



Université de Sfax
*Laboratoire des Sciences des Matériaux et
Environnement*



UNIVERSITÉ DE NANTES

*Laboratoire de Génie des Procédés
Environnement et Agro-alimentaire
UMR-CNRS 6144*

THÈSE (en cotutelle)

Présentée à la Faculté des Sciences de Sfax pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université de Sfax et de l'Université de Nantes

Disciplines : Sciences Biologiques
Génie de Procédés

Intitulée

**Bioréacteur enzymatique couplé à l'ultrafiltration pour la
valorisation des co-produits issus des industries de la pêche.
Application à la seiche *Sepia officinalis*.**

Présentée et soutenue publiquement

Par

Emna SOUFI-KECHAOU

Le 1^{er} Juin 2011 devant le jury composé de :

Président :	M. Amor EL ABED	Professeur, INSTM, Tunis
Rapporteur :	M. Néji GHARSALLAH	Professeur, Faculté des Sciences de Sfax
Rapporteur :	M. André DERATANI	Directeur de recherche CNRS, Université Montpellier II
Examineur :	M. Jean-Pascal BERGÉ	Cadre de recherche HDR, IFREMER, Nantes
Directeur de thèse :	M. Pascal JAOUEN	Professeur, Université de Nantes
Directeur de thèse :	Mme. Raja BEN AMAR	Professeur, Faculté des Sciences de Sfax

A Slim et Zakaria,

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à M. le Professeur Amor El Abed, conseiller et chargé de mission au sein du premier ministère. Je suis très touchée par l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse. Je suis également fière de compter parmi vos étudiants.

Je remercie vivement M. Néji Gharsallah, Professeur à la faculté des sciences de Sfax d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. L'intérêt que vous avez accordé à ce travail est un réel honneur pour moi.

Toute ma reconnaissance s'adresse à M. André Deratani, directeur de recherche au CNRS, d'avoir mis à ma disposition les moyens financiers nécessaires à la réalisation de cette thèse *via* le projet de coopération franco-tunisienne (CMCU) dont il a été le coordinateur, mais surtout d'avoir permis son achèvement dans de bonnes conditions. Je le remercie également d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes deux directeurs de thèse, M. Pascal Jaouen, Professeur à l'Université de Nantes-UMR CNRS GEPEA, et Mme Raja Ben Amar, Professeur à la faculté des sciences de Sfax, pour avoir dirigé cette thèse et de m'avoir ouverte aux techniques de séparation membranaire en me confiant ce sujet de recherche. Leur disponibilité et leur savoir ont permis mon entrée dans le domaine du génie des procédés. Leur expérience universitaire m'a guidée vers les objectifs à atteindre lors de la réalisation d'un travail de recherche. Je les remercie également pour leurs encouragements incessants ainsi que la confiance qu'ils ont eue en moi jusqu'à la fin. Raja, j'ai tellement appris de vous tant sur le plan scientifique qu'humain et c'est grâce à vous que j'ai pu surmonter bon nombre de problèmes administratifs et scientifiques. Pascal, vous n'avez épargné aucun effort afin de mettre à ma disposition les moyens nécessaires pour accomplir ce travail dans les meilleures conditions qui soient. Merci pour tout.

Toute ma reconnaissance s'adresse à M. Jean-Pascal Bergé, cadre de recherche à l'IFREMER de Nantes et responsable du laboratoire des Sciences et Technologies de la Biomasse marine, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe "co-produits" et d'avoir dirigé la partie hydrolyse enzymatique et analyses. Ses précieux conseils et sa responsabilité scientifique m'ont permis d'aller de l'avant tout au long de ce travail. La pertinence de ses remarques et sa clairvoyance ont fait prendre à cette thèse un tournant décisif et passionnant. Jean-Pascal, votre lucidité m'a à maintes reprises remise "sur orbite". Puissiez-vous trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Que M. Francis Quéméneur, Professeur émérite à l'université de Nantes soit assuré de mes plus profonds sentiments de reconnaissance pour sa présence ô combien précieuse durant mes séjours à Saint-Nazaire, particulièrement au GEPEA. Francis, vous avez cru en moi dès les premières semaines de thèse et je ne l'oublierai jamais. Votre soutien infaillible et votre lucidité m'ont permis de surmonter mes difficultés à plusieurs reprises. Merci également de m'avoir fait découvrir la Bretagne et la langue bretonne !

Je souhaite aussi remercier M. Jean-Luc Vallet, précédent 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.

C'est avec beaucoup d'émotion que j'évoque la mémoire de feu Maryse Derouiniot-Chaplain, technicienne de recherche CNRS au laboratoire GEPEA de Saint-Nazaire, qui nous a malheureusement quittés trop tôt. Après tout ce que nous avons partagé durant ces années de thèse, j'aurais tant souhaité qu'elle puisse un jour, lire ce petit paragraphe. J'espère que de là où elle est, mon hommage lui parviendra. Maryse était l'âme du GEPEA, ne ménageant jamais son temps ni ses efforts pour aider les doctorants et stagiaires, souvent aux dépens de sa famille... Elle était sur tous les fronts au labo avec un dévouement exemplaire et une bonne humeur matinale, malgré la journée surchargée qui l'attendait. Je n'oublierais jamais les longs moments passés ensemble à faire des filtrations, souvent à des heures tardives. Maryse, tu as été une amie et une confidente. J'ai constamment en tête ta petite phrase si réconfortante : "Te bile pas Emna". Les mots me manquent pour te remercier... Tu seras toujours présente dans nos mémoires. Adieu Maryse, repose en paix.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Françoise Leroi, Cadre de recherche en microbiologie alimentaire à l'IFREMER de Nantes au département des Sciences et Technologies de la Biomasse Marine pour sa précieuse contribution à la partie recherche d'activités antimicrobiennes, et de m'avoir fait profiter

de ses compétences en microbiologie. Je la remercie aussi pour son enthousiasme, sa disponibilité et ses conseils.

Je remercie également M. Yannick Fleury, Maître de Conférences au Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper (LUMAQ) pour son aide et sa contribution à la partie recherche d'activités antimicrobiennes.

Je désire exprimer ma profonde reconnaissance au personnel de la société "Calemba" et en particulier à Messieurs Ben Romdhane et Khemakhem pour l'intérêt et le soutien qu'ils ont apporté à ce travail, ainsi que pour la fourniture du matériel biologique.

Je remercie les services de coopération et d'action culturelle (SCAC) de l'ambassade de France en Tunisie et l'Agence Universitaire de la Francophonie pour leur soutien financier et pour m'avoir permis de terminer mon travail de recherche dans de bonnes conditions. Merci donc à Mme Imen Annabi, responsable des affaires culturelles à l'IFC et à M. Bernard Le Duc, directeur du bureau de l'Europe de l'Ouest et Maghreb de l'AUF.

Que M. Abderrahmane Bouain, Professeur à la faculté des sciences de Sfax reçoive ici mes plus vifs remerciements pour sa contribution à ce travail ainsi que pour ses conseils, sa disponibilité et sa rigueur scientifique. Puisse ce travail vous satisfaire et vous témoigner de mon profond respect.

Je remercie très sincèrement M. Abdelhamid Ben Salah, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax pour son aide ainsi que ses encouragements.

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

J'adresse également mes sentiments de reconnaissance à tout le personnel de la Faculté des Sciences de Sfax, pour leur aide et leur disponibilité durant ces années de thèse. Que Mme Sadika Feki, responsable du service de troisième cycle soit particulièrement remerciée pour sa disponibilité et sa gentillesse.

J'exprime mes vifs remerciements à M. Nabil Zouari, Professeur et responsable de l'unité de valorisation au Centre de Biotechnologie de Sfax de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour les premiers essais d'hydrolyse enzymatique et pour ses précieux conseils et de m'avoir fait profiter de son expérience.

Que M. Samir Jaoua, Professeur et directeur du laboratoire « Biopesticides » au Centre de Biotechnologie de Sfax, trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour les discussions que nous avons eues avant le début de cette thèse et pour ses nombreux conseils éclairés. J'espère sincèrement pouvoir en bénéficier encore tout au long de ma carrière.

Mes plus sincères remerciements à M. Mahmoud Elyès Hamza, directeur de l'Institut National Agronomique de Tunisie (INAT) pour sa disponibilité et ses conseils. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordée. J'ai toujours été impressionnée par ses qualités humaines et professionnelles.

C'est avec une infinie reconnaissance que je m'adresse maintenant à M^{me} Nejla Bejaoui. Vous avez marqué mon parcours d'étudiante puis d'enseignante à l'Institut National Agronomique de Tunisie, l'INAT. Vos conseils si précieux ont toujours éclairé ma voie. Vous m'avez appris les valeurs de base de la profession d'enseignant universitaire, à savoir l'intégrité et le dévouement pour le savoir. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en me confiant les travaux pratiques d'écologie aquatique. C'est à mon tour maintenant de communiquer à mes étudiants ce que vous m'avez si généreusement inculqué.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à M. M^{ed} Moez Zouari, secrétaire général au Ministère de l'Agriculture et de l'Environnement, pour ses précieux conseils et son aide et quant à l'intégration du corps enseignant de l'INAT. Qu'il trouve ici le témoignage de mon respect.

Que M. Hechmi Missaoui, directeur de la DGPA au Ministère de l'Agriculture soit assuré de mes profonds sentiments de reconnaissance pour son aide et ses conseils judicieux. Je le remercie également pour tout ce qu'il m'a appris au cours de mon cursus universitaire.

Je remercie vivement tous mes enseignants et actuellement collègues du département des Ressources Animales, Halieutiques et des Technologies Agro-alimentaires de l'INAT, de m'avoir tant appris au cours de ma formation universitaire. C'est incontestablement grâce au soutien duquel j'ai bénéficié de leur part que j'ai pu concrétiser ma vocation, l'enseignement, dans cette institution qui m'est si chère. Travailler à leurs côtés est un réel plaisir et j'espère sincèrement pouvoir le faire encore longtemps.

C'est avec beaucoup d'émotion et une infinie gratitude que je m'adresse à Naziha et feu si Mohamed Marrakchi. Vous avez toujours éclairé mon parcours avec vos conseils. J'aurais souhaité que si Mohamed puisse être présent pour ma soutenance. Puisse ce travail rendre hommage au grand homme de science et de savoir qu'il est et qu'il sera toujours. Vos recommandations resteront à jamais gravées dans ma mémoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme Hager Debbabi, Maître-assistante à l'INAT pour son soutien inestimable. En me confiant une partie des travaux pratiques de microbiologie, elle m'a permis d'enrichir mon expérience pédagogique dans un domaine qui me passionne. Je la remercie pour sa confiance, son amitié et ses encouragements infaillibles dans des épreuves parfois difficiles.

Je remercie sincèrement Justine, qui, passée avant moi à l'IFREMER, m'a permis de connaître le "fonctionnement" du laboratoire STAM. Ses conseils toujours avisés et ses grandes qualités humaines ont franchement facilité mon intégration au sein de l'équipe. Un grand merci également pour son amitié et sa présence au tout début de ma thèse.

Une thèse en co-tutelle, c'est également un travail d'équipe sans relâche et sur plusieurs sites. Je voudrais tout particulièrement remercier toutes les personnes rencontrées dans les différents laboratoires où je suis passée et n'ayant jamais lésiné pour m'apporter leur aide précieuse.

Du GEPEA de Saint-Nazaire : Merci à Anthony, Jocelyne et Laurette pour leur sympathie, leur aide et leur présence si agréable.

Du laboratoire STBM (ex STAM) de l'IFREMER de Nantes : Merci à Claire pour sa présence quotidienne, son amitié et son aide pour la réalisation de nombreuses expérimentations. Merci à Jean-Paul pour ses connaissances en GC-MS. Merci à Sandrine qui, malgré le peu de temps passé ensemble, m'a marquée par sa gentillesse et sa simplicité. Merci à Nolwenn, pour ses conseils en matière de lipides et sa générosité. Merci à Christine pour toutes ses connaissances sur les protéines son point de vue « industriel » des choses. Merci à Dédé pour sa grande expérience en laboratoire et ses précieux conseils. Merci Fred et Abdoulaye, les microbiologistes pour leurs nombreux conseils "bactéricides". Merci à Régis pour son aide "mathématique". Merci à Isabelle et Sylvie, pour leur aide administrative et en souvenir de nos conversations matinales à la salle café. Merci à Camille, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa bonne humeur constante. Un grand merci à Laetitia pour ses grandes qualités humaines, son amitié, sa générosité et sa joie de vivre. Merci à Sylvia, Jacqueline et Corinne, les "BMM", ce fut un plaisir de vous côtoyer au quotidien.

Du laboratoire des Sciences des Matériaux et Environnement de la Faculté des Sciences de Sfax : Merci à Khaled, Emna et Elyès pour leur sympathie et leur aide durant mes séjours à Sfax. Merci également à Imen, pour nos récents échanges de mails. Un grand merci à toute l'équipe de l'unité de valorisation du Centre de Biotechnologie de Sfax pour leur aide précieuse et leur accueil durant ma présence parmi eux. Najoua, Imen, Kamel et Nizar, merci pour ces moments inoubliables que nous avons partagé.

Merci à tout le personnel administratif de l'Institut National Agronomique de Tunisie (INAT), en particulier Héla, Monia et Fethi pour m'avoir permis de concilier mes cours avec mes séjours à Nantes.

Au tour maintenant des personnes qui ont fait de ces quatre années passées en France, l'une des expériences les plus inoubliables de ma vie sur le plan humain :

A Zo et Raul, pour votre présence quotidienne à l'IFREMER. Notre soutien mutuel, notre entraide, et souvent nos moments de délire ont fait naître entre nous une amitié sincère. Je n'oublierai jamais cette équipe multiculturelle que nous avons formée. A Christelle et Karine, pour les bons moments passés ensemble. Les filles, vivement un prochain 14 juillet à Nantes ensemble !

A Jeanne-Marie, pour ses encouragements, son aide et sa gentillesse. Je n'oublierai jamais nos moments de confidences et nos longues discussions après chaque retour à Nantes laissant à arrache-cœur mon petit Zak.

A Christine, pour son oreille toujours ouverte et son attention continue envers moi. Je ne te dirais jamais assez à quel point ta présence et ton amitié ont été importants pour moi. Merci d'avoir été là.

A la famille Jaouen, Véronique, Marie, Manon et la petite Adélaïde. Votre accueil si sympathique et votre gentillesse m'ont extrêmement touchée. J'espère de tout cœur que notre amitié ira bien au-delà de la thèse.

A Jean-Pierre et Anne-Marie, merci pour ces magnifiques moments passés à Saint-Nazaire un certain mois de juillet. J'admire votre simplicité et votre sérénité contagieuse ! Jean-Pierre, vous retrouverez certainement un jour la trace de vos ancêtres les Schlumpf à Tabarka !

A Françoise, pour avoir été une mère de substitution et une de mes meilleures amies. Les interminables discussions que nous avons eues sont gravées dans ma mémoire. Merci à toi et à Francis de m'avoir ouvert les yeux sur tellement de choses. Votre main constamment tendue et vos encouragements m'ont aidée à aller de l'avant.

A toute la famille Feki : Madiha, Radhouane, Mehdi, Yessine et Amine, sans qui ma vie à Nantes n'aurait pas été la même. Merci pour votre accueil si convivial en m'offrant la chaleur d'un foyer. Merci Madiha d'avoir été l'amie et la grande sœur. Je ressens encore la joie de te retrouver à mon retour à Nantes, et qui me faisait presque oublier le départ déchirant en laissant les miens. Merci pour ces petites escapades et ces week-ends passés en votre compagnie.

Un grand merci à mes amies de l'INAT, Olfa, Inès, Héla et Frida, tout simplement pour leur présence. Les filles, vous côtoyer au quotidien est tellement agréable. J'espère qu'à présent j'aurais plus de temps à passer en votre compagnie.

A Mahbouba, pour tes conseils et ton soutien indéfectible à toute épreuve. A Dalenda, Héla et Ahmed, Zoheir et Héla, pour vos encouragements permanents.

Je tiens à remercier tout particulièrement les familles Meziou, Kechaou et Ellouze pour leur adorable accueil. Merci à Jalel, Wafa, Habib, Zeineb, Nejib et Zeineb et pour les bons moments passés chez vous durant mes séjours de travail à Sfax. Je remercie également la famille Ben Amar, Slah, Sana, Manel et Syrine pour leur gentillesse et leur joie de vivre contagieuse ! Merci de m'avoir permis de partager des moments si agréables avec vous à Sfax.

A tous mes oncles, tantes et cousins des familles Soufi et Sarraj

Enfin,

A mes parents et à mon frère, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Les mots de remerciements sont si dérisoires face à ce que vous avez fait pour moi. Votre présence est inestimable. Dieu vous garde.

A mes beaux parents pour leur soutien infaillible et leurs encouragements incessants. Merci d'être toujours à mes côtés. Je vous dois tellement de choses... A mes deux sœurs, Saadia et Sonia et leurs conjoints Moez et Sami, pour votre affection et votre présence.

A Zakaria, qui a supporté avec beaucoup de patience mes longues absences... A un an déjà, tu n'avais que deux mots à la bouche : "maman...skype". Merci pour ton courage et de m'avoir facilité la tâche. Papa et toi avez été merveilleux. Je vous promets de rattraper le temps perdu. A ton frère Mohamed Ayoub, qui n'est pas encore là, mais qui m'a donné tellement de force intérieurement.

Et je garde le meilleur pour la fin,

A Slim, pour sa patience exemplaire (il en a fallu, je sais...). C'est grâce à ton soutien que je suis arrivée jusque là. Je te dois tout.

Merci à tous de votre présence à mes côtés.

*Je dédie ce mémoire à mes parents, Hassine et Naima.
Autour de moi tout peut disparaître, je vous
retrouverai toujours à mes côtés. C'est l'image de
votre visage lumineux de fierté qui m'a permis, dans
mes moments de peine et de solitude, d'aller jusqu'au
bout.*

AVANT PROPOS

Cette thèse de doctorat en co-tutelle, entre la Faculté des sciences de Sfax et l'Université de Nantes a été réalisée dans la cadre d'un projet de coopération mixte franco-tunisienne (CMCU 04) au sein d'un projet en réseau élargi (PRE 01). Ce travail de recherche a été en partie financé par le projet via l'organisme EGIDE. Un complément de bourse a été accordé par les Services de Coopération et d'Action Culturelle (SACS) de l'ambassade de France en Tunisie ainsi que par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

En France, ce travail a été réalisé au sein du département des Sciences et Techniques Alimentaires Marines (STAM) du centre Ifremer de Nantes (actuel STBM) et du laboratoire de GENie des Procédés Environnement Agroalimentaire (GEPEA, UMR CNRS-6144) localisé au centre de recherche de transfert technologique, CRTT de Saint-Nazaire. En Tunisie, le travail a été effectué au laboratoire des Sciences des Matériaux et Environnement de la faculté des Sciences de Sfax.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION	20
I. INTRODUCTION GENERALE	20
II. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE.....	24
III. OBJECTIFS DE L'ETUDE	25
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	28
I. CONTEXTE ECONOMIQUE DE L'ETUDE	28
I.1. La pêche et l'aquaculture dans le monde.....	28
I.1.1. Importance des produits de la mer.....	28
I.1.2. Production des produits de la mer : quelques chiffres	28
I.1.3. Situation mondiale de la production et de l'exploitation des céphalopodes.....	30
I.1.4. L'activité de transformation des produits de la mer.....	32
I.2. Les co-produits d'origine marine : situation actuelle de la valorisation.....	37
I.2.1. Les co-produits : définition et contexte économique.....	37
I.2.2. Les voies de bioconversion des co-produits de la pêche	39
I.2.2.1. Les produits destinés à la consommation humaine	39
I.2.2.2. Les farines et huiles	40
I.2.2.2.1 <i>Procédé de fabrication</i>	40
I.2.2.2.2 <i>Les farines</i>	40
I.2.2.2.3 <i>Les huiles de poisson</i>	42
I.2.2.3. Les hydrolysats	43
I.2.2.3.1 <i>Définition</i>	43
I.2.2.3.2 <i>Les autolysats et produits fermentés</i>	44
I.2.2.3.3 <i>Les hétérolysats</i>	44
I.2.2.3.3.1 Les ensilages	44
I.2.2.3.3.2 Les hydrolysats enzymatiques	45
I.2.2.4. Les hachis	46
I.2.2.5. Les composés à haute valeur ajoutée à partir d'hydrolysats marins	47
I.2.2.5.1. <i>Les composés à intérêt nutritionnel</i>	47
I.2.2.5.1.1. Les peptides et acides aminés	47
I.2.2.5.1.2 Les composés lipidiques.....	54
I.2.2.5.2 <i>Les composés à activités biologiques</i>	55
I.2.2.5.2.1 Les peptides.....	55
I.2.2.5.2.2 Les peptides antimicrobiens	57
I.2.2.5.2.3 Les acides gras et phospholipides	57
I.2.2.5.3 <i>Les composés à intérêt fonctionnel</i>	58
I.2.2.5.4 <i>Les hydrolysats en tant que milieu nutritif</i>	59
I.2.2.6. Les autres voies de valorisation	59
I.3. Description de l'espèce étudiée.....	60
I.3.1. Principales caractéristiques morfo-anatomiques et physiologiques.....	60
I.3.1.1. Le viscéropallium	61
I.3.1.2. Le céphalopodium	61

I.3.1.3. Le tractus génital.....	62
I.3.1.4. Le tractus digestif	62
I.3.1.5. Organes spécialisés de la seiche : la glande d'encre.....	64
I.3.1.5.1 Organisation générale de la glande d'encre.....	67
I.3.1.5.2 Mélanogénèse et composition de l'encre de seiche	67
I.3.1.5.3 Importance de l'encre comme système de défense	68
I.3.1.5.4 Propriétés biologiques de l'encre.....	68
I.3.2. Eco-biologie de la seiche	69
I.3.3. Distribution géographique.....	70
I.4. la filière de transformation de la seiche.....	70
I.4.1. Description du procédé	70
I.4.2. Les co-produits issus des industries de conditionnement de la seiche	71
I.5. les voies de valorisation de la masse vicserale	72
I.5.1. Les enzymes	72
I.5.2. Les huiles.....	72
I.5.3. Les lysats.....	72
II. PRODUCTION DE COMPOSES VALORISABLES A PARTIR DES CO-PRODUITS MARINS PAR LES TECHNIQUES DOUCES.....	75
II.1. L'hydrolyse enzymatique.....	75
II.1.1 Les enzymes: définition et classification	75
II.1.2 Définition et principe de l'hydrolyse enzymatique d'une protéine.....	76
II.1.3 Initiation et suivi de la réaction d'hydrolyse.....	77
II.1.3.1. Les paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique.....	77
II.1.3.1.1 La nature du substrat	78
II.1.3.1.2 La nature des enzymes protéolytiques.....	78
II.1.3.1.3 Influence de la température.....	79
II.1.3.1.4 Influence du pH.....	80
II.1.3.1.5 Concentration en enzyme et réaction d'hydrolyse.....	80
II.1.3.2 Le degré d'hydrolyse comme paramètre de suivi	80
II.1.3.2.1 Définition.....	80
II.1.3.2.2 Méthodes de quantification	81
II.1.3.3. Importance des conditions opératoires	84
II.1.3.3.1 Optimisation des conditions d'hydrolyse	84
II.1.3.3.2 Principe de la méthodologie des plans d'expérience	84
II.1.4. Les différents types réacteurs enzymatiques et leur mode de conduite	85
II.1.4.1 Réacteurs en "batch"	86
II.1.4.2 Réacteurs en "fed batch"	87
II.1.4.3 Réacteurs continus et combinaison bioréacteur enzymatique/UF	87
II.1.4.4 Les différents modèles de réacteurs	88
II.1.4.5 Importance de l'agitation dans les réacteurs enzymatiques.....	89
II.2. Les procédés membranaires	89
II.2.1 Définitions et principes de la filtration membranaire	89
II.2.1.1 La membrane.....	89
II.2.1.2 Le procédé de filtration membranaire	90
II.2.2 Les différents procédés de filtration.....	91
II.2.3 Les domaines d'application des procédés membranaires	93
II.2.4 L'ultrafiltration (UF).....	94
II.2.4.1 Les différents modes de filtration.....	95
II.2.4.1.1. La filtration frontale (dead-end filtration).....	95
II.2.4.1.2. La filtration tangentielle (cross-flow filtration).....	96

II.2.4.2 Les modules	96
II.2.4.2.1. Définition	96
II.2.4.2.2. Géométrie des modules et rentabilité économique	96
II.2.4.3. Les membranes	101
II.2.4.3.1 Structure et classification des membranes	101
II.2.4.4 Les principaux paramètres caractérisant le fonctionnement des membranes en ultrafiltration	102
II.2.4.4.1 Le seuil de coupure	102
II.2.4.4.2 La sélectivité ou taux de rétention: TR	102
II.2.4.4.3 La pression transmembranaire	103
II.2.4.4.4 Propriétés hydrodynamiques des fluides dans les modules d'UF	104
II.2.4.4.4.1 Perméabilité de la membrane au solvant	104
II.2.4.4.4.2 Le flux de perméation et le flux de soluté	104
II.2.4.4.5 Les phénomènes limitant le transfert de matière	105
II.2.4.4.5.1 Comportement caractéristique du flux de perméat	105
II.2.4.4.5.2 Couche de polarisation et colmatage	106
II.2.4.4.6 Nettoyage des membranes	110
II.2.4.4.7 Mesure de la nettoyabilité	111
III. UTILISATION DES PROCÉDES DE SÉPARATION POUR LE FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS PROTEIQUES	111
III.1. Fractionnement par la taille: l'ultrafiltration	112
III.1.1 Caractéristiques séparatives	113
III.1.2 Fractionnement membranaire d'hydrolysats dotés d'activités biologiques ...	113
III.2 Fractionnement selon la charge des peptides: la chromatographie échangeuse d'ions	119
III.2.1 Le principe de l'échange d'ions	119
III.2.2 La séparation par extraction sur phase solide (SPE: Solid Phase Extraction)	119
III.2.3 Echange d'ions en chromatographie d'élution: application aux acides aminés	121
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	122
I. INFLUENCE DU CHOIX DU SUBSTRAT ET DES CONDITIONS D'HYDROLYSE	122
I.1. Définition des objectifs de l'étude	122
I.2. Matériel biologique	123
I.2.1. Origine de la matière première	123
I.2.2. Préparation des matrices	124
I.3. Matériel enzymatique	124
I.3.1. Protamex	125
I.3.2. Alcalase	125
I.3.3. Flavourzyme	125
I.3.4. Delvolase	126
I.3.5. Pepsine	126
I.3.6. Multifect Neutral	127
I.4. Détermination de l'activité spécifique des enzymes et des matrices	128
I.4.1. Activités spécifiques des enzymes commerciales	128
I.4.2. Activité protéolytique des viscères de seiche	129
I.5. Hydrolyses enzymatiques	130
I.5.1. Equipement, installations et conditions opératoires	130
I.5.1.1. Hydrolyses à l'échelle de laboratoire	130

1.5.1.1.1. Hydrolyses de longue durée avec régulation de pH.....	130
1.5.1.1.2. Hydrolyses de 6 heures sans contrôle de pH.....	132
1.5.1.2. Hydrolyses à l'échelle pilote.....	133
1.5.1.3. Arrêt des réactions d'hydrolyse.....	136
1.5.2. Suivi de la cinétique des hydrolyses.....	136
1.5.2.1. Hydrolyses de longue durée : méthode du pH-Stat.....	136
1.5.2.1.1. Principe.....	136
1.5.2.1.2. Calcul du degré d'hydrolyse (DH).....	138
1.5.2.2. Hydrolyses sans régulation de DH: méthode au DNFB.....	139
1.5.2.2.1. Principe.....	139
1.5.2.2.2. Protocole opératoire et calculs.....	139
1.5.3. Optimisation des hydrolyses : méthodologie des plans d'expérience.....	140
1.5.3.1. Objectif.....	140
1.5.3.2. Principe.....	141
1.5.3.3. Montage et conditions opératoires.....	142
1.5.3.4. Paramètres étudiés.....	144
II. FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS.....	145
II.1. Fractionnement par la charge : chromatographie échangeuse d'ions.....	145
II.1.1. Objectifs.....	145
II.1.2. Purification par extraction solide-liquide sur les colonnes SPE Chromabond.....	145
II.1.2.1. Procédure et principe de fonctionnement.....	145
II.1.2.2. Equipement et supports d'extraction solide-liquide.....	147
II.1.2.3. Mise au point d'un protocole expérimental.....	149
II.1.3.3.1. Préparation de l'échantillon.....	149
II.1.3.3.2. Procédure SPE.....	149
II.2. L'ultrafiltration : fractionnement par la taille.....	152
II.2.1. Objectifs.....	152
II.2.2. Essais préliminaires : ultrafiltration à l'échelle de laboratoire.....	153
II.2.2.1. Equipement.....	154
II.2.2.2. Mode opératoire.....	156
II.2.3. Ultrafiltration à échelle pilote.....	156
II.2.3.1. Equipement.....	156
II.2.3.2. Caractéristiques des membranes utilisées.....	158
II.2.3.3. Nettoyage des membranes.....	158
II.3.4. Les conditions de filtration.....	160
II.3.5. Performance des membranes.....	161
II.3.5.1. Détermination de la perméabilité à l'eau.....	161
II.3.5.2. Tests d'adsorption statique.....	161
III. ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	162
III.1. Le pourcentage d'humidité et de matière minérale.....	162
III.2. Analyse des protéines.....	163
III.2.1. Dosage des protéines totales.....	163
III.2.1.1. Principe.....	163
III.2.1.2. Protocole.....	164
III.2.2. Dosage des protéines solubles.....	165
III.2.2.1. Principe.....	165
III.2.2.2. Protocole.....	165
III.2.3. Dosage des acides aminés.....	166
III.2.4. Profils moléculaires des peptides solubles par chromatographie d'exclusion stérique (SE-FPLC).....	169

III.2.4.1. Principe	169
III.2.4.2. La chromatographie à moyenne pression	170
III.3. Analyse des lipides	171
III.3.1. Extraction et dosage des lipides	171
III.3.1.1. Choix de la méthode	171
III.3.1.2. Extraction et dosage des lipides totaux par la méthode de Folch	171
III.3.1.3. Dosage des lipides par RMN basse résolution	173
III.3.1.3.1. Principe du dosage	173
III.3.1.3.2. Appareillage	174
III.3.1.3.3. Protocole expérimental	173
III.3.1.4. Analyse des classes de lipides par CCM	175
III.3.1.5. Dosage des phospholipides	177
III.3.1.6. Fractionnement des lipides en chromatographie liquide	178
III.3.1.7. Analyse des acides gras par CPG-SM	179
III.3.1.7.1. Dérivation des acides gras	179
III.3.1.7.2. Analyse des esters méthyliques d'acides gras par CPG-SM	179
IV. VALORISATION DES HYDROLYSATS EN TANT QU'INHIBITEURS DE CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES: TESTS <i>IN VITRO</i>	181
IV.1. Objectifs et choix des micro-organismes	181
IV.2. Essais sur les peptides produits par les hydrolyses	181
IV.2.1. Micro-organismes, caractéristiques et conditions de culture	182
IV.2.2. Techniques expérimentales	184
IV.3. Essais sur les hydrolysats issus du plan d'expérience	187
IV.3.1. Micro-organismes, caractéristiques et conditions de culture	187
IV.3.2. Protocole expérimental	192
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	196
I. Influence du choix du substrat et des conditions d'hydrolyse	196
I.1. Les co-produits de sieche générés par les industries de transformation des produits de la mer	196
I.1.1. Bilan massique de la chaîne de transformation	196
I.1.2. Caractérisation biochimique des matrices non hydrolysées	197
I.1.2.1. Composition biochimique proximale	197
I.1.2.2. Analyse des protides	198
I.1.2.2.1. Les protéines totales et les acides aminés	198
I.1.2.2.2. Les profils peptidiques	201
I.1.2.3. Analyse des lipides	202
I.1.2.3.1. Les lipides totaux et les acides gras	202
I.1.2.3.2. Les lipides neutres, glycolipides et phospholipides	204
I.1.2.3.3. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	205
I.1.2.4. Discussion	206
I.2. Détermination de l'activité protéolytique des enzymes et des viscères de seiche	209
I.2.1. Activité spécifique des enzymes commerciales	209
I.2.2. Activité spécifique des enzymes endogènes	210
I.3. Hydrolyses à l'échelle de laboratoire	212
I.3.1. Hydrolyses de 24 h avec contrôle de pH	212
I.3.1.1. Suivi de la cinétique d'hydrolyse et répartition de la matière	213
I.3.1.2. Solubilisation des protéines	216
I.3.1.3. Libération des lipides	217
I.3.1.4. Distribution des phospholipides	218

I.3.1.5. Distribution des acides gras	219
I.3.1.6. Profils moléculaires des peptides	220
I.3.1.7. Composition en acides aminés	220
I.3.1.8. Discussion	223
I.3.2. Hydrolyses de 6 h sans contrôle de pH	229
I.3.2.1. Suivi de la cinétique enzymatique et répartition de la matière au cours du temps	229
I.3.2.2. Solubilisation des protéines	236
I.3.2.3. Libération des lipides	238
I.3.2.4. Distribution des phospholipides	240
I.3.2.5. Profil des poids moléculaires des peptides	242
I.3.2.6. Analyse des acides aminés	245
I.3.2.7. Tests d'activités antimicrobiennes	250
I.3.2.8. Discussion	252
I.3.3. Optimisation des hydrolyses avec Pepsine	260
I.3.3.1. Conduite du plan d'expérience	261
I.3.3.2. Détermination des conditions optimales d'hydrolyse	265
I.3.3.3. Discussion	267
I.4. Etude de la cinétique de croissance des pathogènes marins en présence des hydrolysats de Pepsine	269
I.4.1. Etude de l'évolution de la croissance de la biomasse bactérienne en fonction des 20 peptides du plan d'expérience	269
I.4.2. Comparaison de la cinétique de croissance des micro-organismes	274
I.4.3. La régression linéaire	276
I.4.4. Discussion	278
I.5. Production de l'hydrolysate à échelle pilote	279
I.5.1. Mise au point d'un procédé d'hydrolyse pilote	280
I.5.1.1. Vérification de la technique d'inactivation thermique de l'enzyme	280
I.5.1.2. Vérification de la cinétique d'hydrolyse à échelle pilote	281
I.5.2. Caractérisation de l'hydrolysate à échelle pilote	282
I.5.2.1. Protéines, lipides et phospholipides	282
I.5.2.2. Analyse des profils peptidiques	284
I.5.2.3. Analyse de la composition en acides aminés	284
I.5.2.4. Vérification de l'activité antibactérienne	286
II. FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT	288
II.1. Fractionnement de l'hydrolysate par la charge ionique	288
II.1.1. Essais sur les colonnes SPE (SAX et SCX)	288
II.1.1.1. Rapports massiques	288
II.1.1.2. Analyse des activités antimicrobiennes	289
II.1.1.2.1. <i>Screening de l'activité antimicrobienne</i>	289
II.1.1.2.2. <i>Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)</i>	290
II.1.1.3. Distribution des poids moléculaires des peptides	291
II.1.2. Discussion	293
II.2. Fractionnement de l'hydrolysate par procédé membranaire	295
II.2.1. Essais préliminaires à l'échelle de laboratoire	295
II.2.1.1. Choix du matériau membranaire et du seuil de coupure	295
II.2.1.1.1. <i>Mesure de l'affinité peptides/matériaux membranaires</i>	295
II.2.1.1.2. <i>Perméabilité à l'eau et flux de perméation de l'hydrolysate</i>	297
II.2.1.1.3. <i>Effet sur les populations peptidiques</i>	305
II.2.1.1.4. <i>Rétention des lipides</i>	314

II.2.1.1.5. Analyse de la composition en acides aminés	315
II.2.1.2. Activité antimicrobienne	318
II.2.1.2.1. Screening de l'activité antibactérienne	318
II.2.1.2.2. Méthode des gels recourverts	319
II.2.1.3. Discussion	320
II.2.2. Essais de filtration membranaire à échelle pilote	324
II.2.2.1. Tests d'adsorption.....	325
II.2.2.2. Filtration de l'hydrolysate.....	327
II.2.2.3. Suivi du flux de perméation et régénération des membranes	328
II.2.2.4. Analyses biochimiques.....	331
II.2.2.5. Analyse des poids moléculaires des populations peptidiques	334
II.2.2.5.1. Profils chromatographiques et intégration des aires	334
II.2.2.5.2. Courbes de tamisage	342
II.2.2.6. Analyse de la composition en acides aminés.....	343
II.2.2.7. Tests d'activité antimicrobienne.....	346
II.2.2.8. Discussion	347
II.2.2.8.1. Choix des membranes	347
II.2.2.8.2. Flux de perméation et nettoyage des systèmes	348
II.2.2.8.3. Sélectivité des membranes et distribution des peptides et lipides	349
II.2.2.8.4. Up-scaling et transposition du procédé	351
II.3. Transposition à échelle industrielle : intégration de l'hydrolyse et du fractionnement sur membrane dans un procédé industriel complet.....	352
II.3.1. Architecture du procédé et opérations unitaires	352
II.3.2. Concentration par nanofiltration.....	356
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	358
BIBLIOGRAPHIE	367

INDEX DES FIGURES DE L'INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Différentes voies de valorisation des co-produits marins.

INDEX DES FIGURES DU CHAPITRE I

Figure I.1 : Production mondiale des pêcheries en millions de tonnes provenant des pêches de capture et de l'aquaculture de 1950 à nos jours (FAO 2005)	29
Figure I.2 : Production mondiale des pêches de capture et de l'aquaculture en Chine et dans le monde de 1950 jusqu'à nos jours (FAO 2007).....	29
Figure I.3 : Production du secteur des pêches de capture dans l'Atlantique Nord-Est et en Méditerranée et mer noire depuis 1970 jusqu'à nos jours (FAO 2007). NIA : Non Inclus Ailleurs.....	30
Figure I.4 : Répartition des ventes en quantité de la seiche selon les principaux quartiers maritimes en 2003.....	32
Figure I.5 : Volume (tonne) des exportations par type de produit en 2007. A : vers l'Espagne. B : vers l'Italie. C : vers l'Allemagne (Source : OFIMER 2008).....	33
Figure I.6 : Valeur (1000€) des exportations par type de produit en 2007. A : vers l'Espagne. B : vers l'Italie. C : vers l'Allemagne (Source : OFIMER 2008).....	35
Figure I.7 : Evolution de la production des produits congelés entre 2002 et 2007 en Tunisie (Source : FAO 2008).....	39
Figure I.8 : Procédé de fabrication d'huiles et de farines de poisson.....	41
Figure I.9 : Principaux pays producteurs de farines de poissons (Source : FAO 2007)	41
Figure I.10 : Principaux pays producteurs de farines d'abats de crustacés (Source : FAO 2007)	42
Figure I.11 : Utilisation des huiles de poisson durant la période 1990-2010 (Source IFFO) ..	43
Figure I.12 : Procédés de fabrication de farines, autolysats, ensilages et hydrolysats.....	45
Figure I.13 : Représentation schématique en coupe de la membrane plasmique.....	58
Figure I.14 : Morphologie de <i>Sepia officinalis</i>	61
Figure I.15 : Organisation morpho-anatomique de <i>Sepia officinalis</i> . A. Vue dorsale (D'après Tompsett 1939, modifié). B. Vue ventrale après dissection.....	63
Figure I.16 : Coupe transversale de <i>Sepia officinalis</i> montrant les structures et organes constituant le viscéropallium (D'après Mangold et al. 1989, modifié).....	64
Figure I.17 : Organisation de l'appareil génital du mâle de <i>Sepia officinalis</i> . A : appareil génital. B : tractus dévaginé (D'après Tompsett 1939, modifié)	64
Figure I.18 : Organisation de l'appareil génital de la femelle <i>Sepia officinalis</i>	65
Figure I.19 : Schéma de l'appareil digestif de <i>Depia officinalis</i> (d'après Mangold et al. 1989, modifié)	66
Figure I.20 : Localisation et importance de la glande d'encre chez le mâle (a) et la femelle (b)	67
Figure I.21 : Biosynthèse de l'eumélanine (d'après Wakamatsu et Ito 2001).....	69
Figure I.22 : Répartition géographique de l'espèce <i>Sepia officinalis</i> (Adaptée de Boletzky, 1983).....	70
Figure I.23 : Etapes de transformation de la seiche à CALEMBO	73
Figure I.24 : Principaux co-produits de seiche.....	74
Figure I.25 : Schéma de l'hydrolyse d'une protéine (d'après Sousa et al. 2004)	77
Figure I.26 : Schéma réactionnel de la libération des protons H ⁺ lors de l'hydrolyse enzymatique	78
Figure I.27 : Effet de la concentration en enzyme sur la quantité de substrat formé au cours du temps (A) et sur la vitesse de réaction (B) (d'après Cuvellier 1999).....	80
Figure I.28 : Réaction entre le DNFB et le groupement amine.....	82
Figure I.29 : Exemple de bioréacteur à membrane	87

Figure I.30 : Différents modèles de bioréacteurs enzymatiques utilisés à échelle de laboratoire. A : Réacteur 800 mL. B et C : Réacteurs 2 L.....	88
Figure I.31 : Principe de fonctionnement d'une membrane semi-perméable. A (●) : les espèces qui traversent la membrane. B (○) : espèces retenues	90
Figure I.32 : Classification des procédés de séparation par membrane (d'après Jaouen 1989) en fonction de la force motrice et de la taille des particules.....	91
Figure I.33 : Mécanismes de transfert sélectif au passage d'une membrane sous l'effet de la pression. Exemple de filtration frontale et tangentielle	95
Figure I.34 : Principe de la filtration tangentielle	96
Figure I.35 : Exemple de module plan à cassette de filtration (échelle de laboratoire).....	97
Figure I.36 : Module à membrane tubulaire.....	97
Figure I.37 : Module spiralé de filtration	98
Figure I.38 : Module à fibres creuses.....	99
Figure I.39 : Représentation du taux de rétention d'une membrane réelle	103
Figure I.40 : Comportement du flux de filtration en fonction du temps	105
Figure I.41 : Représentation schématique des différences de perméabilité entre un solvant pur et un fluide biologique	106
Figure I.42 : Formation de la couche de polarisation.....	107
Figure I.43 : Polarisation de concentration sans couche de gel (a) et avec couche de gel (b).....	107
Figure I.44 : Différents phénomènes de colmatage. A : Adsorption, B : Formation d'un gâteau, C : Obstruction des pores	108
Figure I.45 : Formation du colmatage interne.....	109
Figure I.46 : Colmatage en profondeur des membranes	109
Figure I.47 : Protocole général d'une extraction solide-liquide.....	120

INDEX DES FIGURES DU CHAPITRE II

Figure II.1 : Localisation de la zone de capture des seiches utilisées pour ce travail selon la répartition des zones de pêche de la FAO (FAO fisheries departement 2005).....	123
Figure II.2 : Séquence peptidique de la Pepsine. (Source : www.sigmaaldrich.com)	127
Figure II.3 : Installation réalisée au laboratoire pour l'hydrolyse enzymatique avec contrôle de pH.....	131
Figure II.4 : Equipement utilisé pour la régulation du pH	132
Figure II.5 : Dispositif d'hydrolyse enzymatique sans régulation de pH à échelle de laboratoire	133
Figure II.6 : Etapes de l'hydrolyse enzymatique (24 h et 6 h) à l'échelle de laboratoire	134
Figure II.7 : Dispositif d'hydrolyse enzymatique à pH libre à l'échelle pilote.....	135
Figure II.8 : Réaction de base du dosage au DNFB.....	139
Figure II.9 : Absorbance à 410 nm en fonction de la concentration en leucine.....	140
Figure II.10 : Représentation d'un plan central composite (D'après Davis 1985)	142
Figure II.11 : Montage en série réalisé pour le plan d'expérience.....	143
Figure II.12 : Principales étapes de fonctionnement des colonnes CHROMABOND®.....	147
Figure II.13 : Principaux composants d'une colonne SPE.....	148
Figure II.14 : Montage effectué au labo pour l'extraction solide-liquide simultanée des échantillons.....	149
Figure II.15 : Processus d'extraction en phase solide dans l'enceinte sous vide	150
Figure II.16 : Diagramme montrant les introns et les exons des différents procédés de traitement	152
Figure II.17 : Eléments composant l'unité de filtration Amicon®	154
Figure II.18 : Installation au laboratoire du système de filtration Amicon®	155
Figure II.19 : Photo et schéma de principe du pilote de filtration UF/NF Microlab 40 (VMA)	157

Figure II.20 : Installation du pilote et système d'acquisition des données	158
Figure II.21 : Unité de distillation utilisée au laboratoire pour le dosage de l'azote total	164
Figure II.22 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Bradford	166
Figure II.23 : Modes de détection FID en chromatographie phase gazeuse	169
Figure II.24 : Chaîne de séparation des poids moléculaires utilisée	170
Figure II.25 : Technique d'extraction des lipides par la méthode Folch.....	171
Figure II.26 : Appareil RMN Minispec PC 120 utilisé	174
Figure II.27 : Principe de fonctionnement du Minispec.....	174
Figure II.28 : Schéma de réalisation d'une CCM préparative.....	176
Figure II.29: Courbe étalon du dosage des PL au ferrothiocyanate d'ammonium	177
Figure II.30 : Mode de détection SM de la chromatographie en phase gazeuse.....	180
Figure II.31 : Schéma de dépôt des échantillons sur la géloseensemencée	184
Figure II.32 : Schéma de mesure du halo d'inhibition du puits d'un agent bactérien	185
Figure II.33 : Représentation schématique des résultats possibles d'un antibiogramme.....	185
Figure II.34 : Procédure de stérilisation des échantillons à analyser par filtration	193
Figure II.35 : Schéma de dépôt des échantillons sur les microplaques.....	193
Figure II.36 : Technique turbidimétrique utilisée dans le Bioscreen pour la mesure de biomasse (Delignette-Muller 1995).....	194
Figure II.37 : Schéma d'une cinétique théorique simplifiée de croissance d'un micro-organisme.....	195

INDEX DES FIGURES DU CHAPITRE III

Figure III.1 : Proportion des différents co-produits obtenus à l'issue du processus de transformation à l'usine en vue d'exportation	197
Figure III.2 : Proportions des composants chimiques majeurs et de cendres dans les viscères de seiche avec et sans la glande d'encre	198
Figure III.3 : Schéma de synthèse de la mélanine.....	201
Figure III.4 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sue colonne Superdex peptide HR 10/30 des viscères de seiche avec (V+E) et sans encre (V-E) non hydrolysés. Calibration : Ribonucléase A (13700 Da), Insuline (5700 Da), Insuline B (3400 Da), Vitamine B12 (1300 Da), Bradykinine (1060 Da), Leu-Tyr (294 Da)...	202
Figure III.5 : Répartition des classes de lipides dans les viscères de seiche avec et sans la glande d'encre.....	204
Figure III.6 : Analyse de l'extrait lipidique des viscères de seiche sans encre (V-E) par CCM	205
Figure III.7 : Les trois phases (lipidique, soluble et insoluble) obtenues après centrifugation de l'hydrolysate de 24 heures des viscères de seiche sans encre	213
Figure III.8 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse des viscères de seiche sans encre par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C	214
Figure III.9 : Composition biochimique (en %) de la fraction soluble, huileuse et insoluble des hydrolysats de seiche par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C	215
Figure III.10 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les viscères de seiche 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.....	216
Figure III.11 : Teneur (en %) des protéines dans la phase soluble des viscères avant et après hydrolyse des viscères de seiche par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH8, 50°C et pendant 24 h.....	217

- Figure III.12 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de seiche. 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. 218
- Figure III.13 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de seiche 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%. 219
- Figure III.14 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de viscères de seiche lors des hydrolyses de 24 h à pH 8 et à 50°C. A : viscères de seiche brutes; B: viscères de seiche hydrolysées avec Protamex 0,1%, C : viscères de seiche hydrolysées avec Alcalase 0,1%; C : viscères de seiche hydrolysées avec Flavourzyme 1,5%. (1) Ribonuclease (13,700 Da); (2) Vasopressin (1,084 Da); (3) Leucin-Tyrosin (294 Da) 221
- Figure III.15 : Evolution du pH au cours des 6 h d'hydrolyse avec Protamex, Delvolase, Pepsine et Multifect Neutral. A : viscères avec encre. B : viscères sans encre 230
- Figure III.16 : Aspect qualitatif du substrat V+E. A : avant hydrolyse. B : Après hydrolyse 231
- Figure III.17 : Les différentes phases (aqueuse et insoluble) obtenues après centrifugation de l'hydrolysate de 6 h. A : hydrolysate brut. B : hydrolysate centrifugé 231
- Figure III.18 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de la réaction de 6 heures par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral. A : Viscères sans encre. B : Viscères avec encre 232
- Figure III.19 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Protamex. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH du substrat et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%. 234
- Figure III.20 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Pepsine. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH 2 et à 45°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%. 234
- Figure III.21 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Delvolase. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH 10 et à 55°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%. 234
- Figure III.22 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Multifect Neutral. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH 10 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%. 235
- Figure III.23 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et après autolyse pendant 6h à pH du substrat et à 50°C, avec 1 volume d'eau. 235
- Figure III.24 : Evolution du contenu en protéines pendant 6 h d'hydrolyse des viscères de seiche avec encre avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral et les enzymes endogènes. A : Phase soluble. B : Phase insoluble 236
- Figure III.25 : Evolution du contenu en protéines pendant 6 h d'hydrolyse des viscères de seiche sans encre avec Protamex, Pepsine, Delvolase, Multifect Neutral et les enzymes endogènes. 237

Figure III.26 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche avec encre en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%	239
Figure III.27 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche sans encre en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%	240
Figure III.28 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche avec encre (V+E) en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%.....	241
Figure III.29 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche sans encre (V-E) en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%.....	241
Figure III.30 : Pourcentages relatifs des molécules réparties par taille (en Dalton) selon les profils obtenus après élution sur colonne Superdex HR 10/30 des viscères de seiche avec encre lors des hydrolyses de 6 h avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral	243
Figure III.31: Pourcentage relatif des peptides répartis par taille (en Dalton) selon les profils obtenus après élution sur la colonne Superdex HR 10/30 des viscères de seiche avec encre lors des hydrolyses de 6 h avec Pepsine.....	244
Figure III.32 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 10/30 de viscères de seiche (V+E) après des hydrolyses de 6 h avec Pepsine. <i>Les courbes 5h et 6h d'hydrolyse sont confondues.</i>	245
Figure III.33 : Résultats des tests antimicrobiens des hydrolysats de 6 h des viscères de seiche (V+E et V-E) avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral sur les souches bactériennes testées.....	250
Figure III.34 : Gel SDS-PAGE recouvert d'une géloseensemencée avec <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 10778. Puits : 1 : Pepsine(V+E), 2 : Pepsine (V-E), 4 : Protamex (V+E), 6 : Protamex (V-E) 7 : Delvolase (V+E), 8 :Delvolase (V-E), 9 : Multifect Neutral (V+E), 10 : Multifect Neutral (V-E)	251
Figure III.35 : Répartition de la matière sèche parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine.....	262
Figure III.36 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine.....	264
Figure III.37 : Quantités des acides aminés (en mmole/mg de matière sèche) libérés dans les hydrolysats du plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine	264
Figure III.38 : Diagramme de Pareto réalisé après obtention des réponses du plan d'expériences pour le DH.	265
Figure III.39 : Diagramme d'ajustement du modèle réalisé pour le degré d'hydrolyse et le rapport E/S.	266
Figure III.40 : Evolution de croissance de la bactérie <i>Shewanella putrefaciens</i> sur milieu de culture seul et en présence des peptides issus des hydrolyses conduites selon les conditions fixées par le PE avec la Pepsine.....	270

Figure III.41 : Evolution de la croissance bactérienne sur milieu de culture seul ou en présence des peptides issus des hydrolyses conduites selon les conditions préconisées par le plan d'expérience.....	271
Figure III.42 : Evolution de la croissance bactérienne sur milieu de culture seul ou en présence des peptides issus des hydrolyses conduites selon les conditions préconisées par le plan d'expérience.....	272
Figure III.43 : Cinétique de croissance bactérienne sur milieu de culture seul (témoin).....	274
Figure III.44 : Cinétique de croissance bactérienne sur milieu de culture en présence de l'hydrolysats n°15	275
Figure III.45 : Courbes d'inactivation thermique de la Pepsine obtenues à échelle de laboratoire et à échelle pilote. Les hydrolyses ont été réalisées pendant 2 h à 45°C, avec un rapport E/S de 0,1% et 1 volume d'eau (v/p)	281
Figure III.46 : Evolution de la cinétique d'hydrolyse avec Pepsine à l'échelle de laboratoire et à échelle pilote. Les hydrolyses ont été conduites pendant 2 h à 45°C avec 0,1% d'enzyme (p/p) et avec 1 volume d'eau (v/p).....	282
Figure III.47 : Profils moléculaires des peptides générés durant l'hydrolyse avec Pepsine (2 h, 45°C) à échelle de laboratoire et à l'échelle pilote des viscères de seiche avec encre .	285
Figure III.48 : Profils chromatographiques de la fraction active cationique et de la fraction non retenue issues du fractionnement par la charge sur les colonnes SPE de l'hydrolysats des viscères de seiche produit par Pepsine à échelle pilote. Calibrations : 1= 7330 Da ; 2 = 3142 Da ; 3 = 2168 Da ; 4 = 1040 Da ; 5 = 496 ; 6 = 250 Da).....	292
Figure III.49 : Test d'adsorption statique : influence du matériau et du seuil de coupure sur les interactions peptides/membrane (Conditions : T = 4°C, 12 h, C ₀ = 100 g.L ⁻¹).....	296
Figure III.50 : Variation du flux de perméation à l'eau (initial et final) en fonction du temps pour les membranes en cellulose régénérée de 1, 5, 10, 30 et 100 kDa à une pression de 2 bars. θ_i : température initiale de l'eau avant filtration. θ_f : température du filtrat ..	300
Figure III.51 : Variation du flux de perméation à l'eau (initial et final) en fonction du temps pour les essais à petite échelle sur les membranes PES de 5 et 30 kDa. P = 2 bars. θ_i : température initiale de l'eau avant filtration. θ_f : température du filtrat	301
Figure III.52 : Variation en fonction du temps du flux de perméation de l'hydrolysats produit avec Pepsine (45°C, pH2) pour les essais à petite échelle avec les membranes en cellulose de 1, 10 et 100 kDa en mode concentration FRV = 4 et à P = 2 bars. θ_i : température initiale de l'eau avant filtration. θ_{fp} : température du finale du perméat. θ_{fcc} : : température du finale du concentrat.	303
Figure III.53 : Variation en fonction du temps du flux de perméation de l'hydrolysats produit avec Pepsine (45°C, pH2) pour les essais à petite échelle avec les membranes en cellulose et en PES de 5 et 30 kDa en mode concentration FRV = 4 et à P = 2 bars ...	304
Figure III.54 : Répartition globale des peptides dans le rétentat et le perméat en fonction du matériau et du seuil de coupure de la membrane après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de seiche sur le mini-pilote Amicon. P = 2 bars, FRV = 4).....	306
Figure III.55 : Distribution des poids moléculaires des peptides dans le perméat et le rétentat de l'hydrolysats de Pepsine fractionné sur les membranes en cellulose régénérée avec le mini-pilote Amicon®	307
Figure III.56 : Distribution des poids moléculaires des peptides dans le perméat et le rétentat de l'hydrolysats de Pepsine fractionné sur les membranes en PES avec le mini-pilote Amicon®	308
Figure III.57 : Profils chromatographiques des perméats obtenus après fractionnement de l'hydrolysats de Pepsine sur les membranes en CR de 1, 5, 10, 30 et 100 kDa et en PES de 5 et 30 KD avec le mini-pilote Amicon	309

Figure III.58 : Comparaison entre les profils d'élution des perméats obtenus après fractionnement de l'hydrolysate de Pepsine sur les membranes en CR et en PES de 5 et 30 KD avec le mini-pilote Amicon®	310
Figure III.59 : Taux de rétention calculés pour les membranes en PES et en CR testées à échelle de laboratoire, obtenus après fractionnement de l'hydrolysate de Pepsine des viscères de seiche à échelle de laboratoire.....	312
Figure III.60 : Courbes de tamisage des 7 membranes testées, obtenues après filtration de l'hydrolysate de Pepsine des viscères de seiche à échelle de laboratoire (2 bars, FRV= 4)	313
Figure III.61 : Répartition des lipides dans le rétentat et le perméat en fonction du seuil de coupure et du matériau membranaire après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de seiche lors sur le mini-pilote Amicon	315
Figure III.62 : Gel SDS-PAGE recouvert d'une gélose ensemencée avec <i>B.megaterium</i> . Puits : 1. Rétentats PES 5 kDa, 2. Rétentat CR 1 kDa, 3. CR 5 kDa.....	319
Figure III.63 : Evolution du flux de perméat de l'hydrolysate des viscères de seiche en fonction du temps fractionné avec les membranes XP117 et ES 404 à 25°C et à P = 5 bars en mode concentration FRV = 4. L'hydrolysate est obtenu avec Pepsine à échelle pilote (pH 2, 45°C) pendant 2heures.....	327
Figure III.64 : Evolution des flux de perméat à l'eau obtenus après chaque étape du cycle de filtration en fonction du temps avec un PTM = 15 bars et à 25°C pour les membranes XP 117 et ES 404.....	329
Figure III.65 : Flux de perméat à l'eau obtenus après passage de l'échantillon d'hydrolysate et après chaque étape de la procédure de nettoyage avec un PTM = 15 bars et à 25°C pour les membranes XP 117 et ES 404	330
Figure III.66 : Profils chromatographiques des rétentats et des perméats obtenus à la suite de la filtration de l'hydrolysate sur les membranes ES404 (A) et XP117 (B) à 5 bars, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$ et FRV = 4.....	335
Figure III.67 : Comparaison des profils chromatographiques des perméats (A) et rétentats (B) des membranes ES404 et XP117 à 5 bars, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$ et FRV = 4.....	338
Figure III.68 : Taux de rétention des peptides (%) par classe de poids moléculaires calculés après filtration de l'hydrolysate des viscères de seiche avec la membrane ES404 et la membrane XP117. PTM = 5 bars, FRV = 4, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$	340
Figure III.69 : Répartition des poids moléculaires des peptides dans le perméat issu de la filtration de l'hydrolysate des viscères de seiche avec la membrane ES404 et la membrane XP117. PTM = 5 bars, FRV = 4, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$	341
Figure III.70 : Evolution du taux de rétention en fonction du poids moléculaire (Daltons) des membranes en PES 4 kDa (ES404) et PES modifié (XP117) au cours de la concentration de l'hydrolysate des viscères de seiche. Conditions : PTM = 5 bars, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, FRV = 4, $v = 2,5 \text{ m.s}^{-1}$).....	342
Figure III.71 : Répartition des concentrations en acides aminés (en mmole/ mg M.S) dans les perméats issus des filtrations sur les membranes 4 kDa (PES et PES modifié). Conditions : PTM = 5 bars, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, FRV = 4, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$).....	344
Figure III.72 : Répartition des avides aminés (%) dans les fractions (perméat et rétentat) obtenues après filtration de l'hydrolysate des viscères de seiche sur les membranes 4 kDa PES (A) et 4 kDa PES modifié (B). Conditions : PTM = 5 bars, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, FRV = 4, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$).....	345
Figure III.73 : Architecture d'un procédé industriel intégré : conception et agencement des éléments et opérations unitaires.....	355

INDEX DES TABLEAUX DU CHAPITRE I

Tableau I.1 : Evolution de la production de conserves de sardine entre 2003 et 2007 (Source : GICA /GIPP).....	36
Tableau I.2 : Evolution de la production des conserves de thon entre 2003 et 2007 (Source : GICA /GIPP).....	36
Tableau I.3 : Exportations des produits de la mer congelés entre 2003 et 2007 (Source : GICA)	37
Tableau I.4 : Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse des co-produits marins.....	48
Tableau I.5 : Principales activités biologiques des peptides d'organismes marins.....	56
Tableau I.6 : Classification des protéases	76
Tableau I.7 : Comparaison entre les principales méthodes de quantification du DH	83
Tableau I.8 : Exemples d'études ayant utilisé la méthodologie de PE pour les co-produits marins.....	86
Tableau I.9 : Classification et caractéristiques des procédés de séparation membranaires	91
Tableau I.10 : Procédés membranaires connaissant un développement industriel et leurs champs d'application	94
Tableau I.11 : Comparaison entre les différents types de modules membranaires (<i>D'après Daufin et al. 1998</i>).....	100
Tableau I.12 : Classification des membranes selon leur nature	101
Tableau I.13 : Revue des travaux sur le fractionnement par UF d'hydrolysats marins	116

INDEX DES TABLEAUX DU CHAPITRE II

Tableau II.1 : Spécificité des Protéases utilisées. Les acides aminés entre parenthèse indiquent une activité moins prononcée de l'enzyme.....	128
Tableau II.2 : Tampons phosphate citrique utilisés pour la détermination de l'activité spécifique des enzymes.....	129
Tableau II.3 : Facteurs de dissociation α des groupements aminés obtenus en fonction de la température et du pH.....	138
Tableau II.4 : Calcul du niveau des facteurs utilisés pour la réalisation des plans d'expériences	143
Tableau II.5 : Matrice expérimentale de l'hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine concernant la durée de l'hydrolyse, la température et la concentration en enzyme et le volume d'eau.....	144
Tableau II.6 : Nature des solvants compétiteurs	146
Tableau II.7 : Caractéristiques des colonnes SPE utilisées selon le fabricant	148
Tableau II.8 : Principales étapes et compositions des mélanges du Protocole SPE.....	150
Tableau II.9: Caractéristiques du pilote Amicon [®]	155
Tableau II.10 : Caractéristiques des membranes utilisées.....	159
Tableau II.11 : Caractéristiques des solutions de nettoyage pour des membranes en PES....	159
Tableau II.12 : Conditions requises pour le nettoyage de la membrane d'ultrafiltration selon les agents colmatants	160
Tableau II.13 : Programmation des températures pour la CPG-FID.....	169
Tableau II.14 : Nature et ordres des dépôts réalisés sur la plaque CCM	176
Tableau II.15 : Solvants utilisés en fonction des classes de lipides en chromatographie liquide sur colonne.....	178
Tableau II.16 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées	182
Tableau II.17 : Conditions opératoires et programme de mise en route du Bioscreen C.....	194

INDEX DES TABLEAUX DU CHAPITRE III

Tableau III.1 : Bilan matière de la chaîne de conditionnement de la seiche : matière première, co-produits et produit fini	197
Tableau III.2 : Teneur en protéines des viscères de seiche par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche.....	198

Tableau III.3 : Acides aminés et composés associés déterminés par le kit d'analyse des protéines des hydrolysats par CPG	199
Tableau III.4 : Composition moyenne (mmole/mg M/S) en acides aminés des viscères de seiche avec et sans encre.....	200
Tableau III.5 : Teneur en lipides des viscères de seiche par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche.....	202
Tableau III.6 : Composition moyenne en acides gras des viscères de seiche	203
Tableau III.7 : Activités protéolytiques des enzymes commerciales sur un substrat modèle obtenues à 50°C et à pH 8.....	209
Tableau III.8 : Conditions opératoires optimales des principales enzymes endogènes des viscères de la seiche <i>Sepia officinalis</i>	211
Tableau III.9 : Teneurs en lipides (en g pour 100 g de matière sèche) dans chaque fractions (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse des viscères de seiche par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH8, 50°C et pendant 24 h.....	217
Tableau III.10 : Concentrations des acides aminés totaux (mmole/mg de matière sèche) dans les fractions solubles des hydrolysats de 24 h des viscères de seiche par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzymes (1,5%). Les hydrolyses ont été réalisées à 50°C et à pH 8.....	222
Tableau III.11 : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble et soluble) avant et après des viscères de seiche avec encre pendant 6 h par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral.....	238
Tableau III.12 : : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble et soluble) avant et après des viscères de seiche sans encre pendant 6 h par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral.....	238
Tableau III.13 : Composition et concentration en acides aminés totaux (en mmole/mg de matière sèche) dans les fractions solubles des viscères de sèche avec encre issues des hydrolyses de 6 h avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral	246
Tableau III.14 : Composition et concentrations en acides aminés totaux (en mmole/g de matière sèche) dans les fractions solubles des viscères de seiche avec encre (V+E) et sans encre (V-E) issues des hydrolyses de 6 h avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Nautral.....	249
Tableau III.15 : Composition en acides aminés des hydrolysats des viscères de seiche avec encre obtenus après hydrolyses avec Protamex, Pepsine, delvolase et Multifect Neutral en comparaison avec les protéines de référence de la FAOWHO et NRC.....	257
Tableau III.16 : Comparaison des ratios obtenus avec les hydrolysats des viscères de seiche avec encre obtenus avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral et les protéines de référence, RP-1 (FAO/WHO) et RP-2 (NRC).....	257
Tableau III.17 : Réponses du plan d'expériences obtenues pour les lipides et les acides aminés	261
Tableau III.18 : Conditions optimales déterminées pour la réponse du DH à partir de l'optimisation des hydrolyses avec Pepsine et valeur prédite pour cette réponse	266
Tableau III.19 : Comparaison des pentes des droites et des ratios des témoins (milieu de culture seul) et avec l'hydrolysat 15 pour les 3 souches.....	277
Tableau III.20 : Equations des droites de régression du témoin et de l'hydrolysat 15 obtenues pour les 3 souches bactériennes	277
Tableau III.21 : Temps de génération (heures) exprimés pour le témoin seul et en présence de l'hydrolysat inhibiteur 15 pour les souches bactériennes	278
Tableau III.22 : Distribution en poids moléculaire des peptides (exprimée en % d'aire relative sous la courbe) des hydrolysats de Pepsine (2h, 45°C)	284

Tableau III.23 : Indices biochimiques des principaux acides aminés limitants selon les standards fixés par la FAO/WHO (1985) ^a et les besoins du Tilapia du Nil selon le NRC (1993) ^b . les indices ont été calculés pour l'hydrolysate produit à échelle pilote des viscères de seiche avec encre (Pepsine, 2h, 45°C, pH 2).....	198
Tableau III.24 : Masses des fractions cationique, anionique et non retenue issues du fractionnement sur les colonnes chromabond de l'hydrolysate des viscères de seiche..	289
Tableau III.25 : Résultats de l'antibiogramme réalisés avec les 3 fractions issues de la séparation par la charge sur les colonnes SCX et SAX de l'hydrolysate.....	290
Tableau III.26 : Spectre de l'activité antibactérienne des fractions issues de la séparation sur colonnes SPE de l'hydrolysate, axprimées en CMI (µg/mL).....	291
Tableau III.27 : Distribution des poids moléculaires (% d'aire relative) de l'hydrolysate initial non fractionné (Hyd), de la fraction cationiaque active (CA), de la fraction non retebue (NR) obtenues après séparation sur les colonnes échnageuses SPE.....	292
Tableau III.28 : Moyenne des flux de perméation obtenus lors de la filtration des hydrolysats avec la Pepsine sur le mini-pilote Amicon à 2 bars à différenys seuils de coupure	292
Tableau III.29 : Distribution des poids moléculaires (% d'aire relative) des perméats obtenus par fractionnement sur les membranes en CR et en PES comparée à celle de l'hydrolysate initial produit par la Pepsine et non fractionné.....	311
Tableau III.30 : Seuils de coupure apparents (rétenion à 90% du soluté ciblé) des 5 membranes d'UF testées à l'échelle de laboratoire et obtenues d'après les courbes de tamisage	314
Tableau III.31 : Teneurs (en mmole/mg de M.S) et répartition des acides aminés dans les perméats et les rétentats issus du fractionnement en mode concentration de l'hydrolysate sur les membranes à l'échelle de laboratoire. P = 2 bars, FRV = 4. P : perméat. R : rétentat	317
Tableau III.32 : Activité antimicrobienne des fractions (perméats et rétentats) issus de la filtration membranaire de l'hydrolysate des viscères de seiche contre 4 bactéries-cible	318
Tableau III.33 : Flux à l'eau des membranes avant et après 20 heures d'adsorption et réduction du rayon de pore correspondant.....	326
Tableau III.34 : Flux de perméation avant, pendant et après ultrafiltration de l'hydrolysate des viscères de seiche à 5 et 15 bars et à 25°C.....	328
Tableau III.35 : Bilans de matière: taux de récupération des volumes et de la matière(peptides, lipides) après filtration de l'hydrolysate des viscères de seiche en mode concentration sur les membranes XP 117 et ES 404	332
Tableau III.36 : Charge en peptides et en lipides dans les différentes fractions (rétenant et filtrat) obtenues après ultrafiltration de l'hydrolysate des viscères de seiche sur les membranes XP 117 et ES 404 à (25°C, PTM = 5 bar), avec un FRV = 4.....	332
Tableau III.37 : Taux de rétenion des protéines et des lipides pour chaque membrane après une ultra filtration de l'hydrolysate Pepsique des viscères de seiche en mode concentration (FRV = 4). $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, PTM = 5 bar.....	334
Tableau III.38 : Valeur des points pivot du fractionnement global, du perméat et du rétenant en fonction des membranes utilisées. PTM= 5 bar, FRV = 4 et $\theta = 25^{\circ}\text{C}$	339
Tableau III.39 : Distribution des poids moléculaires (% d'aire relative) des perméats obtenus par fractionnement sur les membranes en ES 404 et XP 117 et de l'hydrolysate initial produit par la pepsine ey non fractionné.....	339
Tableau III.40 : Seuils de coupure nominaux et apparents des membranes Es404et XP117 obtenus après calcul des TR (%) et traçage des courbes de tamisage	339
Tableau III.41 : Taux de transmission des acides aminés dans les perméats obtenus après fractionnement de l'hydrolysate sur les membranes ES 404 et XP 117.....	346

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide Aminé
AAE	Acide Aminé Essentiel
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AG	Acide Gras
AGMI	Acide Gras Mono-Insaturé
AGPI	Acide Gras Poly-Insaturé
AGS	Acide Gras Saturé
A.U	Anson Unit
BSA	Bovine Serum Albumine
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CR	Cellulose Régénérée
D	diamètre de la section
Da	Dalton
DH	Degré d'Hydrolyse
DNFB	DiNitroFluoroBenzene
e	épaisseur de la membrane
EC	Enzyme Classification
EMAG	Ester Méthylique d'Acide Gras
EPA	EicosaPentaenoic Acid
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
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
<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
kDa	kilo Dalton
L	litre
LN	Lipides Neutres
M	molaire
MF	Microfiltration
min	minute
mL	millilitre
MS	Mass spectrometry

MWCO	Molecular Weight Cut-Off
n.c.	non communiqué
n.d.	non déterminé
N.I.A	Non Inclus Ailleurs
NF	Nanofiltration
N.R	Nitrogen Recovery
NRC	National Research Council
OI	Osmose Inverse
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPA	O-PhthaldiAldehyde
PES	Polyether Sulfone
PL	PhosphLipides
PM	Poids Moléculaire
PSSI	Programmed split/splitless injector
PTM	Pression transmembranaire
PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acid (= AGPI)
rpm	rotation par minute
SAX	Strong Anion Exchange – support échangeur anionique fort
SC	Seuil de Coupure
SCX	Strong Cation Exchange – support échangeur cationique fort
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
sec	seconde
SM	Spéctrométrie de Masse
SPE	Solid Phase Extraction - extraction solide-liquide
t	tonnes
TNBS	acide TriNitroBenzène Sulfonique
U	Unité enzymatique
UF	Ultrafiltration

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION GENERALE

Les découvertes scientifiques de cette dernière décennie n'ont cessé de démontrer les ressources diverses qu'offrent les mers et les océans pour la recherche et développement en biotechnologie marine. Ces richesses concernent divers domaines et peuvent être à caractère alimentaire, pharmaco- médical, cosmétique,...Le potentiel commercial et industriel de ces domaines reste en partie inexploré, difficilement quantifiable et très dépendant de la demande du marché et de la disponibilité à long terme des ressources visées. En biotechnologie marine la valorisation industrielle et commerciale des ressources repose aussi sur une vision à long terme de l'exploitation durable des ressources. Selon la FAO, plus de 200 millions de tonnes de produits de la mer (poissons, crustacés, mollusques, algues,...) sont actuellement pêchés, ou récoltés chaque année dans le monde. Les produits de la mer peuvent être consommés frais, congelés, séchés ou encore transformés.

Parmi ces produits, la seiche est très prisée aussi bien sur le marché européen que tunisien. Une des transformations majeures de cette ressource est le conditionnement en frais ou en congelé pour l'exportation. Cette transformation de la seiche est à l'origine de plusieurs types de co-produits: les co-produits solides, comme les têtes, peaux et viscères, et les coproduits liquides, comme les effluents issus de la chaîne de transformation (eaux de lavage). La politique environnementale actuelle incite de plus en plus les industriels à prendre en compte les déchets générés par tout procédé de transformation ; il est devenu alors primordial de trouver des voies de valorisation de ces co-produits tout en intégrant la notion de développement durable. Les techniques utilisées devront être non agressives pour l'environnement et ne pas engendrer de dépenses énergétiques ou d'investissement trop lourds. Ainsi, dans un contexte de développement industriel des biotechnologies et de l'utilisation durable des ressources marines, les industries de conditionnement des produits de la mer sont identifiées comme étant un maillon primordial de la chaîne, vu l'importante source de co-produits qu'elles génèrent.

Très longtemps, les ressources des mers et des océans étaient considérées comme inépuisables. Avec le temps et l'acquisition de plus en plus de connaissances sur l'état du milieu aquatique, les constats sont qu'alarmants. En effet, face à une production halieutique mondiale en déclin depuis ces dernières décennies, et des problèmes de plus en plus récurrents

liés aux bovins et à la volaille, la recherche de nouvelles sources protéiques de substitution n'a jamais été autant d'actualité sur le plan international d'où la nécessité d'exploiter au maximum toutes les potentialités des produits de la mer (poissons, crustacés, mollusques,...). Ainsi, pour assurer la pérennité de cette ressource, il devient primordial d'apprendre à mieux les gérer, aussi bien dans leur récolte que dans leur transformation. Leur rendement doit donc être maximisé pour une meilleure utilisation.

Quelques applications biotechnologiques de co-produits peuvent être reliées directement à une espèce. Par contre la majorité des applications que l'on retrouve dans la littérature peuvent s'appliquer à plusieurs d'entre elles. Le diagramme de la figure 1 représente les potentialités de valorisation des co-produits de la pêche. Cette valorisation peut se définir comme suit :

« La valorisation des biomasses marines ou d'autres types de biomasses par des procédés biotechnologiques implique l'utilisation d'organismes vivants (bactéries, levures, champignons, etc.) ou de biomolécules actives (ex.enzymes) couplés à des technologies physico-chimiques (broyage, chauffage/refroidissement, contrôle de pH, séparation/purification, centrifugation, filtration, évaporation, séchage, etc.) afin d'obtenir un ou plusieurs composés possédant une valeur ajoutée sur un ou plusieurs marchés-cible (Source : Centre de Recherche sur les Biotechnologies Marines, Rimouski, Canada) ».

Actuellement ces co-produits, peu ou mal valorisés sont essentiellement transformés en farines et huiles, destinés principalement à l'alimentation animale (Benjakul et Morissey 1997). Pourtant, ces co-produits composés comprenant les têtes, arêtes, viscères et peaux constituent une source importante de protéines et d'acides aminés essentiels et possèdent une richesse nutritionnelle non négligeable (Diniz et Martin 1998 – Shahidi et al. 1995). Mieux valorisés, ces co-produits pourraient entrer dans la composition de produits à **plus haute valeur ajoutée**, destinés aux marchés alimentaires, pharmaceutiques ou encore cosmétiques.

L'utilisation de farines d'origine animale a fait l'objet de nombreuses controverses liées surtout à l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine ainsi que les dioxines. L'interdiction de produire certaines de ces farines a conduit les recherches vers de nouveaux moyens d'utiliser les co-produits, parmi lesquels l'**hydrolyse enzymatique** des protéines de produits de la mer. Cependant, la faible valeur marchande de ces hydrolysats a incité les

industriels à optimiser les conditions de fabrication et a orienté les études vers la conservation des molécules ayant gardé des propriétés fonctionnelles, nutritionnelles et biologiques.

Depuis plusieurs années, la nouvelle voie de valorisation des co-produits est leur transformation par application de l'**hydrolyse enzymatique**. En effet, l'hydrolyse constitue une bonne approche pour réhabiliter les protéines d'origine marine. Il en résulte un produit nommé hydrolysats protéiques. L'hydrolyse enzymatique modifie les propriétés moléculaires des protéines : diminution du poids moléculaire, modification de la charge et exposition des groupements hydrophobes (Nielsen 1997), entraînant ainsi une modification des propriétés initiales de la protéine. L'hydrolyse des protéines permet alors d'améliorer les propriétés fonctionnelles, nutritionnelles mais également de produire des peptides dotés d'activités biologiques.

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 et d'obtenir un hydrolysats avec une forte teneur en matière protéique (polypeptides, peptides et acides aminés), il est possible que les lipides soient également libérés. Ainsi, la recherche exposée dans le cadre de ce travail a pour but de déterminer le potentiel du procédé d'hydrolyse enzymatique contrôlée sur les co-produits solides issus de la chaîne de conditionnement de la seiche, dans le but de libérer et de récupérer des acides aminés essentiels et des lipides à intérêt nutritionnel et de mettre en évidence des peptides antimicrobiens. Cependant, il existe certaines interrogations qui s'imposent dans la mise en œuvre de ce procédé. Est-ce que les matrices avec encre et sans encre vont réagir de la même façon face à ce type de traitement ? Le choix de l'enzyme ainsi que la durée de la réaction d'hydrolyse sont-ils importants ? Est-il possible d'optimiser les conditions d'hydrolyse pour obtenir les rendements d'extraction les plus importants ainsi que des activités antimicrobiennes plus accentuées ?

Les poids moléculaires des peptides libérés au cours de l'hydrolyse semblent être un des facteurs les plus importants dans la production d'hydrolysats dotés d'activités biologiques. Cependant, l'hydrolyse conduisant à une population peptidique très diversifiée, on pourrait ainsi envisager d'accroître l'activité spécifique de ces hydrolysats en les fractionnant.

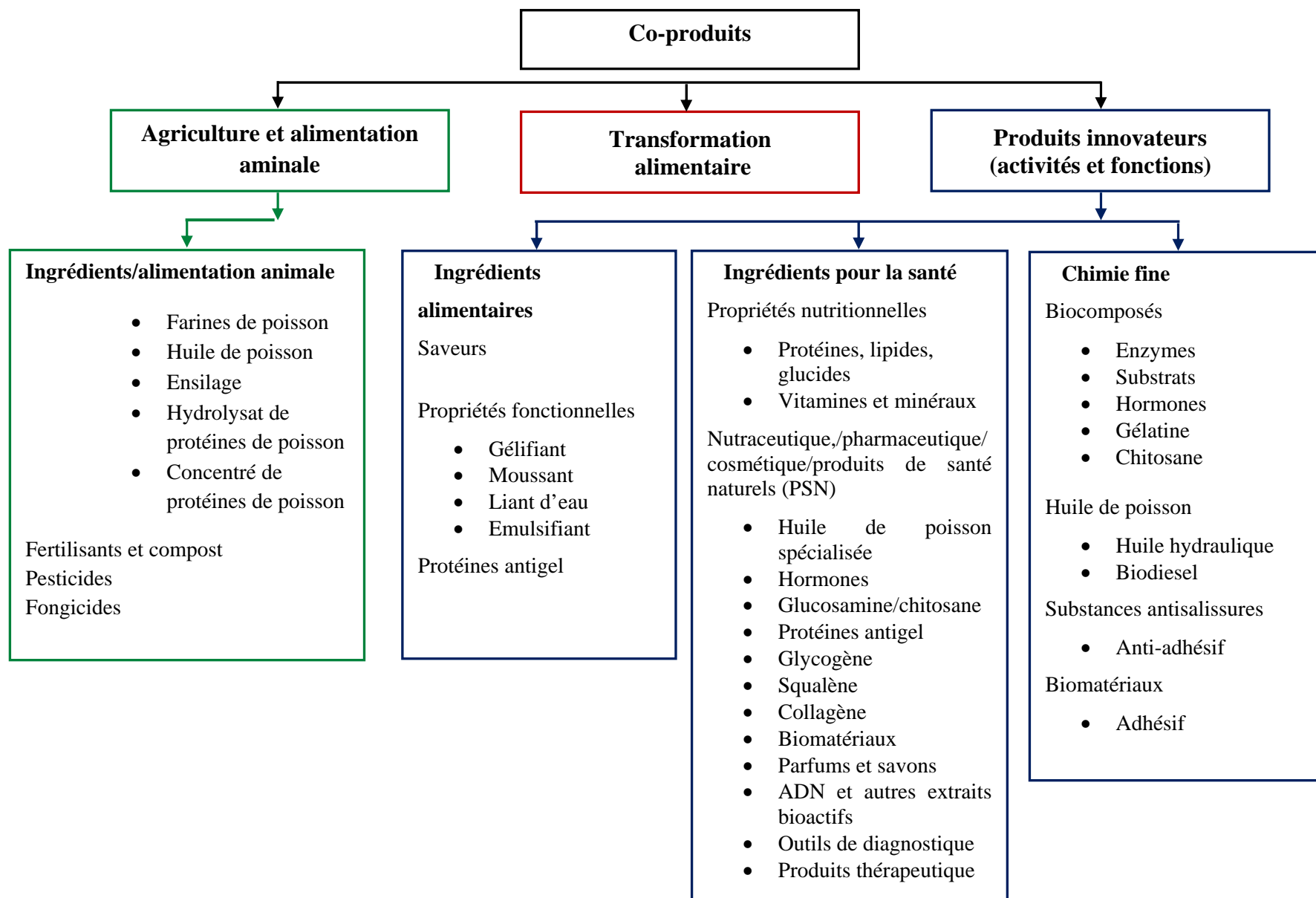


Figure 1 : Différentes voies de valorisation des co-produits marins

Les procédés membranaires, constitueraient alors un moyen efficace afin d'obtenir les fractions peptidiques tout en ciblant la gamme de poids moléculaire désirée. Ces procédés impliquent également des coûts énergétiques plus faibles que les traitements thermiques et seraient donc en phase avec les exigences environnementales actuelles. Les procédés membranaires, déjà utilisés pour séparer et /ou concentrer des peptides issus de l'hydrolyse du lait (Cheang et Zydney 2004 – Pouliot et al. 1999 – Bouhallab et al. 1992), de l'hémoglobine (Lebrun et al. 1998), des protéines de colza (Tessier et al. 2006) et plus récemment des protéines de co-produits de poissons (Vandanjon et al. 2007 – Kim et al. 2006 – Jeon et al. 1999 – Picot et al. 2010) présentent de nombreux avantages. Il s'agit de technologies propres, n'utilisant pas de solvant, elles minimisent les rejets d'effluents et permettent de travailler à température modérée. Cependant certaines questions se posent. Quel mode de filtration choisir ? Quel matériau, quel module, et quel seuil de coupure choisir ?

II. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE

Les débarquements des céphalopodes constituent une part importante de la pêche en Tunisie avec essentiellement la seiche méditerranéenne *Sepia officinalis*. L'exportation croissante des céphalopodes entraîne l'installation progressive des unités de transformation aussi bien sur le littoral de Sfax en Tunisie que sur les côtes de la Basse-Normandie et la Bretagne. L'exportation de la seiche se fait le plus souvent sous forme congelée, pelée et éviscérée, générant une quantité importante de déchets avec des coûts d'enlèvement conséquents. Les co-produits obtenus ainsi sont des matières premières disponibles en grande quantité et qui représentent une charge importante pour les entreprises transformatrices. Apporter des solutions de valorisation permettrait alors de diminuer les coûts liés à la transformation des seiches et répondrait à une forte attente des industriels de la région. Nombreuses valorisations sont envisageables tant en alimentation animale qu'humaine, en cosmétologie et en médecine. En effet, l'industrie alimentaire, pour élargir sa gamme de produits et fabriquer des produits de remplacement a besoin de disposer de toutes sortes d'additifs ou d'ingrédients. Cette demande s'exprime en termes fonctionnels, c'est-à-dire que ces composés doivent répondre à une fonction précise (croissance, survie, qualité, métabolisme,...).

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE

S'inscrivant dans le cadre général de la valorisation des co-produits de la pêche, ce travail a pour but de déterminer la nature et la qualité biochimique des viscères issues de la transformation de la seiche et sur cette base mettre en œuvre des méthodes de valorisation par le biais de l'**hydrolyse enzymatique** et des **procédés de séparation sur membranes** pour produire des **hydrolysats dotés de propriétés nutritionnelles et antibactériennes** selon un procédé transférable à échelle industrielle. Etant donné que le niveau des activités recherchées provient principalement de la taille des peptides, ce travail s'articule autour l'idée que le **degré d'hydrolyse** et le **fractionnement sur membrane** constituent deux champs d'actions complémentaires sur la distribution des masses molaires des hydrolysats obtenus. Ce travail s'est déroulé en 5 étapes :

- 1- **Choix du substrat** : Nous nous sommes intéressés aux co-produits de la seiche disponibles dans les industries de conditionnement . Etant donné que l'encre de seiche est une composante majeure des viscères et qu'elle s'oxyde très rapidement et afin d'éliminer tout risque d'interférence de cette substance au cours de l'hydrolyse, nous avons en premier lieu utilisé comme substrat des viscères sans la glande d'encre pour suivre le déroulement de la réaction d'hydrolyse sans cette substance. Ensuite et pour tout le reste du travail, nous nous sommes basés sur les co-produits réellement rejetés par les industries de conditionnement à savoir les viscères comprenant la glande d'encre. Dans un premier temps, nous allons donc explorer la qualité biochimique des viscères issues de la transformation de la seiche *Sepia officinalis* afin de connaître les voies de valorisation envisageables.
- 2- **Mise en place des techniques analytiques** : des outils analytiques biochimiques (contrôle de l'hydrolyse par la méthode pH-Stat, DNFB, tests d'activités ...) ont été mis en place afin de suivre, comprendre, contrôler et valider le fonctionnement et la reproductibilité des étapes d'hydrolyse et de fractionnement sur membrane.
- 3- **Criblage des enzymes, optimisation de l'hydrolyse enzymatique et production à échelle pilote** : Une série d'enzymes ayant des conditions opératoires très différentes a été testée avec des temps d'hydrolyse différents. L'hydrolyse enzymatique a ensuite été optimisée à l'aide de la méthodologie des plans

d'expériences afin de déterminer les conditions d'hydrolyse permettant de maximiser la teneur en protéines, lipides et l'activité antibactérienne de l'hydrolysats. Les conditions optimales ont ensuite été transposées à échelle pilote. Nous prospecterons également l'éventuelle présence d'activités antimicrobiennes, en effectuant les bio-essais sur la flore microbienne d'altération de la crevette conditionnée.

- 4- Etude du fractionnement sur membrane :** le fractionnement sur membrane offre, à côté du contrôle du degré d'hydrolyse, un deuxième levier pour agir sur la distribution des tailles des peptides et donc sur le niveau d'activité antimicrobienne des hydrolysats. L'étude de l'impact du fractionnement sur membrane sur les populations peptidiques a été découplée de celle de l'enrichissement des hydrolysats en acides aminés essentiels et lipides, ainsi que celle de l'activité antibactérienne, et ce en posant des hypothèses concernant la pression, la concentration et le FRV (Facteur de réduction volumique). Les performances du fractionnement ont été évaluées en termes de densité de flux de perméation, de sélectivité (profils chromatographiques des fractions, taux de rétention, seuil de coupure apparent des membranes) et de facilité de nettoyage des membranes.
- 5- Eléments de conception d'un procédé industriel :** Cette étape est essentielle avant tout dimensionnement ou toute évaluation économique d'un procédé. Dans cette étude, le procédé complet combine l'hydrolyse enzymatique avec le fractionnement sur membrane de manière à produire un hydrolysats commercialisable intéressant sur le plan nutritionnel et également bioactif. Il est donc nécessaire avant de concevoir un procédé industriel : (i) d'identifier l'ensemble des opérations unitaires envisageables dans un procédé de fabrication d'un hydrolysats, leur agencement et les technologies concurrentes à chacune de ces étapes, (ii) de déterminer la faisabilité technique différentes opérations unitaires susceptibles d'être mises en œuvre sur un procédé industriel.

Ce mémoire est donc divisé en différentes parties. La première est dédiée à la production d'hydrolysats à l'échelle de laboratoire et à l'échelle pilote avec une caractérisation fine de la composition biochimique ainsi que l'application de biotests et à l'optimisation des conditions d'hydrolyse. La seconde partie porte sur le fractionnement des

hydrolysats de viscères de seiche par les procédés membranaires, également à l'échelle de laboratoire et pilote. Cette partie concernera la sélection des membranes, l'effet des paramètres opératoires et de l'hydrolysat brut sur la distribution en poids moléculaire des perméats et rétentats, ainsi que la détermination de quelques éléments en vue de la conception d'un procédé pré-industriel (méthodologie de changement d'échelle).

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. CONTEXTE ECONOMIQUE DE L'ETUDE

I.1 LA PECHE ET L'AQUACULTURE DANS LE MONDE

I.1.1 Importance des produits de la mer

Les produits de la mer jouent un rôle important dans la nutrition humaine en raison des qualités nutritionnelles qu'ils offrent mais aussi pour le vaste choix qu'ils possèdent sur le plan gustatif, de la texture ou de la forme sous laquelle ils sont commercialisés : entiers, congelés, salés, fumés, séchés ou transformé (conserves, plats préparés, surimi...). En 2001, la consommation européenne de poisson était de 19,8 kg/habitant, quantité supérieure à la moyenne mondiale (16,3 kg/habitant). Cependant, les apports en protéines animales moyens en Europe sont encore majoritairement issus de la viande et des produits laitiers (FAO 2004). Cette différence serait due essentiellement à des problèmes de goût et de culture (Roy et Durand 1997). Cependant, les qualités nutritionnelles des produits de la mer sont en général supérieures ou égales à celles de la viande (Piclet 1987). De plus, les protéines des poissons, crustacés et céphalopodes 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). Les produits de la mer sont pauvres en glucides mais riches en sels minéraux (de 0,6 à 2,5% par rapport à la matière fraîche) (Piclet 1987). Certaines espèces de céphalopodes et de crustacés sont particulièrement riches en vitamines, notamment en vitamine D (Médale et al. 2003).

I.1.2 Production des produits de la mer: quelques chiffres

La production mondiale des pêches de capture et de l'aquaculture a fourni en 2008 environ 143 millions de tonnes de produits de la mer dont 110 millions sont destinées à la nutrition humaine. Les 23% restant sont, quant à eux, destinés principalement à la production d'huiles et de farines (FAO 2005). Depuis les années 50, la production mondiale des produits de la pêche est passée de 20 à 130 millions de tonnes (Figure I.1). 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. La Chine reste de loin le plus gros producteur avec une production halieutique déclarée de 51,5 millions de tonnes en 2008 (17,1 et 34,4 millions de tonnes provenant des pêches de capture et de l'aquaculture respectivement) (Figure I.2).

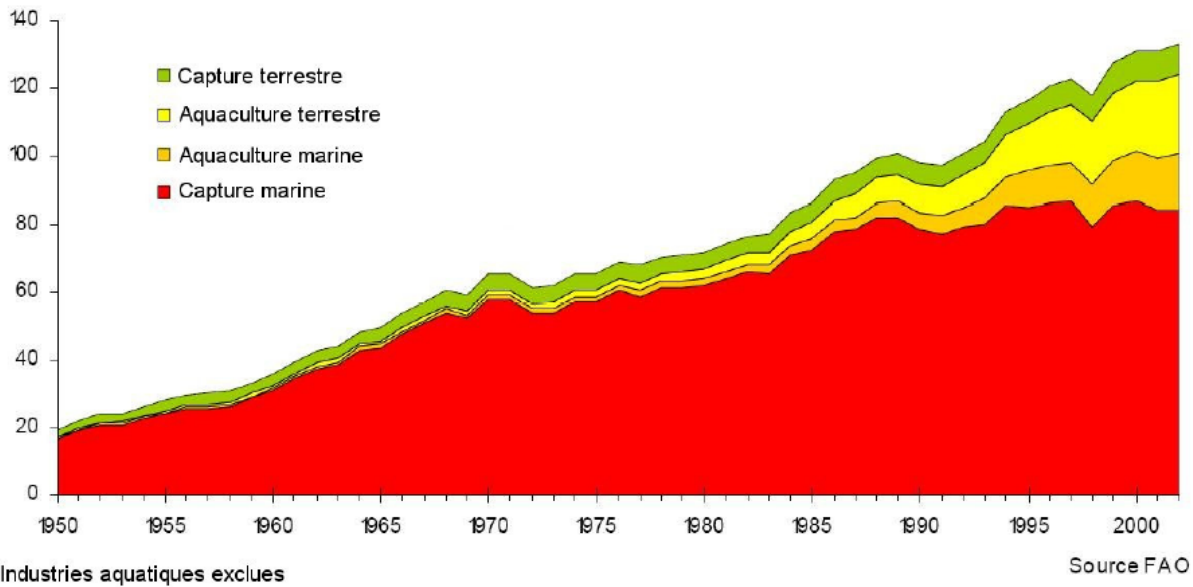


Figure I.1 : Production mondiale des pêcheries en millions de tonnes provenant des pêches de capture et de l'aquaculture de 1950 à nos jours (FAO 2005).

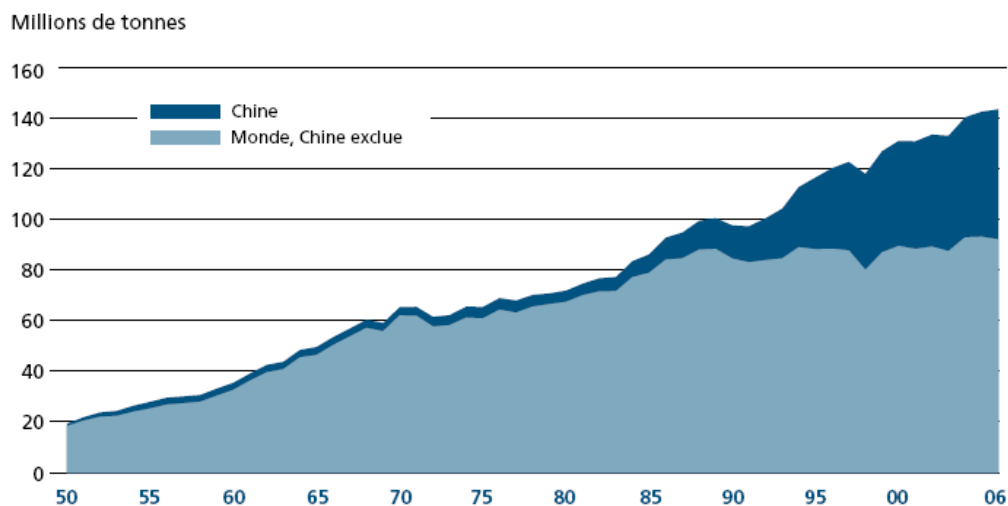


Figure I.2 : Production mondiale des pêches de capture et de l'aquaculture en Chine et dans le monde de 1950 jusqu'à nos jours (FAO 2007).

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). La production mondiale des pêches de capture a atteint environ 92 millions de tonnes en 2006, pour une première valeur marchande de 91,2 milliards de dollars EU selon les estimations, dont 82 millions de tonnes provenant des eaux marines et un niveau record de 10 millions de tonnes des eaux intérieures (FAO 2007). 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. Dans l'Atlantique Sud-Est et dans le Pacifique Sud-Ouest, les captures totales ont

chuté de plus de 10 pour cent en 2006. Dans l'Atlantique Nord Est, la baisse des captures a été progressive, les captures totales ayant chuté de près de 25 pour cent en 10 ans (Figure I.3).

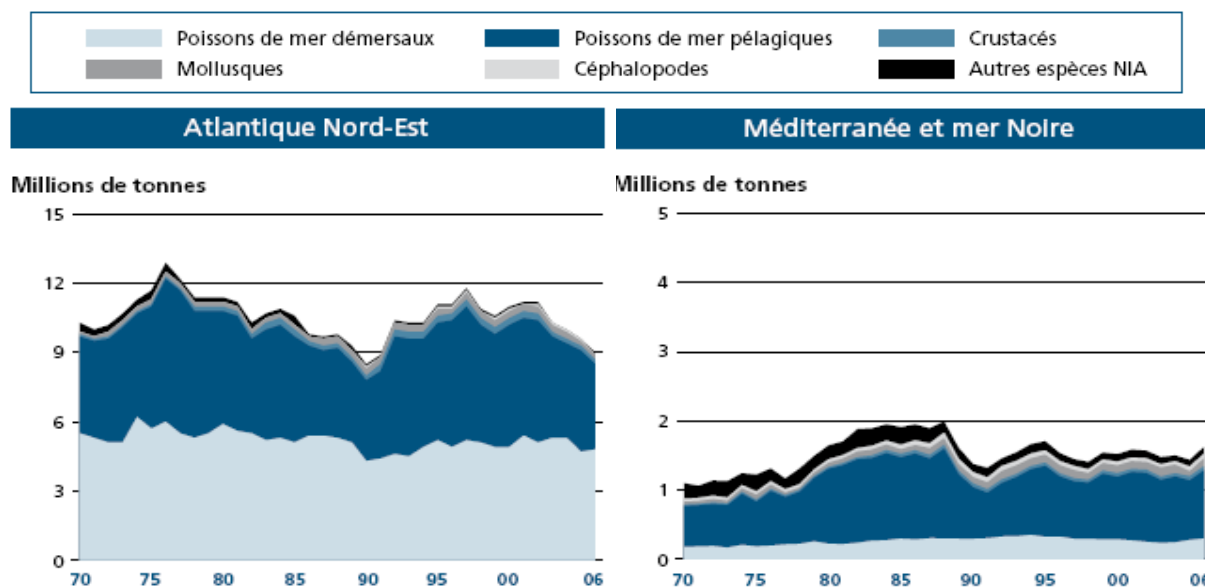


Figure I.3 : Production du secteur des pêches de capture dans l'Atlantique Nord-Est et en Méditerranée et mer noire depuis 1970 jusqu'à nos jours (FAO 2007).

NIA : Non Inclus Ailleurs

I.1.3 Situation mondiale de la production et de l'exploitation des céphalopodes

Les céphalopodes constituaient jusqu'à une quarantaine d'années un matériel d'étude purement fondamental et les recherches entreprises s'intéressaient à la systématique ainsi qu'à la taxonomie des espèces appartenant à cette classe. Depuis les années 1970, une nette progression de la production mondiale de céphalopodes a été constatée (Najai et al. 1979 - Pinczon Du Sel et al. 1992). C'est la baisse enregistrée dans les ressources mondiales halieutiques, qui a favorisé le recours aux céphalopodes comme « *Source de protéines supplémentaire ou alternative aux poissons* » (Mangold 1982). Ainsi, il a été enregistré au courant des dernière décennies une demande croissante de la consommation et un intérêt particulier pour cette ressource, considérée jusque là comme une alternative, et n'étant consommée que très accessoirement.

La consommation des produits de la pêche diffère selon les pays, et dans ces pays, selon les classes de la société. Les espèces démersales sont les plus prisées en Europe septentrionale et en Amérique du Nord, alors que les céphalopodes sont consommés principalement dans les pays méditerranéens et asiatiques. La consommation des crustacés, qui demeurent des produits de forte valeur, est principalement concentrée dans les pays riches (FAO 2007). Les captures de céphalopodes ont atteint aussi un nouveau sommet en 2006 pour se situer à 4,3 millions de

tonnes. Dans ce groupe, les tendances récentes pour les trois principales espèces sont très différentes. Les prises d'encornets volants géants dans le Pacifique Est ont continué de progresser en flèche, ayant presque quintuplé depuis 2000. Les prises de calmar Japonais dans le Pacifique Nord-Ouest ont toutefois diminué pendant la même période. Dans l'Atlantique Sud-Ouest, les prises d'encornet rouge argentin se sont redressées après la chute spectaculaire enregistrée en 2004-2005 (FAO 2007). La part des céphalopodes dans le commerce mondial du poisson a été de 4,2 pour cent en 2006. La Thaïlande est le premier exportateur de calmar et de seiche, devant l'Espagne, la Chine et l'Argentine. Le Maroc est quant à lui le premier exportateur de poulpe. L'Espagne, l'Italie et le Japon sont les principaux importateurs de ce produit. Les prises totales annuelles de céphalopodes, qui se situent entre 3,6 et 3,8 millions de tonnes.

En France, l'activité de pêche des céphalopodes est très hétérogène selon les différents quartiers maritimes. Pour la seiche, Cherbourg constitue le port le plus important de point de vue débarquements et ventes en 2003 avec 3666 tonnes, suivi de Saint-Brieuc avec 2851 tonnes. En 1996, les débarquements les plus importants concernant la partie Atlantique de la France ont été effectués dans les ports de Caen, Cherbourg, Le Guilvinec et Boulogne/mer, et ceci à toutes les saisons.

En termes de valeur économique, la production moyenne (1989-2004) des céphalopodes représente 10 millions d'Euros pour la France (Challier 2005). En Basse-Normandie, première région française productrice de seiche, cette espèce occupe la deuxième place et contribue jusqu'à 35% du chiffre d'affaire des chalutiers côtiers au printemps (Royer 2002). En ce qui concerne le commerce extérieur, les céphalopodes font partie des produits en hausse en volume à l'export, à côté des crevettes, du saumon, du maquereau, du bar et de la baudroie (FAO, 2004). En analysant les données statistiques de l'OFIMER de 2008, il est possible de constater que les quantités de seiches exportées vers les principaux pays destinataires sont assez importantes et se classent toujours en seconde position après le poisson (figure I.4) Ces quantités représentent 13 %, 18 % et 20 % du volume total des exportations respectivement pour l'Espagne, l'Italie et l'Allemagne (OFIMER, 2008b). En termes de valeur, la seiche se place toujours en troisième position après les poissons et les divers invertébrés pour les trois principaux pays (figure I.5)

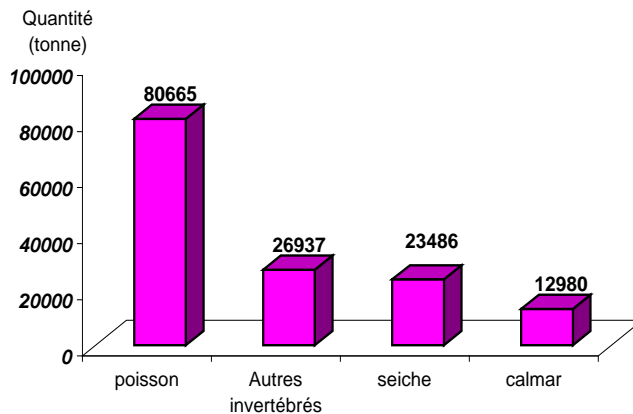
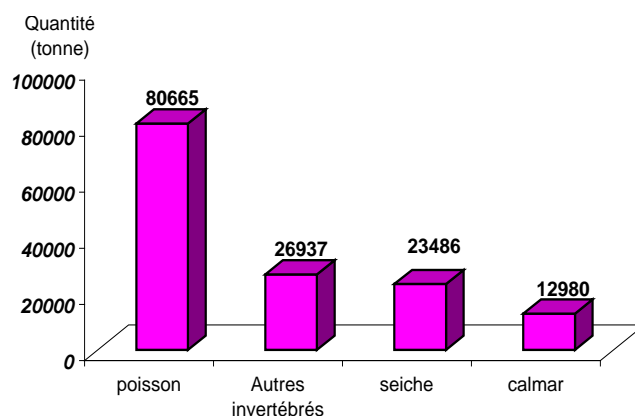
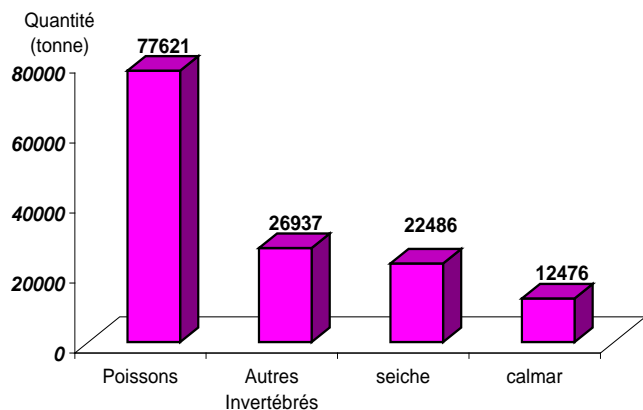


Figure I.4: Valeur (K€) des exportations de la France par type de produit en 2007. A : vers l'Espagne. B : vers l'Italie. C : vers l'Allemagne (Source : OFIMER 2008).

I.1.4 L'activité de transformation des produits de la mer

En France, l'industrie de transformation des produits de la mer regroupe les entreprises dont l'activité concerne le filetage (qui est donc à la frontière entre mareyage et transformation...), le conditionnement sous atmosphère modifiée, la cuisson, la surgélation, la sauriserie et la fabrication de conserves. Le chiffre d'affaires de l'industrie de transformation

des produits de la mer (3 milliards €) représente 2,3% de l'ensemble des industries agroalimentaires.

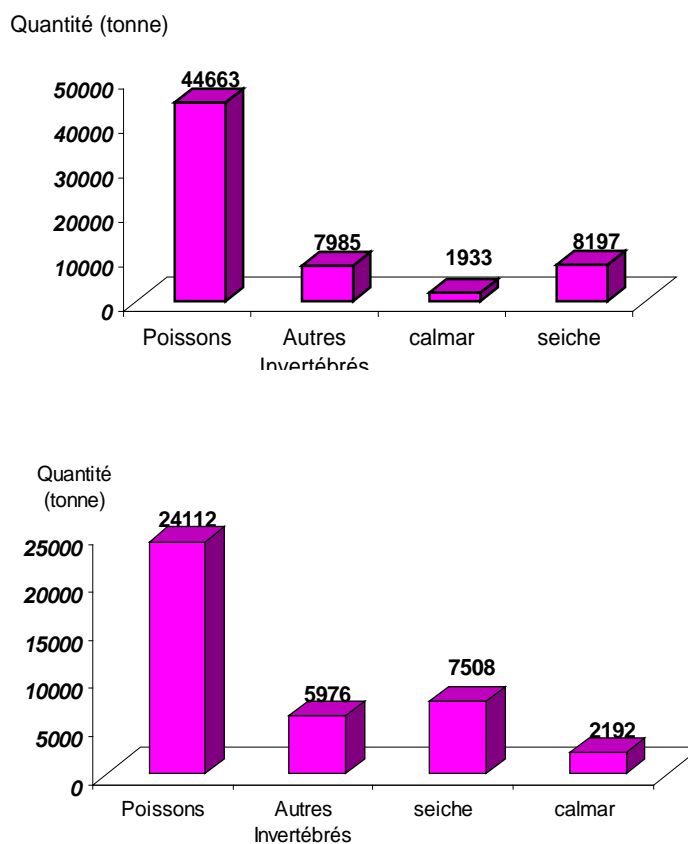


Figure I.5 : Volume (tonne) des exportations par type de produit en 2007. A : vers l'Espagne. B : vers l'Italie. C : vers l'Allemagne (Source : OFIMER 2008).

Cependant, au cours des dix dernières années, ce chiffre d'affaires a augmenté deux fois plus vite que celui des IAA. Il existe 287 entreprises de transformation en France, avec 13 300 emplois. Le chiffre d'affaires global se répartit comme suit : conserves, 29% ; surgelés, 28%, ; saurisserie, 20% ; produits traiteurs (y compris cuisson de crevettes), 22%. Le chiffre d'affaire

moyen des entreprises de transformation s'élève à 16,3 millions d'euros (Tanguy 2006). Les entreprises de transformation sont établies en grande majorité dans les régions littorales ; la Bretagne et le littoral Atlantique regroupent 55% du chiffre d'affaires.

Le marché français de la **consERVE du thon** est de 134 000 tonnes alimenté essentiellement par les importations (107 100 tonnes). Les 11 conserveries françaises de **sardines** ont transformé 15 000 tonnes de sardines en 2004, l'approvisionnement français représentant 48% des tonnages (66% provenant de l'Atlantique et 34% de la Méditerranée). Les industries de fumage (23 entreprises dont 7 produisent plus de 1 000 tonnes, pour un chiffre d'affaires total de 436 millions €) ont mis en œuvre 40 300 tonnes de saumon et 5000 tonnes de truite. Le saumon provient essentiellement de Norvège (61%), d'Ecosse (22%) et d'Irlande (8%) (Tanguy 2006). Plus spécifiquement, la France est le premier pêcheur européen de seiches (5^{ème} mondial) avec 12 300 tonnes en 2006 engendrant une importante activité de conditionnement et de transformation est concentrée dans la région de Basse-Normandie.

En Tunisie, il existe actuellement 80 unités de transformation, traitement, séchage, fumage, salage, réfrigération, congélation, surgélation et conditionnement de produits de la mer, avec une activité orientée à 90% vers l'exportation. Il est à noter que certaines entreprises peuvent avoir plusieurs activités en même temps. Ces unités sont réparties comme suit :

- congélation de poisson et de fruits de mer : 45 unités
- conserves de poissons (sardine, thon) : 15 unités
- surgélation de crustacés et mollusques : 12 unités
- séchage, fumage, salage, saumurage : 8 unités

Cependant, il existe une concentration de ces différentes activités sur le littoral sud de la Tunisie, particulièrement la région de Sfax, ce qui crée une pression environnementale considérable. La congélation des produits de la mer a connu une expansion durant les années 80 avec une capacité qui s'élève à plus de 10 000 tonnes et elle est sous-utilisée dans une large mesure. Les produits congelés sont principalement les crustacés (crevettes et langoustes) et les céphalopodes principalement les poulpes et seiches (Figure I.6).

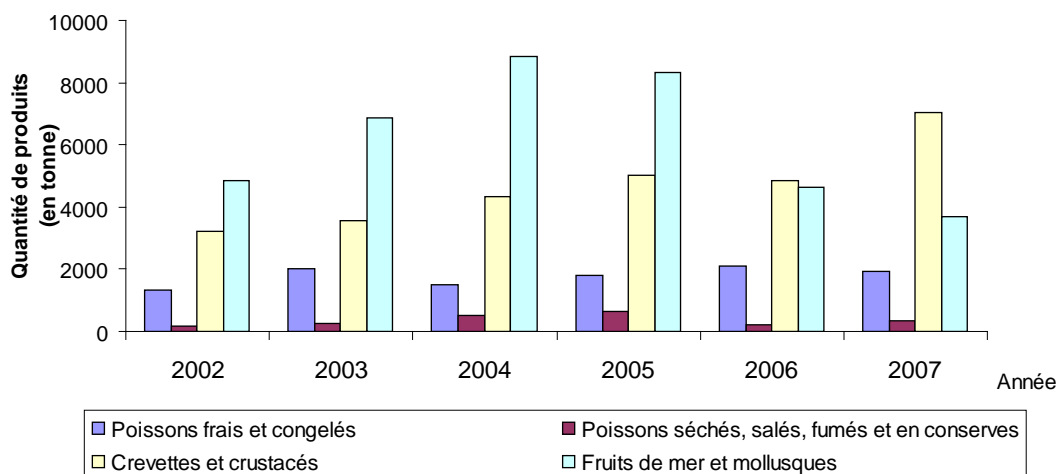


Figure I.6 : Evolution de la production des produits congelés entre 2002 et 2007 en Tunisie (Source : FAO 2008)

Le programme de mise à niveau entamé depuis 1995 a engendré une amélioration des exportations des produits de la pêche. D'ailleurs, la réussite de ce programme a fait que la Tunisie est inscrite sur la liste n°1 des pays en provenance desquels l'exportation des produits de la pêche (décision 98/573 CEE) et des mollusques bivalves (décision 98/571 CEE) est autorisée sans restriction. Les principaux pays importateurs sont : l'Italie, La France, la Grèce, l'Allemagne, la Belgique, le Royaume-Uni et le Japon. La majeure partie de la production de la seiche provient des ports des gouvernorats suivants : Sfax avec 4823,230 tonnes, Gabès avec 413,472 tonnes et enfin Médenine (Jerba et Zarziss) avec 654,433 tonnes. Cette production représente 13,89% de la production halieutique totale de ces régions et est en majeure partie exploitée par les industries de conditionnement et de congélation des produits de la mer en vue de son exportation. L'industrie des conserves et de congélation de produits de la mer en Tunisie comprend trois principales activités : les conserves de sardine, les conserves de thon, et les congelés de la mer.

*** les conserves de Sardine**

La moyenne des quantités de conserves de sardine produites au cours des cinq dernières années se situe à environ 1.800 tonnes de produits finis. La capacité de transformation est actuellement de 106 tonnes/jour répartie sur 15 unités (thon et sardine). Nous présentons, dans le tableau I.1, l'évolution des quantités de sardines traitées sur la période 2001-2006 :

Tableau I.1: Evolution de la production de conserves de sardine entre 2003 et 2007 (Source : GICA /GIPP)

Année	2003	2004	2005	2006	2007
Quantité transformée de sardines fraîches	2715	2218	3021	2440	2848
Production de conserves de sardine	1815	1621	2234	1807	1967

Unité : Tonne

Les exportations de sardines sont négligeables et se sont limitées à quelques actions d'exportation au cours des dernières années. Ceci est dû au manque de compétitivité de l'industrie tunisienne sur les marchés internationaux face à des concurrents tels que le Maroc le Portugal et l'Espagne. En effet, la production marocaine de conserves de sardine avoisine les 140.000 tonnes soit plus que 50 fois celle réalisée par la Tunisie.

*** les conserves de thon**

La capacité de transformation installée pour les thons en 2003 avoisine les 143 T/jour répartie sur 15 unités. Les matières premières sont constituées à plus de 95% par le thon importé. Le thon rouge tunisien est destiné à l'exportation en frais vers le Japon. Cette production reste insuffisante pour subvenir aux besoins de la consommation locale (Tableau I.2).

Tableau I.2: Evolution de la production des conserves de thon entre 2003 et 2007 (Source : GICA /GIPP)

Année	2003	2004	2005	2006	2007
Quantité transformée de thon frais	9 707	12 145	14 450	15 950	19 803
Production de conserves de thon	3 827	4 739	6 758	6 116	8 393

Unité : Tonne

*** les congelés de la mer**

Cette branche regroupe 45 unités qui traitent principalement les crustacés et les céphalopodes. L'activité de ces entreprises est exclusivement orientée vers l'exportation. Le tableau I.3 résume l'évolution des exportations durant la période 2003-2006 par type de produits de la mer congelés. L'Italie et l'Espagne détiennent près de 90% des exportations tunisiennes des produits de la mer congelés (Tableau I.3).

Tableau I.3: Exportations des produits de la mer congelés entre 2003 et 2007 (Source : GICA)

Espèces/Année		2003	2004	2005	2006	2007
Crevettes	Quantité	4444	5847	3658	3006	3146
	Valeur	47 655	63 853	46241	37882	45200
Seiches	Quantité	1788	1765	2722	4572	2989
	Valeur	5 952	4952	10053	18101	14458
Poulpes	Quantité	2114	973	2671	2332	3476
	Valeur	9730	3866	10545	15453	27629
Autres	Quantité	1136	844	1112	1219	477
	Valeur	6842	5417	8189	7701	3322

Quantité (Tonnes) ; Valeur (MTND)

I.2 LES CO-PRODUITS D'ORIGINE MARINE : SITUATION ACTUELLE DE LA VALORISATION

I.2.1 Les co-produits : définition et contexte économique

Les co-produits de la pêche sont définis comme les parties non utilisées et récupérables de tout produit marin à intérêt commercial suite aux opérations de manipulation et de transformation à terre (industries de conditionnement et de transformation) et à bord des bateaux. On ne parle plus de déchets, mais de **co-produits bioconvertibles et valorisables**. Les co-produits des entreprises de transformation des produits de la mer peuvent avoir une nature variée : peaux, têtes, chutes de filets, viscères, écarts de triage, etc... En Tunisie, la valorisation des co-produits de la pêche n'est pas une activité à part entière, il s'agit d'une activité annexe de quelques industries de transformation des produits de la pêche, essentiellement les unités de réfrigération, congélation, surgélation et conditionnement de produits de la mer destinés à l'exportation. Selon l'article 2 du décret n° 2000-81 du 17 avril 2000 (Jort n° 33 du 25 avril 2000), l'activité de valorisation des sous- produits de la pêche fait partie de la branche des industries du poisson appartenant au secteur des industries agroalimentaires. Cette industrie fait partie de la liste des activités de première transformation agricole. Selon la nomenclature douanière harmonisée (NDH), les articles issus de la valorisation des produits de la mer sont classés dans les chapitres suivants :

- chapitre 03** : poissons congelés
- chapitre 16** : préparations de viandes ou poissons
- chapitre 21** : Préparations alimentaires diverses

Les codes NGP des articles qui peuvent provenir des co-produits ou de la valorisation des produits de la mer sont les suivants :

- ☛ **0303299009** : farines, poudres et agglomérés sous forme de pellets de crustacés, propres à l'alimentation humaine.
- ☛ **0307999001** : fruits de mer séchés, salés ou en saumure.
- ☛ **03079913012** : fruits de mer congelés.
- ☛ **1605903000** : mollusques préparés ou conservés.

La filière de valorisation des co-produits est très peu développée en Tunisie. De plus, depuis quelques années, les difficultés apparues dans les filières animales concernant l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine et les dioxines n'a pas facilité ce processus de valorisation des co-produits issus des industries de transformation animales. La transformation des produits de la mer entraîne donc, pour les usines de transformation, la production d'une quantité importante de déchets. L'évacuation de ces déchets représente un coût annuel élevé. 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. De plus, et compte tenu du contexte actuel (raréfaction de la ressource, augmentation du prix de l'énergie, mesures environnementales de plus en plus strictes,...), il convient de proposer de nouvelles stratégies de valorisation de ces co-produits afin de les transformer en produits à usages multiples (agriculture, nutraceutique, nutrition animale, valorisation énergétique,...). Sur le plan international, la production de poissons blancs des pays de l'Union européenne, de l'ordre de 700.000 tonnes par an, couvrant moins de 20% de leur consommation. Les importations européennes de poissons blancs en provenance d'autre pays se sont élevées à 2.6 millions de tonnes en 2002. L'Europe s'approvisionne dans le marché mondial des poissons blancs principalement pour trois espèces : le cabillaud, le lieu de l'Alaska et le merlu. Ces trois espèces représentent 80% des importations européennes de poissons blancs. En ce qui concerne la valorisation, la principale activité est la fabrication du surimi-base et autres plats cuisinés ou conserves.

En France métropolitaine, la quantité des déchets générés par les différentes activités de mareyage, toutes sortes de transformations industrielles mais aussi par les captures accessoires se situe entre 150 000 et 200 000 tonnes soit jusqu'au 50% de la masse initiale des poissons (Ofimer 2007). Actuellement à peu près 96% de ces co-produits font l'objet d'une transformation de masse (sous forme de farine/huile, hydrolysats et hachis pour le petfood) (Figure I.7), ce qui ne nécessite pas ou peu de technologie particulière, mais qui en contrepartie

ne génère que peu de valeur ajoutée. 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.

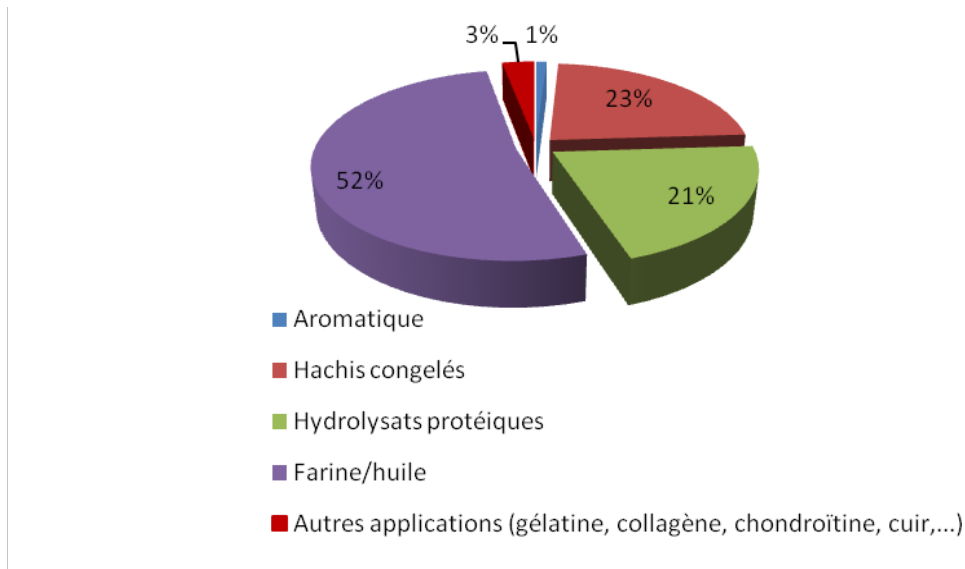


Figure I.7 : Répartition des modes de valorisation de co-produits d'origine marine (Source : OFIMER 2006)

I.2.2 Les voies de bioconversion des co-produits de la pêche

Plusieurs voies de valorisation peuvent intervenir dans le traitement des co-produits en fonction du produit final que l'on désire obtenir à la fin. Le produit dérivé est le produit commercial obtenu à partir d'un co-produit. Un co-produit pourra donner plusieurs produits dérivés. Ainsi, les viscères de poisson par exemple 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. Dans ce qui suit, nous allons dresser un inventaire des différentes voies de bioconversion des co-produits de la pêche ainsi que leurs applications.

I.2.2.1 Les produits destinés à la consommation humaine

Il s'agit de produits à très haute valeur ajoutée provenant essentiellement des écarts de triage des produits de la mer. Cela concerne tous les produits frais plus au moins endommagés lors de la capture et de la pêche, le transport, la manutention ou retirés après triage dans les usines de conditionnement, de congélation ou de conserverie de poissons. Il s'agit par exemple : des chevrettes et crevettes écrasées ou sans têtes ou sans queues ou découpées en morceaux, des moules clovisées et autres crustacés de la mer endommagés mais toujours frais et propres à la

consommation et des écarts de filetage de poissons frais ou de sous – produits de conserveries de poissons. Tous ces co-produits frais de haute valeur nutritive peuvent être collectés puis revalorisés pour en fabriquer des produits très variés tels que le surimi-base, les plats cuisinés (bâtonnets panés, les salades et cocktails de fruits de mer congelés) les préparations en conserves (bisque de crevettes, beurre de crevettes.)

I.2.2.2 Farines et huiles

Cette voie de 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 est prise en compte.

I.2.2.2.1 Procédé de fabrication

Les huiles et les farines de produits de la pêche 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. La Figure I.8 récapitule les différentes étapes du procédé d'obtention de farines et huiles de produits marins. 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 (Olivari 1933).

I.2.2.2.2 Les farines

Dans les années 1950 et face à un déficit en apport protéique d'origine animale sur le plan mondial et particulièrement dans les pays en voie de développement, la valorisation alimentaire des produits et co-produits de la pêche a dépassé le stade expérimental et les farines de poissons sont alors devenues l'une des principales sources de protéines animales utilisées en élevage (James 1992). Elles sont définies comme des produits dont la matière sèche contient plus de 75% de protéines brutes et au plus 12% de lipides (directive n° 9287 CEE de la commission 04/10/92). Cependant, des farines enrichies en protéines peuvent être élaborées pour des utilisations spécifiques.

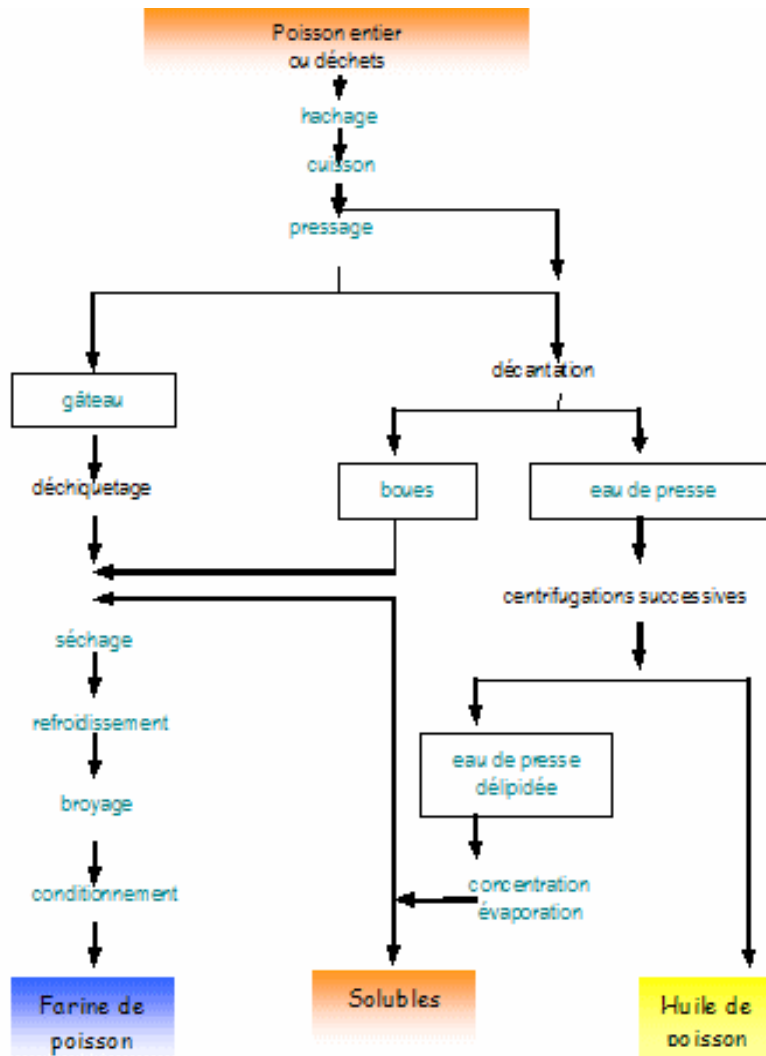


Figure I.8: Procédé de fabrication d’huiles et de farines de poisson

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 (FAO 2008). 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 I.9).

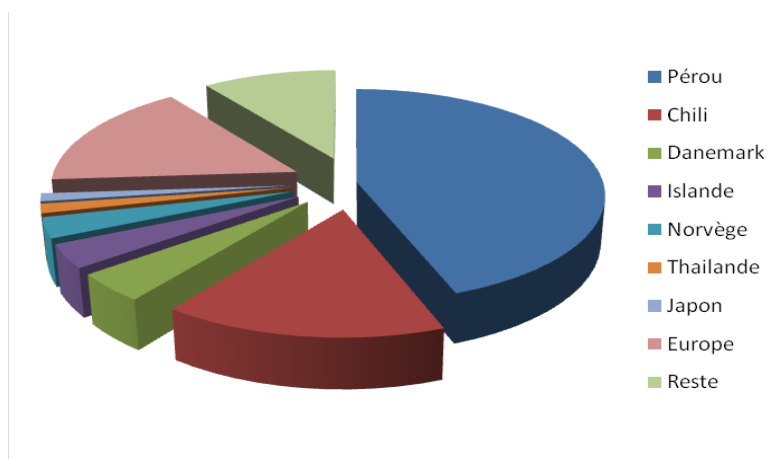


Figure I.9: Principaux pays producteurs de farines de poissons (Source : FAO 2007)

Jusqu'à présent, les farines produites proviennent essentiellement des poissons entiers ou de déchets produits et on parle surtout de farines de poissons. La production mondiale des farines de poisson varie actuellement autour de 8 millions de tonnes par an après avoir connu une croissance régulière durant ces 30 dernières années. Concernant les farines de crustacés, le Japon produit plus de 50% de la production mondiale, talonné de près par les Etats-Unis (FAO 2008) (Figure I.10). 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 Tunisie, la production de farines de poissons et du lait en poudre a été mise en suspens par mesure de précaution depuis l'année 2000.

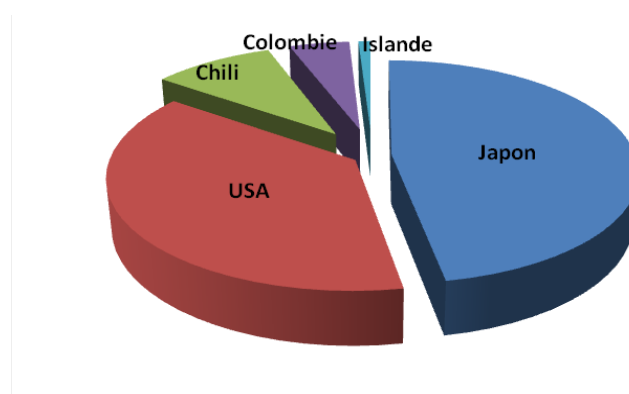


Figure I.10: Principaux pays producteurs de farines d'abats de crustacés (Source : FAO 2007)

I.2.2.2.3 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. D'après l'organisation internationale des aliments de poisson et des huiles de poisson (IFFO), 70% de ces huiles sont 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 (Figure I.11). 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 $\omega 6$). 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.

I.2.2.3 Les hydrolysats

I.2.2.3.1 Définition

Les hydrolysats sont des fractions à teneur protéique élevée (73 à 85%). On distingue deux catégories: les autolysats et produits fermentés, qui sont les produits traditionnels obtenus par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) et les hétérolysats obtenus par réaction d'hétérolyse (avec l'ajout d'acides ou d'enzymes exogènes) et dont la fonction est de modifier la matière première afin de lui apporter des qualités nutritionnelles et économiques (Roy et Durand 1997).

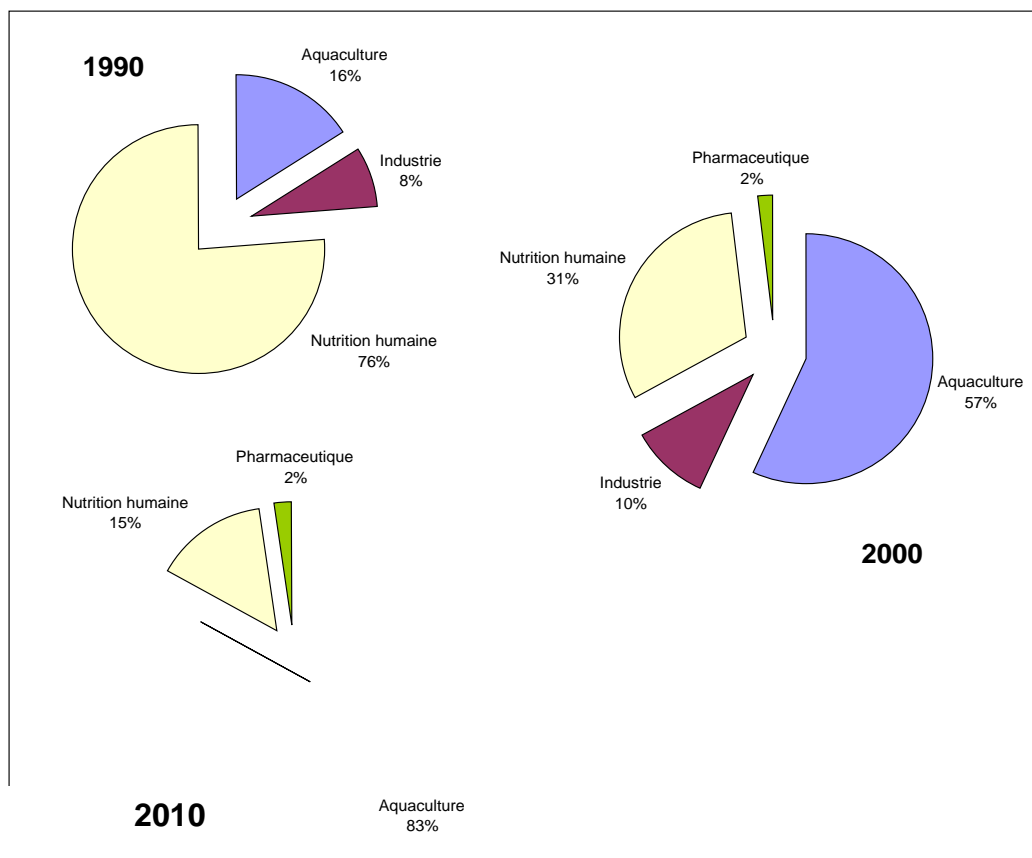


Figure I.11: Utilisation des huiles de poisson durant la période 1990-2010 (Source IFFO).

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 digestes et d'avoir une haute qualité nutritive. La figure I.12 récapitule les procédés de fabrication des autolysats, hydrolysats, farines et ensilages.

I.2.2.3.2 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 est la plus ancienne technique utilisée pour une bonne conservation des aliments en leur conférant en même temps des caractéristiques organoleptiques. Dans ces mélanges complexes, la présence d'inhibiteurs naturels et la force ionique élevée diminuent l'activité des enzymes endogènes. la durée du procédé peut alors durer plusieurs mois (Roy et Durand 1997). Les **autolysats** sont des produits plus récents et conçus principalement pour l'alimentation animale. Ils 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 (Haard et Simpson 1994). Cependant, toute la fraction protéique n'est hydrolysée, même à la suite d'une autolyse très poussée. Les autolysats se présentent alors sous la forme d'un précipité insoluble dont la formation serait due à l'interaction entre les acides gras libres produits par l'action des phospholipases avec des protéines (Schimmer 1981).

I.2.2.3.3 Les hétérolysats

I.2.2.3.3.1 Les ensilages

Un ensilage est décrit comme étant un produit liquéfié fabriqué à partir d'un animal ou de la partie d'un animal par ajout d'un acide. La liquéfaction est provoquée par l'action des enzymes présentes dans les tissus et accélérée par l'acide. Ce dernier permet de créer les conditions favorables de pH pour l'action des enzymes, favorise la digestion des tissus et limite la croissance bactérienne (Vizcarra-Magana et al. 1999). Divers acides peuvent être utilisés, tels que les acides inorganiques (acide chlorhydrique, acide sulfurique,...) ou des acides organiques (acide formique, acide propionique,...). Les acides sont généralement apportés dans des proportions de 1 à 5% (volume/poids) aux tissus broyés (Raa et Gildberg 1976).

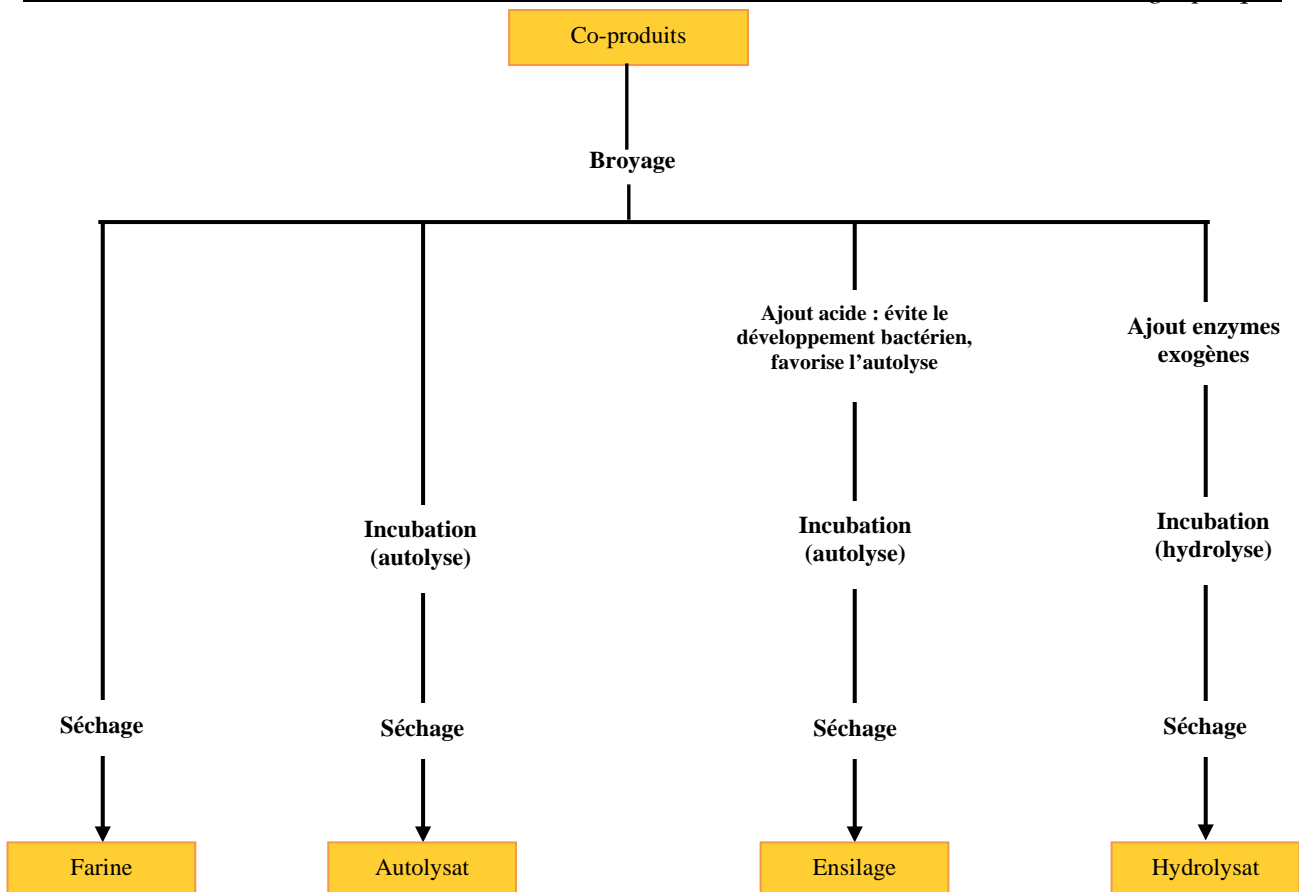


Figure I.12 : Procédés de fabrication de farines, autolysats, ensilages et hydrolysats

1.2.2.3.3.2 Les hydrolysats enzymatiques

Vues les contraintes et inconvénients majeurs des produits fermentés et des autolysats cités précédemment et compte tenu de la lenteur de la réaction, aussi bien celle de fermentation que celle d'autolyse, les industries agro-alimentaires se sont penchées depuis quelques années sur une technique plus rapide et moins coûteuse, en remplaçant les protéines habituellement utilisées par des protéines dites "non conventionnelles" en leur conférant - par exemple par hydrolyse - de nouvelles propriétés fonctionnelles. Les hydrolyses sont donc 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 sont souvent issues de sous-produits disponibles en grandes quantités et de faible valeur ajoutée (cas de la caséine) (Mannheim et Cheryan 1990), des protéines de soja ou de blé (Adler-Nissen 1978), de maïs (Hardwick et Glatz 1989). Elles peuvent être issues d'une purification d'enzymes digestives (De Vecchi et Coppes 1996), extraites de végétaux (papaine, 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. L'hydrolyse enzymatique dans des conditions contrôlées permet d'améliorer les propriétés fonctionnelles de ces mélanges en libérant des peptides mais tout en conservant leur valeur nutritionnelle (Sikkorski et Naczk 1981).

Les déchets d'abattoir, d'origine bovine ovine ou caprine et aviaire étant devenus suspects, les industries agro-alimentaires se sont tournées vers les protéines d'origine marine, considérées comme matériel sain. L'interdiction de produire certaines farines d'origine animale a donc orienté les recherches vers de nouvelles sources protéiques de substitution et a ainsi conduit les industriels à optimiser le coût et les conditions de fabrication, en particulier par le choix de l'enzyme. De nos jours, l'utilisation de la fraction protéique des hydrolysats (intérêt nutritionnel, source azotée et activité biologique) est majoritaire. Aussi, le rôle de remplacement des sources alimentaires protéiques que jouent les hydrolysats est quelque peu dépassé quoique toujours d'actualité. Cependant, l'utilisation des hydrolyses enzymatiques pour la solubilisation des protéines et la libération des lipides à intérêt nutritionnel est de plus en plus répandue suite à une exigence de plus en plus forte pour une meilleure qualité nutritionnelle aussi bien sur le plan animal qu'humain. 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.

I.2.2.4 Les hachis

Les hachis représentent la troisième voie de valorisation de masse en France avec une production de 33 000 tonnes en 2002 (OFIMER 2004). 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 et des études d'appétence sont développées par les boîtes commercialisant ces produits. 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 (OFIMER 2004).

I.2.2.5 Les composés à haute valeur ajoutée à partir d'hydrolysats marins

Dans ce paragraphe, nous allons développer plus particulièrement les composés que nous avons traités dans la partie expérimentale.

I.2.2.5.1 Les composés à intérêt nutritionnel

I.2.2.5.1.1 Peptides et acides aminés

Lorsqu'elles subissent une hydrolyse enzymatique avec des protéases, les protéines sont alors clivées en peptides et si l'hydrolyse est très poussée, en acides aminés. Ainsi, 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, comme les acides aminés essentiels. Au début des années 60, les hydrolysats de protéines d'origine marine ont été utilisés principalement pour la nutrition animale. Ce n'est que plus tard, dans les années 80 que des progrès significatifs dans le domaine de l'hydrolyse ont été réalisés et qu'à la suite de cela ils ont été utilisés en nutrition humaine. En **nutrition humaine**, la digestibilité des protéines hydrolysées d'origine marine présente un avantage pour la nutrition de personnes dont le système digestif est en dysfonctionnement. Des régimes adéquats en fonction des pathologies peuvent ainsi être élaborés. En effet, il s'est avéré que l'assimilation intestinale des peptides issus de protéines hydrolysées était meilleure et le rendement métabolique plus efficace qu'un mélange d'acides aminés libres correspondant. Ceci est du fait que plus les protéines sont solubles, mieux elles seront métabolisées par l'organisme et plus les peptides sont petits, plus vite ils seront absorbés par la paroi intestinale (Durand et Lagoïn 1983). Depuis les années 70, les recherches se sont tournées vers les hydrolysats de produits et co-produits marins, en commençant par les hydrolysats de poisson. Les espèces les plus communément exploitées dans ce sens sont la morue (Lalasis et al. 1978), le tilapia (Abdul-Hamid et al. 2002) et le saumon (Liaset et al. 2003). Ces travaux ont montré 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 protides solubles est important et la composition en acides aminés équilibrée. Ces hydrolysats ont donc été convoités pour leur grande valeur nutritionnelle, parfois supérieures à celles des régimes synthétiques. 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).

Tableau I.4: Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse des co-produits marins.

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Temp. (°C)	Type de protéase	Spécificité	Espèce hydrolysée	Utilisation	Auteurs
Enzymes d'origine animale								
Chypotrypsine (Digestive Bovine/ Porcine, SIGMA)	3.4.21.1	7-9	24-40	Endopeptidase à sérine	Acides aminés aromatiques	crevette	Intérêt nutritionnel	Simpson et al. 1998
	3.4.21.2					sole	Activité biologique	Jun et al. - 2004; Rajapakse et al. 2005
Trypsine (Digestive Bovine/ Porcine, SIGMA)	3.4.21.4	7-9	35-60	Endopeptidase à sérine	Lys, Arg	Crevette	Intérêt nutritionnel	Simpson et al. 1998
						sole	Activité biologique	Jun et al. - 2004; Rajapakse et al. 2005
Pepsine (Digestive Bovine/ Porcine, SIGMA)	3.4.23.1	2-4	35-40	Endopeptidase à aspartate	Acides aminés hydrophobes	morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset et al. 2000
	3.4.23.2					sole	Activité biologique	Jun et al. - 2004; Rajapakse et al. 2005
Pancréatine (Pancréas Bovine/ Porcine)	3.4.21.4	7-9	40	Mélange de Trypsine, Chymotrypsine et Carboxypeptidase	n.c	saumon	Activité antioxydante	Wang et al.-2008
						saumon, merlu	Activité antioxydante ; Inhibition de l'ACE (Activité antihypertensive)	Nakajima et al. 2008

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Temp. (°C)	Type de protéase	Spécificité	Espèce hydrolysée	Utilisation	Auteurs
Enzymes d'origine animale								
E.digestive maquereau	-	10	50	-	-	Lieu	Activité biologique	Je et al. 2005
E.digestive morue	-	7	40	-	-	morue	Intérêt nutritionnel	Gildberg et al. 2002
E.digestive saumon	-	7,5	40	-	-	saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 2000b; c
E.digestive thon	-	10	50	-	-	sole	Activité biologique	Jun et al. - 2004; Rajapakse et al. 2005
Enzymes d'origine végétale								
Bromélaïne Tige d'ananas (<i>Ananas comosus</i>) (Biochem Europe)	3.4.22.32	5-8	20-65	Thiolprotéase	Aucune	morue	Source azotée	Aspmo et al. 2005a; b
Ficine (Latex de figue)	3.4.22.3	5-8	30-80	Thiolprotéase	Aucune	menhaden écailleux	Intérêt nutritionnel	Hevia et al. 1976
Papaïne Latex de papaye (<i>Carica papaya</i>)	3.4.22.2	5-8	65-80	Thiolprotéase	Aucune	capelan	Intérêt nutritionnel	Shahidi et al. 1995
						hareng	Source azotée	Aspmo et al. 2005a; Aspmo et al. 2005b
						Poisson lézard	Activité biologique	Dong et al. 2005
						Sole	Activité biologique	Jun et al. 2004; Rajapakse et al. 2005
Actinidine Kiwi, (Biochem Europe)	3.4.22.14	4-7	15-40	Thiolprotéase	Aucune	morue	Source azotée	Aspmo et al. 2005a; b

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Temp. (°C)	Type de protéase	Spécificité	Espèce hydrolysée	Utilisation	Auteurs							
Enzymes d'origine microbienne															
Alcalase® 2,4 L <i>Bacillus licheniformis</i> (Novozymes)	3.4.21.62	6-10	55-70	Endopeptidase à sérine	Aucune	Seiche	Intérêt nutritionnel	Soufi-Kechaou et al. 2009							
						Capelan	Intérêt nutritionnel	Shahidi et al. 1995							
						crevette	Activité biologique	Bordenave et al. 2002							
	3.4.21.19						crevette	Intérêt nutritionnel	Gildberg et Stenberg 2001						
							hareng	Intérêt nutritionnel	Hoyle et Merrit 1994						
							Morue	Activité biologique	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt 2003						
							Morue	Intérêt nutritionnel	Lalasisidis et al. 1978						
							3.4.22.31						Morue	Libération des lipides	Šližyte et al. 2005b
													Morue	Source azotée	Aspmo et al. 2005a; 2005b
													Morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset et al. 2000
							Thon	Source azotée	Guérard et al. 2001						
							Sardine	Activité biologique	Rousseau et al. - 2001; Ravallec-Plé et al. - 2001						
								Intérêt nutritionnel	Quaglia et Orban - 1987						
								Libération des lipides	Dumay et al. – 2006						

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Temp. (°C)	Type de protéase	Spécificité	Espèce hydrolysée	Utilisation	Auteurs
						saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 2000b; c
						Sole	Activité biologique	Jun et al. 2004; Rajapakse et al. 2005
						Tilapia	Intérêt nutritionnel	Abdul-Hamid et al. 2002
Neutrase [®] 0,5 L <i>Bacillus amyloliquefaciens B.subtilis</i> (Novozymes)	3.4.24.28	5,5-7,5	45-55	Métalloprotéase (Zn)	Phe, Leu, Val	Capelan	Intérêt nutritionnel	Shahidi et al. 1995
						Morue	Intérêt nutritionnel	Šližyte et al. 2005a
						Morue	Libération des lipides	Daukšas et al. 2005
						Morue	Source azotée	Aspmo et al. 2005a ; b
						morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset et al. 2000
						Sole	Activité biologique	Jun et al. 2004; Rajapakse et al. 2005
Protamex [®] <i>Bacillus sp.</i> (Novozymes)	3.4.21.62	6 - 8	35 - 60	Endoprotéase Mélange de thiol et de métalloprotéases	Leu-Phe	Seiche	Intérêt nutritionnel	Soufi-Kechaou et al. 2009
	3.4.24.28					Morue	Source azotée	Aspmo et al. 2005a; b
						Sardine	Libération des lipides	Dumay et al. 2006
						Saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset et al. 2003
Corolase [®] 7089 <i>Bacillus subtilis</i> (AB enzymes GmbH)	n.c	7,5	40	Endopeptidase	n.c	Saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 2000b;c
Corolase PN-L Champignon (Rohm enzymes)	n.c	7,6	40	Endopeptidase	n.c	Saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 2000a; b

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Temp. (°C)	Type de protéase	Spécificité	Espèce hydrolysée	Utilisation	Auteurs
Flavourzyme® 500 L <i>Aspergillus oryzae</i> (Novozymes)	3.4.11.12	5- 7	40 - 60	Endo- et exopeptidases métalloprotéase	Leu-pro	Morue	Intérêt nutritionnel	Aspmo et al. 2005a
						Morue	Libération des lipides	Daukšas et al. 2005
						Sardine	Libération des lipides	Dumay et al. 2006
						Seiche	Intérêt nutritionnel	Soufi-Kechaou et al. 2009
						Saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 2000a; b
Pronase® <i>Streptomyces griseus</i> (Sigma, Amano Pharmaceutical)	3.4.24.4	5-9	37	Mélange de protéases alcalines, neutre, endo et exo (sérine protéase)	Aucune	Sole	Activité biologique	Jun et al. 2004
						Maquereau	Activité biologique	Wu et al. 2003
Kojizime® Champignon (Novozymes)	3.4.11.1	5.5 - 6	45 - 55	n.c	n.c	Morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset et al. 2000
Umamizine® Champignon (Amano Pharmaceutical)	3.4.21.63	7	45	n.c	n.c	Thon	Activité biologique	Guérard et al. 2002
	3.4.22.25					Thon	Source azotée	Guérard et al. 2002

En raison de leur constitution et de leurs caractères organoleptiques spéciaux, les hydrolysats de poisson ne sont généralement pas consommés à l'état pur ni en forte quantité, mais ils peuvent, de multiples façons, servir d'ingrédients. En effet, l'amertume des peptides générés lors de l'hydrolyse est un frein pour l'utilisation des hydrolysats en alimentation humaine (Creach 1950 - 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 (Boury, 1950 – Mackie 1982).

En **alimentation animale**, quelques applications ont été trouvées pour l'utilisation des hydrolysats marins 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 l'intérêt des peptides de poisson en tant que substituts du lait (Merritt 1982). Les hydrolysats protéiques d'origine marine sont utilisés depuis de nombreuses années et leur utilisation comme source protéique de substitution aux autres farines animales n'est plus la seule application possible. En effet, il a été démontré que l'absorption intestinale des peptides hydrolysés était meilleure pour les ruminants et aboutissait ainsi à une meilleure métabolisation et donc un meilleur rendement massique.

Cependant, c'est essentiellement dans le domaine de l'aquaculture que ces hydrolysats ont été et sont encore les plus valorisés, étant donnée l'absence d'aliments adaptés aux différents stades larvaires de poissons et de crustacés et qui constitue un facteur limitant du secteur aquacole. Depuis les années 1970, les études sur les besoins nutritionnels des larves de poissons et crustacés d'aquaculture se sont multipliées face à un développement important de ce secteur, mettant en évidence les comportements alimentaires ainsi que les besoins nutritionnels des juvéniles (Kanazawa 1970). 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 larves de crevettes (Ravallec-Plé 2000) et des alevins de poisson (Olivia-Teles et al. 1999). 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). En 2006, une étude démontrait que les saumons pouvaient être élevés sans farine de poisson, en la remplaçant par une farine végétale supplémentée en hydrolysate de poisson (Espe et al. 2006). Il est important de prendre en considération la capacité digestive et les besoins des larves de crustacés et alevins de poissons, l'acceptabilité de l'aliment n'étant mise à l'épreuve qu'une fois à l'intérieur de l'organisme.

Les hydrolysats protéiques des produits de la mer sont certes utilisés depuis de nombreuses années, mais il en existe ceux particulièrement adaptés aux besoins des animaux au cours des différents stades larvaires. Cahu et al. (1999), se basant sur le critère de la formation squelettique ont montré que l'incorporation d'hydrolysats dans l'aliment augmentait la qualité des larves de *Dicentrarchus labrax*. Toutefois, de nombreuses études rapportent que de trop fortes ou de trop faibles concentrations en hydrolysate ralentissent le développement (Jones et al. 1979 – Amjad et Jones 1992 – Cahu et al. 1999). Le Moullac et al. (1994) ont montré que la farine de calmar, utilisée à faible concentration, avait un effet sur la croissance de *L. vannamei*. La présence dans ces aliments de molécules capables de stimuler la croissance ou la digestion, présente un intérêt évident pour les premiers stades larvaires de crustacés, en particulier de la crevette, au cours desquels se forment les prémices du système digestif.

1.2.2.5.1.2 Les composés lipidiques

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. 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. 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).

I.2.2.5.2 Les composés à activités biologiques

I.2.2.5.2.1 Les peptides

La digestion enzymatique des protéines de produits d'origine marine est susceptible de libérer des peptides possédant une action biologique. Les peptides fonctionnels sont contenus initialement dans les séquences des protéines alimentaires. Pour exercer leurs propriétés potentielles, ils doivent être libérés par la digestion intraluminale, mais protégés d'une hydrolyse ultérieure qui détruirait leurs sites actifs, puis absorbés sans être dégradés lors du passage entérocytaire (Bouglé 2007), enfin toucher leur cible à une concentration qui soit compatible avec la physiologie. De nombreux travaux ont porté 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 (Sato et al.1982). Ainsi, ces derniers peuvent intervenir dans la régulation des fonctions cardio-vasculaires comme l'effet anti-hypertenseur et vasodilatateur via l'inhibition de l'ACE (Angiotensin Converting Enzyme). Les inhibiteurs de l'ACE sont largement utilisés dans le traitement de l'hypertension, de l'insuffisance cardiaque et de la néphropathie diabétique (Ariyoshi 1993 – Fujita et al. 2000) et plusieurs dizaines d'inhibiteurs de l'ACE ont été repérés et libérés des protéines d'origine marine, notamment les poissons et algues (Sato et al. 2002). L'activité anti-thrombotique a également été mise en évidence par la présence d'enzymes fibrinolytiques extraites à partir des algues.

D'autres activités biologiques de type facteur de croissance, stimulation de la synthèse protéique, contrôle de la motilité intestinale, déclenchement de la sécrétion d'enzymes digestives effets immuno-modulateurs, effets antioxydants, propriétés cytotoxiques ont pu être isolés et identifiés (Bernet et al. 2000 – Ravallec-Plé et al. 2001 – Ravallec-Plé et Van Wor mhoudt 2003 – Guérard 2004 – Williams et al. 2005 – Kim et Mendis 2006 - Picot et al.2006). Les peptides marins interviennent aussi dans le traitement de l'ostéoporose, de l'arthrite, du diabète, de l'obésité ou encore du cancer (Gildberg et al. 2002; Kim et Mendis 2006). Le Tableau I.5 précise quelques exemples de ces activités. Dans la composition d'un hydrolysats donné on retrouve généralement toujours les mêmes peptides actifs. Le point déterminant est donc la répétitivité des conditions de lyse qui doivent toujours fournir des peptides de même taille (Ravallec-Plé et al. 2001). L'hydrolyse devrait donc être maîtrisée de même que le degré de purification des peptides afin d'obtenir une activité biologique constante et d'affirmer que ce sont bien les peptides qui en sont responsables (Mayer et al. 2007).

Tableau I.5 : Principales activités biologiques des peptides d'organismes marins

Espèces	Activité	Références
<i>Mollusques céphalopodes</i>		
Seiche (<i>Sepia officinalis</i>)	Croissance somatique immuno-modulatrice et digestive	Le Bihan - 2006
Calamar géant (<i>Dosidicus gigas</i>)	anti-oxydante	Mendis et al. - 2005; Rajapakse et al. - 2005
Calamar (<i>Dosidicus eschrichtii</i>)	anti-oxydante	Lin et Li - 2006
Calamar (<i>Todarodes pacificus</i>)	anti-oxydante	Ono et al. - 2004
<i>Crustacés</i>		
Crevette (<i>Acetes chinensis</i>)	anti-oxydante	He et al. - 2006
Crevettes tropicales (<i>Penaeus subtilis</i>)	anti-oxydante	Guérard et al. - 2002; Sumaya - Martinez et al. - 2004; Guérard et al. - 2007
<i>Poissons</i>		
merlu	réparation du tissu épithélial	Fitzgerald et al. - 2005
sole	anticoagulante	Rajapakse et al. - 2005
	anti-oxydante	Jun et al. - 2004
sardine	hypotensive	Bordenave et al. - 2002 Kajimoto et al. - 2005b
	comportement hormonal	Ravallec-Plé et al. - 2001 Rousseau et al. - 2001
	sécrétagogue	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt - 2003
morue	immuno-modulatrice	Gildberg et al. - 1996
	anti-proliférative	Picot et al. - 2006
lieu	oxydante	Je et al. - 2005
merlu	immuno-modulatrice	Duarte et al. - 2006
merlan	anti-proliférative	Picot et al. - 2006
saumon	anti-proliférative	Picot et al. - 2006

1.2.2.5.2.2 Les Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs), ou peptides cationiques (pour leurs charges positives), représentent une grande variété de petites molécules (10 - 40 acides aminés) qui sont codées par des gènes et considérées ensemble pour leur activité antimicrobienne native. Selon leur structure et leur composition en acides aminés, les PAMs peuvent être classés en plusieurs catégories. Un grand nombre d'entre eux ont conservé certaines caractéristiques structurales communes. En se basant sur ces propriétés communes, deux familles majeures de PAMs ont bien été caractérisées chez les mammifères : les défensines et les cathélicidines. Chez les poissons, plusieurs familles de molécules possédant une activité antimicrobienne sont connues depuis: les protamines, chargées positivement, interagissent avec les membranes des bactéries ; elles ont des propriétés antimicrobiennes contre un large éventail de bactéries Gram⁻, Gram⁺, et de champignons. La résistance aux antibiotiques des micro-organismes pathogènes ne cesse de croître et devient un réel problème de santé publique. La situation est telle que plusieurs souches bactériennes sont devenues multi-résistantes à tous les antibiotiques à large spectre au point que certaines de ces infections sont, aujourd'hui, incurables. Ce phénomène de résistance aux agents antimicrobiens n'est pas nouveau mais s'est aggravé depuis ces 20 dernières années. Au cours de cette période, aucune nouvelle classe d'antibiotique n'a vu le jour. Il apparaît donc nécessaire et urgent de découvrir de nouvelles classes d'agents anti-infectieux. Les peptides d'origine marine ont déjà fait leurs preuves de point de vue activité antimicrobienne (Huang et al. 2007 - Chung et al. 2005 - Kato, 2002; Nakamura et al. 2000 - Einarsson, 1987). Plus particulièrement, les invertébrés offrent une source potentielle pour les médicaments antimicrobiens (Bansemir et al. 2006 - Jayaraj et al. 2008 - Mayer et al. 2007). Chez les mollusques, les composés bioactifs identifiés sont en majeure partie des peptides, depsipeptides, stérols, sesquiterpènes, terpènes, polypropionates et dérivés d'acides gras (Balcázar et al. 2006 - Blunt et al. 2006 - Maktoob and Ronald 1997). Chez les céphalopodes, Sherief et al. (2004) ont mis en évidence une activité antibactérienne à partir d'extraits organiques des glandes nidamentaires (éthanol, méthanol et butanol) de ces glandes. Plusieurs études et travaux ont porté aussi sur les propriétés antimicrobiennes de l'encre (Mochizuki 1979- Takai et al. 1993- Palumbo et Jackson 1995- Mackintosh 2001).

1.2.2.5.2.3 Les acides gras et phospholipides

Les recherches sur les AGPI (Acides Gras PolyInsaturés) se sont accrues depuis une vingtaine d'années. Ainsi, il a été démontré que les ω 3 ont un effet bénéfique sur la

circulation sanguine et sur la prévention et le traitement de l'athérosclérose, 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 ω 3 est sans doute leur action contre les maladies cardiaques (Jacobson 2006 - Kris-Etherton et al. 2006). Les ω 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 - Puglia et al. 2005), ou dans l'inhibition de la genèse des carcinomes (Larsson et al. 2004). De ce fait, de nombreuses activités biologiques ont été recensées dans les huiles de poisson. Certaines études ont montré des propriétés anti-inflammatoires (Kim et al. 2006 - Maroon et Bost 2006). 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 **phospholipides** sont naturellement présents dans tous les organismes. En effet, les phospholipides sont un des constituants majeurs des membranes cellulaires (Figure I.13). Les quantités les plus importantes de phospholipides dans les co-produits marins sont trouvées dans les têtes de poissons, crustacés et céphalopodes mais également dans les œufs en période de fraye.

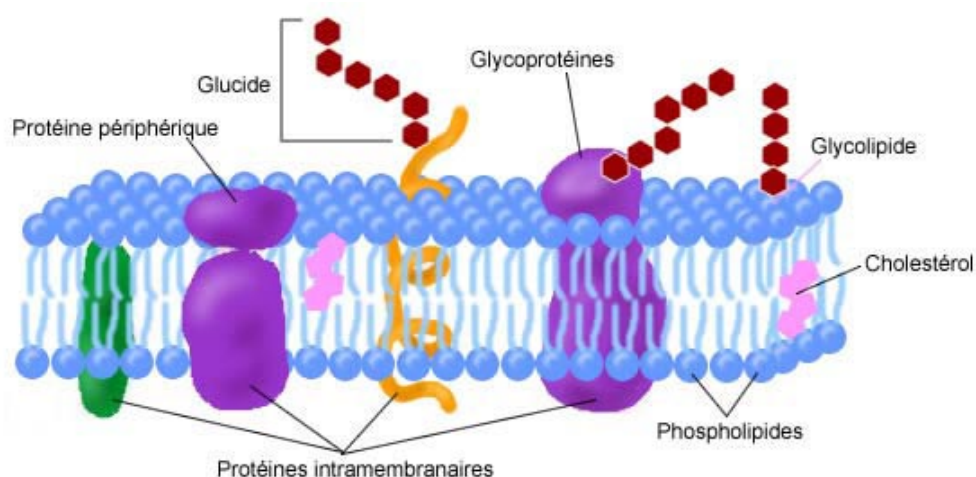


Figure I.13 : Représentation schématique en coupe de la membrane plasmique

I.2.2.5.3 Les composés à intérêt fonctionnel

En plus de leurs propriétés biologiques et nutritionnelles confirmées, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats de produits marins ont été étudiées. En effet, les hydrolysats doivent avoir des propriétés particulières afin d'entrer dans la composition des aliments. Ces propriétés concernent par exemple l'hydrophobicité, les facultés d'émulsion ou de formation

de mousse et la capacité à retenir l'eau. Sur ce point, Kristinsson et Rasco (2000 b) ont souligné le fait que l'ajout de 1,5% d'hydrolysats de saumon réduisait la perte en eau après congélation de 3 à 1%. Quaglia et Orban (1990) ont également démontré que les hydrolysats de sardine possédaient des propriétés émulsifiantes et hydrophobes et ce en fonction de l'avancement de l'hydrolyse. D'une manière générale, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont essentiellement liées aux conditions et paramètres d'hydrolyse. Ainsi, en contrôlant ces conditions, il est possible d'obtenir les propriétés fonctionnelles voulues (Šližyte et al. 2005a).

I.2.2.5.4 Les hydrolysats en tant que milieu nutritif

Les micro-organismes ont besoin d'environ 3 éléments principaux en grande quantité. Plusieurs autres éléments sont nécessaires en très faible quantité, ils font partie des enzymes et des co-facteurs. La microbiologie dépend en grande partie de la croissance et du maintien des micro-organismes en laboratoire. Ceci n'est possible que si des milieux de culture adéquats sont disponibles. L'utilisation d'hydrolysats de poisson comme source azotée 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.

I.2.2.6 Autres voies de valorisation

Certains co-produits d'origine marine plus spécifiques peuvent servir à la production de composés possédant des caractéristiques précises leur conférant une haute valeur marchande. Ces produits dérivés peuvent provenir des carapaces de crustacés, de la coquille interne des céphalopodes (os de seiche, Gladius du Calmar) pour la chitine et le chitosan ; de tout tissus conjonctif (peaux, nageoires, structures osseuses) pour le collagène et la gélatine et plus particulièrement les cartilages de poissons sélaciens pour la chondroïtine sulfate, protéine fortement impliquée dans le mécanisme d'induction des ostéoblastes pour la régénération osseuse. Des compléments en minéraux peuvent également être extraits des arêtes et des écailles permettant de pallier à des carences en calcium phosphore et magnésium et ce en alimentation animale et humaine. La kératine peut elle aussi être extraite à partir des écailles de poisson, est utilisée pour les soins capillaires et les ongles en tant qu'agent filmogène, tenseur et hydratant. Les hydrolysats enzymatiques peuvent également conduire à la production de composés aromatiques. Ces produits dérivés sont destinés à être incorporés dans les plats cuisinés à saveur de produits de la mer (arôme de crabe, poisson,...). Les

molécules aromatiques peuvent être obtenues 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 utilisés sur le marché portent les appellations crabe, crevette, langoustine, homard ou poisson blanc.

I.3 DESCRIPTION DE L'ESPECE

ETUDIEE

Sepia officinalis (linné, 1753)

Embranchement : Mollusques

Classe : Céphalopodes

Sous-classe : Coléoïdés

Ordre : Sepioidea

Famille : Sepiidae

Genre : *Sepia*

Espèce : *officinalis*



I.3.1 Principales caractéristiques morpho-anatomiques et physiologiques

D'une manière générale, les céphalopodes (du grec : *kephalê* « tête » et *podos* « pied ») sont caractérisés par le rattachement du pied à la tête (céphalopodium) (Figure I.14). Cet appareil brachial est constitué de 8 bras et de 2 tentacules préhenseurs chez les décapodes et l'entonnoir. Ce sont des animaux évolués, tant sur les plans physiologique et anatomique que sur le plan du psychisme. En effet, ces animaux possèdent un encéphale particulièrement évolué avec un système nerveux bien développé et sont ainsi considérés comme les invertébrés les plus « intelligents » dotés d'une capacité d'apprentissage (Dickel et al. 2001- Agin et al. 2006) ainsi qu'une vision nettement plus développée que les autres espèces d'invertébrés grâce à des yeux similaires à ceux des vertébrés.

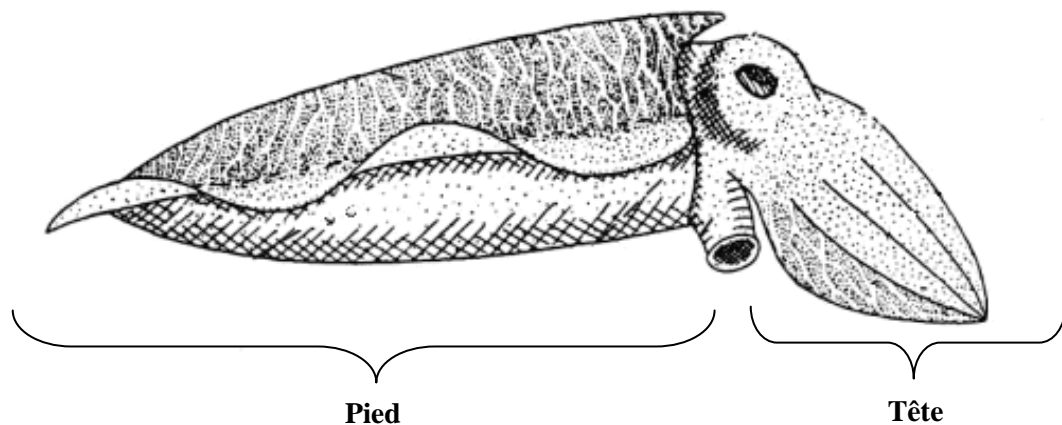


Figure I.14 : Morphologie de *Sepia officinalis*.

Ces animaux possèdent également une coquille qui peut être soit externe (genre *Nautilus*), soit interne comme pour la seiche, le calmar et le poulpe. En conséquence, même si les céphalopodes ont gardé des caractéristiques appartenant aux mollusques, certains mécanismes sont comparables à ceux des poissons (Mangold et al. 1989- Rocha et al. 2001- Perrin 2004). De ce fait, les céphalopodes sont étudiés pour de nombreuses raisons commerciales et scientifiques (Boletzky 2003). La seiche appartient au groupe des céphalopodes décapodes. La famille des Sepiidae, à laquelle appartient l'espèce *Sepia officinalis* se caractérise par un manteau large, robuste, aplati dorso-ventralement. Les nageoires sont étroites, longues avec des lobes postérieurs libres, ne se rejoignant pas sur la ligne médiane (Figure I.14). Leur coquille calcaire interne, appelée Sépion ou plus communément "os de seiche" est la structure squelettique de la seiche. Le Sépion possède une épine peu proéminente, invisible chez l'animal intact. La taille commune de la seiche se situe entre 15 et 25 cm, la maximale varie autour de 50 cm. Dans cette partie, nous détaillerons principalement la cavité viscérale, objet de cette étude. L'organisation anatomomorphologique générale de la seiche est présentée dans les figures I.15.

I.3.1.1 Le viscéropallium

Le viscéropallium comprend la coquille, le manteau, les nageoires, les organes de la cavité palléale et la masse des viscères (Figure I.16).

I.3.1.2 Le céphalopodium

Le céphalopodium comprend la tête, l'appareil branchial et l'entonnoir. Chez les céphalopodes, les ganglions céréboïdes, palléo-viscéraux et pédieux sont fusionnés en un

système nerveux central céphalisé qui, sur un plan anatomique est composé de deux parties : le cerveau et les lobes optiques (Bernay 2005).

I.3.1.3 Le tractus génital

Chez les céphalopodes, les sexes sont bien séparés et stables (Richard 1971). La gonade est constituée d'un unique gonoducte qui s'étire sur le côté gauche de la cavité palléale. Chez le mâle, le testicule s'ouvre sur un gonoducte séparé en différentes glandes étroitement associées (vésicules séminales) et impliquées dans la formation des spermatophores (Figure I.17) (Bernay 2005).

Chez la femelle, les organes sexuels comprennent l'ovaire, l'oviducte, la glande de l'oviducte et les glandes nidamentaires principales et accessoires (Figure I.18). Ces glandes peuvent atteindre des dimensions considérables chez les animaux mûrs par accumulation de réserves indispensables à l'ovogénèse (Mangold 1989). Ces glandes influencent donc fortement la composition biochimique ainsi que la masse des viscères. Les glandes nidamentaires sont logées dans la cavité palléale. Grâce à un canal central, elles sécrètent une substance gélatineuse, constituant une capsule, qui enrobe l'ovocyte et polymérise au contact de l'eau de mer assurant ainsi la protection des embryons. Les glandes nidamentaires accessoires se sont révélées posséder une importante activité antibactérienne atteignant un pic au cours de la période de maturation des gamètes.

I.3.1.4 Le tractus digestif

Les céphalopodes sont des prédateurs actifs macrophages. L'appareil digestif est composé d'un bulbe buccal, de glandes associées au bulbe buccal, du tube digestif, de la glande digestive (hépatopancréas), de l'estomac et des caeca pyloriques (Figure I.19). L'hépatopancréas peut représenter jusqu'à 80% du volume total des viscères. La glande digestive est composée de trois types de cellules digestives, parmi lesquelles les plus importantes sont les cellules matures contenant les enzymes digestives (Boucaud-Camou 1973 - Boucher-Rodoni 1983).

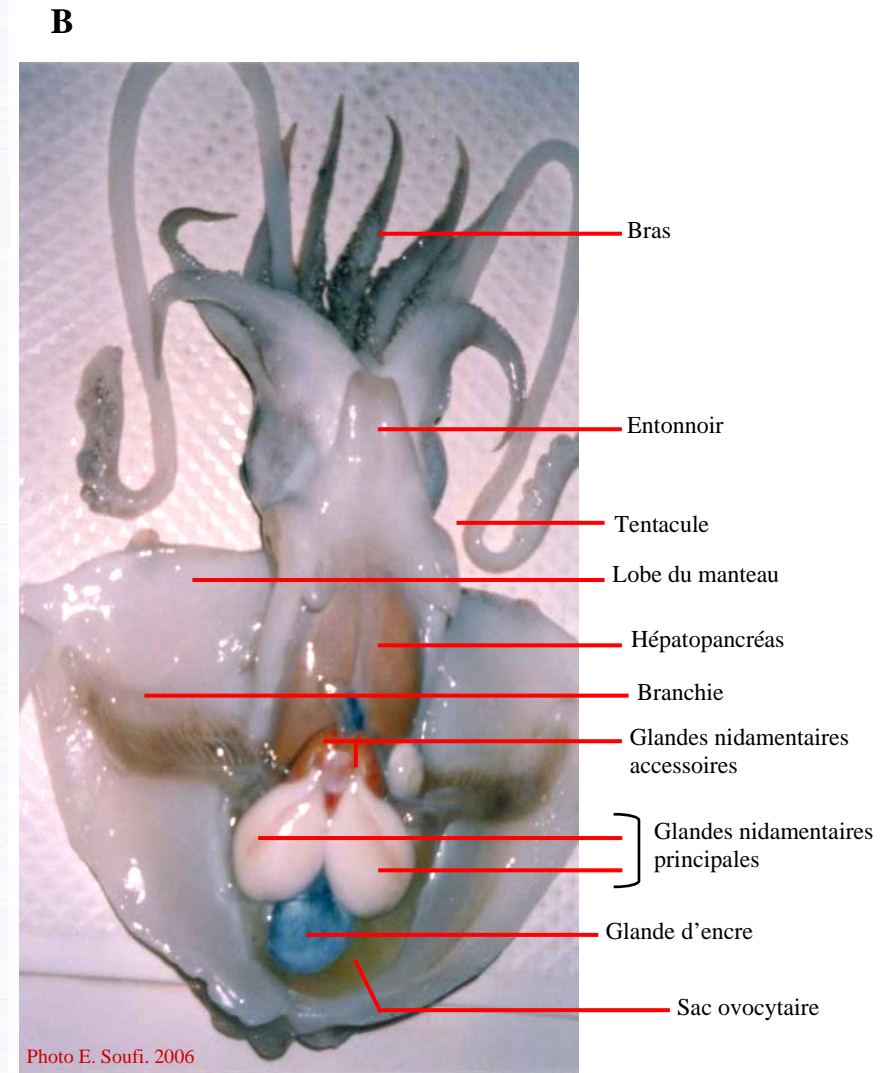
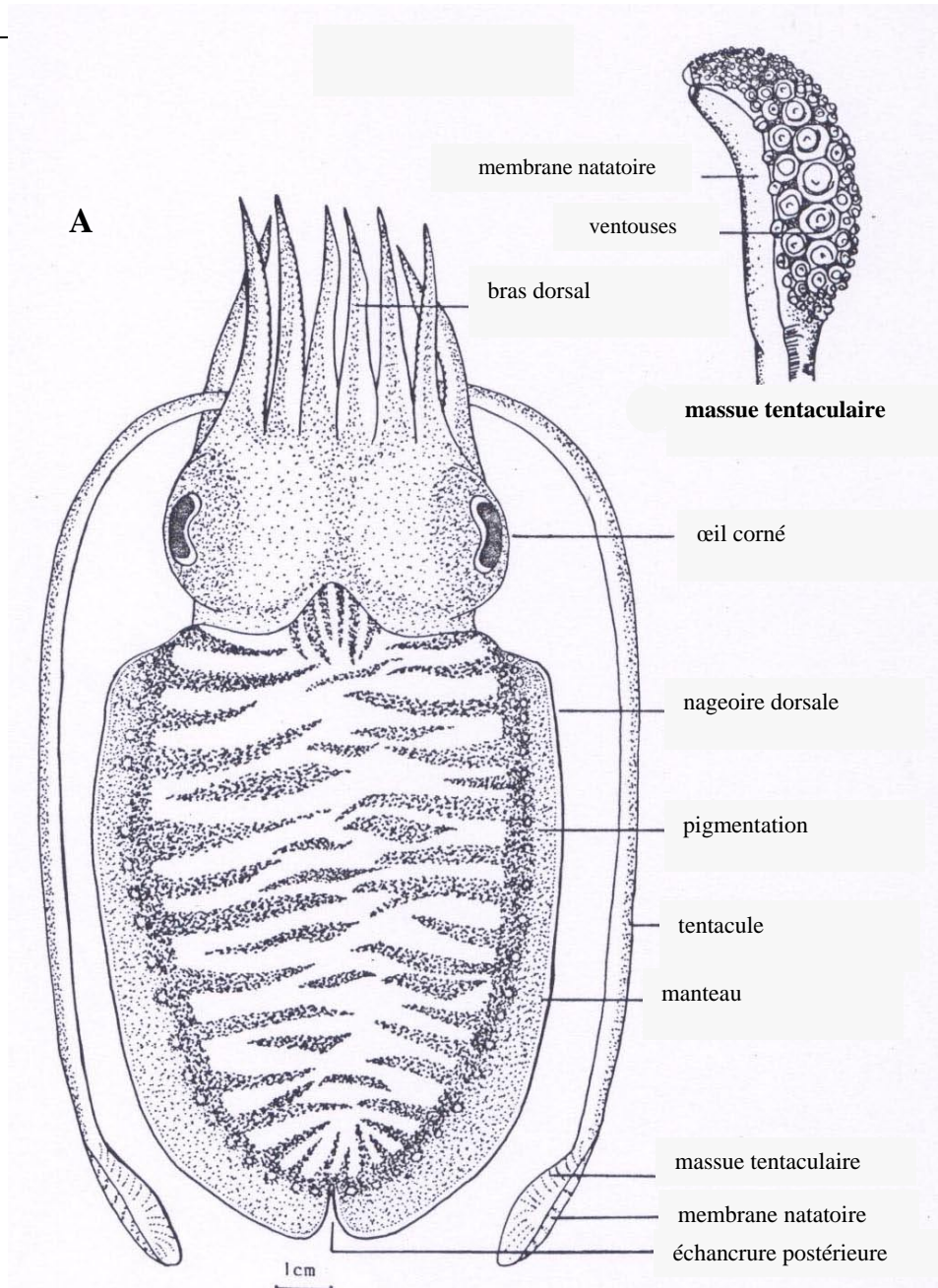


Figure I.15 : Organisation morpho-anatomique de *Sepia officinalis*. A. Vue dorsale (D'après Tompsett 1939, modifié). B. Vue ventrale après dissection.

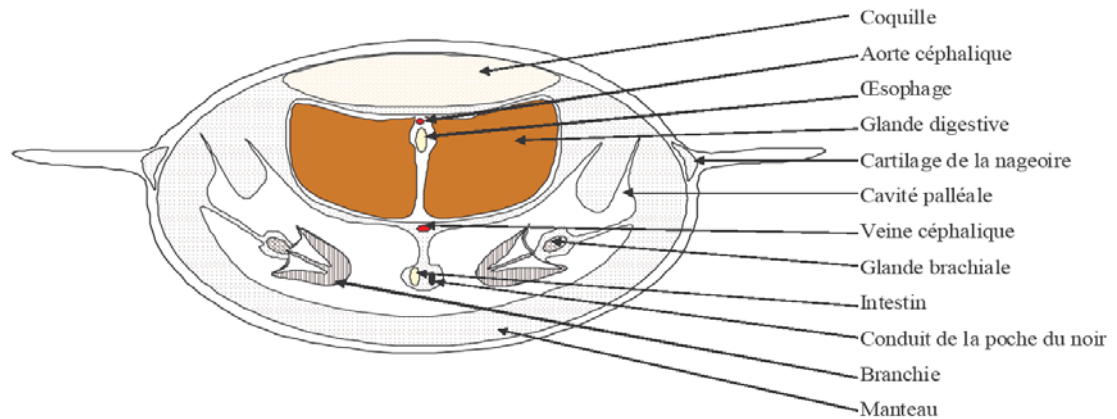


Figure I.16: Coupe transversale de *Sepia officinalis* montrant les structures et organes constituant le viscéropallium (D'après Mangold et al. 1989, modifié).

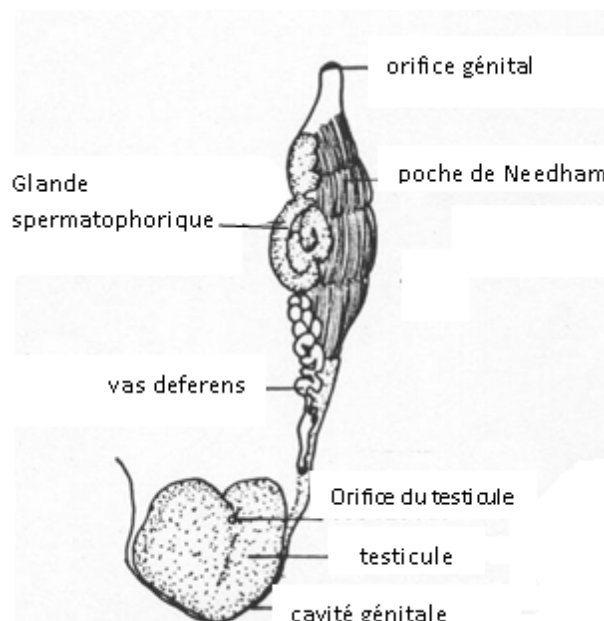


Figure I.17: Organisation de l'appareil génital du mâle de *Sepia officinalis*. A : appareil génital. B : tractus dévaginé (D'après Tompsett 1939, modifié)

I.3.1.5 Organes spécialisés de la seiche : la glande d'encre

La majorité des céphalopodes (poules, seiches, calmars) possèdent des organes particuliers qui leur sont propres, destinés comme dans la plupart des cas à un rôle de défense et de survie : il s'agit de l'entonnoir ou siphon exhalant qui en expulsant une importante quantité d'air propulse l'animal à une grande vitesse lui permettant ainsi d'échapper à son prédateur et la glande d'encre ou "poche du noir" (Figure I.20). Dans ce travail nous développerons uniquement cette dernière structure étant donné qu'elle joue un rôle très important dans la composition des viscères.

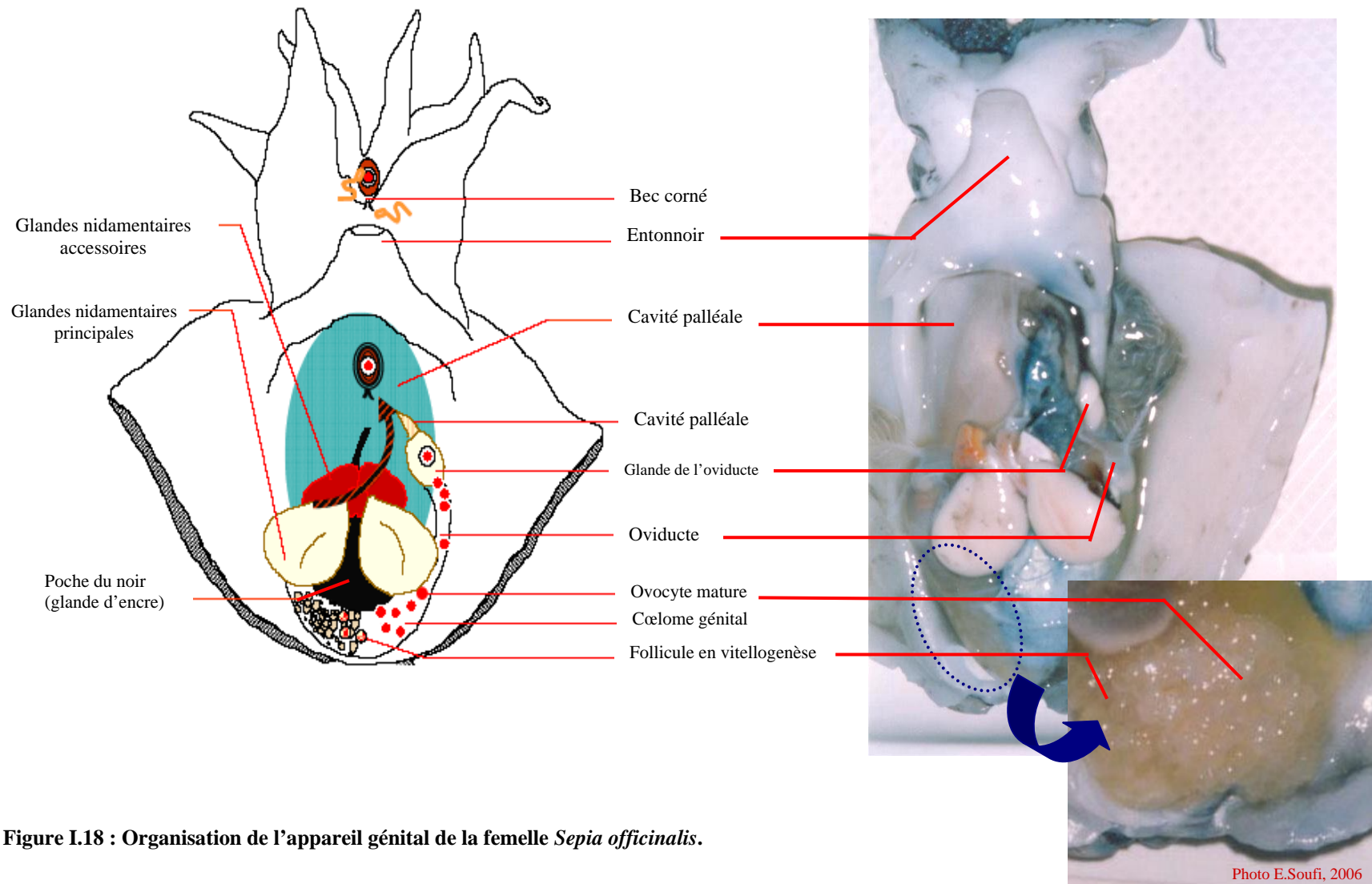


Figure I.18 : Organisation de l'appareil génital de la femelle *Sepia officinalis*.

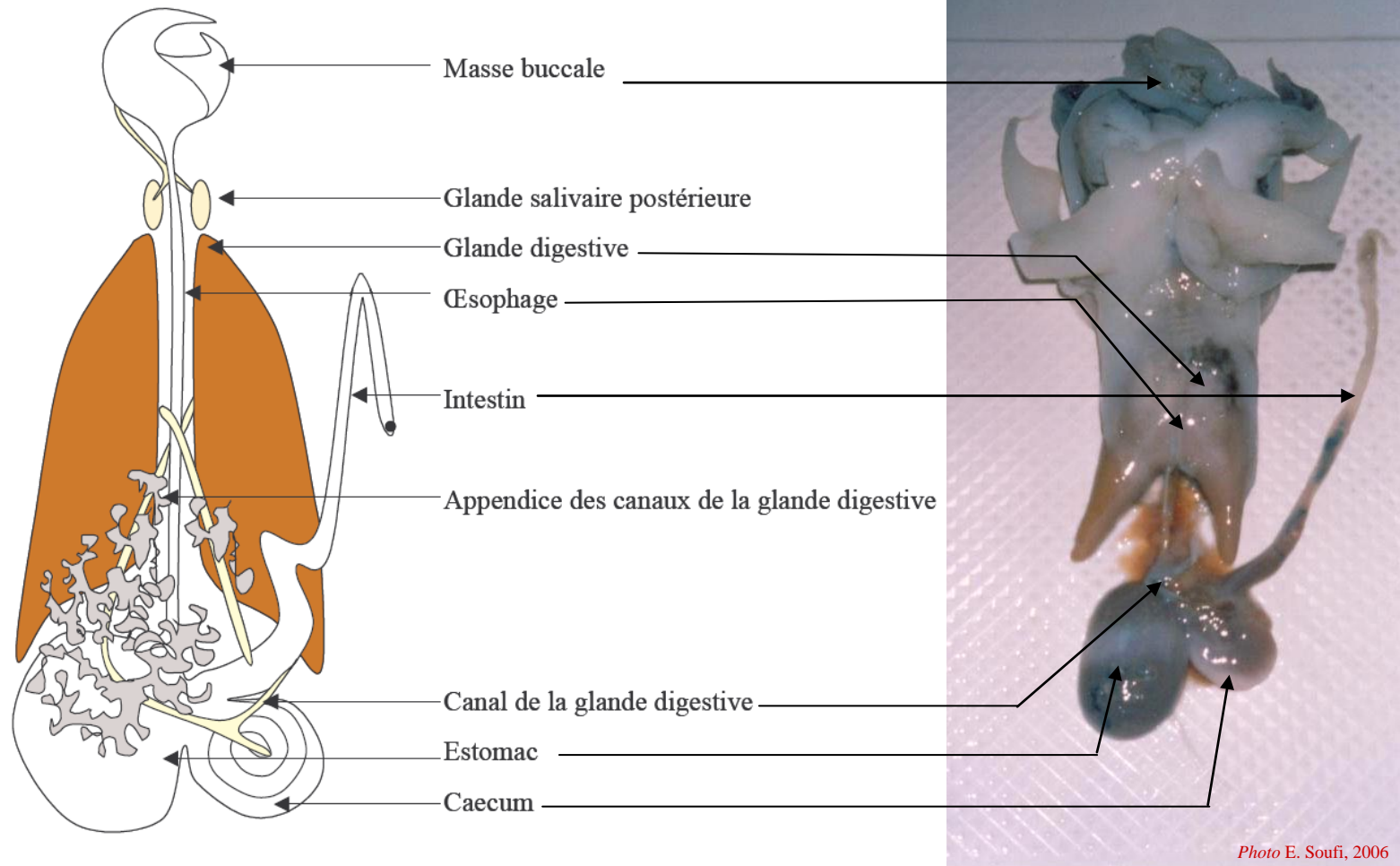


Figure I.19 : Schéma de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* (d'après Mangold et al. 1989, modifié)

I.3.1.5.1 Organisation générale de la glande d'encre

La glande d'encre des céphalopodes est considérée comme le système biologique de mélanogénèse le plus perfectionné (Girod 1982- Szabo 1961). La glande d'encre ou "poche du noir" est présente dans le tractus digestif. Cette poche est accolée à la glande digestive et est composée de plusieurs alvéoles. La glande de la poche du noir contient des mélanosomes qui, quand elles sont matures libèrent des grains de mélanine (tyrosine oxydée), associés à du matériel cellulaire et tenus en suspension dans le liquide (Schraemayer 1994).

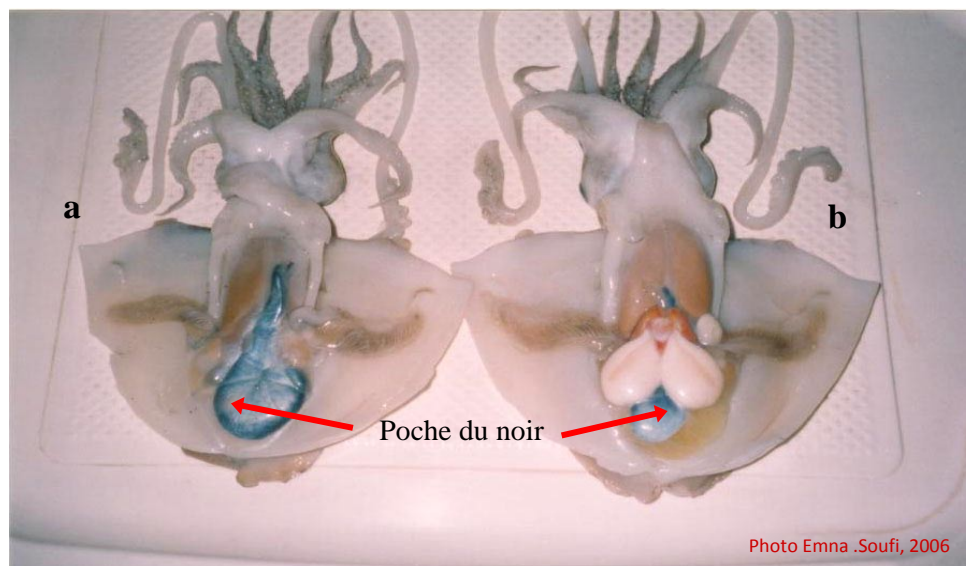


Figure I.20 : Localisation et importance de la glande d'encre chez le mâle (a) et la femelle (b)

I.3.1.5.2 Mélanogénèse et composition de l'encre de seiche

Depuis très longtemps, l'encre de seiche a été adoptée comme modèle d'étude du mécanisme de la mélanogénèse du fait que la mélanine qu'elle contient est très proche en structure et en composition de celle de tous les mammifères, notamment de celle de l'homme (Panizzi et Nicolaus 1952- Pitatelli et Nicolaus 1961- Pitatelli et al. 1963- Prota et al. 1981- Aimé et al. 1991- Pezzella et al. 1997). L'encre de seiche est composée essentiellement de sépiomélanine, c'est-à-dire de la cyclodopa-mélanine (Nicolaus 1968). A part quelques impuretés, cette mélanine se compose d'un mélange de polymères hautement réticulés, constitués de différentes unités structurales dérivées de la tyrosine (Figure I.22) : 5,6 DHI (dihydroxy- indole) ; 5,6 DHIC (dihydroxy-indole carboxylic acid) ; acides pyrroles carboxyliques ; leuchodopachrome et unités Dopa non cycliques (Pezzella et al. 1997). Les premiers stades de formation des mélanosomes sont formés de vésicules dérivées soit des tubules de l'appareil de Golgi soit du réticulum endoplasmique. Dans ces mélanosomes "primaires", les membranes de l'appareil de Golgi, des mitochondries ou bien d'autre matériel

cellulaire sont également incorporés. Les membranes formant les couches externes des mélanosomes sont formées soit par ce mécanisme soit par fusion de petites vésicules (Schraemayer 1994- Simon et Shozuke 2004).

I.3.1.5.3 Importance de l'encre comme système de défense

L'encre des céphalopodes représente un système de défense exceptionnel contre les menaces que représentent les prédateurs. A première vue, elle servirait essentiellement à brouiller les prédateurs en leur laissant un "écran noir". En effet, la substance muqueuse libérée avec la mélanine ainsi que les glycoprotéines permettent à l'encre d'une part de se diffuser rapidement dans l'eau et d'autre part de rester longtemps en suspension. Cependant, selon Adamo et al. (1996), le signal pourrait être aussi bien visuel que chimique et permettrait d'alerter les individus de la même espèce de la présence d'un danger. Aussi, les expériences de Gilly et al. (1992) ont mis en évidence une réponse de fuite du calmar suite à l'exposition à la substance incolore contenue dans l'encre de seiche, le L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa).

I.3.1.5.4 Propriétés biologiques de l'encre

La mélanine possède aussi de nombreuses fonctions physiologiques (Riley 1997) parmi lesquels le rôle d'antioxydant. En effet, les molécules d'eumélanine possèdent à la fois des groupements fonctionnels oxydants (*o*-quinone) et réducteurs (*o*-hydroquinone) (Rozanoska et al. 1999 - Sarna et al. 1999). De plus, l'encre semble contenir un antioxydant par le fait que l'oxydation de ces composés dans l'eau de mer est retardée (Lucero et al. 1994). Un antioxydant naturel stabilisant ces messagers chimiques dans l'eau de mer pourrait ainsi être présent dans l'encre. Senan et al. (2004) ont étudié les propriétés antiprolifératives de l'encre de seiche sur les fibroblastes des embryons de poulet *in vitro* et ce via le processus d'apoptose (mort programmée des cellules). L'activité antimicrobienne de l'encre des céphalopodes contre différents groupes de microorganismes a été largement étudiée durant les trente dernières années (Mochizuki 1979- Takai et al. 1993- Palumbo et Jackson 1995- Mackintosh 2001). Les extraits aqueux de l'encre de seiche ont montré un large spectre d'action antimicrobienne et se sont avérés efficaces contre neuf agents pathogènes testés. Une activité similaire a été observée pour l'extrait aqueux de *Sepia pharaonis* contre la bactérie *Proteus mirabilis* et pour celui du calmar *Loligo duvaucelii* contre *Escherichia coli* (Patterson Edward et Murugan 2000). Sadok et al. (2004) ont démontré le potentiel significatif que possède l'encre de seiche pour l'inhibition des bactéries anaérobies, particulièrement la flore psychrotrophe.

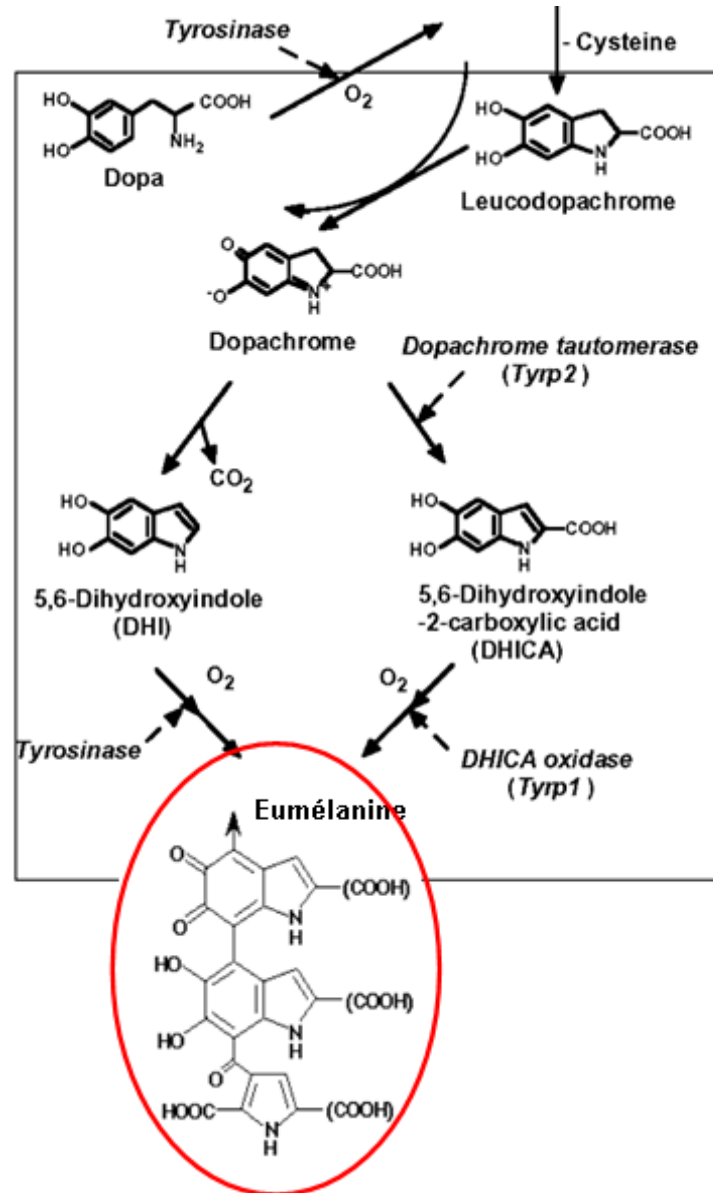


Figure I.21: Biosynthèse de l'eumélanine (d'après Wakamatsu et Ito 2001)

I.3.2 Eco-biologie de la seiche

La seiche, comme tous les céphalopodes en général occupe un niveau élevé dans le réseau trophique. Elle est carnivore, et ce dès l'éclosion (Pinczon Du Sel et Daguzan 1992). Les femelles pondent la totalité de leurs œufs au cours d'une unique saison (Bott 1938 - Richard 1967). Les œufs pondus en mars se développent en 90 jours et aboutissent à des seiches de grande taille (8 à 9 mm), après un développement embryonnaire de 30 jours (Henry et al. 1994- Halon et al. 1999). Au fur et à mesure que les œufs sont émis, la femelle les fixe sur un substrat dur, en général une tige d'herbier, composant ainsi de véritables grappes auxquelles ont donné le nom de "raisins de mer" (Najai et Ktari 1979). La seiche se trouve au niveau des étages infra et circalittoaux. Il s'agit d'une espèce démersale, néritique, généralement sur fonds sableux ou sablo-vaseux et herbiers, présente de la côte jusqu'à

environ 150 m de profondeur. Les seiches sont présentes dans les eaux côtières depuis avril jusqu'en octobre. En revanche en hiver, elles migrent des côtes vers des zones plus profondes probablement à la recherche d'une nourriture plus abondante, mais aussi de températures plus adéquates à leur biologie.

I.3.3 Distribution géographique

La répartition géographique de *Sepia officinalis* est étendue (Figure I.22) puisqu'elle occupe l'est de l'Atlantique, de l'entrée de la mer Baltique jusqu'au nord de l'Afrique, ainsi que la Méditerranée et la zone des Açores (Boletzky 1983- Boyle et Boletzky. 1996 - Guerra 2006). La seiche effectue des migrations saisonnières très marquées (Boucaud-Camou et al. 1991). En Méditerranée, cette espèce présente les stocks les plus importants au niveau du Golfe de Gabès (Tunisie), au large des côtes sud-est espagnoles et au niveau du bassin oriental (Najai et Ktari 1979).



Figure I.22 : Répartition géographique de l'espèce *Sepia officinalis* (Adaptée de Boletzky, 1983).

I.4 LA FILIERE DE TRANSFORMATION DE LA SEICHE EN TUNISIE

I.4.1 Description du procédé

Le matériel biologique utilisé dans cette étude provient à titre gracieux de la société « Calambo ». Cette entreprise, fondée en 1972 est située à proximité du port de pêche de Sfax et possède comme principale activité la transformation et la congélation des produits de la mer, principalement la crevette et les céphalopodes (poulpe, eledone, calmar et seiche). Les produits sont essentiellement exportés au pays de la communauté européenne (Espagne, Italie, Grèce,...). Aussi bien en France qu'en Tunisie, les seiches ne sont jamais transformées à bord des bateaux de pêche, elles sont simplement glacées ou congelées et stockées indépendamment du reste des captures afin d'éviter les salissures dues à l'encre. Une fois

débarquées, elles sont achetées par les mareyeurs et les usines de transformation sous criée, puis congelées entières en noir (non lavées) et en blocs. En effet, cette encre permet une altération moins rapide des produits. L'industrie « Calemba » reçoit les produits frais ou congelés à bord des bateaux. Les seiches sont généralement nettoyées et congelées en bloc en IQF (Individuel Quick Frozen). Le procédé de traitement de la seiche jusqu'à son conditionnement est résumé dans la figure I.23. Il s'agit de la méthode italienne conduisant à l'obtention de plusieurs types de déchets.

I.4.2 Les co-produits issus de l'industrie de conditionnement de la seiche

Deux types de co-produits résultent de la transformation de la seiche, les co-produits solides et les co-produits liquides. Dans le domaine agroalimentaire, l'industrie de conditionnement et de transformation des produits de la mer est considérée parmi les industries les plus consommatrices d'eau (eaux de lavage, de transport, de congélation de découpe et de cuisson). En effet, la consommation moyenne en eau des unités implantées sur le littoral de la région de Sfax est estimée à environ un millier de m³/j (APIP 1996). Dans ce cas, l'encre de seiche affecte la composition de ces rejets et augmente d'une manière significative leur caractère polluant (Abdelmouleh 1997) par le fait que ce produit biologique, de part sa composition est très miscible à l'eau de mer et reste en solution pendant une durée dépassant les 14 jours (Flood et al. 1990).

Concernant les co-produits solides, les principaux déchets obtenus suite à la transformation et au conditionnement de la seiche sont : les viscères, la tête, l'os (sorte coquille interne rudimentaire), la peau et les nageoires (Figure I.24). Les viscères comprennent le tractus digestif, le tractus génital, l'appareil cardio-respiratoire et l'appareil excréteur. Le système digestif est constitué par l'hépatopancréas également appelé glande digestive, l'estomac, les caeca pyloriques, l'intestin et la glande d'encre. Le système reproducteur comprend les glandes nidamentaires accessoires, (chez la femelle), les gonades et gonoductes et en période de reproduction les ovocytes et spermatophores.

En termes de pourcentages, la peau et le bec représentent environ 8%, l'os 7% et la masse viscérale entre 15 et 20% du poids total de l'animal, en fonction de la période du cycle reproducteur. La masse viscérale est particulièrement riche en enzymes, en protéines et en acides gras poly-insaturés. Dans cette étude, nous avons choisi de travailler sur la valorisation des co-produits de la seiche, et en particulier sur la masse viscérale. En effet, cette dernière possède un fort potentiel en ce qui concerne sa composition biochimique et n'a fait pour

l'instant l'objet d'aucune étude concrète de valorisation. En effet, toutes les études réalisées jusqu'à présent sur les viscères concernent surtout certaines espèces de poissons.

I.5 LES VOIES DE VALORISATION DE LA MASSE VISCERALE

A l'instar des poissons, la seiche possède un grand intérêt nutritionnel. Il s'agit de l'une des espèces marines les plus riches en protéines. Si la valorisation de la masse viscérale des poissons a été abondamment étudiée durant ces 20 dernières années, celle des céphalopodes n'a fait l'objet que très récemment de très peu de travaux (le Bihan et al. 2007 - Soufi-Kechaou et al. 2009 - Balti et al. 2009). Quelques équipes se sont intéressées à la valorisation de l'hépatopancréas du calmar (Lian et al 2005 – Mai et al. 2006).

I.5.1 Les enzymes

La glande digestive de la seiche ou hépatopancréas est le siège d'une grande activité enzymatique. Dans cet organe, il existe de type amylasiques, lipasiques ou encore protéolytiques (Boucaud-Camou 1982 – Perrin 2004). Deux principaux types de protéases existent, les sérines protéases (trypsine et chymotrypsine) et les cathepsines (Balti et al. 2007). Elles possèdent de plus des estérases ainsi que des phosphatases.

I.5.2 Les huiles

La teneur en lipides des viscères est en général de plus de 10% (Boucaud-Camou 1973). Ces huiles d'origine marines sont particulièrement riches en acides gras poly-insaturés (Shen et al. 2007 – Shyla et al. 2009). En effet, des études ont démontré que les acides gras poly-insaturés participent à la prévention de l'athérosclérose grâce à leurs actions anti-oxydantes. Ils jouent également un rôle dans la prévention du vieillissement et favorisent une bonne croissance ainsi qu'un bon développement du fœtus et du nourrisson.

I.5.3 Les lysats

Il existe un intérêt croissant concernant les bioprocédés de valorisation des déchets marins. En effet, les co-produits peuvent simplement être broyées puis séchées conduisant alors à l'obtention d'une **farine** ou bien subir une lyse permettant l'obtention de lysats (**autolysats**, **ensilage** ou **hydrolysat**). Il existe diverses méthodes pour lyser les tissus.

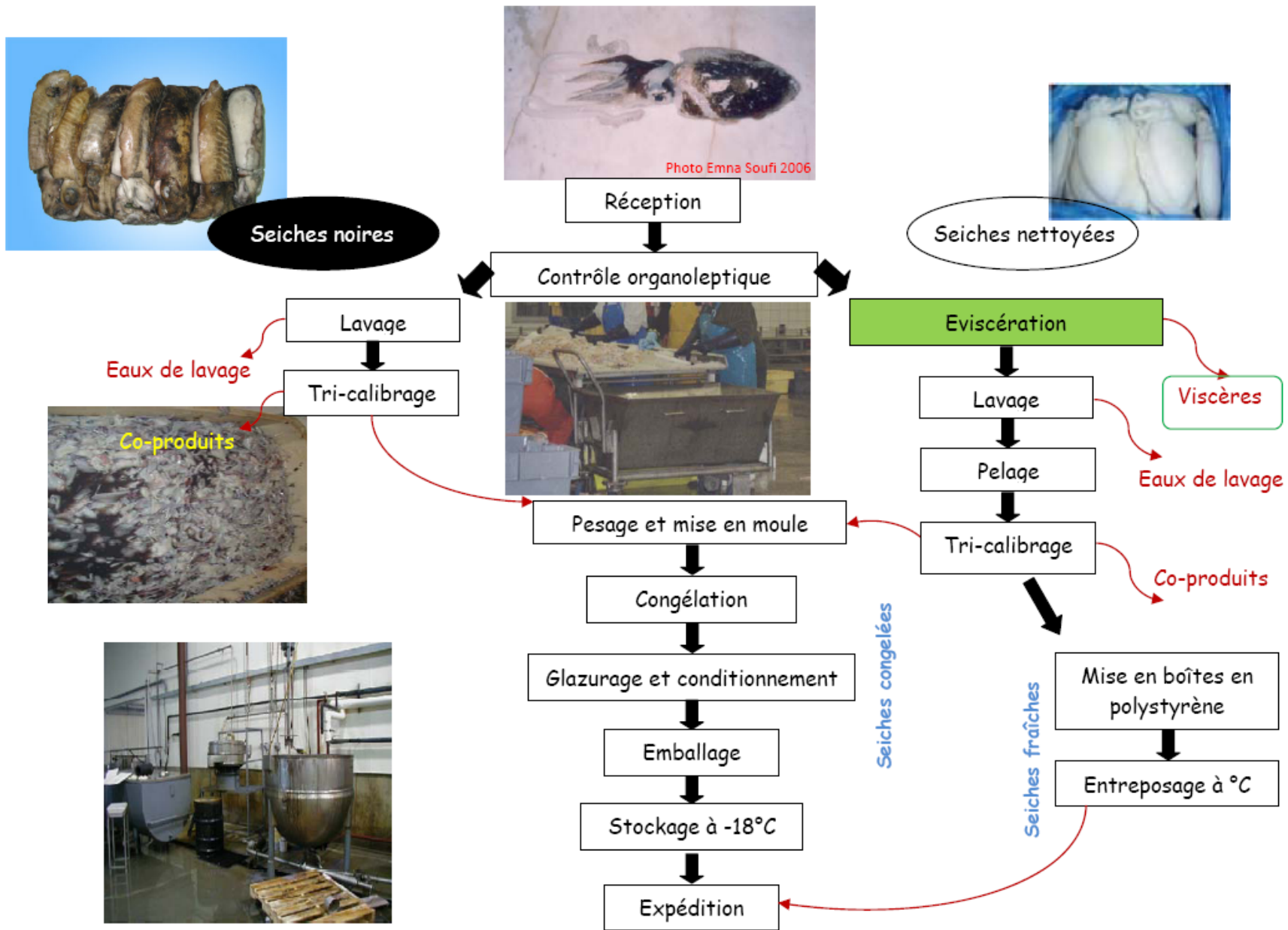


Figure I.23 : Etapes de transformation de la seiche à CALEMBO

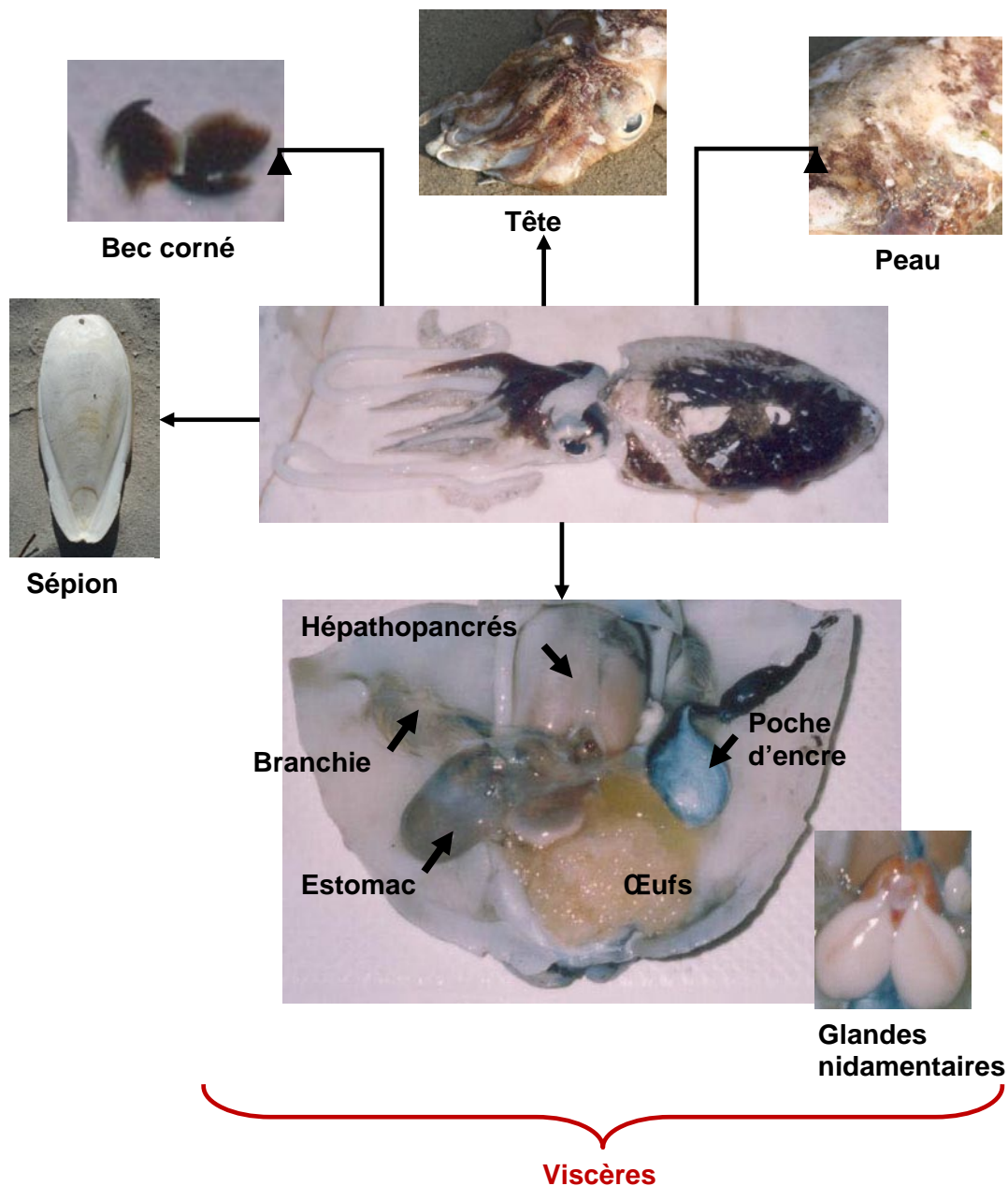


Figure I.24 : Principaux co-produits de seiche

La méthode classique de production d'autolysat de poisson exploite les enzymes endogènes présentes dans les viscères. En effet, les viscères sont caractérisées par une forte teneur en enzymes (Gildberg et Almas 1986). Cette autolyse correspond à une évolution post-mortem dont on contrôle la température et le temps d'incubation. Au cours de cette digestion enzymatique, les bactéries vont jouer un rôle primordial (apport de matériel enzymatique) en contribuant à la digestion (Mukundan et al. 1986). Pour l'ensemble de ces techniques, les temps d'incubation sont fortement variables, pouvant varier de quelques heures jusqu'à plusieurs mois, surtout pour les autolysats (Le bihan 2006) d'où le caractère non rentable des autolyses à cause d'une durée beaucoup trop longue. De la même façon, la température

(50°C) et le pH (acide, neutre ou alcalin) de lyse peuvent varier. Ces paramètres sont fonction du tissu, de l'animal et du produit final que l'on désire obtenir (degré de lyse). En conclusion, sous ces termes génériques d'autolysat, hydrolysats ou ensilage, on englobe plusieurs produits hautement différents les uns les autres car chacun est fonction des paramètres suivants : La matière biologique première (une seule ou un groupe d'espèces, un seul ou un ensemble d'organes,...) ; les conditions de lyse (pH et température) ; le niveau de lyse (lyse complète ou partielle des tissus) ; les enzymes (endogènes, bactériennes ou exogènes) et le conditionnement (liquide, lyophilisé...)

Néanmoins, le problème majeur au niveau des enzymes endogènes concerne la dégradation et les altérations auxquelles sont sujettes les matières premières (co-produits) au cours du stockage suite à la transformation. Ainsi, les différents traitements subis peuvent altérer la qualité des co-produits et même empêcher leur utilisation suite à une dégradation majeure des enzymes endogènes, des acides gras ainsi que des peptides. Pour ces différentes raisons, l'objet de ce premier chapitre sera de caractériser le contenu enzymatique et biochimique des viscères de seiche, mais aussi de connaître l'impact des différentes conditions d'hydrolyse enzymatiques sur la qualité des hydrolysats.

II. PRODUCTION DE COMPOSES VALORISABLES A PARTIR DES CO-PRODUITS MARINS PAR LES TECHNIQUES DOUCES

II.1. L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

II.1.1 Les enzymes : définition et classification

Une enzyme est une protéine présentant des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique donnée, aussi bien dans un métabolisme vivant qu'*in vitro*. Comme tout catalyseur, elle n'intervient pas dans le processus réactionnel et sa structure est retrouvée inchangée 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) et les ligases (EC 6). Le tableau I.6 indique les différentes spécificités des protéases. Dans la nature, les protéines enzymatiques sont synthétisées par les êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement. Les enzymes commerciales utilisées pour la production d'hydrolysats marins possèdent, quant à elles diverses origines. Il existe ainsi un grand panel d'enzymes exogènes de diverses origines dont les spécificités sont récapitulées dans le tableau I.6. Dans ce travail, toutes les enzymes sont des hydrolases (EC 3) et elles appartiennent plus spécifiquement au groupe des protéases (EC 3.4) qui s'attaquent aux liaisons peptidiques.

Tableau I.6 : Classification des protéases.

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

II.1.2 Définition et principe de l'hydrolyse enzymatique d'une protéine

L'hydrolyse enzymatique est une réaction chimique, catalysée par des enzymes du type hydrolase, au cours de laquelle intervient obligatoirement une molécule d'eau aboutissant à la scission d'un composé. L'hydrolyse enzymatique d'une protéine est la dégradation contrôlée d'une protéine en peptides et /ou acides aminés par des enzymes protéolytiques, sous conditions modérées de pH et de température. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, le procédé d'hydrolyse protéique se déroule en trois étapes. Tout d'abord, un

complexe Michaëlien entre le substrat protéique et l'enzyme se forme. La liaison peptidique, située entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine est alors clivée générant ainsi au moins deux peptides (Figure I.25).

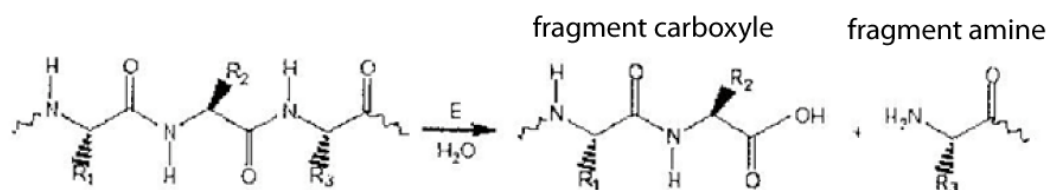


Figure I.25 : Schéma de l'hydrolyse d'une protéine (Sousa *et al.* 2004)

Après attaque nucléophile d'une molécule d'eau, le peptide restant est libéré de l'enzyme. L'hydrolyse enzymatique permet ainsi la formation d'un groupement α -carboxyle et un groupement α -aminé. Les peptides nouvellement formés peuvent être de nouveaux substrats pour l'enzyme (Adler-Nissen 1986). L'hydrolyse enzymatique permet ainsi de modifier les propriétés moléculaires de la protéine : diminution du poids moléculaire, modification de la charge et exposition hydrophobes (Nielsen 1997). Cela entraîne une amélioration de ses propriétés fonctionnelles (solubilité et propriétés moussantes, émulsifiantes,...), nutritionnelles, organoleptiques mais permet également la production de peptides dotés d'activités biologiques (Mahmoud 1994, Chabeaud 2008). Ces activités vont varier en fonction de la nature de la protéine, des spécificités de coupure de l'enzyme mise en œuvre, mais également des conditions expérimentales et du degré d'hydrolyse final. L'hydrolyse des liaisons peptidiques va donc générer la libération des protons H^+ (Figure I.26). 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 NH_3^+ soit suffisant pour permettre de maintenir le pH constant (Ravallec-Plé 2000). Lorsque le pH est inférieur, la réaction s'inverse et ce seront des ions HO^- qui seront libérés.

II.1.3 Initiation et Suivi de la réaction d'hydrolyse

II.1.3.1 Les paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique

Le suivi de l'hydrolyse est un souci majeur 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. L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des protéines est affectée par le type de substrat

protéique, la spécificité de l'enzyme, la concentration du substrat et de l'enzyme, le pH, la force ionique, la température et l'absence ou la présence de substances inhibitrices et la quantité d'eau rajoutée. 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 (Dumay 2006).

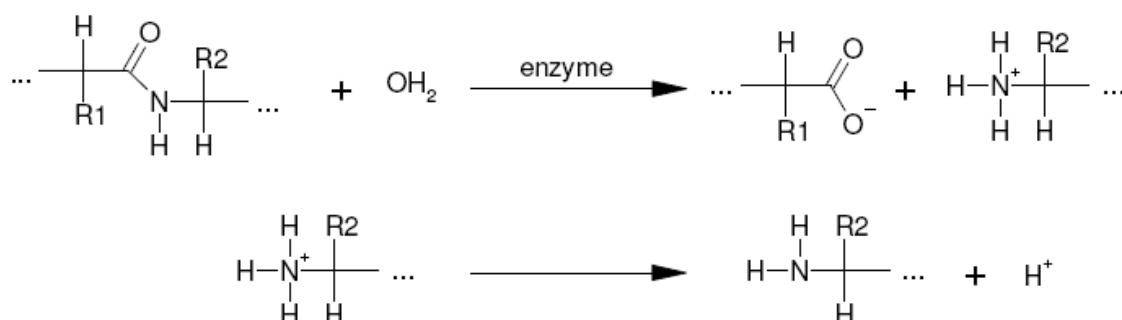


Figure I.26 : Schéma réactionnel de la libération de protons H^+ lors de l'hydrolyse enzymatique

II.1.3.1.1 La nature du substrat

La composition initiale des protéines des espèces marines, notamment les poissons, diffère en fonction de l'espèce, de la partie étudiée (muscle, organe,...), des facteurs environnementaux de l'aire de capture de l'espèce, de la condition physiologique de l'animal (période du cycle biologique,...) au moment de la capture, les conditions de stockage et/ou le délai entre la capture et le procédé d'hydrolyse. Toutes ces variations vont donc affecter la composition de l'hydrolysats de point de vue qualité des peptides (Ono et al. 2004), mais également les activités biologiques résultantes.

II.1.3.1.2 La nature des enzymes protéolytiques

Les enzymes utilisées pour l'hydrolyse des protéines sont classées dans le groupe de protéases. Il existe 4 classes de protéases, désignées par le groupement fonctionnel principal de leur site actif : **sérine**, **thiol** (cysréine), **carboxyl** (acide aspartique et glutamique), et **métallo** (souvent zinc). C'est ce groupement qui définit le pH optimum de ces enzymes. Les thiol- et métalloprotéases sont actives à pH neutre, les sérines et carboxylprotéases sont actives, respectivement à pH alcalin et acide. Les protéases sont également classées en **endopeptidases** et **exo-peptidases** selon leur mécanisme hydrolytique. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur des protéines au niveau des sites spécifiques produisant ainsi des peptides de taille relativement grande. Les exopeptidases hydrolysent, quant à elles systématiquement les acides aminés, soit en position c-terminale (cas de

carboxypeptidases), soit en position N-terminale (cas des amino-peptidases) (Kristinsson et Rasco 2000). Pour l'hydrolyse de protéines alimentaires, les enzymes les plus couramment utilisées sont les endoprotéinases. Cependant, les exopeptidases peuvent être combinées aux endopeptidases afin d'aboutir à une dégradation plus complète (Adler-Nissen 1982) et pour obtenir des hydrolysats présentant des propriétés diverses. Comparées aux enzymes **endogènes** initialement présentes dans les organes et muscles des espèces marines et contribuant à la fabrication longue et incontrôlée d'autolysats, l'utilisation des enzymes exogènes permet d'obtenir des produits protéiniques solubles avec de bonnes propriétés fonctionnelles sans pour autant affecter leurs valeurs nutritives, et de contrôler la formation de peptides amers (Raksakulthai et Haard 2003) et de maintenir une reproductibilité de la qualité du produit. Le choix des enzymes à utiliser dans une réaction d'hydrolyse est établi en fonction de leurs caractéristiques en termes de spécificité, efficacité, activité, stabilité, propriétés organoleptiques des hydrolysats, profils de température, de pH et de coût (Sainclivier 1985). Ce choix va ensuite influencer la composition en peptides dans l'hydrolysats (Adler-Nissen 1986). Dans cette étude, les enzymes choisies sont toutes d'origine microbienne. En effet, comparées aux enzymes d'origine animale, les enzymes d'origine microbienne présentent un moindre coût, une plus large variété d'activités catalytiques et une plus grande stabilité thermique et pH-métrique (Diniz et Martin 1997). **A la suite de cette revue, il ressort ainsi que la combinaison entre la spécificité de coupure de l'enzyme et la composition initiale du substrat sont déterminantes pour les produits que l'on désire obtenir à la fin.**

II.1.3.1.3 Influence de la température

L'étude de la vitesse initiale en fonction de la température fait apparaître deux phases bien distinctes. 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 température est spécifique pour chaque enzyme (souvent indiquée par le fournisseur) et il est important de travailler dans la plage de température indiquée. 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 une surconcentration en sels).

II.1.3.1.4 Influence du pH

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. La vitesse d'une réaction décroît généralement rapidement lorsque l'on s'éloigne du pH optimum jusqu'à devenir négligeable (± 2 unités de pH). Ce pH optimum varie beaucoup selon les enzymes. Les exemples de protéases indiquées dans le Tableau I.6 ont des pH optimaux variant de 2 à 10.

II.1.3.1.5 Concentration en enzyme et réaction d'hydrolyse

Pour une concentration donnée de substrat, l'étude des variations de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en enzyme (Figure I.27) 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.

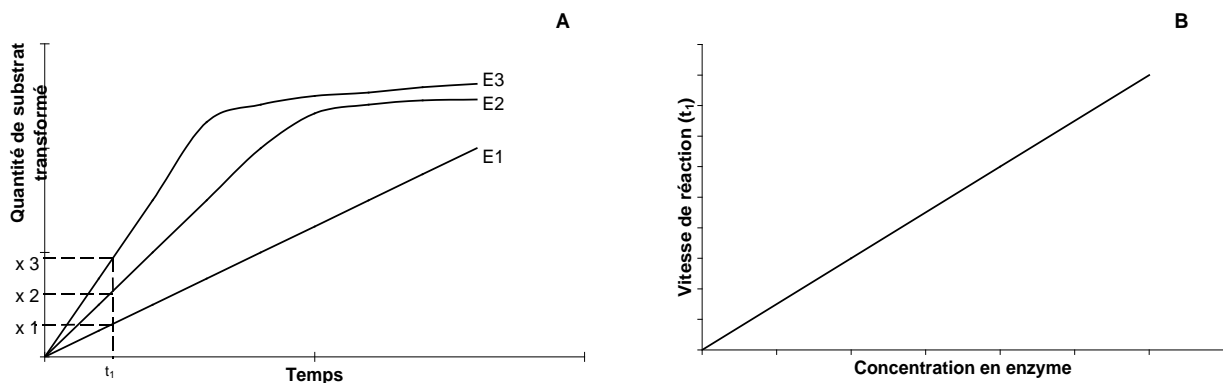


Figure I.27 : Effet de la concentration en enzyme sur la quantité de substrat formé au cours du temps (A) et sur la vitesse de réaction (B) (Cuvellier 1999).

II.1.3.2 Le degré d'hydrolyse comme paramètre de suivi

II.1.3.2.1 Définition

L'évolution de l'hydrolyse enzymatique est quantifiée par degré d'hydrolyse (DH) et est représentée par l'Équation I.1.

$$\%DH = \frac{\text{nombre de liaisons peptidiques coupées}}{\text{nombre de liaisons peptidiques totales}} \cdot 100 \quad (\text{Equation I.1})$$

Le degré d'hydrolyse est déterminé par le nombre de liaisons peptidiques coupées sur le nombre total de liaisons dans le substrat initial. Une protéine intacte a une valeur de DH égale à 0% tandis qu'une protéine totalement hydrolysée en acides aminés libres a une valeur de DH de 100%. Le degré d'hydrolyse (DH), indicateur du degré d'avancement de l'hydrolyse est le paramètre le plus communément utilisé pour décrire et contrôler le procédé d'hydrolyse (Adler-Nissen 1986). Ce paramètre sert à contrôler l'efficacité et la reproductibilité du procédé d'hydrolyse.

II.1.3.2.2 Méthodes de quantification

De nombreux protocoles ont été mis en place pour le suivi de la réaction d'hydrolyse enzymatique. 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 dont la sonde est plongée dans le milieu réactionnel. Cependant par ce biais, l'hydrolyse ne peut être poussée très loin car l'activité de l'enzyme étant très sensible aux variations de pH. La mesure du DH peut également être lue de manière **indirecte** suivant trois principales méthodes en se basant sur trois principes différents. Ces méthodes sont les suivantes :

☛ *Méthode du pHstat*

Afin de permettre une action plus longue de l'enzyme, la titration des protons libérés est basée sur le maintien d'un pH constant (auquel opère l'enzyme) et de la neutralisation du milieu réactionnel par rajout continu et automatique d'une base, généralement la soude (lors de libération de H⁺) ou d'un acide (libération HO⁻) selon la valeur du pH à laquelle opère l'enzyme au cours de la réaction (Shahidi et al. 1995). Le volume versé est directement proportionnel à la quantité de liaisons peptidiques coupées. Cette méthode est dite méthode du pHstat en référence à l'appareil utilisé (Adler-Nissen 1986). La méthode du pHstat est une méthode de référence et a été utilisée par de nombreux auteurs lors de la solubilisation des protéines alimentaires, elle permet un suivi continu du degré d'hydrolyse (Adler-Nissen 1977 – Shahidi et al. 1995 – Diniz et Martin 1996 – 1997a,b – Liaset et al. 2000 – Guérard et al. 2001).

☛ *Méthode du TCA*

Cette méthode se base sur le dosage de la quantité d'azote libéré au cours de la protéolyse et restée soluble en présence d'un agent précipitant, en l'occurrence l'acide trichloroacétique TCA (Baek et Cadwallader 1995). Dans ce cas, le DH est déterminé dans l'extrait par 10 % de TCA. Le test au TCA est complémentaire à celui avec l'OPA. Le DH est exprimé comme le pourcentage ratio de l'absorbance de l'hydrolysats sur celui de la solution d'origine.

☛ Méthodes colorimétriques

Les méthodes les plus courantes pour estimer l'évolution de l'hydrolyse sont les méthodes basées sur la quantification des groupements α -aminés qui se retrouvent libérés tout au long de l'hydrolyse par dosage spectrophotométrique. 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)** (Fields 1971 - Adler-Nissen 1979), à l'***o*-phthaldialdéhyde (OPA)** (Panasiuk et al. 1998 - Nielsen et al. 2001). 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). Le tableau I.7 dresse une comparaison entre ces différentes méthodes et la méthode pHStat.

Méthode au TNBS : l'acide 2,4,6- trinitrobenzènesulfonique en présence d'amine primaire et en milieu légèrement alcalin, réagit et forme un chromophore dont d'adsorption maximale se situe à 340 nm.

Méthode au DNFB : basée sur la méthode de Sanger : le peptide est traité par le 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB) ou réactif de Sanger (Sanger 1949). Le groupement amine de l'acide aminé terminal joue le rôle de réactif nucléophile pour le DNFB et se substitue à l'atome de fluor sur le noyau aromatique (Figure I.28) :

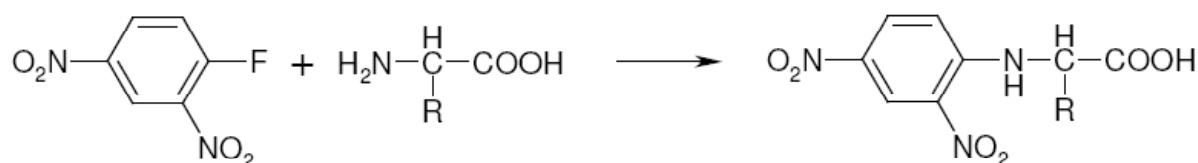


Figure I.28: Réaction entre le DNFB et le groupement amine

Le tableau I.7 présente une comparaison entre les différentes méthodes citées ci-dessus avec les principaux avantages et inconvénients.

Tableau I.7 : Comparaison entre les principales méthodes de quantification du DH

Méthode	Avantages	Inconvénients
TNBS	<p>Ne dépend pas de l'enzyme (Spellman 2003).</p> <p>Peut être utilisé pour toutes sortes de protéines.</p>	<p>Réactif considéré instable et toxique</p> <p>La réactivité avec le groupement α-aminé de la lysine induit un biais dans le résultat (Adler-Nissen, 1979)</p> <p>Temps de réaction très long (1h d'incubation et 30 mn de refroidissement) (Spellman et al. 2003)</p> <p>Le résultat ne peut pas être utilisé pour un suivi en temps réel du DH.</p> <p>L'exactitude de la valeur du DH diminue avec des protéines hétérogènes couplée à une faible quantité de prise d'essai (Panasiuk 1997)</p> <p>Dispersion nécessaire de l'hydrolysate dans du sodium dodécylsulfate (SDS) en cas d'insolubilité partielle</p> <p>Interférence avec les sucres réducteurs et l'ammoniaque</p> <p>Absence de la réactivité de la proline et de l'hydroxyproline.</p>
DNFB	<p>L'exactitude des résultats est aussi bonne que celle des autres méthodes de dosage colorimétriques</p>	<p>Existence d'un seuil minimal de concentration en groupes aminés</p> <p>Le résultat ne peut pas être utilisé pour un suivi en temps réel du DH.</p>
OPA	<p>La plus simple à mettre en œuvre et la plus rapide (Spellman 2003).</p> <p>Pas d'étape de chauffage préliminaire (Church et al. 1985).</p> <p>La plus sensible, malgré sa faible réactivité avec la cystéine et sa non réactivité avec la proline (Silvestre 1997).</p> <p>Il existe une corrélation directe entre la méthode OPA et celle du pHStat (Damodaran et Paraf 1997).</p>	<p>L'exactitude des valeurs du DH va dépendre du substrat protéique hydrolysé.</p> <p>Inadéquate pour la quantification du DH des substrats riches en cystéine (Spellman 2003) : la réaction OPA -cystéine est faible et instable.</p> <p>L'utilisation du β-mercaptoethanol comme composé à thiol génère initialement de l'isoindole, qui subit généralement un réarrangement intramoléculaire impliquant très souvent une extinction à la longueur d'onde 340 nm. (Frister et al. 1988)</p>
pHStat	<p>Non dénaturante pour les protéines.</p> <p>Très rapide, reproductible (Spellman 2003).</p> <p>Suivi en temps réel de la réaction d'hydrolyse.</p>	<p>Dépendance de l'enzyme et sous-estimation du DH : l'exactitude des valeurs de DH dépendent du type de l'activité de l'enzyme utilisée au cours de la réaction : pour une préparation enzymatique riche en exopeptidases, le pHStat sous-estime le DH du fait que la valeur du pK des groupements α-aminés est considérablement supérieure pour les tripeptides, dipeptides et acides aminés libres à celle des polypeptides (Adler-Niessen, 1986), ce qui mène à une sous-estimation de la valeur $1/\alpha$ et par conséquent à une sous-estimation du DH (Spellman et al. 2003).</p> <p>Non adapté pour une réaction pH acide.</p> <p>Peu adéquate dans le domaine industriel à cause de la régulation de pH.</p>
TCA	<p>Dosage simple par la méthode Kjeldahl</p>	<p>Méthode relativement fastidieuse</p> <p>Nécessite d'importants volumes d'échantillons</p> <p>Ne permet pas de suivre en temps réel l'évolution du DH au cours du procédé d'hydrolyse (Nielsen et al. 2001)</p>

Méthode de l'OPA : le DH est estimé directement par quantification des ponts peptidiques rompus selon la méthode décrite par Church et al. (1983- 1985). Les groupes α -aminés libérés réagissent avec les réactifs constituant la solution OPA (tétraborate de Sodium, SDS) et le β -mercaptoethanol pour former un complexe qui absorbe fortement à 340 nm (Nielsen et al. 2001).

II.1.3.3 Importance des conditions opératoires

II.1.3.3.1 Optimisation des conditions d'hydrolyse

Les principaux paramètres gouvernant le procédé d'hydrolyse sont la température, le pH, le rapport enzyme/substrat, le ratio substrat/eau et enfin la durée de la réaction d'hydrolyse. Ces quatre premiers facteurs déterminent la vitesse de la réaction de l'enzyme alors que la durée de l'hydrolyse joue un rôle sur la composition finale du produit et l'étendue de la réaction (Adler-Nissen 1986). La biochimie complexe et différente de chaque matrice incite à optimiser l'hydrolyse de chaque matrice de façon séparée. Les premiers travaux réalisés sur l'hydrolyse des produits de la mer ont consisté à évaluer individuellement l'effort de chaque paramètre (les autres étant fixés) sur le degré de l'hydrolyse et sur la quantité d'azote libérée (Sripathy et al 1962 – Sen et al 1962 – Liu et al 1981 – Diniz et Martin 1996 – Benjakul et Morissey 1997 – Normah et al. 2005). Cependant, ces paramètres étant nombreux et ayant des effets combinés indissociables, une méthode expérimentale, moins coûteuse en expériences a été utilisée. Elle permet de mesurer et de connaître l'influence de chaque paramètre et d'en déduire ceux qui ont le plus d'impact dans la réaction d'hydrolyse. Statistiquement parlant, cette méthode est connue sous le nom de **méthodologie des plans d'expériences**.

II.1.3.3.2 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. Elle a pris un essor important avec le développement de l'informatique et la puissance de calcul qui l'accompagne (Benoist et al.1994). La grande nouveauté de la méthode des plans d'expériences est qu'elle propose une expérimentation factorielle : en effet, tous les facteurs varient simultanément. Le traitement des résultats se fait à l'aide de régressions multiples et l'analyse de la variance (Goupy 1996 - 1999). Faire varier tous les facteurs à la fois présente les avantages suivants (Garcia-Diaz et Phillips 1995) : diminution du nombre d'essais ; l'étude d'un nombre important de paramètres ; l'étude de l'effet des paramètres et l'identification des paramètres les plus influents : l'estimation des conditions

optimales de fonctionnement et l'obtention de modèles mathématiques. 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. Il existe plusieurs stratégies d'expérimentation (Schimmerling et al. 1997) :

- Les **plans complets** : consistent à tester toutes les combinaisons des paramètres sélectionnés. Cependant, le nombre d'essais peut vite devenir trop important quand le nombre de facteurs augmente. Par exemple pour 6 facteurs, le nombre d'essais s'élève à 64. Selon la répartition des points expérimentaux dans l'espace d'analyse (carré ou hexagonal), différents plans ont été développés (plan centré composite de Doehlert, de Box et Behnken).
- Les **plans réduits** : consistent à tester seulement une partie des combinaisons. La difficulté des plans réduits consiste en la sélection des essais à effectuer. En 1985, Taguchi crée une méthode visant à simplifier la mise en œuvre des ces plans d'expériences (quelle matrice d'expériences choisir ? Comment prendre en compte telle ou telle interaction ?etc...) (Vigier 1988 - Pillet 1994). Pour cette finalité, cette méthode propose un recueil des tables et des outils d'aide au choix de la table la plus adaptée (Melhaoui et al. 1998 - Brisset et al. 2001).

Les travaux rapportant l'utilisation de la méthodologie des plans d'expériences afin d'étudier l'hydrolyse enzymatique des protéines sont principalement axées sur l'optimisation de la solubilisation du substrat et la recherche d'un produit final ou d'une activité biologique quelconque (Tableau I.8).

II.1.4 Les différents types réacteurs enzymatiques et leur mode de conduite

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.

II.1.4.1. Réacteurs en "batch"

La réaction est conduite de façon **discontinue**. Ce mode de réaction est préconisé dans le cas de faibles volumes (échelle de laboratoire). 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.

Tableau I.8 : Exemples d'études ayant utilisé la méthodologie de PE pour les co-produits marins

Substrat	Enzyme	Plan d'expériences			Référence
		Type/niveau	Facteurs	Réponse	
Co-produits d'écrevisse	Optimase® (autre nom de l'alcalase)	Plan centré composite	T, pH, ratio E/S, [S], d	Quantité des peptides solubles et DH%	Baek et Cadwallader 1995
Muscle d'aiguillat (<i>Squalus acanthias</i>)	Alcalase® 2,4 L	Box-Behnken 3 niveaux	T, pH, ratio E/S	DH%	Diniz et Martin 1996
Co-produits de crabe	Flavourzyme®	Plan centré composite	T, pH, ratio E/S, [S], d	Quantité des peptides solubles et DH%	Baek et Cadwallader 1995
Concentrat soluble de poisson	Flavourzyme® Kojizyme®	Plan factoriel 4x5x6	T, [E], d	DH%	Nilsang et al. 2005
Protéines de caroe dorée (<i>Carassius auratus</i>)	Flavourzyme®	Box-Behnken 3 niveaux	T, pH, ratio S/eau, [E]	DH%	Sumaya-Martinez 2005
Carcasse de crevettes (<i>Penaeus braziliensis</i> et <i>Penaeus subtilis</i>)	Alcalase® 2,4 L	Box-Behnken 3 niveaux	T, pH, ratio E/S	Activité antioxydante, teneur en peptides solubles et en composés phénoliques totaux	Guérard et al. 2007a
Viscères et têtes de sardine	Alcalase® 2,4 L Flavourzyme® Protamex	Plan centré composite	T, pH, ratio E/S, ratio S/eau, d	Libération des lipides	Dumay 2006
Muscle de carpe marbrée (<i>Aristichthys nobilis</i>)	Alcalase® 2,4 L	Réseau neural artificiel		Activité de piégeage des radicaux libres	Li et al. 2006

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.

II.1.4.2 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.

I.1.4.3 Réacteurs continus et combinaison bioréacteur enzymatique / UF

Dans ce type de réacteur, la cuve est alimentée et soutirée en continu. Pour 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 seulement le produit sorte de l'enceinte. Pour ne récupérer que ces peptides, le réacteur pourra par exemple être combiné avec un système d'ultrafiltration (UF) au seuil de coupure connu (Figure I.29). 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 (Bouhallab 1998).

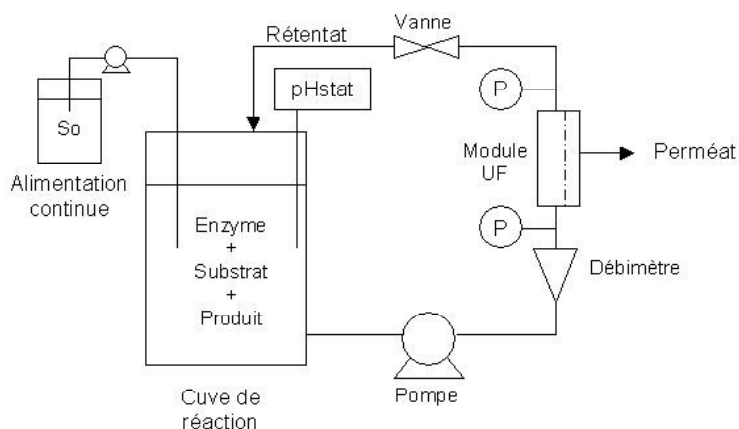


Figure I.29 : Exemple de bioréacteur à membrane



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).

II.1.4.4 Les différents modèles 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 (Figure I.30).



Figure I.30: Différents modèles de bioréacteurs enzymatiques utilisés à échelle de laboratoire. A : Réacteur 800 ml. B et C : Réacteurs 2 L.

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.

II.1.4.5 Importance de 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) et 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. La géométrie du réacteur joue un rôle sur l'efficacité de l'agitation comme le montre la relation :

$$\frac{Q}{H} = k \left[\frac{d}{D} \right]^n \quad \text{(Equation I.2)}$$

où Q : débit du mobile d'agitation,

H : la hauteur nanométrique,

d : le diamètre de l'agitateur,

D : le diamètre 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 nanométrique importante), le diamètre de l'agitateur doit être petit devant celui de la cuve.

II.2 LES PROCÉDES DE SEPARATION PAR MEMBRANAIRES

II.2.1 Définitions et principes de la filtration membranaire

II.2.1.1 La membrane

Une membrane semi-perméable est une barrière mince permselective qui, sous l'action d'une force de transfert, va permettre ou pas le passage de certains composants entre deux

milieux qu'elle sépare et ce à échelle microscopique, ces composés pouvant être des ions, des molécules ou des particules (Maurel 1993) (Figure I.31).

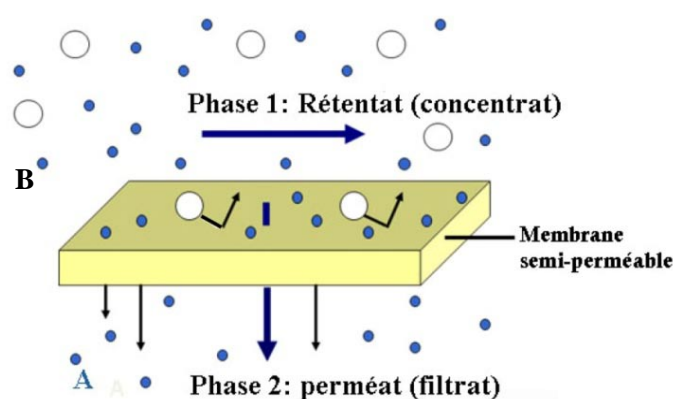


Figure I.31: Principe de fonctionnement d'une membrane semi-perméable. A (●) : les espèces qui traversent la membrane. B (○) : les espèces retenues.

II.2.1.2 Le procédé de filtration membranaire

La filtration membranaire est basée sur l'application d'un gradient de force motrice qui permet le transfert d'un solvant à travers une membrane dont la taille des pores assure la rétention de solutés. Les procédés de séparation par membrane sont utilisés pour séparer soit molécules ou ions en solution (osmose inverse, ultrafiltration, électrodialyse) soit des particules ou des micro-organismes en suspension dans un liquide (microfiltration et ultrafiltration). Ces techniques 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 l'obtention de produits à haute valeur ajoutée par fractionnement et purification de certaines molécules intéressantes (Humphrey et Keller 2001).

La force agissante de la membrane peut être : (i) un gradient de pression : osmose inverse (OI), ultrafiltration (UF), microfiltration (MF), (ii) un gradient de potentiel électrique : électrodialyse (ED) (iii) un gradient de concentration (dialyse). Le transport sélectif à travers une membrane dépend des caractéristiques des substances à séparer et de celles de la membrane (dimensions, forme, nature chimique, état physique, charge électrique,...) et des conditions hydrodynamiques de travail. Suivant les caractéristiques, le transfert sélectif des espèces repose soit sur leur capacité à diffuser à travers le matériau membranaire, soit sur leur taille par rapport à celle des pores de la membrane (effet tamis), soit sur une exclusion ionique.

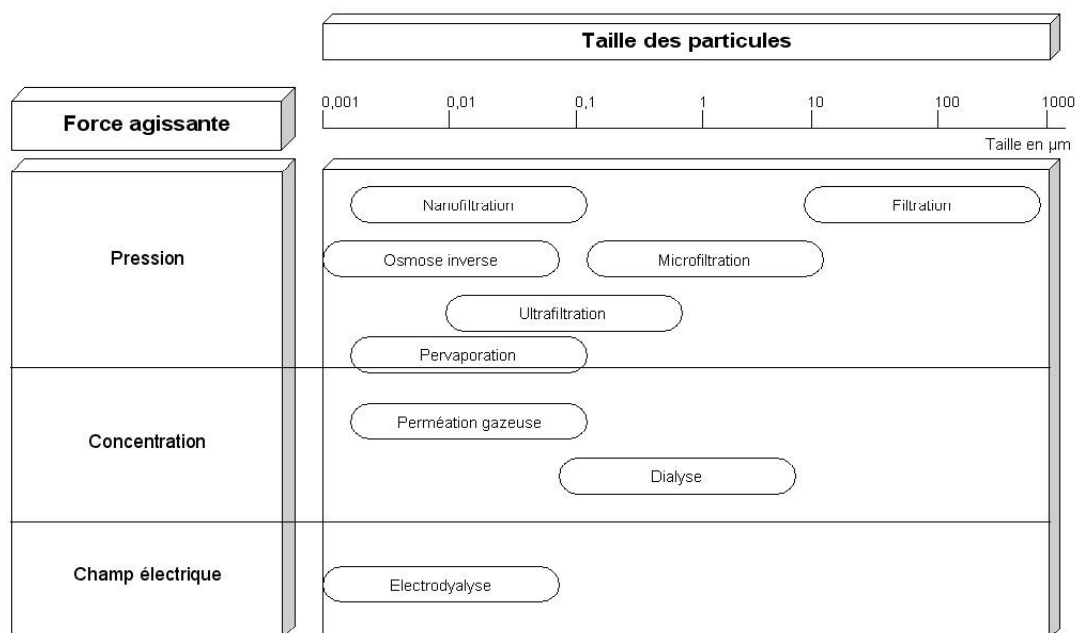


Figure I.32 : Classification des procédés de séparation par membrane en fonction de la force motrice et de la taille des particules.

II.2.2 Les différents procédés de filtration

La *filtration* permet la séparation de grosses molécules (pollens, grosses bactéries) allant de 10 à 100 µm (Tableau I.9).

Tableau I.9 : Classification et caractéristiques des procédés de séparation membranaires

	OI	NF	UF	MF
Taille moyenne des pores	Dense	0,5 à 2 nm	2 à 100 nm	0,1 à 10 µm
MWCO (Da)	< 300	300 à 1000	1000 à 10 ⁵	10 ⁵
Rôle de la pression osmotique	importante	moyenne	très faible	négligeable
Débits spécifiques	10 à 60 l/h.m ²	50 à 100 l/h.m ²	40 à 200 l/h.m ²	100 à 1500 l/h.m ²
Pressions appliquées (bar)	40 à 80	10 à 40	2 à 10	1 à 6
Composés retenus	solutés (sucre, ions, sels)	matières organiques, substances chargées	protéines, virus, enzymes, macromolécules	colloïdes, macromolécules, bactéries, émulsions
Procédés concurrents	évaporation, électrodialyse, échange d'ions	échange d'ions, chromatographie	précipitation chimique, chromatographie sur gel, dialyse	centrifugation, filtration sur terre de diatomées, décantation

- La *microfiltration* (MF) est la filtration à travers une membrane micro-poreuse avec des pores individualisés. Elle permet de traiter des fluides contenant des matières en suspension et des particules microniques dont la taille est comprise entre de 0,1 à 10 μm (levures, bactéries colloïdes). Les pressions utilisées sont généralement comprises entre 0,1 et 5 bars. Ce procédé est généralement utilisé pour la clarification des solutions (Piot et al. 1984 - Kolega et al. 1991- Aspelunda et al. 2008- Chhaya et al. 2008-Akbache et al. 2009) 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 . Mais plutôt que de parler de diamètre des pores, on caractérise les membranes d'ultrafiltration par le seuil de coupure des poids moléculaire (MWCO) en Dalton (1 Da = 1,67 10^{-24} g) défini comme étant la masse moléculaire des solutés arrêtés à 90% par la membrane. 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) se positionne entre l'ultrafiltration et l'osmose inverse. La taille des particules retenues par ce procédé est de l'ordre du nanomètre (composés organiques, molécules organiques, sels dissous). Cette technique permet la déminéralisation sélective des eaux et la concentration de composés organiques de faible masse moléculaire (antibiotiques par exemple). La membrane de nanofiltration possède un seuil de coupure de l'ordre de 500 D (diamètre des pores < 0,001 μm). Les pressions appliquées sont comprises entre 5 et 30 bars. Les membranes de nanofiltration sont fabriquées à partir de matériaux comportant, pour la plupart des charges électriques. Ces membranes ont la capacité de séparer de façon sélective des ions et des petites molécules. Cependant, elles présentent des mécanismes de fonctionnement relativement complexes car intermédiaires entre ceux de l'osmose inverse et de l'ultrafiltration.

-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 en retenant ainsi les fines particules comme les sels minéraux. Le principe de l'OI consiste à appliquer sur le compartiment contenant les sels dissous une pression supérieure à la pression osmotique de façon à inverser le flux d'eau pure. Le transfert de matières se fait par un

phénomène de diffusion à travers la structure poreuse. Les pressions utilisées sont généralement situées entre 20 et 80 bars. Le diamètre des pores d'une membrane d'osmose inverse est inférieur à 0,001 μm . Les applications industrielles de l'osmose inverse concernent essentiellement le traitement des eaux (dessalement de l'eau de mer, potabilisation d'eau saumâtre souterraine, préparation d'eau « ultra-pure » pour l'électronique et les industries pharmaceutiques...).

-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 principale 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. L'utilisation principale de l'électrodialyse est le dessalement d'eau saumâtre (et parallèlement leur concentration en vue de l'obtention de sel de table).

II.2.3 Les domaines d'application des procédés membranaires

L'utilisation des procédés à membranes présente en effet deux intérêts majeurs : (i) la possibilité de séparer, extraire, concentrer ou purifier en continu des produits sans l'ajout d'adjuvant, ni changement de phase, à basse température, (ii) une grande surface d'échange par unité de volume en utilisant différents types de modules. Les procédés de séparation et de concentration utilisant les membranes ont pris une place de plus en plus importante dans de nombreux domaines comme la production d'eau potable à partir de l'eau de mer, le traitement de l'eau et des effluents industriels et domestiques, la purification et le fractionnement des solutions macromoléculaires dans les domaines des industries biotechnologiques, pharmaceutiques et agroalimentaires,.... A titre d'exemple, dans le domaine de la potabilisation de l'eau, la capacité de production des plus grosses usines est multipliée par dix tous les 5 ans (Maurel 2001). Ces procédés, souvent qualifiés de techniques propres possèdent

de nombreux avantages par rapport aux techniques de séparation conventionnelles : (i) le procédé peut être réalisé à température ambiante, ainsi un milieu thermosensible peut être traité sans qu'aucun de ses constituants ne soit altéré, ceci est particulièrement important dans les industries agroalimentaires et en biotechnologie (ii) le fonctionnement se fait sans changement de phase, ce qui est économique au niveau énergétique (iii) le procédé est physique, l'installation est donc modulable et peut fonctionner en continu (iv) les procédés à membranes peuvent être facilement combinés avec d'autres procédés. Concernant les applications industrielles on distingue trois catégories d'applications industrielles en fonction du procédé de filtration (Tableau I.10) :

- **la concentration** : récupération du concentrat par ultrafiltration ou osmose inverse.
- **le fractionnement** : séparer et récupérer plusieurs solutés de différents poids moléculaires généralement par ultrafiltration et nanofiltration.
- **la clarification** : récupération du perméat par microfiltration.

Tableau I.10 : Procédés membranaires connaissant un développement industriel et leurs champs d'application.

Procédé	Type de membrane	Origine de la sélectivité	Force motrice	Opérations unitaires
MF	poreuse	taille des particules ou molécules	gradient de pression ($1 < \Delta P < 6 \text{ bar}$)	Clarification, débactérisation, dépollution, séparation
UF	poreuse	taille des particules ou molécules	gradient de pression ($2 < \Delta P < 10 \text{ bar}$)	Clarification, purification, dépollution, séparation
NF	Poreuse ou dense	taille des particules ou molécules	gradient de pression ($10 < \Delta P < 40 \text{ bar}$)	Adoucissement, purification, déminéralisation, concentration
OI	dense	différence de solubilité et diffusion	gradient de pression ($40 < \Delta P < 100 \text{ bar}$)	Dessalement, concentration, désalcoolisation, purification

II.2.4 L'ultrafiltration (UF)

Dans le présent travail, on s'intéresse exclusivement à la séparation de composés par UF. Par conséquent, ce procédé sera détaillé dans cette partie bibliographique. La membrane semi-perméable sépare la suspension en un rétentat (ou concentrat) contenant les espèces

retenues (grosses molécules + quelques petites) et un perméat (ou filtrat) qui traverse la membrane et ne contenant que les petites molécules). L'ultrafiltration convient bien à la concentration des macromolécules (protéines, polysaccharides, globules gras) dont le poids moléculaire est supérieur à 10,000 Daltons et le diamètre supérieur à 30Å. C'est ainsi que l'ultrafiltration est utilisée pour la concentration des protéines de lactosérum (Taddei 1986) et de poisson (Jaouen 1989), d'acides aminés, d'acides organiques, de vitamines, d'enzymes, d'antibiotiques et de vaccins (Mohr et al. 1993). Dans certains cas, l'ultrafiltration est utilisée pour la concentration de microorganismes (Boyaval 1993).

II.2.4.1 Les différents modes de filtration

Dans ce type de filtration, on distingue deux types de filtration, selon que le gradient de pression est appliqué de manière frontale ou tangentielle (Figure I.33).

II.2.4.1.1 La filtration frontale (dead-end filtration)

Egalement appelée filtration classique, il s'agit d'un simple passage d'une suspension ou solution à travers un filtre sous l'effet de la pression. Le fluide s'écoule perpendiculairement à la surface filtrante (Bessiere 2005). Les particules retenues s'accumulent au fur et à mesure au-dessus de la membrane entraînant une augmentation de la résistance au passage du filtrat et une diminution de l'efficacité de la membrane au cours du temps. Des nettoyages fréquents de celle-ci sont nécessaires et ce mode de filtration reste inadapté au fonctionnement en continu. Ce mode de filtration possède donc une entrée (alimentation confondue avec le rétentat) et une sortie (perméat).

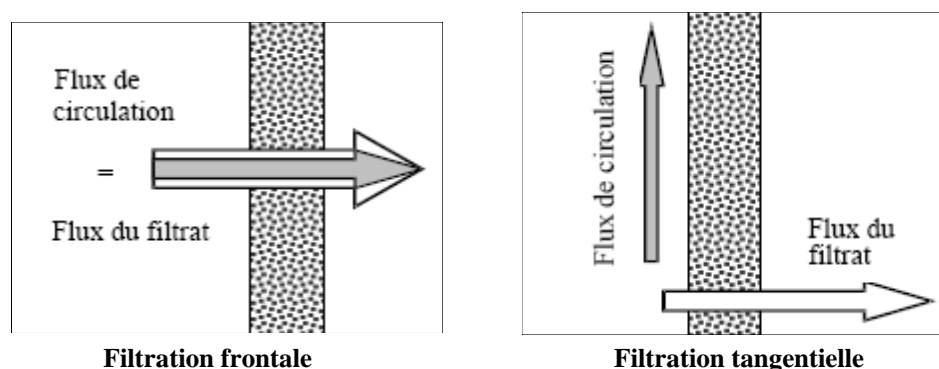


Figure I.33: Mécanismes de transfert sélectif au passage d'une membrane sous l'effet de la pression. Exemple de filtration frontale et tangentielle.

II.2.4.1.2 La filtration tangentielle (cross-flow filtration)

C'est la technique de filtration la plus répandue dans l'industrie. Elle permet un balayage permanent de la membrane, et donc une utilisation plus longue avant nettoyage. Sous pression, le fluide circule parallèlement à la surface de la membrane ce qui réduit à la fois l'accumulation des macromolécules contre la membrane et les séquences de nettoyage (Piot et al. 1984). En filtration tangentielle, il y a une entrée (alimentation) et deux sorties : le rétentat et le perméat (Figure I.34).

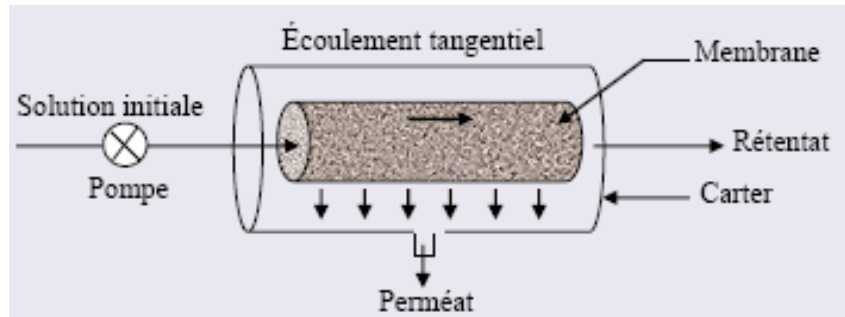


Figure I.34 : Principe de la filtration tangentielle

II.2.4.2 Les modules

II.2.4.2.1 Définition

La principale fonction d'un module de filtration tangentielle est d'entourer la membrane afin que l'alimentation soit séparée du perméat et que ces flux ne se mélangent pas. Il doit également supporter un gradient de pression et optimiser l'écoulement pour limiter les effets de colmatage. De plus, le système doit être aussi compact que possible tout en permettant un remplacement aisé des membranes. Différents types de modules ont donc été développés : modules plan, spiralé, tubulaire, fibre creuse. Le choix d'un module s'effectue essentiellement en fonction de la solution à traiter (viscosité, taux de matières en suspension, volume...).

II.2.4.2.2 Géométrie des modules et rentabilité économique

Les **modules plans**, qui sont en fait de simples feuilles montées de part et d'autre de cadres rigides sont peu coûteux et simples à mettre en œuvre. Cet arrangement présente beaucoup de flexibilité et un bon accès aux membranes pour le nettoyage ou le remplacement. Cependant, ces systèmes présentent l'inconvénient de la surface filtrante qui reste très faible par rapport à l'encombrement engendré ; raison pour laquelle ce type

de technique ne permet que la filtration de petits volumes avec un faible débit. Ce type de système se colmate aussi facilement et nécessite généralement une pré-filtration (Remigy et Desclaux 2007). Il est aussi couramment utilisé dans la réalisation des essais de filtration en laboratoire (Figure I.35). Pour augmenter la surface filtrante, des cassettes peuvent être utilisées et consistent en la superposition de feuilles de membranes empilées et séparées par des couches inertes.

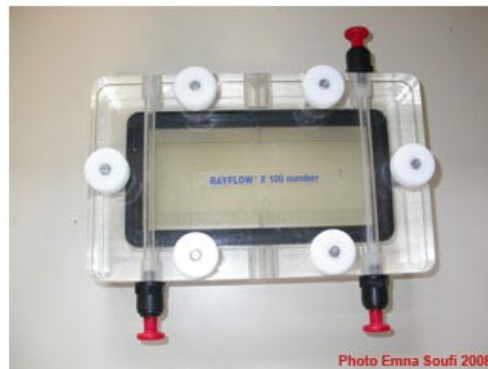


Figure I.35 : Exemple de module plan à cassette de filtration (échelle de laboratoire)

Dans le cas des **modules tubulaires** (Figure I.36), les membranes ont la forme de cylindres et se présentent sous forme de tubes regroupés en parallèle et/ou en série dans lesquels circule l'alimentation (faisceaux de tubes de 4 à 25 mm de diamètre). Le rétentat sort à l'extrémité du canal, alors que le perméat traverse la membrane et sort latéralement (Aimar et Daufin 2004). Ces systèmes, volumineux et coûteux sont très flexibles pour le nettoyage mais moins sensibles à l'encrassement. Ils permettent de traiter des solutions visqueuses et/ou chargées sans prétraitement.

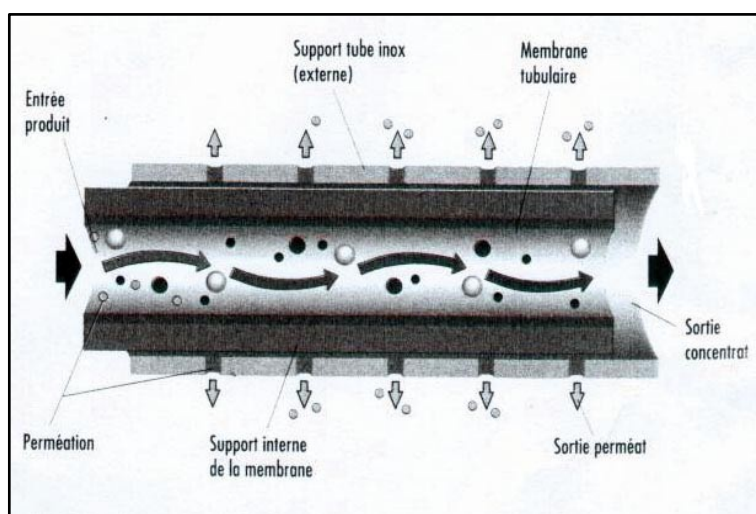


Figure I.36 : Module à membrane tubulaire

Les modules spiralés sont composés d'une ou de plusieurs feuilles membranaires enroulées autour d'un axe (Figure I.37). 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 (Aptel et al. 2002). 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, ce qui engendre un surcoût. Les modules fibres creuses sont, quant à eux composés de membranes fibres creuses de diamètre interne inférieur à 3 mm. Par conséquent, les risques d'obstruction sont élevés. Ces modules ne peuvent être utilisés que pour le traitement d'eaux contenant peu de matières en suspension ou ayant été pré-traitées. Cependant, par rapport aux modules plans et tubulaires, cette géométrie possède l'avantage d'être plus compacte et moins onéreuse.

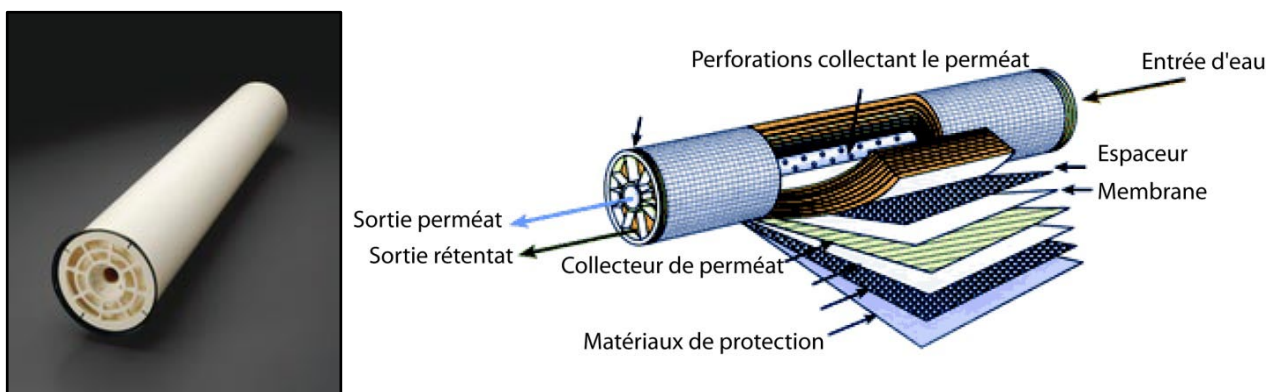


Figure I.37 : Module spiralé de filtration

Les modules fibres creuses se présentent comme des membranes de fibres creuses de diamètre interne inférieur à 3 mm, regroupées dans une enveloppe (Figure I.38). La peau est localisée à l'intérieur ou à l'extérieur de chaque fibre, selon que le perméat est collecté à l'intérieur ou à l'extérieur des fibres. 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.

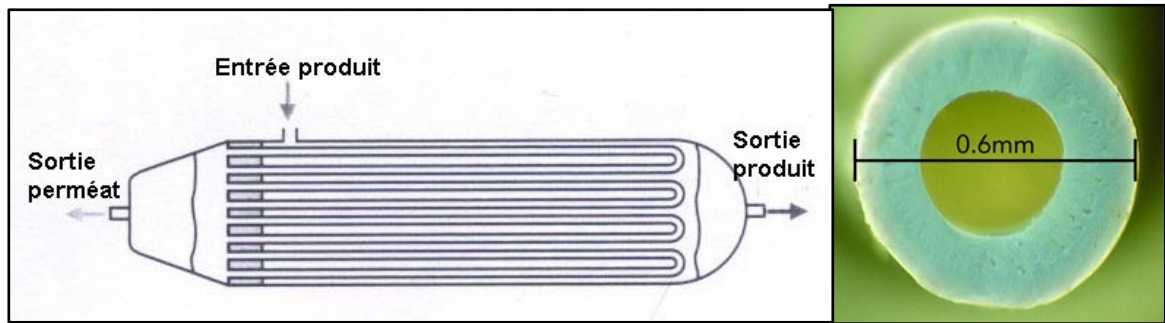


Figure I.39 : Module à fibres creuses

Le choix du type de module dépend d'un certain nombre de critères, liés au contexte industriel. Les caractéristiques et différences entre les divers modules industriels sont résumées dans le tableau I.11.

Tableau I.11 : Comparaison entre les différents types de modules membranaires (D'après Daufin et al. 1998)

Module	Plan	Spiralé	Tubulaire	Fibres creuse
Membrane	Organique en format rectangulaire	Organique	Organique : monotubulaires Minérale : monotubulaires ou multicanaux	Organique avec la couche séparatrice
Surface filtrante par module industriel	Jusqu'à 100 m ²	Jusqu'à 30 m ²	Jusqu'à 25 m ²	Jusqu'à 75 m ²
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Visualisation du perméat produit par chaque élément. • Faible consommation d'énergie • Performance (flux) • Plaques réutilisables 	<ul style="list-style-type: none"> • Compacité • Faible volume mort • Faible consommation d'énergie • Capacité élevée • Faible coût • remplacement des membranes facile et peu coûteux 	<p>En général :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nettoyage facilité • Faible colmatage • Meilleu rcouple (pression/température) <p>Membranes minérales :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Durée de vie • Tenue mécanique • Thermostabilité • Résistance aux lavages chimiques • Stérilisation à la vapeur 	<ul style="list-style-type: none"> • Compacité élevée • Faible volume mort • Faible consommation énergétique • Hautes pressions possibles • Prix
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> • Pré-traitement • Système peu compact • Investissement élevé • Nettoyage difficile • Faible résistance thermique des matières plastiques • Colmatage • Prix 	<ul style="list-style-type: none"> • Pré-traitement • Performance (flux) • Echange standard par module • Sensibilité au colmatage • Faible résistance thermique des matières plastiques • Perte de charge élevée • Nettoyage difficile • Télescopage de la membrane • Limitation su couple (pression/température à cause des colles) 	<p>En général :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Volume mort important • Consommation d'énergie • Coût élevé • Faible compacité (surface de transfert par unité) <p>Membranes organiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Faible résistance thermique des matières plastiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité au colmatage • Traitement difficile des produits visqueux • Echange standard par module • Faible résistance thermique des matières plastiques • coût de remplacement des membranes élevé

II.2.4.3 Les membranes

II.2.4.3.1 Structure et classification des membranes

Les membranes peuvent être classées selon leur morphologie, on parle alors de membranes homogènes, membranes asymétriques ou membranes composites ; ou bien suivant leur nature chimique (membranes organiques et inorganiques) (Tableau I.12). Les membranes organiques qu'on utilise dans ce travail sont scindées en 2 groupes, celles à base de polymères naturels (acétate de cellulose, acétobutyrate de cellulose, cellulose régénérée, nitrate de cellulose) et celles à base de polymères synthétiques (polyamides, polyfuranes, polybenzimidazole, polyéthylène, polysulfone (PS), polyéther sulfone (PES), polycarbonates, polymères vinyliques). Les premières membranes organiques ont été réalisées à partir d'acétate de cellulose et ont été utilisées pour le dessalement de l'eau de mer par osmose inverse (Mendjel 1984).

Tableau I.12 : Classification des membranes selon leur nature.

Origine	Nature	Structure	Mode de fabrication	Applications
Inorganiques	céramiques métaux verres	dense gel poreuse dynamique	diffusion tamisage	filtrations, séparations d'ions et de molécules
Naturelles modifiées	Cellulose	dense gel poreuse	désolvation feutrage, greffage	filtrations, séparations d'ions, de gaz et de molécules
Organiques de synthèse	macromolécules polymères	dense gel poreuse dynamique	neutre	diffusion migration tamisage
	complexants	liquide	émulsification inclusion	séparation d'ions, de molécules

Les membranes minérales les plus connues sont celles en céramique (Al_2O_3 , SiO_2 , TiO_2 , etc...). Elles présentent une structure composite poreuse résultant d'un empilement de grains dont la taille détermine le diamètre moyen des pores. Le coût de ces membranes reste assez élevé par rapport aux autres. Le prix du mètre carré des membranes minérales est plus

élevé que celui des membranes organiques, mais d'une manière générale, les membranes minérales sont plus résistantes aux agressions physiques. Elles supportent des pressions largement supérieures à 10 bars et des températures pouvant atteindre 300°C. Elles sont également plus résistantes aux agressions chimiques. Elles tolèrent une large gamme de pH, elles sont insensibles aux produits de nettoyage et aux solvants et elles se conservent à sec et sont inaltérables par les microorganismes. Les membranes organiques supportent quant à elles des pressions maximales de 10 à 15 bars en ultrafiltration, des températures ne dépassant pas les 100°C, une gamme de pH variable et sont attaquées par certains agents de nettoyage et sont sujets à des attaques par les microorganismes. Par conséquent, le remplacement des membranes minérales est beaucoup moins fréquent que celui des membranes organiques. Les membranes sont ainsi utilisées de nos jours à échelle industrielle dans des domaines très variés comme la clarification des jus de fruits et de la bière (Gan et al. 1997), la séparation des hématies du plasma sanguin (Jaffrin et al. 1992), l'hémodialyse par reins artificiels ou encore la production d'eau potable.

II.2.4.4. Principaux paramètres caractérisant le fonctionnement des membranes en ultrafiltration

II.2.4.4.1 Le seuil de coupure

En UF, la sélectivité d'une membrane est définie par son seuil de coupure (SC) ou molecular weight cut-off (MWCO), c'est-à-dire par la masse molaire de la plus petite molécule, ou ion retenus par la membrane à 90%. L'unité du seuil de coupure est le Dalton (Da). Les diamètres de pore des membranes utilisés en UF sont généralement compris entre 0,5 et 150 nm, les seuils de coupure 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 présence d'une solution réelle, le seuil de coupure dépend également des interactions membrane-soluté (effets électrostatiques et/ou hydrophobes). Ce paramètre est lié à la nature du soluté, aux phénomènes d'adsorption ainsi qu'à la polarisation de concentration qui est fonction des conditions opératoires et de la composition initiale du soluté (Fane 1986).

II.2.4.4.2 La sélectivité ou taux de rétention : TR

Une membrane est caractérisée, pour une séparation donnée, par son pouvoir de rétention. Ce pouvoir d'arrêt est quantifiable par le taux de rétention (TR), appelé aussi taux de rejet, défini par la relation suivante :

$$TR = 100. \left(1 - \frac{C_p}{C_s} \right) \quad \text{(Equation I.3)}$$

avec TR : taux de rétention (%)

C_p : concentration en soluté dans le perméat (kg.m^{-3})

C_s : concentration en soluté dans la solution d'alimentation (kg.m^{-3})

Le TR fluctue en fonction du poids moléculaire du soluté suivant une courbe, appelée **courbe de tamisage**, représentée sur la Figure I.39.

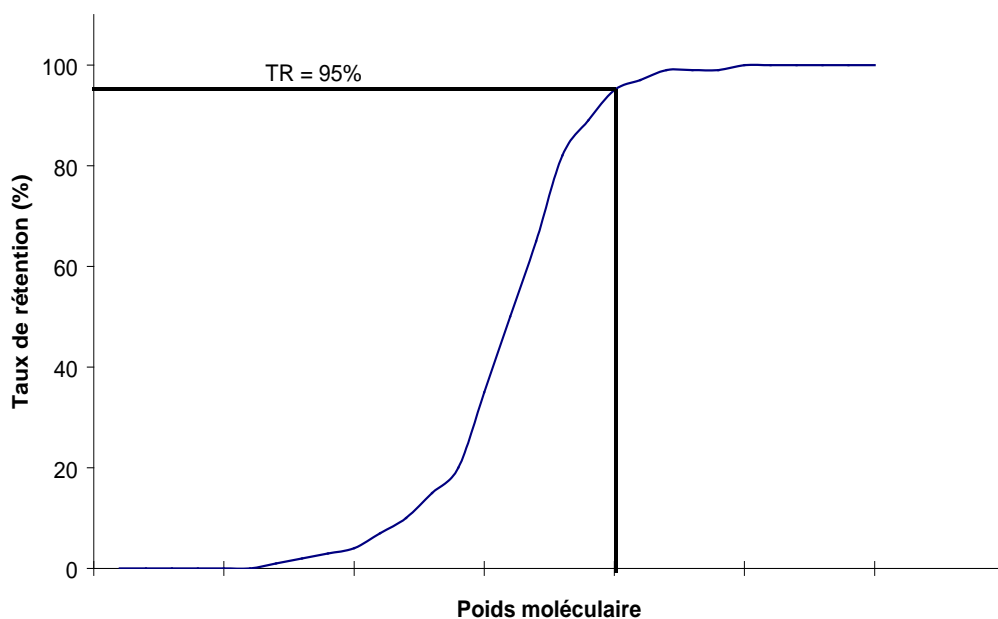


Figure I.39: Représentation du taux de rétention d'une membrane réelle.

II.2.4.4.3 La pression transmembranaire

La pression transmembranaire (P_{tm}) est la moyenne des pressions à l'entrée du module de filtration (P_1) et à la sortie côté rétentat (P_2) de la membrane, diminuée d'une éventuelle pression du côté du filtrat (P_f) (Mulder 1951).

$$P_{tm} = \frac{1}{2} (P_1 + P_2) - P_f \quad \text{(Equation I.4)}$$

Les pressions sont exprimées en Pascal.

II.2.4.4 Propriétés hydrodynamiques des fluides dans les modules d'ultrafiltration

II.2.4.4.1 Perméabilité de la membrane au solvant

Le solvant peut être considéré comme un fluide Newtonien et son écoulement à travers la membrane est laminaire. La perméabilité de la membrane est alors 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 I.5) est applicable et 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. Le flux de solvant pur à travers une membrane est directement proportionnel à la pression transmembranaire appliquée :

$$J = L_p \cdot P_{tm} = \frac{P_{tm}}{\eta \cdot R_m} \quad \text{(Equation I.5)}$$

avec J : flux du solvant ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

L_p : perméabilité hydraulique de la membrane ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ou $\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{bar}^{-1}$)

P_{tm} : pression transmembranaire (Pa)

η : viscosité dynamique du solvant (Pa.s)

R_m : résistance hydraulique de la membrane (m^{-1}).

La résistance hydraulique de la membrane R_m est une caractéristique intrinsèque de la membrane et ne dépend ni de la composition de la solution-mère ni de la pression appliquée. La perméabilité hydraulique (L_p) est une grandeur caractéristique fondamentale des membranes. Elle est indépendante des conditions de pression et de vitesse dans lesquelles sont effectuées les mesures. Elle est déterminée expérimentalement par la mesure du flux obtenu suite à la filtration de l'eau.

II.2.4.4.2 Le flux de perméation et le flux de soluté

La productivité du procédé est définie par le débit de perméation, Q_p , divisé par la surface membranaire S . Il représente aussi la vitesse du fluide perpendiculaire à la surface de la membrane.

$$J_o = \frac{Q_p}{S} \quad \text{(Equation I.6)}$$

Le flux de soluté est donné par la relation :

$$J_s = J \cdot C_p \quad (\text{Equation I.7})$$

avec J_s : flux de soluté par unité de surface ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)

C_p : concentration du soluté dans le perméat ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

II.2.4.4.5 Phénomènes limitant le transfert de matière

II.2.4.4.5.1 Comportement caractéristique du flux de perméat

Le comportement au cours du temps du flux à travers la membrane d'ultrafiltration est totalement différent dans le cas d'un solvant pur et dans le cas d'une solution (solvant + soluté) (Figure I.40). Dans le cas d'un solvant pur, la perméabilité hydraulique et la résistance constituent l'état de référence de la membrane.

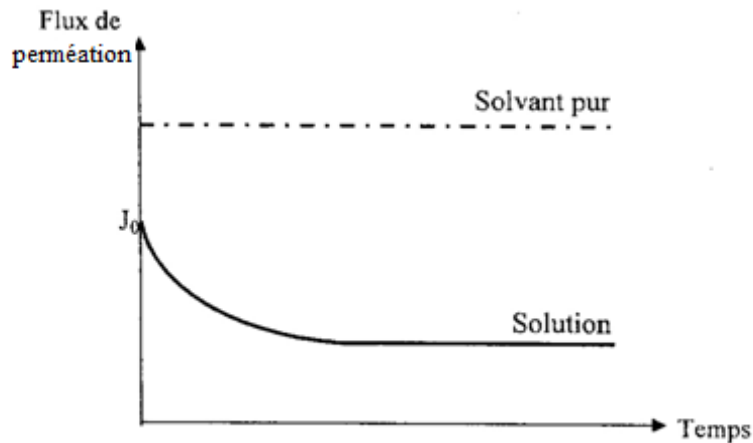


Figure I.40 : Comportement du flux de filtration en fonction du temps

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 (Figure I.41). Lors de la filtration d'une solution à travers une membrane, il se produit en général une accumulation du soluté à proximité de la paroi membranaire, sous l'effet d'un gradient de pression. On observe ainsi qu'au premier temps, puis atteint un état quasi-stationnaire. D'autre part, lorsqu'on augmente la pression transmembranaire, le flux augmente puis se stabilise à partir d'une valeur de pression notée « pression critique P_c ».

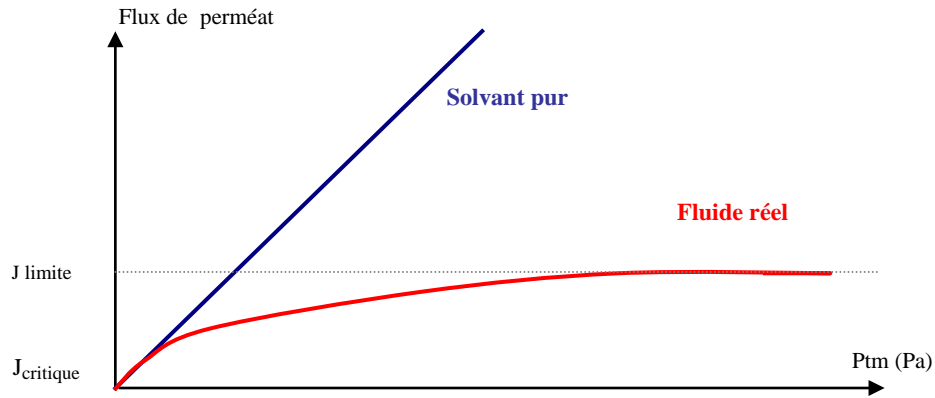


Figure I.41 : Représentation schématique des différences de perméabilité entre un solvant pur et un fluide biologique.

Ce phénomène inhérent à tous les procédés de séparation par membranes est dû à l'accumulation de matière à l'interface fluide/membrane sous l'effet convectif créé par la perméation. Ce phénomène est nommé polarisation de concentration et ne concerne généralement que les solutés tandis que le second phénomène, c'est-à-dire la formation d'un dépôt à la surface de la membrane porte le nom de colmatage. Pour certains fluides à traiter, ces deux phénomènes sont étroitement liés puisque la polarisation de concentration peut être à l'origine même du colmatage.

II.2.4.4.5.2 Couche de polarisation et colmatage

Deux phénomènes limitent le bon fonctionnement des procédés membranaires : la polarisation et le colmatage (Jonsson 1977- Brun 1988). La **couche de polarisation** est due par 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, ou **couche de polarisation**, disparaît dès que la pression redevient nulle. Le phénomène de **polarisation primaire** de concentration représente l'un des premiers mécanismes proposés pour expliquer la limitation du flux de filtration (Porter et al. 1972 – Bacchin et al. 2002). La couche de polarisation de concentration, de l'ordre d'une dizaine de microns conduit à une chute rapide du flux dès les premiers instants de filtration (Figure I.42). Ce phénomène peut être représenté par le **modèle du gel (film)** (Broussous 1999).

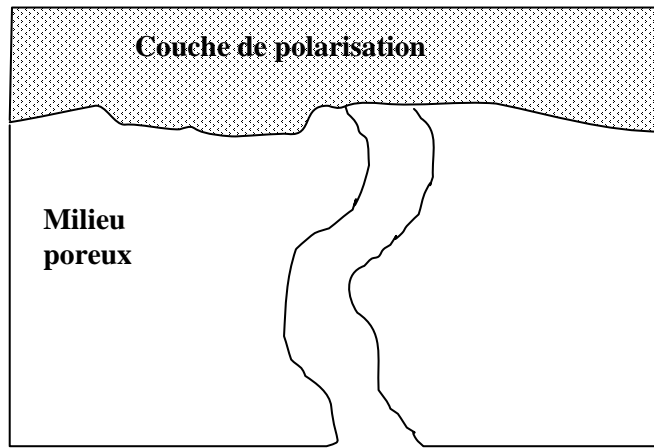


Figure I.42 : Formation de la couche de polarisation

La concentration à la surface membranaire est fonction du rapport entre le transport convectif de la matière vers la membrane du au flux transmembranaire et à la rétrodiffusion vers la solution initiale due au gradient de concentration qui peut être expliquée par la loi de **Fick**. Un état stationnaire est atteint lorsque ces deux phases se compensent (Figure I.43) :

$$J C_p = J C_m - D \frac{dc}{dx}$$

(Equation I.8)

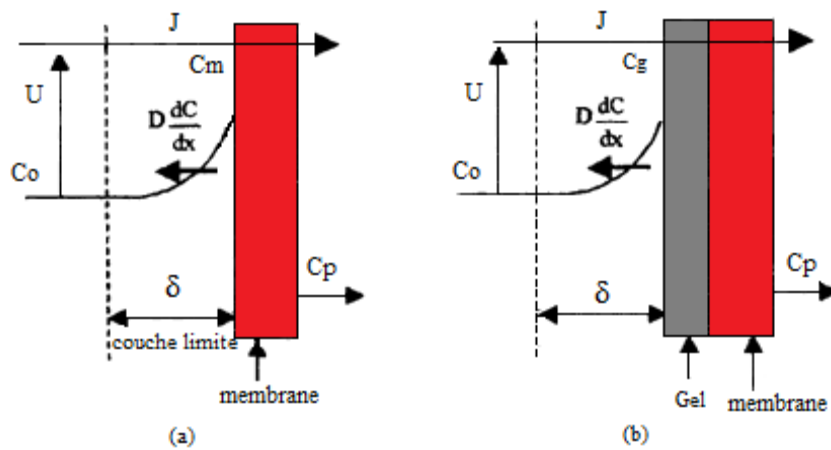


Figure I.43: Polarisation de concentration sans couche de gel (a) et avec couche de gel (b)

Le colmatage ou **phénomène de polarisation secondaire** peut être défini comme la conséquence des phénomènes résultant du passage de la matière de la phase liquide à la phase solide, cette dernière formant un dépôt sur ou dans la membrane. On distingue le colmatage externe en surface de la membrane et le colmatage interne, situé dans la structure poreuse de la membrane. Deux types de colmatages peuvent être identifiés (i) un colmatage qualifié de réversible, car susceptible de disparaître si la cause de la formation est éliminée, (ii) un

colmatage qualifié d'irréversible lorsque des procédures chimiques ou des mécanismes énergétiques doivent être utilisés pour son élimination. D'un point de vue pratique, sera qualifiée d'irréversible la partie du colmatage qu'il est nécessaire d'éliminer par une procédure chimique ou mécanique. 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**, l'**obstruction des pores**, et la **formation d'un dépôt** à la surface de la membrane (Figure I.44).

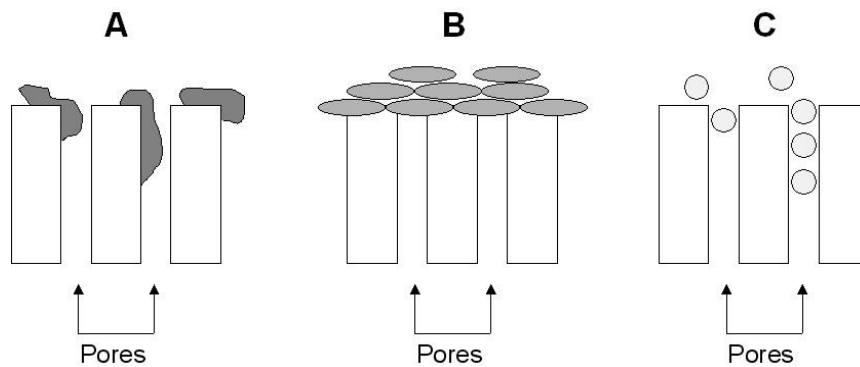


Figure I.44 : Différents phénomènes de colmatage. A : Adsorption, B : Formation d'un gâteau, C : Obstruction des pores.

L'**adsorption** est un phénomène physico-chimique qui se produit sous l'effet d'interactions entre certains constituants du fluide et toute surface solide, donc avec la membrane. L'adsorption peut intervenir aussi bien à la surface de la membrane qu'à l'intérieur des pores. On distingue ainsi l'adsorption superficielle (engendrant une diminution du nombre de pores accessibles), de l'adsorption en profondeur (créant en plus une diminution du diamètre moyen des pores). Pour quantifier l'effet d'adsorption, Zeman (1983) utilise le modèle de réduction du rayon de pore par une couche adsorbée :

$$\frac{\Delta r_{\text{pore}}}{r_{\text{pore}}} = 1 - \left(\frac{J_a}{J_o} \right)^{0,25} \quad \text{(Equation I.9)}$$

avec Δr_{pore} : épaisseur de la couche adsorbée (m)

J_o : flux de solvant pur pour une membrane neuve ($l \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)

J_a : flux de solvant pur pour une membrane adsorbée ($l \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)

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 filtration. En filtration tangentielle, ce phénomène est limité grâce au balayage permanent de la membrane. Deux types de colmatage peuvent avoir lieu (i) **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 des membranes (ii) **l'obstruction mécanique des pores** ou colmatage en profondeur n'intervient pas avant plusieurs dizaines de minutes. Les particules de taille voisine de celles des pores vont provoquer un dépôt de matière à l'intérieur de la membrane, d'où une obstruction mécanique des pores (Figure I.45).

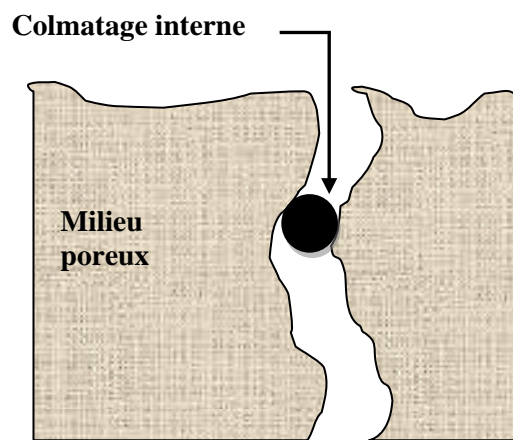


Figure I. 45 : Formation du colmatage interne

Pour limiter ce type de colmatage, il est conseillé de travailler avec des membranes ayant des dimensions de pores très inférieures à celles des plus petites particules contenues dans la solution (Figure I.46).

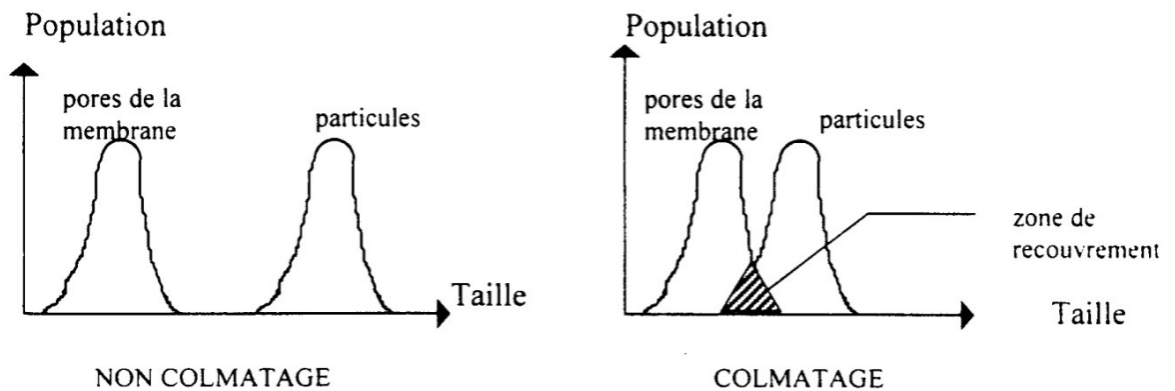


Figure I.46 : Colmatage en profondeur des membranes

II.2.4.4.6 Nettoyage des membranes

L'efficacité dans le temps d'une membrane dépendra en grande partie de la qualité du nettoyage effectué. En effet, si le colmatage irréversible est responsable des pertes de qualité de la membrane, on comprend bien qu'un bon nettoyage consiste à éliminer totalement le colmatage réversible pour limiter l'encrassement au colmatage irréversible que l'on s'efforcera de limiter au maximum. Le nettoyage et la régénération périodique sont spécifiques pour chaque membrane, selon le type de fluide à traiter. Il s'agit ici de bien connaître la nature de la couche de colmatage pour pouvoir l'éliminer de manière efficace. 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 et l'action mécanique.

Il existe trois grandes méthodes de nettoyage (parfois combinées entre elles) : **chimique** (Kazemimoghadan et Mohammadi 2007), **enzymatique** (Argüello et al. 2002) et **physique** (Muthukumar et al. 2004). Dans le domaine alimentaire, les nettoyeurs chimiques et enzymatiques agissant sur les solutés adsorbés à la surface et à l'intérieur de la membrane sont les plus couramment utilisés. Généralement, un nettoyage chimique comporte plusieurs étapes complémentaires alliant des rinçages à l'eau pure et l'utilisation d'agents nettoyeurs basiques ou acides, dont le choix dépend des caractéristiques du matériau membranaire et de la nature des couches colmatantes (Aimar 2006). 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 ;

Les milieux acides et/ou complexants sont recommandés pour éliminer les sels minéraux de dépôt, alors que les milieux alcalins, souvent en présence d'agents tensioactifs, solubilisent et dégradent les protéines et les dépôts lipidiques. Pour une meilleure efficacité, l'action des différents agents nettoyeurs a été combinée dans des formulations industrielles telles que celles de la gamme Ultrasil® (Henkel, Allemagne) qui combine pouvoirs alcalin et surfactant. La conduite de la régénération possède son importance : choix de la vitesse de circulation, qualité de l'eau, etc... (Cabero et al. 1999). A la fin des années 90, le **nettoyage**

physique par ultrasons a été étudié pour pallier aux inconvénients liés à l'utilisation des produits chimiques (Kyllönen et al. 2005). Basés sur la formation et l'agitation des microbulles dans le module, les ultrasons agissent sur les particules accumulées à la surface des membranes et dans les pores. Comparée aux nettoyages classiques qui nécessitent l'arrêt complet du procédé, cette technique permet un nettoyage en continu. Elle permet donc de prévenir le colmatage et d'améliorer le taux de séparation (Muthukumaran et al. 2004).

Plus récemment, le **nettoyage enzymatique** a été développé pour permettre le nettoyage des membranes sensibles aux réactifs chimiques et aux pH ou températures élevées et pour améliorer l'efficacité du nettoyage chimique. Par rapport au nettoyage chimique, le nettoyage enzymatique est un procédé beaucoup plus respectueux de l'environnement et moins consommateur de produits nettoyants et d'énergie. Cependant, il s'avère plus onéreux, son action est plus lente et il demande d'importantes précautions d'emploi. De plus, les enzymes peuvent être dénaturées par les contraintes de cisaillement induites par la pompe. Son utilisation est donc plus délicate. Argüello et al. (2005) rapportent l'utilisation de l'Alcalase® pour le nettoyage de membranes colmatées par les protéines de lactosérum.

II.2.4.4.7 Mesure de la nettoyabilité

La nettoyabilité d'une membrane, également appelée « efficacité de nettoyage » est définie comme sa capacité de régénération. Elle peut être évaluée selon des critères hydrauliques (récupération du flux initial) ou physico-chimiques (aucun contaminant observé). Kazemimoghadan et Mohammadi (2007) ont évalué le taux de récupération du flux initial (TR%) par l'équation suivante :

$$TR\% = \left[\frac{J_n - J}{J_o - J} \right] \times 100 \quad \text{(Equation I.10)}$$

avec J_n : flux à l'eau après nettoyage de la membrane

III UTILISATION DES PROCÉDES DE SÉPARATION POUR LE FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS PROTÉIQUES

Cette partie passe en revue les études portant sur le fractionnement d'hydrolysats marins. L'amélioration de la sélectivité de la séparation en agissant sur la charge des peptides est également abordée.

Un hydrolysats protéique est un mélange complexe de peptides dont certains présentent des activités biologiques, ce qui justifie l'intérêt de fractionner les hydrolysats afin de concentrer les molécules actives. La majorité des peptides contenus dans un hydrolysats protéique présentent des propriétés physico-chimiques comparables, d'où la nécessité de développer des techniques de séparation hautement sélectives, basées sur des **différences de charge**, de **poids moléculaire** ou **d'hydrophobicité des molécules**. Les méthodes de séparation sont nombreuses mais ne s'appliquent pas toutes à l'échelle industrielle. Par exemple, la chromatographie en phase liquide certainement la voie de fractionnement la plus fine, où des différences physico-chimiques (poids moléculaire, hydrophobicité, charge) sont exploitées afin d'isoler des fractions ou des peptides spécifiques à partir d'un mélange complexe permettant ainsi une séparation efficace des peptides (Meisel et Frister 1989). Cependant, cette technique demeure très onéreuse, difficilement applicable industriellement et utilisée uniquement lorsque des peptides spécifiques sont recherchés ou encore, à des fins purement analytiques. A l'inverse, la précipitation sélective est une méthode simple et peu coûteuse qui souffre toutefois d'un manque de sélectivité. L'ajout d'un solvant, d'ions (salting out) ou l'ajustement du pH favorise la précipitation de certaines fractions peptidiques hydrophobes (Léonil et al. 1994 - Reynolds et al. 1994 - Groleau et al. 2004). Cependant, les peptides précipités doivent être isolés du milieu initial (centrifugation), suivis d'une étape additionnelle de purification afin d'éliminer tout agent (sel, solvant) pouvant nuire à une utilisation ultérieure de la fraction peptidique ainsi préparée.

III.1 FRACTIONNEMENT PAR LA TAILLE : L'ULTRAFILTRATION

Les techniques membranaires sont de loin celles qui offrent le plus grand potentiel de séparation de mélange peptidique à l'échelle industrielle. Parmi ces techniques, l'ultrafiltration (UF) est la mieux adaptée puisqu'elle permet une concentration sélective des peptides en fonction de leur taille (Cheryan, 1998). Cependant, la plupart des travaux utilisent l'UF comme technique pratique et simple pour le fractionnement de solutés ; l'influence des paramètres opératoires sur les performances et l'efficacité de la séparation sur membrane ne sont que très peu considérés. Le tableau I.13 montre que la plupart des études portent sur l'application des membranes d'UF pour le fractionnement d'hydrolysats dotés d'activités biologiques ou bien pour récupérer ou éliminer une fraction peptidique donnée. Les travaux concernant également l'amélioration de la qualité organoleptique ou la clarification et la décoloration des hydrolysats.

III.1.1 Caractéristiques séparatives

L'UF, en mode continu (bio-réacteur membranaire) ou après hydrolyse, est utilisé afin de séparer les peptides du reste du milieu réactionnel contenant l'enzyme et le matériel protéique non-hydrolysé (Mannheim et Cheryan 1990 - Turgeon et Gauthier 1990 - Bouhallab et al. 1993). Comme le soulignent Lahl et Braun (1994), ce type de procédé permet l'arrêt de la réaction hydrolytique sans recourir à des traitements thermiques et/ou l'acidification du milieu. L'UF est aussi utilisée afin d'optimiser les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats en permettant un contrôle du poids moléculaire des peptides contenus dans les fractions (perméat et rétentat) générées (Althouse 1995 - Huang et al. 1996). La charge des molécules influence également le pouvoir de séparation du procédé. En fait, les membranes d'UF sont fabriquées à partir de polyélectrolytes, tels le polyamide, le polyether sulfone ou l'acétate de cellulose, qui leur confèrent une surface chargée, le plus souvent négativement. Les effets de charges sont donc importants puisque la polarité des espèces à séparer influence la sélectivité de la membrane (Timmer et al. 1998). Les molécules de solutés non chargées traversent les pores de la membrane si elles ne sont pas stériquement rejetées. Les molécules chargées sont soumises en plus aux forces électrostatiques, et leur perméation dépendra de plusieurs phénomènes désignés par « effets de charge ».

III.1.2 Fractionnement membranaire d'hydrolysats dotés d'activités biologiques

La plupart des travaux dans ce sujet ont été effectués à l'université de Pukyong à Pusan (Corée du sud). Ces travaux mettent en œuvre une méthodologie expérimentale commune qui consiste à filtrer un hydrolysats par une série de membrane d'UF (jusqu'à 5) ayant un seuil de coupure de 1 à 30 kDa, et à comparer l'activité spécifique de chaque fraction avec celui de l'hydrolysats initial, afin d'identifier la fraction la plus active. Des hydrolysats obtenus à partir de différents substrats ont été fractionnés de cette façon : eaux chaudes de lavage de poissons frais (Yoon et al. 1998), protéines de carcasse de morue (Jeon et al. 1999), protéines de carcasse de colin d'Alaska (Je et al. 2004 – Je et al. 2005), gélatine de peau de calmar géant (Mendis et al. 2005), muscle de calmar géant (Rajapaske et al. 2005), protéines de carcasse de Hoki (Je et al. 2005 – Kim et al. 2007) et muscle de congre (Ranathunga et al. 2006) les activités évaluées la plupart du temps sont celles antioxydantes et antihypertensives. Cependant, les propriétés émulsifiantes et foisonnantes ont également été considérées. D'une manière générale, il ressort que les bioactivités les plus élevées sont obtenues dans des fractions de faibles poids moléculaire. Cette équipe a également mis au point un procédé de

fractionnement en cascade, composé de trois réacteurs à membranes en série pour isoler des fractions de poids moléculaires définis et pour mesurer les activités biologiques. Les trois réacteurs sont équipés de membranes d'UF en fibres creuses de SC décroissant. Dans le premier réacteur, la gélatine est digérée par l'Alcalase et l'hydrolysate est fractionné sur la membrane d'UF 10 kDa avant d'être hydrolysée par la Probase E dans le deuxième réacteur à membrane. Le second hydrolysate est fractionné par la membrane d'UF 5 kDa et ensuite hydrolysé par la collagénase dans le troisième réacteur à membrane. Le troisième hydrolysate est fractionné par la membrane d'UF 1 kDa. Par analyse chromatographique, les pics majeurs des premier, deuxième et troisième hydrolysats ont été localisés à 6 – 8 kDa, 2 – 4 kDa et 0.5 – 2 kDa. L'activité biologique la plus haute a été observée dans le deuxième réacteur (fraction 2 – 4 kDa) (Kim et al. 2001).

Des travaux portant sur la filtration d'hydrolysats par une série de membranes d'UF ont aussi été publiés par d'autres équipes de recherche. Sumaya-Martinez (2004) ont fractionné successivement un hydrolysate de carcasse de crevette par microfiltration (0.45 µm) et ultrafiltration (30 kDa, 5 kDa). Trois fractions peptidiques ont été isolées (0.45 µm – 30 kDa, 30 – 5kDa, < 5kDa). La plus importante activité biologique a été attribuée à la fraction inférieure à 5 kDa. Neves et al. (2004) ont étudié l'impact de la source d'enzyme et des conditions d'hydrolyse sur la distribution du poids moléculaire d'un hydrolysate de poisson. Les hydrolysats ont été fractionnés par ultracentrifugation en utilisant un concentrateur Centricon équipé de membranes de Sc 30, 10 et 3 kDa afin d'isoler quatre fractions (>30kDa, 30-10 kDa, 10-3 kDa, et < 3 kDa). Le profil en acides aminés de chaque fraction et la proportion entre la teneur en acides aminés à chaîne branchée et les acides aminés à chaîne aromatique ont été évalués afin de déterminer les fractions qui pourraient être utiles pour la gestion diététique des patients atteints de maladies de foie chronique. Les peptides de taille inférieure à 3 kDa semblent être incorporés dans des formules hypoallergéniques.

A la suite de cette revue bibliographique, on constate que la plupart des travaux aspirent uniquement à raffiner un hydrolysate à l'échelle analytique et à augmenter son activité spécifique dans la perspective d'une valorisation industrielle des co-produits pour produire des ingrédients utilisables en alimentation animale et humaine. Dans d'autres travaux, l'hydrolysate est traité par une succession d'étapes de séparation incluant l'UF et la chromatographie pour isoler et identifier un peptide à activité élevée. Do (2000) a isolé de cette façon un peptide inhibiteur de l'ACE à partir de protéines du muscle du maquereau,

ayant la séquence suivante d'acides aminés Tyr-Val-Ala. Des travaux semblables ont été réalisés par Je et al. (2004) et Je et al. (2005) qui ont isolé un nouveau peptide antihypertensif (Phe-Gly-Ala-Ser-Thr-Arg-Gly-Ala, MM : n.c) et un nouveau peptide antioxydant (Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr, MM : 672 Da).

Tableau I.13 : Revues des travaux sur le fractionnement par UF d'hydrolysats marins

Substrat	Membrane/MWCO	Conditions opératoires	Objectif du fractionnement	Littérature
Clarification - Décoloration				
Poudre de moule dégraissée	n.c	n.c	Clarification / décoloration	Ye et Xu 1996
Jus de cuisson de thon	membrane AF-30-1812-T en PS de 0,2 m ² ; 10 kDa	mode concentration T ~ 20°C; FRV = 6 échelle pilote	T Clarification	Jao et Ko 2002
Protéines de carcasse de saumon	membrane tubulaire PCI de 6,25 m ² ; FP 100 000 kDa en PVDF	n.c	Clarification	Liaset et al. 2003
Protéines de tête de crevette	membrane planes Millipore (Système Pellicon) de 30 kDa	n.c échelle laboratoire	Clarification	Ruttanaporn-vareesakul et al. 2006
Amélioration des qualités organoleptiques				
Capelan	membrane de 10 kDa	n.c	amélioration du goût	Raksakulthai et Haard 1992
Sauce séchée et fermentée de poisson	membranes de 100 et 500 Da	n.c	amélioration du goût	Bae et al. 1999
Poisson	n.c	n.c	amélioration du goût	Park et al. 2002
Effet sur les activités biologiques et/ou propriétés fonctionnelles				
Eaux de lavage de poisson frais	membranes de 1 et 3 kDa	n.c	Antioxydante	Yoon et al 1998

Protéines de carcasse de morues	membranes planes de 3, 10 et 30 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antioxydante, antihypertensive propriétés émulsifiantes	Jeon et al 1999
Substrat	Membrane/MWCO	Conditions opératoires	Objectif du fractionnement	Littérature
Effet sur les activités biologiques et/ou propriétés fonctionnelles				
Gélatine de peau de colin d'Alaska	membranes fibre creuse UFP-10-C-4 de 10 kDa ; UFP-5-C-4 de 5 kDa; UFP-1.0-43-PM1 de 1 kDa	T= 37 ou 50 °C échelle laboratoire	Antihypertensive	Byun et Kim 2001
Protéines de crevette	membranes planes Durapore PVDF 0,45 µm cellulose régénérée 5 et 30 kDa	n.c échelle laboratoire	Antioxydante	Sumaya-Martinez 2004
Protéines de carcasse de colin d'Alaska	membranes planes de 1, 3, 5, 10 et 30 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antihypertensive	Je et al. 2004
Protéines de carcasse de colin d'Alaska	membranes planes de 1, 3, 5, 10 et 30 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antioxydante	Je et al. 2005a
Protéines de carcasse de hoki	membranes planes de 1, 3, 5 et 10 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antioxydante	Je et al. 2005b
Protéines de carcasse de hoki	membranes planes de 1, 3, 5 et 10 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antioxydante	Kim et al. 2007
Gélatine de peau de calamar géant	membranes planes de 3, 5, 10 et 30 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antioxydante	Mendis et al. 2005

Substrat	Membrane/MWCO	Conditions opératoires	Objectif du fractionnement	Littérature
Muscle de calamar géant	membranes planes de 3, 5 et 10 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antioxydante	Rajapaske et al. 2005
Muscle de congre	membranes planes de 1, 3, et 5 kDa (Système Minitan)	n.c Analytique	Antioxydante	Ranathunga et al. 2006
Récupération ou élimination de certaines fractions				
Muscle de Maquereaux	n.c	n.c	Séparation et purification d'un peptide antioxydant	Do 2000
Protéines de poisson	membranes de 3, 10 et 30 kDa (concentrateur centricon)	Analytique	Récupération d'une fraction peptidique de taille inférieure à 3 kDa	Neves et al. 2004
Crevettes	membranes de 3 kDa	Mode dialyse Analytique	Elimination des peptides de taille inférieure à 3 kDa	He et al. 2006
Evaluation des performances du procédé				
Protéines de merlan bleu	membranes PCI tubulaire 0,033 m ² MT04 300 Da en PA/PES MT04 4 kDa en PES modifié MT68 8 kDa en PS MT120 20 kDa en PS	Mode recyclage total: V = 2L; Co = 4,8 à 11,4 g.L ⁻¹ ; T= 15°C, v = 2,5 m.s ⁻¹ ; ΔP= 35 bar Mode concentration : V= 4 L; Co = 45 g.L ⁻¹ ; T= 40°C, v = 2,5 m.s ⁻¹ ; ΔP= 35 bar Echelle pilote	flux de perméation, TR	Vandanjon et al. 2007

III.2 FRACTIONNEMENT SELON LA CHARGE DES PEPTIDES : LA CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS

III.2.1 Principe de l'échange d'ions

Sous le terme échangeurs d'ions, on entend toutes les substances naturelles et de synthèse qui sont capables d'échanger des ions sur lesquels elles sont fixées, contre des quantités équivalentes d'autres ions, contenus dans une solution en environnante (Foster et al. 1985). L'échange d'ions est un procédé par lequel les ions d'une certaine charge contenus dans une solution (par exemple des cations) sont éliminés de cette solution par adsorption sur un matériau solide (l'échangeur d'ion) pour être remplacés par une quantité équivalente d'autres ions de même charge émis par le solide. Le procédé d'échange d'ions peut donc être défini comme un échange réversible d'ions entre une solide et un liquide, échange qui s'effectue sans modification substantielle de la structure solide (Foster et al. 1985). Dans un but de simplification, il est commode de considérer un échangeur d'ion comme un réseau poreux portant, en surface et à l'intérieur des pores, un excès de charge électrique compensé par un nombre convenable d'ions de charge opposée. Ces derniers se déplacent lors de l'ionisation et s'échangent avec les ions de la solution (Rosset et al. 1991). L'échangeur d'ions peut être un sel, un acide ou une base, solide ou insoluble dans l'eau, mais hydraté. Ils sont constitués d'un squelette de base (matrice) et de groupements actifs (ions fixes).

III.2.1 La séparation par extraction sur phase solide (SPE: Solid Phase Extraction)

L'extraction sur phase solide (SPE: Solid Phase Extraction) est un outil puissant pour la préparation et l'analyse des échantillons et possède un large spectre d'activité (analyses environnementales, analyses pharmaceutiques et biochimiques, la chimie organique et les analyses alimentaires. Cette technique séparative, appelée également extraction solide-liquide a pour but d'extraire certains composés présents dans des échantillons complexes avant leur analyse par les différentes techniques chromatographiques (Saksena et Zydney 1994). Les ions de charge opposée ne sont pas affectés. L'échangeur d'ions est un sel, un acide ou une base solide et insoluble dans l'eau mais hydraté. En effet, l'ajustement du pH et l'ajout d'un sel influencent les interactions stériques et électrostatiques entre protéines (Zydney 1998 – Cheang et Zydney 2004).

Les principales étapes de la procédure SPE sont le conditionnement de l'adsorbant, le dépôt de l'échantillon, le lavage de l'adsorbant et l'élution. Cette démarche permet de pallier l'absence de sélectivité du système de séparation, ou la faible sensibilité du détecteur dans le cas de solutions diluées. Enfin, l'extraction solide-liquide permet de dépolluer l'échantillon avant son injection, et de préserver le matériel chromatographique. Les molécules ciblées sont retenues par partage ou par adsorption sur la phase d'extraction et éluées au cours d'une ultime étape. Cette étape d'élution a été précédée d'un ou plusieurs lavages visant à éliminer les espèces interférentes de la matrice (Figure I.47).

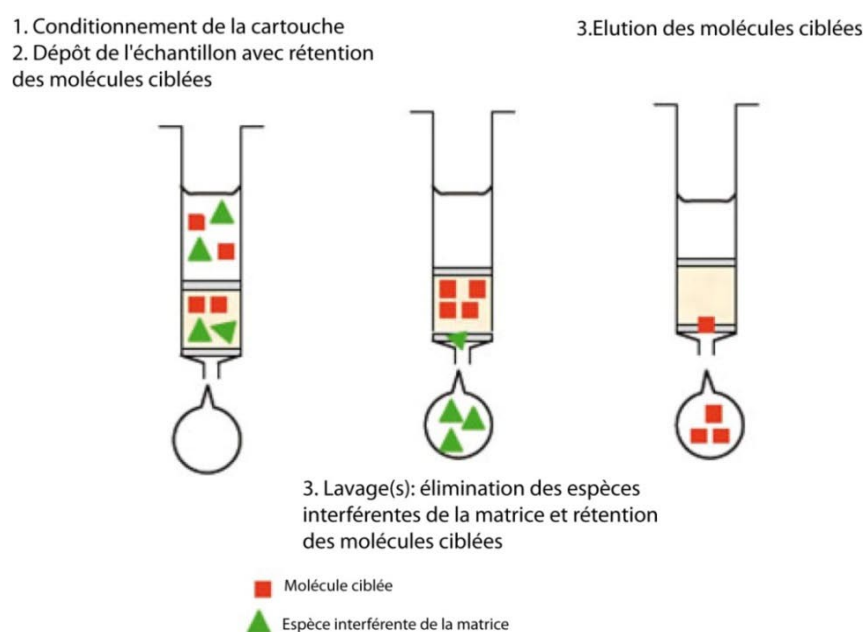


Figure I.47: Protocole général d'une extraction solide-liquide

Les matériaux de base utilisés dans cette méthode sont généralement des supports de silice greffée avec des groupements acides (fort : sulfonique ou faible : acide carboxylique) ou basiques (amine) retiennent sélectivement des molécules chargées par interactions ioniques. Ainsi, les molécules ciblées, sous forme ionique, sont retenues au cours du dépôt et des lavages tandis que les espèces neutres ou de charge identique à celle du support sont éluées. A la fin, le pH de l'étape d'élution neutralise les molécules (échangeur fort) ou le support d'extraction (échangeur faible) et rompt ainsi les interactions ioniques responsables de la rétention des molécules. Le pH des différentes phases (dépôt, lavage, élution) préparées à partir de solutions tampon est fixé en fonction des pKa des couples acide/base des molécules et des greffons ionisables du support d'extraction. La capacité des phases échangeuses d'ions vis-à-vis des espèces ioniques ou ionisables dépend du nombre de sites échangeur d'ions par unité de masse de phase stationnaire.

III.2.3 Echange d'ions en chromatographie d'élution : Application aux acides aminés

Dans ce type de chromatographie, la résine ou bien la silice n'est pas utilisée sous forme acide ou base libre mais elle est d'abord équilibrée avec un tampon approprié. Le mélange d'acides aminés est introduit sur la colonne dans le même tampon. On impose en général le pH et la force ionique des tampons de telle sorte que la plupart des composés à séparer soient fixés sur la colonne. Il s'établi alors un équilibre entre les ions du tampon et les groupes ionisables des constituants du mélange d'une part et les groupes actifs de la résine d'autre part. Les liaisons salines ne sont cependant pas les seules forces qui interviennent dans la rétention des corps et comme dans le cas de la chromatographie par déplacement, les forces de Wan Der Waals jouent ici un rôle plus ou moins important, en fonction de la structure des produits chromatographiés. Pour éluer les constituants d'un mélange fixés sur la colonne, on diminue les affinités des ions adsorbés vis à vis de la résine en modifiant graduellement le pH et la force ionique du tampon et souvent la température. En modifiant ainsi constamment l'équilibre tampon-résine, on fait passer progressivement en solution des corps dont l'ionisation n'est plus suffisante pour une combinaison avec les groupes dissociés de la résine. Comme on veut favoriser l'interaction de la protéine avec la phase stationnaire, on aura avantage à jouer avec le pH de la solution tampon qui circule dans la colonne. Pour une phase solide échangeuse de cations, on voudra optimiser la charge positive de la protéine et donc travailler à un pH plus bas, histoire de bien former des groupements -NH_3^+ et -COOH plutôt que -NH_2 et -COO^- . Un tampon à pH 7,5 serait approprié. À l'inverse, pour une phase solide échangeuse d'anions on utilisera plutôt un tampon basique à pH 8,2 par exemple, de manière à favoriser la formation de groupements -COO^- et de réduire la présence de groupements NH_3^+ (Le Guilly 1996).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. INFLUENCE DU CHOIX DU SUBSTRAT ET DES CONDITIONS D'HYDROLYSE

I.1 DEFINITION DES OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif de cette première partie est de mettre au point un procédé d'hydrolyse enzymatique des viscères de seiche capable de déstructurer les matrices par le biais des protéases de façon à obtenir de bons rendements en termes de recouvrement des protéines dans la fraction soluble, de libérer les lipides en vue d'une valorisation ultérieure, d'obtenir un enrichissement de la fraction soluble en acides aminés importants en nutrition animale et enfin de prospecter une activité antimicrobienne des peptides. La production de produits d'intérêt doit donc être répétable et le procédé maîtrisé.

La première phase comprend :

- 1) Une connaissance précise de la matière première à travers la caractérisation biochimique des viscères avec et sans la glande d'encre qui représente une proportion assez importante de la partie viscères (10%).
- 2) Des hydrolyses de 24 heures afin d'observer le comportement des matrices en contact avec les enzymes et ce dans des conditions précises et contrôlées de température et de pH pour assurer la reproductibilité du procédé.
- 3) Un screening des différentes enzymes en visant les propriétés nutritionnelles (lipides, acides aminés).

La deuxième phase comprend :

- 1) Un criblage plus fin des enzymes et des matrices afin de bien délimiter notre domaine d'analyses à travers des hydrolyses de 6 heures en visant les propriétés nutritionnelles et l'activité antibactérienne.
- 2) La définition des conditions d'hydrolyse.

La troisième phase comprend :

- 1) La transposition du procédé d'hydrolyse à échelle pilote.
- 2) La caractérisation de l'hydrolysats final.

Pour chacune des différentes phases, une caractérisation de l'hydrolysat est réalisée. Un hydrolysat enzymatique peut être décrit selon trois principales caractéristiques :

- la source de protéines à l'origine de l'hydrolysat (substrat) fournit une information de base quant à la composition en acides aminés,
- le degré d'hydrolyse (DH) est une valeur numérique (%) illustrant l'étendue de la coupure de la protéine générée par la réaction,
- le profil de poids moléculaire (PM) quantifie la proportion (%) de peptides formés en fonction de leur taille.

I.2 MATERIEL BIOLOGIQUE

I.2.1 Origine de la matière première

Les seiches et viscères utilisés dans cette étude nous ont été fournis par la société "CALEMBO" (Sfax, Tunisie). Les individus matures (longueur dorsale du manteau entre 20 et 25 cm) utilisés pour cette partie de l'étude ont été capturés par chalutage dans le Golfe de Gabès (Figure II.1) durant le mois de février et entre septembre et octobre 2006.

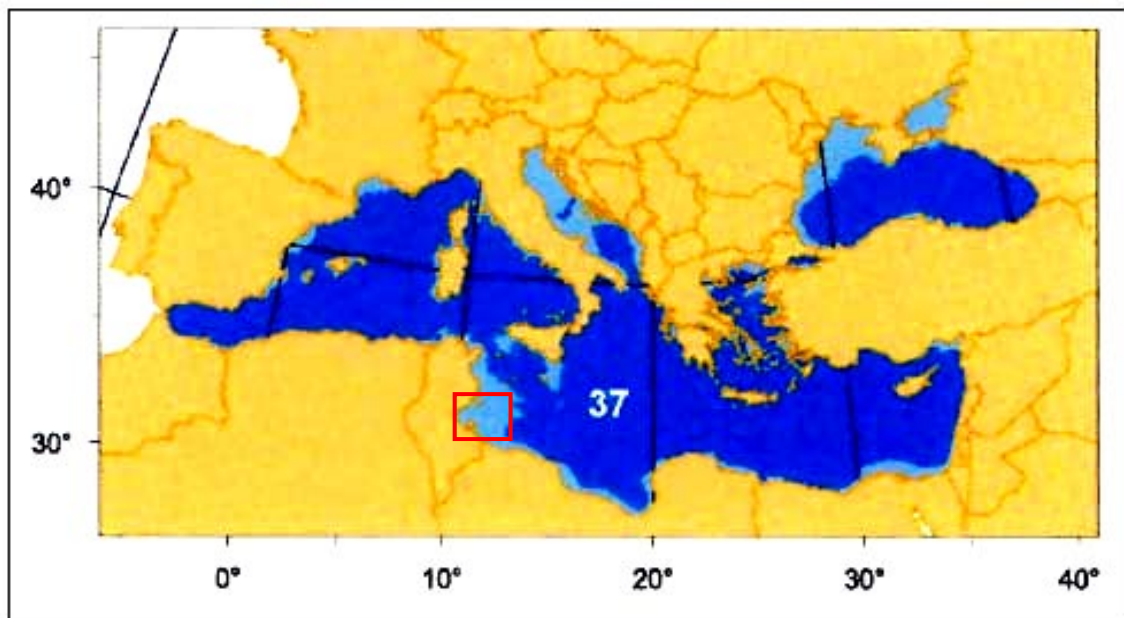


Figure II.1 : Localisation de la zone de capture des seiches utilisées pour ce travail selon la répartition des zones de pêche de la FAO (FAO fisheries departement 2005)

Les seiches proviennent de plusieurs campagnes de pêche et à des périodes différentes dans l'année dans le but de s'affranchir au maximum des variations biochimiques pouvant être induites par la saison et le sexe (Caponio et al. 2004 - Özyurt et al. 2006). En effet, en période de reproduction, l'état physiologique des femelles change considérablement à cause de la maturation des gamètes qui demande à l'animal une grande mobilisation des réserves lipidiques et protéiques pour la vitellogénèse et donc une modification dans la composition biochimique des viscères. Aussi, nous avons choisi une unique aire et technique de pêche pour que le régime alimentaire soit à peu près le même. En effet, étant donné que la seiche est carnivore, le contenu stomacal influe d'une manière significative sur la composition biochimique des viscères et la manière de capture également.

I.2.2 Préparation des matrices

Deux types de matrices ont été préparés :

Les viscères sans la glande d'encre : des seiches fraîchement pêchées sont éviscérées au laboratoire (unité de valorisation, Centre de Biotechnologie de Sfax) et la glande d'encre a été enlevée délicatement de la masse viscérale. Les viscères ont ensuite été broyés et homogénéisés à l'aide d'un blender pendant 1 min. Les lots provenant des campagnes de pêche de février ont été mélangés avec ceux d'octobre 2006 et minutieusement homogénéisés avant de placer des aliquotes des 200 g environ, placés dans des pots et stockés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Les viscères avec la glande d'encre : les viscères noirs sont obtenus directement chez l'industriel suite à l'opération d'éviscération manuelle des seiches fraîches au niveau de la chaîne de transformation. Les individus ont été pêchés durant les campagnes de mois de février 2006 et entre septembre et octobre 2006. Les matrices sont broyées, homogénéisées et des aliquotes de 1 kg environ sont stockés dans des sachets à -80°C.

I.3 MATERIEL ENZYMATIQUE

Dans ce travail, 6 enzymes ont été utilisées. Protamex®, pour les hydrolyses de 24 h et de 6 h, Alcalase® et Flavourzyme™ uniquement pour les hydrolyses de 24 h, et Delvolase®, Pepsine et Multifect® Neutral pour les hydrolyses de 6 h et de 2 h à grande échelle. Les spécificités des différentes protéases sont mentionnées dans le tableau II.I.

I.3.1 Protamex®

Protamex® est une enzyme industrielle produite par génie génétique par la firme Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Il s'agit d'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'Unité Anson (U.A) est définie comme la quantité d'enzyme qui, incubée pendant 10 min à 25°C et à pH 7.5 en présence d'hémoglobine dénaturée, libère de ce substrat l'équivalent de 1 mg de tyrosine, déterminée par une absorption spectrophotométrique à 280 nm sur le filtrat non précipitable par l'acide trichloroacétique. L'activité déclarée de Protamex est de 1,5 AU/g. Les conditions optimales d'hydrolyse 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 (Novozymes, 2001a).

I.3.2 Alcalase®

L'alcalase® 2,4 L, une serine protéase (possède des résidus serine au niveau de son site catalytique) endopeptidase bactérienne est produite par fermentation puis purification à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. Son principal constituant enzymatique est la Subtilisine A (nom générique, Subtilisine Carlsberg). De qualité alimentaire (autorisations FAO), cette enzyme possède une activité spécifique déclarée de 2,4 unités Anson par gramme (AU/g). Les numéros enzymatiques de l'Alcalase® sont EC 3.4.21.62, 3.4.21.19 et 3.4.22.31. Le fabricant (Novozymes A/S) préconise les conditions optimales suivantes : une température comprise entre 55 et 70°C et un pH compris entre 6,5 et 8,5. Alcalase peut être inactivée par chauffage à 85°C pendant 10 min lorsque le pH est de 8. (Novozymes, 2001b).

I.3.3 Flavourzyme™

Flavourzyme™ 500MG (Novozymes A/S) est un complexe peptidique qui hydrolyse les protéines dans des conditions neutres ou acides. Elle appartient la classe des hydrolases. Flavourzyme est produite par fermentation à partir d'une souche sélectionnée mais non

génétiquement modifiée d'*Aspergillus oryzae*. Elle 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 d'au moins 4 endopeptidases et 5 exopeptidases. Elle est souvent utilisée dans le but de diminuer l'amertume des peptides. Cette enzyme est conforme aux spécifications de pureté recommandées pour les enzymes commerciales de qualité alimentaire, établies par le FAO (FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)) et le (Food Chemical Codex (FCC)). 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 (Novozymes, 2001c).

I.3.4 Delvolase®

Delvolase® est une protéase alcaline de qualité alimentaire, produite à partir de la fermentation d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. Delvolase®, également appelée Subtilisin Carlsberg (E.C. 3.4.21.62) est une sérine protéase (possède un acide aminé à sérine au niveau de son site catalytique). Cette endopeptidase est fabriquée par "DSM Food Specialities – Beverage Ingredients" (Delft, The Netherlands). Concernant les conditions optimales, Delvolase® est stable en solution à pH compris entre 5 et 10. Son activité optimale se situe entre 9,5 et 10,5. Cependant, il est conseillé de travailler à un pH aux alentours de 8 afin d'éviter la désamination des acides aminés basiques dans un milieu à pH alcalin. La température optimale est de 60°C et l'inactivation de l'enzyme peut être effectuée à 90°C pendant 15 min (DSM 2003).

I.3.5 Pepsine

La Pepsine appartenant à la famille des peptidases A1 est la protéase digestive la plus commune chez les vertébrés. Contrairement à d'autres endopeptidases, elle hydrolyse uniquement les ponts peptidiques (ne coupe pas les liaisons amide ou ester) (Figure II.2). La Pepsine commerciale que nous avons utilisée (EC 3.4.23.1) provient de la muqueuse gastrique du porc et nous a été fournie par Sigma Aldrich. Les sites de coupure préférentiels sont ceux hydrophobiques et ceux contenant des résidus aromatiques dans les positions P1 et P'. L'hydrolyse augmente si la protéine contient des acides aminés souffrés proches du pont peptidique d'un acide aminé aromatique.

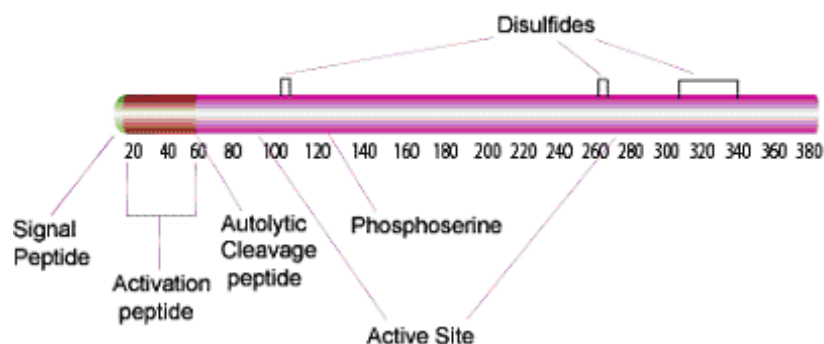


Figure II.2 : Séquence peptidique de la Pepsine. (Source : www.sigmaaldrich.com)

La Pepsine possède également une préférence de coupure pour la partie carboxyle de la Phénylalanine et de la Leucine et à un degré moindre pour le côté carboxyle de l'Acide Glutamique. Cependant, elle ne coupera pas les liaisons au niveau de la Valine, Alanine ou Glycine. Les conditions optimales sont 2 pour le pH et 45°C pour la température. Elle est inactivée irréversiblement à un pH>7. L'activité spécifique de la Pepsine porcine donnée par le fournisseur est de 1,8 unités Sigma/mg protéine. Les spécificités de coupure au niveau de la chaîne β de l'insuline sont comme suit :

$\text{Phe}^1 \pm \text{Val}$, $\text{Gln}^4 \pm \text{His}$, $\text{Glu}^{13} \pm \text{Ala}$, $\text{Ala}^{14} \pm \text{Leu}$, $\text{Leu}^{15} \pm \text{Tyr}$, $\text{Tyr}^{16} \pm \text{Leu}$, $\text{Gly}^{23} \pm \text{Phe}$, $\text{Phe}^{24} \pm \text{Phe}$ et $\text{Phe}^{25} \pm \text{Tyr}$

I.3.6 Multifect® Neutral (GC 710)

La Multifect® Neutral ou GC 710 est une protéase neutre, d'origine bactérienne provenant de la fermentation contrôlée d'une chaîne de *Bacillus amyloliquefaciens* non modifiée génétiquement. Cette metallo-endorpeptidase, de qualité alimentaire, est commercialisée par GENECOR® International Inc. (Leiden, The Netherlands) (Genecor 2001). Les conditions opératoires de cette enzyme se situent entre 6 et 8 pour le pH avec un optimum de 7 et entre 40 et 60°C pour la température. L'enzyme peut être inactivée en maintenant la température du mélange réactionnel supérieure à 60°C pendant 30 min. La GC 710 est très utilisée dans l'hydrolyse des graines comme le soja, le blé, le riz (alcool de riz) et dans le processus de fabrication de la bière, surtout dans le processus en amont (Jung et al. 2004 - Zhu et al. 2004). Multifect® Neutral possède une activité enzymatique déclarée de 1600 (Unités Azo/g).

Tableau II.1 : Spécificité des Protéases utilisées. Les acides aminés entre parenthèse indiquent une activité moins prononcée de l'enzyme. (Alcal.=Alcalase ; Prot.=Protamex ; Flav.=Flavourzyme ; Peps.=Pepsine ; Delv.=Delvolase ; M.N=Multifect Neutral)

	Hydrophobes						Souffrés		Basiques			Acides		Aminés		OH				
	Trp	Iso	Pro	Phe	Tyr	Leu	Val	Met	Cys	Lys	Arg	His	Glu	Asp	Gln	Asn	Ser	Thr	Gly	Ala
Alcal.	x	x	x	x	x	x	x						x	x						
Prot.	x	x	x	x	x	x	x			x	x									
Flav.	x	x		x	x	x	x			x	x		(x)	(x)	(x)	(x)	x	x		x
Peps.	x			x	x	x							x	x	x	x				
Delv	n.c																			
M.N	n.c																			

I.4 DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DES ENZYMES ET DES MATRICES

I.4.1 Activités spécifiques des enzymes commerciales

Du fait que les unités données pour les activités spécifiques sont différentes (AU/g pour Protamex et Alcalase et Multifect Neutral, LAPU/g pour Flavourzyme, unités SIGMA pour Pepsine et DU/g pour Delvolase), il convient 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. (1993).

Le substrat modèle choisi est l'hémoglobine. Pour chaque enzyme, différentes conditions de pH, de température et de concentration en enzymes sont testées dans le but de définir les plus favorables à l'hydrolyse. Ainsi, 4 températures (30, 40, 50 et 60°C) et 5 valeurs de pH (5, 6, 7, 8 et 9) sont testées. Concernant les concentrations, les indications données par les différents fournisseurs nous suggèrent de tester différentes concentration en fonction des enzymes. 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, Delvolase Multifect Neutral et Pepsine qui semblent posséder une activité moindre sont testées aux concentrations suivantes : 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 Na₂HPO₄ 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 II.2. 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 II.2 : Tampons phosphate citrique utilisés pour la détermination de l'activité spécifique des enzymes.

pH	Na ₂ HPO 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 de 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 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 II.1).

$$1 \text{ U} = 1 \text{ mg de BSA hydrolysée / h} \quad (\text{Equation II.1})$$

I.4.2 Activité protéolytique des viscères de seiche

Les matrices vivantes, contiennent naturellement des enzymes endogènes indispensables pour leur métabolisme. Les viscères sont le siège d'une activité enzymatique accrue, vu le rôle qui leur est imposé. La seiche, *Sepia officinalis*, connue pour avoir un cycle de vie court, est caractérisée par un taux de croissance élevé (Clarke et al. 1989 – Le Goff et

Daguzan 1991). Cette croissance rapide et leur métabolisme à prédominance protéique impliquent un fort renouvellement protéique et par conséquent des activités protéolytiques importantes. De plus des études antérieures ont démontré la présence de nombreuses enzymes dans le tractus digestif de la seiche (Perrin et al. 2004).

L'étude de l'activité protéolytique présente dans les viscères est particulièrement importante. D'habitude et afin que cette machine enzymatique vienne interférer avec les enzymes exogènes, les tissus à hydrolyser sont préalablement cuits de façon à inactiver les enzymes endogènes. Cependant, de tels traitements 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 quantifier l'activité endogène de façon à ce que les hydrolyses soient conduites sur des matrices crues et non pré-cuites.

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 Ultra Turrax® (Bioblock Scientific, Nantes, France) 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.

I.5 HYDROLYSES ENZYMATIQUES

I.5.1 Equipement, installations et conditions opératoires

I.5.1.1 Hydrolyses à l'échelle de laboratoire

I.5.1.1.1 Hydrolyses de longue durée avec régulation de pH

Dans un premier temps, les hydrolyses de longue durée ont été réalisées de façon à observer le comportement des matrices en contact avec les enzymes. Les hydrolyses ont été conduites pendant 24 h en mode pH-Stat, avec Protamex, Alcalase, Flavourzyme et Pepsine.

Pour chaque réaction environ 100 g de matière première sont introduites dans le réacteur enzymatique à double enveloppe de capacité 1 L, en rajoutant 1 volume d'eau milliQ. Le système est mis en agitation (300 rpm) et amené à la température voulue à l'aide de la circulation d'éthylène glycol dans la double paroi, grâce à un bain thermostaté. La température à l'intérieur du système est mesurée à l'aide de la sonde de température du pH-stat. Dès que la température optimale d'action de l'enzyme est atteinte, le pH initial du substrat est mesuré puis l'ajout manuel de NaOH 1M ou bien HCl 2M est réalisé jusqu'à l'obtention du pH voulu pour réaliser l'hydrolyse. La réaction d'hydrolyse est alors initiée après stabilisation en rajoutant l'enzyme selon les ratios enzyme/substrat suivants : 0,1% p/p pour Alcalase Protamex et Pepsine et 1,5% p/p pour Flavourzyme. Toutes les réactions d'hydrolyse ont été conduites à 50°C et pH 8, excepté pour la Pepsine où la température est de 45°C à pH 2. Le système est maintenu en agitation pendant 24 h et le pH est contrôlé par l'électrode et régulé par la pointe d'addition du titrateur (TIM 84, Radiometer Analytical, SAS, France) (Figure II.3).

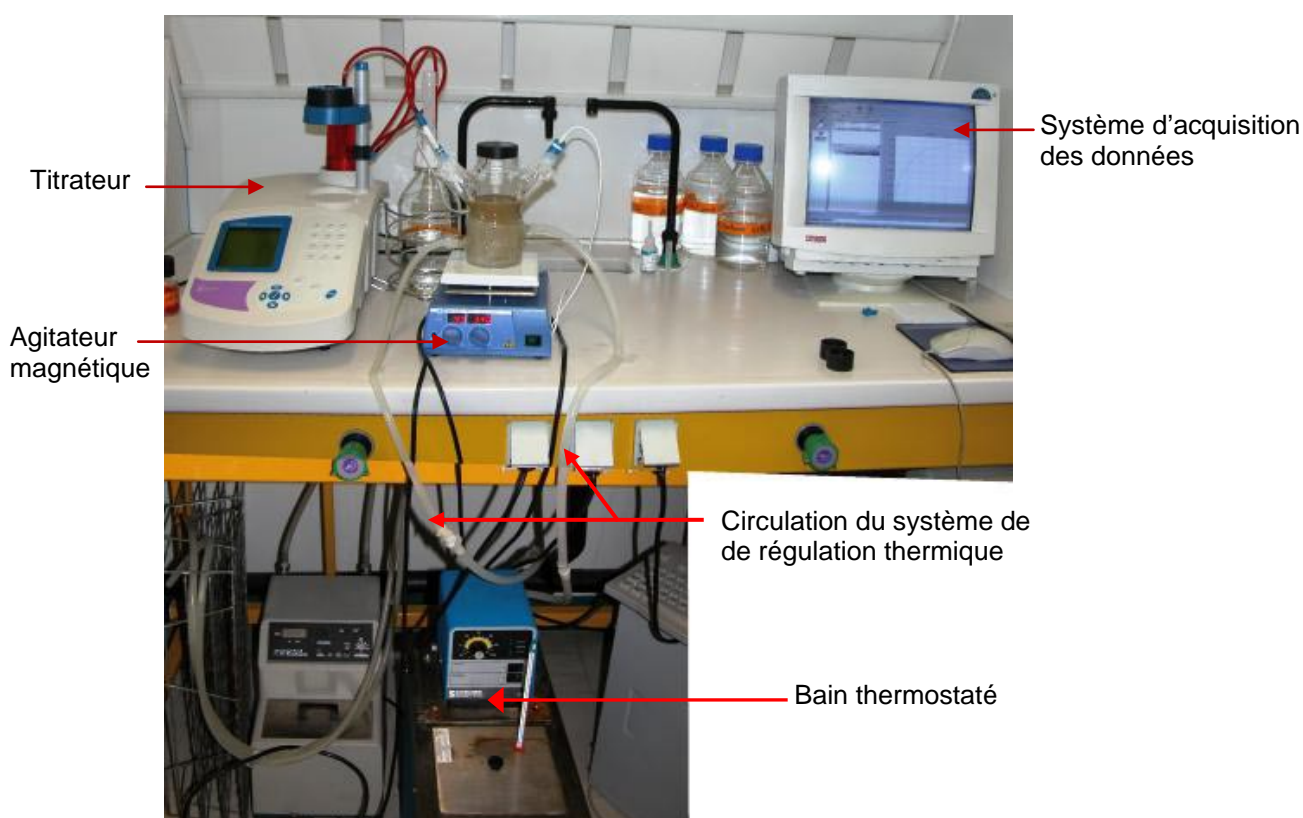


Figure II.3: Installation réalisée au laboratoire pour l'hydrolyse enzymatique avec contrôle de pH

Description de l'appareil

Le titrateur (TIM 84, Radiometer Analytical, SAS, France) délivre une quantité d'ions OH^- (sous forme de soude 2N) proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques rompues. En milieu basique ou neutre, le groupe aminé sera plus ou moins dissocié, libérant ainsi des ions H^+ qui seront neutralisés par les ions OH^- provenant de la cuve d'alimentation en soude du pH-Stat (Figure II.4). Tant que le pH reste constant, il existe une relation linéaire entre le nombre de liaisons peptidiques coupées et le nombre de moles de base apportées par le Ph pour maintenir le pH constant.

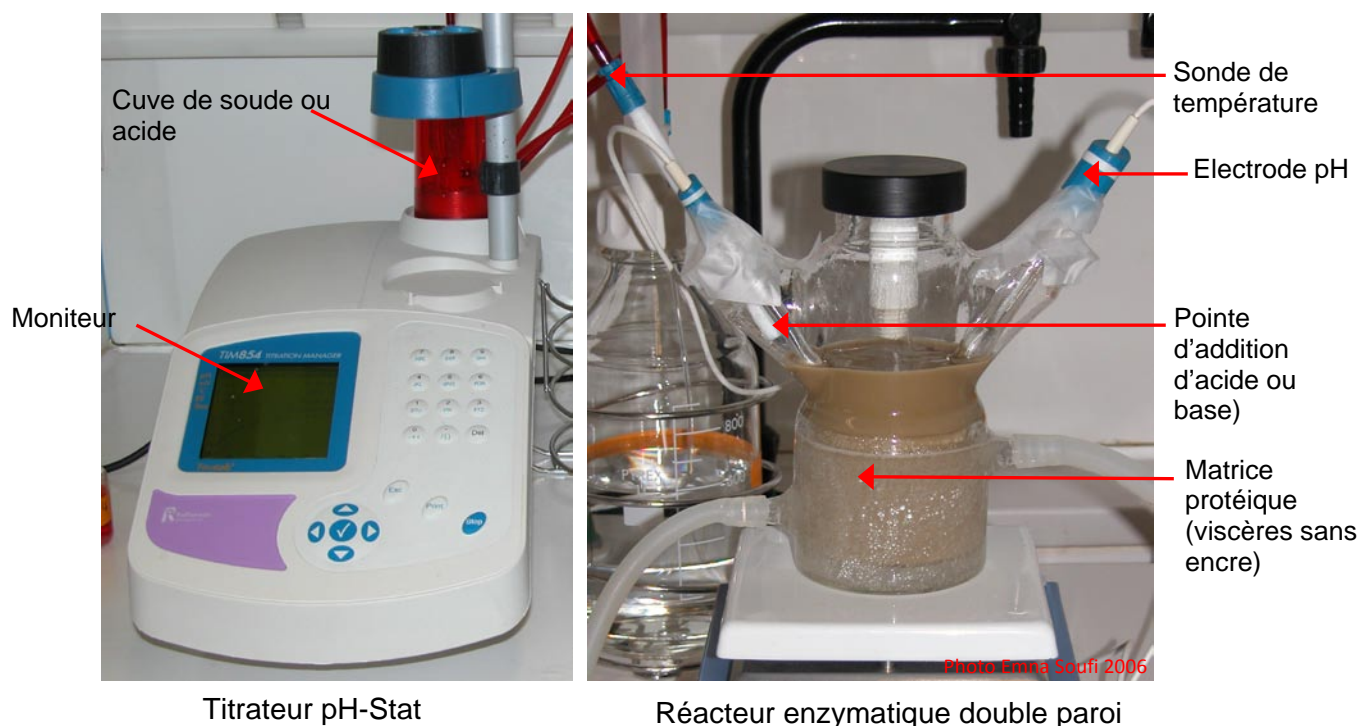


Figure II.4 : Equipement utilisé pour la régulation du pH

I.5.1.1.2 Hydrolyses de 6 heures sans contrôle de pH

A la suite des hydrolyses de 24 h avec régulation de pH, des hydrolyses de 6 h sont réalisées avec Protamex, Delvolase, Mutifect Neutral et Pepsine sans régulation de pH avec prélèvement toutes les 10 min. 400 g de substrat (viscères avec encre) sont introduits dans un réacteur enzymatique à double paroi de 2 L, avec rajout de 1 volume d'eau MilliQ. Comme pour la réaction précédente, le système est maintenu à la température voulue à l'aide d'un bain thermostaté. L'agitation est maintenue d'un agitateur à hélice de modèle RW 20 (Ike-Werk, Janke & Kunkel, Germany) (Figure II.5). L'initiation de la réaction d'hydrolyse est

réalisée par ajout des enzymes (ratio E/S : 0.1%, p/p). Les conditions opératoires sont les suivantes : 50°C, pH de la matrice (6,7) pour Protamex et Multifect Neutral ; 45°C, pH 10 pour Delvolase ; 50°C, pH 2 pour Pepsine.

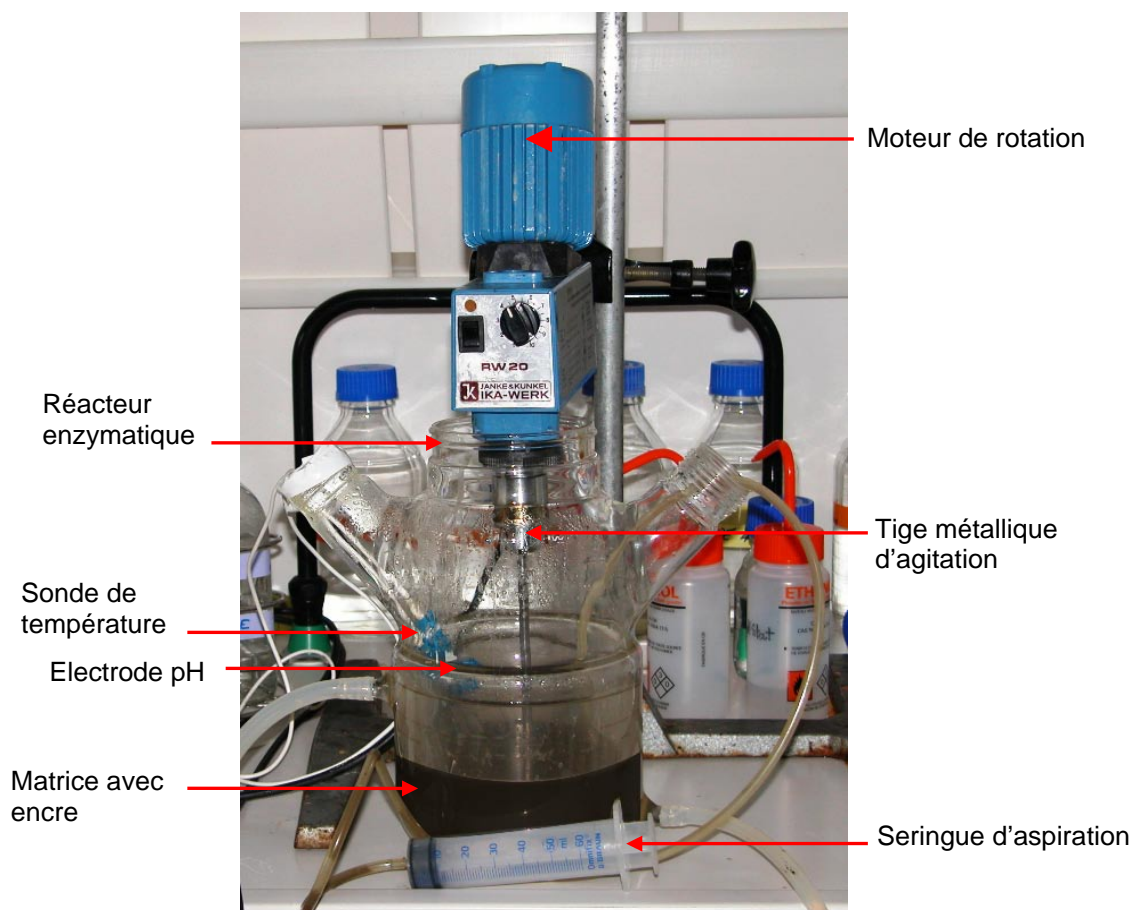


Figure II.5: Dispositif d'hydrolyse enzymatique sans régulation de pH à échelle de laboratoire

La figure II.6 résume les différentes procédures d'hydrolyse à échelle de laboratoire (24 heures et 6 heures).

I.5.1.2 Hydrolyses à l'échelle pilote

Les hydrolyses à échelle pilote se sont déroulées au centre Ifremer de Nantes. Le montage et la mise en route d'un réacteur enzymatique d'une dimension particulière ont donc été nécessaires. Les étapes préliminaires incluent le montage des différents éléments du réacteur, sa mise en route et les réglages des commandes pilotant les différents paramètres du procédé d'hydrolyse. Les hydrolyses d'une durée de deux heures, avec la Pepsine ont été conduites dans un grand réacteur en verre à double enveloppe (Batailler, France) d'une capacité minimale de 13 L et maximale de 22 L.

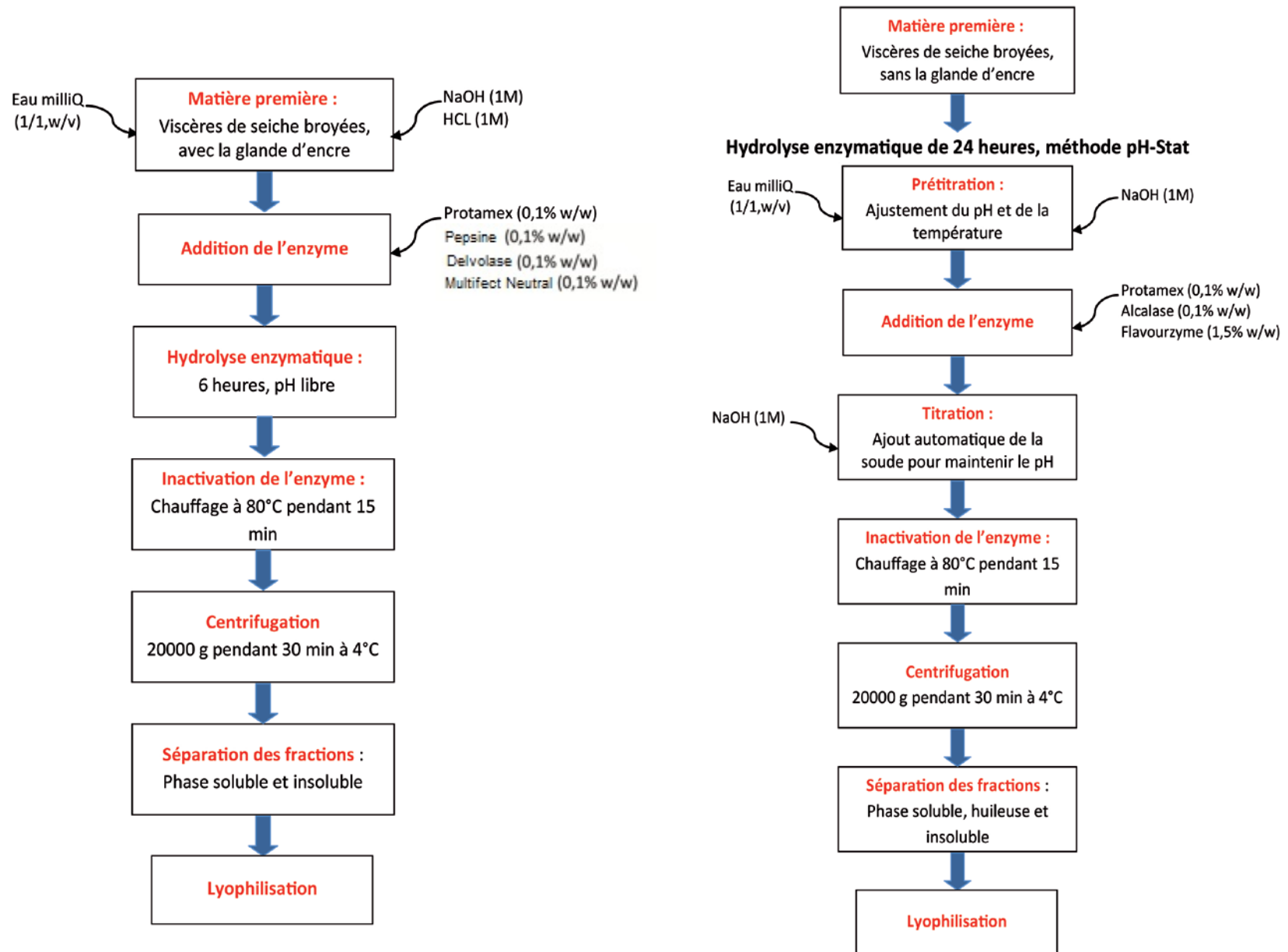


Figure II.6 : Etapes de l'hydrolyse enzymatique (24 h et 6 h) à l'échelle de laboratoire

Le dispositif est doté d'un moteur rotatif de modèle Stirrer SS-30 (Stuart Scientific, UK) dans lequel s'insère une longue tige métallique munie à son extrémité d'une hélice assurant l'agitation du système à l'intérieur du réacteur. Deux barres métalliques ont été montées sur la tige afin de casser le vortex. La régulation de la température est réalisée par un bain-marie (réglé à 54°C), relié à la double enveloppe par une pompe. Le liquide circulant autour des parois du réacteur est l'eau (Figure II.7). Le contrôle de la température est réalisé par l'intermédiaire d'une sonde placée horizontalement par rapport au réacteur enzymatique. La valeur du pH est mesurée ponctuellement tout au long de l'hydrolyse moyennant une électrode placée verticalement. Les sondes à température et pH sont reliées à un automate permettant la lecture et l'enregistrement des données. Des prélèvements toutes les 10 min sont effectués afin de suivre la cinétique de la réaction d'hydrolyse ainsi que la composition biochimique des hydrolysats.

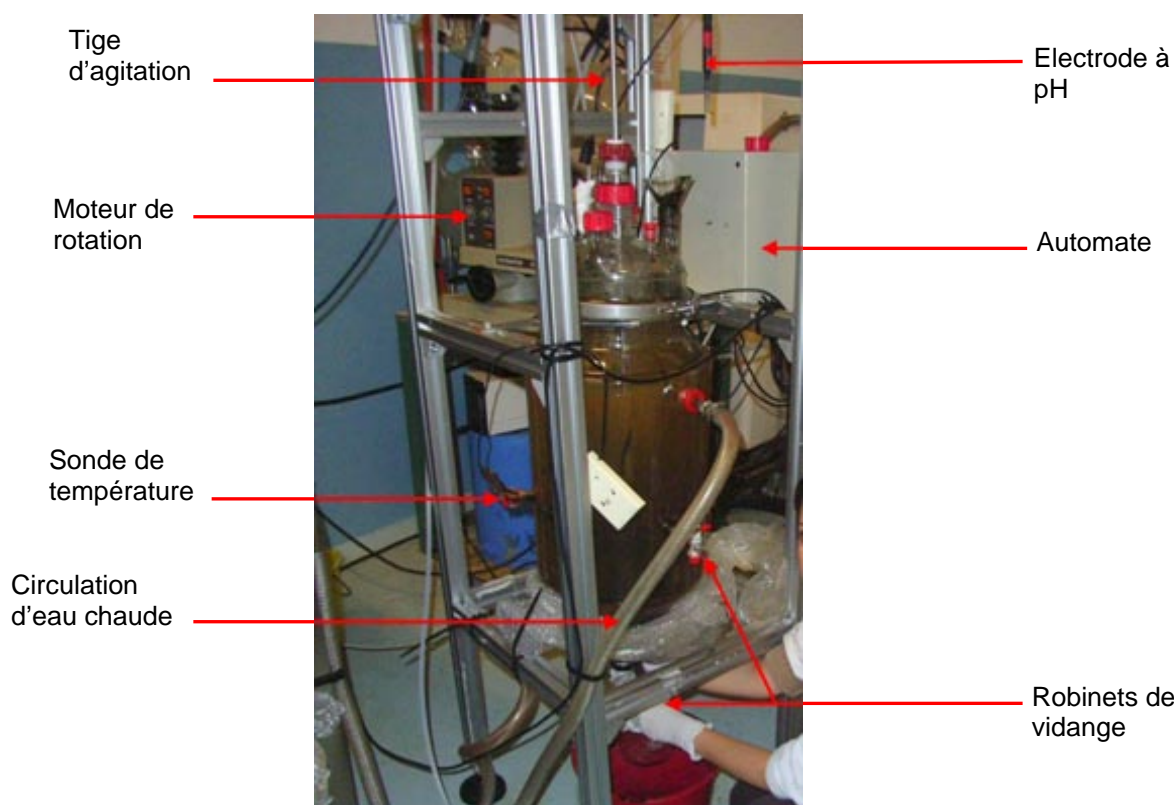


Figure II.7: Dispositif d'hydrolyse enzymatique à pH libre à l'échelle pilote

Les viscères de seiche avec encre sont mises à décongeler la veille puis broyées (8 kg) avant d'être introduites dans le réacteur avec un volume d'eau (8 L). Comme pour les hydrolyses à échelle de laboratoire, le système est préchauffé jusqu'à atteindre la température de 50°C à l'intérieur du substrat avec une agitation continue. Dès que la température est

stable, une régulation du pH est alors nécessaire (pH 2) par l'ajout de HCL 4N. La réaction d'hydrolyse est alors initiée par ajout de la Pepsine (8g).

I.5.1.3 Arrêt des réactions d'hydrolyse

Pour toutes les hydrolyses effectuées, aussi à l'échelle de laboratoire qu'à échelle pilote la réaction est arrêtée par inactivation thermique de l'enzyme (80°C pendant 20 min). Après refroidissement à température ambiante, l'hydrolysate est centrifugé à 20000g pendant 30 min à +4°C. Les différentes phases obtenues sont ensuite lyophilisées et conservées à -20 °C pour les analyses biochimiques.

I.5.2 Suivi de la cinétique des hydrolyses

L'importance de l'hydrolyse est quantifiée par le degré d'hydrolyse (DH) qui est déterminé par le nombre de liaisons peptidiques coupées sur le nombre total de liaisons peptidiques. Une protéine intacte a une valeur de DH égale à 0% tandis qu'une protéine totalement hydrolysée en acides aminés libres a une valeur de DH égale à 100%. Le suivi de la cinétique des hydrolyses se fait donc moyennant le calcul du degré d'hydrolyse (DH). Dans ce travail, nous avons utilisé deux principales méthodes selon qu'il y ait eu ou non contrôle du pH au cours de la réaction :

- **Méthode pH-Stat** basée sur la détermination de la concentration en groupements α -aminés libérés durant la réaction d'hydrolyse.
- **Méthode au DNFB** basée sur le dosage de la libération des groupements α -aminés au cours de l'hydrolyse dans le cas où cette dernière d'hydrolyse a lieu sans régulation de pH.

I.5.2.1 Hydrolyses longue durée : méthode du pH-Stat

I.5.2.1.1 Principe

D'une manière générale, l'étude d'une cinétique réactionnelle par pH-Stat consiste à maintenir ce pH constant par ajout d'un réactif neutralisant les ions H_3O^+ ou OH^- libérés et de calculer la cinétique de la réaction étudiée en se basant sur la consommation du réactif utilisé pour maintenir le pH du milieu, en fonction du temps. Dans leur grande majorité, les cinétiques réactionnelles présentent des réactions chimiques avec libération ou consommation d'ions H_3O^+ ou OH^- ; la vitesse de formation de ces ions est évidemment fonction des

conditions opératoires et notamment fonction du pH du milieu réactionnel. Pour ces études, l'objectif de l'analyste va être le maintien de son milieu réactionnel à une valeur appropriée du pH. Cette action est communément appelée pH-Stat.

Dans le cas de notre étude, la méthode du pH-Stat en milieu basique est basée sur la consommation d'OH⁻ (sous forme de base) durant l'hydrolyse des protéines (Adler-Nissen, 1982). En effet, lors d'une hydrolyse enzymatique, les endopeptidases clivent les liaisons peptidiques situées entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi au moins deux peptides et libérant des protons H⁺ neutralisés par addition de soude. 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. En effet l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des protéines est affectée par la spécificité de l'enzyme, la concentration de l'enzyme dans le substrat, le pH, la force ionique, la température et la présence ou l'absence de substances inhibitrices. Pour réaliser et contrôler une hydrolyse, il est donc nécessaire de travailler dans des conditions précises de température et de pH adaptées à l'enzyme utilisée. Le pH doit être supérieur à 6,5 pour que le degré de dissociation de NH₃⁺ soit suffisant et permettre de maintenir le pH constant (Adler-Niessen, 1982).

Le volume de soude versé est également très différent en fonction de la température de travail. En effet, le *pK* de la réaction d'hydrolyse varie de façon significative avec la température (Kristinsson et Rasco 2000c) :

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 T} \cdot 240 \quad \text{(Equation II.2)}$$

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

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad \text{(Equation II.3)}$$

Le tableau II.3 regroupe les différentes valeurs du coefficient de dissociation α en fonction des différentes températures.

Tableau II.3 : Facteurs de dissociation α des groupements aminés obtenus en fonction de la température et du pH (Kristinsson et Rasco 2000c).

pH	Température (°C)				
	25	30	40	50	60
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

Cette technique de travail fut mise en œuvre pour la première fois en 1923 par Knaff-Lenz pour l'étude d'une estérase, l'ajout du réactif titrant étant alors totalement manuel et assuré par un opérateur lisant et ajustant en permanence le pH du milieu réactionnel. Au cours des années 50, la société Radiometer A/S commercialise, suite à un travail en commun avec la Brasserie danoise Carlsberg, un système automatique de contrôle du pH ou pH-Stat comprenant une burette d'addition du réactif titrant et un enregistreur graphique pour le tracé de la courbe de consommation de réactif. L'addition du réactif est de type "tout ou rien" et les calculs sont effectués manuellement en se basant sur la courbe enregistrée.

I.5.2.1.2 Calcul du degré d'hydrolyse (DH)

Afin de 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 :

$$DH = \frac{V \cdot N}{\alpha \cdot Mp \cdot h_{tot}} \cdot 100 \quad \text{(Equation II.4)}$$

Avec :

V = Volume de soude versée durant l'hydrolyse (mL)

N = Normalité de la soude (mM)

α = Facteur de dissociation des groupements α -NH₂

M_p = Masse protéique dans la matière fraîche (g) déterminée par la teneur en azote total (%N).6,25 (Crooke et al. 1971)

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

I.5.2.2 Hydrolyses sans régulation de pH : méthode au DNFB

I.5.2.2.1 Principe

Cette méthode colorimétrique est basée sur le dosage des groupements NH₂ libérés suite à la réaction d'hydrolyse, selon la méthode décrite par Sanger (Sanger 1949). L'acide 2,4 Dinitrofluorobenzène (DNFB) réagit avec les groupements aminés N-terminaux libres pour former des dérivés Dinitrophenylés (DNP) de couleur jaune. Les groupements amines de l'acide aminé terminal jouent le rôle de réactif nucléophile pour le DNFB et se substituent à l'atome de fluor sur le noyau aromatique (Figure II.8) :

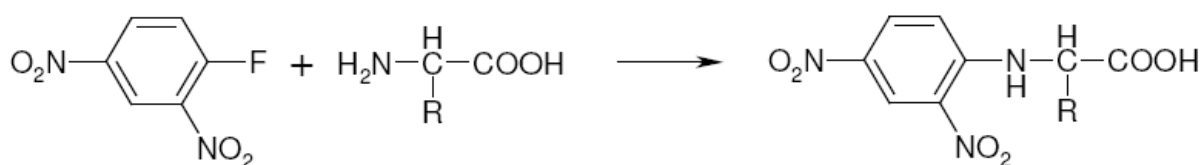


Figure II.8 : Réaction de base du dosage au DNFB

I.5.2.2.2 Protocole opératoire et calculs

Les essais sont réalisés en duplicats. A 1 mL d'hydrolysats (surnageants dilués au 200ème) est ajouté 1 mL de Tétraborate de Sodium (Na₂B₄O₇•10H₂O). Après agitation vigoureuse, 0,25 mL d'un mélange de DNFB/éthanol (0.013/1; v/v) sont rajoutés au mélange. Les préparations (mélange réactionnel + blanc) sont placées pendant 10 min, dans un bain-marie à 50°C et à l'obscurité et aussitôt refroidies sous l'eau courante. La réaction est stoppée par ajout de 10 mL de HCL 10N et l'absorbance est lue à 410 nm (spectrophotomètre, UNICAM UV4 UV/VIS) Une solution de glycine 5 mM est utilisée comme référence pour déterminer la quantité des groupements aminés (Figure II.9).

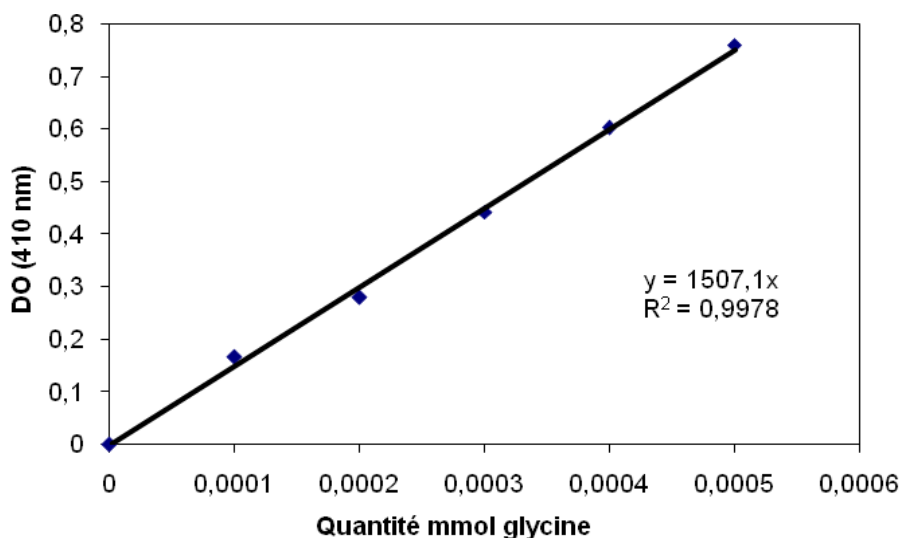


Figure II.9: Absorbance à 410 nm en fonction de la concentration en glycine.

La droite $y = 1507,1x$ ($R^2 = 0,99$) donne la correspondance entre l'absorbance et la quantité de fonctions amine dans le tube. Une mole d'amine est égale à une liaison peptidique coupée.

Le degré d'hydrolyse est alors donné par la formule suivante :

$$DH = \frac{\text{Nombre de moles d'amines (moles)} \times \text{dilution}}{\text{Masse de protéines (g) dans la prise} \times h_{tot}} \times 100 \quad (\text{Equation II.5})$$

I.5.3 Optimisation des hydrolyses : méthodologie des plans d'expériences

I.5.3.1 Objectif

La méthodologie des plans d'expériences a été utilisée dans le but d'optimiser l'hydrolyse de 2 heures avec la Pepsine et d'observer l'influence de la variation des paramètres expérimentaux, sur la teneur en protéines et en composés lipidiques. En effet, les conditions d'hydrolyse adoptées dans la première partie de ce travail ont été définies selon un substrat modèle, l'hémoglobine.

I.5.3.2 Principe

Au début du siècle dernier, les problèmes multifactoriels sont devenus très nombreux dans des domaines aussi variés que la recherche, le développement, l'agriculture ou l'industrie. Un problème à 15 variables prenant chacune trois valeurs, nécessitait 14.348.907 expériences. C'est ainsi que le mathématicien Ronald. A. Fisher a mis au point en 1935, la méthodologie des plans d'expériences, qui permet de réduire considérablement le nombre d'expériences à réaliser tout en garantissant un haut niveau de fiabilité des résultats. 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 but étant de proposer un plan d'essais, permettant d'obtenir le résultat le plus précis possible, à nombre d'essais donné (Demonstant 1996).

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.

Le type de plan d'expérience utilisé dans ce travail est un plan factoriel centré composite, avec comme modèle associé les surfaces de réponse (Figure II.10). Ces plans possèdent comme objectif de « trouver un optimum » et 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.

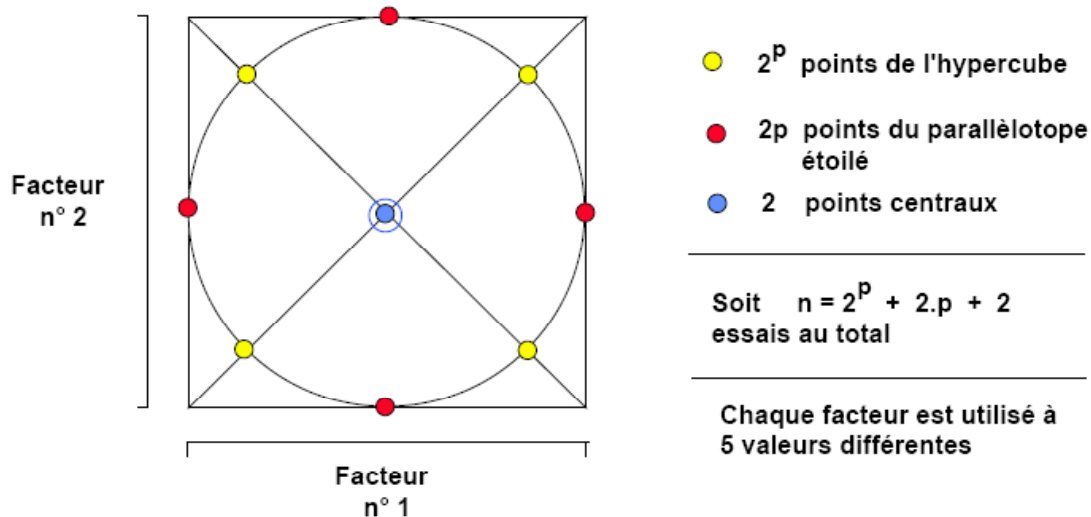


Figure II.10: Représentation d'un plan central composite (Davies 1985)

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 (Kempthorne 1952). 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 al. 1994). Le calcul des niveaux des facteurs est indiqué dans le Tableau II.4

I.5.3.3 Montages et conditions opératoires

Etant donné le nombre important de points de la matrice (20 points) et afin de réaliser le maximum de réactions d'hydrolyse dans un minimum de temps, les hydrolyses ayant en commun une même température et une même durée ont été regroupées par 2. Un montage en série de deux réacteurs a été nécessaire pour conduire deux hydrolyses en même temps (Figure II.11).

Tableau II.4 : Calcul du niveau des facteurs utilisés pour la réalisation des plans d'expériences.

Niveaux	Valeurs réelles
$-\alpha$	<i>Min</i>
-1	$\frac{Min+Max - 1}{2} \alpha \left[Max \frac{Min+Max}{2} \right]$
0	$\frac{Min+Max}{2}$
+1	$\frac{Min+Max + 1}{2} \alpha \left[Max \frac{Min+Max}{2} \right]$
$+\alpha$	<i>Max</i>

Dans notre cas, α est égale à 2.

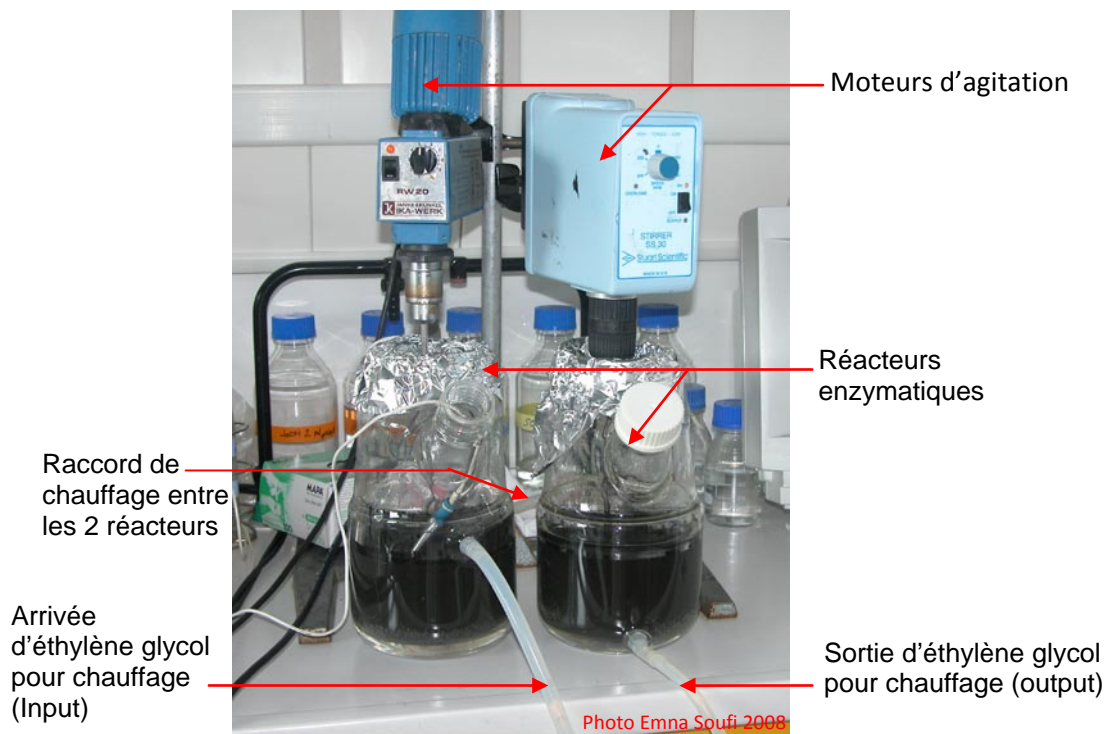


Figure II.11: Montage en série réalisé pour le plan d'expérience

I.5.3.4 Paramètres étudiés

Comme cité précédemment, 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, les variables quantitatives étudiées sont la concentration en enzyme, la température, la durée d'hydrolyse et le volume d'eau. Le Tableau II.5 indique les conditions utilisées pour mailler le domaine expérimental utilisé pour l'optimisation des viscères de seiche et 20 points expérimentaux ont été définis dans notre matrice. Pour des considérations de logistique et d'installations au laboratoire, nous avons centré notre matrice autour de la température. De cette manière, il était possible de réaliser deux hydrolyses par jour en montant deux réacteurs en série et en travaillant donc à la même température pour les deux réacteurs.

Tableau II.5 : Matrice expérimentale de l'hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine concernant la durée de l'hydrolyse, la température et la concentration en enzyme et le volume d'eau.

Numéro de l'expérience	Temps d'hydrolyse (min)	Température (°C)	Volume d'eau (ml)	ratio E/S % (p/p)
1	-2	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	-1
5	-1	-1	-1	+1
6	+1	-1	-1	+1
7	-1	-1	+1	+1
8	+1	-2	+2	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	-1	+1	-2	-2
12	+1	+1	-1	-1
13	-1	+1	+1	-1
14	+1	+2	+1	-1
15	-1	+1	-1	+1
16	+2	+1	-1	+1
17	-1	+1	+1	+1
18	+1	+1	+1	+2
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
Niveau des variables	Temps d'hydrolyse (min)	Température (°C)	Volume d'eau (mL)	ratio E/S % (p/p)
-2	10	30	0	0
-1	97,5	37,5	0,5	0,15
0	185	45	1	0,3
+1	272,5	52,5	1,5	0,45
+2	360	60	2	0,6

Après avoir conduit ces hydrolyses, différentes réponses sont étudiées : la quantité de lipides recueillie (fraction huileuse + fraction soluble + culot) la quantité de protéines dans la fraction soluble, la concentration en acides aminés essentiels et l'activité antimicrobienne des peptides. Les données obtenues sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Statgraphic 5 (Magnugistic, USA).

II. FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

Les hydrolysats utilisés dans toute cette partie de l'étude sont ceux issus de l'hydrolyse pendant 2 h avec la Pepsine.

II.1 FRACTIONNEMENT PAR LA CHARGE : CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'IONS

II.1.1 Objectifs

Ayant décelé une activité antibactérienne dans l'hydrolysat Pepsique, nous avons décidé de purifier les protéines de l'hydrolysat en effectuant une extraction sur phase solide (SPE) et de déterminer les profils peptidiques de la fraction active ce qui nous renseignera sur la taille des molécules et le seuil de coupure à choisir pour les fractionnements sur membranes. A part la concentration de l'activité antibactérienne, la chromatographie échangeuse d'ions nous permettra également de déterminer si cette dernière est présente dans la fraction anionique ou cationique.

II.1.2 Purification par extraction solide-liquide sur les colonnes SPE Chromabond®

II.1.2.1 Procédure et principe de fonctionnement

Le but de cette étape est de savoir si les peptides antimicrobiens présents dans notre hydrolysat protéique sont anioniques, cationiques ou neutres. Dans le cas de l'étude, l'utilisation de l'extraction sur phase solide présente trois objectifs :

- préparer des échantillons pour l'analyse en chromatographie sur gel de filtration.
- Concentrer l'activité biologique à analyser.
- Eliminer les substances interférentes.

Pour cela, quatre étapes principales étapes sont nécessaires (Figure II.12) :

a) Conditionnement :

Avant de déposer l'échantillon, l'étape de conditionnement est nécessaire afin d'assurer des interactions reproductibles avec l'analyte et a pour but d'éliminer des espèces interférentes potentiellement recouvertes lors de l'étape d'élution, et de préparer le polymère à recevoir l'échantillon. Le conditionnement consiste à imprégner l'adsorbant et à produire ainsi un environnement convenant à l'adsorption de l'analyte.

b) Dépôt de l'échantillon (adsorption):

L'échantillon est pressé ou aspiré à travers la phase solide et les molécules sont enrichies sur l'adsorbant. Les composés interférants et les molécules du solvant (matrice) ne sont pas retenus. Seuls les composés intéressants de notre produit sont retenus par échange d'ions.

c) Lavage de l'adsorbant :

Les interférants restants sont éliminés de la phase en utilisant une solution de lavage. Une solution de lavage peut être un mélange hydro-organique ou un solvant aprotique (acétonitrile) dopé en modificateur polaire et protique tel qu'un alcool, un acide ou une base (acide acétique, ammoniac, diéthylamine). Lorsque le mélange de lavage est constitué majoritairement du solvant porogène, la reconnaissance des molécules ciblées est favorisée. Le tableau I.6 reporte les différentes interactions mises en jeu entre les espèces en solution et le polymère ainsi que les solvants compétiteurs.

Tableau I.6: Nature des solvants compétiteurs.

Interaction	Composition des solutions de lavage
hydrophobe	tout solvant organique
dipôle-dipôle	acétonitrile, dichlorométhane, tétrahydrofurane, chloroforme
liaison hydrogène	chloroforme, méthanol, acétonitrile – acide acétique, eau
ionique	acide (acide acétique) ou base (ammoniac ou diéthylamine) dans un solvant dissociant (acétonitrile ou méthanol)

d) L'élution :

L'étape d'élution doit permettre d'obtenir un bon recouvrement des molécules recherchées avec un volume de solvant percolé le plus faible possible. Finalement, les analytes sont éliminés de l'adsorbant par élution avec un solvant approprié. Ainsi, l'étape d'élution est efficace en présence d'un solvant organique polaire auquel peuvent être ajoutés de l'eau ou un modificateur de nature acide ou basique (acide acétique ou triéthylamine). Cette étape ne doit pas se faire très rapidement et la vitesse d'élution dépend de la dimension de la colonne et de la quantité de l'adsorbant.

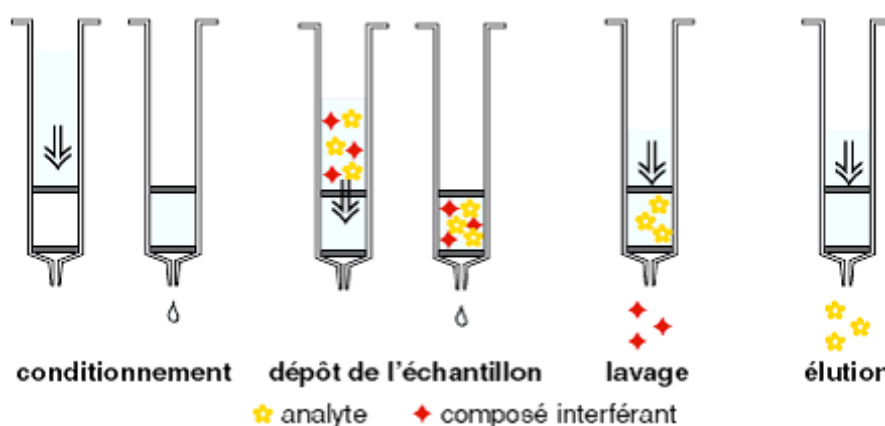


Figure II.12 : Principales étapes de fonctionnement des colonnes CHROMABOND®

II.1.2.2. Equipement et supports d'extraction solide-liquide

Les colonnes utilisées dans le cadre de ce travail sont des cartouches CHROMABOND® (Macherey-Nagel, France) en polypropylène et dont la phase stationnaire (adsorbant) est à base de silice et est retenue par deux frittés en polyéthylène. Les solutions sont percolées à travers la phase stationnaire par gravité ou par aspiration (Figure II.13). Des réservoirs dotés d'embouts de seringue à leurs deux extrémités permettent la percolation des solutions par surpression, avec un débit constant.

Etant donné qu'il s'agit d'un principe d'échange d'ions, deux types de colonnes, l'une cationique (SA ou SCX : strong cation exchange), l'autre anionique (SB ou SAX : strong anion exchange) ont été nécessaires. Les caractéristiques des colonnes sont mentionnées dans le tableau I.7.

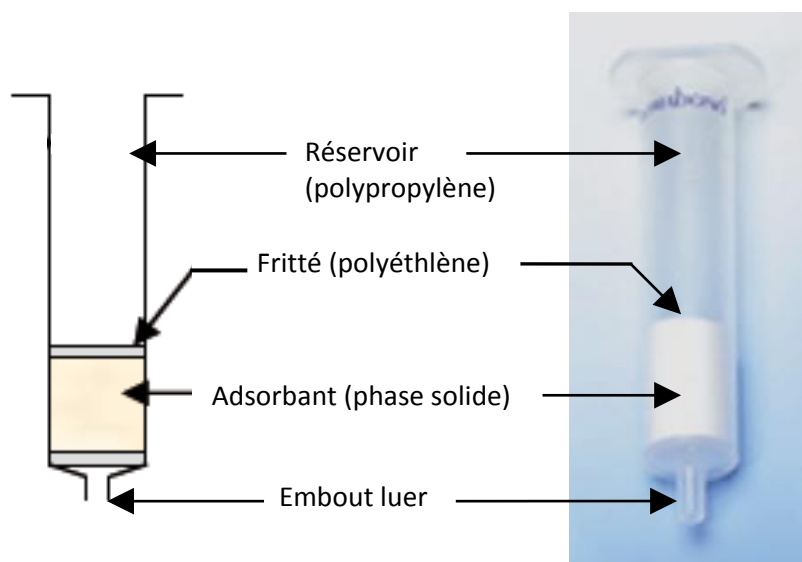


Figure II.13: Principaux composants d'une colonne SPE

Tableau II.7 : Caractéristiques des colonnes SPE utilisées selon le fabricant

Colonnes SPE	SCX (SA)	SAX (SB)
Composition de l'adsorbant	Acide benzènesulfonique à base de silice	Ammonium quaternaire à base de silice
Propriété	Echangeur de cations	Echangeur d'anions
Taille des pores	60 Å	60 Å
Taille des particules	45 µm	45 µm
Surface spécifique	500 m ² /g	500 m ² /g
Stabilité de pH	2 à 8	2 à 8
Capacité d'échange	~ 0.9 meq/g soit 0,45 mmol de molécules basiques	~0.6 meq/g soit 0,3 mmol de molécules acides
Volume	6 mL	6 mL
Poids de l'adsorbant	1000 mg	1000 mg

Dans notre cas, du fait que les volumes des échantillons à traiter sont faibles, plusieurs extractions et donc colonnes SPE devaient être traitées simultanément, de façon automatisée et à cadence rapide. Nous avons donc utilisé une chambre à vide Supelco Visiprep™ (Sigma-Aldrich, France) à 12 puits. Une pompe à vide SUE 300 (Heto, Danemark) est branchée au dispositif et les colonnes SPE sont placées verticalement (Figure II.14).



Figure II.14: Montage effectué au labo pour l'extraction solide-liquide simultanée des échantillons

II.1.2.3 Mise au point d'un protocole expérimental

Le but de ce protocole est la mise au point d'une méthode pour l'extraction sélective et la concentration des molécules antibactériennes présentes dans l'hydrolysate.

II.1.2.3.1 Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon est une étape déterminante pour le bon déroulement de la séparation sur colonnes SPE échangeuses d'ions. L'échantillon est constitué du surnageant recueilli suite à l'hydrolyse de 2 heures avec la Pepsine. Durant tout le reste du manuscrit, et pour des raisons pratiques, l'échantillon sera appelé hydrolysate. Un volume de 20 mL est recentrifugé (7000 g, 10 min) puis passé sur verre fritté (pore 3) afin d'éliminer toutes les particules en suspension. Avant dépôt sur la colonne SPE, le pH doit être supérieur à 2. Dans notre cas, étant donné que l'hydrolyse a été réalisée en milieu acide (pepsine, pH2) le pH est de 2,25 et donc il n'y a pas eu besoin de réajustement.

II.1.2.3.2 Procédure SPE

Les différentes étapes de la procédure SPE sont reportées dans le tableau II.8 Le protocole SPE est réalisé sur un module d'extraction sous vide à 12 voies Visiprep (Supelco, Sigma-Aldrich, France) (Figure II.15). Ci-dessous le déroulement du protocole expérimental établi.

Tableau II.8: Principales étapes et compositions des mélanges du Protocole SPE

Etape	SCX	SAX	Volume (mL)
	Phase mobile	Phase mobile	
Conditionnement	1) MeOH	1) MeOH	12
	2) H ₂ O	2) H ₂ O	12
Dépôt	Hydrolysats	Fraction cationique	20
Lavage	C ₂ H ₄ O ₂ / H ₂ O	NH ₄ OH/H ₂ O	12
Elution 1	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	12
Elution 2	MeOH/C ₃ H ₆ O + 20% C ₂ H ₄ O ₂	MeOH/ C ₃ H ₆ O + 20% NH ₄ OH	2 x 12

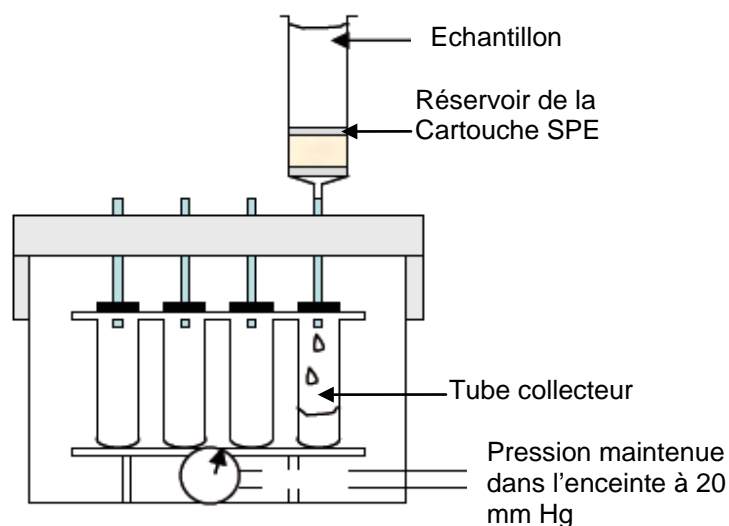


Figure II.15: Processus d'extraction en phase solide dans l'enceinte sous vide

* **Colonnes SCX, échangeur cationique fort:**

1- Conditionnement : avec 12 mL de méthanol + 12 mL d'eau MilliQ. Il est important de noter que les colonnes sont ramenées à ras mais ne jamais complètement à sec sous peine d'altérer la phase adsorbante.

2- Dépôt de l'échantillon : il s'agit de l'hydrolysats, préalablement préparé et directement sur les colonnes cationiques (SCX) et récupération dans des tubes collecteurs (Figure) → **fraction 1**

3- Lavage : avec 12 mL d'un mélange d'acide acétique/eau (5/95 ; v/v) et récupération de dans des tubes collecteurs → **fraction 2**

4- Elution 1: avec 12 ml d'un mélange méthanol/eau (20/80 ; v/v) → **fraction 3**

Les fractions **1, 2** et **3** sont transvasées dans le même bécher pour être évaporées et passées sur l'échangeur anionique (SAX).

5- Elution 2 : avec 2 x 12 mL d'un mélange méthanol/acétone (1/1 ; v/v), + 20% acide acétique et récupération des composés cationiques en ramenant la colonne à ras → **fraction cationique** → concentration par évaporation et pesée.

6- Evaporations : les fractions dépôt, lavage et élution (**fractions 1, 2 et 3**) sont transvasées dans le même ballon pour être évaporées au rotavapor. Les résidus (composés cationiques) sur les parois du ballon sont récupérés dans 20 mL d'eau MilliQ et le pH est réajusté à 11 pour être passés sur la colonne échangeuse d'anions (SAX). La **fraction cationique** est également évaporée, pesée et récupérée dans 1 mL d'eau MilliQ.

La fraction cationique est conservée pou des analyses ultérieures.

*** Colonnes SAX, échangeur anionique fort:**

1- Conditionnement : avec 12 mL de méthanol + 12 mL d'eau MilliQ.

2- Dépôt de l'échantillon : il s'agit des sorties des éluats des la colonne cationique issues de l'étape 4 (fractions 1, 2 et 3) → **fraction 4.**

3- Lavage : avec 12 mL d'un mélange eau/NH₄OH (95/5 ; v/v) et récupération de dans des tubes collecteurs → **fraction 5.**

4- Elution 1 : avec 12 ml d'un mélange méthanol/eau (20/80 ; v/v) → **fraction 6**

Les fractions 4, 5 et 6 constituent **la fraction non retenue (NR).**

5- Elution 2 : avec 2 x 12 ml d'un mélange méthanol/acétone (1/1 ; v/v) + 20% NH₄OH et récupération des composés anioniques en ramenant la colonne à ras → **fraction anionique** → concentration par rotavapor et pesée.

6- Evaporations : la fraction contenant les composés anioniques et la fraction NR sont évaporées et les composés récupérés dans 1 mL d'eau MilliQ.

La fraction anionique et NR sont conservées à -20°C pour les analyses ultérieures.

II.2 L'ULTRAFILTRATION : FRACTIONNEMENT PAR LA TAILLE

II.2.1 Objectifs

L'objectif de cette partie est de montrer l'intérêt des procédés de filtration membranaire dans l'amélioration de la composition du produit final en peptides, lipides. Le but est également de rechercher la fraction la plus intéressante du point de vue des activités antimicrobiennes. La figure II.16 résume les différentes étapes de cette partie.

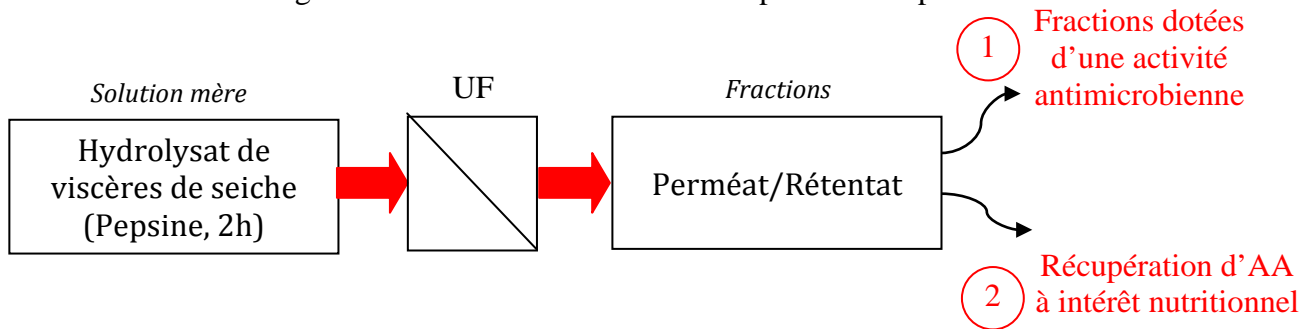


Figure II.16 : Diagramme montrant les introns et les exons des différents procédés de traitement.

Cette étude a été divisée en trois parties :

1 – Essais préliminaires : Fractionnement à petite échelle

Nous avons choisi de commencer à cette dimension afin d'investiguer l'influence des caractéristiques des membranes et des conditions opératoires sur la sélectivité et le fractionnement, c'est-à-dire la capacité à isoler des classes peptidiques possédant un poids moléculaire bien défini. Cette première phase d'essais préliminaires a porté sur :

- La caractérisation et le choix des membranes : il s'agit d'étudier le comportement de l'hydrolysate avec le matériau constituant la membrane afin d'évaluer les potentialités de colmatage.
- Le choix du seuil de coupure : il s'agit d'évaluer les rendements du fractionnement des hydrolysats de viscères de seiche en analysant biochimiquement le perméat et le rétentat et d'étudier l'effet de la sélectivité de la membrane sur la distribution en poids moléculaire du perméat et du rétentat et sur l'activité antimicrobienne.
- L'influence des conditions opératoires et de la distribution en poids moléculaire sur la composition biochimique des fractions membranaires et la capacité antimicrobienne de ces dernières.

Cette première partie à échelle de laboratoire nous a donc permis de choisir la membrane adéquate selon le type de notre substrat et de définir les conditions opératoires en fonction des analyses biochimiques, de la distribution du poids moléculaire et de l'activité antimicrobienne dans les fractions membranaires recueillies.

2 – Fractionnement à échelle pilote

Le fractionnement de l'hydrolysate des viscères de seiche en conditions proches de celles d'un niveau industriel a été réalisé dans le but d'évaluer l'effet du passage à grande échelle et des conditions opératoires (pression, FRV) sur la composition précédente (obtenue à petite échelle) des fractions réténat et perméat ainsi que la conservation de l'activité antimicrobienne.

3 – Etude du changement d'échelle

La partie fractionnement sur membranes se termine par une étude préliminaire à la conception d'un procédé industrialisable intégrant hydrolyse enzymatique et fractionnement membranaire et permettant d'aboutir à un hydrolysate bioactif commercialisable. Cette étude comporte deux phases :

- Une phase d'identification des opérations unitaires et des technologies envisageables dans un tel procédé.
- Une phase d'étude de la faisabilité technico-économique des différentes opérations

II.2.2 Essais préliminaires : ultrafiltration à l'échelle de laboratoire

L'objectif de cette étude est de trouver une membrane permettant la transmission des peptides, la concentration des lipides et la présence d'une activité antimicrobienne élevée, avec un colmatage minimum. Afin de trouver le meilleur seuil de coupure et matériau, des tests préliminaires sont réalisés à l'aide d'un petit pilote d'UF.

Deux types d'échantillons sont utilisés pour cette analyse, il s'agit des hydrolysats 60 min et 120 min (en fonction du temps de prélèvement). Le but de ce choix étant de déterminer si oui ou non le temps d'hydrolyse influe sur le fractionnement membranaire, ainsi que sur la nature des espèces présentes dans le perméat et le concentrat.

II.2.2.1 Equipement

Ces essais ont été réalisés avec la petite unité de 50 mL (Amicon® Stirred Cell) fournie par la société Millipore. Cette petite unité de filtration est composée du corps de la cellule, contenant le liquide à filtrer ; d'une base, d'un support servant au maintien et à l'insertion de la membrane ; d'un joint de fixation de la membrane ; d'un système d'agitation magnétique formé d'une tige et d'un barreau aimanté ; d'un assemblage assurant la pressurisation du système à pression constante et enfin d'un support de filtration (Figure II.17).

Les membranes utilisées sont de forme en disques en Cellulose Régénérée (CR) ou en PES modifié (PolyEtherSulfone). Ce matériau est spécialement 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).

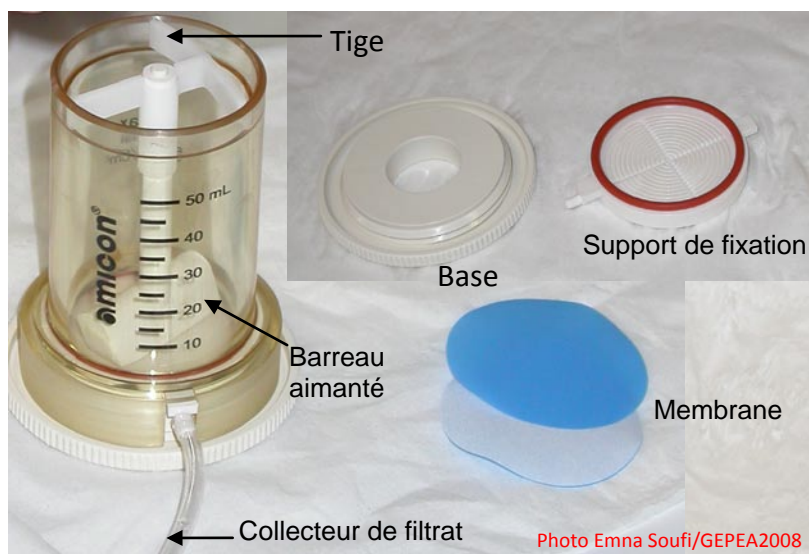
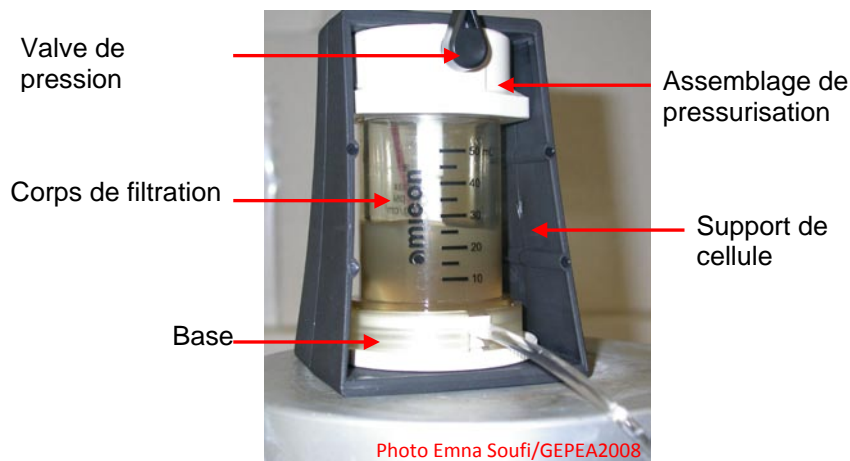


Figure II.17: Eléments composant l'unité de filtration Amicon®

Dans ce travail, nous avons utilisé les deux types de matériaux avec différents seuil de coupure, 1; 5; 10 ; 30 et 100 kDa pour la cellulose régénérée et 5 et 30 kDa pour PES. Le mode de filtration consiste en une filtration frontale. Les principales caractéristiques de cette petite unité de laboratoire sont données dans le Tableau II.9. Une installation adéquate a été réalisée au laboratoire (GEPEA de Saint-Nazaire, Centre de Recherche et de Transfert de Technologie). La petite unité est installée sur une plaque magnétique pour l'agitation et raccordée à une arrivée d'air comprimé pour la pressurisation du système. La cellule est placée en hauteur par rapport au contenant récupérant le perméat afin de faciliter l'écoulement de ce dernier (Figure II.18).

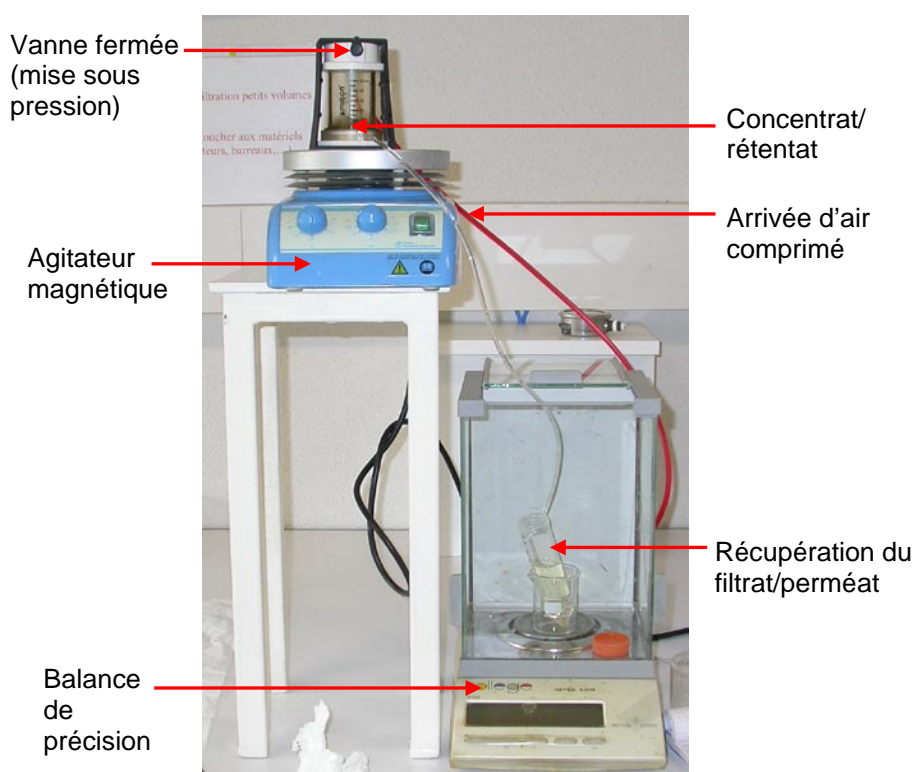


Figure II.18 : Installation au laboratoire du système de filtration Amicon®

Tableau II.9 : Caractéristiques du pilote Amicon®

Matériau de filtration	PES modifié	Cellulose régénérée
Surface membranaire utile	13,4 cm ²	13,4 cm ²
Pression maximale	4,82 bar	4 bar
Plage de pH	1 -14	1 -14
Température limite	65°C	50°C

II.2.2.2 Mode opératoire

Des flux à l'eau sont réalisés avant et après le passage de l'échantillon afin d'estimer la facilité de régénération des membranes et le facteur colmatage. Après hydrolyse, 40 mL de surnageant sont prélevés et introduits dans les cellules de filtration. Lorsque le système est installé, l'agitation magnétique est activée et une pression de 2 bar est exercée, amorçant la filtration. Le perméat est recueilli et le débit de perméat est calculé. L'ultrafiltration est arrêtée lorsque le volume perméat atteint 30 mL (FRV = 4). Le perméat et le rétentat sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à ce que les analyses biochimiques soient effectuées. La température initiale, prise à l'intérieur du produit est en moyenne de 22°C et celle finale, est de $25,2^{\circ}\text{C}$ pour le concentrat et $23,4^{\circ}\text{C}$ pour le perméat.

II.2.3 Ultrafiltration à l'échelle pilote

Les essais de filtration en conditions représentatives d'un fonctionnement industriel ont été menés sur le pilote UF/NF Microlab 40 (VMA Industrie, France) au CRTT de Saint-Nazaire (laboratoire GEPEA). Cette étape est réalisée après les résultats des analyses obtenus sur le perméat et le concentrat issus des essais en laboratoire à petite échelle.

Pour réaliser la filtration une autre hydrolyse de 2 h avec Pepsine sur le réacteur de grande taille a été nécessaire de façon à avoir des quantités suffisantes de surnageant. Après centrifugation, le surnageant est clarifié sur fritté ($n^{\circ}3$) avant passage en ultrafiltration. En effet, même après centrifugation, des petites particules de mélanine en agrégation (dus à la présence de l'encre) restent toujours en suspension dans le surnageant clair.

II.2.3.1 Equipement

Le pilote Microlab 40, représenté dans la figure II.19, est composé d'une cuve d'alimentation d'une capacité de 5 L. La pompe tripiston (b) permet d'atteindre la pression maximale de 42 bar, alors que la pression minimale de fonctionnement du pilote est de 10 bars. Un échangeur de chaleur (d) relié à un groupe froid (e) permet de maintenir la température constante. Le perméat est collecté dans une éprouvette posée sur une balance de précision reliée à un ordinateur (Figure II.20). Ce système d'acquisition des données permet d'obtenir les flux de perméation ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) en fonction du temps.

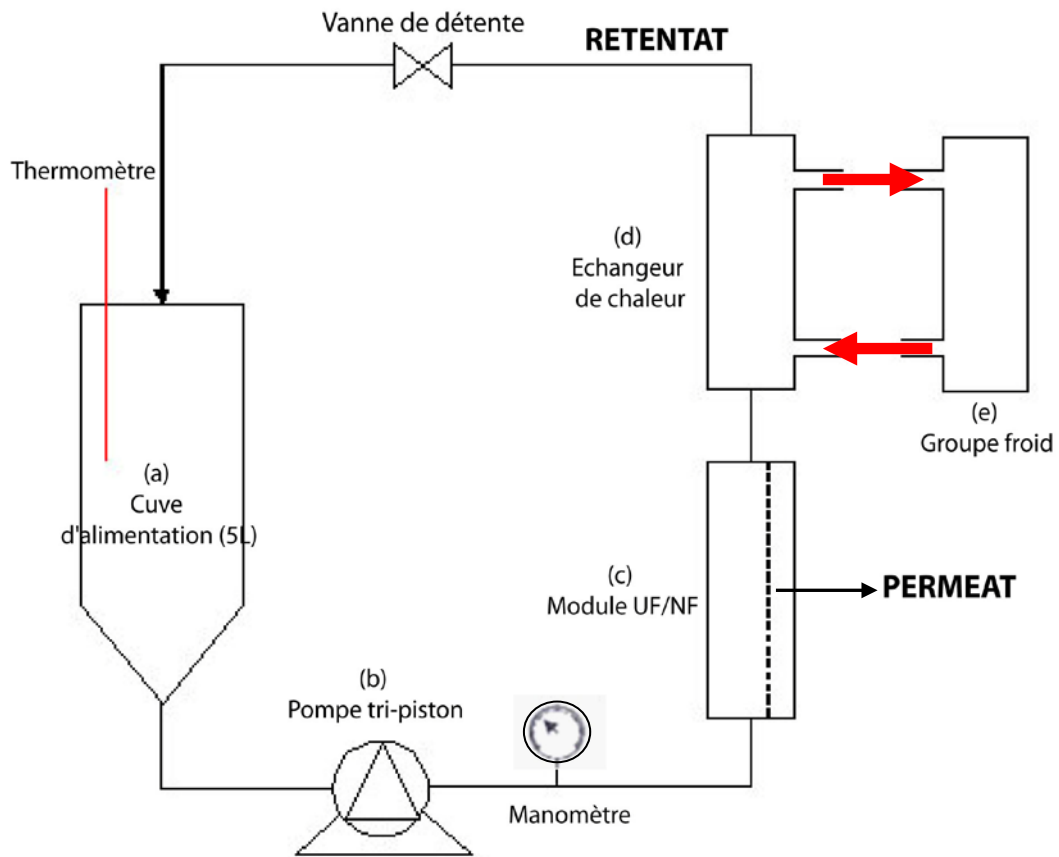


Figure II.19: Photo et schéma de principe du pilote de filtration UF/NF Microlab 40 (VMA)



Figure II.20: Installation du pilote et système d'acquisition des données

II.2.3.2 Caractéristiques des membranes utilisées

Deux membranes film composite ½ pouce tubulaires en PES (XP 117 et MT 404) ont été testées dans cette partie de l'étude et sont fournies par PCI (France). Leurs caractéristiques sont représentées dans le tableau II.10. Comme pour les essais précédents, le matériau utilisé ici (PES) est spécialement développé pour avoir une faible affinité avec les protéines (Vandanjon et al. 2004 - Chabeaud 2008), une sélectivité et une résistance chimique élevées avec de hauts débits et rendements. Le seuil de coupure auquel cette étape a été réalisée est celui déterminé lors de l'étape préliminaire. Un axe en téflon a été installée à l'intérieur de la membrane de façon à augmenter la vitesse linéaire ($v = 2,5 \text{ m.s}^{-1}$; $Re = 13\ 800$).

II.2.3.3 Nettoyage des membranes

Avant chaque essai d'ultrafiltration et après chaque utilisation, les membranes sont soumises à une procédure de nettoyage suivante :

- 1- Rinçage à l'eau distillée.
- 2- Nettoyage basique par recirculation d'une solution composée d'Ultrasil 11 à 3g/l pour XP 117 et Ultrasil 11 à 10 g/L et ce pendant 30 min à 45°C à 10 bar pour les deux membranes.
- 3- Rinçage à l'eau distillée.
- 4- Nettoyage acide par recirculation d'une solution d'acide nitrique (HNO₃) 3mL/L pendant 20 min à 30°C et à 15 bar pour les deux membranes.
- 5- Rinçage à l'eau distillée.

Tableau II.10: Caractéristiques des membranes utilisées

Membrane	MT 44 – ES 404	XP 117
Matériau	PES	PES
Seuil de coupure	1000 à 4000	5000
Surface membranaire utile (m ²)	0,0033	0,033
Pression de référence (bar)	15	15
Pression maximale (bar)	25	30
Température maximale (°C)	60	80
Gamme de pH toléré	2 - 12	2 - 11
Produits de nettoyage basique préconisés	Ultrasil 10 ou Ultrasil 11 à 10g/L	Ultrasil 10 ou Ultrasil 11 à 3g/L
	NaOH 5g/L + SDS 2g/L	NaOH 1g/L + SDS 2g/L
	NaOH 5g/L + Na ₂ S ₂ O ₅ 2g/L	NaOH 1g/L + Na ₂ S ₂ O ₅ 2g/L
	Ultrasil 10 ou Ultrasil 11 à 10 g/L + NaOCL à 200 ppm de chlore libre	Ultrasil 10 ou Ultrasil 11 à 3g/L + NaOCL à 200 ppm de chlore libre
Produits de nettoyage acide préconisés	NaOH 5g/L + NaOCL à 200 ppm de chlore libre	NaOH 1g/L + NaOCL à 200 ppm de chlore libre
	NaOH à pH10 + H ₂ O ₂ 130 volumes à 3g/L	NaOH à pH10 + H ₂ O ₂ 130 volumes à 1mL/L
Produits de nettoyage acide préconisés	HNO ₃ à 3g/L ou UL 75 à 0,5% ou H ₃ PO ₄ à 2g/L	

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 II.11.

Tableau II.11 : Caractéristiques des solutions de nettoyage pour des membranes en PES.

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 choisies de façon à respecter les éventuelles applications des fractions résultantes de la filtration (agroalimentaire, nutraceutique...). Ainsi, seules des solutions de nettoyage alcalines et acides ont été utilisées. Les conditions préconisées pour ces solutions sont reportées dans le Tableau II.12.

Tableau II.12 : Conditions requises pour le nettoyage de la membrane d’ultrafiltration selon les agents colmatants.

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

II.3.4 Les conditions d’ultrafiltration

La cuve d’alimentation du pilote Microlab 40 est remplie avec 4 L de la solution à filtrer (hydrolysat 2 h avec Pepsine), d’une teneur en protéines de 45 g.L⁻¹. La température est de 25°C et la pression de 5 bar pour les deux essais. La pression minimale requise pour ce pilote a été choisie pour les essais de filtration de l’hydrolysat car on voulait se placer exactement dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la petite unité Amicon® et ce afin de pouvoir comparer les deux procédés et établir une procédure de changement d’échelle. Les flux de perméation sont mesurés jusqu’à l’obtention d’un facteur de réduction volumique (FRV) égal à 4 (valeur nous paraissant réaliste d’un point de vue industriel), le FRV étant défini comme le volume solution initial sur le volume de rétentat à l’instant t :

$$FRV = \frac{V_0}{V_t} \quad \text{(Equation II.6)}$$

avec : V_0 : volume initial de l’hydrolysat

V_r : volume de rétentat à l’instant t

II.3.5 Performance des membranes

II.3.5.1 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 II.7). 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 II.8).

$$\text{Perméabilité à l'eau} = \frac{\text{Flux de perméat}}{PTM} \quad \text{(Equation II.7)}$$

$$\text{Taux de régénération} = \frac{\text{Perméabilité à l'eau après nettoyage}}{\text{Perméabilité initiale}} \quad \text{(Equation II.8)}$$

Après chaque utilisation, les membranes sont nettoyées selon la procédure recommandée par le fabricant. Le flux à l'eau est mesuré soit après une procédure complète (J_n), soit après chaque étape de nettoyage basique et acide. La nettoyabilité désigne la capacité de la membrane à être régénérée après filtration d'une solution d'hydrolysate. Elle peut s'exprimer comme le pourcentage de flux récupéré après nettoyage de la membrane (Rabiller-Baudry et al. 2000) :

$$\text{Nettoyabilité} = 100 \times \frac{J_n}{J_0} \quad \text{(Equation II.9)}$$

Le flux à l'eau pure (J_0) a été mesuré à 21 °C et à 4 bars pour déterminer la perméabilité initiale de la membrane. 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).

II.3.5.2 Tests d'adsorption statique

Des tests d'adsorption en conditions statiques ont été réalisés après passage de l'hydrolysate afin de déceler d'éventuelles interactions peptides/matériau membranaire pouvant altérer les performances de la membrane (LaPointe 2004). Le test d'adsorption est

effectué en plaçant la membrane en contact avec l'hydrolysate à 4°C pendant 12 heures et ce pour minimiser le risque de contamination microbiologique. La membrane est ensuite abondamment rincée à l'eau distillée afin d'éliminer l'excédent de solution peptidique. Un flux à l'eau pure après adsorption (J_a) est mesuré à 25°C à 15 bars.

L'étendue de l'adsorption est exprimée en termes de réduction du flux de perméation à l'eau avant et après contact avec la solution peptidique :

$$\text{Réduction du flux à l'eau en (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{J_a}{J_0} \right) \quad \text{(Equation II.10)}$$

et de réduction du diamètre des pores selon le modèle de Zeman (1983) :

$$\frac{\Delta_{rp}}{r_p} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{J_a}{J_0} \right)^{0,25} \right) \quad \text{(Equation II.11)}$$

En dernier lieu, la membrane est nettoyée selon la procédure décrite au paragraphe II.3.1.3. Un flux à l'eau après nettoyage (J_n) est mesuré à 25°C et à 15 bars afin d'évaluer la nettoyabilité de la membrane.

III. ANALYSES BIOCHIMIQUES

III.1 LE POURCENTAGE D'HUMIDITE ET DE MATIERE MINERALE

L'objectif de cette analyse est la détermination de la teneur en matière sèche de l'échantillon après évaporation de l'eau ainsi que des matières volatiles. Dans notre cas, la teneur en matière sèche des échantillons a été déterminée de manière gravimétrique en pesant les produits avant et la lyophilisation. Cette dernière ne permet pas l'extraction totale de l'eau de l'échantillon, notamment celle de liaison des molécules. Cependant, la lyophilisation a été une étape indispensable dans notre étude et la non destruction des échantillons en utilisant ce procédé s'est révélée être un atout majeur, vu que les quantités d'échantillons sont généralement très faibles. Nous avons néanmoins estimé l'eau restante dans le produit après lyophilisation en le passant à l'étuve pendant 24 heures à 105°C afin d'éliminer toute trace d'eau, et il s'est avéré que le pourcentage est très faible. De plus, la détermination du

pourcentage d'humidité a été biaisée de façon identique tout au long de l'étude, permettant ainsi une comparaison des échantillons entre eux. Pour la matière première non hydrolysée, le pourcentage d'humidité a été déterminé également en étuve en triplicats. Environ 10 g de matière fraîche sont déposés dans une coupelle. Soit m_1 cette masse. Après séchage à l'étuve à 105°C pendant 24 heures, la coupelle est refroidie dans un dessiccateur (pour éviter la réabsorption d'humidité). Le taux de matière sèche est déterminé de la manière suivante :

$$\% \text{ M.S} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \quad \text{(Equation II.12)}$$

avec : m_0 : masse en grammes de la coupelle vide ;

m_1 : masse en grammes de la prise d'essai ;

m_2 : masse en gramme de la coupelle et la prise d'essai après sortie de l'étuve et à la suite du refroidissement (au moins une heure) au dessiccateur ;

Pour déterminer la matière minérale, l'échantillon est séché, prélevé, repesé et introduit dans un creuset en céramique puis dans un four à moufle réglé à 550°C pendant toute une nuit. A la sortie, le creuset est laissé à refroidir toujours dans un dessiccateur, puis la teneur en matière minérale est déterminée gravimétriquement, de la même manière que la matière sèche.

III.2 ANALYSE DES PROTIDES

III.2.1 Dosage des protéines totales

III.2.1.1 Principe

La teneur en protéines est estimée à partir de la matière azotée par la méthode de Kjeldahl (Crooke 1971). Celle-ci est basée sur la transformation en deux étapes de l'azote aminé contenu dans les matières organiques en azote ammoniacal. L'échantillon est minéralisé à chaud par action de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) en présence d'un catalyseur ($\text{K}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$, 5/2 ; p/p). A la suite de la minéralisation, l'azote protéique est intégralement transformé en sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) et est libéré sous forme d'ammoniac par action de la soude concentrée (NaOH, 10M) durant la distillation. L'ammoniac fixé par l'acide borique est ensuite dosé par l'acide chlorhydrique (HCl, 1M).

Le pourcentage d'azote est donné par la relation :

$$\%N = (1,4 \times V \times [HCl]) / M \quad \text{(Equation II.13)}$$

où V : est le volume de HCl utilisé pour titrer l'échantillon (en mL)

[HCl] : molarité de HCl

M : la masse de la prise d'essai (en g)

Le taux de protides totaux est déterminé en multipliant la quantité d'azote par **6,25** qui est le coefficient de conversion azote-protéine utilisé dans le muscle de poisson (Adler-Niessen 1986).

III.2.1.2 Protocole

Environ 1 g de matière sèche (MS), ou 10 g de matière fraîche (MF), sont introduits dans des matras prévus à cet effet. Une pastille de minéralisation et 20 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés puis les tubes, coiffés de leurs capteurs de fumée sont mis à chauffer progressivement jusqu'à 450°C. Lorsque la solution vire au bleu verdâtre, la minéralisation est arrêtée. Après refroidissement des matras, le contenu est remis en suspension avec 20 mL d'eau milliQ, puis les tubes sont installés dans l'unité de distillation K-314 (BÜCHI) (Figure II.21) avec un erlenmeyer de 250 mL, contenant 20 mL de solution d'acide borique 3% (indicateur coloré).



Figure II.21: Unité de distillation utilisée au laboratoire pour le dosage de l'azote total

La solution est neutralisée avec de la soude 10 M de façon à avoir un volume total de 80 mL puis 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).

III.2.2 Dosage des protéines solubles

III.2.2.1 Principe

La méthode utilisée dans cette étude est celle de Bradford (Bradford 1976). Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur le dosage des acides aminés qui, par réaction d'adsorption avec le bleu de Coomassie G250 forment un complexe stable absorbant à 595 nm. Ce réactif, rouge-brun à l'état libre prend une teinte bleue variant d'intensité en fonction de la teneur en protéines. Le coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible du réactif permet un dosage protéique très sensible. Le choix de cette méthode s'est fondé d'une part sur sa rapidité et d'autre part sur la résistance à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes de dosage colorimétrique. Son principal défaut est sa réactivité très différente face aux diverses protéines.

III.2.2.2 Protocole

La protéine utilisée pour établir la gamme étalon est l'albumine sérique bovine (ou BSA) qui a la particularité de réagir très fort avec le bleu de Coomassie, pouvant ainsi donner des valeurs plus hautes que la réalité. Cependant, nous l'avons choisie pour le fait qu'elle possède une bonne solubilité et que le but de ce test est de comparer les échantillons entre eux. Les résultats sont exprimés en g de protéine eq BSA/ g de matière.

La gamme étalon, réalisée à partir d'une solution-mère de BSA (ampoule) de 2 mg/mL va de 0 à 14 µg/mL. La courbe étalon est réalisée pour chaque microplaque (Figure II.22). Tous les essais sont réalisés en triplicats. Les échantillons lyophilisés sont remis en suspension dans des tubes Eppendorf puis centrifugés à 10000 rpm pendant 10 min de façon à faire précipiter les éléments insolubles. Les surnageants sont ensuite dilués de façon à entrer dans la gamme établie. La longueur d'onde est déterminée avec un spectrophotomètre lecteur de microplaques. Dans chaque puits de la micro-plaque, 5 µL d'échantillons, blanc ou étalons sont déposés puis 250 µL de réactif (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, PIERCE). Le système est laissé à température ambiante pendant une demi-heure, puis l'absorbance de chaque puits est lue au spectrophotomètre à 595 nm.

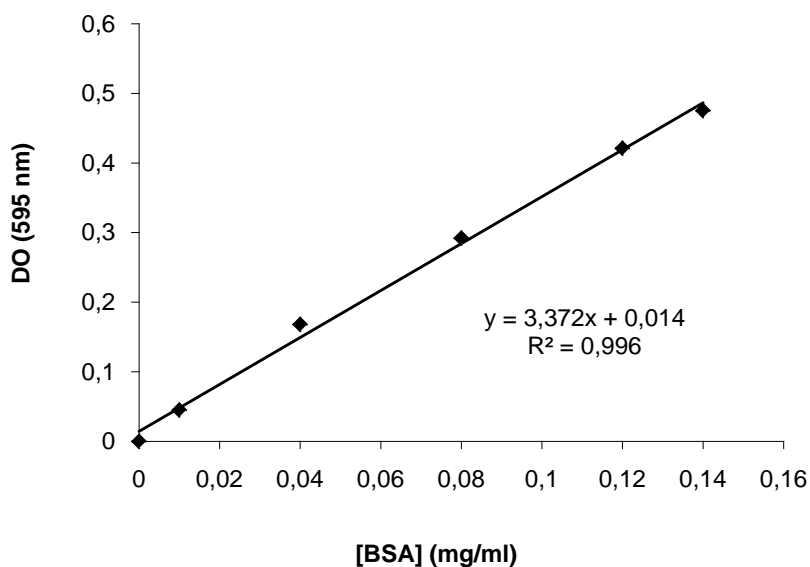


Figure II.22 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Bradford.

III.2.3 Dosage des acides aminés

La composition en acides aminés totaux ainsi que leur concentration dans hydrolysats et la matière brute non hydrolysée a été effectuée selon la procédure EZ : faast™ (Phenomenex®). Cette méthode commence par une étape d'extraction sur une phase solide suivie par une dérivation puis une ultime étape d'extraction liquide/liquide. Les acides aminés ainsi dérivés sous une forme volatile peuvent être séparés et analysés en phase gazeuse. Pour ce faire, il est nécessaire de commencer par une hydrolyse acide des polypeptides et protéines présents dans les produits.

a) Hydrolyse acide :

Dans une ampoule à sceller, environ 10 mg de lyophilisat sont pesés puis 200 µl d'une solution d'acide chlorhydrique (HCL, 6M) sont introduits. Les ampoules sont ensuite scellées hermétiquement à chaud, puis incubées à 110°C pendant 18h. Cette étape permet de libérer les acides aminés liés aux peptides et polypeptides. Une fois, l'hydrolyse terminée, l'acide chlorhydrique restant dans l'ampoule est évaporé sous azote. Deux millilitres et demi d'eau milliQ sont alors introduits dans l'ampoule pour dilution des acides aminés.

b) Extraction en phase solide :

Après homogénéisation, 25 µL de cette solution aqueuse contenue dans les ampoules sont prélevées et transférées dans un microtube en verre et 100 µL d'un réactif 1 y sont ajoutés. L'échantillon dans le microtube est ensuite aspiré à l'aide d'une seringue sur laquelle est adapté un cône contenant un adsorbant ayant pour rôle d'accrocher les acides aminés tout en les purifiant des composés interférents. Dans le microtube, 200 µL d'eau milliQ sont ajoutés, pour éliminer tout ce qui n'a pas été retenu par l'adsorbant. Le cône est enlevé de la seringue et le liquide accumulé dans la seringue est jeté (PHENOMENEX, Badawy et al 2008)

c) Dérivation des acides aminés :

La dérivation permet de prévenir les transformations chimiques des échantillons avant leur analyse en CPG. Il existe deux types de dérivation. La première permet de séparer les groupes fonctionnels (COOH et NH₂) par l'utilisation de différents réactifs alors que la seconde protège ces groupes par l'utilisation d'un seul réactif (Zenkevich, 2005).

Le kit EZ :faast™ utilisé dans ce travail, correspond au premier type de dérivation. Deux cents micro-litres de tampon d'élution (mélange réactifs 3A + 3B du kit EZ:faast™) sont introduits dans le microtube, dans lequel est expulsé la résine adsorbante du cône, contenant les acides aminés. La dérivation de ces derniers est effectuée en rajoutant 50 µL d'un réactif 4 (solution organique) à l'aide d'une pipette Drummond Dialomatic Microdispenser. Après homogénéisation au vortex, l'échantillon et le réactif doivent rester en contact pendant au moins une minute à température ambiante. La solution est de nouveau agitée pour re-émulsionner le contenu du microtube et laissée pendant une minute. Cent microlitres de réactif 5 sont alors ajoutés. Au bout d'une minute de réaction, 100 µL d'un réactif 6 sont finalement introduits. La solution est vortexée et laissée à décanter. Deux phases distinctes sont obtenues, la phase supérieure étant celle contenant les dérivés d'acides aminés ayant migré de façon concomitante.

d) Détermination du profil des acides aminés par CPG-FID :

La phase supérieure contenant les acides aminés dérivés est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur pour analyse en Chromatographie en Phase gazeuse couplée à la détection à l'ionisation de flamme (FID). La détection par FID est l'une des méthodes les plus répandues pour la détection des acides gras et des acides aminés. Après élution en CPG et 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. La Figure II.23 schématise l'acquisition des données pour ce mode de détection.

L'appareillage utilisé en CPG est un chromatographe Auto System Gas Chromatography (Perkin Elmer, France) composé d'une colonne capillaire (phase stationnaire) Zebron ZB-AAA GC Column for Protein Hydrolysates d'une longueur de 10 m et de diamètre interne de 0,25 mm. 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. 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 3 mm 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 reliée à la chambre d'injection par une pré-colonne de 5 m de longueur et 0,32 mm de diamètre interne. Le gaz vecteur circulant à l'intérieur de la colonne est 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 1,72 bar. Les volumes injectés dans le chromatographe peuvent varier de 1,5 à 2 μL . Le programme de température est le suivant : le four est à une température de 110°C puis à 6,56 secondes il augmente de 32°C/min pour atteindre 320°C. La température de l'injecteur est maintenue constante à 250°C et celle du détecteur placé en sortie de la colonne est de 320°C. 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 II.13

Chaque acide aminé de l'hydrolysat possède un temps de rétention différent sur la colonne. Le détecteur fournit pour chacun un signal sous forme de pics. La concentration de chaque acide aminé dans l'échantillon est calculée à partir de l'aire sous la courbe de chacun d'entre eux et par référence à un standard interne. L'arginine et la cystéine ne sont pas quantifiés par cette méthode car elles sont éluées de la colonne avec le « volume mort ».

Tableau II.13 : Programmation des températures pour la CPG-FID.

	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	0,00
	50	2,00
	150	7,00
	230	53,33
	70	53,33
	70	60,00

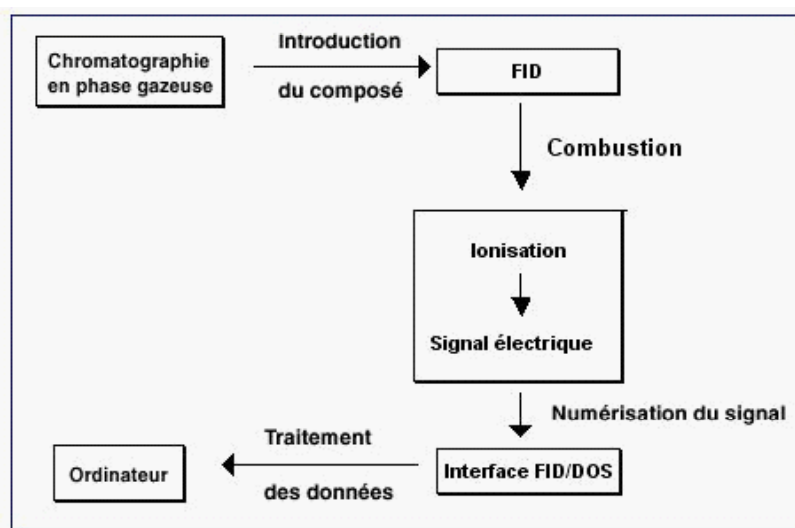


Figure II.23 : Modes de détection FID en chromatographie phase gazeuse.

III.2.4 Profils moléculaires des peptides solubles par chromatographie d'exclusion stérique (SE-FPLC)

III.2.4.1 Principe

La chromatographie d'exclusion stérique, également appelée tamisage moléculaire ou chromatographie de perméation sur gel permet, grâce à une phase stationnaire composée de billes de gel poreux réticulé (13-15 μm) d'agarose et de dextran, la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Les solutés sont élués dans l'ordre inverse des poids moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse molaire. Une calibration de la colonne par des marqueurs de poids moléculaire connus peut donc permettre d'évaluer le poids moléculaire des molécules contenues dans l'échantillon.

III.2.4.2 La chromatographie à moyenne pression

La SE-FPLC (Size Exclusion – Fast Protein Liquid Chromatography) constitue un outil précieux pour le suivi de l'hydrolyse, la caractérisation des hydrolysats produits à l'échelle de laboratoire et à échelle pilote ainsi que pour la vérification de la reproductibilité du procédé.

Toutes les analyses ont été réalisées sur une colonne Tricorn Superdex™ Peptide 10/300 GL (Amersham Pharmacia Biotech) possédant un domaine de fractionnement compris entre 100 et 7000 Da. La pression maximale tolérée est de 300 psi. Le volume total de la colonne est de 24 mL. Les standards injectés pour calibrer la colonne sont les suivants : Leucine – Tyrosine (294 Da), Vasopressine (1084 Da), Insuline chaîne β (3496 Da) et Ribonucléase A (13 700 Da).

La colonne est montée sur un système de chromatographie liquide BioCAD® SPRINT™ (PerSeptive Biosystems) (Figure II.24). Les échantillons (phase soluble de l'hydrolysat) sont d'abord solubilisés dans un tampon NaCl 50 mM contenant 5% d'acétonitrile, 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) constituant la phase mobile d'élution. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 10 000 rpm afin d'éliminer les agrégats insolubles. Le volume d'échantillon déposé est de 200 μ L et le débit d'élution est de 0,5 mL/min. La détection des composés est effectuée par lecture de la densité optique à 214 nm, longueur d'onde correspondant à l'absorbance des liaisons peptidiques. Les données sont ensuite collectées grâce au logiciel Diamir (JMBS software). Afin de déterminer la répartition des peptides élués selon leur masse molaire, les chromatogrammes sont intégrés et l'aire totale sous la courbe est divisée en six classes de poids moléculaires (>7 ; 7-5,5 ; 5,5-3 ; 3-2 ; 2-1 ; 1-0,5 ; 0,5-0,25 ; <0,25 kDa).

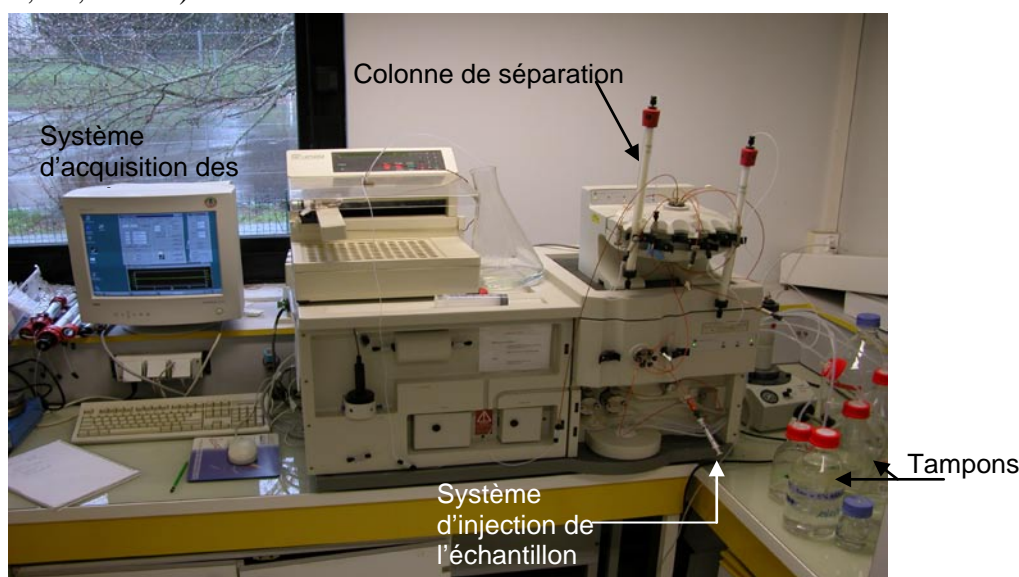


Figure II.24: Chaîne de séparation des poids moléculaires utilisée

III.3 ANALYSE DES LIPIDES

III.3.1 Extraction et dosage des lipides

III.3.1.1 Choix de la méthode

Afin de réaliser le dosage des lipides dans les hydrolysats de viscères de seiche, les méthodes de Folch et al. (1957) et de la RMN ont été utilisées et sur l'ensemble des échantillons.

Dans un premier temps, le choix pour le dosage des lipides a porté sur la méthode RMN vu que nous avons une quantité considérable d'échantillons à analyser et que la méthode RMN possède l'avantage d'être très rapide (temps de mesure très court, moins d'1 minute), non destructive (absence de solvants) et les analyses sont reproductibles. Cependant, le point faible de cette méthode est que les teneurs en lipides ne sont détectées qu'au-delà d'un certain seuil. Ainsi, pour certains de nos échantillons et en particulier les phases insolubles, les taux de lipides étant très faible il était impossible d'obtenir une mesure correcte par RMN, d'où le choix d'une méthode classique faisant appel à une extraction des lipides par un solvant organique, en l'occurrence la méthode de Folch et al. (1957). Par ailleurs, il était nécessaire d'obtenir des extraits lipidiques par cette méthode et de les conserver pour d'autres analyses plus fines des composés lipidiques.

III.3.1.2 Extraction et dosage des lipides totaux par la méthode de Folch

Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch (Folch, 1957). Pour chaque échantillon d'hydrolysat, les extractions ont été réalisées en triplicats et la valeur prise en compte est la moyenne calculée. Cette technique fait appel à une extraction à froid des lipides par un mélange d'un solvant organique, le chloroforme, et d'un alcool, le méthanol avec les proportions suivantes : méthanol/chloroforme (1/2, v/v). Le méthanol a pour but de dissocier les interactions des lipides avec les autres constituants membranaires. L'addition d'une solution aqueuse de NaCl à 0,9% (m/v) favorise l'obtention d'un système biphasique. La phase supérieure composée de méthanol et d'eau contient les composés hydrophiles (glucides et protéines) dont la dissolution est favorisée par la présence du sel alors que les lipides sont dissous dans la phase organique inférieure. Un mélange de solvants est utilisé afin d'extraire la totalité des lipides, des lipides les plus polaires au moins polaires.

Environ 1g d'échantillons secs (fractions lyophilisées) sont d'abord préalablement réhydratés en fonction de leur teneur en eau. La teneur en eau des viscères de seiche avoisinant 80%, 4 volumes d'eau sont ajoutés aux extraits secs. 6,66 volumes de méthanol, solvant polaire, sont ajoutés au système pour une homogénéisation pendant 30 min. Ensuite, 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 ($\Phi=3$), les composés solides non lipidiques et non solubilisés dans le mélange de solvant sont éliminés. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décanter dans laquelle on ajoute 0,2 volumes d'une solution de NaCl (0,9% NaCl ; m/v) (Figure II.25, a). Après agitation et dégazage par ouverture du robinet (Figure II.25, b), l'ensemble est mis à décanter à + 4 °C pendant une nuit à l'obscurité (Figure II.25, c).

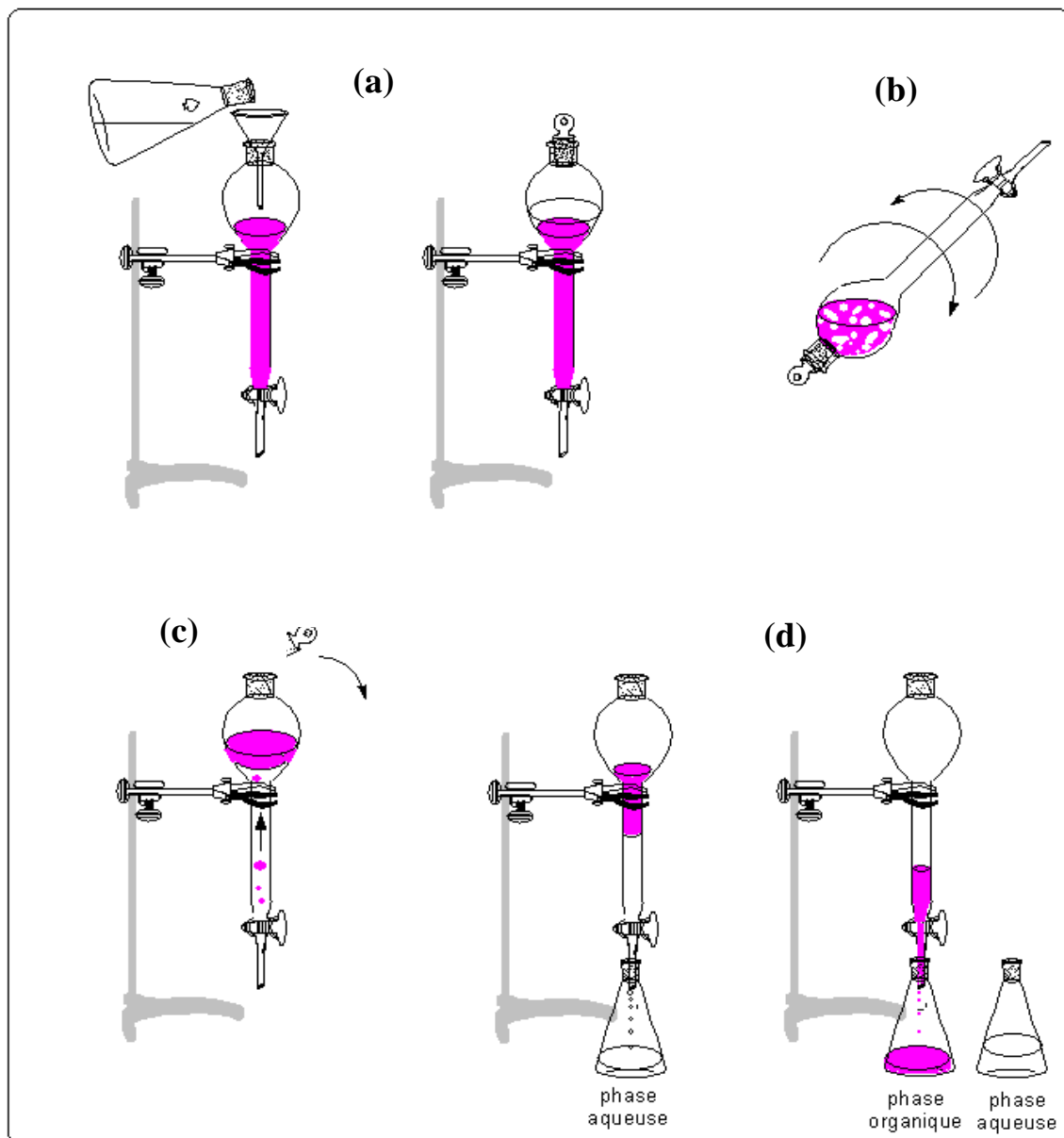


Figure II.25 : Technique d'extraction des lipides par la méthode Folch

Deux phases peuvent être distinguées : la phase organique (inférieure) contenant les lipides neutres (LN), les glycolipides (GL) et les phospholipides (PL) et la phase aqueuse (supérieure) contenant les gangliosides ainsi que d'autres composés solubles non lipidiques (protéines, sucres...) et les lipides très ionisés.

Après séparation complète, la phase organique nous intéressant est récupérée dans des béchers (Figure II.27, d), puis transvasée dans des ballons préalablement tarés puis évaporée sous vide à 35°C à l'évaporateur rotatif (Rotavapor Heidolph 94200 Bioblock Scientific, France – Pompe Ilmvac commercialisée par Avantec) afin d'éliminer grossièrement le solvant. L'extrait lipidique obtenu sur les parois des ballons est passé sous azote pendant 15 min pour éliminer toute trace de solvant, puis repris dans avec un certain volume de chloroforme (entre 15 et 20 mL) en fonction de la masse lipidique obtenue pour la conservation. Il est ensuite transvasé dans des flacons hermétiques en verre opaque lesquels sont stockés à l'abri de la lumière à - 20 °C.

La pesée du ballon contenant l'extrait lipidique après évaporation du solvant à vide permet de calculer la teneur en lipides exprimée par rapport à la matière sèche (g/100 g MS).

III.3.1.3 Dosage des lipides par RMN basse résolution

III.3.1.3.1 Principe du dosage

Le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) concerne le noyau des atomes. Ceux-ci se composent de neutrons non chargés et de protons de charge électrique positive. Le mouvement de rotation de ces charges autour de leur axe (spin) induit un mouvement magnétique. Chacun des atomes peut donc être comparé à un micro-aimant. Le principe de cette méthode d'analyse repose donc sur l'obtention d'un signal électrique suite à l'excitation d'un échantillon par un champs B_1 de fréquence ν_1 égale à, la fréquence de résonance des noyaux d'hydrogène situés dans le champs B_0 . Deux temps dits de relaxation caractérisent le retour à l'équilibre de l'aimantation : un temps de relaxation longitudinale (T1), encore appelé « spin-réseau », et un temps de relaxation transversale (T2), appelé également « spin-spin ».

Le basculement du spin nucléaire donne naissance à un petit courant électrique dans un fil métallique (bobine réceptrice) enroulé autour de l'échantillon. Ce signal par la suite, très amplifié, donne naissance au signal au niveau de l'enregistreur. L'intensité du signal

enregistré est proportionnelle à la quantité d'atomes d'hydrogène dans la région de l'échantillon excitée par le champ de radio-fréquence. Le résultat obtenu peut donc être exploité directement dans le cas de dosages, par exemple.

III.3.1.3.2 Appareillage

L'appareil de RMN utilisé pour les analyses de ce travail est le BRUCKER Minispec PC 120 composé comme suit (Figure II.26) :



Figure II.26 : Appareil RMN Minispec PC 120 utilisé

L'unité de contrôle magnétique est dotée d'un aimant créant un champ magnétique statique interne $B_0 = 0,47$ Tesla. Le générateur de champ de radiofréquences (20 MHz) crée un second champ magnétique B_1 . L'émission de l'énergie de l'échantillon est détectée par un récepteur. Les deux dernières fonctions décrites sont assurés par une bobine d'axe perpendiculaire au champ principal. En effet, le champ de radiofréquence et les signaux enregistrés sont très petits par rapport à B_0 . La mesure ne peut donc se faire que dans un plan où ce champ est nul (Figure II.27).

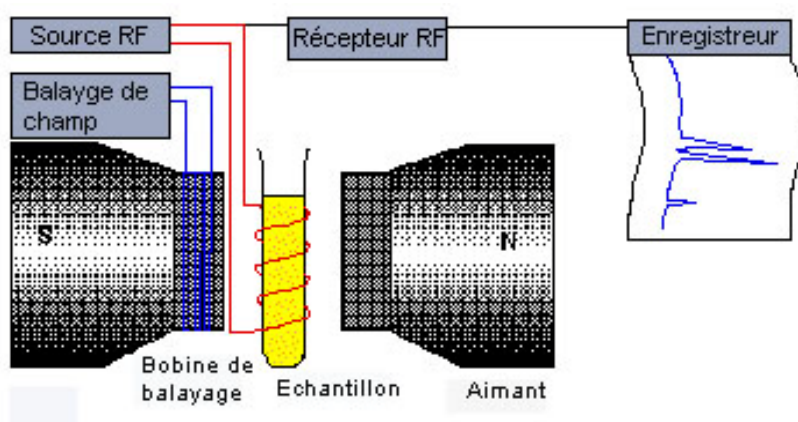


Figure II.27 : Principe de fonctionnement du Minispec

III.3.1.3.3 Protocole expérimental

Les analyses se font sur les lyophilisats des différentes fractions générées par l'hydrolyse. Les échantillons sont préparés dans des tubes de RMN (h = 10 cm ; Ø = 1 cm). La hauteur de la poudre lyophilisée introduite dans le tube ne doit pas dépasser 1 cm de hauteur et le poids de l'échantillon doit être noté. Les tubes sont ensuite mis à chauffer environ 1 heure au bain marie à 40°C, avant d'être introduits dans l'appareil Minispec.

Avant de passer les échantillons, faire un « daily check » en plaçant un standard, l'appareil est ainsi calibré pour 24 heures. La quantification des lipides se fait grâce à une courbe d'étalonnage réalisée sur de l'huile de poisson. Les résultats sont donnés en % de lipides dans l'échantillon.

III.3.1.4 Analyse des classes de lipides par CCM

Les extraits lipidiques conservés des hydrolysats de 24 heures avec Protamex, Alcalase et Flavourzyme, ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Cette technique permet de déterminer le nombre, ainsi que la quantité des différentes familles de composés contenus dans l'extrait. Elle permet d'avoir un premier aperçu sur la composition d'un échantillon. Les plaques de silice utilisées (Macherey-Nagel, glass plates SIL G-25, 20*20 cm) sont prélavées la veille avec de l'isopropanol, puis séchées à 100°C à l'étuve durant 1 heure, avant d'être refroidies au dessiccateur.

La déposition des échantillons ainsi que des standards sur la plaque (50 mg de lipides, ici 20 µl) se fait grâce à un automate (LINOMAT IV ,CAMAG) en suivant un certain ordre (Figure II.28). Les standards sont déposés afin de pouvoir identifier les différentes classes lipidiques contenues dans l'extrait. Ces derniers sont détaillés dans le Tableau II.14.

La plaque est ensuite introduite dans une cuve à chromatographie et la migration des composés lipidiques s'effectue avec le solvant hexane/éther/acide acétique (70/30/1, v/v/v) jusqu'à environ 2 cm du bord supérieur. La plaque est alors sortie de la cuve, séchée sous hotte aspirante puis révélée à l'aide de révélateurs, dans ce cas la primuline. La plaque est immergée dans une solution de primuline diluée à 10% dans un mélange acétone/eau distillée (80/20;v/v). La plaque est laissée à sécher, puis observée sous lampe UV à 630 nm. Les composés sont identifiés par leurs rapports frontaux (Rf) et comparés aux standards (SIGMA, France).

Tableau II.14 : Nature et ordres des dépôts réalisés sur la plaque CCM

Numéro de dépôt	Famille chimique	Standard utilisé
1	Extrait lipidique 1	-
2	Extrait lipidique 2	-
3	Extrait lipidique 3	-
4	Extrait lipidique 4	-
5	Extrait lipidique 5	-
6	Tri-acyl glycérol (TAG)	Tripalmitin
7	Di-acyl glycérol (TAG)	Dioléine
8 Mélange Sigma	Stérol (ST)	Cholestérol
	Ester de stérol (SE)	Ester de cholestérol
	Tri-acyl glycérol (TAG)	Trioléine
	Acide gras libre (Pernice et al.)	Acide heptadécaénoïque
9	Alcool gras	Tridécanol
	Stérol (ST)	Cholestérol
10	Extrait lipidique 6	-
11	Extrait lipidique 7	-
12	Extrait lipidique 8	-
13	Extrait lipidique 9	-

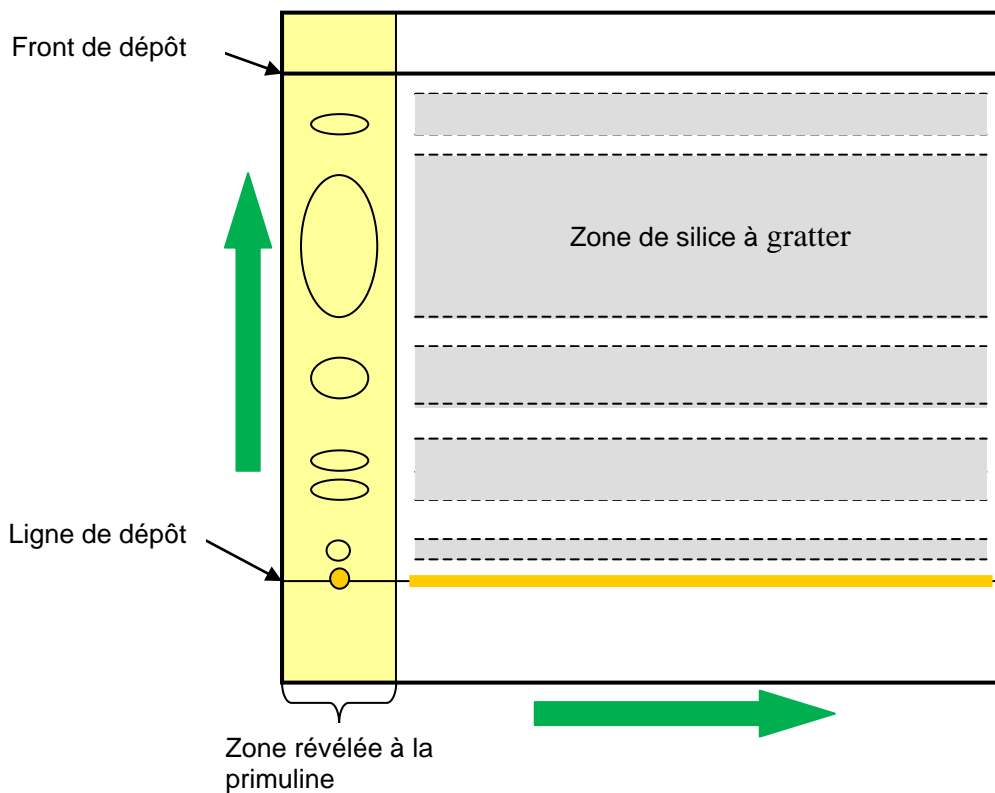
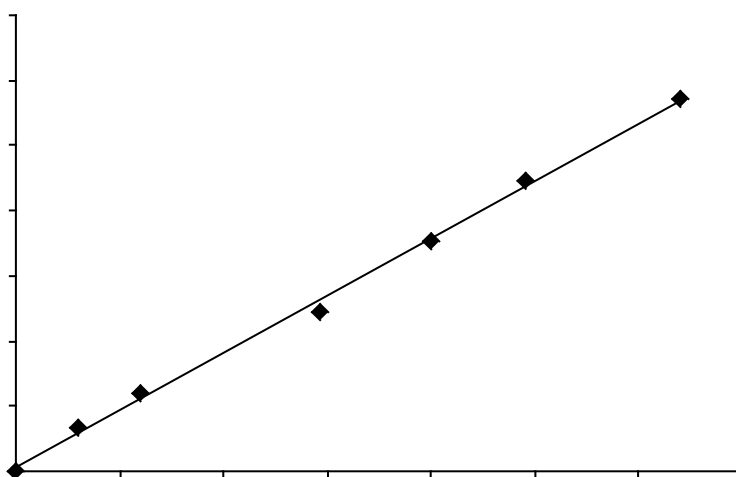


Figure II.28 : Schéma de réalisation d'une CCM préparative.

III.3.1.5 Dosage des Phospholipides

Dans ce travail, la méthode de dosage des phospholipides proposée par Stewart (1980) a été choisie du fait qu'elle ne nécessite pas de minéralisation des extraits lipidiques. Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur la formation d'un complexe coloré entre les phospholipides et le ferrothiocyanate d'ammonium (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. Un volume d'extrait lipidique correspondant à ~0,5 mg de lipides (la quantité est estimée de façon à entrer dans la gamme étalon) est évaporé sous courant d'azote puis repris dans 2 mL de chloroforme. Un volume de 1 mL de réactif au ferrothiocyanate d'ammonium sont ajoutés à l'extrait lipidique sec. 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 chloroformique est récupérée et la densité optique est mesurée à 488 nm (le complexe coloré formé possède un maximum d'absorption à cette longueur d'onde) au spectrophotomètre (UNICAM UV/VIS Spectrometer UV 2).

Les quantités de phospholipides sont calculées en fonction d'une gamme étalon établie avec de la phosphatidylcholine (PC, Avanti polar lipid, AL, USA) (Figure II.29). Les résultats sont exprimés en g d'équivalent de phosphatidylcholine par g de lipide (g Eq. PC/g lipides).



III.3.1.6 Fractionnement des lipides en chromatographie liquide

Les lipides totaux sont fractionnés en différentes classe de lipides (lipides neutres/ glycolipides/ phospholipides) en fonction de leur polarité par chromatographie solide/liquide sur colonne ouverte de type SPE (Solid Phase Extraction). Cette technique est basée sur la différence de degré d'adsorption de composés lipidiques sur des phases mobiles et fixes (Dreyfus, 1997). Dans ce cas, la phase solide est le gel de silice. Les composés lipidiques vont réagir différemment en fonction de la polarité du solvant d'éluion. Cette méthode est applicable à ma plupart des mélanges lipidiques, elle est préconisée pour une première séparation des classes d'un mélange.

Dans une colonne en verre (diamètre interne : 8-10 mm ; longueur : 20 cm) est introduite de la laine de verre afin de retenir la silice activée (une nuit à 100°C). La quantité de silice déposée 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 (10 mg) est ensuite déposé doucement en tête de la colonne en utilisant le chloroforme comme éluant. Après complète éluion du solvant, introduire délicatement par les bords de la colonne un par un les différents éluants en générant ainsi un gradient de polarité négatif (du plus polaire au moins polaire). Les solvants, les classes de lipides associées et les volumes utilisés sont résumés dans le Tableau II.15. Les fractions correspondant à l'éluion de ces solvants sont ensuite récupérées et quantifiées par évaporation dans des petits ballons préalablement tarés. Les fractions sont ensuite conservées dans un volume connu de mélange benzène/éthanol (4/1, v/v) et stockées à -20°C.

Tableau II.15 : Solvants utilisés en fonction des classes de lipides en chromatographie liquide sur colonne.

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

III.3.1.7 Analyse des acides gras par CPG-SM

III.3.1.7.1 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. 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 (BF₃), acide ou basique) (Christie 1989). 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). 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.

III.3.1.7.2 Analyse des esters méthyliques d'acides gras par 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. La Figure II.30 schématise l'acquisition des données pour ce mode de détection.

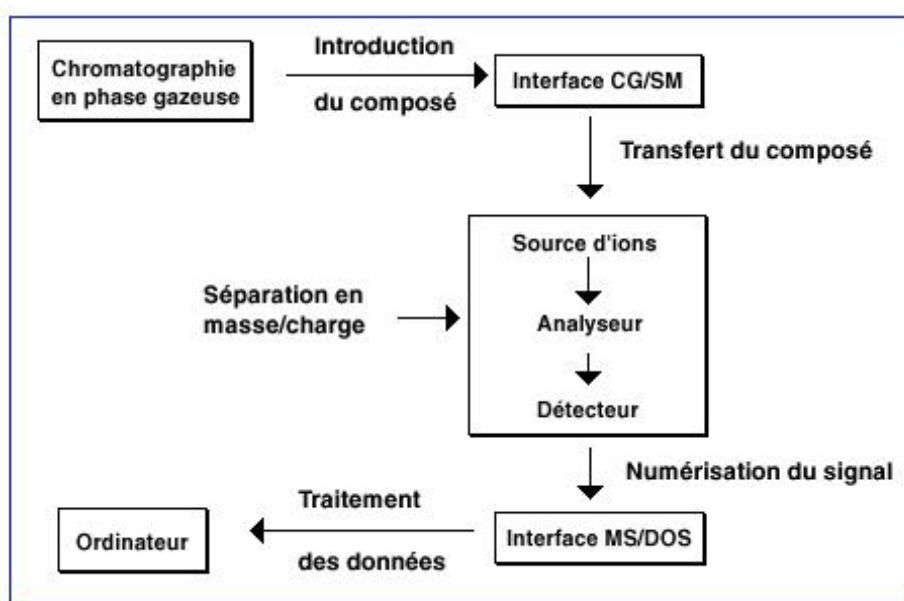


Figure II.30 : Mode de détection SM de la chromatographie en phase gazeuse.

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).

IV. VALORISATION DES HYDROLYSATS EN TANT QU'INHIBITEURS DE CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES : TESTS *IN VITRO*

IV.1 OBJECTIFS ET CHOIX DES MICRO-ORGANISMES

Dans cette étude, nous avons choisi de tester nos hydrolysats sur quelques souches d'*altération microbienne des produits de la mer conditionnés* et de voir si les peptides possèdent une activité inhibitrice sur ces bactéries. En effet, ce problème bénéficie d'une attention majeure de la part de l'OMS ainsi que des différents organismes mondiaux de santé publique et de veille zoonitaire (Huss 1995). Cette évolution s'explique notamment par le fait qu'à l'heure actuelle un certain nombre de législations nationales et internationales en matière d'alimentation rendent le producteur pleinement responsable de la qualité de ses produits (directive du Conseil de la CEE 91/493/CEE (CEE 1991)).

Après capture, à l'état cru, les produits de la mer sont des denrées très sensibles au processus d'altération microbienne. En effet, ils peuvent être contaminés par des bactéries naturellement présentes dans l'environnement marin. Nous pouvons en citer à titre d'exemple *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Serratia sp.*, *Shewanella sp.* (Hanninen et al. 1997 – Gopal et al. 2005). Ces bactéries peuvent se développer très rapidement sur les produits de la mer crus, qui constituent un environnement favorable au développement microbien du fait d'un pH neutre (proche de 7) et de la présence de composés chimiques de faible poids moléculaire tels que les acides aminés et les nucléotides libres (Chinivasagam et al. 1998). Ces composés sont directement utilisables pour la croissance et le métabolisme de ces bactéries.

IV.2 ESSAIS SUR LES PEPTIDES PRODUITS PAR LES HYDROLYSES

Des tests d'activité antibactérienne, ont été réalisés sur les peptides produits par l'hydrolyse enzymatique de 6 heures avec Protamex, Delvolase, Pepsine et Multifect Neutral

avec comme matrice protéique les viscères de seiche avec (V+E) et sans la glande d'encre (V-E).

IV.2.1 Micro-organismes, caractéristiques et conditions de culture

Les souches de bactéries cibles sélectionnées ainsi que leurs caractéristiques sont présentées succinctement dans le Tableau II.16. Ces souches ont été et manipulées au Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper (LUMAQ) de l'Université de Bretagne Occidentale. Elles ont été conservées puis activées sur les milieux Sabouraud Glucose Agar (SGA). Les bactéries cible utilisées dans cette études ont été choisies car elles font partie de la flore marine pathogène du poisson (Balebona et al. 1998 - Fernandez et al. 2003 – Michel et al.1997 - Mizuki et al. 2006 - Montfort et Baleux 1990 – Ringo 2008 - Zanetti et al. 1999) ou tout simplement parce qu'elles sont communément utilisées en analyse microbiologique.

Tableau II.16 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

Micro-organisme	Origine	Type
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 10778	Bactérie Gram +
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Bactérie Gram -
<i>Lactococcus garvieae</i>	ATCC 43 921	Bactérie Gram +
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240	Bactérie Gram +
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	18 - 96	Bactérie Gram +

Bacillus megaterium

De forme bacilles, *B. megaterium* est une bactérie aérobie ou aéro-anaérobies facultative, et tirent son énergie par respiration ou fermentation. Ce genre de bactéries est capable de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. *B. megaterium* est hétérotrophe, saprophyte et ubiquitaire. Elle fait partir des eubactéries les plus fréquemment retrouvées dans le sol et peut constituer des groupes de bactéries arrangées en chaînes liées ente elles par des polysacharides. *Bacillus megaterium* produit la pénicilline-amidase utilisée pour la fabrication de la pénicilline.

Escherichia coli

E.coli est un bacille pathogène de la famille des enterobacteriaceae. Ce sont des aéro-anaérobies, mobiles ou immobiles, facilement cultivables, fermentant le glucose, réduisant les nitrates en nitrites et dépourvus d'oxydase. *E. coli* est un hôte commun de la microflore

commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud. *E. coli* peut apparaître sous forme coccobacillaire ou filamenteuse dans les vieilles cultures.

Lactococcus garviae

Il s'agit d'un genre anaérobie facultatif largement utilisé dans l'industrie alimentaire comme souches « starter » dans la production des fromages, des laits fermentés, de la caséine. Ces bactéries ont un rôle dans la production du caillé (prise en masse du lait par acidification dû à la fermentation du lactose en acide lactique) servant à la fabrication du fromage. Grâce à leurs équipements enzymatiques, elles participent à la protéolyse de la caséine en acide aminé précurseur de nombreuses molécules aromatiques.

Micrococcus luteus

M. luteus est une espèce représentée par des bactéries appartenant à la famille des *Micrococcaceae*. Les cellules sont des coques de 0,5 à 2 µm de diamètre, souvent groupées en paire ou en tétrade, généralement immobiles. Ce sont des bactéries aérobies, à métabolisme oxydatif, possédant une catalase, chimio-organotrophe. Ces bactéries ont pour habitat le sol, les eaux douces, les aliments ; elles sont fréquentes sur la peau de l'Homme et des animaux.

Vagococcus salmoninarum

Le genre *Vagococcus* regroupe des coques ou des bactéries ovoïdes, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, catalase négative, chimio-organotrophes à métabolisme fermentatif, fermentant le glucose (sans gaz) en produisant essentiellement de l'acide lactique. Sur gélose au sang de mouton, les colonies sont petites, non pigmentées et s'entourent d'une zone d'hémolyse alpha. *Vagococcus salmoninarum* a été isolé aux U.S.A., en Australie et en Norvège à partir des salmonidés (*Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*) adultes atteints de péritonite et/ou de troubles de la reproduction. Le pouvoir pathogène de cette espèce est probable mais n'a pas fait l'objet d'une reproduction expérimentale.

Les souches ont été préparées et l'incubation a été faite à 37°C dans du bouillon de soja tryptique pour *M. luteus* (ATCC 10240) et *E. coli* (ATCC 25922) ; à 30°C dans le milieu liquide de Luria-Bertani pour *B. megaterium* (ATCC 10778) ; à 30 °C dans du bouillon de soja tryptique pour *V. salmoninarum* (18-96) et à 25 °C dans du bouillon de soja tryptique avec du NaCl à 1.5% pour *L. graviae*.

IV.2.2 Techniques expérimentales

- Méthode de la diffusion sur puits de gélose

Les surnageants des hydrolysats lyophilisés (~ 500 mg) sont solubilisés dans de l'eau milliQ à 0.1% TFA puis centrifugés 10000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est utilisé pour les tests d'activité antibactérienne.

La méthode utilisée pour doser l'activité antibactérienne est celle de diffusion par puits sur gélose décrite par Berghe et Vlietinck (1991). Le principe de cette méthode est similaire à la technique classique de l'antibiogramme (Chabbert 1963). Le milieu de culture est coulé sur boîte de pétri à une épaisseur de 8 mm. Chaque échantillon (60µl) est déposé dans un puits creusé dans une gélose tamponnée à pH 7 etensemencée après dilution à environ 10^6 UFC.mL⁻¹. Le schéma de dépôt est représenté sur la Figure II.31.

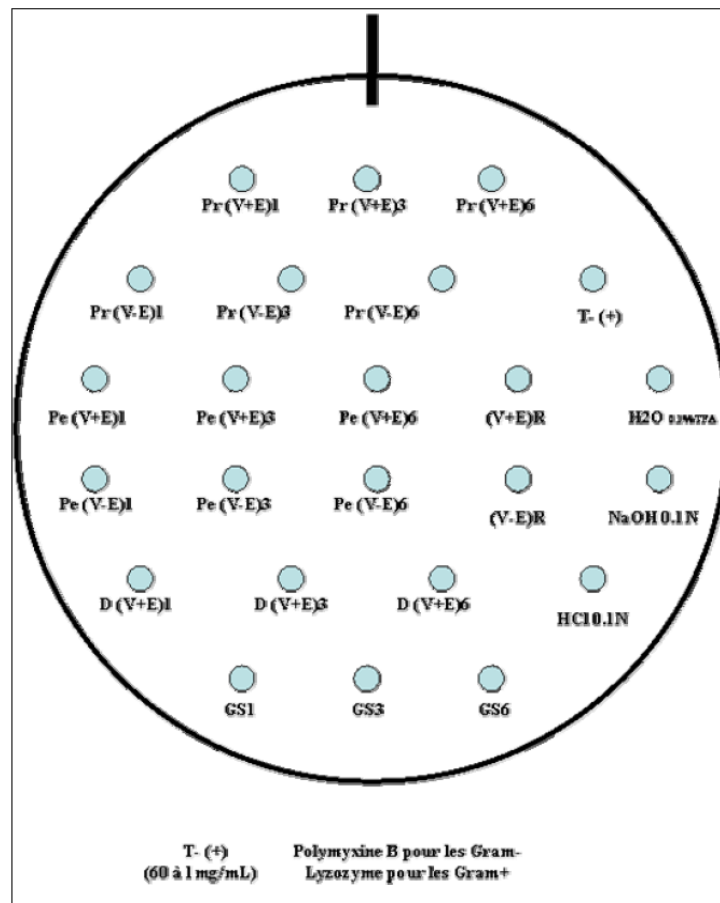


Figure II.31 : Schéma de dépôt des échantillons sur la gélose ensemencée.

Différents témoins ont été effectués : (i) HCl (0.1 N) et NaOH (0.1N) pour vérifier l'efficacité du tampon phosphate de sodium 100 mM, pH7, Polymyxine B pour les Gram-, Lysozyme à 1 mg/ml pour les Gram+ et H₂O, 0.1 % TFA étant le solvant de solubilisation des échantillons. Après 24H d'incubation à température optimale de croissance, l'activité antibactérienne se traduit par un halo d'inhibition autour du puits. La lecture est réalisée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse (Figure II.32)

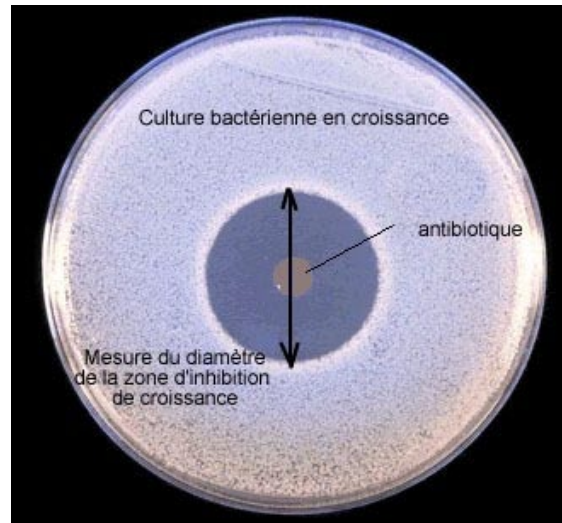


Figure II.32 : Schéma de la mesure du halo d'inhibition autour du puits d'un agent antibactérien.

Selon la taille du diamètre, on peut déterminer la catégorie de la bactérie vis-à-vis de notre produit, à savoir sensible, intermédiaire et résistante et aussi déterminer le degré d'inhibition (Figure II.33).

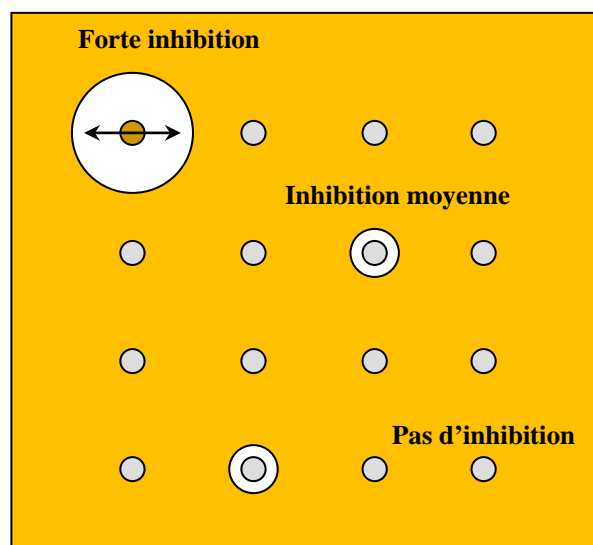


Figure II.33 : Représentation schématique des résultats possibles d'un antibiogramme.

Les échantillons les plus actifs ont été analysés par la méthode des gels recouverts ainsi que la méthode des concentrations minimales inhibitrices (MICs).

- Méthode des gels recouverts

Pour cette méthode, le Gel SDS-PAGE est recouvert d'une géloseensemencée avec *Bacillus megaterium* ATCC 10778. Cette technique a été mise au point par Laemmli (1970) où la séparation des molécules se fait en milieu basique à pH=8.8 en présence d'un détergent, le Sodium-Dodecyl-Sulfate qui masque la charge des protéines par sa propre charge négative et permet donc de faire migrer les protéines selon leurs poids moléculaires et leurs conformations uniquement. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et en présence de SDS, puis les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (Amersham, Pharmacia Biotech). Après transfert, la membrane est colorée au bleu de Coomassie et l'activité inhibitrice des hydrolysats est retrouvée dans la région correspondant à la bande majeure de coloration.

- Méthode des concentrations minimales inhibitrices

La méthode de diffusion réalise la relation entre la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et le diamètre d'inhibition autour d'une source d'antibiotique qui peut être dans la plupart des cas soit un disque de papier imprégné d'une quantité connue d'antibiotique) ou bien une solution comme dans le cas de nos hydrolysats dans cette étude.

Les CMI ont été déterminées sur des plaques microtitrantes standard comportant 96 puits. Un volume de 50 mL d'un milieu concentré, inoculé à 2×10^5 CFU/mL avec les bactéries cible 60 μ L d'une série de dilutions au 1/2 de la fraction cationique active. Les microplaques sont incubées pendant 48 heures aux températures optimales de croissance des bactéries. La croissance bactérienne est mesurée et estimée par la lecture de la D.O à une longueur d'onde de 600 nm. La CMI est définie comme la concentration la plus faible en protéines donnant 100% d'inhibition de croissance après 48 h d'incubation.

IV.3 ESSAIS SUR LES HYDROLYSATS ISSUS DU PLAN D'EXPERIENCE

Dans cette partie, nous avons testé les hydrolysats issus de notre plan d'expérience afin de déterminer si les conditions d'hydrolyse influent sur l'activité inhibitrice des peptides produits. La culture ainsi que les manipulations ont été réalisées au laboratoire de microbiologie du département STBM de l'IFREMER de Nantes.

IV.3.1 Micro-organismes, caractéristiques et conditions de culture

Dans cette deuxième partie d'étude de l'activité inhibitrice, nous avons choisi comme matériel d'étude des souches bactériennes appartenant à la flore d'altération de la crevette. En effet, l'une des espèces marines particulièrement sujette à l'altération microbienne au cours de la conservation est la crevette de la famille de Peneidae. En effet, ce genre constitue l'un des produits les plus exportés à travers le monde, notamment en Tunisie où cette activité représente une part importante de l'ensemble de l'activité de l'industrie de conditionnement. Si elle n'est pas vendue fraîche sur le marché, elle est conservée et conditionnée et est donc susceptible de subir une altération microbienne. Dans une étude de Sadok et al. (2004), quelques effets de conservation de l'encre de seiche sur les crevettes décortiquées ont été décelés et nous avons donc voulu approfondir cette étude en ciblant des bactéries Gram+ et Gram -. Ces dernières se retrouvent essentiellement dans la microflore des produits de la mer frais, ou en début de conservation pour les produits légèrement préservés comme le saumon fumé (Gram et Huss 1996). Cette flore tend ensuite à diminuer au cours de la conservation pour laisser la place aux bactéries à Gram positif, notamment aux bactéries lactiques (Leroi et al. 2001). Ci-après les principales caractéristiques des souches cible.

*Bactéries à Gram positif

• *Brochotrix thermosphacta* EU2206 :

Les espèces du genre *Brochotrix* sont très proches sur les plans phénotypique et phylogénétique de *Listeria*. Ces deux genres font d'ailleurs partie de la même famille bactérienne : les Listeriaceae. *Brochotrix thermosphacta* est une bactérie contaminante des viandes réfrigérées, particulièrement de la viande de bœuf et de porc (Dainty et Mackey 1992). Elle se retrouve également dans la volaille et les produits de la mer en général (Rachman et al. 2004 – Del Rio et al. 2005). Elle a été isolée et décrite pour la première fois par Sulzbacher et McLean (1951). Elle est non pathogène mais est responsable de la production d'odeurs. *Brochotrix thermosphacta* fait partie de la flore de la dinde crue

(Samelis et al. 2000), du porc (Bohaychuk et Geer 2003) et du jambon cuit (Samelis et al. 1998). Les produits de la mer constituent également un habitat favorable au développement de *B. thermosphacta*. Nickelson et al. (1980) ont isolé cette bactérie de la chair des poissons hachés, de poissons emballés sous CO₂ ou de poissons congelés comme le cabillaud (Gardner 1981). *Brochotrix thermosphacta* est une bactérie à Gram positif qui se présente dans la plupart du temps sous forme de bâtonnets fins et immobiles. Elle est anaérobie facultative, non sporulée et produit de la catalase. Psychrotrophe, elle est capable de se développer entre 0 et 30°C avec un optimum de croissance autour de 25°C. Le pH optimum de croissance est de 7 (Stackebrandt et Jones 2006).

• **Listeria monocytogenes EU2162** :

L. monocytogenes est un bacille de petite taille, saprophyte, non sporulé, anaérobie facultatif et largement répandu dans la nature. Cette bactérie, mobile à 20°C est la seule espèce du genre *Listeria* pathogène pour l'homme ; elle est responsable de la listériose qui est une septicémie d'origine digestive. Elle est invasive et capable de traverser le placenta et de pénétrer le système nerveux central du fœtus (méningo-encéphalites). C'est une bactérie intracellulaire facultative, capable de survivre et de croître à l'intérieur de la plupart des cellules de l'hôte infecté. De point de vue culture, ce germe psychrophile se développe à 4°C et même jusqu'à - 2°C et les colonies sont transparentes mesurant de 1 à 2 mm. *Listeria monocytogenes* ne survit pas plus de 30 min à +60 °C. La pasteurisation l'élimine des aliments, mais aux températures de réfrigération, elle continue de se développer contrairement à la plupart des autres bactéries, ce qui constitue un critère de sélection. Elle résiste plusieurs mois dans le sol. Elle est détruite à un pH inférieur à 4. On a identifié *L. monocytogenes* dans au moins 37 espèces de mammifères, domestiquées ou non, et dans au moins 17 espèces d'oiseaux et probablement dans certaines espèces de poissons et de coquillages. Le problème posé par *Listeria monocytogenes* dans les aliments réfrigérés est sa capacité à se développer à des températures avoisinant 0°C. Même si la population bactérienne est faible au départ, elle est susceptible d'augmenter lors de l'entreposage et de la distribution et d'atteindre des niveaux significatifs pouvant causer la listériose alimentaire. Elle ne peut pas se développer dans les aliments congelés, mais si la contamination a lieu avant la surgélation, l'organisme peut y survivre et recommencer à se développer lors de la décongélation, atteignant des niveaux dangereux pour la santé humaine. La bactérie peut être hébergée dans le tube digestif

de certains mammifères, y compris celui de l'homme, qui peuvent être porteurs sains de la bactérie.

• **Staphylococcus aureus RF173** :

Avec *E. coli*, les staphylocoques sont des bactéries occupant le premier rang des germes responsables d'infections contractées dans les hôpitaux (infections nosocomiales) (De La Fuente et al.1993). Les souches de l'espèce *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) sont les plus pathogènes et sont les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine et vétérinaire et sont connues pour provoquer des infections cutanées. *S. aureus* est également désigné sous le nom de "microcoque de Morel" par rapport au scientifique qui l'a isolé pour la première fois en 1911) (Boukerrou et al. 1985). Leur habitat naturel est constitué par les flores cutanées et muqueuses humaines et animales. Ils sont également retrouvés dans l'environnement (eau, sol, air, aliments, objets). *S. aureus* est également au deuxième rang des bactéries responsables d'intoxications alimentaires, après les salmonelles (Alhendi et al.1993). *S. aureus* appartient à la famille des Micrococcaceae, présentant une forme arrondie (coccus) et mis en évidence par la coloration Gram +, non sporulé. Cette bactérie se cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose comme en anaérobiose en formant, sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque "doré". En milieu liquide, il produit, dans le bouillon, un trouble homogène. Il n'a pas d'exigences particulières. Si les conditions idéales de croissance sont une température de 37° C et un pH de 7,5, de grandes variations sont tolérées. Le traitement des infections dues à ces souches est difficile en raison de la prévalence élevée des souches multirésistantes aux antibiotiques.

* **Bactéries à Gram négatif**

• **Shewanella putrefaciens EU2185** :

La plupart des espèces du genre *Shewanella* ont pour habitat le milieu extérieur et tout particulièrement le milieu aquatique (y compris le milieu marin). *Shewanella putrefaciens* joue un rôle tellement important dans l'altération des produits de la mer qu'elle a été désignée comme la bactérie spécifique d'altération de ces denrées. Beaucoup d'études ont ainsi été réalisées sur certaines espèces de poisson à intérêt commercial (Molin et Stenström 1984 – Pournis et al. 2005 - Vogel et al. 2005 – Pantazi et al. 2008). Cette bactérie est également impliquée dans la production de putrescine dans la crevette entière fraîche (Benner et al. 2004). La chair des produits marins contient de grandes quantités de *N*-oxyde de

triméthylamine qui aurait un rôle osmoprotecteur. En anaérobiose, les *Shewanella* sont capables de réduire l'oxyde de triméthylamine en triméthylamine (OTMA) [(CH₃)₃NO] et de former de la triméthylamine (TMA) [(CH₃)₃N], ce qui confère aux produits de la mer une odeur forte et désagréable (Dalgaard et al. 1993). La production d'hydrogène sulfuré (H₂S) contribue également à la formation d'odeurs putrides. La conservation au froid ne résout pas entièrement le problème car de *Shewanella putrefaciens* étant donné qu'il s'agit d'une bactérie psychrotrophe, apte à se multiplier à 4°C. *Shewanella putrefaciens* est responsable de rares infections chez l'homme : septicémies, bactériémies, endocardites, péritonites, infections biliaires, otites, infections de l'oreille, surinfections de plaies, abcès...

• **Photobactérium phosphoreum EU2183 :**

Le genre *Photobacterium* rassemble des bacilles rectilignes, de 0,8 à 2 µm de diamètre sur 1,8 à 2,4 µm de longueur, non sporulés, halophiles, le plus souvent mobiles grâce à des flagelles polaires non entourés d'une gaine, à métabolisme respiratoire et fermentatif, oxydase et catalase positives. *Photobactérium phosphoreum* est une bactérie bioluminescente, thermosensible, halophile, psychrotrophe et résistante au CO₂, et pouvant être cultivée entre 4 et 20 °C, mais ne cultivant pas à 35 °C. *Photobacterium phosphoreum* a pour habitat les eaux des mers froides et tempérées et vit en symbiose avec diverses espèces de poissons. L'importance de cette espèce en biologie vétérinaire est double : (i) elle est responsable de l'altération des poissons conservés dans une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone et (ii) elle impliquée dans des intoxications à l'histamine. En effet, elle a été retrouvée dans le poisson emballé sous atmosphère modifiée, dans le poisson légèrement préservé, le calmar et les crevettes crues emballées sous atmosphère modifiée (Gram et Huss 1996 – Hovda et al. 2007). Comme *Sw. putrefaciens*, *Ph. Phosphoreum* est une bactérie d'altération car elle provoque la formation d'odeurs désagréables par la production de TMA. Sa production est 10 à 100 fois plus élevée que celle de *Sw. putrefaciens* (Dalgaard 1995). *Photobactérium phosphoreum* est également une bactérie productrice d'amines biogènes, notamment l'histamine et est à l'origine d'altération spécifique du saumon fumé (Joffraud et al. 2006).

• **Serratia liquefaciens EU2196 :**

Cette espèce appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle fut connue depuis longtemps sous le nom d'*Enterobacter liquefaciens*. Elle a été retrouvée essentiellement dans

le poisson fumé emballé sous vide (Gonzalez-Rodriguez et al. 2002 – Joffraud et al. 2006). Des études par inoculation de cette bactérie sur du saumon fumé ont notamment montré qu'elle était responsable de la production d'amines biogènes et en particulier de putrescine (Jorgensen et al. 2000). Cette espèce a également été retrouvée sur d'autres matrices alimentaires comme le lait et les produits laitiers (Morales et al. 2004), les produits à base d'œufs (Hidalgo et al. 2008), les saucisses de viande de porc (Garcia Fontan et al. 2007). La culture de *Serratia liquefaciens* est obtenue avec un optimum thermique variant de 22 à 30°C. *Serratia liquefaciens* est occasionnellement impliquée dans des infections opportunistes et c'est une espèce responsable de mammites sub-cliniques ou chroniques chez les bovins. Les infections intramammaires surviennent durant le tarissement et se perpétuent durant la lactation.

• **Vibrio cholerae RF184** :

La bactérie *Vibrio cholerae* (vibron cholérique ou bacille virgule en français) est une bactérie en forme de bâtonnet incurvé, mobile et responsable du choléra chez l'homme. *Vibrio cholerae* a été pour la première fois isolé comme le responsable du choléra par l'anatomiste italien Filippo Pacini en 1854, mais ce n'est qu'en 1965, en hommage à ce même scientifique que la dénomination officielle de *V. cholerae* a été attribuée. Cette bactérie pathogène vit à l'état saprophyte dans l'eau, parasite le zooplancton et possède une grande capacité de survie environnementale. Elle peut survivre pendant 50 jours dans l'eau de mer à 5-10°C, et de 10 à 12 jours à 30-32°C. Cette bactérie peut contaminer les fruits de mer et l'intestin des poissons. Certains crustacés, notamment les crevettes jouent un rôle de vecteur grâce à des récepteurs situés sur leurs carapaces dorsales (Castro-Rosas et al. 2002). La culture de *V. cholerae* s'effectue les milieux usuels mais le vibron tolère des pH très élevés, d'où l'emploi d'une eau peptonée alcaline (pH 8,5) et hypersalée (halotolérance) (NaCl 3 %) qui permet d'enrichir le germe à partir des selles et d'inhiber la plupart des autres bactéries non-halotolérantes.

• **Salmonella typhimurium RF187**:

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des Enterobacteriaceae et possède une forme cylindrique avec des dimensions de 2 µm sur 0,5 µm et se multiplie sur le milieu de culture en formant des colonies. *Salmonella typhimurium* se multiplie dans le tractus gastro-intestinal et est responsable de gastroentérites aiguës. D'une manière générale, ces organismes mésophiles sont distribués dans le monde entier mais se rencontrent principalement dans les intestins de l'homme et des animaux dans les milieux naturels pollués par des excréments humains ou

animaux. La survie dans l'eau dépend de nombreux paramètres, parmi lesquels des facteurs biologiques (interaction avec d'autres bactéries) et physiques (température) (Rhodes et Kator 1988).

IV.3.2 Protocole expérimental

Culture des souches

L'ensemble des micro-organismes est cultivé dans le milieu de culture BHB + 2,5% NaCl. Les différentes cultures sont effectuées à partir de deux pré-cultures. Dans la première, les souches sont repiquées dans du BHB auquel a été ajouté 2.5% NaCl. Le tout est incubé à 20°C. Pour la deuxième, 100µL de la première pré-culture sont inoculés dans du BHB +2.5% NaCl et portés à incubation à 20°C pendant 31 h.

Préparation des échantillons

Tout le protocole expérimental est effectué sous hotte à flux laminaire.

Les échantillons à tester sont les peptides issus des 20 réactions d'hydrolyse, notés de P1 jusqu'à P20. Une masse de 110 mg de lyophilisat (surnageant) est mélangée avec 10 mL du milieu de culture (BHB + 2.5% NaCl) dans des tubes stériles. La dissolution des peptides est aidée en vortexant pendant quelques secondes. Le pH de 20 tubes peptides + BHB + 2.5% NaCl doit être ajusté au pH du milieu témoin, sans peptide (BHB + 2.5% NaCl). Le pH initial du milieu est de 7,39. Pour ce faire les tubes sont transvasés dans de petits béchers. Le pH initial de chaque tube est mesuré et ajusté soit avec du NaOH (1N, 0.1 N) ou du HCl (1N) selon le pH de départ. Dans notre cas, le pH des 20 échantillons varie entre 7,20 et 7,34, donc il n'y a pas eu besoin de réajuster le pH.

Le mélange (peptides+milieu) est ensuite stérilisé sous la hotte à flux laminaire : Le contenu de chaque bécher (hydrolysate+BHB) est filtré sur un filtre Whatman à 0,45µm (filtres adaptables seringues) et transvasé dans de nouveaux tubes stériles à l'aide d'une seringue de telle manière qu'il n'y ait pas de bactéries qui puissent passer. On commence d'abord par enlever la partie supérieure de la seringue et la placer sur le filtre (Figure II.34), puis pousser le contenu dans les tubes stériles. Le filtre est ensuite ouvert et la seringue désemboutée est placée dessus et tout le liquide est aspiré pour être transvasé finalement dans des tubes stériles.

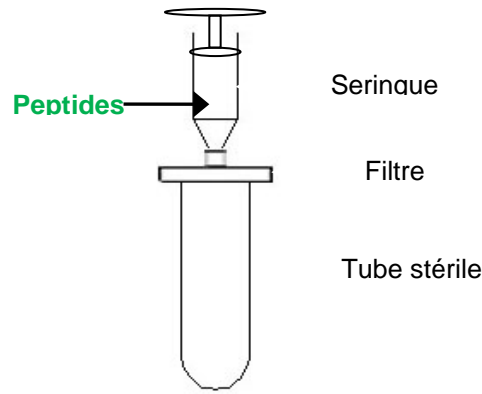


Figure II.34 : Procédure de stérilisation des échantillons à analyser par filtration.

Dépôt sur les plaques

Un volume de 297 μ L de chaque tube (peptide+ BHB) est déposé dans les puits de deux microplaques. Dans chaque puits sont ensuite inoculés 33 μ L des souches de la deuxième culture, dilués au 1/10^e sauf pour la souche *Schewanella putrefaciens* qui avait faiblement poussé (donc inoculée sans dilution préalable). Chaque microplaque utilisée comporte 100 puits. Les 80 puits de chacune des plaques sont occupés par le BHB, la souche bactérienne et le peptide. Des témoins de stérilité sont réalisés en déposant dans 10 puits le milieu BHB + le peptide seul. Dans 8 puits sont déposés le BHB + les souches uniquement afin de comparer la croissance des bactéries avec et sans la présence des hydrolysats (Figure II.35).

		PEPTIDES			
SOUCHES	P1	P2	P3	P10	
S1	BHB+P1+S1	BHB+P2+S1	BHB+P3+S1	BHB+P10+S1	
S2	BHB+P1+S2	BHB+P2+S2			
S3	BHB+P1+S3				
S4					
S5					
S6					
S7					
S8	BHB+P1+S8			BHB+P10+S8	
Peptides seuls (témoin de stérilité)	BHB+P1	BHB+P2	BHB+P10	
BHB + souches	BHB+S1	BHB+S2	BHB+S8		

Figure II.35: Schéma de dépôt des échantillons sur les microplaques

Les plaques ainsi remplies sont placées dans un lecteur de microplaques, le Bioscreen C, pour le suivi de la croissance microbienne et ce par mesure de la D.O à 600 nm. Ainsi, l'augmentation de la biomasse microbienne accompagnant la croissance d'une population de micro-organismes entraîne l'opacification du milieu de culture. Ces techniques turbidimétriques permettent donc de suivre l'évolution de la croissance microbienne par la mesure de la densité optique (D.O). Cette variable, définie comme le logarithme du rapport entre l'intensité I_0 du faisceau incident et l'intensité I du faisceau transmis, caractérise l'opacité du milieu (Figure II.36) :

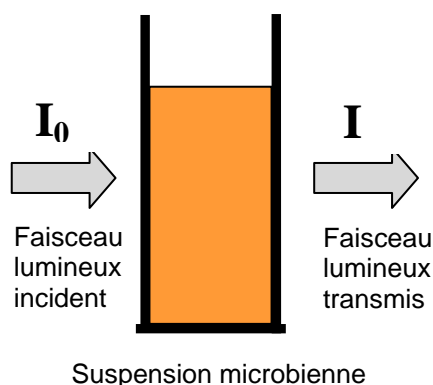


Figure II.36: Technique turbidimétrique utilisée dans le Bioscreen pour la mesure de biomasse (Delignette-Muller 1995).

Dans le tableau ci-dessous est récapitulé le programme de mise en route du Bioscreen C :

Tableau II.17 : Conditions opératoires et programme de mise en route du Bioscreen C

Milieu de culture	BHB + 2,5% NaCl (pH non modifié)
Masse hydrolysate lyophilisé	110 μ m
Volume (BHB+Peptides)	297
Volume inoculum	33 μ l
Longueur d'onde	600 nm
Température d'incubation	20°C
Durée de préchauffage	non
Durée de l'expérience	3 jours
Intervalle entre les mesures	30 min
Intensité de l'agitation	médium
Moment de l'agitation	Pré
Durée de l'agitation	10s

Suivi de la cinétique de croissance bactérienne

La figure résume la cinétique de croissance théorique simplifiée d'un micro-organisme. Au début, il y a une phase de latence ou **phase stationnaire**, suivie d'une phase **croissance exponentielle**, puis d'un plateau ou **phase stationnaire** maximale. Les cinétiques de croissance d'une population microbienne sont souvent représentées en coordonnées semi-logarithmiques. La phase de croissance exponentielle apparaît alors linéaire et la pente de cette droite correspond au taux de croissance (Figure II.37).

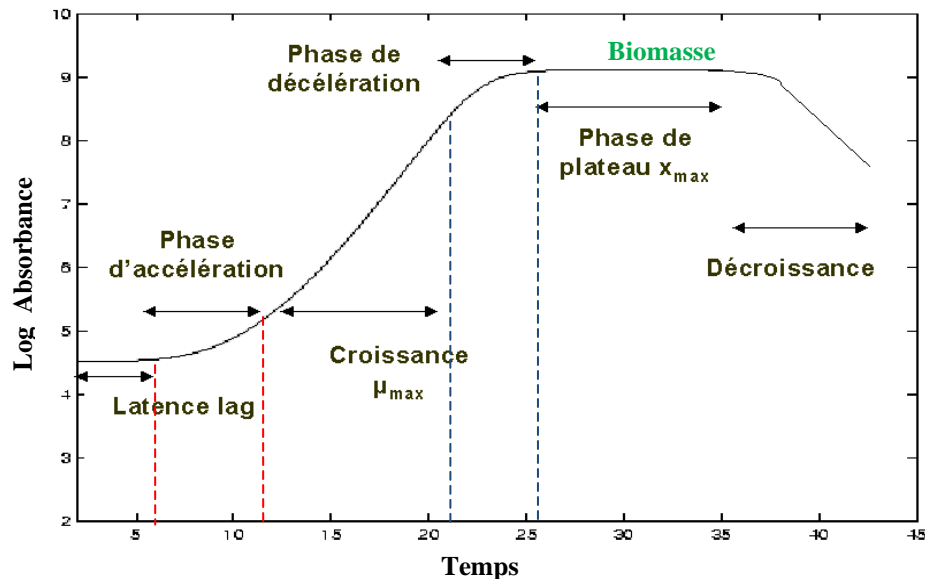


Figure II.37: Schéma d'une cinétique théorique simplifiée de croissance d'un micro-organisme

CHAPITRE III : RESULTATS ET **DISCUSSION**

I. INFLUENCE DU CHOIX DU SUBSTRAT ET DES CONDITIONS D'HYDROLYSE

I.1 LES CO-PRODUITS DE SEICHE GENERES PAR LES INDUSTRIES DE TRANSFORMATION DES PRODUITS DE LA MER

Les co-produits (viscères) utilisés dans cette étude proviennent de la transformation de la seiche en vue de son conditionnement pour l'exportation. Les viscères représentent une part importante du mollusque. Grâce à leur teneur élevée en protéines et leur faible teneur en glucides, elles représentent un ingrédient d'un réel intérêt. Cette fraction des co-produits comprend une glande spécifique des mollusques céphalopodes et qui est la poche d'encre. La glande ou "poche du noir", contient des mélanosomes qui, à maturité, libèrent des grains de mélanine (tyrosine oxydée), associés à du matériel cellulaire et tenus en suspension dans du liquide (Schraemayer 1994). L'encre est un produit concentré, faiblement lipidique et utilisé depuis l'antiquité dans les habitudes culinaires des pays asiatiques et ceux du sud.

Ce chapitre a pour objectif d'établir un bilan massique des différents co-produits issus de la chaîne de transformation de la seiche puis de caractériser d'un point de vue biochimique les co-produits utilisés tout le long de cette étude, plus précisément les viscères avec et sans la glande d'encre. Les résultats obtenus lors de cette étape serviront de référence pour déterminer jusqu'à quel niveau l'encre peut influencer la composition du produit et de comparer l'efficacité des procédés développés au cours de l'étude sur les deux types de matrices, avec et sans encre.

I.1.1 Bilan massique de la chaîne de transformation

La Figure III.1 schématise les différents co-produits solides récupérés après pelage, décorticage et éviscération des seiches suites aux opérations unitaires du procédé de conditionnement ainsi que les proportions qu'ils représentent. Ces différents co-produits générés par la chaîne de transformation sont alors quantifiés. Le Tableau III.1 recense les différentes sorties des fractions solides générées par ce procédé. Nous nous sommes basés sur un lot de seiche de 6,7 kg que nous avons disséqué et nettoyé selon la méthode conduite par l'industriel. Le manteau, ou blanc de seiche et les bras sont considérés comme le produit fini.

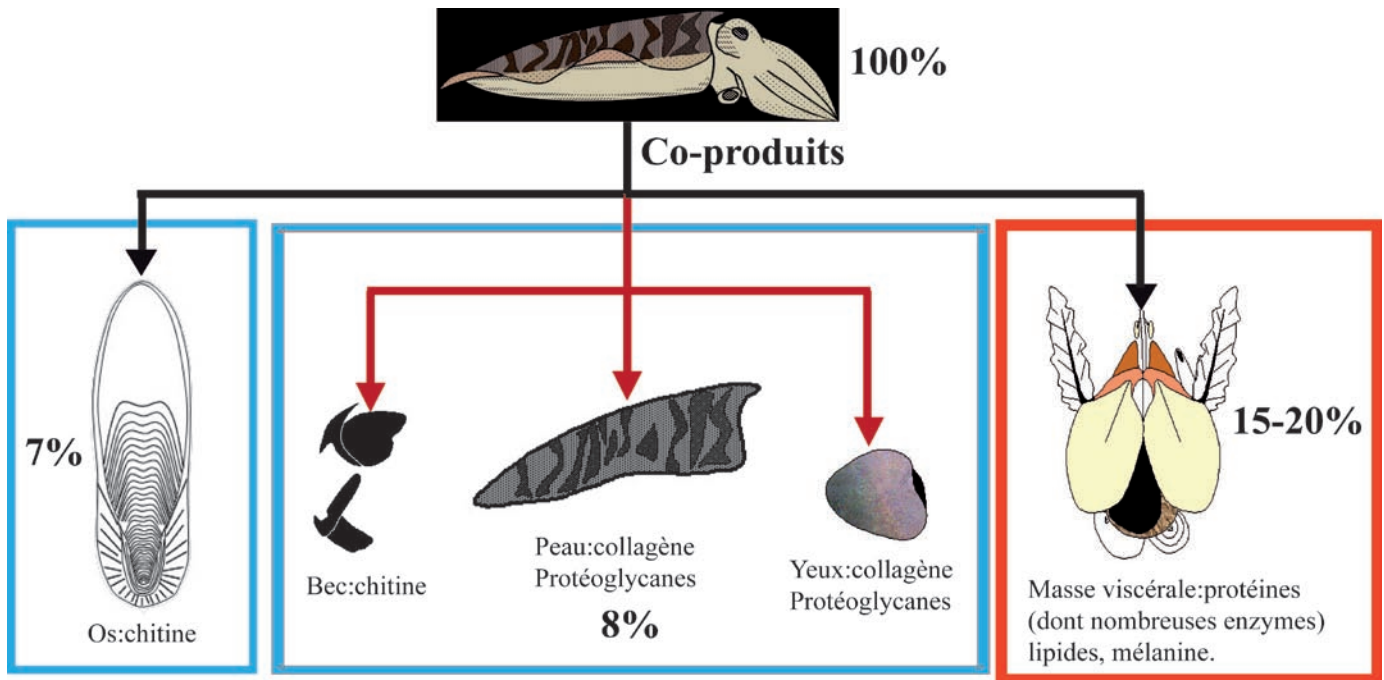


Figure III.1: Proportion des différents co-produits obtenus à l'issue du processus de transformation à l'usine en vue d'exportation.

Tableau III.1 : Bilan matière de la chaîne de conditionnement de la seiche : matière première, co-produits et produit fini.

	Poids (kg)	Rendement par rapport au céphalopode entier (% en masse)
Seiches entières	6,7	-
Manteau (blanc)+bras	4,34	64,7
Yeux+ Peaux+bec	0,53	8
Viscères	1,34	20
Sépion	0,49	7,3

Les différents co-produits sélectionnés pour l'étude sont ensuite caractérisés : viscères sans encre (V-E) et viscères avec encre (V+E).

I.1.2 Caractérisation biochimique des matrices non hydrolysées

I.1.2.1 Composition biochimique proximale

La Figure III.2 représente la distribution en sucres, lipides, cendres et protéines des viscères de seiche avec ou sans la poche du noir. A l'instar de la plupart des matrices vivantes, les viscères de seiche sont composés d'environ 80% d'eau (79% pour les viscères avec encre et 75% pour les viscères sans encre). Les deux matrices ont une composition biochimique presque semblable. Les protéines sont la fraction biochimique la plus importante mais les proportions retrouvées dans les matrices sont différentes : 70,64 % dans les viscères

sans encre et 82,54 % dans les V+E. Les lipides représentent environ 20% de la matière sèche quand le matériel biologique est dépourvu de la poche du noir et 8% quand la poche du noir n'est pas enlevée. Etant donné l'importance accordée à la fraction protéique dans cette étude, une analyse plus fine des acides aminés est donnée plus loin. Enfin, les cendres varient autour de 7 % de la matière sèche pour les deux types de matrices.

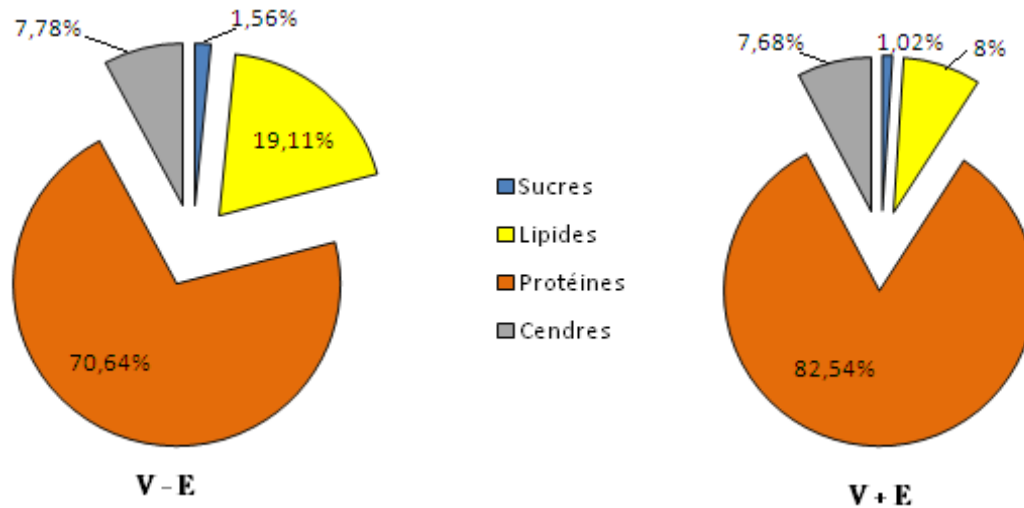


Figure III.2: Proportions des composants chimiques majeurs et de cendres dans les viscères de seiche avec et sans la glande d'encre.

I.1.2.2 Analyse des protides

I.1.2.2.1 Les protéines totales et les acides aminés

Les quantités de protéines retrouvées dans les viscères (V+E et V-E) par rapport à la matière sèche et à la matière fraîche sont données dans le Tableau III.2 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 la quantité d'azote total obtenue après dosage par la méthode Kjeldahl.

Tableau III.2 : Teneur en protéines des viscères de seiche par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche.

	quantité de protéines en g pour 100 g	
	de matière fraîche	de matière sèche
Viscères (V-E)	17,6 ± 0,3	70,9 ± 0,8
Viscères (V+E)	20,1 ± 0,1	80,4 ± 0,4

Tous les acides aminés pouvant être quantifiés par le guide EZ :faast™ sont listés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Acides aminés et composés associés déterminés par le kit EZ :faast d'analyse des protéines des hydrolysats par CPG.

Désignation chimique	Abbréviation
Acide α -Amino adipique	AAA
Acide α -Amino butyrique	ABA
L-Alanine	ALA
L-Asparagine	ASN ^a
L-Acide aspartique	ASP
L-Acide glutamique	GLU
L-Cystine	C-C
L-Glutamine	GLN ^a
L-Glycine	GLY
L-Histidine	HIS
Hydroxylysine (2 isomères)	HLY
4-Hydroxyproline	HYP
L-Isoleucine	ILE
L-Leucine	LEU
L-Lysine	LYS
L-Méthionine	MET
L-Ornithine	ORN
Phénylalanine	PHE
Proline-Hydroxyproline (dipeptide)	PHP
L-Proline	PRO
Sarcosine	SAR
L-Serine	SER
L-Thréonine	THR
L-Tryptophane	TRP ^b
L-Tyrosine	TYR
L-Valine	VAL

^a TRP est complètement perdu durant l'hydrolyse acide.

^b ASN et GLN sont quantitativement transformés en ASP et GLN.

D'après le tableau III.4, on constate que les viscères comprenant l'encre sont presque deux fois et demie plus riches en acides aminés (1,725 mmoles) que les viscères où l'on a retiré la glande (0,734 mmoles/g M.S). Tous les acides aminés essentiels sont présents dans les deux matrices, sauf pour le Tryptophane qui est complètement détruit durant l'hydrolyse acide.

Tableau III.4 : Composition moyenne (mmole/mg M.S) en acides aminés des viscères de seiche avec et sans la glande d'encre.

Acides aminés liés	V-E	V+E
ABA	0,0 ± 0,0	0,017 ± 2.10 ⁻⁴
ALA	0,078 ± 2.10 ⁻³	0,335 ± 0,0
ASN	0,010 ± 4.10 ⁻⁴	0,0 ± 0,0
ASP	0,050 ± 3.10 ⁻³	0,043 ± 3.10 ⁻⁴
GLU	0,083 ± 0,0	0,090 ± 5.10 ⁻³
GLY	0,044 ± 10 ⁻³	0,332 ± 0,0
HIS	0,002 ± 0,0	0,001 ± 4.10 ⁻⁴
ILE	0,052 ± 0,0	0,095 ± 0,0
LEU	0,082 ± 5.10 ⁻⁴	0,247 ± 0,0
LYS	0,034 ± 3.10 ⁻³	0,048 ± 10 ⁻⁴
MET	0,031 ± 0,0	0,059 ± 0,0
ORN	0,031 ± 10 ⁻⁴	0,014 ± 0,0
PHE	0,037 ± 0,0	0,127 ± 5.10 ⁻⁴
PRO	0,060 ± 6.10 ⁻⁴	0,096 ± 2.10 ⁻³
SAR	0,007 ± 2.10 ⁻⁴	0,0 ± 0,0
SER	0,039 ± 10 ⁻⁴	0,0 ± 0,0
THR	0,027 ± 0,0	0,098 ± 0,0
TYR	0,020 ± 10 ⁻³	0,028 ± 2.10 ⁻⁴
VAL	0,047 ± 5.10 ⁻⁴	0,095 ± 10 ⁻⁴
TOTAL	0.734	1,725

Les acides aminés essentiels (AAE) constituent une part très importante des acides aminés avec environ 40 % pour la matrice V+E et 36 % pour la matrice V-E. Il s'agit de la Lysine, Méthionine, Phénylalanine, Thréonine, Valine, Leucine et l'Isoleucine. L'Histidine et l'Arginine sont dits semi-essentiels car seuls les nourrissons ont besoin d'un apport exogène (présents dans le lait maternel). Nous les considéreront toutefois comme faisant partie des AAE pour le reste de l'étude. Les AAE sont présents à des proportions plus importantes dans la matrice V+E. Par exemple pour la Phénylalanine, la concentration est de 0,037 mmoles/ mg de M.S pour la matrice sans encre contre 0,127 mmoles/mg de M.S pour les viscères avec encre avec un rapport de 3,5. Cette nette différence de teneurs est expliquée par le fait que la

Phénylalanine est le précurseur de la Tyrosine lui-même à la base de la synthèse de l'eumélanine, procurant la couleur noire à l'encre de seiche (Figure III.3).

Par action de la Phénylalanine hydroxylase, la Phénylalanine est transformée en Tyrosine puis en Dopa par hydroxylation et action de la tyrosinase pour enfin aboutir par oxydation et polymérisation à l'eumélanine. Cependant, la concentration en tyrosine n'est pas exceptionnellement importante (0,028 mmoles) et pas très différente de celle de la matrice V-E.

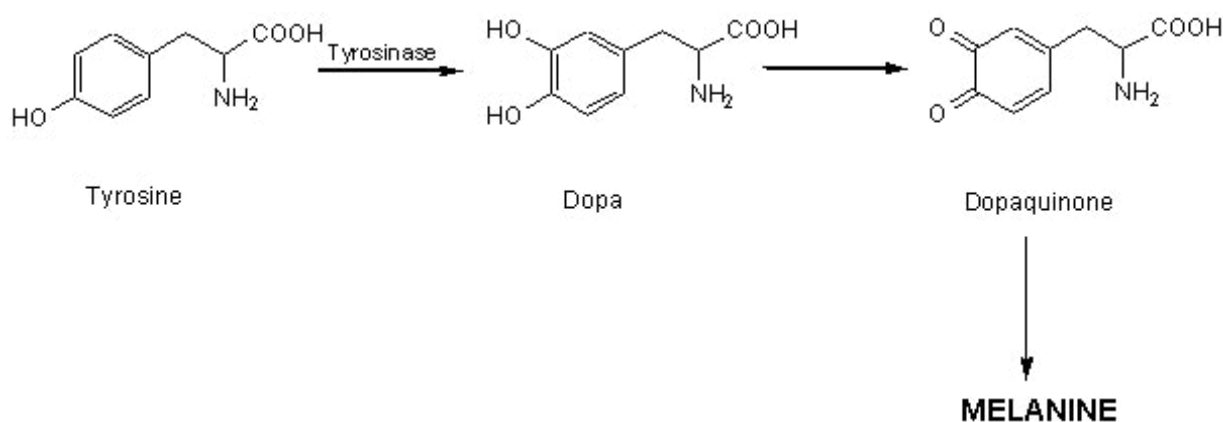


Figure III.3 : Schéma de synthèse de la mélanine.

I.1.2.2.2 Les profils peptidiques

Les profils chromatographiques des poids moléculaires des peptides contenus dans les viscères de seiche non hydrolysés avec encre et sans encre sont reportés sur un même graphique (Figure III.4). On constate que les 2 chromatogrammes sont semblables, à la seule différence qu'à partir de 1000 Da, on remarque un décalage des pics vers des plus petits peptides pour la matrice V+E. Par ailleurs, les D.O des pics obtenus avec les viscères sans encre sont nettement supérieurs à ceux correspondant au substrat V+E. Ceci est probablement dû à la concentration en protéines initialement injectée.

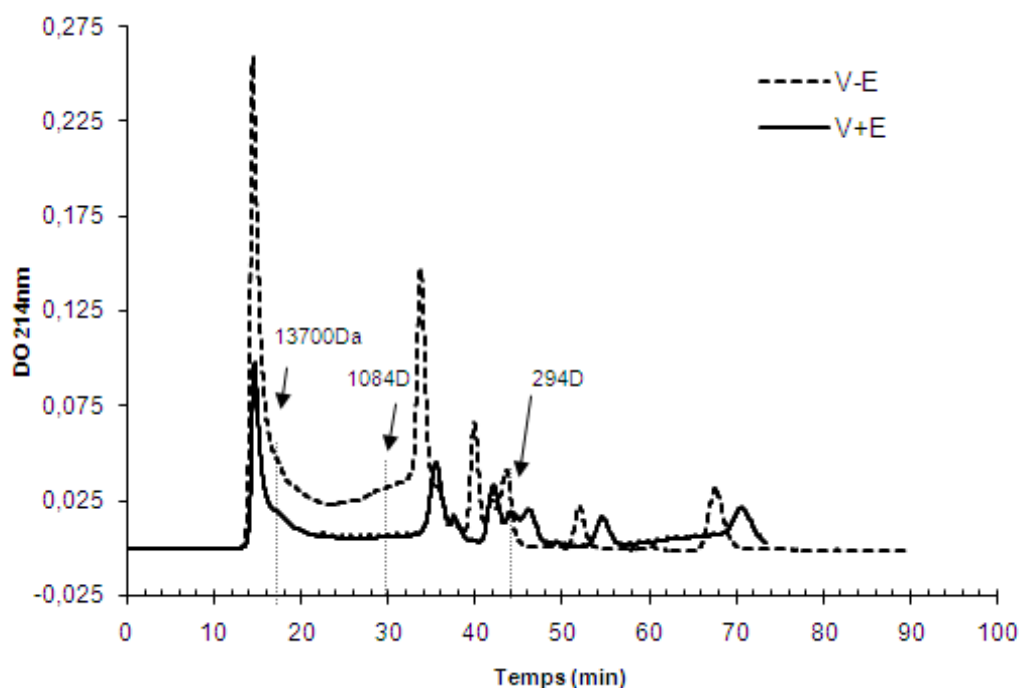


Figure III.4 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sue colonne Superdex peptide HR 10/30 des viscères de seiche avec (V+E) et sans encre (V-E) non hydrolysés. Calibration : Ribonucléase A (13700 Da), Insuline (5700 Da), Insuline B (3400 Da), Vitamine B12 (1300 Da), Bradykinine (1060 Da), Leu-Tyr (294 Da).

I.1.2.3 Analyse des lipides

I.1.2.3.1 Les lipides totaux et les acides gras

Les quantités de lipides retrouvées dans les viscères par rapport à la matière sèche et à la matière fraîche sont données dans le Tableau III.5 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). L'analyse par RMN servira ultérieurement pour un nombre plus important d'échantillons (les trois phases des hydrolysats).

Tableau III.5 : Teneur en lipides des viscères de seiche par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche.

	quantité de lipides en g pour 100 g	
	de matière fraîche	de matière sèche
Viscères (V-E)	4,8 ± 0,7	19,1 ± 0,2
Viscères (V+E)	2,9 ± 0,2	8,7 ± 0,5

Les valeurs moyennes de la composition en acides gras des matrices V+E et V-E sont consignées dans le Tableau III.6 Une analyse de variance sur ces teneurs relatives a été effectuée afin d'identifier quels sont les acides gras dont les proportions sont significativement différentes au seuil de 5% pour les deux types de matrices.

Tableau III.6: Composition moyenne en acides gras des viscères de seiche (%).

Acides gras	V-E	V+E
C14:0	7,92 ± 0,1	7,73 ± 0,1
C15:0	0,44 ± 0,008	0,41 ± 0,02*
C16:0	19,18 ± 0,04	19,44 ± 0,03
C18:0	10,2 ± 0,01	9,4 ± 0,05*
C19 :0	3,89 ± 0,002	3,11 ± 0,003
ΣAGS	41,63 ± 0,08	40,09 ± 0,01
C16:1ω7 trans	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,01
C16 :1ω7	5,73 ± 0,09	7,02 ± 0,06*
C18:1ω12	0,3 ± 0,005	0,32 ± 0,001
C18:1ω9	8,1 ± 0,08	9,3 ± 0,1*
C18:1ω7	5,0 ± 0,1	3,92 ± 0,04 *
C18 :1ω6	0,12 ± 0,006	0,14 ± 0,02
C20:1ω12	0,7 ± 0,01	0,39 ± 0,005*
C20 :1ω9	2 ,33 ± 0,08	2,54 ± 0,05*
C22:1ω9	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,03
C24:1ω9	0,22 ± 0,1	0,17 ± 0,02
Σ AGMI	23,12 ± 0,67	24,43 ± 0,13
C16:2ω4	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0
C18:2ω6	0,51 ± 0,01	0,55 ± 0,02
C18:3ω4	0,38 ± 0,0	0,79 ± 0,0 *
C18:4ω3	0,6 ± 0,05	0,34 ± 0,01*
C20:4ω3	0,52 ± 0,001	0,51 ± 0,004
C20:5ω3	12,4 ± 0,02	11,1 ± 0,1
C22:5ω3	2,77 ± 0,02	2,9 ± 0,04
C22:6ω3	19,16 ± 0,2	17,5 ± 0,6 *
Σ AGPI	36,39 ± 4,8	34,09 ± 0,9

* : significativement différent au seuil de 5%

Vingt-trois acides gras ont été identifiés dans les lipides totaux viscères sans encre (V-E) et des viscères avec encre (V+E) de seiche. 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) et en proportions moindres l'acide pentadécanoïque (C15 :0). Les taux en acides gras des viscères sans encre et avec encre ne sont pas significativement différents. Les teneurs en acide palmitique (C16 :0)

sont beaucoup plus importantes que les autres AGS. Ce résultat est en accord avec les travaux de Shyla et al. (2009) sur l'hépatopancreas de la seiche *Sepia pharaonis* où le taux de C16 :0 était de 19,23%. Concernant les acides gras polyinsaturés (AGPI), les pourcentages sont très importants pour les deux matrices (36,39% pour V-E et 34,09% pour V+E) et sont présents à un taux une fois et demi plus important que pour les AGMI (~ 36 et 34%). Les acides $\omega 3$ représentent entre 48% (V+E) et 52% (V-E) des acides gras totaux des viscères de seiche et ~ 97% des AGPI. Les valeurs les plus importantes sont observées pour l'acide docosahexaénoïque (DHA) C22:6 $\omega 3$ qui représente à lui seul ~ 50% pour V-E, suivi de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) C20:5 $\omega 3$ (~33%). Ces résultats correspondent à l'étude de Shen et al. (2007) sur l'huile des viscères de l'espèce de *Sepiella maindroni de Rochebruns*, où ces deux acides gras sont majoritaires et où les AGPI représentent 31% de la totalité des acides gras. Il ressort également de cette analyse que seules les teneurs en C15:0, C18:0, C16:1 $\omega 7$, C18:1 $\omega 9$, C20:1 $\omega 12$, C20:1 $\omega 9$, C18:3 $\omega 4$, C22:6 $\omega 3$ et C18:4 $\omega 3$ varient significativement entre les deux matrices.

I.1.2.3.2 Les 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). La Figure III.5 montre la répartition de ces trois classes de lipides dans les lipides totaux des viscères avec et sans encre. Ces valeurs sont le résultat de la pesée des différentes fractions en sortie de la colonne de silice et après évaporation.

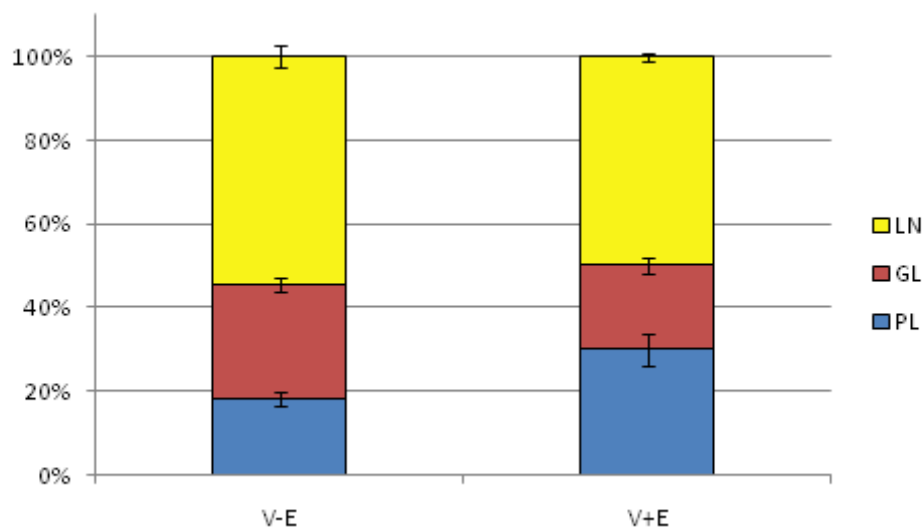


Figure III.5 : Répartition des classes de lipides dans les viscères de seiche avec et sans la glande d'encre.

D'après le graphique ci-dessus, on peut constater que la composition en LN, GL et PL des deux matrices étudiées sont différentes. Les lipides neutres sont prédominants ($55,8 \pm 6,9$ % des lipides totaux pour V-E et $50,4 \pm 1,5$ % pour V+E). Les différences résident essentiellement dans les quantités relatives de phospholipides et de glycolipides. En effet, la teneur en GL pour V-E représente $26 \pm 1,2$ et $20 \pm 1,1$ pour V+E. Ainsi, à cause de sa teneur relativement importante dans les viscères de seiche et du fait des voies de valorisation potentielle, un dosage systématique des phospholipides sera réalisé pour chaque type d'hydrolyse mené et pour les différentes fractions obtenues.

I.1.2.3.3 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse des composés lipidiques par CCM est donnée pour le substrat viscères sans encre (V-E). Le résultat de la migration des composés est présenté sur la Figure III.6. Les rapports frontaux des différentes taches ont été calculés, puis comparés à ceux des standards également déposés sur la plaque. Les différentes taches identifiées dans la migration de l'extrait lipidique ont été numérotées de 1 à 4.

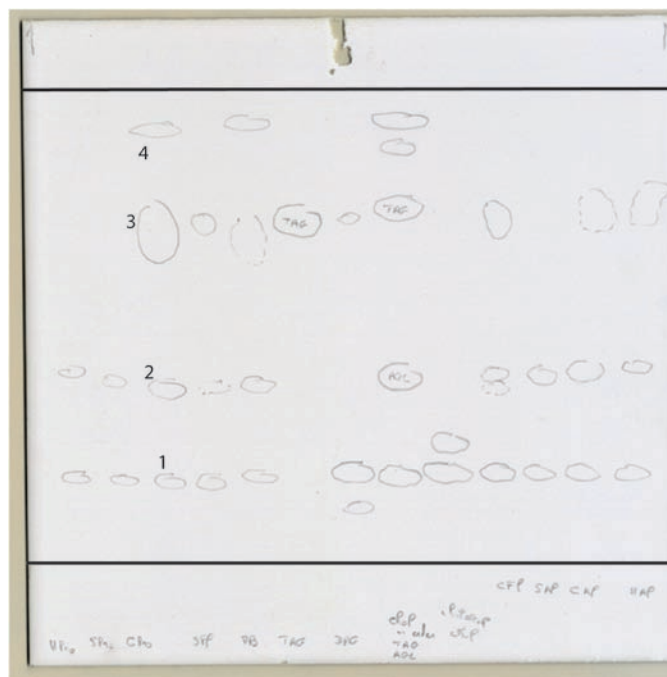


Figure III.6 : Analyse de l'extrait lipidique des viscères de seiche sans encre (V-E) par CCM.

La fraction numéro 1 semble correspondre soit à des MAG, soit à des éthers de glycérols. En effet, lorsque l'on compare les rapports frontaux de ces deux types de composés à celui de la tache 1, on retrouve les mêmes résultats de 0,03 / 0,05. La fraction numéro 2 correspond vraisemblablement à des diacyl glycérols (DAG) ou à des acides gras libres (AGL). En effet, le rapport frontal de 0.18, correspond au rapport frontal de l'une des formes de DAG. Concernant la tache numéro 3, le rapport frontal de 0,54, ainsi que la forte proportion des composés de cette dernière, laisse penser que les composés contenus dans cette fraction, peuvent être des triacylglycérols (TAG). En dernier lieu, la fraction numéro 4 semble être des composés de la famille des stérols. En effet, avec un rapport frontal de 0,25, on retrouve la valeur caractéristique du cholestérol.

I.1.2.4 Discussion

L'objectif de cette partie consistait à caractériser biochimiquement les deux types de matrices (viscères avec encre et viscères sans encre) et de définir jusqu'à quel degré la présence de l'encre peut influencer sur la composition biochimique du substrat d'étude, vue la prédominance de cette fraction dans le co-produit viscères. Il était donc important de comparer les deux matrices et de déterminer l'importance de la présence la glande d'encre avant de procéder au volet hydrolyse enzymatique.

A notre connaissance, aucune étude antérieure n'a porté sur la caractérisation biochimique des viscères de l'espèce méditerranéenne de seiche *Sepia officinalis*, rendant ainsi difficile la comparaison de nos résultats. D'une manière générale, les études portant sur les co-produits de céphalopodes demeurent très rares. L'unique étude sur les viscères de *Sepia officinalis* a concerné une espèce atlantique et s'est intéressée essentiellement aux effets de la durée du stockage ainsi que des différents traitement subis par l'animal juste après la pêche sur la variation de l'activité enzymatique endogène au sein de viscères (Le Bihan et al. 2006).

Cependant, les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par différents auteurs sur la composition des viscères de mollusques céphalopodes (Takahashi 1960 – Lian et al. 2005 - Joseph et al. 2006 – Sherief et al. 2006 – Shen et al. 2007 – Lian et al. 2008 - Shyla et al. 2009). La principale différence dans la composition biochimique de ces deux matrices est la teneur en protéines. Cette différence est vraisemblablement à la présence importante de l'encre. **La richesse en protéines de cette matrice (V+E) en fait une source intéressante pour l'hydrolyse enzymatique à l'aide de protéases commerciales pour des fins**

essentiellement de nutrition animale. Il n'existe pas de précédents travaux sur l'hydrolyse enzymatique des co-produits de la seiche, mais uniquement sur l'autolyse (Le Bihan et al. 2006) ou sur des hydrolysats d'une espèce non méditerranéenne de Calmar (Lian et Lee 2003 - Lian et al 2005 – Lian et Lee 2008). Les travaux portant sur les hydrolysats des viscères de poissons permettent de se tourner vers l'utilisation de ces enzymes pour obtenir une fraction peptidique intéressante (Quaglia et Orban 1987 - Quaglia et Orban 1990 - Ravallec-Plé 2000 - Rousseau et al. 2001 - Ravallec-Plé et al. 2001 - Bordenave et al. 2002).

Les viscères de seiche sont également riches en lipides. Cependant, les analyses ont montré que mais les viscères dépourvus d'encre possèdent des teneurs plus importantes que pour la fraction avec encre. Vu que qu'il s'agit d'un même lot (pas de variabilité biochimique due à la saison ou à l'aire de pêche), cette différence est attribuée au volume important que représente la fraction encre au sein du substrat viscères, une fois la poche du noir éclatée, la fraction lipidique devient minime. En effet, cette glande contient toute une usine enzymatique servant à la mélanogénèse (Ortonne et al. 1981 — D'Ischia et al. 1991 - Prota et al. 1991) et est donc très riche en protéines mais très pauvre en lipides. La fraction mélanine composant l'encre contient également des fragments peptidiques appelés mélano-protéines (Knicker et al. 1995 – Pezzella et al. 1997).

Cependant, cette fraction est potentiellement intéressante notamment du fait de sa composition en acides gras. En effet, les acides gras de la famille des $\omega 3$, 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 - Kris-Etherton et al. 2006) y sont représentés en grandes quantités. Peu de références bibliographiques portent sur la caractérisation des acides gras des co-produits de seiche, notamment les viscères. Néanmoins, ces résultats sont en concordance avec les travaux de Le Bihan et al. (2007) où les proportions en AGPI, même après le processus de traitement en industrie restent relativement élevés. Il a été également démontré que pour l'espèce *Sepia pharaonis*, est une excellente source d'AGPI, particulièrement les $\omega 3$ (Takahashi 1960 - Joseph et al. 2006 - Sherief et al. 2006). Les AGPI (C18:2 $\omega 6$, C18:3 $\omega 4$, C20:5 $\omega 3$ et C22:6 $\omega 3$) ont été définis comme sources nutritives importantes pour la croissance des larves de crustacés (D'Abramo et Sheen 1993 – Cavalli et al. 2001). Des effets « booster » de la croissance ont été observés pour *Macrobrachium rosenbergii* suite à un régime alimentaire riche en AGPI (C \geq 20 $\omega 3$) à partir de lipides d'origine marine (Sandifer et Joseph 1976).

L'analyse des acides aminés liés montre la présence de presque tous les acides aminés essentiels (le TRP n'est pas dosé), ce qui fait des viscères un produit intéressant pour la valorisation en nutrition, notamment animale. Par ailleurs, Derby et al. montrent des similarités au niveau des acides aminés notamment de la teneur en Tyrosine et en Phénylalanine (Derby et al. 2007). Ces résultats sont également en accords avec les études de Lian et al. (2003 – 2005).

Compte tenu de leur forte richesse en protéines, la suite du travail sera orientée essentiellement dirigé vers la valorisation des protéines et des peptides. Ainsi, l'analyse de la composition en acides aminés sera systématiquement réalisée pour toutes les réactions d'hydrolyse. La fraction lipidique est également présente mais en quantité moindre. Par conséquent, uniquement des analyses de la teneur en lipides totaux et en phospholipides seront menées dans le reste de cette étude.

CONCLUSION

Cette analyse de la composition biochimique de la matière première des deux types de matrices a permis de constater que la présence ou l'absence de l'encre dans les co-produits viscères induit des variations dans la composition biochimique. Ainsi, pour les premiers essais des hydrolyses de 24 heures, nous allons utiliser comme substrat les viscères sans encre afin d'observer le comportement de la matière première avec les protéases. Dans la suite du travail, une comparaison entre les rendements biochimiques des deux matrices suites aux hydrolyses enzymatiques sera effectuée.

I.2 DETERMINATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES ENZYMES ET DES VISCERES DE SEICHE

I.2.1 Activité spécifique des enzymes commerciales

Dans cette partie, les activités spécifiques des enzymes utilisées pour les hydrolyses de longue durée sur la matrice V-E - à savoir Protamex, Alcalase et Flavourzyme - et celles choisies pour les hydrolyses de six heures sur la matrice V+E – à savoir - Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral ont été déterminées. Les trois enzymes choisies Protamex, Alcalase et Flavourzyme sont commercialisées par la société Novozymes AS (Danemark). Les trois autres enzymes, à savoir Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral sont commercialisée

respectivement par Sigma-Aldrich (France), DSM Food Specialities (Seclin, France) et Genecor (Danisco Division, Denmark).

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 alors que le substrat utilisé 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, l'activité de Flavourzyme est donné en unité Leucine Amino Peptidase (LAPU), basée sur l'hydrolyse de la L-leucine-p-nitroanilide, celle de Delvolase est mesurée une méthode modifiée d'Anson, basée sur l'hydrolyse de l'hémoglobine et celle de la Pepsine en mEq de tyrosine. Une standardisation des activités est donc nécessaire.

Le dosage des activités enzymatiques est effectué à 50°C et à pH 8 (Dumay et al. 2006). Les activités spécifiques sont données en mU où à 1 U correspond 1 mg de BSA hydrolysée en une heure. Les résultats des activités protéolytiques des différentes enzymes sont consignés dans le tableau III.7.

Tableau III.7 : Activités protéolytiques des enzymes commerciales sur un substrat modèle obtenues à 50°C et à pH 8.

	Activité protéolytique (mU)
Alcalase 0,1%	1677,3 ± 23,1
Delvolase 0,1%	1184,6 ± 4,8
Pepsine 0,1%	1089,3 ± 10,5
Multifect Neutral 0,1%	544,6 ± 3,9
Protamex 0,1%	532,7 ± 13,5
Flavourzyme 1,5%	275,6 ± 3,9

D'après les résultats obtenus, Alcalase est l'enzyme la plus active sur un substrat modèle qui est l'hémoglobine, suivie de Delvolase et de la Pepsine. Les activités de Protamex et de Multifect Neutral sont proches. Flavourzyme est l'enzyme possédant la plus faible activité. L'Alcalase utilisée pour cette étude est une Alcalase 2,4L, ce qui signifie qu'elle possède 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 inférieure, ce qui explique les différences obtenues sur le substrat modèle.

I.2.2 Activité spécifique des enzymes endogènes

L'étude de l'activité protéolytique des enzymes endogènes présentes dans les viscères est particulièrement importante dans le but de connaître les mécanismes intervenant au cours de l'hydrolyse, surtout que dans notre cas, les endoprotéases ne sont pas inactivées. Ainsi, elle permet la bonne compréhension des mécanismes de protéolyse et fournit d'importantes informations concernant le degré d'hydrolyse.

La seiche *Sepia officinalis* possède un cycle de vie court et est caractérisée par un taux de croissance élevé (Manglod et Boletzky 1973 – Clarke et al. 1989 – LeGoff et Daguzan 1991). Cette croissance rapide et leur métabolisme à prédominance protéique impliquent un fort renouvellement protéique et par conséquent des activités protéolytiques importantes.

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) (Huss 1988). Les principales enzymes identifiées dans le tractus digestif de *Sepia officinalis* sont les cathepsines, la trypsine, chymotrypsine, amylase, lipase et la pepsine (Perrin et al. 2004)

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), l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique des viscères a été estimée à 30558 ± 57 mU avec une concentration en protéines solubles de 8,9 g/L. La plupart des enzymes endogènes digestives sont actives à pH alcalin, malgré un pH acide du substrat d'origine (~6,4) et à un intervalle de température de 35 à 60°C (Castillo-Yañez et al. 2004). Ainsi, sous les conditions opératoires déterminées, les activités des enzymes protéolytiques des viscères de seiche 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).

Le Tableau III.8 récapitule les différentes conditions d'utilisation de quelques unes des enzymes spécifiquement trouvées dans les viscères la seiche *Sepia officinalis* (Le Bihan 2006).

Tableau III.8: Conditions opératoires optimales des principales enzymes endogènes des viscères de la seiche *Sepia officinalis*

Enzyme	pH	Température (°C)
Cathepsine	2-7	25-40
Trypsine	7-8	35-60
Chymotrypsine	6-8	25-40

Les viscères possèdent une machinerie enzymatique diversifiée, due aux fonctions digestives. Très peu d'équipes ont étudié l'activité enzymatique interne des viscères de la seiche *Sepia officinalis* (Boucaud-Camou 1973 - Perrin et al. 2004, Le Bihan et al. 2006 – Le Bihan et al. 2007). En revanche pour les poissons, de nombreuses études réalisées par différents auteurs se sont tournées vers ces matrices (Gildberg et Almas 1986 - Gildberg 1992 - De Vecchi et Coppes - 1996 - Delbarre-Ladrat et al. 2004).

Différents phénomènes sont observés au niveau des viscères de la seiche *Sepia officinalis* entre le moment où l'animal est pêché et lorsque la seiche est transformée (Le Bihan et al. 2007). D'abord une rupture des lysosomes qui induit une augmentation des activités enzymatiques acides et donc une diminution du pH. Secondairement, la dégradation des vésicules à zymogène contenant les enzymes secrétées entraîne une augmentation de l'activité de celle-ci. Enfin, une légère hydrolyse des viscères est observée. En effet, le taux d'autolyse est déterminé par l'activité des enzymes digestives présentes dans les tissus (Raa et Gildberg 1982). Puisque les protéines sont les composantes majeures des viscères de seiche (Boucaud-Camou 1973), ce sont principalement les protéases qui sont responsables de l'autolyse. Les enzymes digestives des poissons marins, des crustacés et des mollusques diffèrent de leurs homologues de mammifères en ce qui concerne l'effet du pH et de la température sur leur activité. Généralement, leur activité protéolytique, à faible température est plus élevée que pour les animaux terrestres (Kolodziejka et Sikorski 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 (Sovik et Rustad 2005) sont aussi fréquemment citées. L'estomac des poissons qui secrète de l'HCl contient de la pepsine, protéase aspartique synthétisée sous forme de pepsinogène. Beaucoup de poissons possèdent deux sortes de pepsines : la pepsine I et la pepsine II. Celles-ci digèrent l'hémoglobine à un taux maximal respectivement dans des zones de pH de 2 à 4. La pepsine de poisson et la cathépsine D ont des propriétés moléculaires très similaires, d'où

l'hypothèse proposée selon laquelle la cathepsine D est l'enzyme ancestrale des aspartiques protéases présentes chez les vertébrés. En effet, la pepsine n'a jamais été détectée chez les invertébrés. Par contre, la cathepsine D, aussi bien que les autres cathepsines agissent bien à la fois en tant qu'enzyme digestive et lysosomale chez beaucoup de ces animaux. Chez la seiche, les protéases acides correspondent principalement aux cathepsines qui ont un pH optimal compris entre 2 et 6 lorsqu'elles sont dosées avec l'hémoglobine en tant que substrat.

I.3 HYDROLYSES A L'ECHELLE DE LABORATOIRE

I.3.1 Hydrolyses de 24 heures avec contrôle de pH

Cette partie porte sur l'hydrolyse enzymatique des viscères de seiches caractérisées dans le Chapitre I.1, à l'aide de protéases industrielles et sans inactivation des enzymes endogènes. Etant donnée l'importance de la fraction encre et la variation engendrée par cette dernière dans la composition biochimique du substrat, nous avons dans une première approche enlevé la glande d'encre du tractus digestif. L'objectif de cette manipulation est d'observer le comportement de la matière première avec les enzymes choisies sans cette encre et pendant des hydrolyses de longue durée.

Dans un premier temps, les hydrolyses sont réalisées pendant 24 heures dans les conditions optimales déterminées par Dumay et al. (2006), c'est-à-dire à **pH8 et à 50°C** avec les trois enzymes suivantes : **Protamex, Alcalase et Flavourzyme**. En effet, d'après cet étalonnage effectué à échelle de laboratoire, le domaine fonctionnel de température de ces trois enzymes varie de 30°C à 60°C. Malgré que la température optimale pour Protamex et Alcalase est de 60°C, 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, il est préférable 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 et les trois enzymes possèdent une activité optimale à pH 8 (Dumay 2006).

Il est important de noter que 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

donne une activité maximale à pH 6,5 (Novozymes - 2001c. Le même constat a été relevé pour Flavourzyme, où l'optimum indiqué par la fiche technique était situé à pH 7 (Novozymes - 2001b).

Comme évoqué précédemment, les activités spécifiques des enzymes présentent une allure asymptotique en fonction de la concentration en enzyme (Cuvellier 1999). Cependant, l'efficacité en enzymes n'est pas toujours proportionnelle à de fortes concentrations en enzymes. Ainsi, pour ces raisons 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**) (Dumay 2006).

L'objectif de cette partie du travail est donc d'effectuer un criblage des enzymes et d'observer le comportement de la matière première avec les protéases en poussant les hydrolyses au maximum. Il s'agit également de comparer les trois enzymes testées et de prédire quelle pourrait être la récupération maximale de lipides, de protéines et d'acides aminés. Les profils peptidiques des hydrolysats protéiques seront également étudiés.

I.3.1.1 Suivi de la cinétique d'hydrolyse et répartition de la matière

Après hydrolyse et centrifugation, trois phases sont distinguées : une phase insoluble (culot), une phase soluble (surnageant) et une interface lipidique très fine (phase lipidique).

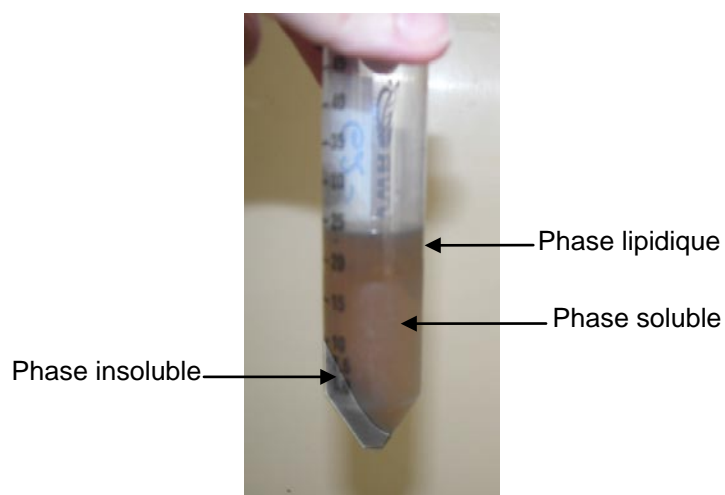


Figure III.7: Les trois phases (lipidique, soluble et insoluble) obtenues après centrifugation de l'hydrolysats de 24 heures des viscères de seiche sans encre.

Comme on peut le constater d'après le Figure III.7, la phase soluble est la phase majoritaire. La phase lipidique correspond à une couche très mince, au-dessus de la phase soluble. Les trois fractions ont été analysées.

L'évolution du degré d'hydrolyse (DH) obtenue pour chaque traitement est représentée sur la Figure III.8.

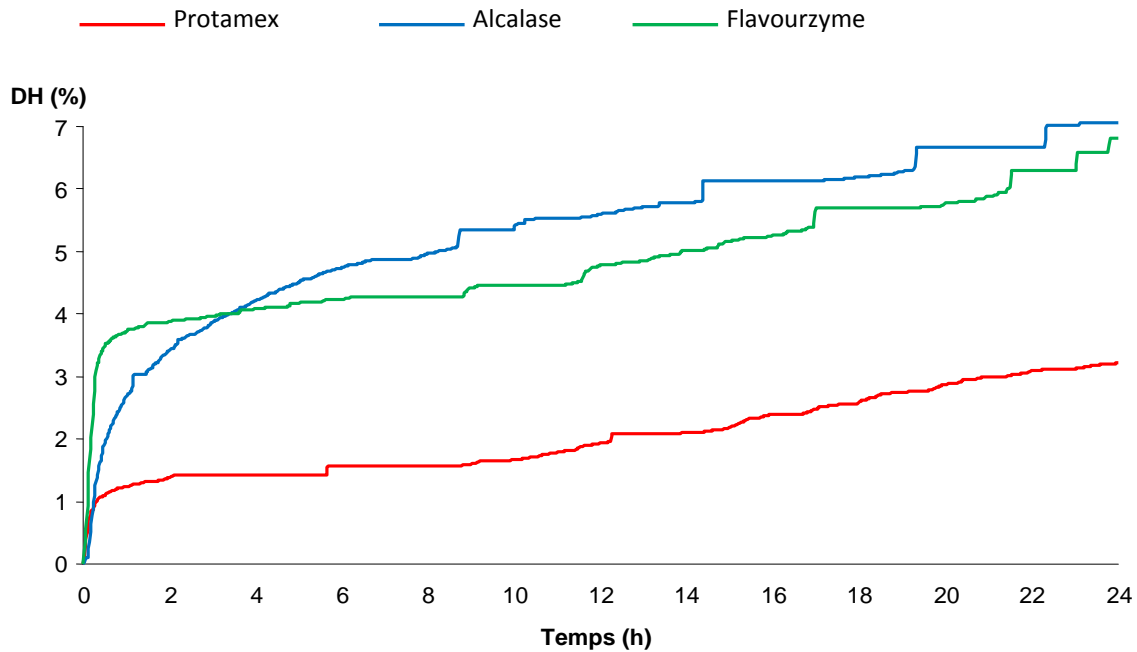


Figure III.8: Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse des viscères de seiche sans encre par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C

La réaction d'hydrolyse débute sans phase de latence. L'allure générale des 3 courbes montre une évolution très rapide durant la première heure d'hydrolyse, correspondant à une consommation accrue de NaOH, suivie rapidement par un plateau. Ensuite, pour les trois enzymes, l'hydrolyse continue mais la cinétique de réaction est plus lente. Au bout de 24 heures d'hydrolyse, les DH obtenus sont de 3,2% pour Protamex, 6,8% pour Flavourzyme et 7% pour Alcalase. Pour Protamex, une légère diminution de l'activité est notée pendant 6 heures, puis l'hydrolyse reprend avec une vitesse assez importante. Deux heures sont nécessaires pour atteindre le plateau avec Protamex (DH = 3,2%). L'hydrolyse conduite avec Flavourzyme se stabilise au bout de moins d'une heure mais reprend longtemps après (au bout de 8 h), où le DH, stabilisé à 4,5%, atteint 6,8% au bout de 24 h. Pour Alcalase, la première phase plateau est atteinte beaucoup plus tard que pour les deux autres enzymes (au bout de 6 h). Cependant, l'hydrolyse continue par phases intermittentes jusqu'à atteindre un degré d'hydrolyse de 7% au bout de 24 h. D'une manière générale, les courbes d'hydrolyse pour Alcalase et Flavourzyme évoluent par des petites augmentations du DH (de 1 à 3%) suivies par des petites phases de paliers.

Les pourcentages des protéines lipides et cendres ainsi que leurs répartitions au sein des trois fractions obtenues après l'hydrolyse et la centrifugation des viscères de seiche sont représentées sur la Figure III.9.

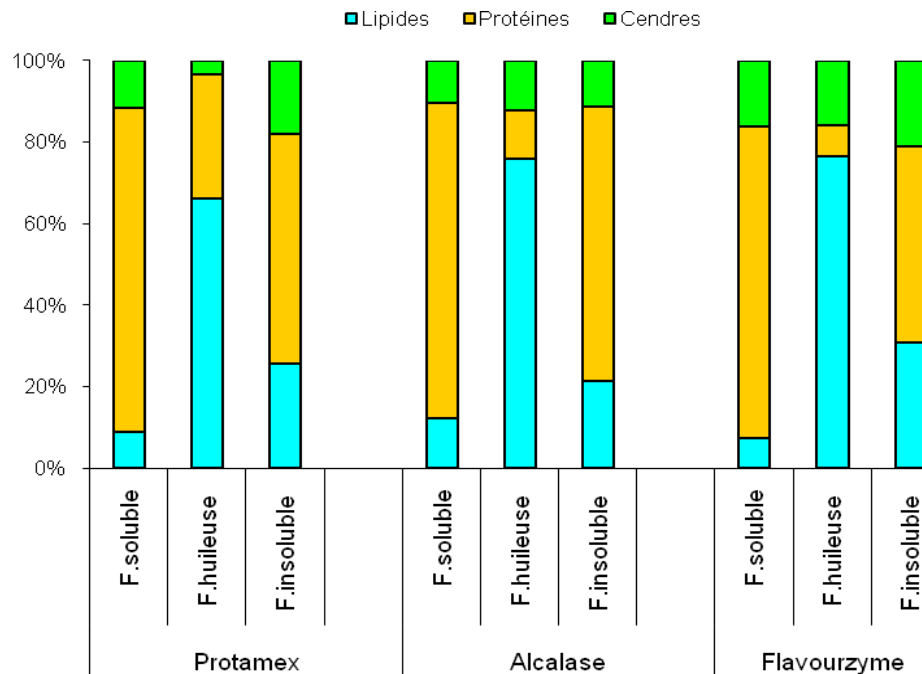


Figure III.9 : Composition biochimique (en %) de la fraction soluble, huileuse et insoluble des hydrolysats de seiche par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C.

On constate que le profil de distribution biochimique est presque similaire pour les trois enzymes : la phase soluble est composée en majeure partie de protéines, la phase huileuse de lipides, et le culot est composé principalement d'un mélange de protéines et de lipides.

En ce qui concerne les différentes répartitions de la matière au sein des trois fractions, les résultats sont représentés sur la Figure III.10. Sans hydrolyse, presque 46% de la matière sont localisées dans la phase insoluble, 26% dans la phase huileuse et 32% dans la phase soluble. **Ainsi, avant hydrolyse, la majeure partie de la matière est localisée dans le culot. Après 24 heures d'hydrolyse, les répartitions de la matière sèche sont radicalement différentes puisque la majeure partie de la matière se retrouve dans la fraction soluble quelque soit l'enzyme utilisée.**

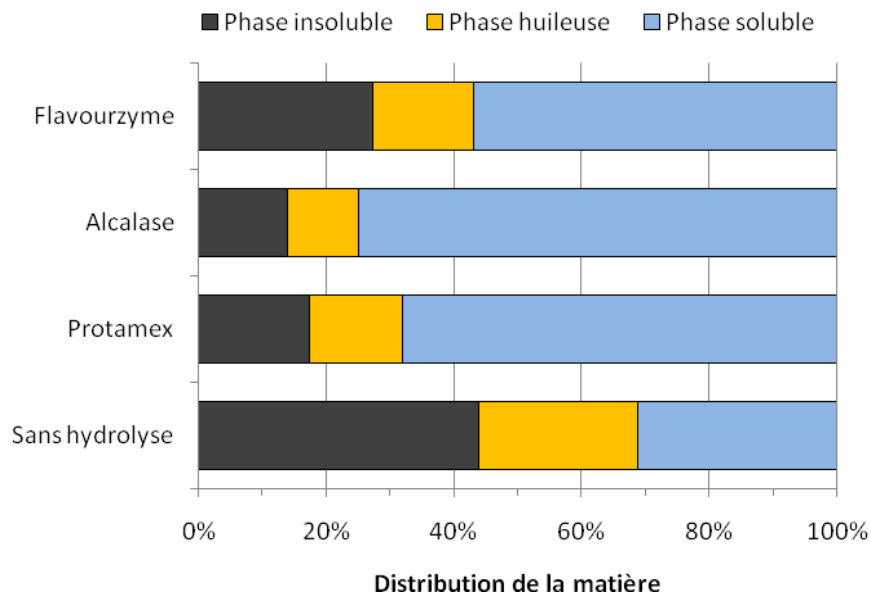


Figure III.10 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les viscères de seiche non hydrolysées et hydrolysées (par Protamex, Alcalase et Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme.

Ainsi, la réalisation d'une hydrolyse enzymatique sur les viscères de seiche permet une solubilisation de la matière. Les profils de Protamex et Alcalase sont assez proches avec 68% et 74% de matière dans la phase soluble respectivement. Flavourzyme conduit à une moins bonne solubilisation de la matière puisque 25% restent dans le culot contre 13% et 17% respectivement pour Alcalase et Protamex.

I.3.1.2 Solubilisation des protéines

Les protéines sont majoritairement solubilisées puisque la plupart d'entre elles sont transformées en peptides. D'après la Figure III.11, Protamex et Alcalase sont les enzymes conduisant à une plus forte solubilisation des protéines puisque le pourcentage dans la phase soluble passe de $21 \pm 0,2$ % à $68 \pm 1,2$ % et $65 \pm 1,5$ % respectivement pour Protamex et Alcalase. Cependant, d'après ces valeurs, on remarque bien que le surnageant n'est composé que de protéines, les lipides se retrouvent également dans la fraction soluble. En effet, d'après le Tableau III.9, le surnageant obtenu après une unique centrifugation des viscères ne comporte que $2,3 \pm 0,2$ 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 30 g de lipides sont retrouvés pour 100 g de matière sèche. Les teneurs en lipides des fractions huileuses demeurent à peu près équivalentes avant ou après hydrolyse.

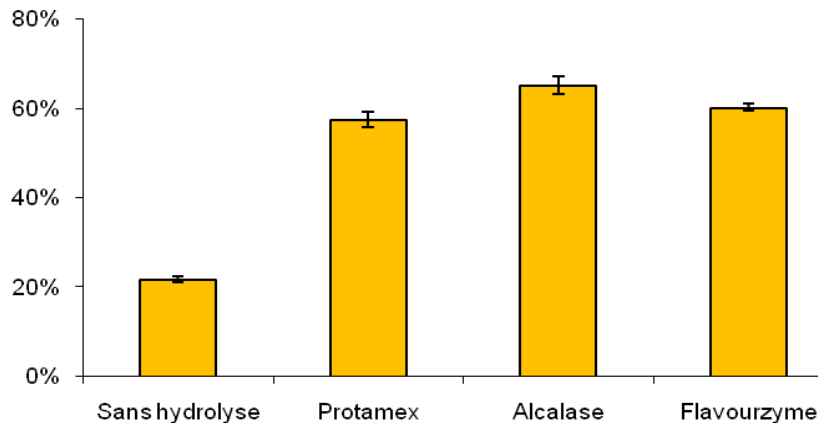


Figure III.11 : Teneur (en %) des protéines dans la phase soluble des viscères avant et après hydrolyse des viscères de seiche par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH8, 50°C et pendant 24 h.

Tableau III.9 : 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 seiche par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH8, 50°C et pendant 24 h.

	Sans hydrolyse	Protamex	Alcalase	Flavourzyme
Phase insoluble	20,1 ± 0,3	31,6 ± 0,2	29,2 ± 0,5	32,4 ± 1,5
Phase huileuse	60,6 ± 0,6	74,5 ± 1,5	76,2 ± 1,8	75,1 ± 0,1
Phase soluble	2,3 ± 0,2	19,5 ± 1,5	20,0 ± 0,4	16,7 ± 2,1

I.3.1.3 Libération des lipides

La libération des lipides correspond à la capacité qu’ont les hydrolyses enzymatiques d’augmenter la présence des lipides dans les fractions liquides (fraction soluble et fraction huileuse) rendant ainsi possible leur extraction sans avoir recours aux solvants. Après avoir effectué une hydrolyse enzymatique sur les viscères de seiche, la quantité de lipides extraits est plus importante que lors d’une extraction classique (Figure III.12) puisque la teneur en lipides des viscères, initialement de $0,19 \pm 0,00$ g de lipides par g de viscères sèches, passe à plus de 0,31 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. Après calcul du ratio lipidique (lipides contenus dans la fraction liquide + lipides de la fraction huileuse + lipides de la fraction insoluble / lipides contenus dans les viscères non hydrolysés), il apparaît que Protamex et Flavourzyme produisent des valeurs de rapports quasiment similaires de 1,49 et 1,50, respectivement, alors que pour Alcalase, le ratio est de 1,24. 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. D’une manière générale, la

fraction soluble est la fraction qui comporte la plus grande partie de lipides (40 à 53% des lipides totaux), suivie de la fraction huileuse (32 à 36% des lipides totaux), et enfin la fraction insoluble qui ne possède que 11 à 25% des lipides totaux. Ces résultats montrent donc qu'à peu près 90% des lipides totaux peuvent être récupérés sans utilisation de solvants.

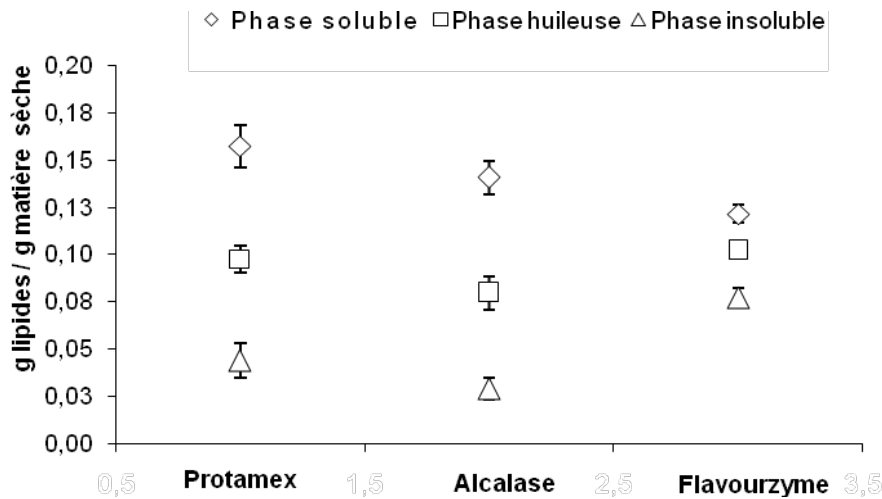


Figure III.12 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de seiche. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme.

I.3.1.4 Distribution des phospholipides

La distribution des phospholipides dans les trois fractions est présentée dans la Figure III.13. D'après les résultats, il apparaît d'une manière générale que la phase soluble des hydrolysats des viscères de seiche contient les taux les plus importants de phospholipides avec des pourcentages de 57%, 52% et 51% respectivement Flavourzyme, Alcalase et Protamex. La phase huileuse quant à elle comprend 25 à 28 % des phospholipides et le culot moins de 22%. En comparant les teneurs en phospholipides par rapport à une extraction organique classique (viscères sans hydrolyse) et en calculant les ratios, on constate que l'hydrolyse avec Flavourzyme permet une meilleure libération (au seuil de 5%) des phospholipides par rapport à celles obtenues classiquement avec une augmentation dans la phase aqueuse d'un facteur de 3. Par contre, l'hydrolyse enzymatique par Alcalase permet quant à elle une amélioration de la teneur en phospholipides de 1,5. Cependant, Protamex ne permet pas significativement (au seuil de 5%) d'obtenir une plus grande libération des phospholipides par rapport à celles obtenues classiquement.

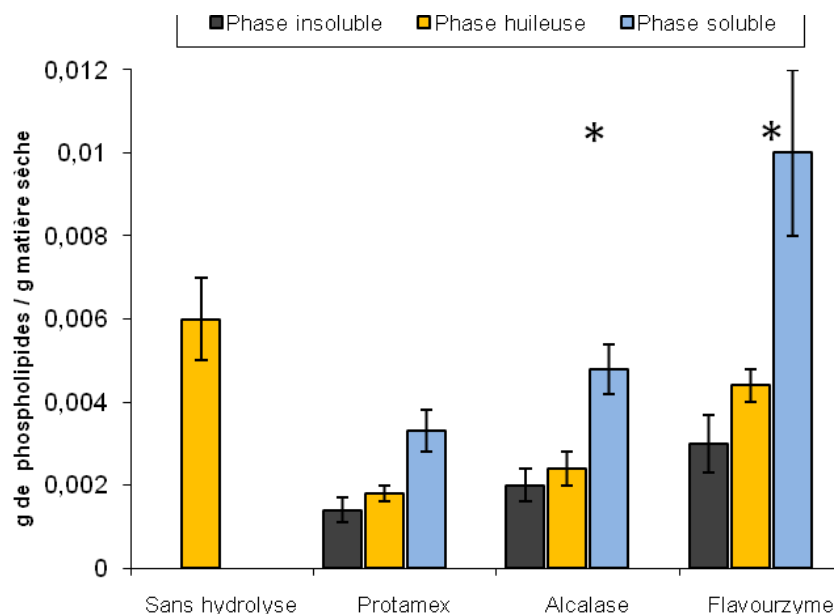


Figure III.13 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de seiche en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau 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%.

I.3.1.5 Distribution des acides gras

La répartition des acides gras dans la fraction insoluble est identique quel que soit le traitement effectué. Après hydrolyse, la fraction insoluble possède une part importante d'AGS (de 70 à 75%), les AGMI représentent environ 30% des acides gras totaux. Concernant les AGPI, ils sont retrouvés en très faibles proportions (2 à 4%).

Les hydrolyses enzymatiques réalisées avec Protamex et Alcalase induisent une répartition similaire des acides gras dans les fractions huileuses. En effet, pour les deux enzymes, cette fraction est composée de 40% d'AGS, 25% d'AGMI et 13% d'AGPI. La même constatation est effectuée pour les fractions solubles où les AGS sont présents à hauteur de 43% avec Protamex et Alcalase. La fraction soluble de Flavourzyme n'en contient que 27%. Ces fractions possèdent toutes de 20 à 35% d'AGMI. Protamex permet d'obtenir la part la plus importante d'AGPI (30% des acides gras totaux de la fraction soluble), suivie d'Alcalase (20% des acides gras de la fraction soluble). Contrairement aux résultats obtenus sur les phospholipides, l'hydrolyse menée avec Flavourzyme induit la plus faible proportion d'AGPI (12%).

I.3.1.6 Profils moléculaires des peptides

Les profils d'élution des peptides des viscères bruts (non hydrolysés) et générés par les hydrolyses sont représentés sur la Figure III.14. D'après les chromatogrammes, on constate que le profil obtenu par les viscères de seiche non hydrolysés est différent de ceux obtenus après hydrolyse. En effet, lors de l'analyse des viscères non hydrolysés (profil A), un pic important est relevé en début de chromatogramme, représentant des composés de haut poids moléculaire ($> 13,700$ Da). 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 1000 Da. Cependant, la majorité des pics obtenus sont situés inférieure entre 1084 et 294 Da. En superposant les trois profils avec les trois enzymes, on constate qu'il n'existe pas de différences entre les chromatogrammes de Protamex et Flavourzyme. Par contre, la distribution des poids moléculaires avec Alcalase présente un léger décalage avec les deux autres, ce qui veut dire que les pics les plus importants correspondent à des poids moléculaires plus petits.

I.3.1.7 Composition en acides aminés

La composition totale en acides aminés avant et après 24 heures d'hydrolyse des viscères de seiche avec Protamex, Alcalase et Flavourzyme sont reportés dans le tableau III.10. D'un point de vue quantitatif, on constate qu'après 24 heures d'hydrolyse, la concentration en acides aminés passe de 0,7 mmoles/g à 1,5 mmoles/g en utilisant Flavourzyme, 3,0 mmoles/g avec Protamex et 3,5 mmoles/g pour les hydrolysats d'Alcalase. Ainsi l'hydrolyse réalisée avec Alcalase permet une augmentation de la teneur en acides aminés d'un facteur de 5. La matière brute non hydrolysée contient 18 acides aminés (Tableau III.10). Après hydrolyse, 23 acides aminés (ou composés relatifs) ont pu être détectés avec les 3 enzymes utilisées, montrant ainsi que 5 acides aminés supplémentaires ont pu être libérés suite à la protéolyse. En effet, l'acide α -aminoadipique (AAA), l'acide α -aminobutyrique (ABA), la Cystine (C-C), la Glutamine (GLN) et la Proline-Hydroxyproline (PHP) qui n'étaient pas détectés dans les viscères non hydrolysés sont apparus suite aux hydrolyses : le AAA a été libérés suite à l'hydrolyse par Flavourzyme, ABA par Protamex, C-C par Alcalase, GLN par Alcalase et PHP par Alcalase.

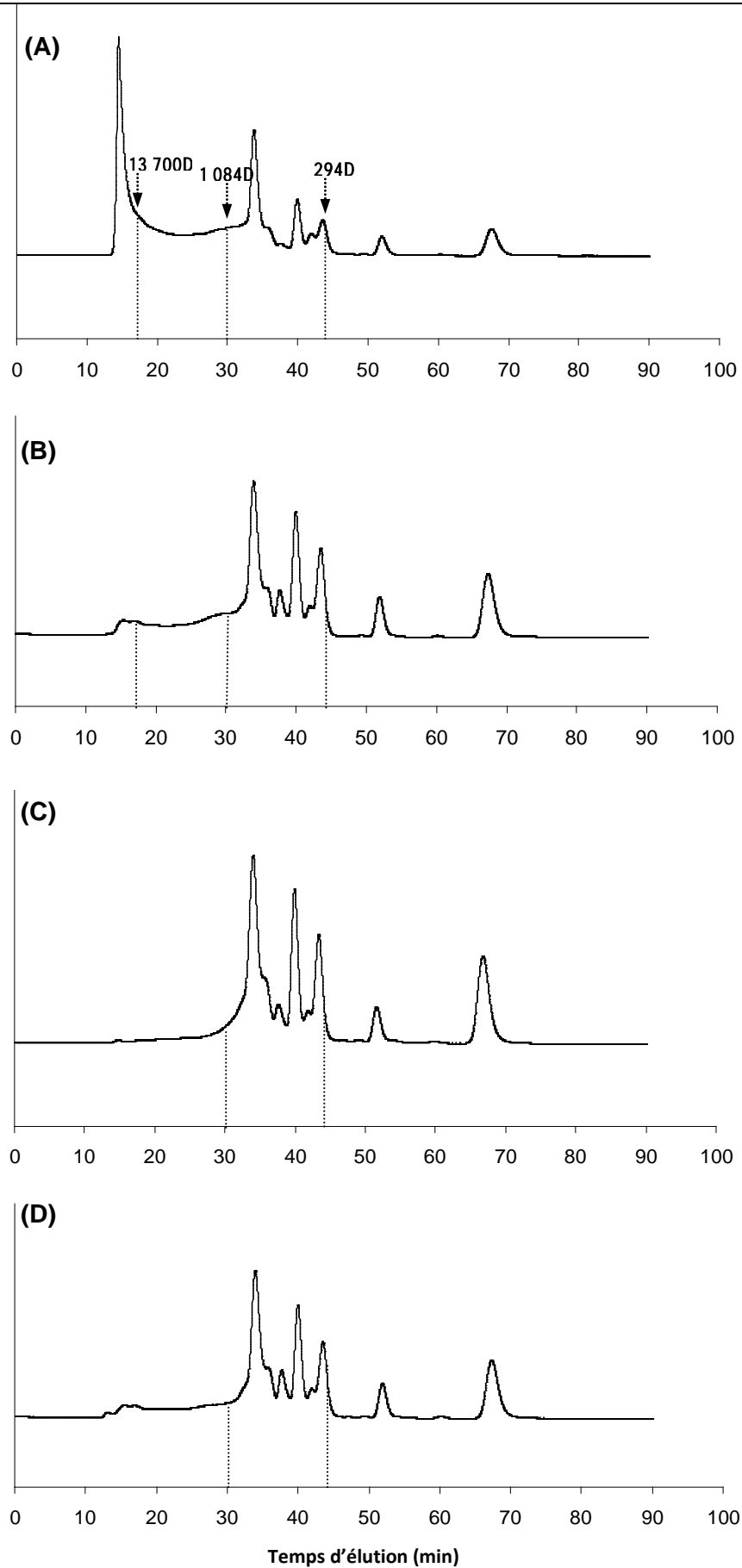


Fig III.14: Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de viscères de seiche lors des hydrolyses de 24 h à pH 8 et à 50°C. A : viscères de seiche brutes; B: viscères de seiche hydrolysées avec Protamex 0,1%; C : viscères de seiche hydrolysées avec Alcalase 0,1%; C : viscères de seiche hydrolysées avec Flavourzyme 1,5%. (1) Ribonucléase (13,700 Da); (2) Vasopressin (1,084 Da); (3) Leucin-Tyrosin (294 Da).

D'autres par contre ont disparu soit par destruction par l'hydrolyse acide précédant l'analyse, comme pour l'Asparagine (ASN), soit par complexation comme le cas de la Sarcosine (SAR) et la Serine (SER) avec Flavourzyme. Avant hydrolyse, le taux d'acides aminés essentiels (AAE) était de 42% dans le surnageant des viscères de seiche. La quantité maximale d'AEE Après hydrolyse est obtenue avec Protamex (plus de 46% de la concentration totale en acides aminés). Ce taux est significativement différent des deux autres enzymes au seuil de 5%. En termes de concentrations, les acides aminés les plus importants pour la matière non hydrolysée étaient l'acide glutamique, la Leucine et l'Alanine, avec des teneurs respectivement de 11,3%, 11,2% et 10,6% par rapport à la quantité totale des acides aminés. Quelque soit l'enzyme utilisée, l'hydrolyse enzymatique engendre d'importantes modifications dans la composition en acides aminés des hydrolysats.

Tableau III.10 : Concentrations des acides aminés totaux (mmole/mg matière sèche) dans les fractions solubles des hydrolysats de 24 heures des viscères de seiche produits par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%). Les hydrolyses ont été réalisées à 50°C et à pH 8.

Acide aminé	Sans hydrolyse	Protamex	Alcalase	Flavourzyme
AAA	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,003 ± 10 ⁻⁴
ABA	0,0 ± 0,0	0,035 ± 2.10 ⁻³	0,0 ± 0,0	0,022 ± 2.10 ⁻³
ALA	0,078 ± 2.10 ⁻³	0,600 ± 0,0	0,371 ± 2.10 ⁻³	0,344 ± 2.10 ⁻⁴
ASN	0,010 ± 4.10 ⁻⁴	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,000 ± 3.10 ⁻⁴
ASP	0,050 ± 3.10 ⁻³	0,079 ± 3,10 ⁻⁴	0,331 ± 3,10 ⁻³	0,063 ± 5.10 ⁻³
C-C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,00	0,010 ± 6,10 ⁻⁴	0,0 ± 4.10 ⁻⁴
GLU	0,083 ± 0,000	0,080 ± 2,10 ⁻⁴	0,335 ± 4,10 ⁻³	0,0 ± 7.10 ⁻³
GLN	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,047 ± 3,10 ⁻⁴	0,092 ± 5.10 ⁻³
GLY	0,044 ± 10 ⁻³	0,371 ± 0,0	0,380 ± 10 ⁻³	0,218 ± 4.10 ⁻³
HIS	0,002 ± 0,0	0,0 ± 3,10 ⁻⁴	0,0 ± 0,0	0,0 ± 2.10 ⁻⁴
ILE	0,052 ± 0,0	0,302 ± 0,0	0,229 ± 8,10 ⁻⁴	0,122 ± 2.10 ⁻⁴
LEU	0,082 ± 5.10 ⁻⁴	0,357 ± 0,0	0,325 ± 5,10 ⁻⁴	0,172 ± 8.10 ⁻⁴
LYS	0,034 ± 3.10 ⁻³	0,057 ± 2,10 ⁻⁴	0,140 ± 9,10 ⁻³	0,046 ± 7.10 ⁻³
MET	0,031 ± 0,000	0,082 ± 2.10 ⁻³	0,099 ± 2,10 ⁻⁴	0,039 ± 5.10 ⁻⁴
ORN	0,031 ± 10 ⁻⁴	0,035 ± 0,0	0,024 ± 2,10 ⁻³	0,018 ± 0,0
PHE	0,037 ± 0,0	0,132 ± 2,10 ⁻⁴	0,164 ± 5,10 ⁻³	0,068 ± 10 ⁻⁴
PHP	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,072 ± 10 ⁻⁴	0,0 ± 0,0
PRO	0,060 ± 6.10 ⁻⁴	0,256 ± 4,10 ⁻³	0,195 ± 7,10 ⁻⁷	0,104 ± 10 ⁻³
SAR	0,007 ± 2.10 ⁻⁴	0,000 ± 0,0	0,009 ± 0,0	0,0 ± 0,0
SER	0,039 ± 10 ⁻⁴	0,038 ± 0,0	0,228 ± 10 ⁻⁴	0,0 ± 0,0
THR	0,027 ± 0,000	0,019 ± 4.10 ⁻³	0,230 ± 10 ⁻⁴	0,066 ± 2.10 ⁻⁴
TYR	0,020 ± 10 ⁻³	0,058 ± 2.10 ⁻⁴	0,099 ± 0,000	0,017 ± 0,000
VAL	0,047 ± 5.10 ⁻⁴	0,239 ± 10 ⁻³	0,220 ± 10 ⁻³	0,133 ± 0,000
TOTAL	0,734 ± 2.10⁻³	2,894 ± 3.10⁻⁴	3,508 ± 2.10⁻⁴	1,527 ± 4.10⁻³

Les acides aminés les plus abondants sont dans l'ordre, ALA>GLY>LEU pour les viscères de seiche traitées avec Protamex et Flavourzyme et GLY>ALA>GLU avec Alcalase. Deux acides aminés ont montré une teneur 8 fois plus importante que dans les viscères bruts, il s'agit de GLY avec Protamex et Alcalase et ALA avec Protamex, démontrant ainsi une action préférentielle de ces protéases.

I.3.1.8 Discussion

Le but de ce chapitre était de prolonger au maximum le temps d'hydrolyse et d'observer le comportement de la matrice avec 3 protéases commerciales à large spectre. Pour écarter la possibilité d'une inhibition de la cinétique enzymatique par l'encre, cette glande a été enlevée dans cette partie de l'étude. L'intérêt était également de voir, dans ces conditions opératoires si on pouvait obtenir un produit riche en composés biochimiques d'intérêt et donc potentiellement valorisable essentiellement en nutrition animale.

Durant l'hydrolyse, le broyat visqueux de viscères est converti progressivement en un liquide très fluide. Les cinétiques d'hydrolyse observées pour l'ensemble des 3 expériences montrent que d'une manière générale, et quel que soit l'enzyme utilisée, un plateau est rapidement atteint concernant l'hydrolyse des viscères de seiche (Soufi-Kechaou et al. 2009). En effet, le DH dépend directement du nombre des liaisons peptidiques accessibles à l'enzyme et présentes dans l'échantillon de départ, expliquant ainsi l'allure des courbes d'hydrolyse. Tous les sites susceptibles d'être clivés par l'enzyme l'étant peu à peu, le plateau est obtenu. L'allure des courbes d'hydrolyse avec Protamex, Alcalase et Flavourzyme est similaire à celles obtenues avec les hydrolyses sur d'autres co-produits de poissons (Liaset et al. 2003 - Aspmo et al. 2005a). En effet, des études antérieures 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, et 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 (Aspmo et al. 2005a).

Cependant, la reprise de l'activité enzymatique observée avec les 3 enzymes est difficile à expliquer. Elle pourrait provenir d'une contamination bactérienne extérieure ou de la modification de la structure des composés présents dans le milieu réactionnel. La réaction d'hydrolyse se comporte en fait de la même manière que si l'on rajoutait du substrat, ce dernier étant le facteur limitant de l'hydrolyse (Ravallec-Plé 2000). C'est comme si à chaque

fois et après obtention du plateau, il y avait de nouveaux sites à hydrolyser, provoquant un déplacement de la courbe. Ceci serait peut-être dû à la cuisson, la présence d'eau dans le milieu, l'apport en sels provoqué par l'addition de soude ou bien à la formation de nouveaux complexes entre les protéines et les lipides. Par ailleurs, dans d'autres études, il a été démontré que l'addition d'hydrolysats dans le milieu réactionnel provoque une augmentation du DH due à une baisse de pH. La reprise de l'activité enzymatique après les paliers serait peut-être due à l'addition de soude servant à compenser cette baisse.

Les DH obtenus lors de cette série d'expériences sont relativement faibles (3 à 7%) mais sont en concordance avec les résultats sur les activités enzymatiques obtenues par Dumay (2006). Ainsi, le DH le plus élevé est obtenu avec Alcalase (7%), qui possède l'activité la plus importante, suivie de Protamex (6,8%) et Flavourzyme (3,2%). Toutefois, dans le travail de Ravallec-Plé, il a été démontré que la corrélation qui existe entre la quantité de substrat ajoutée et le degré d'hydrolyse explique bien les changements obtenus au cours de la cinétique d'hydrolyse après addition de substrat, confirmant bien qu'il s'agit du facteur limitant pour l'hydrolyse. Ainsi, des DH plus importants peuvent être obtenus avec une plus grande quantité de broyat. Dans notre cas, la quantité de produit de départ n'étant pas très importante (~200 g) les valeurs de DH obtenues sont expliquées.

Il n'existe pas de travaux ayant utilisé Alcalase pour l'hydrolyse des viscères de *Sepia officinalis* ou même de mollusques céphalopodes rendant ainsi difficile la comparaison de nos résultats avec cette enzyme. Toutefois, les valeurs de DH obtenues dans ce travail sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus dans des études portées sur d'autres co-produits de poisson hydrolysés avec Alcalase (Quaglia et Orban 1990 - Ravallec-Plé et al. 2001). Des DH plus importants (pouvant aller jusqu'à 20%) ont cependant pu être obtenus, pour d'autres espèces de poisson (Liaset et al. 2000 - Gbogouri 2006 - Jia et al. 2010) et après avoir réalisé une optimisation des conditions d'hydrolyse (Diniz et Martin 1996 - Nilsang et al. 2005 - Centenaro 2008 - Wassawa 2008).

Dans cette étude, les enzymes endogènes n'ont pas été inactivées. En effet, 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). Par ailleurs, dans le travail de Pastoriza et al., il a été démontré que les enzymes endogènes présentes dans les viscères étaient les plus actives dans les conditions dans lesquelles ont été conduites nos hydrolyses (50°C, pH 8) (Pastoriza et al.

2003). Dans d'autres travaux sur les viscères de poissons, l'inactivation des enzymes endogènes a permis d'obtenir des DH beaucoup plus importants (Guérard et al. 2001 – Dumay et al. 2006). En effet, comme l'a souligné Gildberg, 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 1992). Quoiqu'il en soit, nous avons choisi de ne pas inactiver les enzymes endogènes car cette étape nécessite un traitement thermique supplémentaire pouvant conduire à une déstructuration physique de la matrice et engendrant une dépense énergétique inutile et peu compatible avec les réalités industrielles.

La distribution de la matière sèche dans les différentes phases obtenues suite à la centrifugation, avant et après hydrolyse, indique que **le traitement enzymatique permet une importante solubilisation de la matière**. Avant l'hydrolyse enzymatique, 46% de la matière étaient localisés dans le culot, alors que 13% seulement restent dans cette fraction après hydrolyse. Environ 87% de la matière totale sont donc sous forme soluble. D'autres études similaires sur l'hydrolyse de viscères de morue dans des conditions similaires (24 h de réaction avec Protamex et Alcalase à 55°C, seul le pH et le contrôle de pH changent) montraient également une grande solubilisation de la matière (Aspmo et al. 2005a – Šližytė et al. 2005b). Une autre étude récente portant sur l'obtention d'hydrolysats à partir de co-produits de Lieu de l'Alaska avec, entre autres les mêmes enzymes (Protamex, Alcalase et Flavourzyme) avait montré une très bonne solubilisation de la matière surtout avec Alcalase avec une majorité d'oligopeptides (Jia et al. 2010). **Les résultats que nous avons obtenus indiquent donc que même avec un faible DH, on peut obtenir une grande solubilisation de la matière**. Dans notre cas, il semble qu'Alcalase soit l'enzyme ayant le mieux contribué à la solubilisation de la matière, même si les DH d'Alcalase et Protamex ne montrent pas d'écart important (7 et 6,8% respectivement).

Le taux de recouvrement des protéines dans la fraction soluble après 24 h d'hydrolyse a augmenté significativement (au seuil de 5%) et ce pour les 3 enzymes. En effet, ce pourcentage passe de $21 \pm 0,5\%$ dans la fraction soluble des viscères non traitées à $65 \pm 1,5\%$ avec Alcalase et $58 \pm 1,2\%$ avec Protamex. Ces résultats sont donc en accord avec les valeurs de DH mentionnées auparavant pour ces deux enzymes.

Concernant la composition en lipides, les résultats trouvés dans ce travail indiquent que **les hydrolyses enzymatiques ont permis une plus importante libération des lipides qu'une extraction classique (avec solvant organique)**. En effet, lors des extractions

classiques, même avec 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. Ainsi, un traitement par hydrolyse enzymatique permet une plus grande libération des lipides, du moins une plus grande accessibilité aux molécules, surtout dans le cas de matrices difficilement broyables comme les viscères. Ces résultats ont déjà été obtenus auparavant dans le cadre d'hydrolyses réalisées sur les co-produits de sardine (Dumay et al. 2006 - Soufi-Kechaou et al. 2009). Une amélioration des rendements par une extraction supplémentaire des lipides pourrait être envisageable, mais ceci entraînerait des pertes de temps et une consommation en solvants (Roose et Smedes 1996). Il a été effectivement montré que la majorité des lipides était extraite en deux ou trois cycles (Christie 1993).

Par ailleurs et grâce au traitement enzymatique, autour de 90% des lipides de viscères de seiche sont localisés dans les fractions liquides (fractions huileuses et solubles). Dans de précédentes études portant sur l'extraction de lipides de co-produit marins par protéolyse avec Alcalase, Neutrase ou Flavourzyme, l'hydrolyse enzymatique a permis une récupération importante des lipides (Linder et al. 2005). En effet, ces auteurs ont montré que plus de 85% des lipides totaux se retrouvaient dans la phase huileuse.

De même, les hydrolyses enzymatiques réalisées avec Protamex et Alcalase et Flavourzyme ont permis une meilleure libération des phospholipides, pouvant aller jusqu'à un facteur 3. Les phospholipides sont majoritairement localisés dans la fraction soluble (entre 51 et 57%), représentant environ 2 fois plus de phospholipides extraits que par la méthode utilisant les solvants. Ainsi, de la même façon que pour les lipides, les rendements des phospholipides ont pu être augmentés sans avoir recours aux solvants.

Comme évoqué précédemment, il n'existe pas d'études antérieures ayant porté sur l'hydrolyse enzymatique des viscères de seiche ou de céphalopodes ainsi, encore moins sur l'action de protéases commerciales sur la libération des lipides et phospholipides. Par contre les viscères de poissons, notamment ceux de la morue ont été bien étudié dans ce sens. Ainsi, l'étude réalisée par Daukšas et al. sur l'hydrolyse 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-Murofushi et al. 1995 – Fisher et al. 1998 - Cheng et al. 2000 - Tamehiro et al. 2002). Ces fractions riches en phospholipides pourraient également

être utilisées en alimentation ou en nutrition, du fait de leurs bienfaits sur la santé (Schneider 2001). En effet, il a été démontré, en aquaculture que l'alimentation supplémentée en phospholipides apparaît essentielle pour le bon développement des larves (Cahu et al. 2003).

La comparaison des profils de répartition des poids moléculaires des peptides obtenus avant et après hydrolyse indique qu'il existe bien des différences dans la taille des protéines entre les viscères brutes et celle traitées par hydrolyse. On voit donc bien ici l'intérêt d'utiliser une colonne ayant un domaine de fractionnement assez petit (249 à 13 700 Da). En effet, la majorité des peptides décelés possèdent un poids moléculaire dans cette gamme. Lors des hydrolyses effectuées sur les viscères de Sardine, Dumay et al. n'avaient pas détecté de différences entre les hydrolysats et les viscères non traitées avec une colonne dont le domaine de fractionnement va de 13,7 kDa à 67 KDa (Dumay et al. 2006).

Les résultats obtenus avec les profils d'élution des peptides sont confirmés par les distributions en acides aminés. En effet, nous avons pu voir que les hydrolyses enzymatiques augmentent la concentration de ces derniers dans la fraction soluble. **Il semblerait ainsi que l'enzyme choisie affecte la composition en acides aminés des hydrolysats puisque l'hydrolyse réalisée avec Alcalase permet une augmentation de la teneur en acides aminés plus importante qu'avec les deux autres enzymes. Cependant, la concentration la plus importante en AAE est obtenue avec Protamex ce qui est extrêmement important pour la suite des travaux.** En effet, la valeur nutritionnelle d'une protéine alimentaire est dans une large mesure le reflet direct de sa composition en acides aminés indispensables. Diverses méthodes anciennes ont été proposées pour augmenter la proportion de ces acides aminés dans les protéines et de tenter ainsi d'améliorer leur qualité. Par exemple, la teneur en méthionine ou en lysine ont été améliorées grâce à l'amélioration de techniques chimiques (Bjarnason-Baumann et al. 1977 – Puigserver et al. 1978), enzymatiques (Fujimaki et al. 1977) ou génétiques (Mertz 1975).

A ce jour et selon nos connaissances, aucune étude portant sur les viscères de seiche *Sepia officinalis* n'a mentionné la composition en acides aminés des hydrolysats, encore moins avec protamex, Alcalase et Flavourzyme. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les études sur les hydrolyses enzymatiques des viscères de *Sepia officinalis* et l'amélioration de la composition biochimique, notamment la teneur en acides aminés sont absentes. La plupart des travaux ont porté sur l'étude de la composition en acides aminés des hydrolysats (tous co-produits confondus) d'espèces de Calmar pour des fins de nutrition

aquacole (Lian et Lee 2005 ; 2008). Une étude récente les propriétés nutritionnelles de l'hépatopancréas de *Sepia pharaonis* a été menée mais sans avoir recours aux techniques d'hydrolyse (Shyla et al. 2009). Ceci rend évidemment difficile la comparaison de nos résultats. Cependant, toutes les études mentionnées ci-dessus ont démontré l'importance de la teneur en acides aminés essentiels dans la composition des aliments d'aquaculture sur la croissance et le métabolisme des organismes.

Les résultats que nous avons trouvés par rapport à la teneur en acides aminés essentiels suite aux hydrolyses sont encourageants et très intéressants, surtout si le travail est à visée nutritionnelle. C'est pour cette raison que dans la suite de l'étude, nous allons plus insister sur la composition en acides aminés des hydrolysats. L'analyse des acides gras ne va par contre pas être poursuivie vu que les résultats ne montrent pas d'importantes différences avec la composition initiale des viscères non hydrolysées. Une analyse particulièrement fine portera également sur les profils peptidiques des hydrolysats vu que le poids moléculaire d'une protéine est déterminant pour son activité biologique.

CONCLUSION

Dans cette partie, l'étude de la cinétique enzymatique des hydrolyses de 24 h des viscères de seiche a démontré qu'il n'est pas nécessaire de poursuivre la réaction pendant un temps aussi long et qu'un temps court est suffisant pour mener une protéolyse complète. Dans notre cas, le plateau est obtenu entre 1 h et 6 h de traitement (en fonction de l'enzyme). **A la suite de ces résultats et de ceux existant dans la bibliographie, les hydrolyses dans la partie suivante de ce travail seront conduites pendant 6 h.** Concernant la performance des enzymes, le DH d'Alcalase est le plus élevé (7%) ce qui est en concordance avec les essais des activités protéolytiques déterminées auparavant. De la même manière, Alcalase est incontestablement l'enzyme qui a conduit à la meilleure solubilisation de la matière et une meilleure récupération des protéines dans la phase soluble, ce qui confirme bien la valeur plus élevée du DH. Outre la quantité de protéines, les profils peptidiques montrent un déplacement du chromatogramme obtenu avec Alcalase vers les plus faibles poids moléculaires, en comparaison avec les deux autres enzymes, confortant les résultats trouvés. Protamex et Flavourzyme ont permis l'extraction de la plus grande quantité de lipides et Flavourzyme a fourni le meilleur rendement concernant les phospholipides (augmentation d'un facteur 5). En effet, la solubilisation de la matrice semble avoir permis une accessibilité aux lipides plus

importante. **Ainsi, suite à ce criblage d'enzymes, Alcalase et Flavourzyme ne seront pas retenues pour la suite du travail. Vus les avantages que présente Protamex, c'est avec cette enzymes que nous allons réaliser les hydrolyses de 6 heures.** Outre le bon rendement obtenu pour les acides aminés essentiels, il est possible de travailler au pH d'origine du substrat (~ 6,7) vu qu'il s'agit d'une enzyme neutre. Ceci nous évite le rajout de sels supplémentaires (NaOH) engendré avec Alcalase, enzyme opérant en milieu alcalin. En effet, le rajout de sels dans la réaction peut perturber le bon déroulement de la protéolyse et, comme nous l'avons vu, engendrer une reprise de l'activité enzymatique. Même si elle a montré de bons résultats du côté des phospholipides, Flavourzyme n'a pas été retenue pour la suite des expérimentations. 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 opératoires, il coûterait environ 40 fois plus cher d'utiliser Flavourzyme que les deux autres enzymes.

I.3.2 Hydrolyses de 6 heures sans contrôle de pH

Dans ce chapitre nous continuons à observer le comportement de la matrice avec les enzymes et à effectuer un criblage de ces dernières. Les hydrolyses sont ainsi conduites avec Protamex, Delvolase, Pepsine et Multifect Neutral aux conditions optimales déterminées par le fournisseur et donc, **contrairement à la partie précédente à des pH et à des températures différentes pour chaque enzyme.** Par contre, les deux types de matrices, avec et sans encre seront exploitées. Le but est de déterminer d'une manière plus fine si la glande d'encre engendre ou pas une modification dans la composition biochimique des hydrolysats et si elle constitue un facteur perturbateur au cours de la réaction d'hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites pendant 6 h en vue des précédents résultats. Nous avons choisi de travailler sans contrôle de pH pour être plus réalistes d'un point de vue industriel. En effet, le contrôle de pH par rajout de sels sous forme d'acide ou de base est difficilement réalisable d'un point de vue industriel en termes de coûts. De plus, pour un produit destiné à la nutrition, il est préférable d'éviter au maximum le rajout de produits.

I.3.2.1 Suivi de la cinétique enzymatique et de répartition la de la matière au cours du temps

Le suivi de la cinétique enzymatique et la valeur du DH ont été déterminés à partir de la teneur en groupements α -aminés libérés après 6 h d'hydrolyse à des pH compris entre 2 et

10 et un intervalle de température de 45 à 55°C. Le pH initial du substrat est de 6,66 à température ambiante (25°C) et est ajusté selon l'enzyme utilisée par rajout de NaOH ou de HCL 2M. La réaction d'hydrolyse a été amorcée par ajout d'une des 4 enzymes avec un rapport enzyme/substrat frais de 0,1%. Pour toutes les enzymes, le pH est resté très stable, surtout pour les viscères avec encre (Figure III.15). Cependant on remarque quand même que pour le substrat viscères sans encre, on enregistre plus de variation du pH. Par exemple pour la réaction avec Delvolase, Ainsi on remarque que le milieu réactionnel tamponne très bien. D'un point de vue qualitatif et quel que soit l'enzyme utilisée, le substrat visqueux est converti au bout d'une heure d'hydrolyse en un liquide très fluide. Pour la matrice V+E, la couleur très noire dominante et imposée par l'encre est conservée en fin de réaction mais légèrement éclaircie au fur et mesure que la protéolyse avance dans le temps, ceci étant du à la digestion enzymatique (Figure III.16).

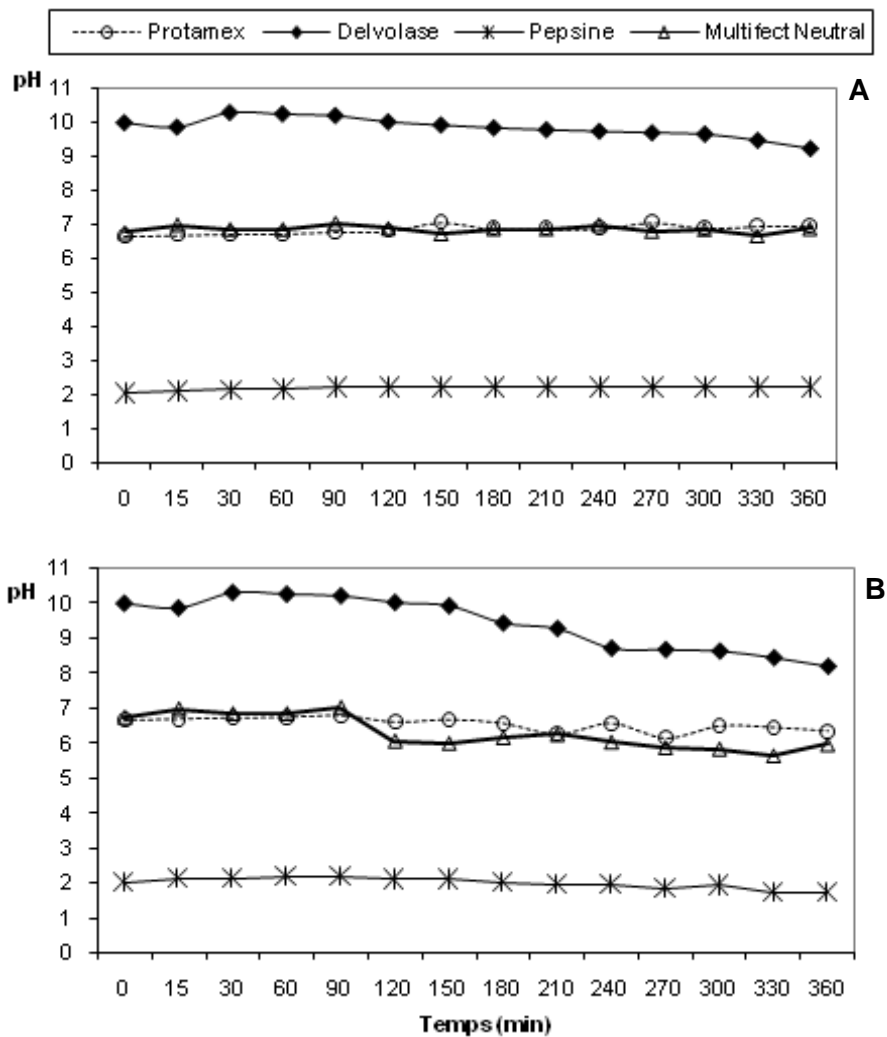


Figure III.15 : Evolution du pH au cours des 6 h d'hydrolyse avec Protamex, Delvolase, Pepsine et Multifect Neutral. A : viscères avec encre. B : viscères sans encre.



Figure III.16 : Aspect qualitatif du substrat V+E. A : avant hydrolyse. B : Après hydrolyse

Contrairement aux hydrolyses précédentes de 24 h, après centrifugation des hydrolysats de 6 h, nous obtenons deux phases : une phase insoluble constituant le culot au fond du tube de centrifugation et une phase soluble en haut et ce pour Protamex, Delvolase, Pepsine et Multifect Neutral (Figure III.17). La phase huileuse est quasi inexistante. En effet, vu le volume de l'encre dominant le substrat et les hydrolysats, et étant donné que cette encre ne contient pas de lipides, la quantité de la fraction lipidique va devenir infime et impossible à prélever pour les analyses. Ainsi dans cette partie, la fraction liquide équivaldra à la fraction soluble uniquement. Le surnageant possède une couleur d'un jaune clair. Après lyophilisation, la poudre possède une coloration marron clair avec une odeur typique de celle des poissons. Le culot issu de la centrifugation consiste en une couche noire très pâteuse due aux particules de mélanine de l'encre.

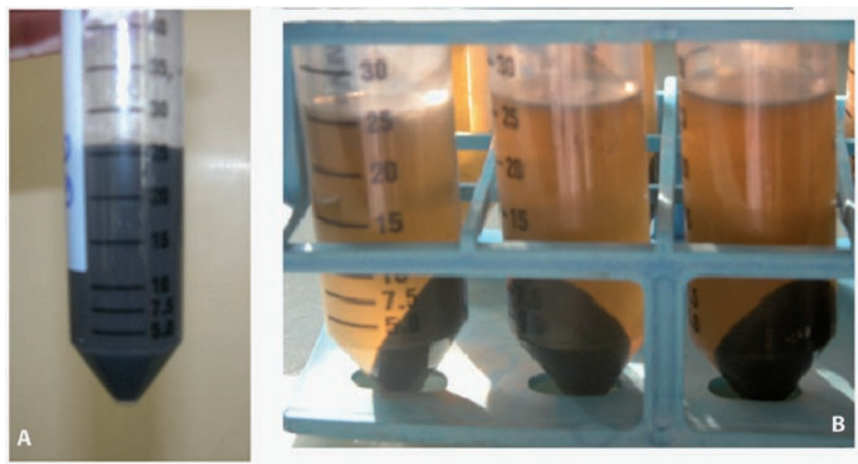


Figure III.17 : Les différentes phases (aqueuse et insoluble) obtenues après centrifugation de l'hydrolysats de 6 h. A : hydrolysats brut. B : hydrolysats centrifugés.

Le degré d'hydrolyse a été calculé à partir de la teneur de l'hydrolysats prélevé chaque heure en composés aminés libérés suite à la protéolyse. Cette concentration nous a permis de suivre la cinétique enzymatique au cours du temps. Les évolutions des hydrolyses durant les six heures d'hydrolyse pour les deux substrats (V+E et V-E), menées avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral est illustrée sur la Figure III.18.

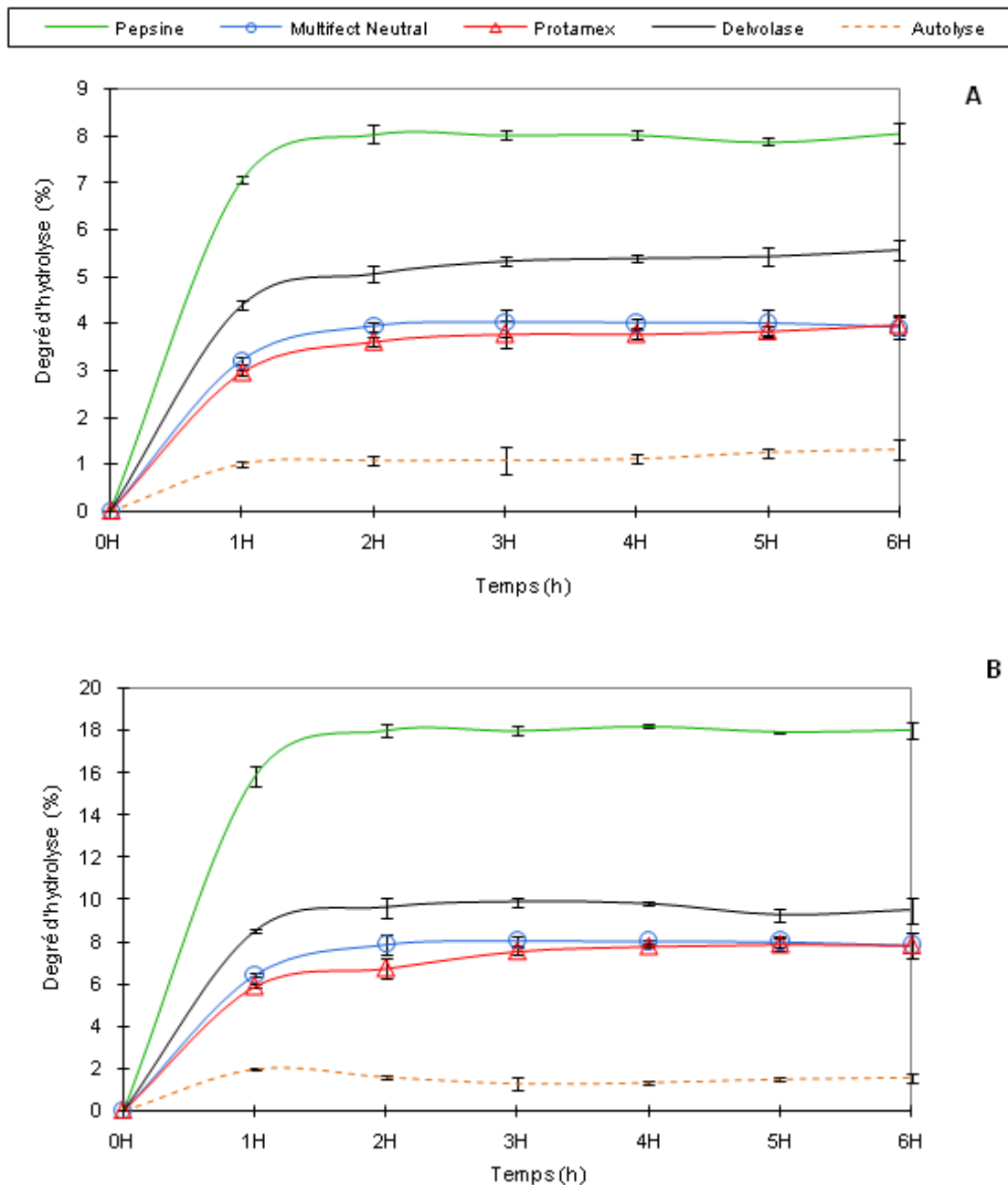


Figure III.18 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de la réaction de 6 heures par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral. A : Viscères sans encre. B : Viscères avec encre.

D'après les courbes, on constate que quels que soient l'enzyme et le substrat, les hydrolyses possèdent toutes le même profil. L'hydrolyse démarre dès l'ajout de l'enzyme, avec une vitesse importante durant la première heure pour se stabiliser et atteindre un plateau à partir de la 2^{ème}-3^{ème} heure et qui va jusqu'à la 6^{ème} heure d'hydrolyse. A la fin, les valeurs de DH pour les viscères sans encre sont de 8% avec Pepsine, 5,4% avec Delvolase, 3,7% pour Protamex et 3,9% pour Multifect Neutral. Pour Protamex, on remarque que la valeur obtenue est du même ordre de grandeur que celle réalisée auparavant avec la réaction d'hydrolyse de 24 h (3,2%), confirmant ainsi l'inutilité de poursuivre aussi longtemps la protéolyse. Le DH obtenu à la fin la réaction d'autolyse (à 50°C, pH du substrat) est de 1,3%, montrant bien ainsi l'intérêt d'utiliser les protéases commerciales par rapport à une simple autodigestion des viscères de seiche. Dans cette partie de l'étude, la valeur de DH la plus élevée, obtenue avec Pepsine est jusqu'à 2 fois supérieure à celle obtenue avec les autres enzymes. Par contre, Protamex et Multifect Neutral quant à elles possèdent une activité équivalente.

On remarque bien ici que les deux substrats, avec et sans encre ne fournissent pas les mêmes résultats en termes de degré d'hydrolyse et que la présence de la fraction encre au sein de la matrice est à prendre en considération. En effet, quelle que soit l'enzyme, les degrés d'hydrolyse sont significativement supérieurs (au seuil de 5%) lorsque la matrice est dépourvue d'encre (presque un facteur de 2). Par contre, la hiérarchisation des enzymes au regard de leur efficacité est toujours la même à savoir : Pepsine, suivie de Delvolase, puis de Multifect Neutral et Protamex. Cependant, le degré d'hydrolyse pour Pepsine atteint 18% en fin de réaction, soit plus de deux fois supérieur à celui obtenu avec la matrice V-E. Le même constat est fait pour les trois autres enzymes : 9,6% pour Delvolase, et 7,8% pour Multifect Neutral et Protamex. Les valeurs sont ainsi pratiquement multipliées par 2 pour ces enzymes également. En ce qui concerne l'autolyse, le degré d'hydrolyse atteint presque 2% au bout d'une heure d'hydrolyse mais la valeur à la 6^{ème} heure est de 1,5% contre 1,3% sur les viscères sans encre avec les deux valeurs significativement différentes pour un intervalle de confiance de 95%. On constate donc une légère augmentation du DH pour l'autolyse des viscères avec encre mais pas aussi marquée qu'avec les enzymes commerciales.

La répartition de la matière au sein des 2 fractions générées par l'hydrolyse a permis le suivi de la solubilisation de la matière au cours du temps (Figure III.19-23).

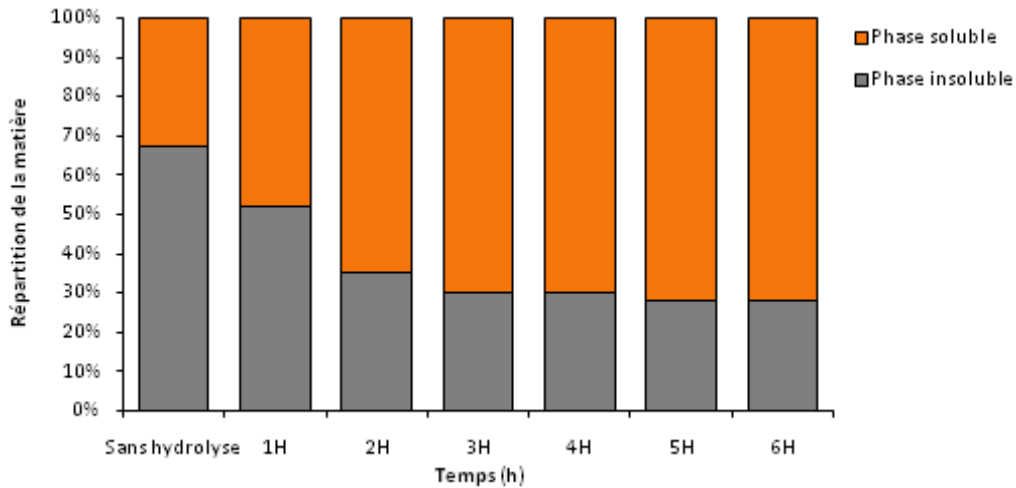


Figure III.19: Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Protamex. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH du substrat et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%.

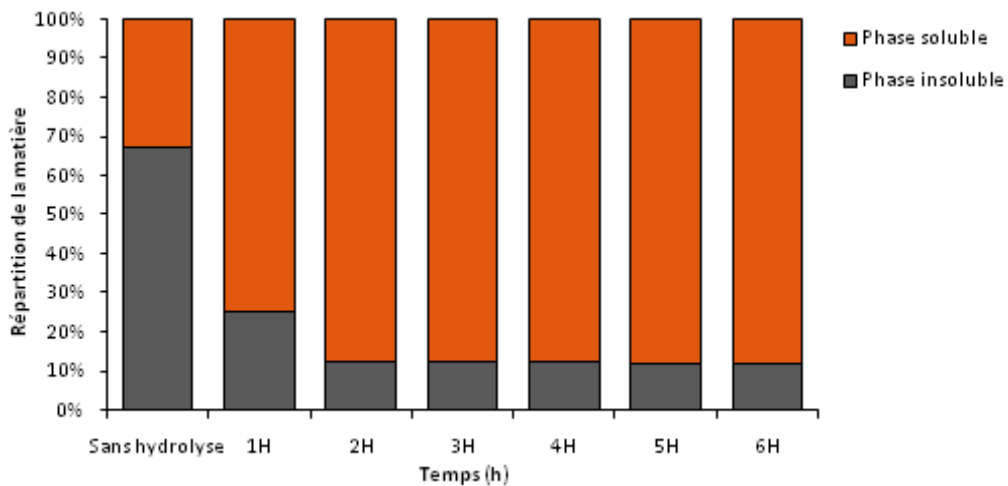


Figure III.20: Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Pepsine. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH 2 et à 45°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%.

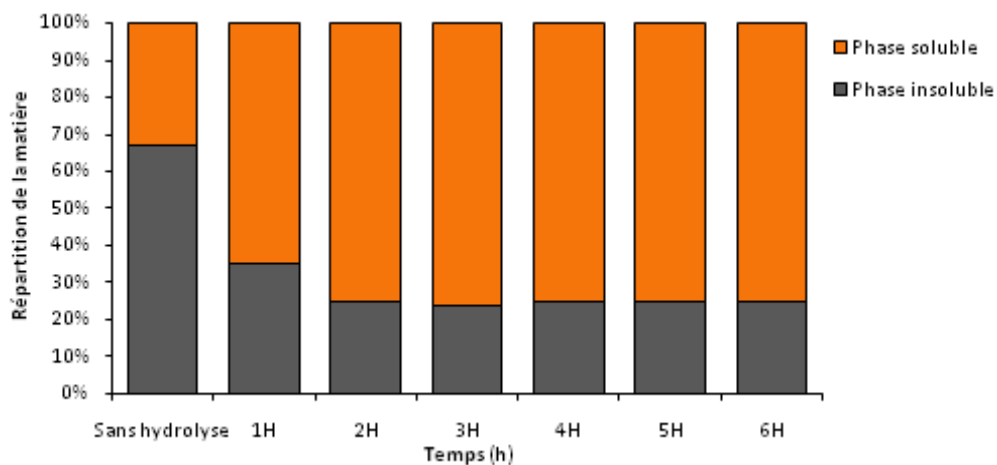


Figure III.21: Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Delvolase. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH 10 et à 55°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%.

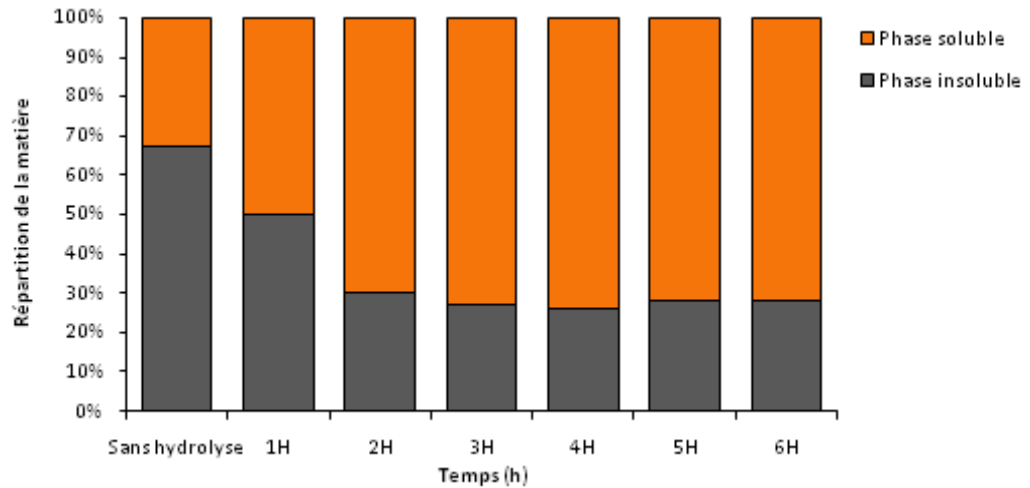


Figure III.22: Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et hydrolysées avec Multifect Neutral. Les hydrolyses ont été conduites durant 6 h, à pH 10 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec E/S= 0,1%.

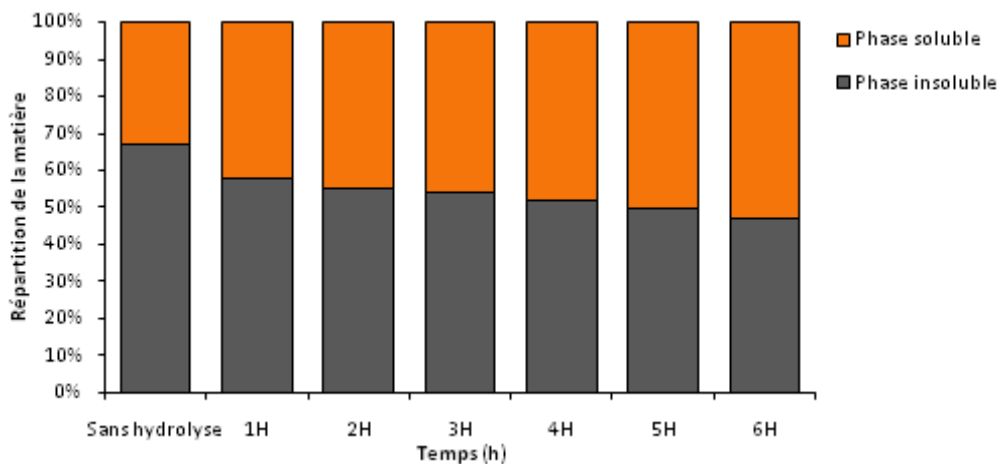


Figure III.23: Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (soluble et insoluble) après centrifugation pour les viscères de seiche avec encre (V+E) non hydrolysées et après autolyse pendant 6h à pH du substrat et à 50°C, avec 1 volume d'eau.

Sans hydrolyse, 33% de la matière sèche est localisée dans la phase soluble contre 67% dans la phase insoluble pour la matrice V+E ; ce qui est en accord avec les résultats du chapitre précédent où 32% de la matière sèche est localisée dans la phase soluble. La cinétique distribution de la matière au cours des 6 h d'hydrolyse est similaire quelle que soit l'enzyme utilisée : après 2 h d'hydrolyse, la majorité de la matière est solubilisée. Les degrés de solubilisation les plus importants pour V+E sont obtenus avec la Pepsine (jusqu'à 87% de matière dans la phase soluble), Multifect Neutral et Protamex sont semblables avec respectivement 74% et 72% de matière sèche dans le surnageant. Pour Delvolase, le maximum de solubilisation de la matière est aussi atteint au bout de la 2^{ème} heure d'hydrolyse avec 76%. Ces résultats, obtenus avec les viscères de seiche avec encre sont sensiblement identiques à ceux obtenus lors de la conduite des hydrolyses avec la matrice sans encre.

Concernant les autolyses et au bout d'une heure, on constate que la teneur de la phase soluble en matière sèche augmente à peine de 10% par rapport aux viscères avec encre non hydrolysés. Cependant et contrairement aux hydrolyses par les protéases exogènes, la réaction se fait très lentement et se poursuit jusqu'à la 6^{ème} heure de traitement pour n'arriver à solubiliser que 53% de matière dans le surnageant.

I.3.2.2 Solubilisation des protéines

L'évolution de la concentration en protéines dans le surnageant et le culot des viscères avec encre (V+E) est représentée sur la Figure III.24.

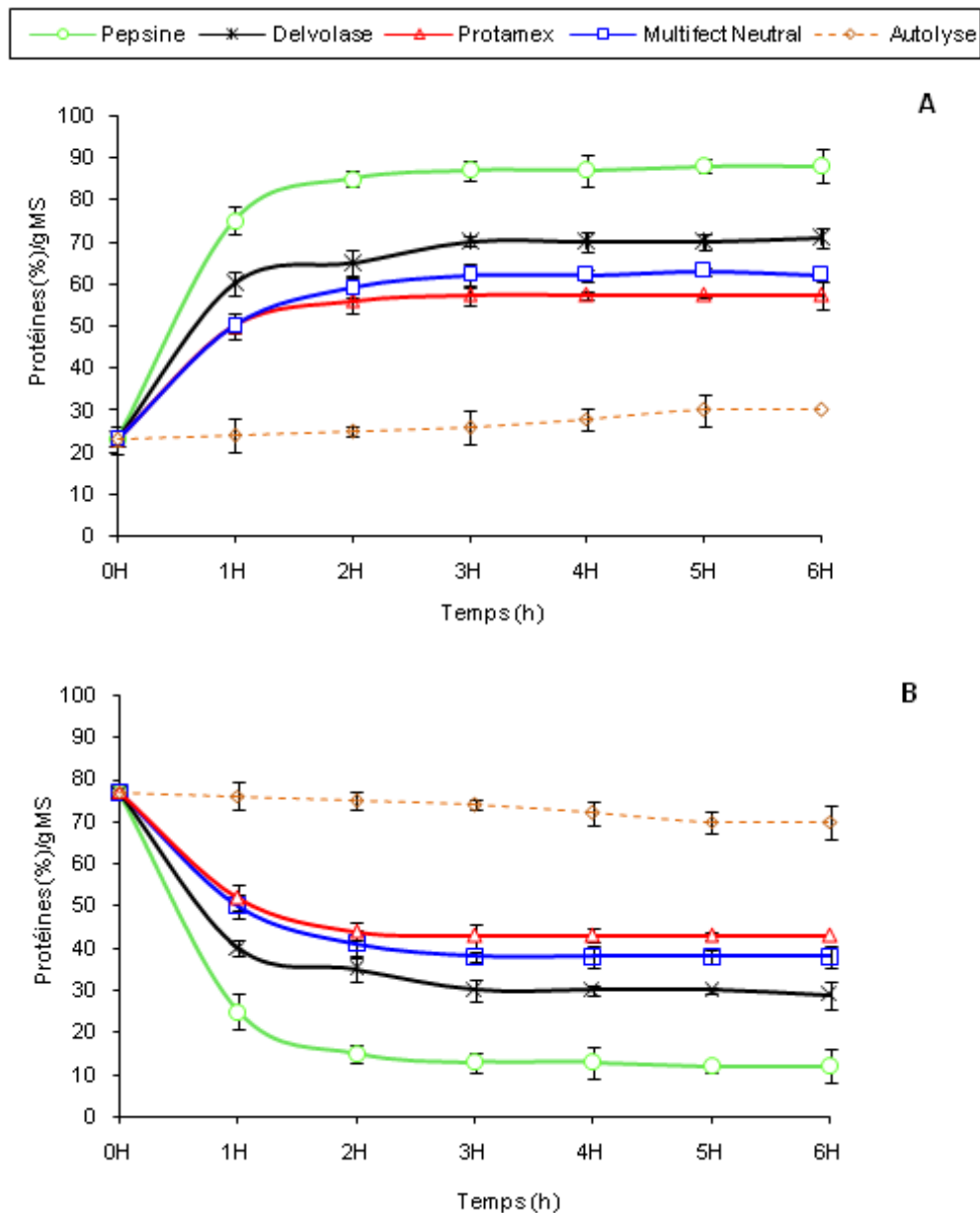


Figure III.24 : Evolution du contenu en protéines pendant 6 h d'hydrolyse des viscères de seiche avec encre avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral et les enzymes endogènes. A : Phase soluble. B : Phase insoluble.

La concentration en protéines dans le surnageant augmente rapidement pendant les 2 premières heures pour se stabiliser pour la suite de la réaction, à l'inverse du pourcentage de protéines dans le culot. Les courbes semblent symétriques et se terminent toutes par un plateau à la fin de la cinétique enzymatique. Aussi bien pour le substrat V+E et V-E (Figure III.25), les meilleures performances sont obtenues avec la Pepsine où 88% de protéines se retrouvent dans la phase soluble pour V+E et presque 70% pour V-E au bout des 6 h d'hydrolyse. Cependant, ces analyses montrent que la matrice V+E est nettement plus riche en protéines, surtout pour l'hydrolyse avec la Pepsine. Comme prévu, l'hydrolyse par les enzymes endogène uniquement a montré les performances les plus faibles. Pour la réaction d'autolyse, les différences dans l'évolution de la cinétique enzymatique entre les deux substrats ne sont pas très marquées. En effet, on remarque une évolution très lente de la teneur du surnageant en protéines pour les matrices V+E et V-E, ce qui est en concordance avec les valeurs de DH mentionnées précédemment.

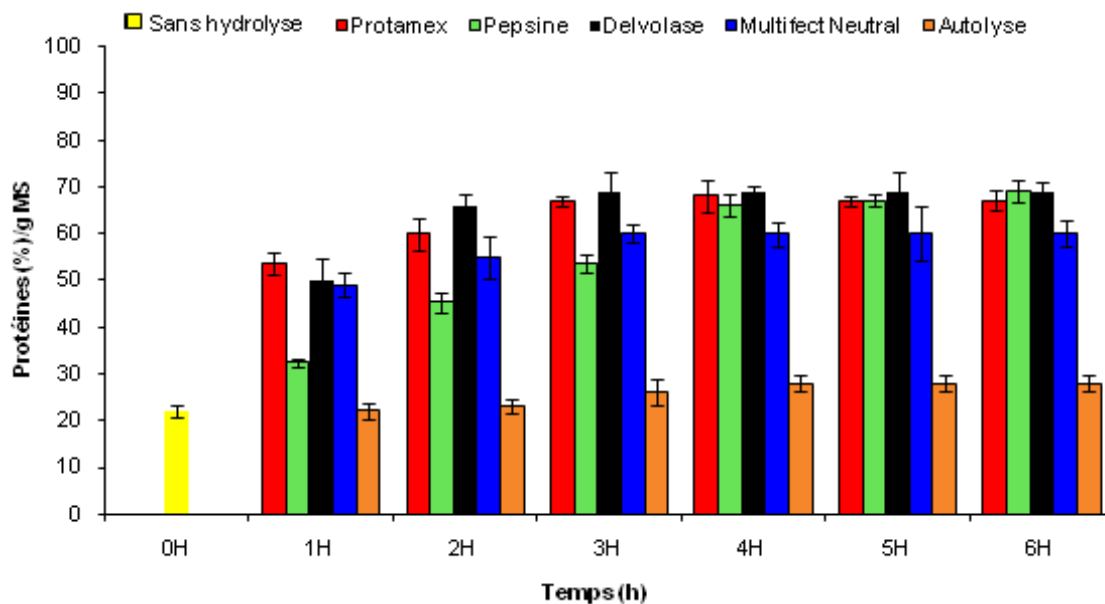


Figure III.25: Evolution du contenu en protéines dans la phase soluble pendant 6 h d'hydrolyse des viscères de seiche sans encre avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral et les enzymes endogènes.

I.3.2.3 Libération des lipides

D'après les résultats que nous avons obtenus, on constate que d'une manière générale et quelle que soit l'enzyme ou le substrat utilisés, les lipides ne solubilisent pas très bien et une quantité importante reste dans le culot après 6 heures d'hydrolyse. En effet, alors que la teneur en lipides dans la fraction soluble des hydrolyses de 24 h des viscères sans encre atteint 20 g pour 100 g de matière sèche (avec Alcalase), il n'est retrouvé au maximum dans cette fraction après hydrolyse pendant 6 heures des viscères avec encre que 13 g de lipides pour 100 g de matière sèche (Tableau III.11). Pour la matrice avec encre, la phase insoluble, qui possède une teneur en lipides initiale de $18,5 \pm 0,5$ g/100g, voit sa teneur en lipides augmenter après hydrolyse uniquement de 21% pour Protamex, 32% avec Delvolase de 56% avec la Pepsine, de et de 59% avec Multifect Neutral. La phase soluble a été enrichie par rapport aux viscères non hydrolysées puisque la teneur en lipides en cette phase est passée de $4,3 \pm 1,6$ g/100g dans la fraction initiale à $11,3 \pm 1,2$ g/100g pour l'hydrolyse de 6 h conduite avec Multifect Neutral.

Pour la matrice viscères sans encre, les teneurs en lipides dans la fraction insoluble ont été supérieures à celles obtenues avec la matrice viscères avec encre et les meilleurs résultats sont obtenus avec Multifect Neutral (Tableau III.12). Cependant, ces teneurs restent inférieures à celles obtenues avec les enzymes pendant les hydrolyses de 24 h. Dans la fraction insoluble, la teneur en lipides est augmentée et passe de 20 à $31,1 \pm 0,2$ g/100g avec Multifect Neutral et de 2,3 à $13,3 \pm 0,2$ g/100g pour la phase soluble.

Tableau III.11: Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble et soluble) avant et après des viscères de seiche avec encre pendant 6 h par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral.

	Sans hydrolyse	Protamex	Pepsine	Delvolase	Multifect Neutral
Phase insoluble	$18,5 \pm 0,5$	$22,5 \pm 0,1$	$28,8 \pm 0,2$	$24,4 \pm 0,5$	$29,41 \pm 0,3$
Phase soluble	$4,3 \pm 1,3$	$9,2 \pm 0,6$	$10,3 \pm 1,1$	$10,7 \pm 1,7$	$11,3 \pm 1,2$

Tableau III.12: Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble et soluble) avant et après des viscères de seiche sans encre pendant 6 h par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral.

	Sans hydrolyse	Protamex	Pepsine	Delvolase	Multifect Neutral
Phase insoluble	$20,1 \pm 0,3$	$24,5 \pm 0,1$	$30,7 \pm 0,7$	$26,4 \pm 0,1$	$31,1 \pm 0,8$
Phase soluble	$2,3 \pm 0,2$	$12,2 \pm 0,9$	$10,5 \pm 1,3$	$11,3 \pm 0,7$	$13,3 \pm 0,2$

Mise à part la présence relativement faible des lipides dans la phase soluble, l'hydrolyse de 6 h des viscères de seiche conduit à une amélioration de l'extraction des lipides par rapport à une extraction classique par les solvants organiques (Figures III.26 et III.27). Contrairement à la solubilisation des protéines où au bout de 2 h d'hydrolyse la majeure partie de la matière se retrouve dans la phase soluble, la libération des lipides au cours se poursuit durant toute l'hydrolyse. Aussi bien pour les viscères avec encre que sans encre, la teneur globale en lipides dans les hydrolysats augmente pour chaque heure d'hydrolyse et la quantité de lipides au bout de 6 h est nettement inférieure à celle obtenue par les autres enzymes pour les hydrolyses de 24 h, notamment avec Protamex. Ceci montre bien que pour les lipides, un temps d'hydrolyse plus important est nécessaire pour un maximum de libération.

En effet, pour les viscères avec encre, la quantité de lipides extraits est augmentée d'un facteur 2,3 avec l'enzyme Multifect Neutral, suivie par les hydrolyses menées par Pepsine et Delvolase où la quantité de lipides extraits est d'environ 0,18 g/g de viscères sèches (sans hydrolyse, la quantité de lipides extraits était de 0,09 g/g). La troisième et dernière enzyme est Protamex qui permet quand même une augmentation de la teneur en lipides d'un facteur 1,8 par rapport aux viscères non hydrolysés. 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.

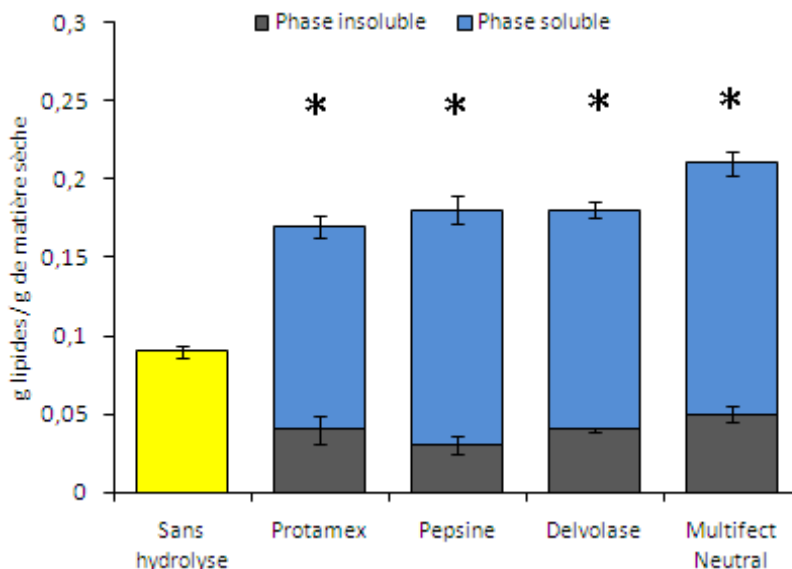


Figure III.26 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche avec encre en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%.

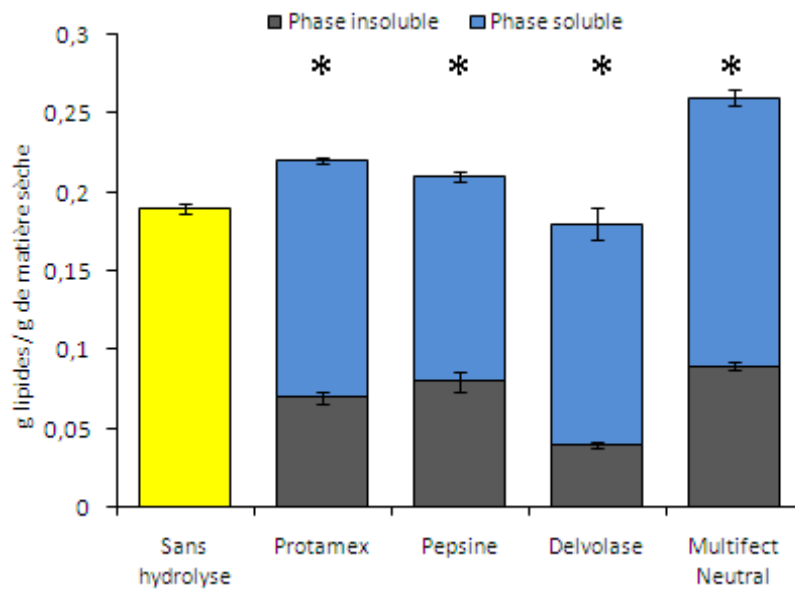


Figure III.27 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche sans encre en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%.

Pour le substrat viscères sans encre (Figure III.27), le traitement avec Multifect Neutral a permis la plus forte libération de lipides avec 0,26 g/g de viscères sèches alors que sans hydrolyse la quantité de lipides extraites était de 0,19 g/g). Cependant, cette quantité est inférieure aux quantités libérées avec les enzymes Flavourzyme et Protamex pour les hydrolyses de 24 h. Les résultats obtenus avec l'enzyme Delvolase ne permet pas une récupération complète des lipides initialement libérés. Quelque soit l'enzyme utilisée, les résultats ici aussi sont différents significativement différents des viscères non hydrolysés, pour un intervalle de confiance de 95%.

I.3.2.4 Distribution des phospholipides

La distribution des phospholipides après hydrolyse de 6 h sur les viscères de seiche avec et sans encre est représentée sur les Figures III.28 et III.29. Le traitement par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral des viscères de seiche avec et sans la fraction encre conduit à une différence significative au seuil de 5% par rapport à un traitement classique par solvant, excepté pour le traitement avec Multifect Neutral pour V+E et V-E et Delvolase pour V-E. Pour ces derniers, aucune différence significative n'a été trouvée par rapport au témoin (sans hydrolyse). Les autres hydrolyses permettent d'augmenter significativement la disponibilité des phospholipides.

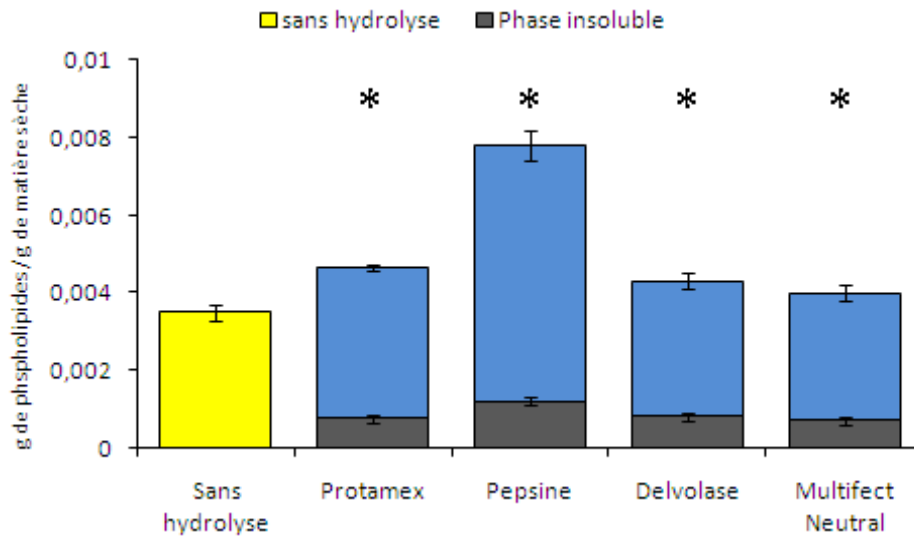


Figure III.28 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche avec encre (V+E) en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%.

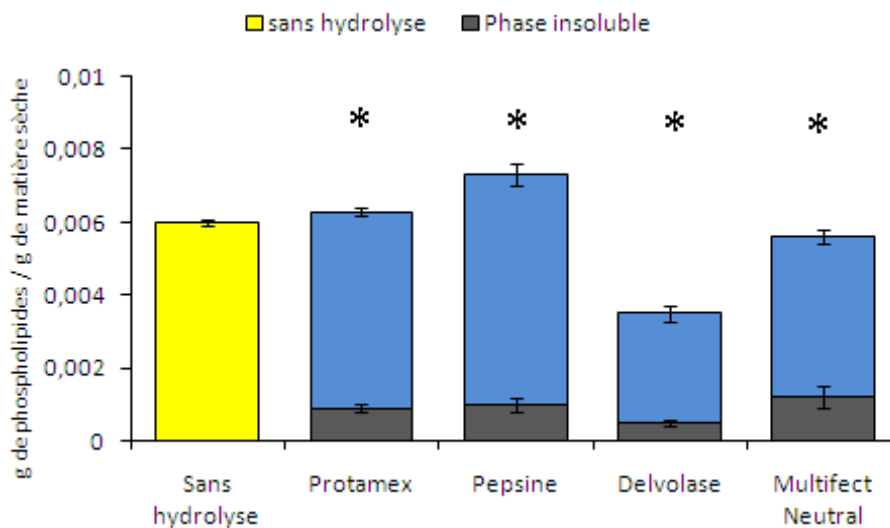


Figure III.29 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses de 6 h réalisées sur les viscères de seiche sans encre (V-E) en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%.

La meilleure performance est obtenue avec la Pepsine où la disponibilité des phospholipides est augmentée d'un facteur 1,2 pour V-E et 2,2 pour V+E. Protamex est classée en 2^{ème} position après la Pepsine pour les deux substrats avec une quantité de phospholipides de 0,0063 et 0,0053 g/g de matière sèche. Comme pour les lipides, on constate que les quantités de phospholipides sont plus importantes pour les viscères sans encre que pour les viscères avec encre. En outre, en comparaison avec les hydrolyses de 24 h avec Protamex, Alcalase et Flavourzyme, les quantités de phospholipides libérées sont moindre,

ceci est visible notamment pour Protamex, où dans les mêmes conditions physico-chimiques d'hydrolyse mais avec un temps de traitement plus court (6 h), la quantité de phospholipides est jusqu'à 25% moindre que pour les hydrolyses de 24 h. 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 75 à 87% des phospholipides totaux).

I.3.2.5 Profils des poids moléculaires des peptides

La Figure III.30 donne le pourcentage relatif de chaque taille de peptides en fonction du temps d'hydrolyse dans les hydrolysats. Le traitement enzymatique par Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral des viscères de seiche avec encre a produit des fractions peptidiques d'une taille allant de 7000 Da jusqu'aux acides aminés libres. Cependant, la majeure partie des fractions est comprise entre 250 et 1000 Da. Les résultats des aires sous la courbe montrent une corrélation entre la distribution de masse des peptides solubles et les rendements en matières solubles. Par exemple, les profils d'éluion des hydrolysats obtenus avec Pepsine montrent beaucoup plus de peptides de petit poids moléculaire (entre 250 et 500 Da) que les autres surnageants obtenus avec les différents traitements enzymatiques. Delvolase se classe après la Pepsine avec 44% de matériel peptidique compris entre 250 et 500 Da. Ces résultats montrent une possible corrélation entre les pourcentages de peptides de petite taille et le degré d'hydrolyse et les rendements en termes de solubilisation de la matière.

Les résultats de distribution des poids moléculaires nous informent également sur le fait que les enzymes ici utilisées, en particulier pour Pepsine et Delvolase qui fournissent un pourcentage élevé de peptides de petit poids moléculaire après 2 h d'hydrolyse, ce qui est en parfaite concordance avec les résultats obtenus précédemment sur les protéines et la matière sèche. Le calcul des pourcentages des aires sous la courbe des 4 hydrolysats obtenus par les différents traitements enzymatiques (Figure III.30) montrent qu'entre 10 et 30 min après l'injection de l'échantillon non hydrolysé, une proportion assez importante des peptides de petit poids moléculaire (~ 1000 Da) est obtenue. A mesure que la réaction d'hydrolyse avance, beaucoup plus de matériel de taille inférieure à 1000 Da et d'acides aminés libres sont produits. Entre 7000 et 2000 Da, les profils sont constants. Les profils de taille supérieure à 7000 Da sont néanmoins présents, surtout pour l'hydrolyse enzymatique réalisée par Delvolase.

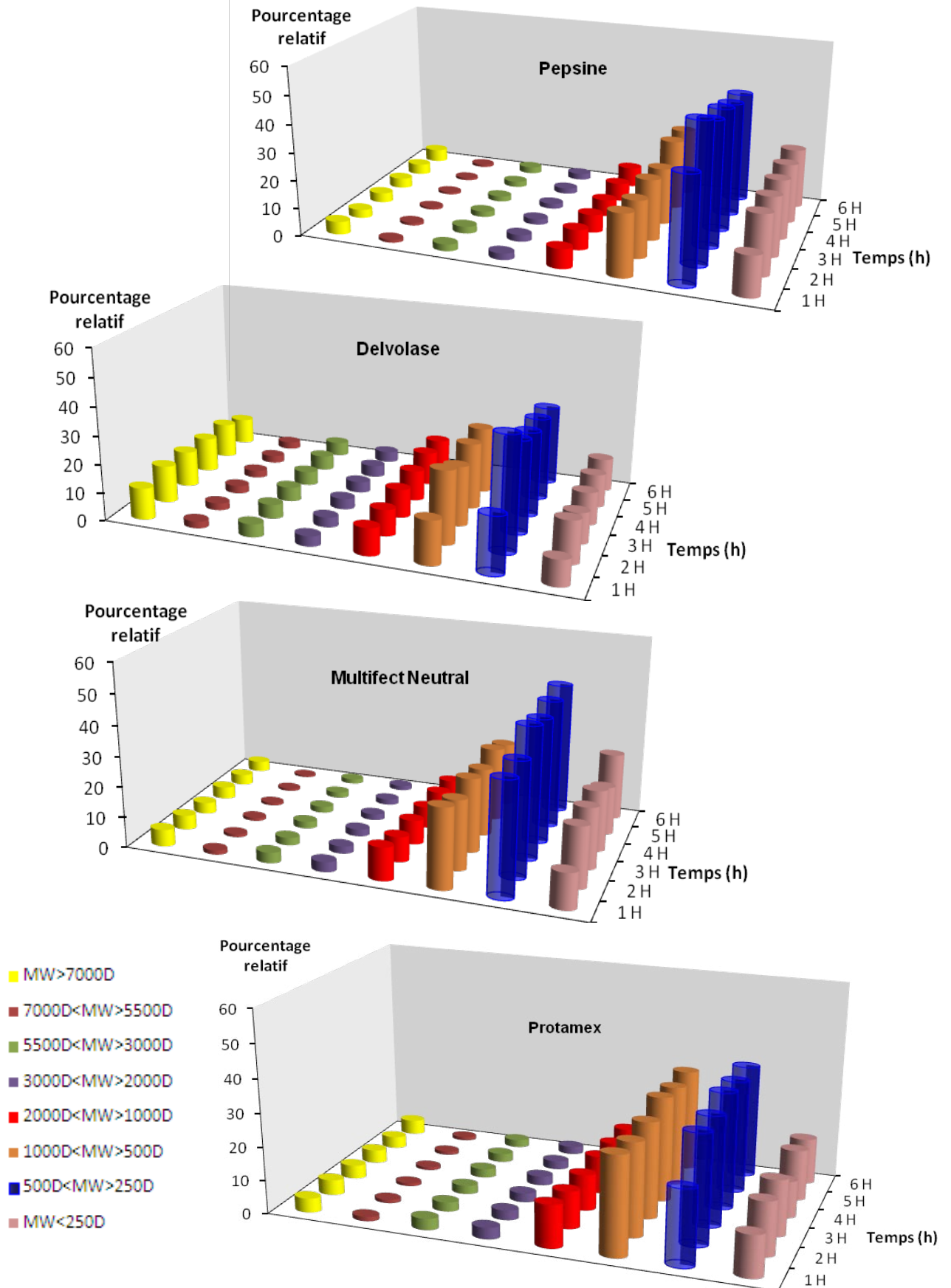


Figure III.30 : Pourcentages relatifs des molécules réparties par taille (en Dalton) selon les profils obtenus après élution sur colonne Superdex HR 10/30 des viscères de seiche avec encre lors des hydrolyses de 6 h avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral.

D'une manière très claire, c'est avec la Pepsine qu'on a pu obtenir les pourcentages les plus importants des peptides de poids moléculaire compris entre 1000 et 250 Da et les pourcentages les plus faibles de molécules supérieures à 7000 Da. Ceci nous a conduits à effectuer une analyse plus fine pour cette enzyme représentée sur la Figure 130.

D'après la figure ci-dessous, on peut isoler 2 familles de peptides : ceux qui sont inférieurs à 1000 Da et qui vont de 2000 Da jusqu'à plus de 7000 Da. En effet, on constate qu'entre 7000 et 1000 Da, les profils montrent une certaine constance. Le pourcentage des peptides de taille supérieure à 7000 Da diminue au bout d'une heure d'hydrolyse. Les peptides de poids moléculaire compris entre 500 et 250 Da présentent clairement les plus forts pourcentages et augmentent au bout de deux heures d'hydrolyse pour atteindre un taux de 50%. Ces proportions diminuent ensuite légèrement jusqu'à la fin de l'hydrolyse. Pareillement les molécules ayant une taille comprise entre 1000 et 500 Da augmentent en nombre après 2 h d'hydrolyse mais se maintiennent constants.

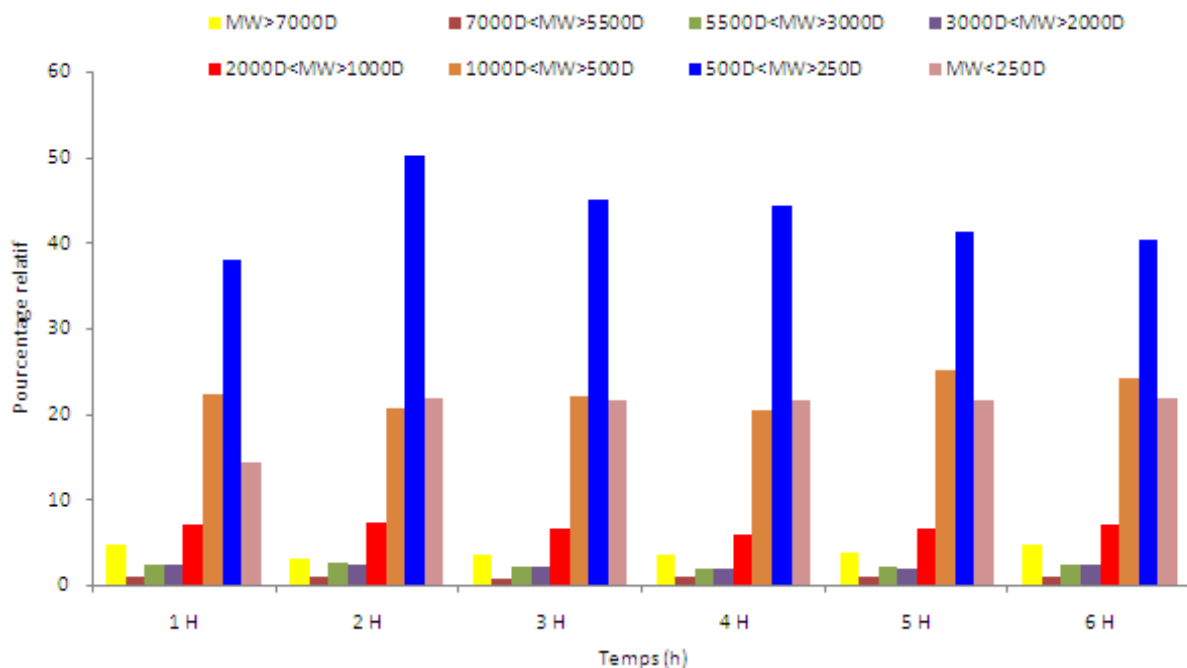


Figure III.31 : Pourcentage relatif des peptides répartis par taille (en Dalton) selon les profils obtenus après élution sur la colonne Superdex HR 10/30 des viscères de seiche avec encre lors des hydrolyses de 6 h avec Pepsine.

Les profils d'élution des échantillons d'hydrolysats prélevés à des intervalles de temps de 1 h au cours de l'hydrolyse de 6 h des viscères de seiche avec encre avec Pepsine sont groupés sur la Figure III.32. Notre choix a porté sur cette enzyme étant donné que c'est avec la Pepsine que nous avons obtenu les résultats les plus pertinents en termes de familles de

peptides de petit poids moléculaire. Comme les montre la superposition des profils, les chromatogrammes se décalent vers les faibles poids moléculaires au fur et à mesure de l'avancée de l'hydrolyse et l'aire comprise sous la courbe ne cesse d'augmenter, reflétant la solubilisation et la dégradation des protéines. Le chromatogramme de la 5^{ème} heure montre clairement un décalage par rapport au chromatogramme des viscères de seiche avec encre non hydrolysés.

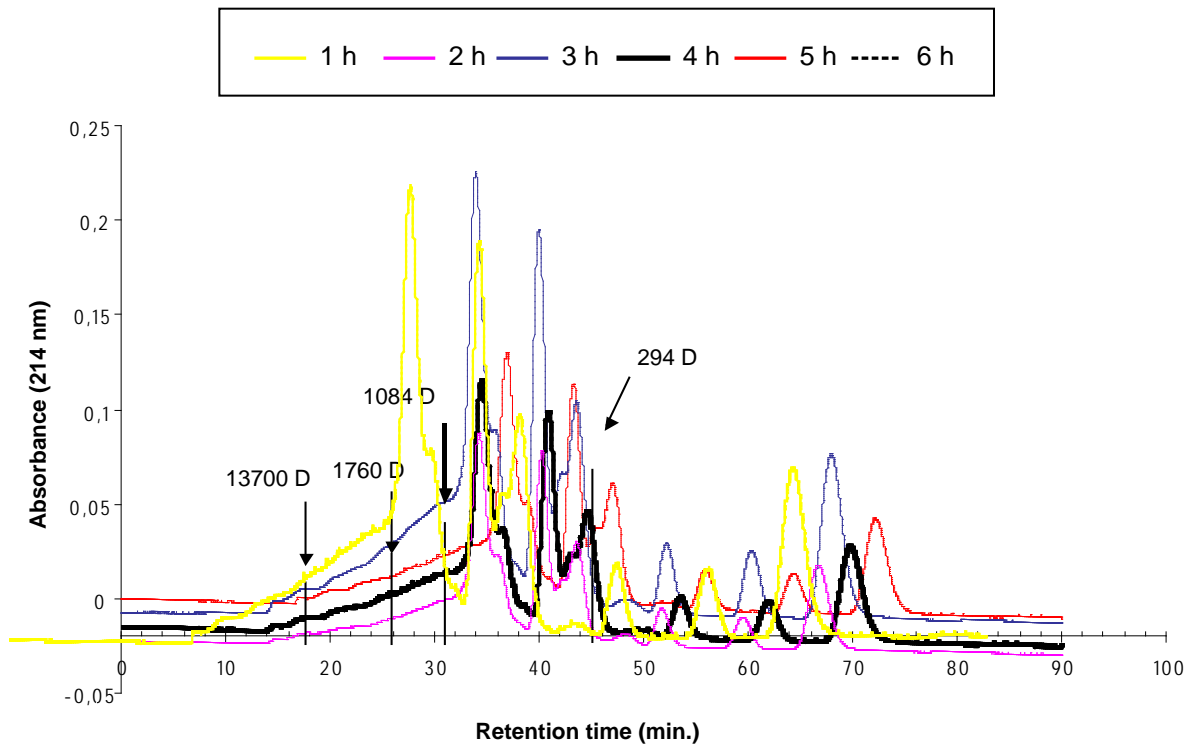


Figure III.32 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 10/30 de viscères de seiche (V+E) après des hydrolyses de 6 h avec Pepsine. Les courbes 5h et 6h d'hydrolyse sont confondues.

I.3.2.6 Analyse des acides aminés

La composition et la concentration en acides aminés dans la fraction soluble des hydrolysats de 6 h des viscères de seiche avec encre Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral sont regroupées dans le tableau III.13. Dix-huit acides aminés ou composés associés ont été détectés dans les 24 fractions avec la présence des 8 acides aminés essentiels (AAE). En effet, quelle que soit l'enzyme utilisée, l'hydrolyse a conduit à la libération de nouveaux acides aminés, par rapport au substrat viscères sans encre et viscères avec encre non hydrolysés.

Tableau III.13 : Composition et concentration en acides aminés totaux (en mmole/mg de matière sèche) dans les fractions solubles des viscères de sèche avec encre issues des hydrolyses de 6 h avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral.

Acide aminé	Protamex					
	1 h	2h	3 h	4 h	5 h	6 h
AAA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ABA	0,000	0,015	0,026	0,028	0,034	0,024
ALA	0,340	0,190	0,372	0,395	0,456	0,342
ASP	0,256	0,113	0,056	0,028	0,034	0,057
GLU	0,492	0,013	0,054	0,031	0,029	0,054
GLY	0,356	0,103	0,229	0,208	0,235	0,204
HIS*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ILE*	0,170	0,083	0,142	0,168	0,200	0,158
LEU*	0,252	0,069	0,137	0,111	0,249	0,195
LYS*	0,109	0,016	0,055	0,041	0,029	0,041
MET*	0,059	0,019	0,050	0,038	0,044	0,043
ORN	0,080	0,006	0,020	0,015	0,010	0,023
PHE*	0,116	0,104	0,180	0,071	0,084	0,164
PRO	0,160	0,074	0,138	0,143	0,176	0,141
SER	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
THR*	0,099	0,027	0,063	0,054	0,065	0,055
TYR	0,033	0,012	0,065	0,024	0,022	0,124
VAL*	0,182	0,082	0,154	0,171	0,186	0,157
Total	2,702	0,926	1,740	1,526	1,852	1,881
Total AAE	0,985	0,400	0,780	0,669	0,856	0,811
% AAE	36,46%	43,19%	44,86%	43,83%	46,23%	43,15%

Acide aminé	Pepsine					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
AAA	0,017	0,016	0	0,006	0	0
ABA	0,019	0,033	0,011	0,030	0,051	0,030
ALA	0,305	0,505	0,208	0,454	0,715	0,371
ASP	0,057	0,038	0	0,045	0,063	0,062
GLU	0,029	0,020	0	0,048	0,057	0,054
GLY	0,205	0,289	0,167	0,262	0,391	0,206
HIS*	0	0	0	0	0	0
ILE*	0,104	0,164	0,050	0,103	0,239	0,097
LEU*	0,107	0,276	0,135	0,243	0,382	0,210
LYS*	0,013	0,045	0,026	0,050	0,081	0,077
MET*	0,043	0,156	0,032	0,148	0,265	0,142
ORN	0,009	0,059	0,018	0,022	0,031	0,022
PHE*	0,161	0,191	0,150	0,280	0,223	0,270
PRO	0,116	0,168	0,053	0,154	0,256	0,099
SER	0	0	0	0	0	0
THR*	0,067	0,189	0,037	0,183	0,124	0,035
TYR	0,016	0,131	0,016	0,126	0,045	0,088
VAL*	0,124	0,272	0,062	0,153	0,249	0,106
Total	1,400	2,559	0,970	2,314	3,181	1,874
Total AAE	0,622	1,296	0,495	1,1632	1,5683	0,9402
% AAE	44,42%	50,66%	51,04%	50,27%	49,29%	50,10%

« * » : acide aminé essentiel

Acide aminé	Delvolase					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
AAA	0,022	0	0	0	0	0
ABA	0	0	0	0,028	0	0
ALA	0,389	0,525	0,559	0,525	0,388	0,307
ASP	0,159	0,219	0,097	0,118	0,073	0,065
GLU	0,182	0,2001	0,086	0,092	0,068	0
GLY	0,329	0,406	0,357	0,319	0,214	0,159
HIS*	0	0,011	0	0	0,008	0,004
ILE*	0,156	0,184	0,168	0,158	0,128	0,076
LEU*	0,277	0,356	0,318	0,296	0,210	0,161
LYS*	0,067	0,109	0,056	0,054	0,056	0,038
MET*	0,073	0,086	0,065	0,063	0,044	0,033
ORN	0,032	0,030	0,023	0,020	0,019	0,008
PHE*	0,132	0,148	0,130	0,112	0,084	0,066
PRO	0,168	0,218	0,198	0,183	0,151	0,074
SER	0,109	0,064	0	0	0,081	0
THR*	0,151	0,164	0,100	0,098	0	0,031
TYR	0,045	0,131	0,123	0,043	0,037	0,030
VAL*	0,161	0,191	0,194	0,163	0,137	0,087
Total	2,4598	3,0474	2,4803	2,2789	1,7053	1,1442
Total AAE	1,0202	1,2517	1,0342	0,9474	0,6710	0,4999
% AAE	41,47%	41,07%	41,70%	41,57%	39,35%	43,69%

Acide aminé	Multifect Neutral					
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
ALA	0,409	0,380	0,338	0,343	0,359	0,375
ASP	0,489	0,457	0,349	0,441	0,471	0,294
GLU	0,726	0,654	0,429	0,764	0,681	0,367
GLY	0,441	0,419	0,367	0,384	0,380	0,405
HIS*	0,005	0,018	0,032	0,021	0,039	0,031
ILE*	0,289	0,238	0,196	0,220	0,235	0,194
LEU*	0,395	0,342	0,288	0,307	0,317	0,329
LYS*	0,101	0,138	0,120	0,131	0,140	0,114
MET*	0,085	0,075	0,026	0,075	0,070	0,076
ORN	0,070	0,060	0,053	0,065	0,062	0,062
PHE*	0,150	0,134	0,110	0,120	0,120	0,132
PRO	0,248	0,224	0,202	0,213	0,239	0,214
SER	0,105	0,132	0,112	0,145	0,151	0,140
THR*	0,206	0,195	0,188	0,216	0,220	0,209
TYR	0,012	0,040	0,051	0,050	0,068	0,050
VAL*	0,155	0,232	0,199	0,217	0,223	0,189
C - C	0,002	0,017	0,006	0,006	0,016	0,011
Total	3,894	3,744	3,067	3,718	3,780	3,188
Total AAE	1,38	1,374	1,162	1,310	1,367	1,278
% AAE	35,67%	36,71%	37,91%	35,24%	36,18%	40,10%

« * » : acide aminé essentiel

L'hydrolyse enzymatique réalisée par la Pepsine a permis l'identification et l'analyse de plus d'acides aminés, en comparaison avec les résultats fournis par les autres enzymes. D'un point de vue quantitatif, le traitement enzymatique effectué par la Pepsine montre les meilleurs résultats. En effet, le contenu en acides aminés totaux dans les hydrolysats de la Pepsine est nettement supérieur à celui des hydrolysats des autres enzymes, en particulier après 2 h d'hydrolyse. Quelle que soit l'enzyme utilisée au cours de la réaction d'hydrolyse, l'analyse des concentrations en acides aminés totaux montre un pic atteint après seulement deux heures d'hydrolyse. En outre, il apparaît également que les acides aminés essentiels (AAE) constituent une part très importante des acides aminés totaux présents dans la fraction soluble des hydrolysats. La proportion la plus élevée en AAE est attribuée aux hydrolysats de Pepsine avec jusqu'à 50% des acides aminés totaux analysés, suivie de Delvolase (entre 39% et 43%).

En termes de concentrations, pour les hydrolysats obtenus avec Protamex, l'acide α -aminoadipique (AAA) n'a pas été détecté et l'acide α -aminobutyrique (ABA) est présent avec seulement de très faibles concentrations (0,0286 mmol/mg matière sèche). De la même manière, l'Histidine (HIS) est faiblement représentée avec la valeur la plus importante après 5 h d'hydrolyse (0,0081 mmol/mg de matière sèche). Dans les hydrolysats obtenus par les quatre traitements enzymatiques, l'acide aminé le plus abondant est l'alanine (ALA). La quantité la plus importante pour ce dernier correspond à l'hydrolysat avec Pepsine. En deuxième position se trouve la glycine (GLY) et ce indépendamment de l'enzyme utilisée, montrant ainsi qu'il n'existe pas de préférence de coupure des enzymes pour cet acide aminé.

Afin de comparer les deux matrices (V+E et V-E), et pour être les plus concis possible, nous avons dressé un tableau récapitulatif exposant les résultats des quantités d'acides aminés obtenues au bout de 6 h d'hydrolyse Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral (Tableau III.14). En effet, la cinétique de production des acides aminés pour les viscères de seiche sans encre ne montre pas de différences avec la matrice V+E. D'après ce tableau, nous constatons que pour les enzymes Protamex, Pepsine et Multifect Neutral, la concentration totale en acides aminés est supérieure dans les hydrolysats des viscères de seiche avec encre. Ceci est particulièrement vrai pour Multifect Neutral où la quantité des acides aminés pour les hydrolysats de la matrice V+E est 1,8 fois supérieure à celle des hydrolysats de la matrice V-E. Cependant, la proportion des AAE des viscères de seiche sans encre reste assez proche de celle de la matrice avec encre. Elle est de 45% avec Protamex, 42% avec Pepsine, 39% avec

Delvolase et 45% avec Multifect Neutral. Ce qui ressort clairement suite à l'analyse de ce tableau c'est que pour la matrice V+E, les concentrations en phénylalanine sont toujours supérieures à celles de la matrice V-E. Cette concentration est 5 fois supérieure pour V+E pour Protamex, 4 fois pour Pepsine et plus de 2 fois pour Delvolase et Multifect Neutral, ce qui est considérable. En effet, on observe des variations aussi importantes entre les deux matrices pour les autres acides aminés, sauf pour la tyrosine pour laquelle on peut dégager les mêmes remarques faites pour la phénylalanine. Pour la tyrosine, les quantités sont aussi toujours supérieures dans les hydrolysats de la matrice V+E, mais avec des coefficients qui ne sont pas aussi importants que pour la phénylalanine. L'histidine, acide aminé essentiel n'est détecté que dans les viscères avec encre à des faibles concentrations pour Delvolase et Multifect Neutral avec des concentrations de 0,004 mmole/g de matière sèche et 0,0032 mmole/g M.S, respectivement.

Tableau III.14: Composition et concentration en acides aminés totaux (en mmole/mg de matière sèche) dans les fractions solubles des viscères de sèche avec encre (V+E) et sans encre (V-E) issues des hydrolyses de 6 h avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral.

Acide aminé	Protamex		Pepsine		Delvolase		Multifect Neutral	
	V+E	V-E	V+E	V-E	V+E	V-E	V+E	V-E
AAA	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,005	0,000	0,000
ABA	0,024	0,035	0,030	0,022	0,000	0,023	0,000	0,000
ALA	0,342	0,100	0,371	0,344	0,307	0,391	0,375	0,425
ASP	0,157	0,179	0,062	0,063	0,065	0,114	0,295	0,025
GLU	0,054	0,080	0,055	0,092	0,000	0,145	0,367	0,014
GLY	0,204	0,271	0,207	0,218	0,159	0,277	0,406	0,245
HIS*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,032	0,000
ILE*	0,158	0,302	0,098	0,122	0,076	0,145	0,195	0,180
LEU*	0,195	0,157	0,210	0,172	0,162	0,231	0,329	0,251
LYS*	0,041	0,057	0,078	0,046	0,039	0,051	0,114	0,046
MET*	0,043	0,082	0,142	0,039	0,033	0,050	0,076	0,059
ORN	0,023	0,035	0,022	0,018	0,008	0,022	0,062	0,015
PHE*	0,164	0,032	0,270	0,068	0,066	0,025	0,133	0,057
PRO	0,141	0,056	0,099	0,104	0,074	0,125	0,214	0,141
SER	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,023	0,140	0,012
THR*	0,055	0,019	0,035	0,066	0,032	0,075	0,210	0,070
TYR	0,124	0,103	0,088	0,017	0,031	0,022	0,050	0,017
VAL*	0,157	0,093	0,107	0,133	0,088	0,151	0,190	0,185
C-C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000
Total	1,881	1,6381	1,8749	1,528	1,1442	1,8750	3,1883	1,744
Total AAE	0,811	0,7403	0,9402	0,6469	0,4999	0,7279	1,2785	0,792
% AAE	43,15%	45,20%	50,15%	42,33%	43,69%	38,82%	40,10%	45,40%

I.3.2.7 Tests d'activités antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne a été d'abord évaluée par la méthode de diffusion sur puits de gélose. Après 24H d'incubation à température optimale de croissance, l'activité antibactérienne se traduit par un halo d'inhibition autour du puits (Figure III.33).

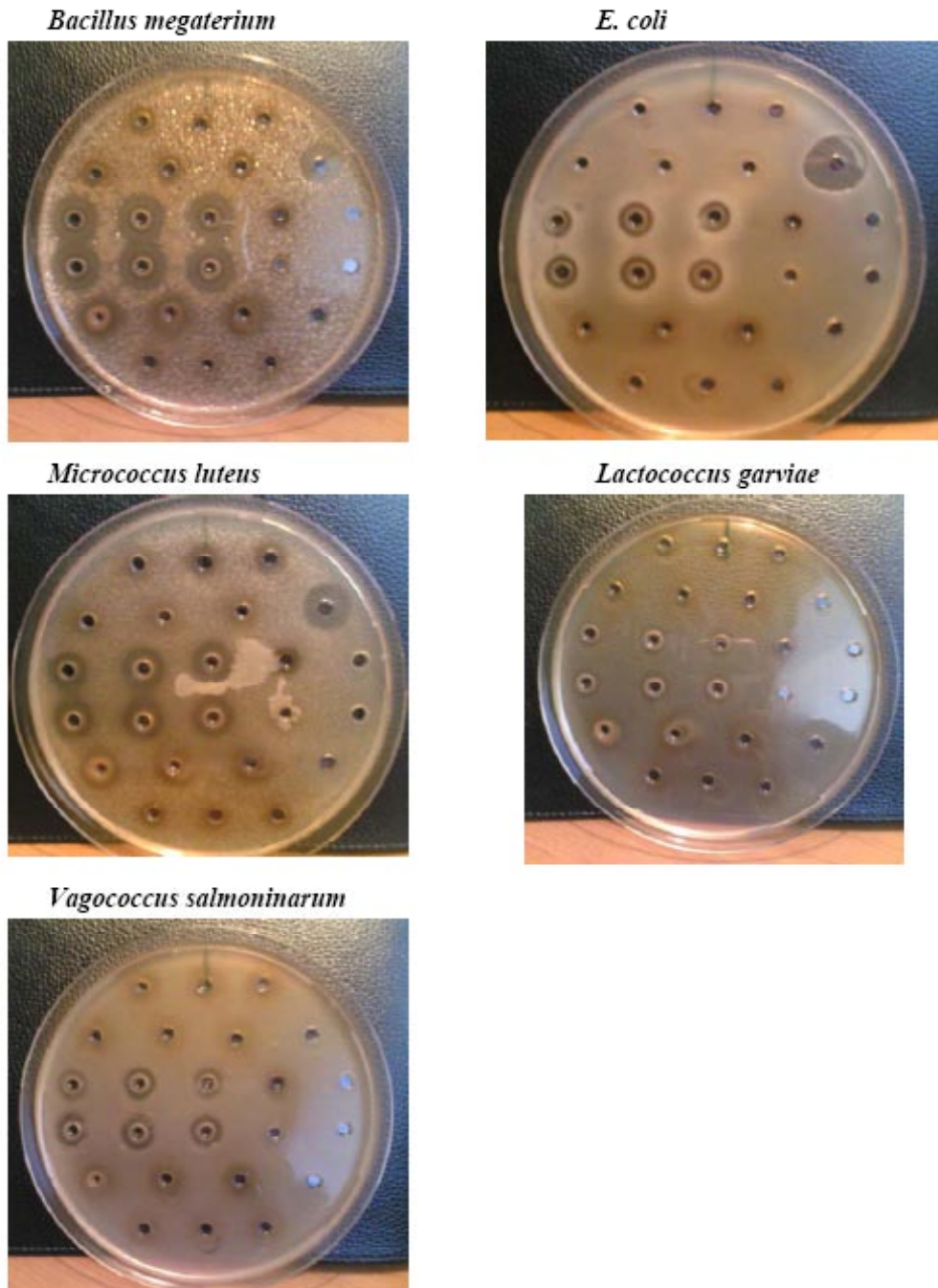


Figure III.33 : Résultats des tests antimicrobiens des hydrolysats de 6 h des viscères de seiche (V+E et V-E) avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral sur les souches bactériennes testées.

D'après les photos des boîtes de pétri et compte tenu du schéma de dépôt, on constate d'après les halos obtenus autour des puits de gélose que des activités antibactériennes sont détectées contre toutes les souches pour les échantillons hydrolysats de Pepsine des viscères de seiche (V+E).

Afin de confirmer les résultats trouvés, les échantillons ont été analysés par la méthode des gels recouverts. Etant donné que les hydrolysats de toutes les heures ont montré des activités inhibitrices de croissance des souches bactériennes, seuls les prélèvements après 1h d'hydrolyse ont été testés. Les hydrolysats des deux types de matrices V+E et V-E ont été testées afin de confirmer que ce sont bien les viscères de seiche avec encre qui ont montré l'activité inhibitrice. La souche cible employée est *Bacillus megaterium* ATCC 10 778. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure III.34. D'après la figure ci-dessus, une zone d'inhibition est observée pour les échantillons des hydrolysats de Pepsine (V+E). Le poids moléculaire du composé actif peut être estimé à environ 6 kDa.

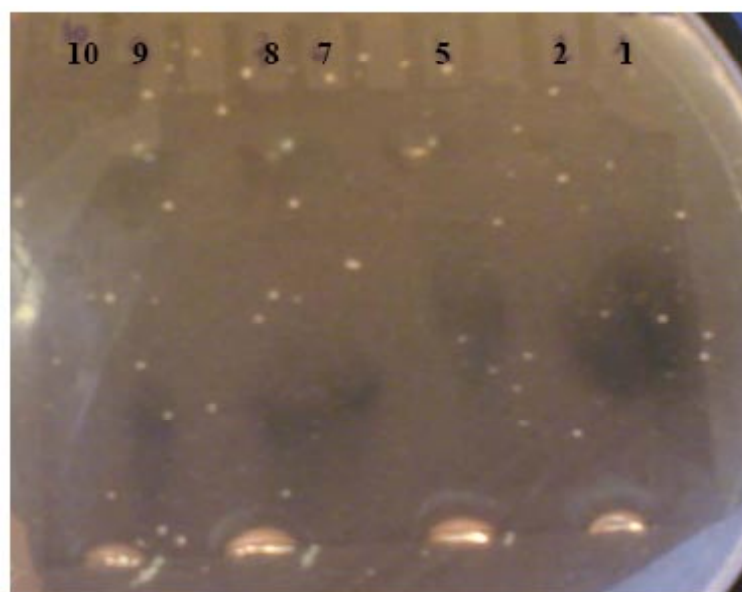


Figure III.34 : Gel SDS-PAGE recouvert d'une gélose ensemencée avec *Bacillus megaterium* ATCC 10778. Puits : 1 : Pepsine(V+E), 2 : Pepsine (V-E), 4 : Protamex (V+E), 6 : Protamex (V-E) 7 : Delvolase (V+E), 8 :Delvolase (V-E), 9 : Multifect Neutral (V+E), 10 : Multifect Neutral (V-E).

I.3.2.8 Discussion

Le but de ce chapitre était de compléter la partie criblage des enzymes en testant d'autres protéases commerciales opérant à des conditions physico-chimiques différentes et de définir ainsi l'enzyme et le temps d'hydrolyse nécessaires à l'obtention d'un produit riche en composés d'intérêt nutritionnel (peptides, acides aminés, lipides, phospholipides,...) mais aussi un produit riche en peptides antimicrobiens. Nous avons également réalisé une comparaison entre les deux matrices, c'est-à-dire les viscères avec encre et les viscères sans encre afin de ressortir l'importance de la glande d'encre dans ce type de co-produit et de montrer la spécificité de ce dernier par rapport aux co-produits traditionnels de poissons.

Pour la cinétique d'hydrolyse, les profils obtenus ont la même allure pour chaque traitement. **D'une manière générale et quelle que soit l'enzyme utilisée, au bout de deux heures d'hydrolyse, un plateau s'installe.** Ceci est particulièrement vrai pour Pepsine où la première phase de l'hydrolyse est très rapide et avec laquelle enzyme on obtient le DH le plus important. **En effet, alors que le DH maximum était atteint avec Alcalase et avait une valeur de 7%, il atteint 18% pour l'hydrolyse réalisée sur les viscères avec encre avec Pepsine.** La phase de croissance exponentielle de la courbe d'hydrolyse correspond à une rupture accrue des ponts peptidiques et à une libération des groupements α -aminés résultante. Cependant, la méthode de DNFB utilisée dans cette partie du travail, par rapport à la méthode pH-stat peut être discutable, de part l'utilisation d'une gamme étalon et la valeur de h_{tot} (8,6 meq/g). En effet, cette valeur est estimée et non calculée à partir du contenu en acides aminés du matériel brut (Adler-Nissen 1986). Des valeurs plus faibles de h_{tot} plus faibles, autour de 7,5 sont mentionnées dans la littérature comme pour le saumon (Kristinsson et Rasco 2000) et chez le requin (Diniz et Martin 1996), même si la plupart des auteurs continuent à utiliser la valeur de 8,6.

Comme évoqué précédemment, la conduite d'une hydrolyse sur les viscères de seiche (avec et sans encre) avec des protéases externes commerciales induit une amélioration du rendement du processus d'hydrolyse en termes de solubilisation de la matière, récupération des protéines et du degré d'hydrolyse. **Les résultats obtenus en utilisant la Pepsine induisent une répartition de la matière pouvant atteindre 87% dans la fraction soluble.** Les résultats de la solubilisation des protéines sont en parfaite concordance avec ceux obtenus pour le DH et la solubilisation de la matière sèche. Le suivi de la cinétique de distribution des protéines dans la phase soluble et la phase insoluble au cours du temps montre clairement le

passage des protéines du culot vers la phase aqueuse. Les meilleures performances sont obtenues avec Pepsine, pour les deux types de matrices avec jusqu'à 88% de protéines dans la phase soluble pour V+E et presque 70% pour V-E au bout des 6 h d'hydrolyse. En termes de rendements et de performances d'hydrolyse, Delvolase se classe en seconde position après Pepsine, puis on trouve Protamex et Multifect Neutral qui fournissent des résultats similaires. Comme prévu les hydrolyses réalisées avec uniquement les enzymes endogènes montrent des résultats très inférieurs de ceux avec les protéases exogènes. Ce classement des enzymes sera conservé pour pratiquement toutes les analyses.

La réaction d'hydrolyse de 6h ne permet pas une aussi grande libération des lipides dans la fraction soluble que lors des hydrolyses de 24 h. Après 6 h d'hydrolyse, une quantité importante reste dans le culot, rendant plus délicate leur extraction. Cependant, la phase soluble a été enrichie par rapport aux viscères non hydrolysés puisque la teneur en lipides en cette phase est passée de $4,3 \pm 1,6$ g/100g dans la fraction initiale à $11,3 \pm 1,2$ g/100g pour l'hydrolyse de 6 h conduite avec Multifect Neutral. A l'exception du traitement réalisé avec Multifect Neutral pour V+E et V-E et Delvolase pour V-E, l'hydrolyse de 6 h permet d'augmenter la disponibilité des phospholipides. **La meilleure performance est obtenue avec Pepsine où la disponibilité des phospholipides est augmentée d'un facteur 1,2 pour V-E et 2,2 pour V+E.** Cependant et comme pour les lipides, les quantités de phospholipides obtenues sont inférieures à celles observées lors des hydrolyses de 24 h, notamment pour Protamex puisque les deux hydrolyses sont réalisées dans les mêmes conditions physico-chimiques. Quelle que soit l'enzyme utilisée, les lipides sont localisés principalement dans la fraction liquide.

Les profils moléculaires suivent la même évolution et confirment bien que la fraction la plus hydrolysée est celle contenant les peptides de plus petite taille (entre 250 et 500 Daltons). Même si les chromatogrammes présentent, au fil du temps un décalage vers les molécules de petite taille, le calcul de l'aire sous la courbe montre qu'à partir de la deuxième heure d'hydrolyse, on arrive à obtenir un pourcentage très important des peptides entre 250 et 1000 Da. De tels résultats ont été mis en évidence dans le travail de Ravallec-Plé où les hydrolyses de seulement 2 heures ont permis de produire des peptides de taille inférieure à 500 Da (Ravallec-Plé et al. 2000). Cependant, après ce pic de peptides de faible poids moléculaire, on observe parfois une diminution de cette proportion à partir de la 3^{ème} heure d'hydrolyse qui serait probablement due à la formation de complexes entre les protéines et lipides. L'analyse

des acides aminés conforte cette hypothèse vu que pour certaines hydrolyses, la quantité de certains acides aminés peut diminuer vers la 4^{ème} ou la 5^{ème} heure d'hydrolyse. Par ailleurs, les performances de la Pepsine ont été confirmées vu que les proportions les plus élevées de matériel peptidique de petite taille ont été attribuées aux hydrolyses avec la Pepsine, aussi bien pour les viscères de seiche avec encre que sans encre.

Ainsi, tous les résultats exposés ci-dessus confirment qu'il n'est pas nécessaire de conduire des hydrolyses de longue durée pour avoir un hydrolysats intéressant. **En effet au bout de 2 h d'hydrolyse une solubilisation quasiment maximale des protéines est atteinte, une bonne composition et teneur en acides aminés, particulièrement les acides aminés essentiels.** Ce résultat est particulièrement mis en évidence pour la Pepsine avec laquelle les meilleures performances de point de vue composition biochimique sont obtenues, De plus, ce sont les hydrolysats de cette enzyme qui montrent des activités antibactériennes. **La Pepsine est donc l'enzyme qui se distingue des autres protéases étudiées ici.** Concernant le temps d'hydrolyse, ces résultats sont en concordance avec des travaux antérieurs sur les co-produits de poissons. Par exemple Ravallec-Plé et al. ont obtenu un DH de 24,85% avec Alcalase sur des co-produits de morue sur un temps d'hydrolyse de 2 heures (Ravallec-Plé et al. 2001). Martínez-Montaña et al., travaillant sur l'hydrolyse acide avec Pepsine du muscle de thon (hydrolyse de 2 h) ont démontré le même schéma de cinétique d'hydrolyse que nous avons mis en évidence dans ce travail, avec un DH des hydrolysats protéiques montrant une tendance exponentielle durant les 90 premières minutes, suivi d'une phase asymptotique avec un DH maximal de 19,4% au bout des 2 h d'hydrolyse (Martínez-Montaña et al. 2010). Pastoriza et al. (2003) ont montré que le degré d'hydrolyse, obtenu après 1 heure de digestion enzymatique étaient de 15.88% avec Pepsine, ce qui rejoint encore une fois les résultats obtenus dans ce travail.

Dans ce contexte, il est important de mentionner que l'efficacité de la dégradation des protéines dépend directement des caractéristiques de l'enzyme. Cette efficacité de l'enzyme est la raison des hauts degrés d'hydrolyse obtenus (Alarcón et al. 2002). En effet, Pepsine (E.C 3.4.23.1) est une protéase non spécifique des peptides et protéines en milieu acide. Contrairement à d'autres endopeptidases, elle hydrolyse uniquement les ponts peptidiques et n'hydrolyse pas les amides non peptidiques ou les liaisons esters. Par ailleurs, la Pepsine montre une préférence de coupure pour les résidus aromatiques hydrophobes

Les résultats concernant la composition et la concentration en acides aminés montrent que d'une manière générale, les hydrolyses enzymatiques ont permis l'augmentation du nombre et de la quantité d'acides aminés en phase soluble par rapport aux viscères de seiche avec et sans encre, non hydrolysées. **Les quantités les plus importantes sont obtenues avec Pepsine, avec un maximum atteint au bout de 2 h d'hydrolyse.** L'acide aminé le plus abondant obtenu avec ce traitement enzymatique est l'alanine, suivi de la glycine, la Valine et la Phénylalanine. Ceci pourrait être expliqué par les préférences des sites d'hydrolyse de la Pepsine, (Sepulveda et al. 1975). En outre, les proportions d'AAE dans les hydrolysats obtenus par Pepsine sont importants (~50%). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude portant sur la composition en acides aminés des hydrolysats des viscères de seiche, ou même de viscères de céphalopodes en général, rendant ainsi la comparaison de nos résultats à propos des acides aminés difficile. Cependant, des résultats similaires aux notre, en terme de composition et d'abondance d'acides aminés ont été rapportés par Lian et al. en utilisant des co-produits de calmar et où la glycine et l'alanine ont enregistré une augmentation de 237% et de 173% respectivement au bout de 2 h d'hydrolyse. D'autres études réalisées sur les hydrolysats de poissons (Klompong et al. 2009 – Jia et al. 2010) ont également montré une abondance de l'alanine et la glycine ainsi que des ratios acides aminés essentiels/acides aminés non essentiels de 0.55 dans les hydrolysats des filets du Selar à bande dorée (Klompong et al. 2009).

Les résultats obtenus par rapport aux acides aminés confirment bien l'hypothèse que les hydrolysats des viscères de seiche peuvent être une source nutritionnelle de haute qualité, notamment pour la nutrition aquacole. En effet, un aliment riche en glycine et en alanine, acides aminés majoritaires dans nos produits présente un fort pouvoir appétant pour certaines espèces de poissons carnivores (Pawson 1977). Ainsi, dans le reste de l'étude et au niveau biochimique, l'accent sera mis sur la composition protéique et en particulier la composition en acides aminés pour caractériser la valeur nutritionnelle de nos hydrolysats. En effet, les protéines sont la catégorie biochimique la plus importante en nutrition aquacole, non seulement pour les considérations économiques ainsi que les besoins alimentaires très particuliers des poissons carnivores mais également à cause du fait que les facteurs de croissance sont généralement associés à certaines sources protéiques (Wilson 2002). Il est bien connu que la qualité d'une protéine est déterminée par plusieurs facteurs et notamment la composition en acides aminés, qui est très importante puisqu'elle définit le degré d'assimilation ainsi que la digestibilité des protéines (Bureau et al. 1999). Martínez-Montaña

et al (2009) dans leur étude sur l'absorption intestinale chez le thon *Thunnus orientalis* ont également démontré que les acides aminés présentant un fort degré d'absorption sont ALA et GLY avec des taux variant de 517 à 793 et de 479 à 850 pmol cm⁻² respectivement. Ainsi, les hydrolysats obtenus dans cette partie, et plus spécifiquement l'hydrolysat pepsique constituent une source riche en nutriments potentiellement valorisables en alimentation aquacole. De plus, les importantes concentrations obtenues en AAE sont très intéressantes puisque la bonne assimilation de ces derniers par les poissons d'élevage a été démontrée (Berge et al. 1999 - Bakke-McKellep et al. 2000 – Berge et al. 2004).

La comparaison de la composition en acides aminés entre les hydrolysats protéiques des viscères de seiche avec encre et des protéines de référence ainsi que les scores biochimiques sont présentés dans les tableaux III.15 et III.16. Les scores biochimiques fournissent une estimation de valeur nutritive d'une protéine et comparent les teneurs en AAE entre les hydrolysats protéiques et les protéines standards. Dans cette étude, les scores sont calculés sur la base des protéines de référence pour une personne adulte, fixées par la FAO et l'OMS, ainsi que sur la base des besoins en acides aminés des juvéniles de la Carpe commune, listés par NRC (National Research Council). **Ainsi, la comparaison de la composition en acides aminés de nos produits avec les protéines de référence ont révélé que la teneur en AAE des hydrolysats des viscères de seiche avec encre est généralement supérieure aux profils protéiques requis par la FAO et l'OMS pour les adultes et ce indépendamment de l'enzyme utilisée.** Le seul point faible des hydrolysats protéiques des viscères de seiche est la faible teneur en Histidine, acide aminé important pour l'organisme adulte humain. Concernant la deuxième protéine de référence (RP-2) pour la carpe commune, le calcul des coefficients a montré que d'une manière générale, la quantité des AA dans les hydrolysats des viscères de seiche est en dessous des besoins requis pour les juvéniles de ce poisson, exception faite pour les hydrolysats réalisés avec Pepsine, et avec les autres enzymes pour la leucine et parfois la lysine (Protamex, Pepsine et Multifect Neutral). En conclusion on peut dire que nos hydrolysats satisfont presque totalement les besoins humains en acides aminés, et en partie ceux des juvéniles de la carpe. **En dépit du déficit en certains AAE comme l'histidine, les hydrolysats protéiques des viscères de seiche peuvent être incorporés en tant qu'ingrédients supplémentaires dans le régime alimentaire des poissons en aquaculture.**

Tableau III.15 : Composition en acides aminés des hydrolysats des viscères de seiche avec encre (g/100g) obtenus après hydrolyses avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral en comparaison avec les protéines de références de la FAO/WHO et NRC.

Acide aminé	Qté (g/100g)				Protéine de référence 1 ^a	Protéine de référence 2 ^a
	Protamex	Pepsine	Delvolase	Multifect Neutral		
VAL	2,13	2,24	2,03	2,72	1,3	3,6
LEU	3,31	4,68	3,62	4,49	1,9	3,3
ILE	2,23	2,42	2,15	3,12	1,3	2,5
THR	1,18	1,96	1,07	2,33	0,9	3,9
MET	0,88	1,29	0,85	1,12	1,7	3,1
PHE	1,92	2,45	1,5	2,23	-	6,5
LYS	1,59	2,42	0,67	2,02	1,6	5,7
HIS	0	0,18	0	0,28	1,6	2,1

^a Profil en AA suggéré pour un adulte (FAO/WHO, 1999)

^b Besoins en AA de la carpe commune selon NRC (1993)

Tableau III.16 : Comparaison des ratios obtenus avec les hydrolysats des viscères de seiche avec encre obtenus avec Protamex, Pepsine, Delvolase et Multifect Neutral et les protéines de référence, RP-1 (FAO/WHO) et RP-2 (NRC).

Acide aminé	Protamex		Pepsine		Delvolase		Multifect Neutral	
	RP-1	RP-2	RP-1	RP-2	RP-1	RP-2	RP-1	RP-2
VAL	1,64	0,59	1,72	2,62	1,56	0,56	2,09	0,75
LEU	1,74	1,00	2,46	1,42	1,91	1,10	2,36	1,36
ILE	1,72	0,89	1,86	2,97	1,65	0,86	2,40	1,25
THR	1,31	0,30	2,17	1,50	1,19	0,27	2,59	0,60
MET	0,52	0,28	0,76	1,41	0,50	0,27	0,66	0,36
PHE	-	0,29	-	2,38	-	0,23	-	0,34
LYS	1,00	0,28	1,00	1,28	0,42	0,12	1,26	0,35
HIS	0,00	0,00	0,11	0,08	0,00	0,00	0,18	0,13

Cette partie de l'étude a également pour but de comparer deux types de matrices : les viscères de seiches avec encre, et les viscères de seiche dépourvues de la glande d'encre. D'après les résultats des analyses, nous avons pu démontrer qu'il existe bien une différence dans les traitements enzymatiques entre les deux matrices. Cette différence est vraisemblablement liée à la présence de l'encre. En effet, et quelque soit l'enzyme utilisée pour l'hydrolyse, les valeurs de DH sont toujours supérieures pour la matrice viscères avec encre. Nous avons déjà montré que les viscères de seiche non hydrolysées avec encre sont différents de point de vue composition biochimique-notamment pour les teneurs en protéines- des viscères de seiche sans encre non hydrolysées. Ainsi, comme mentionné plus haut, le degré d'hydrolyse est étroitement lié au nombre et à la disponibilité des sites de coupure.

Dans ce cas, et vu le volume important d'encre disponible dans la glande, ou poche du noir, on peut estimer une disponibilité plus importante des liaisons protéiques, surtout que cette substance est composée essentiellement de composés protéiques (Neifar et al. 2008).

En outre, l'analyse de la composition en acides aminés révèle des différences entre les deux substrats, surtout au niveau de la phénylalanine où les quantités dans les viscères avec encre sont jusqu'à 5 fois supérieures. Les mêmes constatations sont faites pour la tyrosine, où quelle que soit l'enzyme utilisée, les teneurs pour cet acide aminé sont toujours supérieures dans les viscères de seiche avec encre. Des résultats similaires sur la composition en acides aminés de l'encre de plusieurs mollusques, entre autres *Sepia officinalis* ont été rapportés dans le travail de Derby et al. (2007) En prenant en considération la composition de l'encre et le schéma de synthèse de la mélanine dans la glande, on constate que les teneurs élevées en tyrosine et en phénylalanine sont expliquées. En effet, l'encre de seiche est composée essentiellement de sépiomélanine, c'est-à-dire de la cyclodopa-mélanine (Prota et al. 1981 - Nicolaus 1968). A part quelques impuretés, cette mélanine comprend un mélange de polymères hautement réticulés, constitués des différentes unités structurales, dérivées de la tyrosine : 5,6 DHI (dihydroxi-indole), 5,6 DHIC (dihydroxy-indole carboxylic acid), acides pyrrole carboxyliques, leuchodopachrome et unités Dopa non cycliques (Pezzella et al. 1997 – Ortonne et al. 1981). Les unités Dopa produites ne sont en fait que de la phénylalanine hydroxylée (3,4-dihydroxyphénylalanine), substance intermédiaire dans la synthèse des quinones aboutissant à l'eumélanine de l'encre de seiche (d'Ischia et al. 1991-Shraemayer 1994 – Pezzella et al. 2003).

Les résultats des tests préliminaires d'activités antimicrobiennes ont montré que c'est avec les hydrolysats pepsiques des viscères avec encre que l'on obtient une activité antimicrobienne importante. L'hydrolyse enzymatique des viscères de seiche sans encre avec Pepsine a également montré une activité inhibitrice mais de moindre importance par rapport aux hydrolysats des viscères avec encre. Il n'a cependant pas été décelé de différences dans l'inhibition de la croissance entre les souches bactériennes testées. L'activité antimicrobienne de l'encre de seiche contre différents groupes de micro-organismes a été démontrée depuis longtemps dans de nombreux travaux (Mochizuki 1979 – Palumbo et Jackson 1995 - Takai et al. 1993. Mochizuki (1979), en purifiant l'isolat possédant un effet inhibiteur sur la culture de *Staphylococcus aureus* a déduit que la propriété antibactérienne de l'encre est due à une substance similaire aux lysozymes. Takai et al. (1993) ont affirmé qu'à

la fois la croissance de *Staphylococcus epidermis* et *Staphylococcus aureus* est inhibée par les extraits de l'encre de calmar. De plus, Sadok et al. (2004) ont pu mettre en évidence une relation entre un traitement à différentes concentrations à base d'encre de seiche *Sepia officinalis* et l'augmentation de la durée de conservation des crevettes décortiquées et conditionnées et ce par inhibition de la prolifération bactérienne anaérobie et du processus de contamination en particulier par la flore psychrotrophe. Sur cette base, nous allons approfondir cette partie en ciblant la flore de contamination de la crevette. Une activité similaire a été observée pour l'extrait aqueux de l'encre de la seiche *Sepia pharaonis* contre la bactérie *Proteus mirabilis* et pour celui de *Loligo duvaucelii* contre *Escherichia coli* (Patterson Edward et Murugan. 2000)

Si les hydrolysats des viscères de seiche avec encre ont démontré les activités inhibitrices les plus significatives, l'encre n'est cependant pas la seule responsable des propriétés antibactériennes. En effet, les glandes nidamentaires accessoires, fraction très importante composant le tractus digestif de la seiche ont également montré des propriétés antimicrobiennes. Le rôle de ces glandes étant de sécréter une substance servant à envelopper et à protéger les œufs en période de reproduction. Sherief et al. 2004 ont mis en évidence une activité antibactérienne des solvants extraits à partir des glandes de la seiche et du calmar, le pic de cette activité coïncidant avec la période de maturité.

CONCLUSION

Trois points importants ressortent clairement suite à cette étape de l'étude. D'abord les résultats des hydrolyses ont montré qu'une hydrolyse avancée n'est pas nécessaire pour obtenir un hydrolysate possédant à la fois des propriétés nutritionnelles intéressantes et des activités biologiques telles que l'activité antibactérienne. En effet, au bout de 2 heures d'hydrolyse, nous arrivons à obtenir un plateau pour le DH et à solubiliser pratiquement le maximum de protéines. Les lipides ainsi que les phospholipides semblent cependant nécessiter un temps d'hydrolyse plus long vu que les rendements des hydrolyses de 6 h sont moins importants que ceux de 24 h.

Cette étape a permis également de montrer que la Pepsine est l'enzyme avec laquelle on a obtenu les meilleures performances et ce au niveau du degré d'hydrolyse, de la solubilisation de la matière et des activités antimicrobiennes. L'action protéolytique de cette enzyme a été très intéressante d'autant plus que les hydrolysats sont enrichis en acides

aminés, ce qui en fait un ingrédient potentiellement utilisable en alimentation animale, plus spécifiquement en aquaculture. Par ailleurs, même si les quantités de lipides et de phospholipides sont moindres par rapport à celles des hydrolyses de 24 h réalisées par Alcalase et Flavourzyme, elles demeurent néanmoins supérieures à celles obtenues par extraction classique par les solvants organiques. Concernant l'activité antibactérienne élevée, une relation semble exister entre le pourcentage important de peptides de petit poids moléculaire obtenu particulièrement avec cette enzyme et la propriété antimicrobienne. En effet, ce type d'activité biologique est lié à une population peptidique de poids moléculaire, se situant autour de 1000 Da. L'étude comparative réalisée sur les deux types de matières premières, viscères de seiche avec encre et viscères sans encre a permis de montrer que la présence de l'encre est très importante, surtout de point de vue composition en acides aminés et propriétés antimicrobiennes.

Ce criblage plus fin des enzymes a permis de mettre en évidence la protéase la plus performante et c'est donc la Pepsine qui a été choisie pour l'optimisation de l'hydrolyse enzymatique des viscères de seiche. **Une fois les conditions optimales déterminées, les hydrolyses à échelle pilote seront conduites - sur la base des résultats rapportés dans cette partie - pendant 2 heures et avec la matrice viscères de seiche avec encre et ce sans contrôle de pH afin d'être le proche possible des conditions transférables en industrie.** Une étude plus poussée des caractéristiques nutritionnelles et biologiques de l'hydrolysat produit à échelle pré-industrielle fera en partie, l'objet du prochain chapitre. **Cette étape constitue donc un pas important dans l'utilisation d'hydrolysats protéiques à grande échelle pour l'alimentation animale. Outre les caractéristiques nutritionnelles, le choix de l'enzyme a été conditionné et orienté vers l'activité antimicrobienne.**

I.3.3 Optimisation de l'hydrolyse avec Pepsine

Suite à l'étude précédente des hydrolyses de 6 heures, sans contrôle de pH, on a pu mettre en évidence la pepsine comme enzyme la plus performante. En outre, il a été révélé que c'est avec Pepsine, sur la matrice viscères de seiche avec encre que l'on obtient une activité inhibitrice de la croissance bactérienne. Ainsi, dans ce chapitre d'optimisation, toutes les hydrolyses ont été conduites avec Pepsine, à pH 2.

I.3.3.1 Conduite du plan d'expérience

Les réponses qui sont étudiées sont la teneur en lipides, en phospholipides et la composition en acides aminés. Pour les lipides et les phospholipides, deux réponses ont été étudiées : (i) les lipides totaux pour évaluer la quantité de lipides réellement présente dans l'hydrolysate, (ii) les lipides libérés qui correspondent aux lipides récupérés dans la fraction liquide et qui peuvent être libérés sans l'utilisation de solvants organiques. Généralement, le comportement de ces deux réponses est identique lors de la variation des paramètres. Le DH est calculé en se basant sur la quantité des groupements aminés libérés au bout des 2 heures d'hydrolyse.

Les réponses obtenues pour chaque hydrolyse du plan d'expériences sont reportées dans le Tableau III.17.

Tableau III.17 : Réponses du plan d'expériences obtenues pour les lipides et les acides aminés.

Numéro de l'expérience	DH	Lipides (g/g de viscères sèches)		Acides aminés (g/g de viscères sèches)	
		Toutes fractions	Fractions liquides	Toutes fractions	Fractions liquides
1	7%	0,16	0,14	0,0048	0,004
2	6%	0,10	0,07	0,0039	0,003
3	8%	0,13	0,11	0,005	0,003
4	6%	0,12	0,10	0,007	0,004
5	12%	0,14	0,11	0,006	0,005
6	11%	0,11	0,08	0,007	0,005
7	10%	0,15	0,13	0,007	0,005
8	14%	0,13	0,10	0,0056	0,004
9	13%	0,16	0,13	0,005	0,003
10	14%	0,17	0,14	0,007	0,006
11	15%	0,16	0,12	0,009	0,007
12	16%	0,15	0,13	0,007	0,005
13	18%	0,19	0,16	0,008	0,006
14	16%	0,17	0,15	0,0076	0,006
15	17%	0,16	0,13	0,009	0,007
16	18%	0,17	0,15	0,0057	0,004
17	20%	0,16	0,14	0,008	0,007
18	19%	0,17	0,15	0,007	0,005
19	13%	0,15	0,13	0,008	0,007
20	14%	0,13	0,11	0,006	0,005

Concernant le DH, les valeurs s'échelonnent de 7% (expérience n°1) à 20% (expérience n°17). Les DH obtenus pour les 4 expériences centrales (expériences n°9, 10, 19 et 20) sont du même ordre de grandeur et compris entre 13 et 14%. Les conditions opératoires permettant l'obtention du plus haut DH sont une durée d'hydrolyse de 1 h 37 min à 52,2°C, avec 1,5 (v/p) de volume d'eau et 0,45% (p/p) d'enzyme par rapport à la matière première (expérience n°17). Les conditions utilisées pour obtenir le plus faible DH sont une durée d'hydrolyse de 1 h 37 min, une température de 37,5°C, un volume d'eau de 0,5% (v/p) et une concentration en enzyme de 0,15% (p/p) par rapport à la matière première (expérience n°1). De plus, la Figure III.35 montre clairement que quelles que soient les conditions d'hydrolyses effectuées entre 80 et 90% de la matière se retrouve dans la phase soluble. Pour les 20 expériences, les profils de répartition de la matière sont tous similaires. Les hydrolyses conduites avec la Pepsine permettent ainsi d'obtenir une fraction insoluble qui ne dépasse pas 20% de la matière totale, quel que soit le DH obtenu.

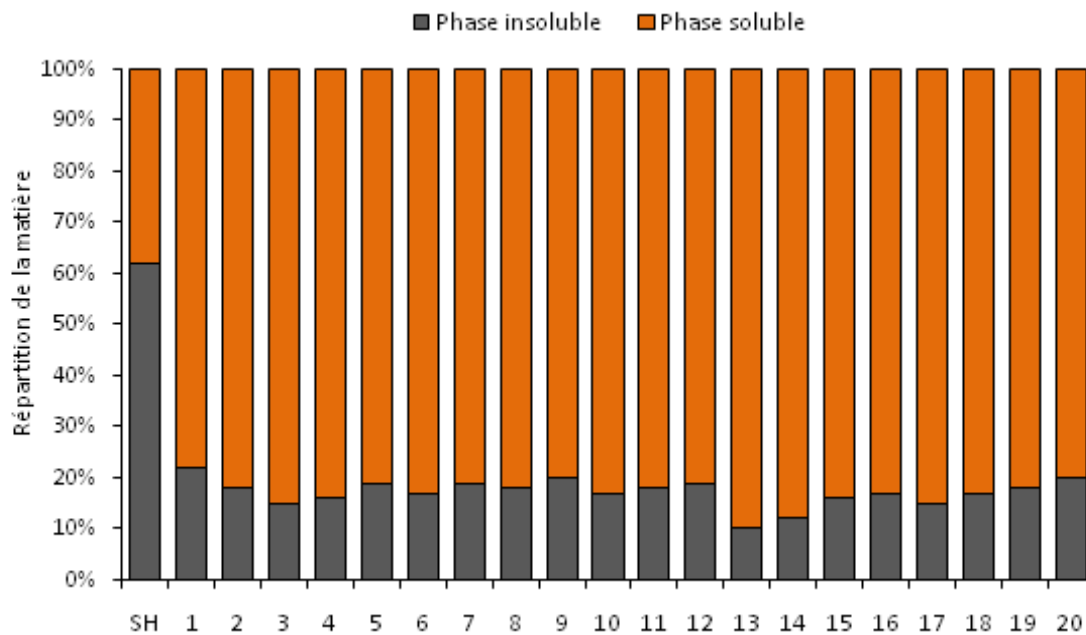


Figure III.35: Répartition de la matière sèche parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine.

Concernant les lipides, les valeurs vont de 0,10 à 0,19 g/g de matière sèche pour les lipides totaux (dans toutes les fractions), et de 0,07 à 0,16 g/g de matière sèche pour les lipides libérés (dans la fraction soluble) (Tableau III.16). Pour cette réponse, les points centraux (n°9, 10, 19 et 20) ne sont pas reproductibles et s'échelonnent de 0,13 à 0,17 g de lipides / g de matière sèche. Il est ainsi difficile ici d'établir une éventuelle influence des 4 paramètres testés tant la répartition des réponses est hétérogène. Les expériences 10, 13 et 16

et 18 conduisent aux extractions de lipides les plus importantes. Cependant, ces hydrolyses n'ont pas été réalisées dans des conditions opératoires similaires. L'expérience n°10 correspond à un temps d'hydrolyse court (1h 37 min) et une concentration en enzyme et en eau moyennes (0,15 et 0,5 respectivement) ainsi qu'une température basse (37,5°C). L'expérience n°13 est également conduite à une courte durée d'hydrolyse (1 h 37 min), une moyenne quantité d'enzyme (0,15%), un volume d'eau élevé (1,5) et une haute température (52,2°C). L'expérience 16, quant à elle correspond à une durée d'hydrolyse plus longue (4 h 32 min), une température et une concentration en enzyme élevées (52,2°C et 0,45%) et un faible volume d'eau de 0,5% (v/p). Enfin, pour l'expérience 18, la durée, la température, la concentration en enzyme ainsi que le volume d'eau rajoutés sont élevés (4 h 32 min, 52,2°C, 0,45% et 1,5). Pour l'ensemble de ce plan d'expériences, et quelques soient les conditions opératoire, 70 à 80% 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 1,2.

Les mêmes observations peuvent être faites concernant les phospholipides. Les valeurs s'échelonnent de 0,0039 à 0,009 g de phospholipides / g de matière sèche. Les points centraux ne sont pas non plus répétables et varient de 0,005 à 0,008 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 1,2 à plus de 2 (Figure III.36). En outre, les phospholipides se retrouvent, pour chaque expérience, majoritairement dans les fractions solubles. Les réponses obtenues pour les valeurs des concentrations en acides aminés du plan d'expérience sont reportées sur la Figure III.37. Comme on peut le constater, la quantité la plus importante est obtenue suite à l'expérience n°20, qui correspond à une hydrolyse de 3 h 5 min, une température de 45°C, un volume d'eau rajouté et un rapport E/S de 0,3. Il s'agit en fait de l'un des points centraux et la concentration en acides aminés totaux s'élève à 4,89 mmole/mg de matière sèche.

L'expérience n°11 révèle également une concentration importante en acides aminés et presque identique à celle de l'expérience n° 20 avec une valeur de 4,82 mmole/mg de matière sèche. Pour l'expérience n°11, le temps d'hydrolyse est court (1 h 37 min), la concentration en enzyme et le volume d'eau rajoutés sont faibles (0,5 pour l'eau et 0,15% pour la Pepsine), mais la température est élevée (52,2°C).

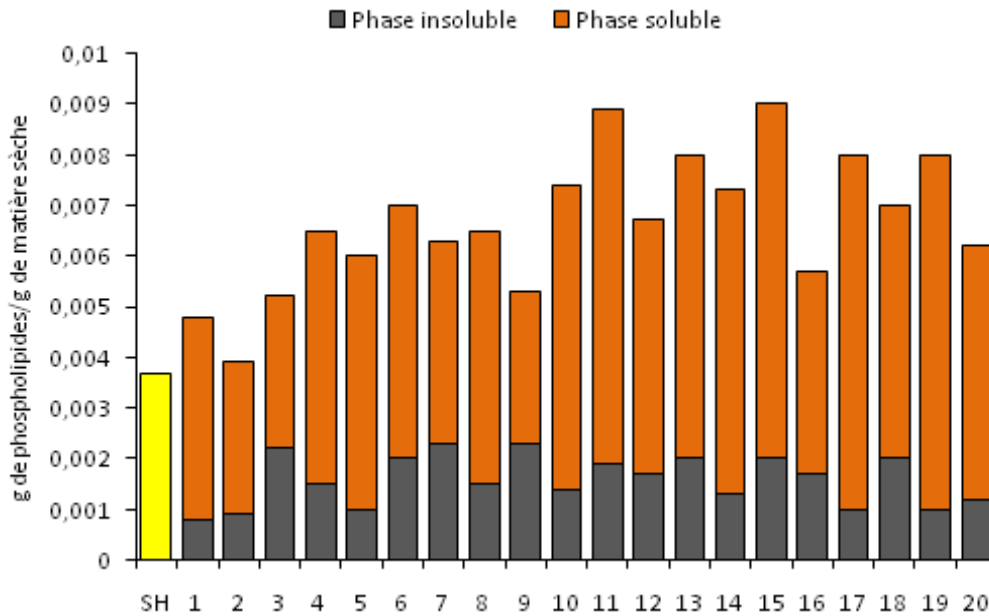


Figure III.36 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d’expériences établi pour l’optimisation de l’hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine.

A l’opposé, la quantité d’acides aminés libérés la plus faible est obtenue suite à l’expérience n°14 avec le temps d’hydrolyse le plus long au niveau du plan d’expériences (4 h 32 min), une température élevée de 52, 2°C, un volume d’eau rajouté de 1,5 et une concentration en enzyme de 0,15% (p/p) par rapport à la matière première.

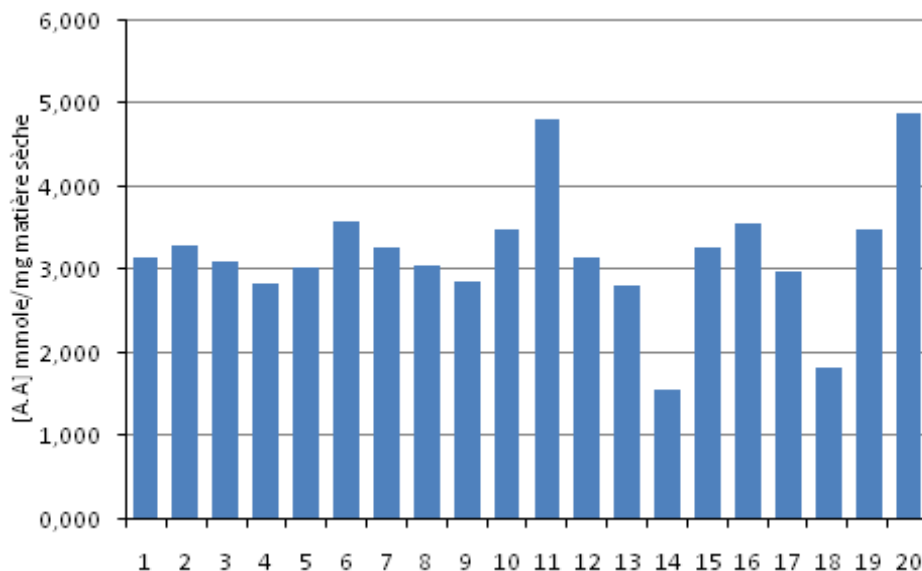


Figure III.37 : Quantités des acides aminés (en mmole/mg de matière sèche) libérés dans les hydrolysats du plan d’expériences établi pour l’optimisation de l’hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine.

Ainsi, et au vu de ces résultats, il semblerait que pour obtenir une concentration élevée en acides aminés totaux, il faille réaliser une hydrolyse sur un temps court, avec une température moyennement importante (~ 45°C) et un rapport E/S moyen (~ 0,15%). Ces conditions sont ainsi très proches de celles que nous avons utilisées lors des hydrolyses de 6 h à échelle de laboratoire.

I.3.3.2 Détermination des conditions optimales de l'hydrolyse

Toutes les valeurs obtenues pour chaque hydrolyse concernant le DH, les quantités de lipides, phospholipides et acides aminés récupérées dans les fractions liquides ont fait l'objet d'un traitement statistique afin de pouvoir prédire, en fonction des paramètres étudiés les meilleures conditions d'hydrolyse pour obtenir le plus fort DH ou les plus grandes quantités de lipides et phospholipides et d'acides aminés libérés. Seules les réponses du DH ont pu être modélisées. Les réponses concernant les lipides n'amènent qu'à des coefficients de régression de 6% pour les lipides et de 1% pour les phospholipides et de 2 % pour les acides aminés.

Le diagramme de Pareto (Figure III.38) met en évidence une estimation de l'importance des différents paramètres testés ainsi que leurs interactions sur le degré d'hydrolyse.

importants influençant le DH au cours d'une hydrolyse enzymatique. Les 2 autres paramètres (eau, temps) n'expliquent que très peu la variabilité du DH. La Figure III.39 montre le résultat de l'ajustement du modèle permettant ainsi de mettre en évidence la corrélation existante entre le DH et le rapport E/S.

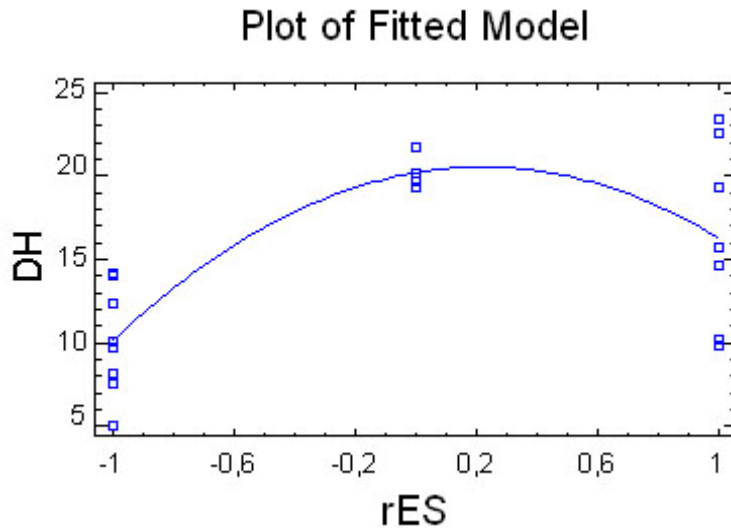


Figure III.39 : Diagramme d'ajustement du modèle réalisé pour le degré d'hydrolyse et le rapport E/S.

Les données enregistrées par le logiciel pour les 20 expériences sont reportées dans le Tableau III.18. Ce dernier montre que pour obtenir le plus fort DH, la protéolyse des viscères de seiche par Pepsine doit être conduite pendant 165 min à 50°C et avec 0,15% (p/p) d'enzyme et en rajoutant un volume d'eau par rapport à la masse du substrat. D'après la modélisation, ces conditions permettraient d'obtenir un DH de 22%, avec une robustesse de 89,5%.

Tableau III.18 : Conditions optimales déterminées pour la réponse du DH de l'optimisation des hydrolyses des viscères de seiche avec encrè par Pepsine et valeur prédite pour cette réponse.

		Réponse	DH
Conditions	Temps d'hydrolyse (min)		165
	Enzyme (% , p/p)		0,15
	Température (°C)		50
	Volume d'eau (% v/p)		1
	R ² ajusté (%)		89,5
Valeur prédite	DH		22%

L'équation permettant de modéliser le DH (Equation III.1) est la suivante :

$$\text{DH} = - 1,83351 + 0,000252351 \times \text{Durée d'hydrolyse} + 1,07624 \times \text{Enzyme} + 0,5075454 \times \text{Température} + 0,0000001285987 \times \text{Eau} - 0,000000134221 \times (\text{Temps d'hydrolyse})^2 + 0,000152745 \times \text{Temps d'hydrolyse} \times \text{Enzyme} - 0,0000122557 \times \text{Temps d'hydrolyse} \times \text{Température} + 0,0000107865 \times \text{Temps d'hydrolyse} \times \text{Eau} - 0,000582734 \times (\text{Enzyme})^2 - 0,00134298 \times \text{Enzyme} \times \text{Température} - 0,000347895 \times (\text{Eau})^2 - 0,000582734 \times (\text{Température})^2$$

Nous avons suivi l'évolution du DH au cours de l'hydrolyse menée dans les conditions données par le logiciel. Au bout de 165 min d'hydrolyse, le DH final est très proche de celui prédit, puisqu'il atteint 21%. La répartition de la matière après avoir conduit cette hydrolyse considérée comme optimale est de 88,3% dans la fraction soluble. Cependant, cette hydrolyse a permis la libération de seulement 78% de lipides totaux avec 51% uniquement localisés dans les fractions liquides. En outre, l'extraction des phospholipides n'a été améliorée que d'un facteur de 1,2. Concernant les acides aminés, cette hydrolyse nous permet d'obtenir une concentration en acides aminés de 4,78 mmoles/mg de matière sèche, correspondant presque à la valeur la plus élevée obtenue au niveau de la réaction 20 du plan d'expériences.

I.3.3.3 Discussion

Le but de ce chapitre était d'étudier l'influence de la durée de l'hydrolyse, de la température, de la concentration en enzyme et du volume en eau pour la conduite de l'hydrolyse des viscères de seiche par Pepsine, en essayant de définir les conditions d'hydrolyse et d'optimiser ces 4 paramètres permettant d'obtenir les réponses les plus hautes pour le DH, la concentration totale en acides aminés et les quantités de lipides et de phospholipides récupérées dans les fractions liquides.

D'après les résultats obtenus, le DH est la seule réponse qui a pu être modélisée. Le coefficient de régression ajusté (R^2) n'est pas très élevé (82%) et en dessous de 90%. La conduite de l'hydrolyse aux conditions préconisées par le logiciel nous donne cependant les résultats prédits. Le DH s'élève en effet à 21 %. Par ailleurs, la concentration en acides aminés totaux obtenue est quasiment la même que celle obtenue par le plan d'expérience. Cependant, les résultats obtenus pour les lipides et les phospholipides ne montrent pas une très grande robustesse du modèle vu que l'hydrolyse ne réalise pas une grande augmentation.

CONCLUSION

Mis à part le degré d'hydrolyse, la conduite de ce plan d'expériences ne permet pas de trouver les meilleures conditions pour la libération des lipides et des phospholipides ainsi que pour les acides aminés. Ces résultats viennent sans doute du choix du domaine d'étude pour mener ce plan d'expériences. Les réponses obtenues concernant les lipides, les phospholipides et les acides aminés n'ont pas montré de réponses significatives par rapport aux 4 paramètres étudiés. En outre, les variations enregistrées pour les points centraux correspondant à 50% de la variation totale, rendant ainsi difficile pour le logiciel de prédire une réponse. Le même constat est observé pour les phospholipides et les acides aminés. Le domaine d'étude choisi semble toutefois donner les valeurs maximales d'extraction des lipides, des phospholipides et des acides aminés.

Dans cette étude, nous avons choisi d'une manière intentionnelle de limiter le domaine d'étude, (de 1 h 37 min à 4 h 32 min, de 32,5 à 52,2°C, des concentrations en enzyme de 0,15 à 1,5% (p/p) et un volume d'eau rajouté de 0,5 à 1,5 (v/p). La modélisation nous a permis au moins d'observer l'influence que possèdent les paramètres ici étudiés sur le DH. Les réponses observées suite à la conduite de l'hydrolyse aux conditions optimales nous a permis d'obtenir des résultats intéressants, surtout pour le DH et la quantité et la qualité des acides aminés. Ainsi, pour la suite de l'étude et pour la conduite de l'hydrolyse à échelle pilote, nous allons nous conformer aux conditions opératoires de l'hydrolyse avec la Pepsine à échelle de laboratoire, c'est-à-dire 2 h d'hydrolyse, sans ajustement de pH, avec un rapport E/S de 0,1% et en rajoutant 1 volume d'eau au substrat viscéres de seiche à hydrolyser. En effet, nous avons déjà démontré que les meilleurs résultats ont été obtenus dans ces conditions. De plus, suite à la conduite de l'hydrolyse suivant les paramètres optimisés par le logiciel, nous avons pu obtenir un DH ainsi qu'une concentration en acides aminés semblables à ceux obtenus à petite échelle. Une augmentation de la concentration en Pepsine de 0,05% n'est donc pas justifiée surtout que l'on se positionne toujours de manière à avoir les conditions les plus intéressantes économiquement pour un industriel. Une augmentation de la concentration en enzyme, même minime aurait des conséquences importantes à grande échelle. Par ailleurs, le but de ce travail est également d'obtenir des peptides antimicrobiens. Nous avons déjà vu que c'est avec Pepsine que l'on obtient les activités inhibitrices les plus intéressantes, ce qui nous amènera à tester les peptides que nous avons obtenus suite aux 20 expériences pour voir si l'on obtient une réponse intéressante et si la variation des conditions d'hydrolyse influence la propriété antibactérienne de notre hydrolysate.

I.4 ETUDE DE LA CINÉTIQUE DE CROISSANCE DE PATHOGENES MARINS EN PRESENCE DES HYDROLYSATS DE PEPSINE

Dans cette partie, les hydrolysats issus du plan d'expériences réalisé avec la Pepsine en vue de l'optimisation de l'hydrolyse sont testés sur quelques bactéries appartenant à flore d'altération des produits de la mer. L'objectif de ce travail est tout d'abord de comparer les croissances des bactéries sans peptides en présence du témoin uniquement puis en présence des différents peptides, puis de vérifier s'il existe une quelconque relation entre les conditions d'hydrolyse et le ralentissement voire l'inhibition de la croissance des bactéries et ce comparant les peptides entre eux. En tout, 20 hydrolysats issus des protéolyses conduites selon la matrice les paramètres du plan d'expérience ont donc été testés sur des pathogènes marins. Le choix de ces bactéries était motivé par le fait que ces souches sont responsables de l'altération des produits de la mer (saumon, crevettes,...) au cours du conditionnement et de la conservation et qui sont très souvent responsables de pertes économiques considérables. Ces pathogènes sont *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Serratia liquefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium* et *Vibrio cholerae*.

I.4.1 Evolution de la croissance de la biomasse bactérienne en fonction des 20 hydrolysats du plan d'expérience

Vu le nombre important d'hydrolysats et de souches bactériennes, il était impossible de représenter tous les graphiques montrant la cinétique de croissance de chaque bactérie en fonction de chaque hydrolysat (8 x 20). Ainsi, nous avons choisi de représenter toutes les courbes sur un même graphique, ce qui nous permettra d'obtenir une discrimination préliminaire entre les bactéries d'une part, et entre les différents hydrolysats d'autre part. Pour cela, nous avons représenté sur un même graphique la croissance d'une seule souche en fonction des 20 hydrolysats et ce uniquement pour *S.putrefaciens*. Des profils de croissance similaires sont obtenus pour toutes les autres souches.

Dans une cette première approche discriminative, nous avons tracé les courbes de croissance en portant la D.O en fonction du temps d'incubation. La représentation des courbes sur un même milieu de culture (un seul hydrolysat) a montré que la croissance des 8 souches bactériennes est semblable (résultats non exposés).

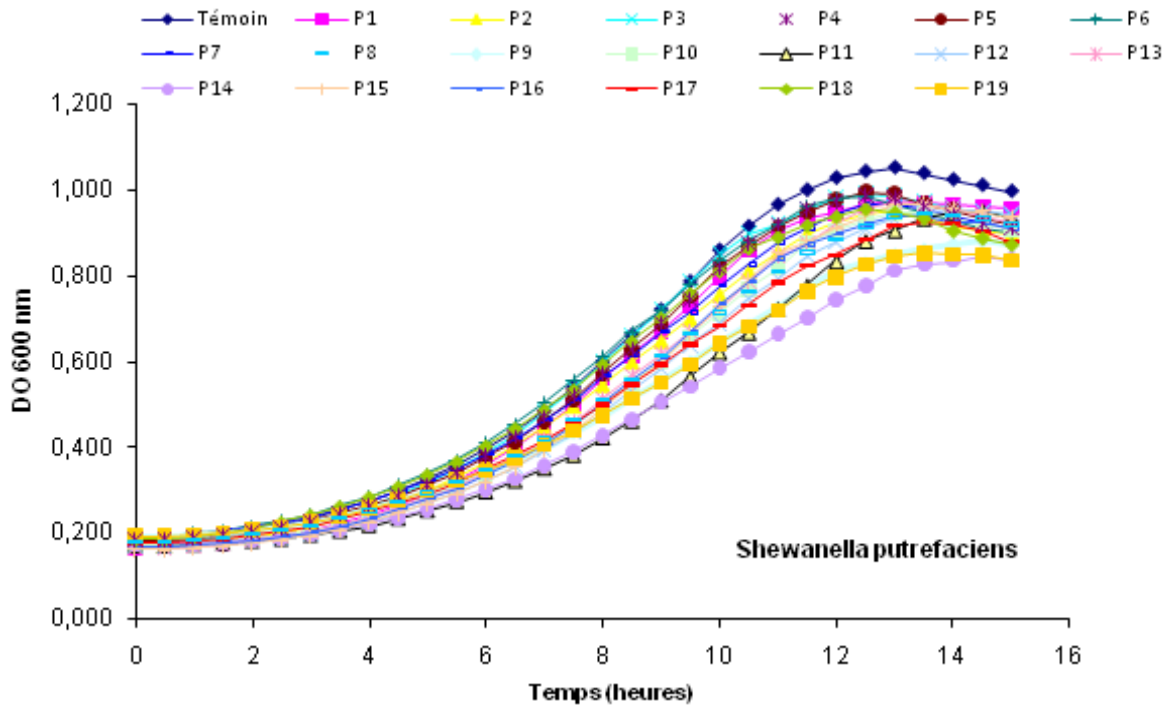


Figure III.40 : Evolution de croissance de la bactérie *Shewanella putrefaciens* sur milieu de culture seul et en présence des peptides issus des hydrolyses conduites selon les conditions fixées par le PE avec la Pepsine.

La Figure III.40 montre clairement que toutes les courbes de croissance de la bactérie en présence des 20 peptides sont inférieures à la courbe de croissance témoin (en bleu), ce qui signifie que le nombre de cellules obtenues après 24 h d'incubation sont plus faibles en présence de nos hydrolysats. Ainsi, le test de Tukey montre que *S. putrefaciens* possède des biomasses significativement moins importantes ($p < 0,05$) que le témoin, et ce en présence des hydrolysats correspondant aux points 11 à 18 du plan d'expérience. La plus faible biomasse de *S. putrefaciens* est obtenue avec les hydrolysats des expériences 11 et 15, suivis du 19.

Pour les 8 souches testées, de l'hydrolysat n°8 jusqu'à l'hydrolysat n°20, les biomasses sont significativement ($p < 0,05$) inférieures au témoin. Afin d'illustrer ces résultats, et dans un souci de comparaison, nous avons choisi pour chaque souche de représenter les 2 extrêmes, c'est-à-dire le graphe correspondant à l'hydrolysat avec lequel nous obtenons les plus fortes biomasses et celui avec lequel nous observons la plus forte inhibition de croissance des cellules bactériennes.

Les Figures III.41 et III.42 montrent l'évolution de la croissance bactérienne en fonction de l'hydrolysat avec lequel nous n'avons observé aucune différence significative avec le témoin et en fonction de l'hydrolysat le plus performant c'est-à-dire avec lequel les résultats les plus significatifs quant à la réduction de la biomasse cellulaire ont été obtenus.

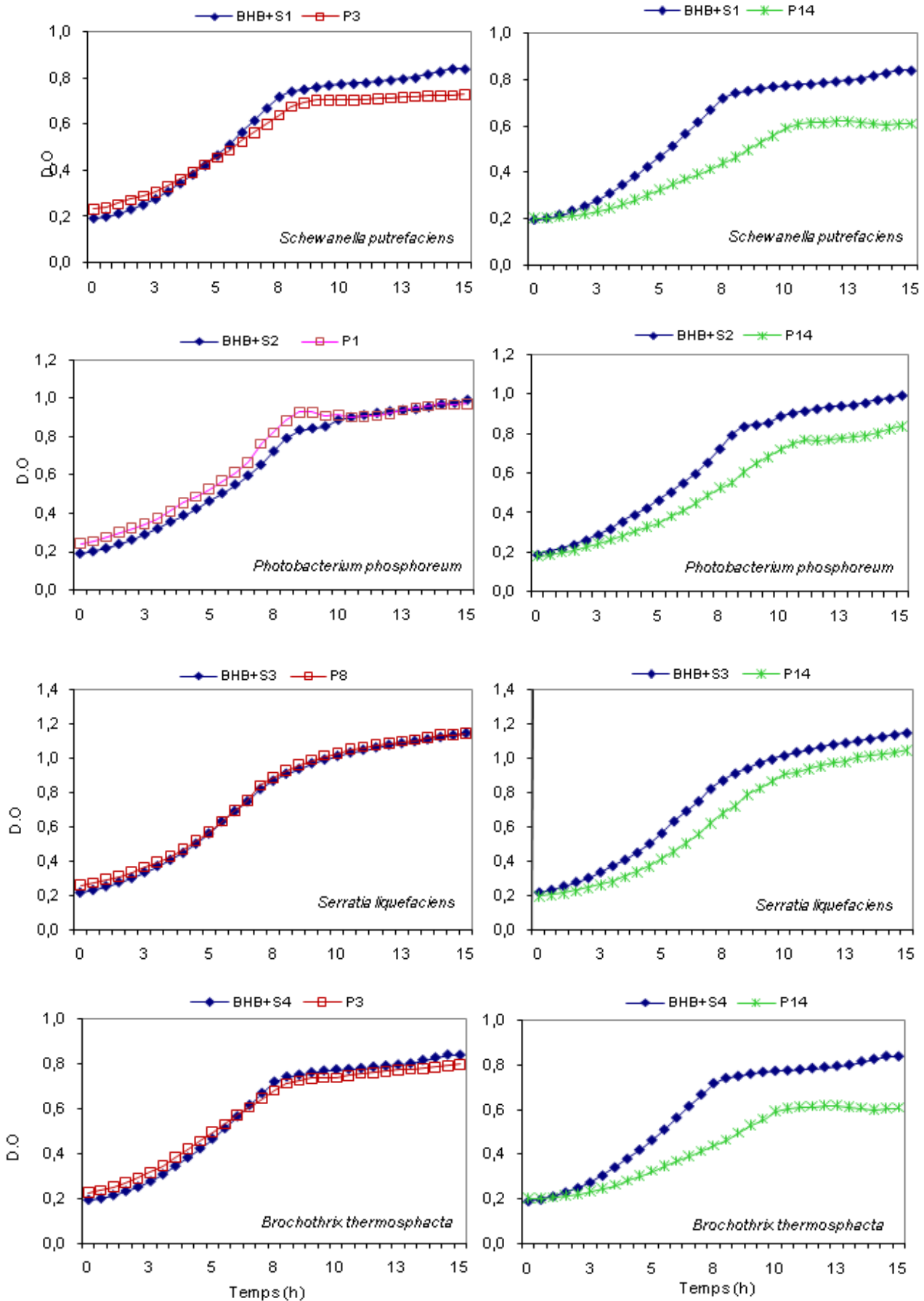


Figure III.41 : Evolution de la croissance bactérienne sur milieu de culture seul ou en présence des peptides issus des hydrolyses conduites selon les conditions préconisées par le plan d’expérience.

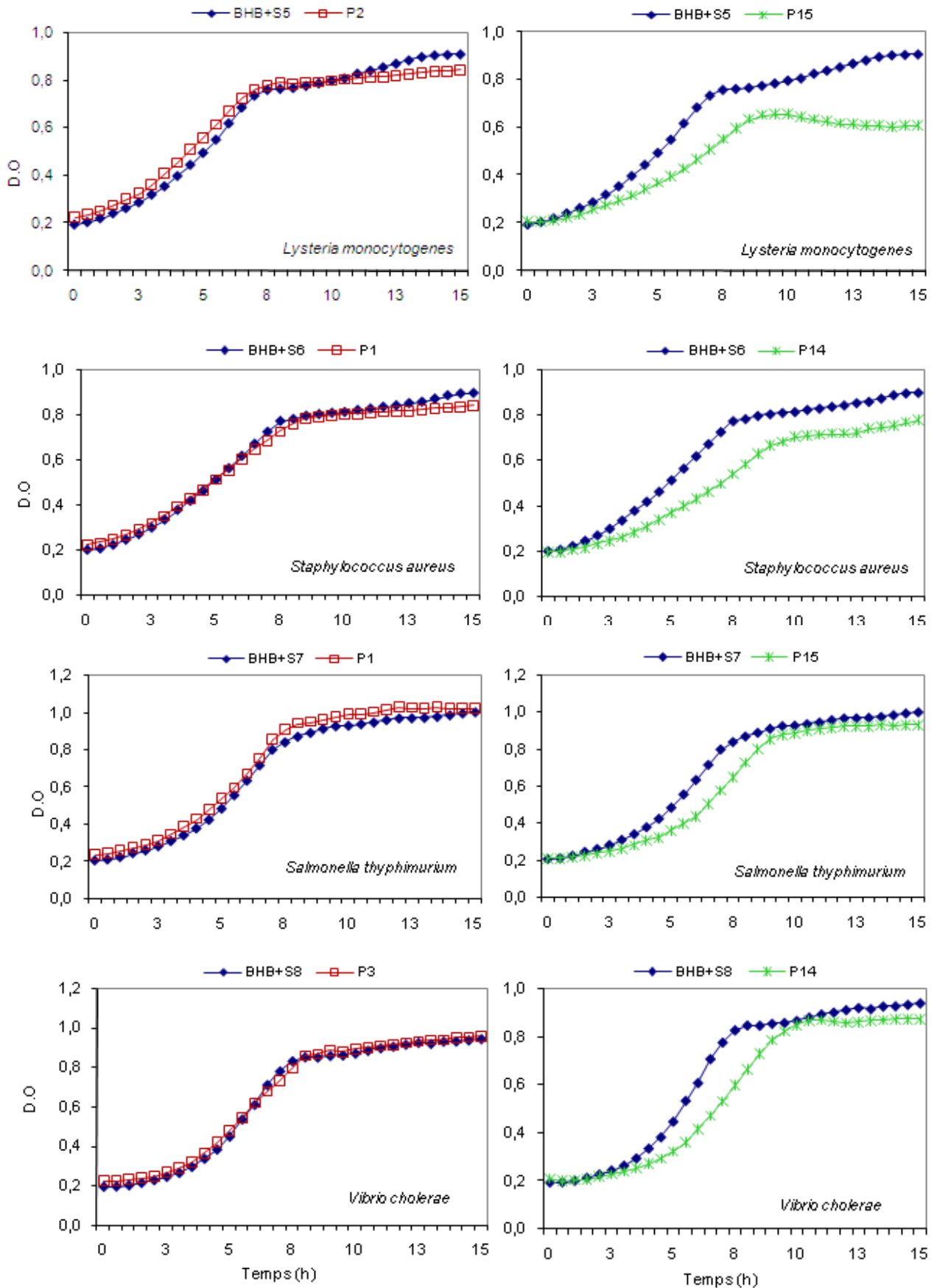


Figure III.42 : Evolution de la croissance bactérienne sur milieu de culture seul ou en présence des peptides issus des hydrolyses conduites selon les conditions préconisées par le plan d’expérience.

L'observation de la cinétique de croissance bactérienne en fonction du temps d'incubation montre que quelque soit la bactérie testée, il n'y a pas d'inhibition significative en présence des hydrolysats faisant partie des 10 premiers points du plan d'expérience. En effet, la courbe de croissance du témoin et celle en présence de l'hydrolysat sont quasi-superposées, surtout pour les bactéries *B. thermosphacta*, *S. liquefaciens*, *S. aureus*, *S. typhimurium* et *Vibrio cholerae*. Quelques différences avec le témoin de croissance sont observées toutefois avec *P. phosphoreum*, *S. putrefaciens* et *L. monocytogenes*. Comme nous l'avons déjà précisé lors de l'analyse préliminaire de l'activité des hydrolysats, *S. putrefaciens* présente quand même une courbe de croissance inférieure à celle en présence uniquement du milieu de culture, mais ceci n'a lieu qu'au niveau de la phase plateau. Par ailleurs, le test de Tukey a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre les points.

L'observation des courbes de croissance des 8 souches en présence, en plus du milieu de culture des hydrolysats montre clairement une activité d'inhibition significative ($p < 0,05$) de cette biomasse bactérienne. Ces hydrolysats appartiennent, comme nous l'avons précisé plus haut aux protéolyses correspondant aux 8 points suivants (de 11 à 18) du plan d'expérience. Plus encore, l'hydrolysat avec lequel on obtient les résultats d'inhibition les plus significatifs ($p < 0,05$) est pratiquement toujours le même, il provient de l'expérience n°15. Ceci n'est cependant pas vrai pour *L. monocytogenes* et *S. typhimurium* où ce peptide correspond à l'hydrolysat issu du point 15 du plan d'expérience. Ainsi, il semble exister une corrélation très claire entre les conditions d'hydrolyse optimisées avec le plan d'expérience et l'activité d'inhibition de la croissance bactérienne.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que les souches les plus sensibles semblent être *B. thermosphacta*, *S. putrefaciens*, et *L. monocytogenes*. Pour ces 3 micro-organismes, nous allons comparer les cinétiques de croissance de manière à détecter l'influence de notre hydrolysat sur ces souches. Pour cela les courbes représentant la cinétique de croissance sont tracées en portant le logarithme de la densité optique en fonction du temps d'incubation. Avec les données exprimées de cette manière, il sera ainsi possible déterminer :

- Le **Lag** : ou temps de latence (en h)
- Le **μ_{\max}** : ou vitesse maximale de croissance par heure ou encore phase d'accélération - correspondant au premier segment de la pente de la courbe.
- Le **T_g** : ou temps de génération (en h)

I.4.2 Comparaison de la cinétique de croissance des micro-organismes

Tout d'abord, il est important d'effectuer une comparaison globale des cinétiques de croissance de 8 pathogènes entre eux et ce en milieu de culture seul et en présence de l'hydrolysate de l'expérience n°15. Ceci nous permettra de voir d'emblée, et après avoir isolé l'hydrolysate le plus activement inhibiteur de déterminer et de comparer la production de biomasse des bactéries sans et avec présence de l'hydrolysate n°15.

La Figure 142 montre que les vitesses de croissance des bactéries sont très variables sur milieu de culture uniquement. Ainsi, *S. liquefaciens* et *S. typhimurium* ont une vitesse de croissance élevée ($p < 0,05$), *L.monocytogenes*, *S.aureus*, *P.phosphoreum*, *B. thermosphacta* ont une vitesse de croissance significativement moindre ($p < 0,05$). Les bactéries *V. cholerae* et *S. putrefaciens* possèdent les plus faibles vitesses de croissance ($p < 0,05$). Il est constaté que le temps de latence ne présente pas beaucoup de variations. Il est relativement court pour toutes les bactéries sauf en ce qui concerne *Vibrio cholerae* et *Scewanella putrefaciens*. La biomasse obtenue après 24 h d'incubation varie légèrement en fonction des bactéries. C'est incontestablement la bactérie *S. liquefaciens* qui donne la plus forte biomasse ($p < 0,05$). *P. phosphoreum* et *S. typhimurium* donnent des biomasses intermédiaires ($p < 0,05$). Enfin, les plus faibles biomasses sont obtenues avec les bactéries *S.putrefaciens*, *V.cholerae* et *L.monocytogenes* et *B. thermosphacta* et *S.aureus* ($p < 0,05$).

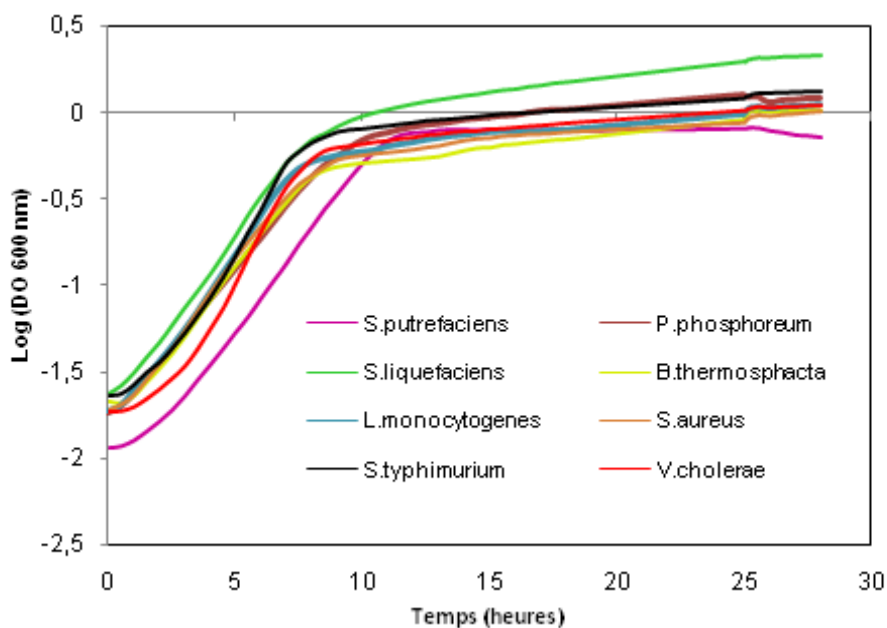


Figure III.43 : Cinétique de croissance bactérienne sur milieu de culture seul (témoin).

La Figure III.43 montre les cinétiques de croissance des bactéries sur le milieu de culture en présence de l'hydrolysats 15 qui possède le plus fort pouvoir d'inhibition. Après 24 h d'incubation, on constate que les vitesses de croissance sont très variables en présence de l'hydrolysats 15 et que les profils des différentes courbes sont différents de ceux obtenus avec le milieu de culture tout seul. Comme nous avons déjà pu le constater lors des comparaisons individuelles du témoin avec la présence des peptides pour toutes les souches, la bactérie *Serratia liquefaciens* semble présenter plus de résistance que les autres courbes, même en présence de l'hydrolysats 15. En effet, on voit bien que sa cinétique de croissance reste très semblable à celle en absence d'hydrolysats et avec milieu uniquement.

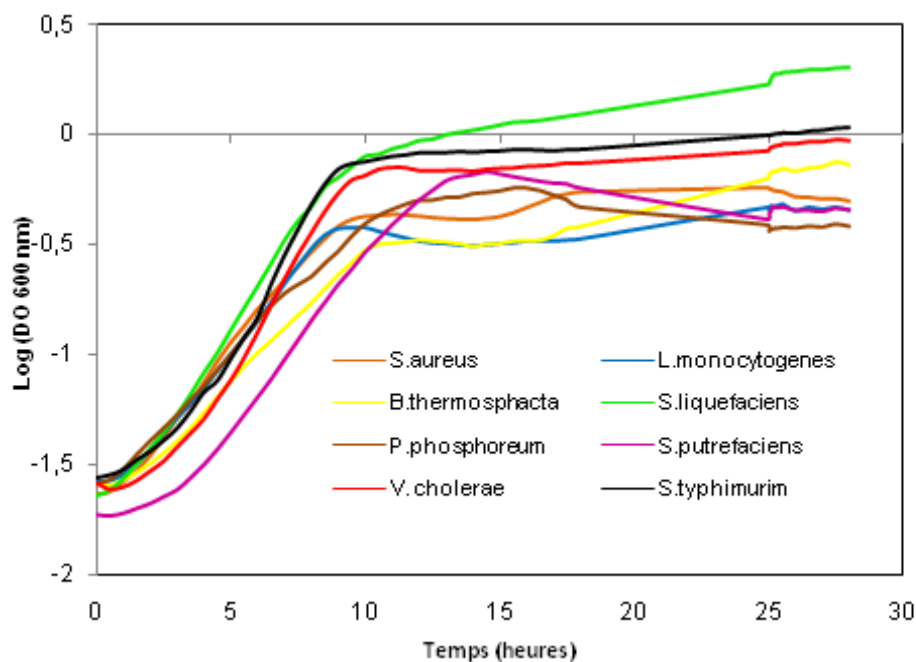


Figure III.44 : Cinétique de croissance bactérienne sur milieu de culture en présence de l'hydrolysats n°15.

Les mêmes constatations sont faites pour *Salmonella typhimurium* et *Vibrio cholerae* où l'évolution des courbes est assez fidèle à celle obtenues sans ajout d'hydrolysats. Cependant, pour les 5 autres bactéries, à savoir, *S.aureus*, *S. putrefaciens*, *L.monocytogenes*, *B.thermosphacta* et *P. phosphoreum* les allures sont clairement différentes. En effet, ces bactéries montrent d'une manière significative ($p < 0,05$) un ralentissement de leur vitesse de croissance par rapport à leurs témoins respectifs. Par ailleurs et en comparant les cinétiques de croissance de ces mêmes 5 bactéries entre elles, il ressort que *S. putrefaciens*, *L.monocytogenes* et *B.thermosphacta* montrent significativement ($p < 0,05$) les vitesses de croissance les plus faibles semblent être les souches les plus sensibles à l'action de

l'hydrolysate 15. Cette propriété d'inhibition est observée aussi bien dans la phase de croissance exponentielle qu'au niveau de la biomasse produite à la fin de l'incubation.

En examinant la Figure III.44, il apparaît qu'au bout de 24 h d'incubation, parmi les 3 bactéries les plus sensibles que nous avons citées, *S. putrefaciens* possède la vitesse de croissance exponentielle la plus faible avec une biomasse cellulaire produite qui augmente vers la 15^{ème} heure accusant ensuite une chute durant le reste de l'expérimentation. En revanche, les vitesses de croissance exponentielles de *L. monocytogenes* et de *B. thermosphacta* sont significativement plus élevées ($p < 0,05$) mais les biomasses obtenues pour ces 2 bactéries entre 10 et 24 h d'incubation sont significativement inférieures à celle de *S. putrefaciens*. **Toutefois, il est important de noter qu'à partir de 24 heures d'incubation, les augmentations de biomasse obtenues après la phase de stabilisation ne sont aucunement dues à une reprise de la prolifération cellulaire mais à un début de mort des cellules qui s'accumulent en formant une biomasse donnant des valeurs de densités optiques élevées et surestimées.** C'est la raison pour laquelle d'ailleurs au niveau des Figures 140 et 141, on s'arrête à 15 heures d'incubation, afin de mieux mettre en évidence la différence entre les 2 courbes de croissance (témoin et avec hydrolysate inhibiteur) au niveau de la phase de croissance exponentielle et qui est d'ailleurs la phase de la cinétique où l'on peut le mieux conclure quant à la présence d'une activité inhibitrice.

I.4.3 Régression linéaire

Après avoir mis en évidence les trois souches bactériennes les plus sensibles, nous allons les comparer en effectuant une régression linéaire entre la courbe de croissance du témoin (bactérie en milieu de culture) et la courbe de croissance des bactéries en présence de l'hydrolysate 15. D'après la Figure III.44, on constate que la phase correspondant à la vitesse de croissance exponentielle est comprise entre 3 et 7 heures, c'est l'intervalle de temps sur lequel nous allons nous baser pour calculer, les pentes des droites de régression, les ratios témoin/peptide, le μ_{max} et le temps de génération (T_g) des souches bactériennes sélectionnées.

D'après les résultats consignés dans le Tableau III.19, on constate que les pentes des droites de régression sont toujours inférieures à celles correspondant au témoin, c'est-à-dire à la croissance de la souche avec la présence de l'hydrolysate 15. Ces résultats confirment bien l'effet inhibiteur de ce dernier. Le ratio le plus élevé est obtenu pour la bactérie *Brochotrix thermosphacta* (1,476), suivie de *Listeria monocytogenes* (1,376) et à la fin *Shewanella*

putrefaciens (1,233). Ainsi comme nous l'avons remarqué auparavant, la souche *B. thermosphacta* est plus sensible à l'inhibition de croissance de l'hydrolysate que les autres.

Tableau III.19: Comparaison des pentes des droites et des ratios des témoins (milieu de culture seul) et avec l'hydrolysate 15 pour les 3 souches *L. monocytogenes*, *B. thermosphacta* et *S. putrefaciens*.

Souches bactériennes	Rég (témoin)	Rég (P15)	Ratios (T/P15)
<i>L. monocytogenes</i>	0,212	0,154	1,376
<i>B. thermosphacta</i>	0,194	0,131	1,476
<i>S. putrefaciens</i>	0,191	0,155	1,233

Rég : régression

Nous pouvons ainsi écrire les équations des droites de régression ainsi que les coefficients de détermination pour les trois bactéries (Tableau III.20).

Tableau III.20: Equations des droites de régression du témoin et de l'hydrolysate 15 obtenues pour les 3 souches bactériennes.

Equations des droites de régression				
Souches	Témoin	R ²	Hydrolysate 15	R ²
<i>L. monocytogenes</i>	y = 0,212 x - 1,73	0,99	y = 0,154 x - 1,69	0,99
<i>B.thermosphacta</i>	y = 0,194 x - 1,72	0,99	y = 0,131 x - 1,7	0,99
<i>S. putefaciens</i>	y = 0,191 x - 1,99	0,99	y = 0,155 x - 1,8	0,99

Le calcul de ces données nous permet de déterminer la vitesse de croissance maximale ou μ_{max} et le temps de génération pour chacune de ces 3 bactéries. Le temps de génération Tg est le temps nécessaire à une bactérie pour se diviser. Le temps de génération correspond donc au temps nécessaire pour qu'une population de cellules double en nombre. Il s'exprime par la relation suivante :

$$Tg = \text{Ln}(2) / \mu_{max} \qquad \text{Equation III.2}$$

Les résultats sont présentés dans le Tableau III.21. D'une manière générale, le Tg de *S. putrefaciens* est le plus important avec $3,61 \pm 0,01$ h, suivi de *B. thermosphacta* $3,56 \pm 0,00$ h puis de *L. monocytogenes* $3,25 \pm 0,00$ h. Ces calculs sont en totale concordance avec les interprétations des courbes de croissance faites précédemment et qui ont montré que *S. putrefaciens* croît beaucoup plus lentement que les autres souches. Les Tg obtenus quand la croissance se fait en présence de l'hydrolysate 15 sont significativement supérieurs à ceux lorsque la croissance se fait uniquement sur milieu de culture, ce qui confirme que le peptide issu de l'hydrolysate 15 du plan d'expérience mis en place possède bien un effet d'inhibition et

de ralentissement de la croissance et ce quelque soit la bactérie. Toutefois, dans ce cas nous un avons un ordre de classement différent pour les bactéries que celui obtenu pour le témoin. En effet, le résultat le plus significatif au seuil de 5% ici est encore une fois obtenu pour *Brochotrix thermosfacta* où le Tg du témoin est de 3,56 h alors que celui obtenu avec le P15 passe à 5,25 h ; ceci est en concordance avec les ratios de pentes de régression où la valeur la plus importante est obtenue pour cette même bactérie. De même, les résultats obtenus pour *L. monocytogenes* et *S. putrefaciens* sont également importants puisque le Tg passe de 3,25 heures à 4,48 heures et de 3,61 heures à 4,45 heures respectivement.

Tableau III.21: Temps de génération (heures) exprimés pour le témoin seul et en présence de l'hydrolysate inhibiteur 15 pour les souches bactériennes.

Souches	Tg (heures)	
	Témoins	Peptide P15
<i>L. monocytogenes</i>	3,25 ± 0,00	4,48 ± 0,00
<i>B.thermosphacta</i>	3,56 ± 0,00	5,26 ± 0,00
<i>S. putrefaciens</i>	3,61 ± 0,01	4,45 ± 0,02

I.4.4 Discussion

Dans un premier temps, tous les peptides issus du plan d'expérience mis en place pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de seiche avec Pepsine sont testés sur les 8 pathogènes des produits de la mer. Le premier résultat que nous avons tiré c'est une certaine corrélation entre les conditions d'hydrolyse et l'inhibition de croissance de ces souches. En effet, toutes bactéries confondues il a été constaté que les la présence dans le milieu de culture des peptides appartenant aux hydrolysats issus des 8 premières hydrolyses (8 premiers points d'expériences) n'ont aucun effet puisque les ceux cinétiques de croissance sont pratiquement identiques. Toutefois, des différences sont observées pour les hydrolysats appartenant aux protéolyses du point 11 au point 18 du plan d'expérience, toutes souches confondues. **Les analyses statistiques ont montré que le degré d'inhibition le plus fort est obtenu avec l'hydrolysate 15 pour toutes les bactéries.** Ceci nous ramène aux conditions d'hydrolyses fixées par notre matrice du plan d'expérience. Pour les hydrolysats 11 à 18, le paramètre qui change par rapport aux 8 premiers hydrolysats est la température. En effet, si pour les huit premières expériences la température est de 37,5°C, elle passe à 52,2°C pour les 8 expériences suivantes (points de 11 à 18). Ceci montre l'existence d'une corrélation entre la température d'hydrolyse et l'activité antibactérienne et prouve bien l'influence de la

température sur la production de peptides biologiquement actifs. **Concernant les points centraux (9,10 et 19,20) où la température est de 45°C, on observe une faible activité inhibitrice de production de la biomasse bactérienne.** Nous avons par ailleurs identifié l'hydrolysate 15 ayant les propriétés antimicrobiennes les plus élevées. Si l'on reprend les conditions d'hydrolyse fixées par la matrice d'expériences, on constate que cette hydrolyse a été réalisée pendant un temps court (1 h 37 min), une température élevée (52,2°C), un rapport substrat/eau faible (0,5 ; p/v), et un rapport enzyme/substrat relativement élevé (0,45, p/p).

Les conditions d'hydrolyse ayant permis de favoriser et d'augmenter une activité inhibitrice de la croissance bactérienne dans l'hydrolysate des viscères de seiche sont une température élevée (>50°C), un ratio eau/substrat de 0,5 (v/p) et une concentration en pepsine élevée.

Cette étude a également montré que l'hydrolysate 15 contribue à l'inhibition de la croissance bactérienne en augmentant le temps de génération ce qui influe sur la vitesse de croissance exponentielle. Cependant, dans une étude complémentaire, il serait intéressant de trouver une corrélation entre les hydrolysates avec lesquels nous avons obtenu une activité antibactérienne (P11 à P18) afin de bien comprendre l'influence des paramètres de l'hydrolyse sur cette activité, notamment le volume d'eau rajouté au substrat et la concentration en enzyme. Pour cela, le plan d'expérience devra être centré différemment. **Par ailleurs, il est bien clair qu'il n'est pas nécessaire de conduire des hydrolyses sur une durée trop longue pour obtenir un effet antibactérien.** Ceci a déjà été observé au niveau du degré d'hydrolyse ainsi qu'au niveau de l'enrichissement de l'hydrolysate final en acides aminés et en composés lipidiques, valorisables en nutrition animale.

I.5 PRODUCTION DE L'HYDROLYSAT A L'ECHELLE PILOTE

L'objectif de cette étape était de produire, à échelle semi-industrielle, l'hydrolysate des viscères de sèche noires, produit précédemment avec la Pepsine à l'échelle du laboratoire, afin d'obtenir un hydrolysate homogène et un volume suffisant afin de réaliser les essais de filtration membranaire. Cette étape est également la base de la mise au point d'un protocole pour la production d'un hydrolysate à intérêt nutritionnel et riche en peptides antimicrobiens, en utilisant des opérations unitaires réalistes d'un point de vue industriel.

I.5.1 Mise au point du procédé d'hydrolyse pilote

I.5.1.1 Vérification de la technique d'inactivation thermique de l'enzyme

Cette partie de l'étude a également consisté à la mise au point à grande échelle des différentes étapes de production de l'hydrolysate, c'est-à-dire la réaction d'hydrolyse proprement dite (régulation de la température, du pH, de l'agitation), inactivation de l'enzyme et centrifugation, et ce afin de développer un procédé pilote réaliste applicable sur le plan industriel et permettant d'obtenir des résultats identiques à ceux obtenus à échelle de laboratoire.

A l'échelle du laboratoire, l'inactivation thermique était réalisée par chauffage des échantillons dans un bain thermostaté. A l'échelle pilote et pour une hydrolyse réalisée au sein d'un réacteur de gros volume, l'inactivation se fait généralement par un système de bullage par injection de vapeur. Cependant, et afin de rester exactement dans les mêmes conditions que l'hydrolyse réalisée à échelle de laboratoire et pour obtenir les mêmes résultats de point de vue activités et composition biochimique, un bain-marie (cuve en aluminium) de taille pré-industrielle a été installé à côté du réacteur. Le principe de chauffage est le même que pour un bain-marie de paillasse, mais le système n'est pas tout à fait le même. En effet et compte tenu de l'important volume d'eau nécessaire pour le grand bain-marie, l'alimentation se fait par pompage et l'eau circule à travers un circuit fermé. En outre, vue l'interface d'échange importante avec le milieu ambiant, la régulation de la température est réalisée avec 5°C supplémentaires afin d'obtenir la température adéquate à l'intérieur du bain.

Au cours de cette étape, nous avons vérifié l'efficacité du procédé d'inactivation à échelle pilote. L'analyse a consisté à mesurer l'évolution de la température dans les hydrolysats inactivés dans la grande cuve afin de s'assurer que le procédé utilisé est comparable à celui à petite échelle. Nous avons appliqué exactement les mêmes conditions, c'est-à-dire chauffage à 80°C pendant 20 min.

La Figure III.45 présente une comparaison des courbes d'inactivation de la Pepsine établies à partir de mesures à échelle de laboratoire (bain-marie Julabo d'un volume de 2 L) et à échelle pilote (bain-marie de 20 L). A échelle de laboratoire, la température croit de 45 à 80°C en 5 min. la température est ensuite maintenue presque constante pendant 15 min. Avec le système à grande échelle, la température croit de 45 à 80°C en 8 min, puis se maintient à une valeur comprise entre 80 et 82 °C pendant 12 min. Ces résultats montrent que le système

d'inactivation à échelle pilote permet d'obtenir des performances similaires à celles atteintes par le procédé à échelle de laboratoire. Cette technique d'inactivation peut donc être incluse dans le procédé d'hydrolyse à échelle pré-industrielle.

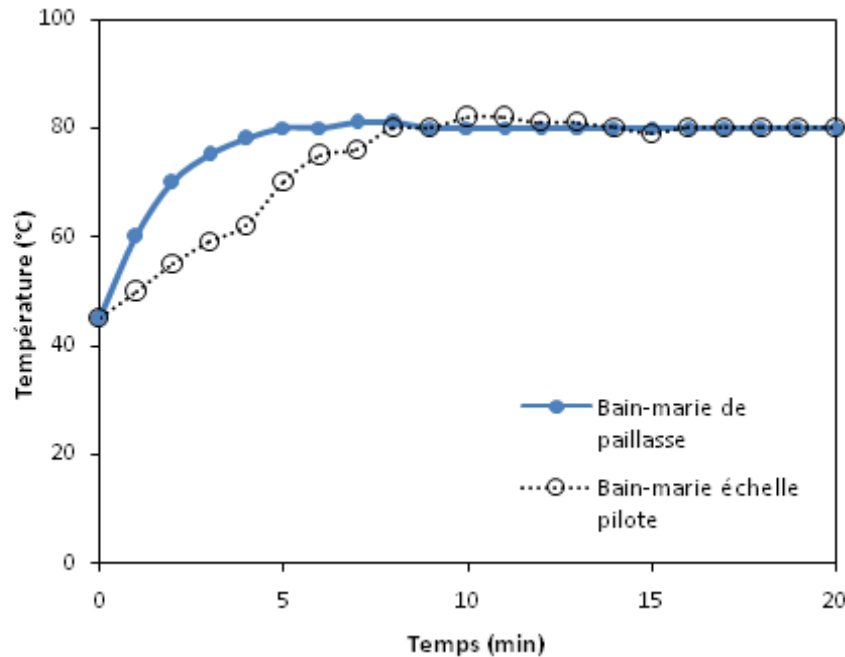


Figure III.45 : Courbes d'inactivation thermique de la Pepsine obtenues à échelle de laboratoire et à échelle pilote. Les hydrolyses ont été réalisées pendant 2 h à 45°C, avec un rapport E/S de 0,1% et 1 volume d'eau (v/p).

I.5.1.2 Vérification de la cinétique d'hydrolyse à échelle pilote

La Figure III.46 compare les cinétiques d'hydrolyse obtenues avec Pepsine pendant 2 h à échelle de laboratoire et à échelle pilote. Les prélèvements d'échantillons pour le dosage des groupements aminés libres et donc du DH ont été effectués toutes les 10 min. Pour cela, une hydrolyse de 2 h à échelle de laboratoire a du être conduite de nouveau afin d'effectuer les prélèvements toutes les 10 min et de pouvoir comparer les deux échelles. D'après le graphique, on constate que les courbes de protéolyse présentent la même allure. Le DH final obtenu (20%) est supérieur à celui obtenu à petite échelle (18%). Ceci est probablement du, comme nous l'avons mentionné plus haut, à la quantité plus importante en substrat. En effet, la disponibilité des sites de coupure influence fortement la valeur du DH (Ravallec-Plé 2000).

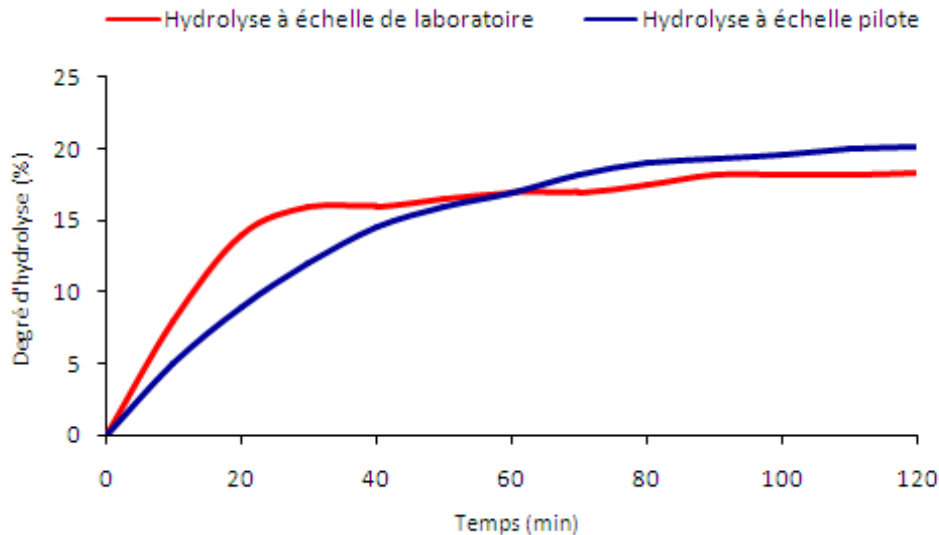


Figure III.46 : Evolution de la cinétique d'hydrolyse avec Pepsine à l'échelle de laboratoire et à échelle pilote. Les hydrolyses ont été conduites pendant 2 h à 45°C avec 0,1% d'enzyme (p/p) et avec 1 volume d'eau (v/p).

Cependant, on constate d'après l'allure de la courbe que la rupture des liaisons peptidiques se fait d'une manière très active pendant les 20 premières minutes, ensuite il y a reprise de l'augmentation du DH à partir de 40 min pour atteindre un plateau à 90 min avec un de DH en fin d'hydrolyse de 18,33%. Pour l'hydrolyse à échelle pilote, la phase exponentielle s'étend sur une période plus longue. Un ralentissement est observé à partir de la 70^{ème} minute, puis il y a stabilisation de la réaction. A la fin de la réaction d'hydrolyse, le DH est de 20,17%.

I.5.2 Caractérisation de l'hydrolysats produit à échelle pilote

I.5.2.1 Protéines, lipides et phospholipides

L'hydrolysats produit suite aux 120 min d'hydrolyse est transvasé dans des pots de 1 L de contenance, sur 800 mL d'hydrolysats introduits dans chaque pot, on obtient une phase soluble qui représente à peu près 80% de la quantité totale introduite dans le pot de centrifugation et jusqu'à 4,4 fois le culot. On retrouve ainsi les mêmes rapports de phases que pour la même hydrolyse conduite à échelle de laboratoire. A partir du procédé pilote, 12,8 L de surnageant sont ainsi récupérés avec comme composition en pourcentage par rapport à la matière sèche 87,3 ± 1,2 % de protéines, 10,1 ± 1,3% de lipides et 0,7 ± 0,002% de phospholipides.

Le rendement protéique (NR%), c'est à dire le pourcentage de protéines transformées puis récupérées dans l'hydrolysate après centrifugation par rapport à la quantité de protéines disponibles initialement a été calculé selon la relation suivante :

$$\text{NR}\% = 100 \times \frac{m_{\text{pf}}}{m_{\text{pi}}} \quad \text{Equation III.3}$$

Avec,

m_{pf} : la masse de protéines finale récupérée dans l'hydrolysate

m_{pi} : la masse de protéines contenue initialement dans les viscères brutes

Le rendement protéique est de 75,3 % et est toutefois supérieur au résultat obtenu à petite échelle (70,4 %). Par rapport aux rendements cités dans la littérature, ce taux est considéré comme élevé. Cependant, les rendements protéiques diffèrent fortement en fonction des conditions opératoires choisies (pH, température, ratio E/S, durée d'hydrolyse, volume d'eau rajouté) (Diniz et Martin 1998). En effet, des rendements compris entre 32,5% et 57% ont été rapportés après 4h d'hydrolyse des viscères de thon avec Alcalase (Guérard et al. 2001). Par ailleurs, Liaset et al. (2000) ont obtenu un rendement protéique allant de 44 à 76% avec Protamex sur les co-produits de saumon. Par ailleurs, Diniz et Martin (1998) ayant étudié l'influence de la durée de l'hydrolyse sur la récupération des protéines de requin par l'Alcalase ont pu obtenir un NR% de 77% pour une durée de 120 min. On confirme ainsi que la Pepsine présente de bien meilleures performances par rapport aux autres protéases commerciales et que le temps d'hydrolyse choisi dans cette étude est suffisant pour obtenir de bons rendements. Toutefois, il est nécessaire de noter que la performance d'une enzyme dépend beaucoup du substrat à hydrolyser. Une enzyme ayant bien fonctionné pour des muscles ou la carcasse d'un poisson ne présentera pas forcément les mêmes performances pour les viscères. Le même raisonnement est à faire concernant les groupes zoologiques, c'est-à-dire tout ce qui est poissons, mollusques et crustacés étant donné que la qualité et la composition des co-produits n'est pas la même.

Les résultats de cette caractérisation biochimique montrent donc bien qu'on arrive à obtenir pratiquement les mêmes résultats que pour les hydrolyses avec la Pepsine en laboratoire. Le procédé est donc reproductible à échelle pilote.

I.5.2.2 Analyse des profils peptidiques

La répartition des poids moléculaires des peptides obtenus après hydrolyses des viscères de seiche avec Pepsine pendant 2 h à 45°C à échelle pilote et à échelle de laboratoire est présentée dans la Figure III.47. L'étude de ces deux profils chromatographiques montrent que les hydrolysats produits à 2 échelles différentes sont très proches. L'étude du pourcentage d'aire sous la courbe relatif aux différentes populations peptidiques des deux hydrolysats injectés à la même concentration montre que les différences minimales qui existent concernent les molécules de taille supérieure à 7 kDa et inférieures à 1 kDa. En effet, le découpage de l'hydrolysate par classe de poids moléculaire (Tableau III.22) indique que l'hydrolysate produit à échelle pilote comprend une quantité légèrement plus faible de peptides de taille inférieure à 5500 Da et inversement pour les peptides de taille inférieure à 1000 Da. En effet, le calcul du DH montre que l'hydrolysate produit à échelle pilote (DH = 20 %) est quelque peu plus hydrolysé que celui obtenu à échelle de laboratoire (DH = 18%).

Tableau III.22 : Distribution en poids moléculaire (exprimée en % d'aire relative sous la courbe) des hydrolysats de Pepsine (2h, 45°C)

Poids moléculaire (Da)	>7000	7000 - 5500	5500 - 3000	3000 - 2000	2000 - 1000	1000 - 500	500 - 250	< 250
Echelle de laboratoire	4,59	1,01	2,39	2,29	7,13	24,25	40,3	21,76
Echelle pilote	3,52	1,04	2,03	2,34	7,45	28,13	45,38	21,36

I.5.2.3 Analyse de la composition en acides aminés

La composition en acides aminés de l'hydrolysate pilote avec Pepsine (2h, 45°C) et pH 2, a été analysée de la même manière que pour l'hydrolysate à échelle de laboratoire. D'après les résultats obtenus, la concentration en acides aminés totaux (4,53 mmole/mg M.S) est supérieure à celle de l'hydrolysate obtenu à échelle de laboratoire (2,56 mmole/mg M.S). Par ailleurs, la teneur en AEE est également importante puisqu'elle représente 59,57% des acides aminés totaux. La concentration en AEE est ainsi plus importante que pour l'hydrolysate à petite échelle puisque ce dernier n'était composé que de 50,15% d'acides aminés essentiels. Les concentrations les plus importantes ont concerné d'abord la **Méthionine** avec 0,457 mmoles/mg, suivie de l'**Alanine** (0,432 mmoles), puis on retrouve la **Phénylalanine** en troisième position avec 0,351 mmoles/mg de matière sèche.

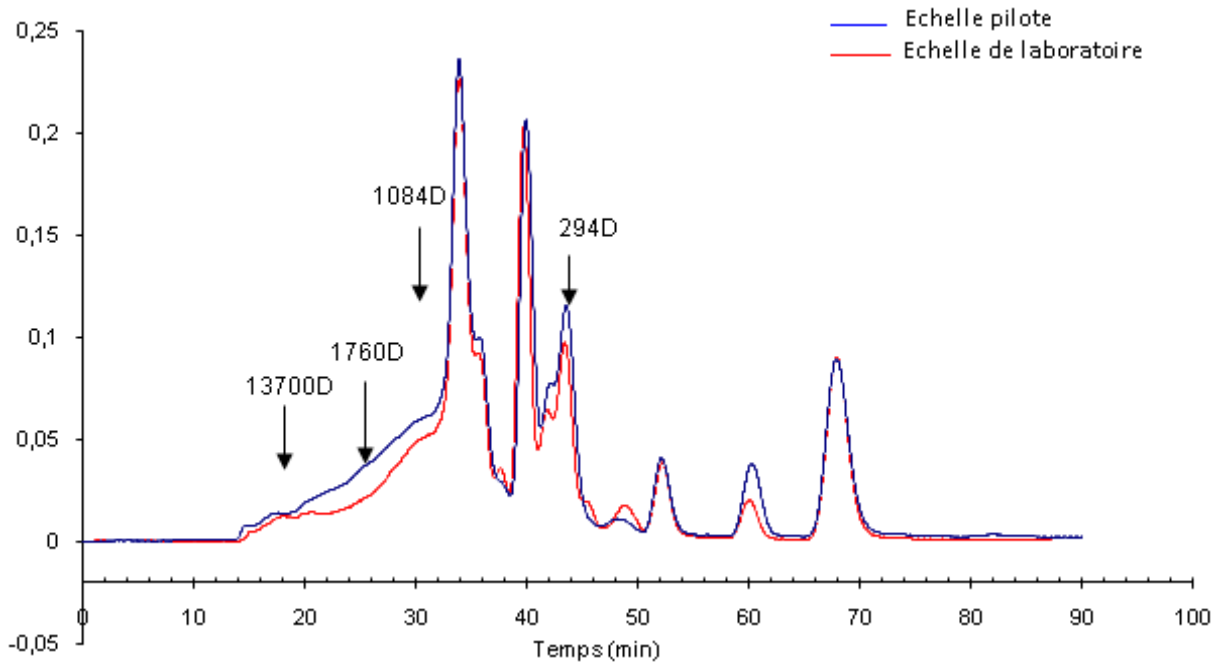


Figure III.47 : Profils moléculaires des peptides générés durant l'hydrolyse avec Pepsine (2 h, 45°C) à échelle de laboratoire et à échelle pilote des viscères de seiche avec encre.

On retrouve ainsi encore une fois la phénylalanine en quantité abondante comme pour l'hydrolysate à échelle de laboratoire. La **Leucine**, la **Lysine** et la **Valine** représentent également une part importante des acides aminés avec 0,276 ; 0,285 et 0,232 mmoles / mg de matière sèche, respectivement.

La valeur nutritive de la protéine d'un ingrédient alimentaire en majeure partie de la capacité de cette protéine à satisfaire les besoins des fonctions métaboliques d'un organisme vivant qualité et ce par rapport à la quantité des acides aminés essentiels disponibles. Ainsi, et afin de "quantifier" la valeur nutritionnelle de notre produit, nous avons mesuré les "indices chimiques" de notre protéine. Il s'agit en fait d'une mesure de la qualité d'une protéine basée sur l'analyse de sa composition en AAE et du taux de ces derniers dans une protéine de référence (Vidotti et al. 2003). Dans cette étude, nous nous sommes basés sur les protéines standard décrites par FAO/OMS (1985) et les besoins du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) listés par le NRC (1993). L'indice est calculé comme suit : le taux de chaque acide aminé essentiel contenu dans une protéine alimentaire est exprimé en pourcentage du taux de ce même acide aminé dans une quantité égale d'une protéine de référence. L'acide aminé pour lequel le pourcentage est le plus bas est dit "limitant": c'est ce pourcentage qui constitue

l'indice chimique (Sgarbieri 1987). Ainsi, l'indice chimique est calculé selon la relation suivante :

$$\text{I.C} = \frac{\text{Concentration en AAE dans la protéine test}}{\text{Concentration en AAE dans la protéine standard}} \quad \text{Equation III.4}$$

Les résultats du calcul des indices chimiques (Tableau III.23) révèlent que l'histidine et l'isoleucine sont les AAE les plus limitants et ce par rapport aux deux protéines de référence. La méthionine, la lysine et phenylalanine + tyrosine présentent les concentrations les plus élevées, tandis que les autres acides aminés essentiels sont présents à des quantités suffisantes par rapport à celles requises par FAO/OMS (1985) et NRC (1993). Pour ce qui est des acides aminés non essentiels, la concentration la plus élevée est attribuée à la valine et celle la moins élevée à l'acide α -amino adipique (AAA) et l'acide aspartique.

Tableau III.23 : Indices biochimiques des principaux acides aminés limitants selon les standards fixés par la FAO/OMS (1985)^a et les besoins du tilapia du Nil selon le NRC (1993)^b. Les indices ont été calculés pour l'hydrolysate produit à échelle pilote des viscères de seiche avec encre (Pepsine, 2h, 45°C, pH 2).

	VAL	MET	ILE	LYS	LEU	HIS	PHE+TYR
PR1 ^a	1,15	1,87	0,65	1,02	1,13	0,21	2,21
PR 2 ^b	1,28	2,03	0,73	1,08	1,22	0,34	2,56

PR 1: Protéine de référence 1 selon FAO/OMS (1985)

PR 2 : Protéine de référence 2 selon NRC (1993)

I.5.2.4 Vérification de l'activité antibactérienne

Une analyse microbiologique a été effectuée afin de vérifier la présence de l'activité antibactérienne détectée avec la Pepsine dans l'hydrolysate produit à échelle de laboratoire. Les souches bactériennes testées sont les mêmes que dans la chapitre précédent, à savoir : *Bacillus megaterium* (ATCC 10778), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Lactococcus garviae* (ATCC 43 921), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), et *Vagococcus salmoninarum* 18 -93. Le protocole opératoire, ainsi que les concentrations des souches testées et de l'hydrolysate sont exactement les mêmes que pour la partie à échelle de laboratoire. Dans cette partie, les diamètres des halos ou auréoles (zones d'inhibition de croissance de la souche bactérienne) ont été mesurés.

Les résultats obtenus prouvent que l'activité d'inhibition microbienne de l'hydrolysate produit à échelle pilote est maintenue et ce pour les quatre souches. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition (entre 18 et 20 mm) montre que les souches sont effectivement sensibles à l'hydrolysate et qu'il y a une forte inhibition.

CONCLUSION

L'hydrolyse à échelle pilote des viscères de seiche avec Pepsine (45°C, pH2) pendant une durée de 2 heures, a permis de vérifier la possibilité de transposition du procédé appliqué à échelle de laboratoire à celle pré-industrielle. Ce travail s'est déroulé en 3 étapes. D'abord la mise en place du procédé d'hydrolyse avec le broyage de la matière première et la conduite de la procédure d'hydrolyse (régulation du pH, de la température ainsi que la vitesse d'agitation) puis la vérification du bon déroulement de la technique d'inactivation thermique de la température. Cette étape est suivie par la production de l'hydrolysate ou plus exactement du surnageant et ce à travers une centrifugation. Environ 12 litres de phase liquide, similaires à ceux obtenus en laboratoire ont ainsi été obtenus. L'analyse de la solubilité des protéines a montré que l'hydrolysate produit est composé à presque 90% de peptides de taille en majeure partie inférieure à 1000 Da. En dernier lieu, une analyse de la composition biochimique a été effectuée. Nous avons également vérifié la présence de l'activité antimicrobienne. Les résultats les plus pertinents des analyses ont consisté au fait que la teneur en acides aminés essentiels sont supérieurs à ceux obtenus à échelle de laboratoire. Toutefois, le calcul des indices chimiques a montré que l'histidine est un acide aminé limitant.

Enfin, on a pu dégager suite à cette étude que l'hydrolyse effectuée à échelle de laboratoire avec Pepsine (45°C, pH2) est tout à fait réalisable à échelle pilote. En effet, l'analyse et la caractérisation de l'hydrolysate produit à échelle pilote est presque la même que celle de l'hydrolysate produit à petite échelle. La procédure de changement d'échelle est donc tout à fait possible et le procédé d'hydrolyse à échelle de laboratoire complètement transposable pour une application pré-industrielle. De plus, nous avons pu démontrer la conservation de l'activité antibactérienne dans l'hydrolysate.

Ainsi, pour la suite du travail nous allons fractionner l'hydrolysate afin d'isoler et purifier le produit et d'isoler des populations peptidiques correspondant à des gammes poids moléculaire distinctes. **Ce travail se déroulera donc en deux étapes majeures : d'abord le fractionnement par la charge. En effet, il a été démontré auparavant que l'activité inhibitrice des peptides antimicrobiens est liée à la charge. Ensuite, l'hydrolysate produit à échelle pilote sera fractionné par les techniques membranaires et ce afin de séparer les fractions peptidique et lipidique.** Ces objectifs ont pu être atteints en réalisant l'hydrolyse enzymatique sur une courte durée (2 h), avec une

température réactionnelle relativement faible, ce qui est économiquement intéressant car d'un point de vue industriel, la production est rapide et demande peu de dépense énergétique. La fraction insoluble générée devra quant à elle faire l'objet ultérieurement d'un travail futur de valorisation.

II. FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT

II.1 FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT PAR CHARGE IONIQUE

Après avoir produit notre hydrolysat des viscères de seiche avec la Pepsine à l'échelle pilote, et après avoir vérifié la présence de l'activité antibactérienne, nous allons maintenant procéder au fractionnement de cet hydrolysat. **L'objectif de cette partie est donc d'apporter de nouvelles informations sur les caractéristiques des peptides antibactériens et ce en vérifiant la relation que possède l'activité de ces peptides avec la charge.** Nous avons choisi la technique de fractionnement par la charge avant celle par la taille (filtration membranaire) afin de voir si l'activité antimicrobienne est anionique ou cationique et donc d'avoir préalablement des informations sur la fonction des peptides présents dans notre hydrolysat et de comprendre leur comportement lors du fractionnement membranaire. Les but est aussi de comparer, plus tard, les populations peptidiques obtenues suite à l'ultrafiltration.

II.1.1 Essais sur les colonnes SPE (SAX et SCX)

II.1.1.1 Rapports massiques

Dans cette partie, des cartouches échangeuses de cations (SCX) et d'anions (SAX) ont été utilisées. L'échantillon fractionné est l'hydrolysat pepsique d'une concentration protéique de 50g/L. Le tableau III.24 présente les masses sèches dans les fractions récupérées au cours des différentes étapes de pré-purification. En tout, 3 fractions sont analysées, la fraction cationique, la fraction anionique et la fraction non retenue par la phase solide des colonnes. Le produit liquide initial désigne la fraction + éluants avant concentration par évaporation. Le produit protéique concentré est ce qui reste sur les parois du ballon d'évaporation des solvants.

Tableau III.24 : Masses des fractions cationique, anionique et non retenue issues du fractionnement sur les colonnes chromabond de l'hydrolysate des viscères de seiches.

Masse (g)	Fraction		
	cationique	anionique	Non retenue
Produit liquide initial	18,43	18,20	41,19
Produit concentré	0,09	0,07	0,63
Produit final lyophilisé	0,016	0,025	0,011

Ces résultats montrent encore une fois que les masses des produits finaux sont très faibles : 16 mg pour la fraction cationique, 25 mg pour la fraction anionique et 11 mg pour la fraction non retenue. Cependant, ce qui va être décisif avant de procéder aux tests antimicrobiens, c'est la présence ou pas d'une quantité acceptable de protéines dans ce produit. Pour cela, les microdosages ont été réalisés comme pour la partie précédente avec la méthode de Bradford. Pour cela, une solution de 50 mg/mL a du être recomposée.

Les densités optiques obtenues donnent des concentrations de $828 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ pour la fraction cationique et de $308 \pm 0,005 \mu\text{g/mL}$ pour la fraction anionique, soit 11 à 30 fois supérieures que celles obtenues dans les fractions issues des essais préliminaires lors du fractionnement sur les résines. **Ceci nous permet donc de passer à l'étape suivante concernant les analyses des populations peptidiques et de la présence de l'activité antibactérienne.**

II.1.1.2 Analyse des activités antimicrobiennes

II.1.1.2.1 Screening de l'activité antimicrobienne

Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence de l'activité antimicrobienne dans les fractions anionique, cationique et non retenue, ce qui nous permettra de vérifier que cette capacité détectée dans l'hydrolysate produit à échelle pilote par Pepsine n'est pas perdue au cours du fractionnement et si elle est enrichie dans l'une ou l'autre des fractions.

L'activité inhibitrice de la croissance a été testée sur les mêmes souches bactériennes utilisées pour tester les hydrolysats en utilisant la même méthode de diffusion en puits de gélose. Le tableau III.25 regroupe les résultats d'inhibitions obtenus avec les diamètres du halo d'inhibition (en mm). Un témoin antibiotique composé de Polymyxine B et de lysozyme à une concentration de 1mg/mL. Les antibiogrammes ont été réalisés en triplicats afin de

donner une moyenne de la zone d'inhibition obtenue. Les prélèvements effectués pour les tests sont de 60µL avec une concentration peptidique de 3 mg/mL.

Tableau III.25 : Résultats de l'antibiogramme réalisés avec les 3 fractions issues de la séparation par la charge sur les colonnes SCX et SAX de l'hydrolysate.

	Zone d'inhibition (mm)			
	CA	AN	NR	Témoin (+/-)
<i>Bacillus megaterium</i>	20,2 ± 1,2	-	-	15 ± 0,2
<i>Escherichia coli</i>	18,6 ± 2,0	5,1 ± 2,8	-	16,3 ± 1,3
<i>Lactococcus graviae</i>	15,6 ± 0,4	-	-	17,6 ± 0,2
<i>Micrococcus luteus</i>	8,5 ± 0,1	-	-	15,2 ± 1,2
<i>Vagococcus salmonarium</i>	19,3 ± 1,1	-	-	17 ± 0,1

CA : fraction cationique ; AN : fraction anionique ; NR : fraction non retenue
(-) : pas d'inhibition

Les résultats montrent l'absence d'activité antibactérienne dans les fractions anionique et non retenue et une forte présence de cette activité inhibitrice dans la fraction cationique. Une très faible inhibition ($d = 5,1 \pm 2,8$) est cependant observée au niveau de *E.coli* mais au niveau d'un seul antibiogramme, expliquant le fort écart-type obtenu. Cette activité isolée obtenue de la fraction anionique vis-à-vis de *E.coli* ne possède pas d'explication plausible. Pour la fraction cationique, toutes les souches de bactéries testées sont sensibles à l'hydrolysate fractionné. Le résultat le plus important à indiquer, c'est que le diamètre d'inhibition de l'hydrolysate fractionné est toujours supérieur au témoin gram+/gram-, sauf pour les souches *L. graviae* et *M. luteus*. Pour cette bactérie uniquement, l'inhibition est particulièrement faible vu que $d < 6$ mm. Toutefois, l'inhibition est remarquablement forte au niveau des autres souches qui sont sensibles à cette fraction cationique. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 15 et 20 mm, la souche bactérienne la plus sensible semble être *B. megaterium* ($20,2 \pm 1,2$ mm).

II.1.1.2.2 Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

La méthode de diffusion sur puits de gélose utilisée précédemment est une technique relativement simple à mettre en œuvre mais importante pour la connaissance des activités préliminaires d'inhibition d'un produit donné et pour savoir si oui ou non la souche bactérienne croît en présence d'un extrait biologique. Cependant, il a été démontré qu'elle est inappropriée pour la détection de certaines classes de composés antimicrobiens et qu'elle ne présente qu'un renseignement à caractère "qualitatif" avec bien des limites (Du Toit et

Rautenbach 2000). Ainsi, nous avons analysé les CMI contre le même spectre de bactéries-cibles en milieu liquide. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.26

Tableau III.26 : Spectre d'activité antibactérienne des fractions issues de la séparation sur colonnes SPE de l'hydrolysate, exprimées en CMI ($\mu\text{g/mL}$).

	Fractions			
	CA	AN	NR	Témoin (+/-)
<i>Bacillus megaterium</i>	33	-	-	1
<i>Escherichia coli</i>	125	-	-	4
<i>Lactococcus graviae</i>	150	-	-	20
<i>Micrococcus luteus</i>	850	-	-	4
<i>Vagococcus salmonarium</i>	80	-	-	60

CA : fraction cationique ; AN : fraction anionique ; NR : fraction non retenue ; (-) : pas d'inhibition. Lysozyme and Polymyxine B ont été utilisés comme témoins positifs contre les Gram+ et les Gram-, respectivement.

Comme il a été démontré dans la partie précédente, aucune activité antibactérienne n'a été détectée aussi bien dans la fraction anionique que dans la fraction non retenue quelque soit la bactérie ciblée. Par ailleurs, comme prévu, les activités antibactériennes contre toutes les souches bactériennes testées ont été détectées dans la fraction peptidique de nature cationique, même si une très faible activité est détectée contre *M. luteus*, ce qui confirme le résultat trouvé précédemment. Suivant le même raisonnement, la fraction CA présente une très forte activité contre *B.megaterium* avec une CMI de 75 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau III.25). En se basant sur des concentrations protéiques, toutes les autres CMI sont inférieures à 200 $\mu\text{g/mL}$, ce qui confirme que les peptides cationiques sont très actifs, même si la nature chimique des composés antimicrobiens n'est pas connue.

II.1.1.3 Distribution des poids moléculaires des peptides

L'échantillon actif, c'est-à-dire la fraction cationique ainsi que la fraction non retenue sont élués une nouvelle colonne de filtration Superdex HR 10/30 (Tricorn, GE healthcare) afin d'estimer la taille des molécules biologiquement actives et de les comparer avec celles de la fraction non retenue. Ceci nous permettra également de poser un postulat quand au choix des seuils de coupure pour l'UF afin de séparer la fraction dotée de l'activité antibactérienne.

Les profils chromatographiques (Figure III.48) permettent de mettre en évidence des différences significatives entre les 2 échantillons, même si les pics ne commencent à être détectés qu'après 15 min, ce qui correspond à des poids moléculaires inférieurs à 13000 Da.

Depuis le début de l'élution, le chromatogramme correspondant à la fraction cationique est toujours supérieur à celui obtenu avec la NR, jusqu'à un certain point d'intersection (A) où les données s'inversent et où les pics d'élution correspondant à la NR (fraction non retenue) sont toujours supérieurs. Le temps d'élution de ce point (A) correspond à un poids moléculaire d'à peu près 800 Da. Préliminairement, l'interprétation des chromatogrammes montre donc que la plupart des peptides qui se retrouvent dans la fraction CA sont supérieurs à 1000 Da et que la fraction non retenue comporte les peptides de petite taille.

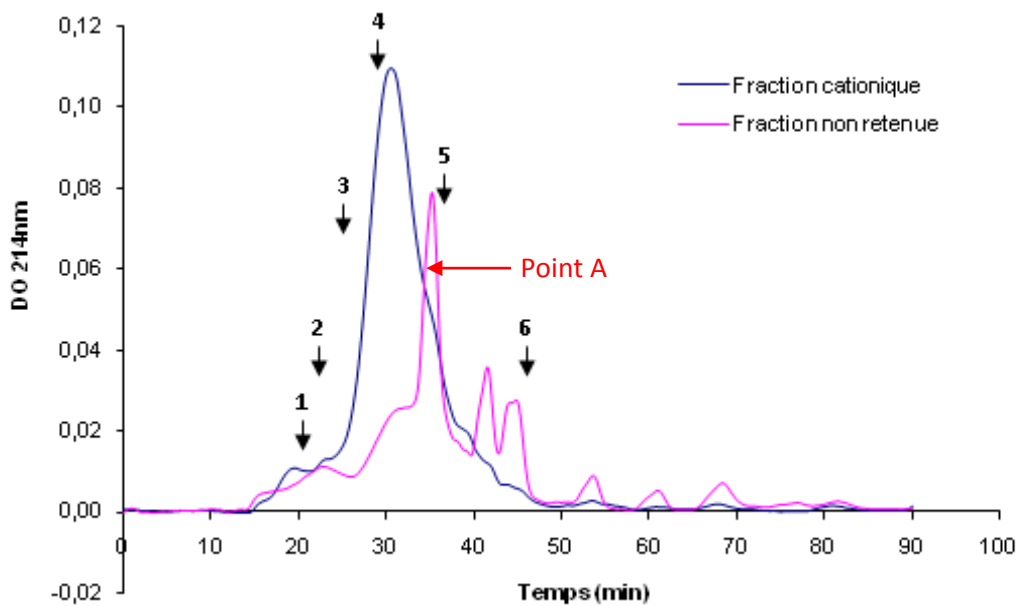


Figure III.48 : Profils chromatographiques de la fraction active cationique et de la fraction non retenue issues du fractionnement par la charge sur les colonnes SPE de l'hydrolysate des viscères de seiche produit par la Pepsine à échelle pilote. Calibrations : 1= 7330 Da ; 2 = 3142 Da ; 3 = 2168 Da ; 4 = 1040 Da ; 5 = 496 ; 6 = 250 Da).

Dans le tableau III.27 sont représentées les proportions des différentes classes de peptides, calculées en pourcentage d'aire sous la courbe.

Tableau III.27 : Distribution des poids moléculaires (% d'aire relative) de l'hydrolysate initial non fractionné (Hyd), de la fraction cationique (CA) active, de la fraction non retenue (NR) obtenues après séparation sur les colonnes échangeuses SPE.

	% d'aire sous la courbe							
	>7	7 - 5,5	5,5 - 3	3 - 2	2 - 1	1 - 0,5	0,5 - 0,25	<0,25
Hyd	1,15	3,07	6,55	4,87	12,63	40,81	14,3	16,88
CA	4,55	1,02	2,51	2,54	20,63	42,83	20,83	4,62
NR	5,66	1,43	2,98	1,88	6,54	20,6	44,36	15,82

Les compositions peptidiques des 2 fractions sont très proches avant 2 kDa. En effet à partir de ce poids moléculaire, nous avons un taux de 20,63% pour CA contre 6,54% pour la NR. Le pourcentage d'aire sous la courbe le plus important correspond à l'intervalle comprenant des poids moléculaires entre 1 et 0,5 kDa (42,83%). Toutefois, on constate qu'à mesure que l'on va vers les peptides de petite taille, les pourcentages d'aire sous la courbe augmentent dans la fraction non retenue et correspondant à la fraction cationique de l'hydrolysate diminuent. Ces données confirment bien les résultats constatés au niveau des chromatogrammes. En revanche, si on compare les 2 fractions avec l'hydrolysate initial, on remarque qu'au niveau des peptides de PM compris entre 2 et 0,25 kDa la fraction cationique est plus enrichie en petits peptides.

II.1.2 Discussion

Plusieurs molécules extraites à partir d'invertébrés marins, notamment les mollusques possèdent un large spectre d'activités antimicrobiennes, agissant notamment sur la croissance bactérienne (Mitta et al. 2000 - Zasloff 2002). Les activités antibactériennes ont été décrites précédemment dans l'hémolymphe de plusieurs espèces de mollusques, notamment les Aplysies, les huîtres, et quelques genres de moules (Maktoob and Ronald 1997 - Olicard et al. 2005 - Gueguen et al. 2006 - Roch et al. 2008). Certaines de ces molécules responsables des activités antibactériennes ont été identifiées et bien caractérisées avec répartitions en différentes classes biochimiques, à savoir les peptides et composés nitrogénés, terpènes, polypropionates, macrolides, prostaglandines, stérols, etc... (Maktoob et Ronald 1997).

Les peptides antimicrobiens cationiques représentent une des familles les plus originales d'agents anti-infectieux qui ait été découverte au cours de ces deux dernières décennies. A ce jour, plusieurs molécules issues d'organismes marins sont en stade avancé de développement pharmaceutique (Andres et Dimarcq 2007). Au niveau de l'organisme vivant, les peptides antimicrobiens cationiques sont considérés comme l'un des éléments clefs du système immunitaire inné, système qui assure la première ligne de défense des organismes multicellulaires. En outre, les composés antimicrobiens cationiques sont à caractère amphiphile et composés de 20 à 50 acides aminés, présentant une grande diversité structurale. Ces peptides présentent un large spectre d'activité antibactérienne et antifongique, voire antivirale.

Le but de la présente partie était de fractionner l'hydrolysate de Pepsine par chromatographie échangeuse d'ions et de vérifier si l'activité antimicrobienne détectée est bien liée à la charge, avant de procéder au fractionnement suivant le poids moléculaire, ce qui nous permettra plus tard de comparer les activités antimicrobiennes obtenues par type de fractionnement (selon la charge ou la taille du peptide). Dans cette étude, l'activité antibactérienne s'est avérée relative à la fraction cationique et ce pour toutes les bactéries-cible testées. La méthode de diffusion sur puits de gélose et la détermination de CMI ont montré que la souche particulièrement sensible à la fraction cationique de l'hydrolysate est *Bacillus megaterium*. Dans des travaux antérieurs et bases de données portant les activités antimicrobiennes provenant de mollusques marins, les peptides qui en sont responsables montrent dans la plupart des cas des caractères cationiques et amphiphiles (se référer aux bases de données suivantes [<http://aps.unmc.edu/AP/main.php> et <http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm>]). Même si les fractions obtenues dans cette étude ne sont pas tout à fait pures, les valeurs des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) sont proches de celles de peptides antimicrobiens purifiés et provenant d'organismes marins (Gueguen et al. 2006 - Seo et al. 2005). Toutefois, ce type de comparaison reste hasardeux du fait de la nature potentiellement complexe de l'activité des extraits contenus dans la fraction.

Plusieurs études portant sur le criblage d'activités antimicrobiennes ont montré que les bactéries Gram⁻ sont plus sensibles que les Gram⁺ (Tadesse et al. 2008). Toutefois, lors de notre screening, la fraction cationique SPE s'est montrée d'un haut degré d'efficacité contre les deux groupes de bactéries appartenant à la fois aux pathogènes humains et à la flore de contamination marine. En finalité, la seule confirmation qui peut être avancée après ces expérimentations concerne la charge des peptides antimicrobiens ainsi que l'intervalle de poids moléculaire dans lequel se situent les peptides. En effet, la nature biochimique des composés est à déterminer dans un travail complémentaire.

CONCLUSION

Dans cette étude expérimentale, la nature cationique des composés bioactifs est vérifiée suite au fractionnement de l'hydrolysate sur colonnes SPE et confirme celle rapportées dans la littérature. Après avoir spécifié la fraction active, nous sommes passés à l'étude des profils chromatographiques correspondant à cette fraction et à celle non retenue. Cette distribution a montré que la fraction biologiquement active possède un PM compris entre 2000 et 250 Da.

Etant donné que notre hydrolysate a présenté une activité antimicrobienne intéressante contre un panel de pathogènes bactériens intéressants, il serait important de spécifier la nature des composés, à travers une purification plus poussée, ce qui permettrait éventuellement de les classer suivant une catégorie d'agents antimicrobiens marins. Ceci devra conduire à des études plus poussées relatives au mode d'action antimicrobien. **La prochaine étape concernant le fractionnement suivant la taille des molécules par les techniques membranaires nous permettra de déterminer le poids moléculaire des peptides bioactifs. L'objectif sera également de les séparer dans une fraction donnée en vue d'une éventuelle valorisation directe.**

II.2 FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT PAR PROCÉDE MEMBRANAIRE

Les objectifs de chapitre sont d'étudier l'application des techniques de séparation membranaire dans le but d'améliorer de la valorisation des co-produits issus des industries de transformation et de conditionnement de la seiche. En effet, la technique d'hydrolyse a déjà démontré son efficacité de point de vue valorisation par la production d'un hydrolysate de haute valeur ajoutée. Dans ce chapitre, on utilise la séparation par la taille comme stratégie de prépurification.

L'hydrolysate issu de l'hydrolyse pilote avec la Pepsine a ainsi été fractionné par UF. Cette étude s'est focalisée sur la valorisation de la fraction protéique en concentrant les protéines en séparant la fraction peptidique de la fraction lipidique. L'objectif de cette ultrafiltration est aussi de localiser la fraction active de point de vue des activités antimicrobiennes. Notre intérêt portera également sur la composition en acide aminés du perméat. Avec cet objectif, la première étape fut le choix du matériau membranaire et du seuil de coupure. Ensuite, une étude de la régénéralité de la membrane d'ultrafiltration a été menée. En effet, le principal facteur limitant de ce type de procédé étant le colmatage provoqué par l'affinité des protéines pour le matériau. Des tests d'adsorption en conditions statiques ont ainsi été effectués.

II.2.1 Essais préliminaires à l'échelle de laboratoire

II.2.1.1 Choix du matériau membranaire et du seuil de coupure

II.2.1.1.1 Mesure de l'affinité peptides/ matériaux membranaires

Des tests d'adsorption en conditions statiques ont été réalisés afin d'évaluer le degré des affinités peptides/membrane. Dans ce cas, l'adsorption a été quantifiée en termes de réduction

du flux de perméation à l'eau avant et après adsorption et par le modèle de réduction du diamètre de pore (Figure III.49).

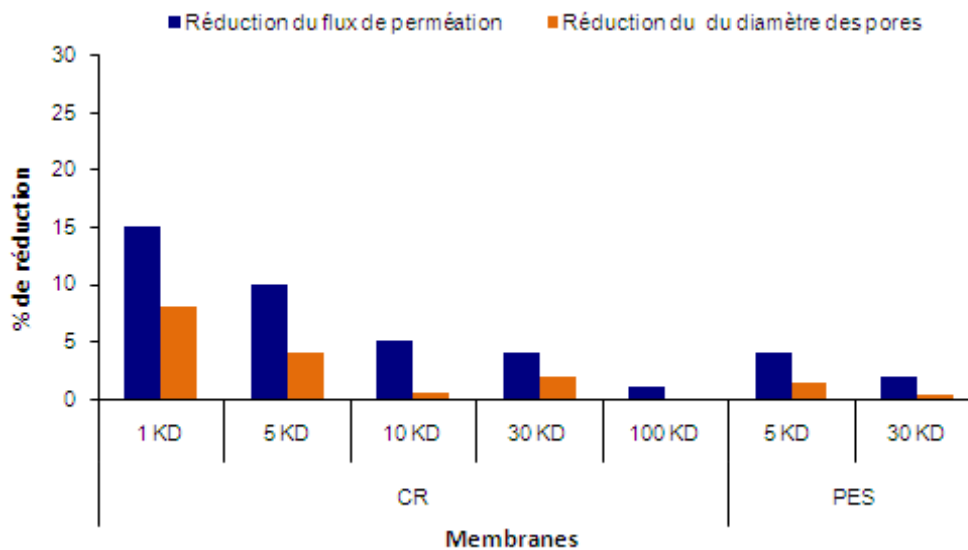


Figure III.49 : Test d'adsorption statique : influence du matériau et du seuil de coupure sur les interactions peptides/membrane (Conditions : T = 4°C, 12 h, C₀ = 100 g.L⁻¹).

D'après cette figure, on constate que la réduction du flux de perméation et du diamètre de pore est très faible puisqu'elle ne dépasse pas 15% pour le flux de perméation et 8% pour la réduction du diamètre du pore et ce pour la membrane en CR 1 kDa. On constate également que cette réduction suit l'ordre suivant correspondant à un seuil de coupure croissant des membranes : CR 1 kDa, CR 5 kDa, PES 5 kDa, CR 10 kDa, CR 30 kDa, PES 30 kDa et CR 100 kDa. De plus, cette figure montre que plus la taille des pores est réduite, plus la réduction du flux due à l'adsorption est élevée et donc plus la membrane serait sensible au colmatage par les peptides de taille proche de celle des pores. Par ailleurs, on remarque que les membranes en cellulose régénérée se colmatent beaucoup plus que celles en PES. Par exemple, la CR 10 kDa possède un pourcentage de réduction du diamètre des pores et du flux de perméation très proche de la PES 5 kDa pour un seuil de coupure 2 fois plus important. Ceci peut s'expliquer si l'on considère que la couche adsorbée est d'épaisseur constante. Etant donné que cette dernière tapisse les pores, elle aura un effet relatif plus marqué lorsque le pore est de petit diamètre.

Ces phénomènes ont déjà été observés par Jaouen et Quéméneur (1992) lors de l'étude de l'effet du matériau et du seuil de coupure sur l'adsorption des protéines de poisson. Saha et

al. (2006) rapportent également que la réduction du flux en conditions statiques, attribuée aux protéines contenues dans le jus de sucre de canne est de l'ordre de 10 à 28% pour les membranes en PES, de seuil de coupure compris entre 30 et 100 kDa. Bien que cette méthode d'estimation de l'affinité peptides/membrane en conditions statiques ne tienne pas compte des conditions réelles de l'ultrafiltration, elle reste un bon indicateur de ce qui se passe en conditions dynamiques (Jaouen 1989). En conditions réelles et en fonction des membranes, la réduction du flux liée à l'adsorption est majorée de 7 à 35% par rapport aux résultats obtenus en conditions statiques. On peut conclure que les membranes disques testées dans cette étude ont relativement peu d'affinité pour les solutés présents dans l'hydrolysate, en conditions statiques subissent un colmatage très faible.

II.2.1.1.2 Perméabilité à l'eau et flux de perméation de l'hydrolysate

Le principal objectif de cette partie de l'étude est de dégager des ordres de grandeur des performances des membranes d'ultrafiltration en termes de flux, de teneur en peptides dans les fractions (sélectivité), ainsi que concernant la nettoyabilité des membranes. **Le criblage effectué suite à cette étude nous permettra de conclure quant au choix du seuil de coupure ainsi que du matériau à utiliser pour le fractionnement à échelle pilote.** Pour cette étude, nous avons comparé 7 membranes- disques d'UF de matériaux et de seuils de coupure différents. En effet, nous avons précédemment trouvé, dans la partie concernant le fractionnement par la charge que l'activité antimicrobienne est majoritairement cationique et que la taille des peptides antimicrobiens analysé par FPLC, contenus dans la fraction cationique se situe entre 250 et 1000 Da. Pour les membranes en cellulose régénérée (CR), les seuils de coupure testés ont été de 1, 5, 10, 30 et 100 kDa. Pour les membranes en PES, les seuils de coupure sont de 5 et 30 kDa.

Ces membranes ont tout d'abord été caractérisées par leur perméabilité à l'eau. L'hydrolysate de pepsine de viscères de seiche a ensuite été fractionné sur chaque membrane en filtration frontale afin de visualiser l'effet direct du matériau et du seuil de coupure. **Les performances des membranes ont été évaluées en termes de flux de perméation et de sélectivité.** Les flux obtenus pour les différents essais sous une pression de 2 bars dans l'objectif d'atteindre un facteur de réduction volumique (FRV) de 4 sont reportés dans le tableau III.28. D'après les résultats obtenus, une tendance peut être dégagée concernant les flux de perméation : plus le seuil de coupure est élevé, plus le flux J est important. Le flux propre à l'échantillon est de 6,05 L/h.m² quand le seuil de coupure est de 1 kDa, mais pour un

seuil de coupure de 5 kDa, les moyennes des flux sont quand même assez élevées vu qu'ils passent à 11,25 L/h.m² pour la membrane en PES et 10,01 L/h.m² pour la membrane en CR. L'écart se creuse beaucoup plus concernant les flux à l'eau initiaux, c'est-à-dire avant passage de l'hydrolysate. En effet pour une membrane en CR, le flux initial J_i passe de 9,96 L/h.m² pour un seuil de coupure de 1 kDa à 34,34 L/h.m² à 5 kDa, puis passe à 52,02 L/h.m² pour 10 kDa, 343,34 L/h.m² à 30 kDa pour atteindre 1072,45 L/h.m² à 100 kDa.

Tableau III.28: Moyennes de flux de perméation obtenus lors de la filtration des hydrolysats avec la Pepsine sur le mini-pilote Amicon à 2 bars à différents seuil se coupure.

Matériau	Seuil de coupure (kDa)	J_i (L/h.m ²)	J (L/h.m ²)	J_f (L/h.m ²)	Taux de régénération
CR	1	9,96 ± 1,5	6,05 ± 0,6	9,65 ± 0,5	96,88 %
PES	5	44,37 ± 2,8	11,25 ± 1,6	44,05 ± 1,3	99,27 %
CR	5	34,34 ± 2,4	9,82 ± 0,9	33,37 ± 1,4	97,17 %
CR	10	52,02 ± 2,1	13,70 ± 3,0	50,48 ± 2,0	97,03 %
PES	30	387,84 ± 7,4	17,68 ± 2,1	366,42 ± 5,4	94,47 %
CR	30	343,34 ± 3,4	16,34 ± 2,2	323,72 ± 7,2	94,28 %
CR	100	1072,45 ± 5,3	22,57 ± 1,1	1121,19 ± 7,2	100 %

J_i : Flux initial à l'eau avant passage de l'hydrolysate.

J : flux moyen pour atteindre FRV = 4

J_f : Flux final à l'eau après passage de l'hydrolysate.

En résumé on peut dire que très logiquement et pour un matériau donné, on observe une augmentation de la perméabilité hydraulique liée à l'augmentation du seuil de coupure de la membrane. Par ailleurs, en considérant des porosités de membranes voisines, le matériau semble avoir une influence majeure. En effet, pour un seuil de coupure de 5 kDa par exemple, la moyenne de J_i est de 42,25 L/h.m² pour la membrane en PES alors qu'elle est de 34,34 L/h.m² pour celle en CR. Ainsi, à seuils de coupure très proches, la membrane en PES est plus perméable à l'eau que celles en cellulose régénérée. **De ce fait, un seuil de coupure élevé n'est pas le seul critère permettant d'obtenir une perméabilité hydraulique élevée, le type de matériau doit également être considéré lors u choix d'une membrane.**

Cependant, cet écart est moins marqué pour un seuil de coupure de 30 kDa. Quant aux flux de perméation de l'hydrolysate, ils se rejoignent pratiquement puisque la moyenne calculée pour la membrane en PES est de 11,25 L/h.m² et de 10,01 L/h.m² pour le seuil de coupure de 5 kDa et pour 30 kDa, ils sont de 387,84 L/h.m² et de 343,34 L/h.m² pour la PES et la cellulose régénérée respectivement.

Après filtration de l'hydrolysate de viscères de seiche à 2 bars, les disques membranaires ont été rincés à l'eau ultra-pure puis nettoyés délicatement à l'aide d'un pinceau doux. La nettoyabilité des membranes a été estimée par le pourcentage de flux récupéré après le passage de l'hydrolysate (Tableau III.29). On observe que par simple rinçage à l'eau et nettoyage mécanique, les taux de régénération sont tous supérieurs à 94%, quelque soit le matériau ou le seuil de coupure considéré. Ceci indique qu'il n'existe pas ou peu de colmatage en profondeur et que les forces d'adhésion des solutés à la surface de la membrane sont faibles. Le plus fort taux de récupération est observé pour la membrane en CR de 100 kDa (recouvrement total du flux à l'eau). Par ailleurs on obtient également une bonne nettoyabilité pour la membrane en PES de 5 kDa.

L'évolution des flux de perméation à l'eau avant et après passage de l'échantillon sont regroupés dans la Figure III.50. Le terme « flux à l'eau initial » désigne le flux avant passage de l'échantillon sur la membrane. Le terme « flux à l'eau final » désigne quant à lui le flux à l'eau après filtration de l'échantillon et nettoyage de la membrane.

Le suivi du flux de perméation suite au passage de l'eau sur une membrane disque neuve a permis de dégager certaines constatations (Figure III.51). Comme prévu, les flux restent pratiquement stables étant donné qu'il n'existe pas de colmatage, les seules variations des points qui existent sont minimales et sont relatives à la sensibilité de la balance de précision. Pour la membrane en cellulose 1 kDa en CR, et étant donnée la taille du dispositif ainsi que la petite section du tuyau collecteur, la première goutte n'arrive qu'à peu près 6 min après la mise du système sous pression et la mise en route de l'agitation magnétique. C'est la raison pour laquelle les valeurs de flux ne commencent qu'à partir de ce temps. Pour les membranes en CR de 1 et 5 kDa, l'unité de temps est la minute. A partir de 10 kDa, l'unité considérée est la seconde vu que l'écoulement de l'eau se fait très rapidement, surtout pour la membrane de 100 kDa pour laquelle le passage de l'eau se fait au bout d'une minute.

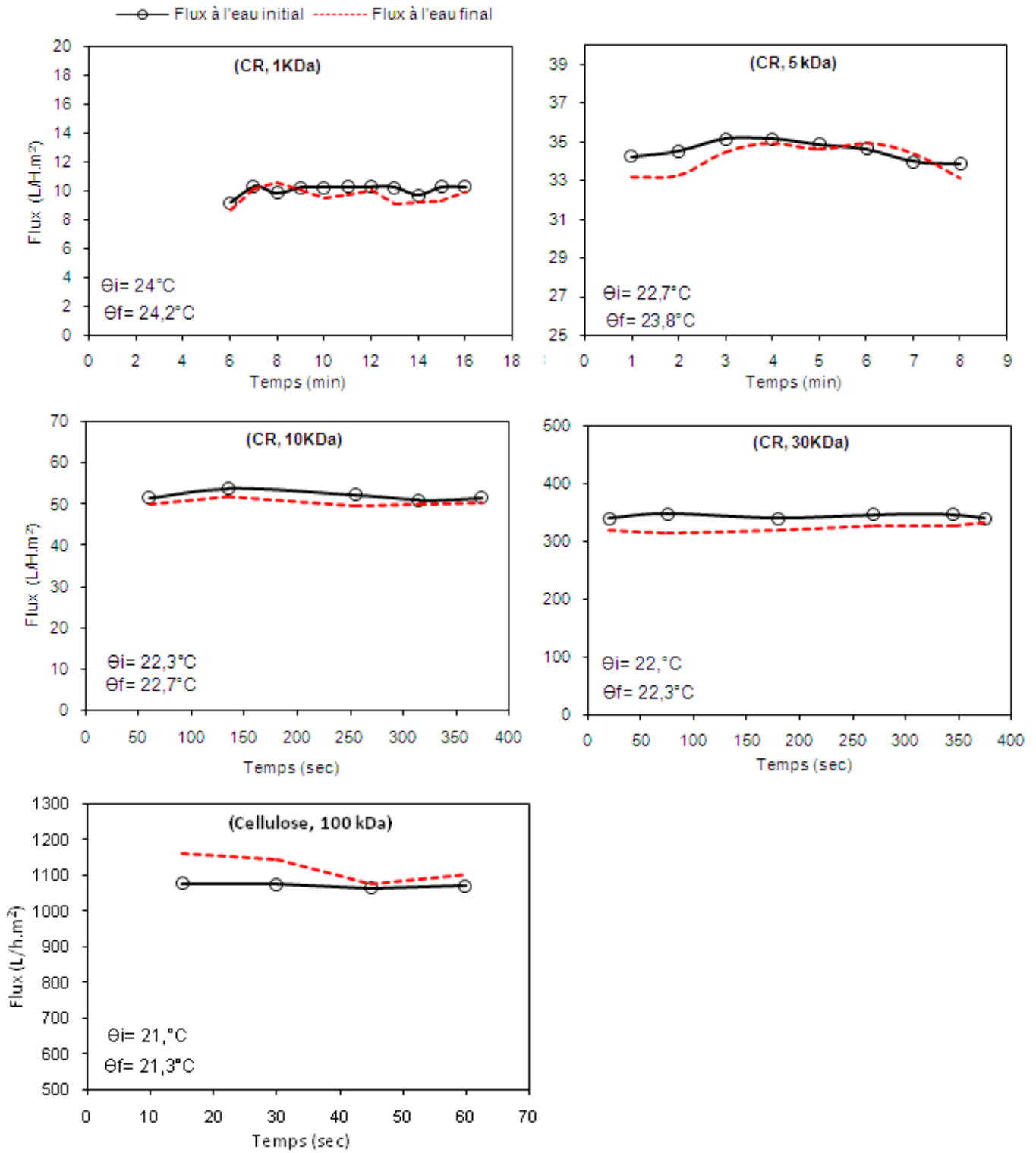


Figure III.50 : Variation du flux de perméation à l'eau (initial et final) en fonction du temps pour les membranes en cellulose régénérée de 1, 5, 10, 30 et 100 kDa à une pression de 2 bars. θ_i : température initiale de l'eau avant filtration. θ_f : température du filtrat

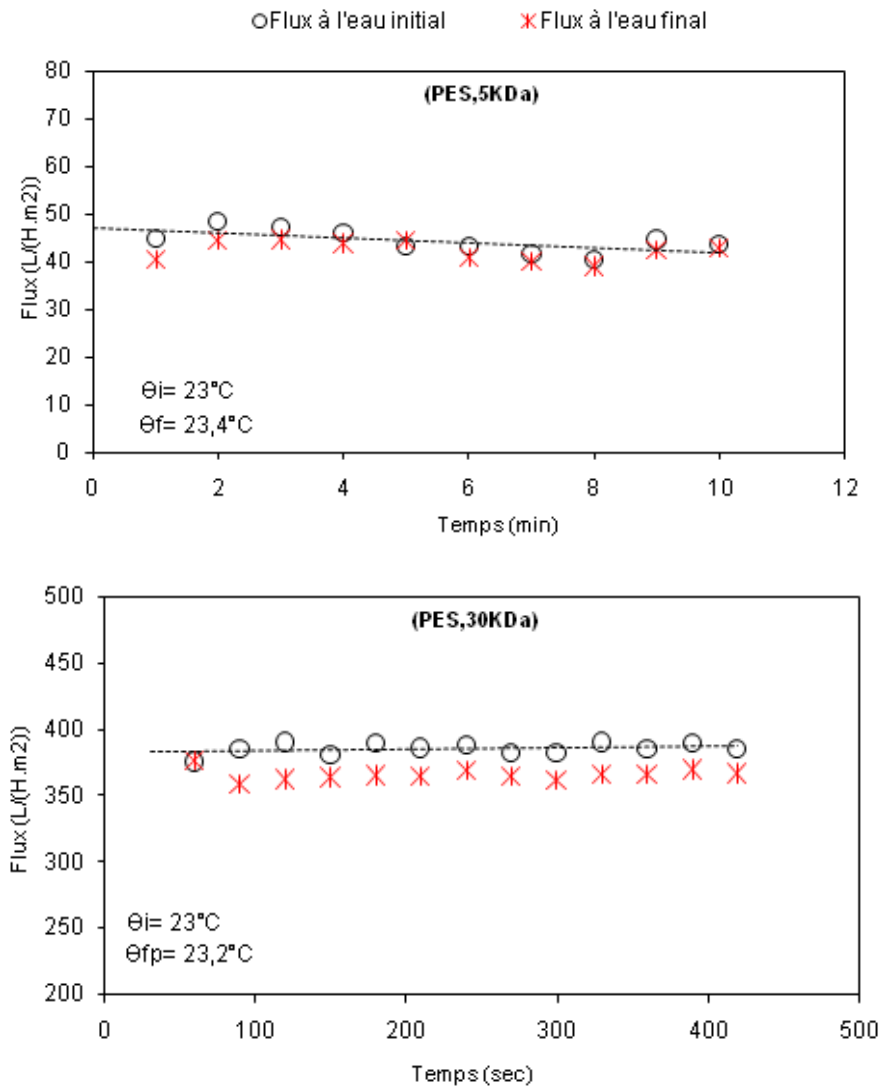


Figure III.51 : Variation du flux de perméation à l'eau (initial et final) en fonction du temps pour les essais à petite échelle sur les membranes PES de 5 et 30 kDa. P = 2 bars. θ_i : température initiale de l'eau avant filtration. θ_f : température du filtrat.

Concernant les membranes en PES de 5 et 30 kDa ci-dessus (Figure III.51), comme on l'a vu dans le tableau, les flux à l'eau avant et après passage de l'hydrolysate sont supérieurs à ceux obtenus avec les membranes en CR. L'allure de répartition des points est pratiquement la même que pour les membranes en cellulose. Toutefois, l'allure de la courbe de tendance montre une légère diminution du flux pour la 5 kDa, probablement due à la petite taille des pores. La répartition des points du flux à l'eau initial et final pour les deux membranes utilisées en PES, montrent que d'une manière générale et après passage de l'hydrolysate et nettoyage de la membrane on récupère pratiquement le même flux que lorsque la membrane était neuve.

Les flux de perméation obtenus lors du passage de l'hydrolysate de Pepsine de 2 heures (45°C, pH2) sur les membranes en cellulose de 1, 10 et 100 kDa sont présentés dans la Figure

III.52. D'une manière générale, on peut dire que l'hydrolysat étudié est très peu colmatant vu que l'allure de la courbe ne montre qu'une très faible diminution du flux de perméation, surtout pour le seuil de coupure de 1 kDa. En effet, les flux en début d'essai sont autour de 6 L/h.m² et en fin d'expérience on conserve quand même un flux correct variant autour de 5 L/h.m². La durée totale de l'essai en mode concentration FRV 4 pour un seuil de coupure de 1 kDa en CR est de 4 heures. Pour les seuils de coupure de 10 et 100 kDa, les flux sont plus élevés et plus stables aussi, confirmant donc la nature peu colmatante de l'hydrolysat. Les effets limitants liés à la couche de polarisation semblent donc négligeables pour ces essais réalisés à l'échelle de laboratoire. Le seul inconvénient qui existe est, comme il est reporté sur la Figure III.51 que la température mesurée au sein du concentrat, après avoir atteint un FRV = 4 accuse une légère augmentation variant entre 4 et 6°C par rapport à la température de l'échantillon introduit dans la cellule de filtration du mini-pilote. Cette augmentation de température est due au frottement dû à l'agitation magnétique. Pour le perméat cependant, on n'enregistre qu'une augmentation d'un ou de deux degrés tout au plus.

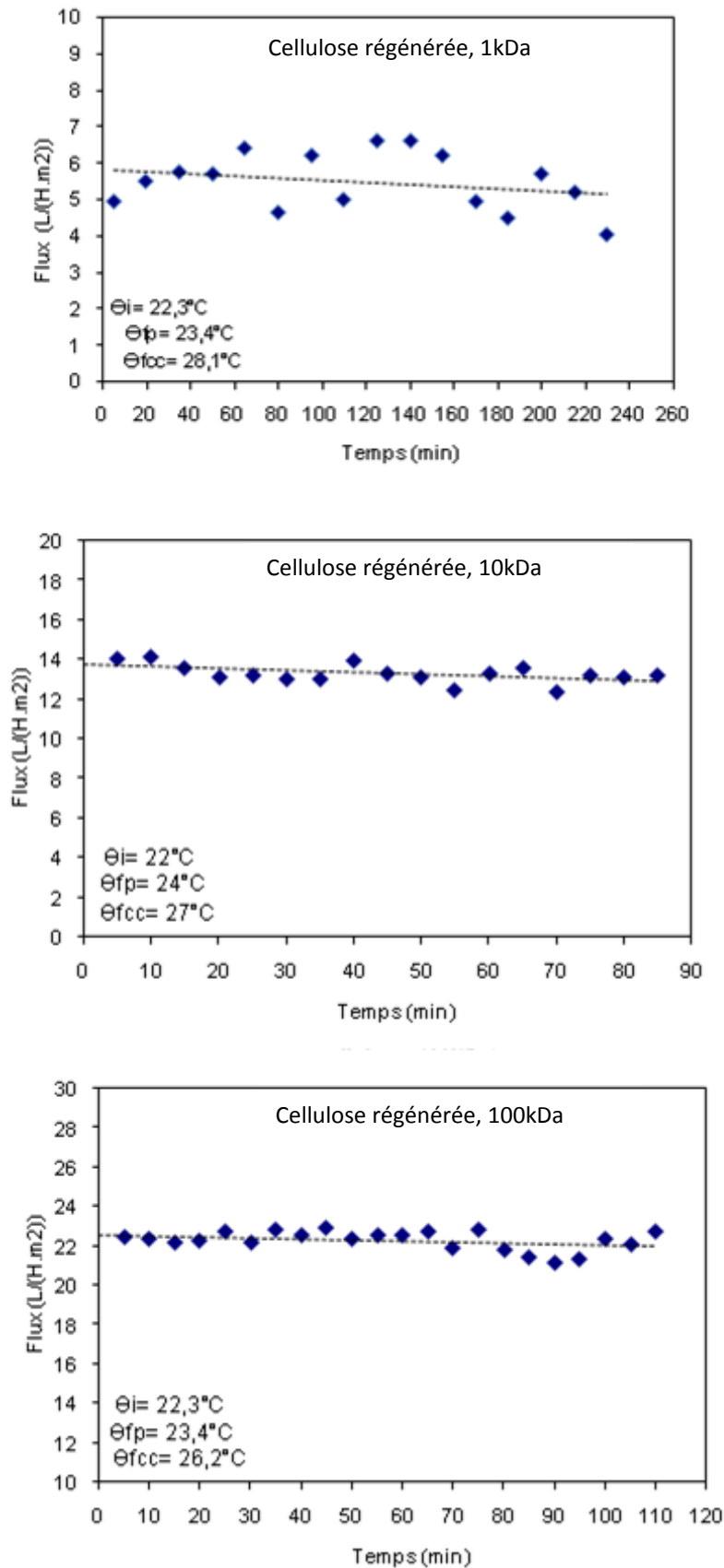


Figure III.52: Variation en fonction du temps du flux de perméation de l'hydrolysât produit avec la Pepsine (45°C, pH2) pour les essais à petite échelle avec les membranes en cellulose régénérée de 1, 10 et 100 kDa en mode concentration FRV = 4 et à P = 2 bars. θ_i : température initiale de l'eau avant filtration. θ_{fp} : température du finale du perméat. θ_{fcc} : température du finale du concentrat.

Les flux de perméation obtenus lors du passage de l'hydrolysate de Pepsine de 2 heures (45°C, pH2) sur les membranes en cellulose régénérée et en PES de 5 et 30 kDa sont présentés dans la Figure III.53. Les valeurs pour les membranes en PES et en CR ont été reportées sur un même graphique dans un but comparatif. On constate que les flux de perméation obtenus pour la membrane en PES sont toujours supérieurs à ceux obtenus avec la membrane en CR, et ce pour les deux seuils de coupure (5 et 30 kDa). Par ailleurs, les flux de perméation obtenus avec la membrane en CR et en PES particulièrement pour un seuil de coupure de 5 kDa présentent une faible tendance à la baisse. En effet, les flux mesurés en début et en fin d'expérience accusent à peine une diminution de 1 L/h.m².

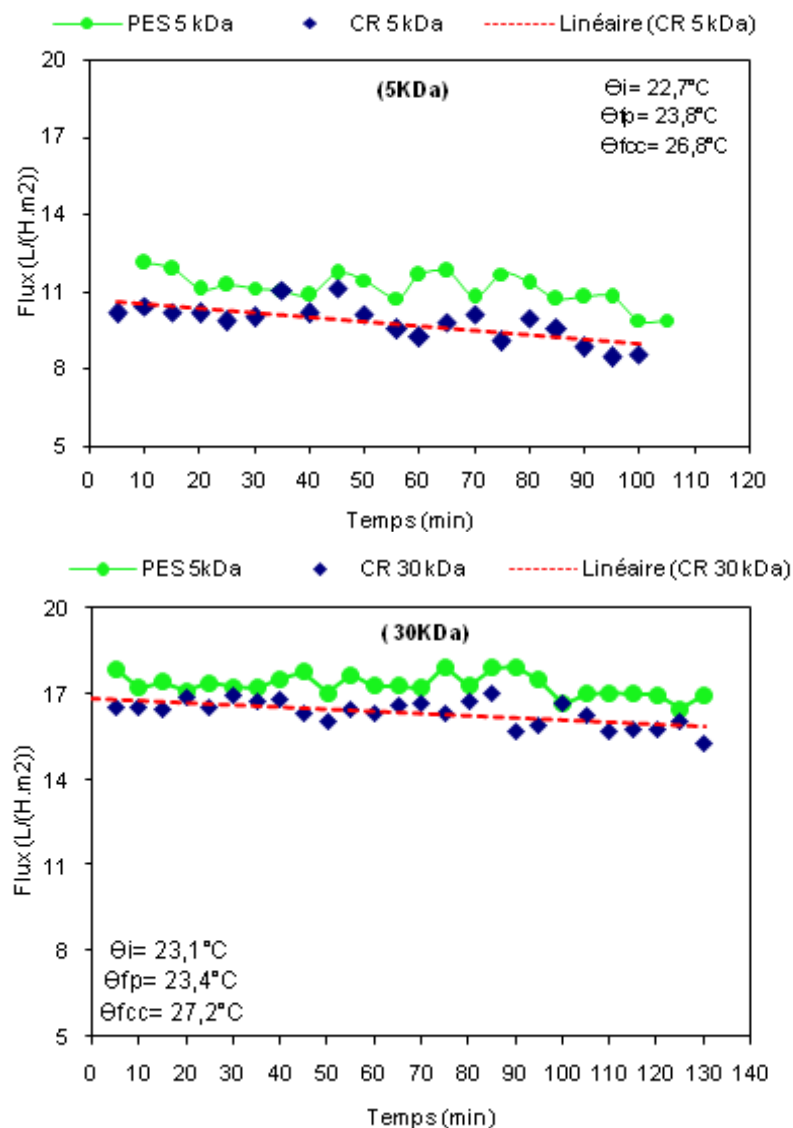


Figure III.53: Variation en fonction du temps du flux de perméation de l'hydrolysate produit avec Pepsine (45°C, pH2) pour les essais à petite échelle avec les membranes en cellulose et en PES de 5 et 30 kDa en mode concentration FRV = 4 et à P = 2 bars.

II.2.1.1.3 Effet sur les populations peptidiques

L'effet du fractionnement sur les populations peptidiques est évalué par : (i) la détermination des profils chromatographiques et la distribution en poids moléculaires dans les perméats et les concentrats, (ii) le calcul du taux de rétention et du taux de transmission et (iii) la détermination de la courbe de tamisage de la membrane. Le taux de rétention (TR), c'est-à-dire les proportions retrouvées dans le concentrat est exprimé par le ratio :

$$TR = 100 \times \left(1 - \frac{C_p}{C_r} \right) \quad \text{Equation III.5}$$

où C_p et C_r sont respectivement la teneur en solutés dans le perméat et dans le rétentat.

Le TR peut être également calculé à partir de l'aire sous la courbe, en considérant la relation linéaire entre l'aire sous la courbe (ASC) et la teneur en peptides (Chabeaud 2008) par la relation suivante :

$$TR = 100 \times \left(1 - \frac{ASC_p}{ASC_r} \right) \quad \text{Equation III.6}$$

où ASC_p et ASC_r sont respectivement l'aire sous la courbe du perméat et du rétentat.

Le taux de rétention global (proportions retrouvées dans le rétentat) et le taux de transmission (proportions retrouvées dans le perméat) des peptides sont représentés par la Figure III.54. Quelque soit le matériau membranaire utilisé, le taux de transmission augmente avec le seuil de coupure. La transmission des protéines sera donc plus importante avec un grand seuil de coupure. En effet, concernant les membranes en cellulose régénérée, alors que la rétention est totale pour un seuil de coupure de 1 kDa, une transmission de 8% est observée à partir de 5 kDa, puis à 10, 30 et 100 kDa (12, 34 et 40% respectivement). Pour ce qui est des membranes en PES, une légère transmission (3%) est observée pour un seuil de coupure de 5 kDa, puis 6% à 30 kDa. **On remarque donc que pour un même seuil de coupure, les membranes en PES présentent un taux de rétention global (toutes fractions de peptides confondues) plus important, comparé aux membranes en CR.**

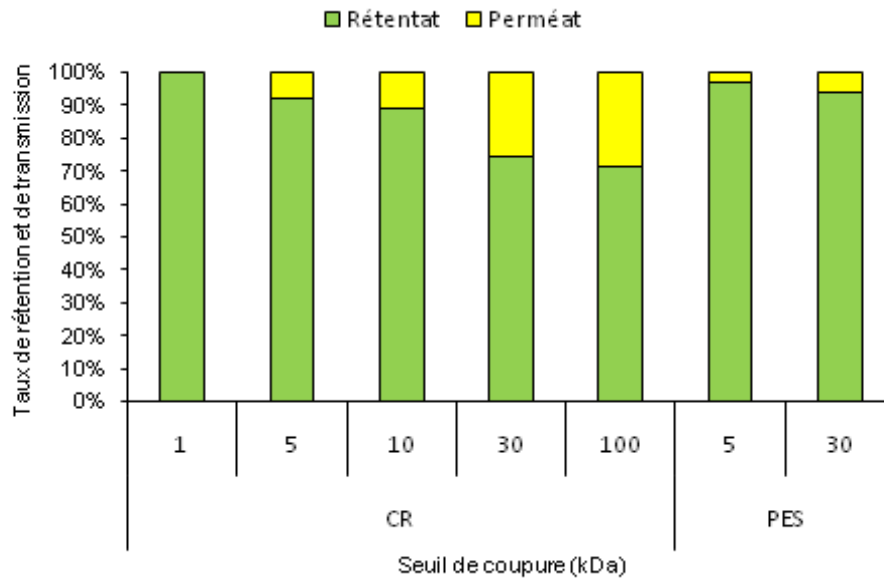


Figure III.54 : Répartition globale des peptides dans le rétentat et le perméat en fonction du matériau et du seuil de coupure de la membrane après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de seiche sur le mini-pilote Amicon. (P = 2 bar, FRV = 4).

La sélectivité d'une membrane est sa capacité à retenir ou à transmettre certains peptides par rapport à d'autres. Cela peut engendrer une nouvelle répartition de la population des peptides dans le rétentat et le perméat et pourrait, éventuellement se traduire par une variation de l'intensité de l'activité antibactérienne des différentes fractions. Les chromatogrammes des perméats et des rétentats et l'intégration de l'aire sous les courbes ont été utilisés pour calculer les taux de rétention et pour tracer la courbe de tamisage des membranes. Les Figures III.55 et III.56 présentent, sur un même graphique les profils peptidiques du perméat et du rétentat pour les membranes en CR (Figure III.55) et en PES (Figure III.56). Pour les seuils de coupure en dessous de 10 kDa, quelque soit le matériau membranaire utilisé, la différence relevée au niveau des 2 chromatogrammes consiste essentiellement en une population peptidique comprise entre 7 et 1 kDa, présente dans le concentrat et absente dans le perméat. La proportion de cette population augmente assez logiquement avec l'augmentation du seuil de coupure membranaire.

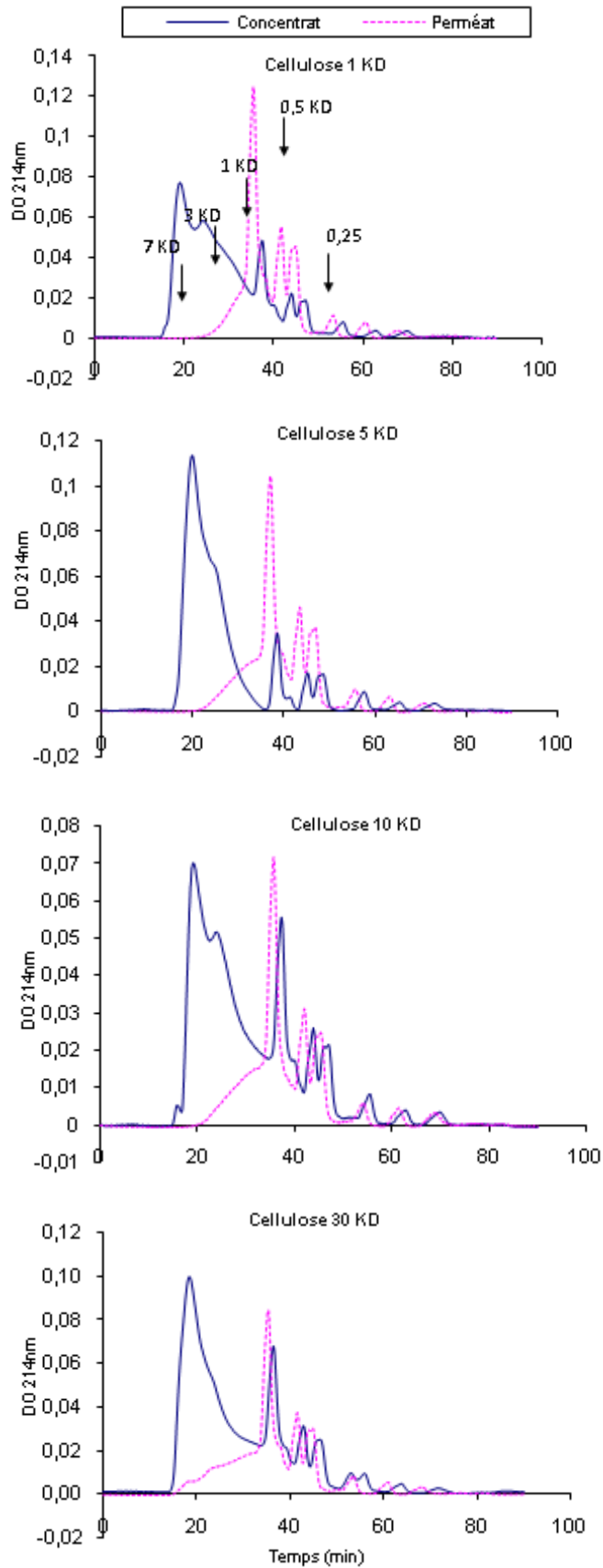


Figure III.55 : Distribution des poids moléculaires des peptides dans le perméat et le rétentat de l'hydrolysat de Pepsine fractionné sur les membranes en cellulose régénérée avec le mini-pilote Amicon.

Cependant, l'observation de la Figure III.56 montre des différences entre les membranes en PES et en CR, surtout pour le seuil de coupure de 5 kDa. **En effet, la membrane en PES 5 kDa montre une ségrégation très claire entre les deux chromatogrammes perméat-rétentat, et par conséquent une meilleure sélectivité.** Ce résultat vient conforter celui que nous avons mis en évidence plus haut suite au calcul des taux de transmission et de rétention pour les différentes membranes. En effet, nous avons pu relever que pour un même seuil de coupure de 5 kDa, la membrane en CR laisse passer beaucoup plus de peptides de PM supérieur à 3 kDa, alors que dans le perméat de la membrane en PES 5 kDa, on obtient un enrichissement conséquent en acides aminés et en polypeptides, résultat important pour une valorisation de l'hydrolysat des viscères de seiche à visée nutritionnelle.

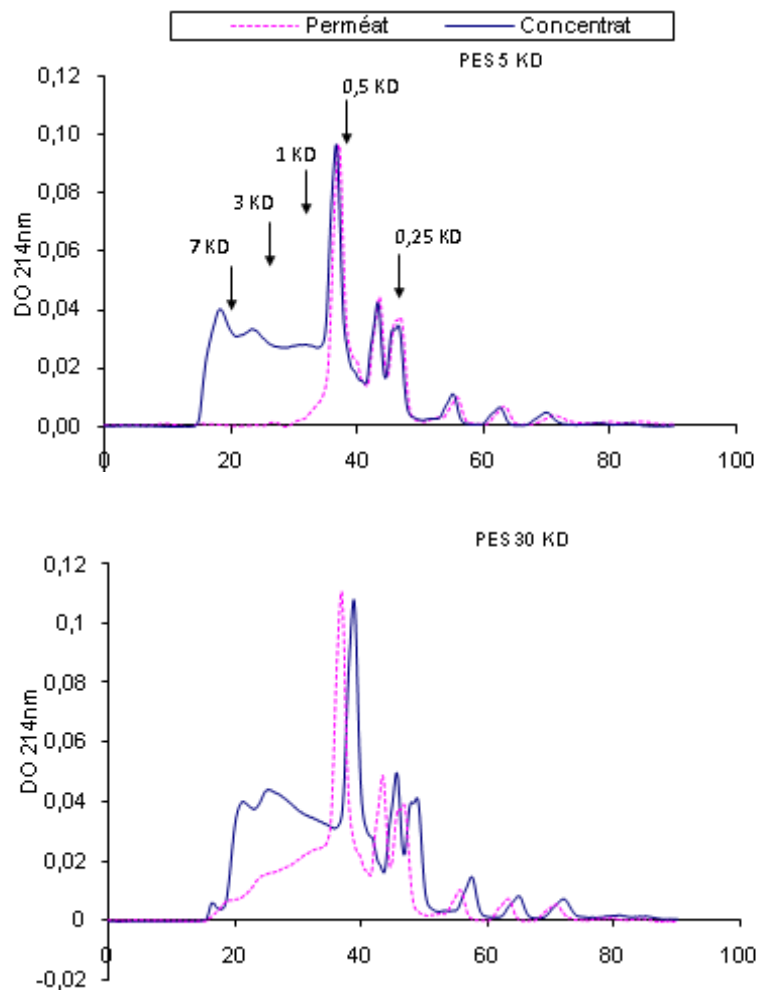


Figure III.56 : Distribution des poids moléculaires des peptides dans le perméat et le rétentat de l'hydrolysat de Pepsine fractionné sur les membranes en PES avec le mini-pilote Amicon.

Les profils chromatographiques des 5 perméats obtenus après fractionnement de l'hydrolysate sur les membranes en CR de 1, 5, 10, 30 et 100 kDa et des 2 perméats obtenus avec la membrane en PES (5 et 30 kDa) à une pression de 2 bars et pour un FRV = 4 sont présentées sur la Figure III.57. Ces perméats ont été injectés à la même concentration (chromatogrammes normés).

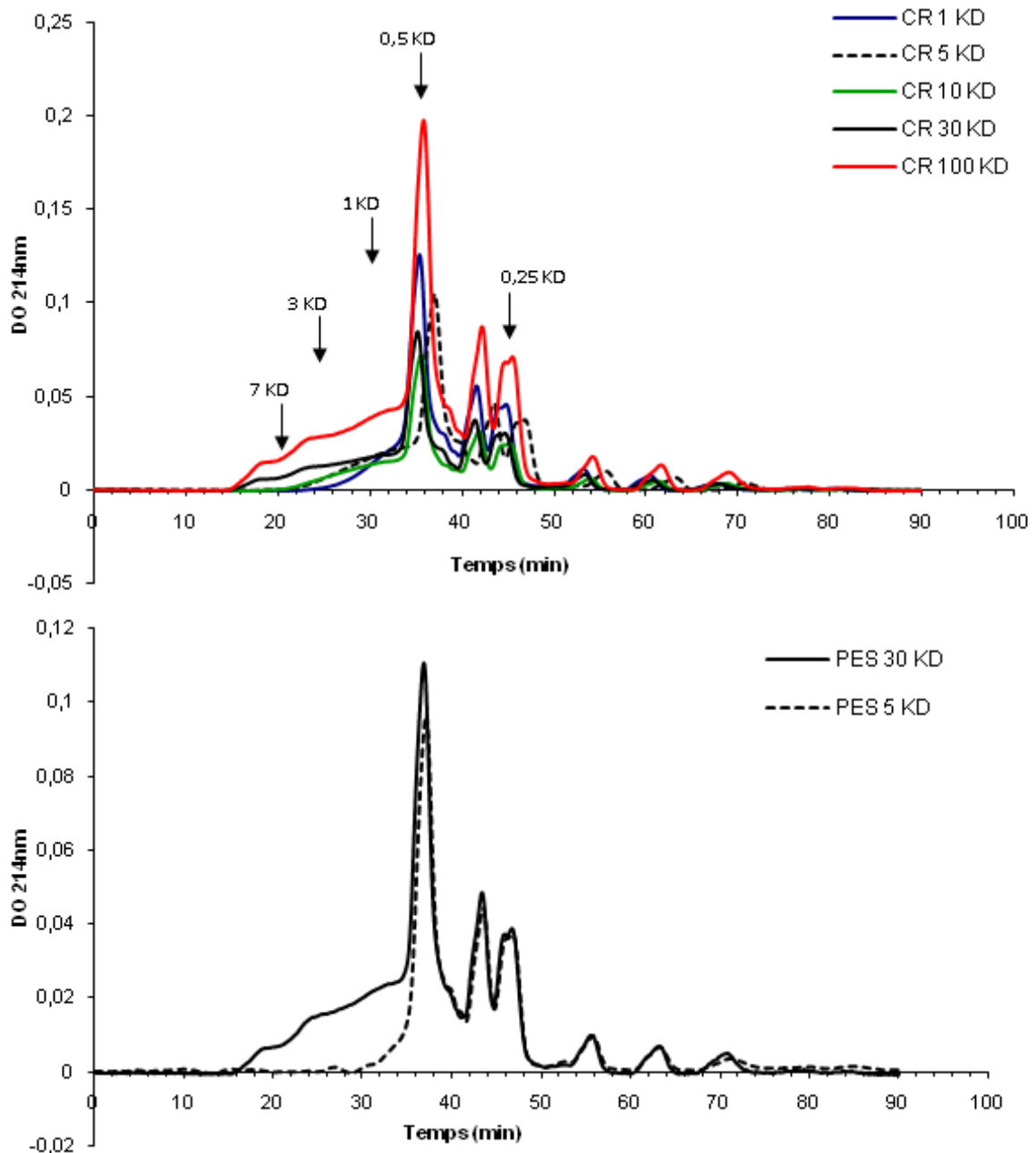


Figure III.57: Profils chromatographiques des perméats obtenus après fractionnement de l'hydrolysate de Pepsine sur les membranes en CR de 1, 5, 10, 30 et 100 kDa et en PES de 5 et 30 kDa avec le mini-pilote Amicon.

La Figure III.57 montre que pour les membranes en cellulose régénérée de 1, 5 et 10 kDa, on observe une rétention totale des peptides ayant un poids moléculaire supérieur à 5 kDa environ. Ces résultats montrent ainsi que ces 3 seuils de coupure sont ceux qui semblent être appropriés au fractionnement d'un hydrolysate de taille inférieure à 7 kDa. Cependant pour les seuils de coupure de 30 et de 100 kDa, on constate que la proportion entre 7 et 5 kDa est beaucoup plus importante. Concernant les membranes en PES, les chromatogrammes montrent que toutes les espèces moléculaires au-dessus de 1 kDa sont retenues lors de la filtration avec la membrane de 5 kDa de seuil de coupure.

Afin de comparer les performances des deux matériaux membranaires, nous avons porté les chromatogrammes pour les seuils de coupure de 5 et 30 kDa des membranes en CR et en PES sur un même graphique (Figure III.58). D'après cette figure, on constate que pour le seuil de coupure de 30 kDa aussi bien pour la cellulose régénérée que pour le polyéthersulfone, la population peptidique supérieure à 5 kDa est très présente, mais la membrane en PES montre clairement une translation vers des poids moléculaires plus petits. Cependant, pour ce qui est du seuil de coupure de 5 kDa, on remarque que le matériau en PES présente une meilleure sélectivité vis-à-vis des peptides de petit poids moléculaire, comparé à la cellulose régénérée. En effet, pour ce dernier matériau, il reste encore des molécules peptidiques ayant un poids moléculaires supérieur à 5 kDa.

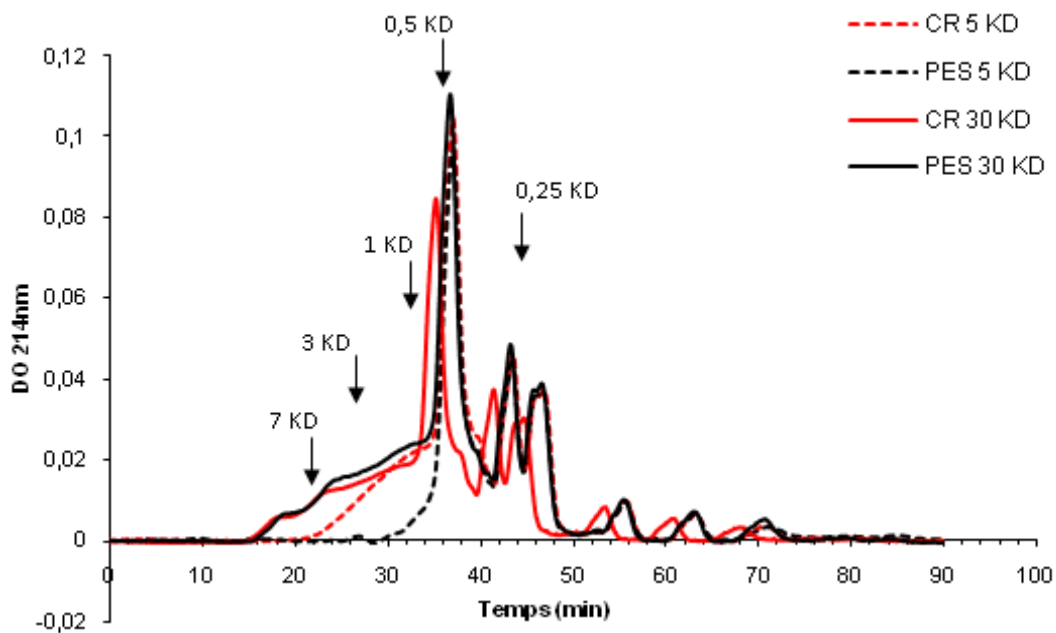


Figure III.58 : Comparaison entre les profils d'élution des perméats obtenus après fractionnement de l'hydrolysate de Pepsine sur les membranes en CR et en PES de 5 et 30 KD avec le mini-pilote Amicon.

La composition des échantillons en six classes de poids moléculaires uniformes et représentatives (> 7 ; 7-5,5 ; 5,5-3 ; 3-2 ; 2-1 ; 1-0,5 ; 0,5-0,25 ; < 0,25 kDa) est reportée sur le Tableau III.29.

Tableau III.29 : Distribution des poids moléculaires (% d'aire relative) des perméats obtenus par fractionnement sur les membranes en CR et en PES comparée à celle de l'hydrolysats initial produit par la Pepsine et non fractionné.

Classe de PM (KD)	>7	7-5,5	5,5-3	3-2	2-1	1-0,5	0,5-0,25	<0,25
Hydrolysats brut	3	1	2,5	2,4	7,3	20,6	50,1	21,8
Perméat PES 5 KD	0,1	0,0	0,1	0,1	0,3	3,5	63,9	31,0
Perméat PES 30 KD	2,8	1,1	3,1	2,7	7,2	13,5	50,7	18,5
Perméat CR 1 KD	0,0	0,0	0,1	0,3	2,8	16	65,9	14,7
Perméat CR 5 KD	0,3	0,1	0,9	1,3	5,7	13,7	56,2	21,5
Perméat CR 10 KD	0,0	0,3	1,7	2,1	7,7	17,7	59,2	13,2
Perméat CR 30 KD	4,3	1,4	3,6	2,9	8,0	17,1	49,1	12,7
Perméat CR 100 KD	4,8	1,4	3,5	2,7	7,3	14,0	50,4	15,3

D'un point de vue global, on constate que quelle que soit la membrane utilisée, les peptides de taille inférieure à 1 kDa représentent la proportion la plus importante. Une intégration plus fine des aires sous la courbe montre que le pourcentage le plus important concerne les molécules peptidiques de poids moléculaire compris entre 500 et 250 Da, suivis des molécules de taille inférieure à 250 Da, c'est-à-dire des acides aminés libres, expliquant ainsi la richesse de l'hydrolysats des viscères de seiche en acides aminés. Cette présence majoritaire de peptides de petite taille dans l'hydrolysats montre donc que le produit obtenu est très hydrolysé avec la Pepsine. Par ailleurs les populations peptidiques au-dessus de 7 kDa ou entre 7 et 5,5 kDa sont très minoritaires et leur présence est probablement due à la formation de complexes protéines-lipides. La présence d'un pourcentage très faible en peptides ayant un poids moléculaire au-dessus du seuil de coupure membranaire peut être expliquée par la capacité de certaines protéines interagir avec le matériau membranaire et à changer de forme tridimensionnelle lui permettant de passer à travers le pore membranaire de taille inférieure à la taille de la molécule protéique

En comparant la distribution des poids moléculaires dans les perméats par rapport à l'hydrolysats initial non fractionné, on remarque que pour les peptides de petite taille (< 500 Da) c'est la membrane en PES de seuil de coupure 5 kDa qui est considérée comme la plus performante vu qu'on passe d'un pourcentage d'aire de 50,1% pour la classe de 0,5 à 0,25 kDa à 64% et de 21,8% pour les peptides de PM < 0,25 kDa à 31%, soit des facteurs d'augmentation variant de 1,3 à 1,4 respectivement.

Dans cette étude, après ultrafiltration de l'hydrolysate de viscères de seiche obtenu avec Pepsine sur le mini-pilote Amicon® puis injection des échantillons de perméat et de rétentat sur la colonne de chromatographie d'exclusion stérique, nous avons déterminé le **taux de rétention par classes de poids moléculaire** (Equation III.5) et donc tracé la courbe de tamisage des membranes testées. Les résultats présentés sur la Figure III.59 montrent que d'une manière générale, pour les faibles seuils de coupure (1 et 5 kDa), les taux de rétention varient de 96,5 à 100% pour la population des peptides de 1 à 7 kDa et ce pour la membrane en PES et entre 50,6 et 100% pour les membranes en CR (1 et 5 kDa) toujours pour le même intervalle peptidique. Ces résultats étaient assez prévisibles du fait de la petite taille du pore membranaire. Toutefois, pour les peptides de taille supérieure à 7 kDa, les TR sont toujours très importants avoisinant les 100% indépendamment de la membrane testée. Quant aux molécules de taille inférieure à 500 Da, les TR sont toujours nuls du fait du passage de ces petits peptides dans le perméat. Les peptides compris entre 500 et 1000 ne sont quant à eux retenus que par les membranes de 1 kDa en CR et de 5 kDa en PES et CR.

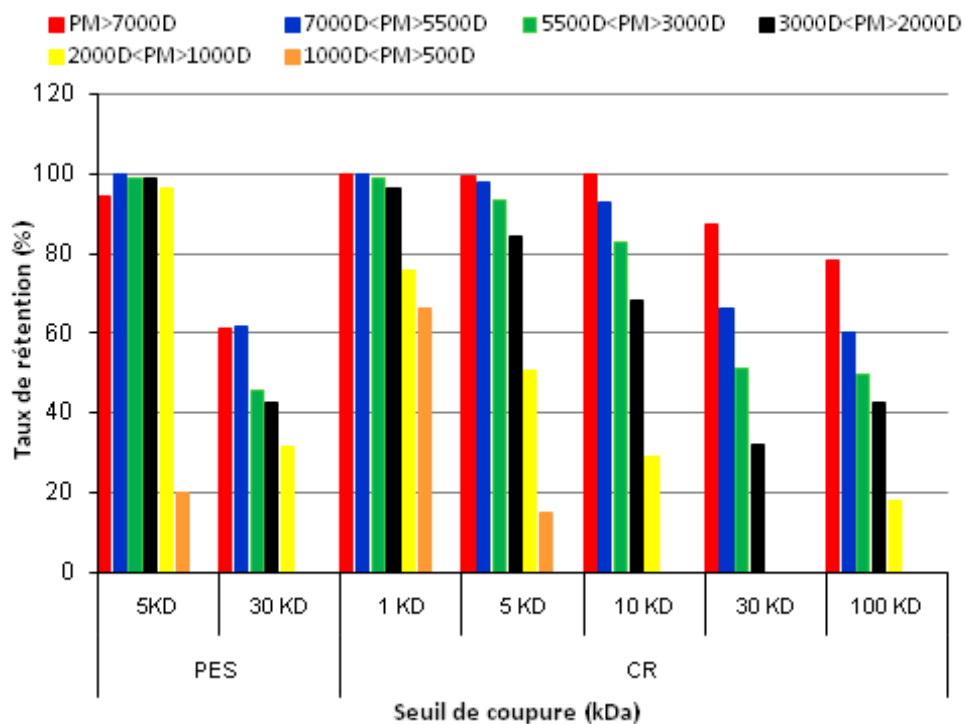


Figure III.59 : Taux de rétention calculés pour les membranes en PES et en CR testées à échelle de laboratoire, obtenus après fractionnement de l'hydrolysate de Pepsine des viscères de seiche à échelle de laboratoire.

En outre, le calcul des taux de rétention nous a permis de montrer une fois de plus que les membranes en PES montrent une meilleure rétention des moyens et les peptides de grande taille. Pour les membranes avec un seuil de coupure élevé, comme prévu les taux de rétention diminuent puisque pratiquement toutes les molécules peptidiques vont passer dans le perméat. Même les peptides de grande taille retenus ne représentent qu'un très faible pourcentage vu que dans l'hydrolysats, il n'existe pas de population ayant une taille de l'ordre de 100 kDa.

Les taux de rétentions établis pour les différentes classes de peptides nous ont permis de tracer les courbes de tamisage. Le seuil de coupure obtenu en conditions réelles de filtration est qualifié d'"apparent" (SC_a), il est défini comme étant le poids moléculaire des peptides retenus à 90%, par opposition au seuil de coupure "nominal" fourni par le fabricant de la membrane. Sur la Figure III.60, la ligne pointillée horizontale tracée au niveau du taux de rétention de 90% permet d'obtenir l'intersection avec les courbes de tamisage.

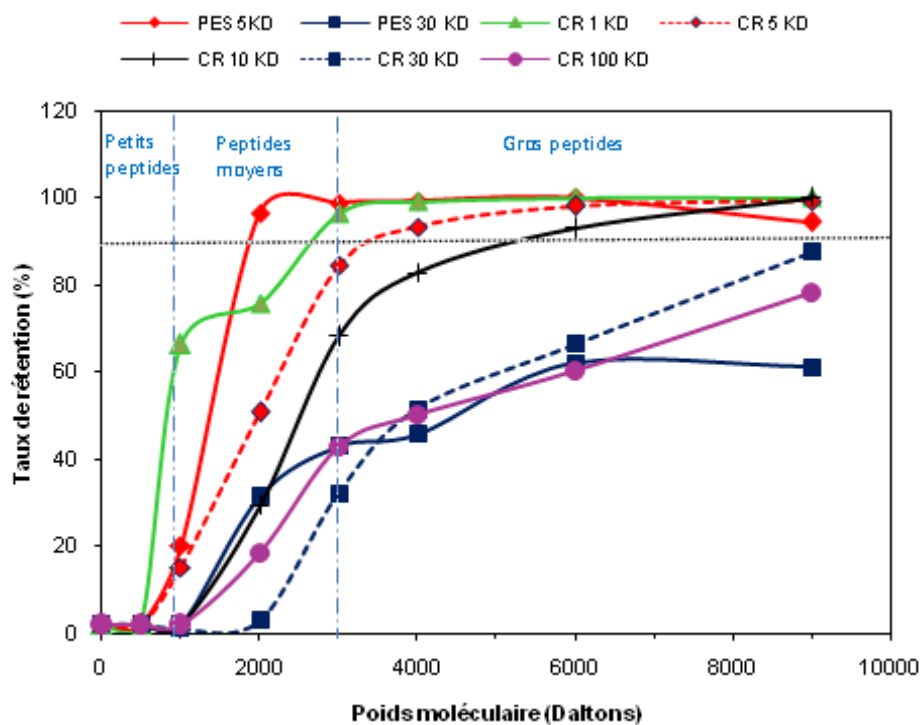


Figure III.60 : Courbes de tamisage des 7 membranes testées, obtenues après filtration de l'hydrolysats de Pepsine des viscères de seiche à échelle de laboratoire (2 bar, FRV = 4).

L'observation des courbes de la Figure III.60 présente les courbes de tamisage obtenues par SE-FPLC. La courbe de tamisage d'une membrane peut être obtenue en traçant le taux de rétention TR en fonction de la taille des solutés. L'allure de ces courbes montre que la PES 5 kDa est plus sélective que le CR 5 kDa, ceci est visible d'après la comparaison de la pente des deux courbes. D'une manière générale, les courbes de 1, 5 et 10 kDa (PES et CR) présentent

une allure similaire et différente de celle des membranes de 30 et 100 kDa où les TR sont assez faibles. Les seuils de coupure apparents déterminés à partir de l'intersection avec la ligne en pointillés (90% de rétention) et les courbes de tamisage sont regroupés dans le tableau III.30.

Tableau III.30 : Seuils de coupure apparents (rétention à 90% du soluté ciblé) des 5 membranes d'UF testées à échelle de laboratoire et obtenus d'après les courbes de tamisage.

Membrane	Seuil de coupure nominal (KD) (données fabriquant)	Seuil de coupure apparent (KD)
PES	5	1,9
	30	n.d
CR	1	2,6
	5	3,3
	10	5,3
	30	9,5
	100	n.d

n.d : non déterminé

On constate d'après ce tableau que **le seuil de coupure apparent est inférieur au seuil de coupure nominal**, sauf pour la membrane de 1 kDa en CR pour laquelle un SC apparent de 2,6 kDa a été mesuré. On observe également que des membranes de matériaux différents ayant un SC nominal identique présentent un SC apparent différent. Ceci semble indiquer que la capacité de rétention d'une membrane ne dépend pas seulement de la taille des pores et du soluté mais également des interactions soluté/membrane (Capannelli et al. 1983 – Lapointe 2004).

II.2.1.1.4 Rétention des lipides

Les dosages de lipides dans le perméat et le rétentat ont été réalisés selon la méthode de Folch et al. (1957). La rétention des lipides est représentée sur la Figure III.61. Les résultats obtenus montrent que les taux de rétention sont assez élevés surtout pour les faibles seuils de coupure de 1 et 5 kDa quel que soit le matériau membranaire. Pratiquement aucune transmission n'est observée pour à 5 kDa pour la membrane en PES. Une légère transmission (3%) est observée à 10 kDa pour la CR, et la 30 kDa en CR et en PES, avec 5% et 4% respectivement. Pour le seuil de coupure de 100 kDa, la transmission est relativement plus importante mais reste tout de même faible (10%). **On peut donc conclure que les lipides se concentrent bien dans le rétentat par UF.**

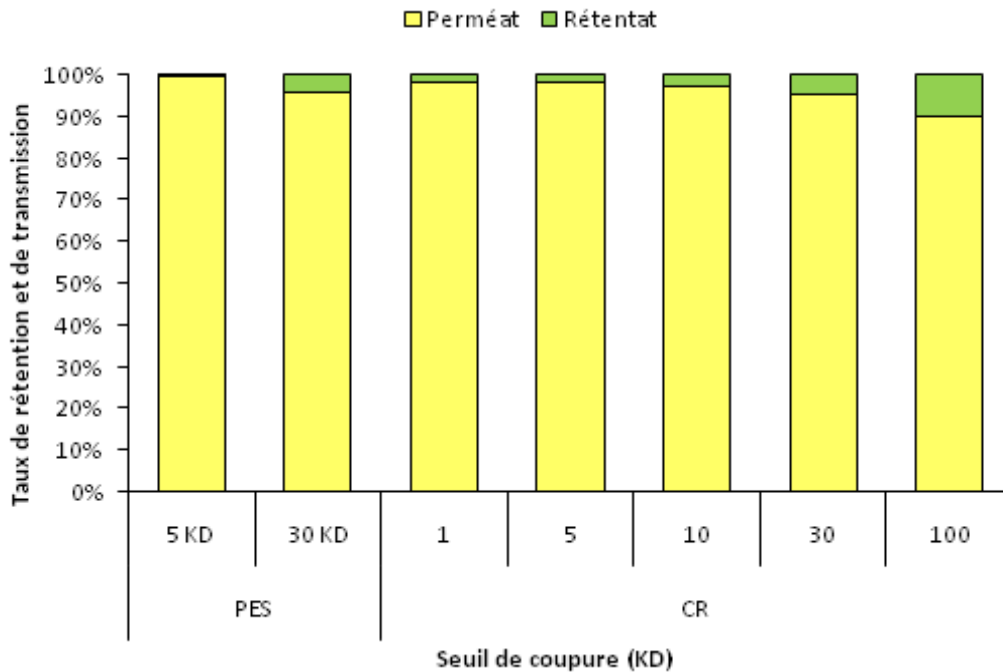


Figure III.61 : Répartition des lipides dans le rétentat et le perméat en fonction du seuil de coupure et du matériau membranaire après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de seiche sur le mini-pilote Amicon.

II.2.1.1.5 Analyse de la composition en acides aminés

La composition ainsi que les concentrations en acides aminés totaux détectés par la méthode EZ :Faast sont consignés dans le Tableau III.32. De l'analyse par GC, il ressort clairement que les perméats comportent des teneurs plus élevées en acides aminés, comme nous l'avions prévu. Il est important également de noter que les concentrations sont très élevées quelque soit le type de membrane puisqu'elles s'échelonnent de 3,116 mmole/ mg M.S à 3,896 mmole/ mg de M.S. En effet, quelque soit la membrane utilisée, le perméat est enrichi en acides aminés, notamment en AAE. Les concentrations dans les perméats sont de 5 à 10 fois (pour la membrane PES 30 kDa) supérieures à celles du rétentat, ce qui est important. Etant donnée le poids moléculaire des acides aminés (≤ 250 Da) ce résultat est valable pour tous les fractionnements vu que le plus petit SC dont nous avons disposé au cours des essais à échelle de laboratoire est de 1 kDa. D'un point de vue qualitatif, 17 AA ont été détectés, avec présence des 8 AAE. La Cystine (C-C) et l'Histidine (HIS) sont soit absents soit présents à l'état de traces et ce essentiellement pour les rétentats. D'un point de vue quantitatif, le

perméat le plus riche en acides aminés est celui issu de la filtration avec la PES 30 kDa avec une concentration de 3,869 mmole/ mg de M.S.

Les perméats obtenus suite aux fractionnements avec des membranes de bas seuil de coupure (1 et 5 kDa) comportent les taux en A.A. relativement les plus bas. A fur et à mesure que le seuil de coupure augmente, la teneur en acides aminés augmente. Ceci pourrait s'expliquer le colmatage des membranes à bas de seuil de coupure. En effet, en comparant les membranes entre elles, on constate qu'en termes de bilan massique, c'est avec les membranes de haut seuil de coupure qu'on arrive le mieux à boucler le bilan matière et à retrouver la concentration de l'hydrolysate initial obtenu à échelle pilote après hydrolyse avec la Pepsine. Par ailleurs, on constate d'après le Tableau III.31 que pour les mêmes seuils de coupure (5 et 30 kDa) c'est avec les membranes en PES qu'on obtient les teneurs les plus élevées d'acides aminés dans le perméat, mais également, en effectuant le bilan massique, c'est avec ce matériau qu'on a le moins de pertes étant donné qu'on retrouve une valeur proche de la concentration initiale de l'hydrolysate des viscères de seiches en millimoles par mg de matière sèche. Les pertes en acides aminés constatées avec les membranes en cellulose régénérée sont vraisemblablement occasionnées par une affinité des acides aminés avec la surface des membranes et donc une adhérence et parfois même une interaction entre les acides aminés entre eux (LaPointe 2003).

Pour ce qui est de l'importance des acides aminés essentiels dans les perméats obtenus par filtration membranaire, on retrouve, comme dans l'hydrolysate initial, que ces derniers constituent un pourcentage important des acides aminés totaux, variant entre 40 et 42%, ce qui est important en prenant en compte les pertes en cours de filtration. En conclusion à cette partie, on peut donc dire que ces essais préliminaires à petite échelle nous ont permis de vérifier les résultats trouvés dans la partie précédente concernant la répartition peptidique en termes de poids moléculaires, et de confirmer que le perméat est bel et bien enrichi en acides aminés. Ainsi, en utilisant des membranes de bas seuil de coupure, par exemple 5 kDa, on arrive à retenir les molécules présentant des activités biologiques (dans ce cas antibactériennes) intéressantes dans le concentrat et à obtenir un perméat valorisable pour la nutrition animale, notamment aquacole.

Tableau III.31 : Teneurs (en mmoles/mg de matière sèche) et répartition des acides aminés dans les perméats et les réténats issus du fractionnement en mode concentration de l'hydrolysate sur les membranes à échelle de laboratoire. P = 2 bar, FRV = 4. P : perméat. R : Réténat.

	Cellulose 1 KD		Cellulose 5 KD		PES 5 KD		Cellulose 10 KD		Cellulose 30 KD		PES 30 KD		Cellulose 100 KD	
	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R
ALA	0,245	0,106	0,315	0,091	0,288	0,048	0,424	0,068	0,264	0,048	0,298	0,010	0,309	0,106
ASP	0,235	0,075	0,332	0,051	0,346	0,050	0,322	0,086	0,211	0,016	0,372	0,071	0,357	0,092
GLU	0,487	0,009	0,542	0,015	0,551	0,003	0,395	0,061	0,470	0,008	0,631	0,005	0,542	0,054
GLY	0,503	0,070	0,451	0,054	0,485	0,149	0,516	0,021	0,470	0,052	0,586	0,029	0,585	0,104
HIS*	0,114	0,013	0,050	0,000	0,030	0,005	0,025	0,007	0,027	0,007	0,059	0,017	0,047	0,000
ILE*	0,158	0,013	0,185	0,017	0,161	0,092	0,277	0,006	0,153	0,086	0,255	0,005	0,167	0,062
LEU*	0,238	0,061	0,256	0,047	0,219	0,022	0,228	0,014	0,197	0,030	0,203	0,011	0,218	0,089
LYS*	0,165	0,059	0,241	0,048	0,122	0,033	0,121	0,002	0,117	0,040	0,208	0,014	0,163	0,025
MET*	0,253	0,014	0,273	0,039	0,356	0,029	0,260	0,015	0,248	0,033	0,201	0,004	0,358	0,021
ORN	0,011	0,020	0,037	0,021	0,021	0,010	0,033	0,012	0,319	0,013	0,054	0,010	0,019	0,008
PHE*	0,099	0,053	0,093	0,053	0,279	0,038	0,180	0,025	0,274	0,044	0,136	0,090	0,282	0,030
PRO	0,213	0,096	0,183	0,088	0,199	0,076	0,232	0,038	0,180	0,015	0,222	0,001	0,211	0,008
SER	0,056	0,015	0,056	0,008	0,089	0,039	0,107	0,070	0,081	0,029	0,078	0,004	0,096	0,023
THR*	0,124	0,005	0,152	0,089	0,169	0,070	0,195	0,031	0,259	0,006	0,238	0,019	0,186	0,047
TYR	0,055	0,012	0,083	0,044	0,070	0,021	0,069	0,013	0,073	0,036	0,065	0,050	0,083	0,012
VAL*	0,160	0,018	0,192	0,029	0,164	0,095	0,282	0,007	0,257	0,088	0,273	0,007	0,173	0,073
C-C	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,002	0,015	0,002	0,016	0,011	0,033	0,000
[C] Totale	3,116	0,646	3,440	0,694	3,549	0,779	3,680	0,478	3,616	0,554	3,896	0,358	3,829	0,752
% AAE	42,07%		41,86%		42,24%		42,60%		42,38%		40,38%		41,61	

*acide aminé essentiel

II.2.1.2 Activité antimicrobienne

II.2.1.2.1 Screening de l'activité antibactérienne

Les perméats et les rétentats obtenus suite aux fractionnements à échelle de laboratoire ont fait l'objet de tests antimicrobiens sur les mêmes pathogènes sur lesquels nous avons fait les essais pour la partie séparation et fractionnement par la charge, à savoir *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Lactococcus gravior*, *Micrococcus luteus* et *Vagococcus salmonarium*. Dans une étape préliminaire, l'activité d'inhibition a été estimée par la méthode de diffusion sur puits de gélose. Les résultats sont consignés dans le tableau III.32. Les diamètres des halos d'inhibition de la croissance bactérienne ont été mesurés (en mm) puis utilisés pour définir 3 catégories d'inhibition. Les essais ont été conduits en triplicats.

Tableau III.32 : Activité antimicrobienne des fractions (perméats et rétentats) issus de la filtration membranaire de l'hydrolysate des viscères de seiche contre 4 bactéries-cibles.

Fractions	<i>B.megaterium</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.gravior</i>	<i>M.luteus</i>	<i>V.salmonarium</i>	
Rétentats	PES 5 KD	+++	+++	+++	+++	+++
	PES 30 KD	+	+	+	+	+
	CR 1 KD	++	+++	++	+++	++
	CR 5 KD	++	++	+++	++	++
	CR 10	+	++	+	+	+
	CR 30	+	+	+	+	++
	CR 100	+	+	+	-	-
Perméats	PES 5 KD	-	+	+	+	-
	PES 30 KD	+	+	+	+	++
	CR 1 KD	+	+	+	+	-
	CR 5 KD	+	+	-	+	+
	CR 10	+	++	++	++	++
	CR 30	+	+	++	++	+
	CR 100	++	+	++	+++	++

(+) : diamètre < 7 mm ; (++) : 7 < Φ < 10 mm ; (+++) : Φ > 10 mm ; (-) : pas d'inhibition détectée.

D'une manière générale, on constate que les rétentats obtenus suite au fractionnement sur un bas seuil de coupure (1 et 5 kDa) sont généralement plus efficaces quelque soit la bactérie. Cependant, il est clair que l'activité antimicrobienne la plus élevée est observée pour le rétentat de la PES 5 kDa puisque pour toutes les souches, le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10 mm, ce qui traduit une concentration du pouvoir antibactérien dans cette fraction. De plus, l'activité antibactérienne est même supérieure à celle obtenue dans le rétentat de la CR 1 kDa (Tableau III.33), ce qui prouve encore une fois la meilleure sélectivité du matériau polyéthersulfone. Par ailleurs et en examinant les perméats, on

constate que ceux présentant la plus faible activité antibactérienne sont les perméats des membranes de bas SC à savoir, la PES 5 kDa et la CR 1 et 5 kDa. En effet, soit le diamètre du halo est très petit (< 7 mm), soit l'activité est totalement absente, comme c'est le cas pour *B.megaterium* et *V.salmonarium* avec la PES 5 kDa et *L.graviae* pour CR 5 kDa. A mesure que le seuil de coupure augmente, on observe un enrichissement du perméat en activité antimicrobienne. Ceci est assez logique puisque les peptides susceptibles d'engendrer une activité antibactérienne ne sont plus concentrés dans le rétentat, mais l'effet inhibiteur est partagé entre le perméat et le rétentat, ce qui explique l'existence d'une activité faible ou intermédiaire dans les 2 fractions. Par exemple pour la CR 30 kDa quelque soit la bactérie testée, les perméats et le rétentat présentent de faibles activités vu que les diamètres des disques d'inhibition ne dépassent pas 7 mm.

II.2.1.2.2 Méthode des gels recouverts

Les fractions les plus actives, à savoir les rétentats issus du fractionnement sur la membrane PES 5 kDa et CR 1 kDa et CR 5 kDa ont été analysés par la méthode des gels recouverts. La souche cible employée ici est *Bacillus megaterium* ATCC 10 778. Cette technique consiste à recouvrir un gel SDS-PAGE par la géloseensemencée avec cette bactérie et où des puits contenant les rétentats à analysés sont creusés. Les résultats sont présentés sur la Figure III.62.

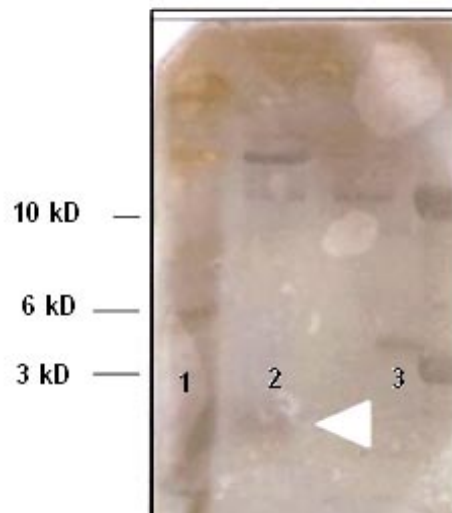


Figure III.62 : Gel SDS-PAGE recouvert d'une géloseensemencée avec *B.megaterium*. Puits : 1. Rétentats PES 5 kDa, 2. Rétentat CR 1 kDa, 3. CR 5 kDa.

D'après cette figure, une zone d'inhibition peut être observée pour ces trois échantillons, essentiellement le rétentat de la PES 5 kDa. Le poids moléculaire est estimé entre 3 et 5 kDa. **Cette donnée nous fournit une raison supplémentaire pour utiliser les membranes en PES et plus particulièrement un seuil de coupure entre 1 et 5 kDa pour le reste de l'étude.** Ce résultat vient donc confirmer notre choix préliminaire quant aux membranes à utiliser pour le fractionnement à échelle pilote.

II.2.1.3 Discussion

Le but de ces essais préliminaires à échelle du laboratoire était de sélectionner le seuil de coupure et le matériau adéquat pour le fractionnement de l'hydrolysate des viscères de seiche obtenu avec la Pepsine à échelle pilote. Pour cela nous avons évalué l'influence du matériau membranaire et du seuil de coupure sur les flux de perméation et la sélectivité du fractionnement de l'hydrolysate ($C_0=100 \text{ g.L}^{-1}$) en observant le comportement du produit avec le matériau membranaire et en analysant la composition biochimique du perméat et du rétentat. **Le suivi des flux de perméation à l'eau avant et après passage de l'hydrolysate ont montré une bonne régénération (>90%) des membranes** en effectuant simplement un rinçage à l'eau et un nettoyage mécanique à l'aide d'un pinceau souple pour éliminer les particules. Ceci montre donc que l'hydrolysate s'avère peu colmatant. En effet avant fractionnement de l'hydrolysate les précautions prises (centrifugation et filtration sur verre fritté) ont été bénéfiques pour prévenir les problèmes de colmatage. **Cependant, le suivi des flux de perméation ont permis de mettre en évidence que les membranes en PES présentent de bien meilleures performances.** Comme nous l'avons déjà constaté lors du suivi de la perméabilité hydraulique des membranes, le matériau a un effet majeur sur les flux. Pour un même seuil de coupure, la membrane en PES 5 kDa possède un flux de perméation ($11,25 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) plus élevé que celui obtenu avec la membrane en CR. La membrane en PES serait donc plus perméable que celle en CR et différeraient pas leur degré d'hydrophobie. D'après Wavhal et Fisher (2005), les surfaces hydrophiles présentent habituellement une perméabilité plus élevée que les surfaces hydrophobes. **On en déduit donc dans notre étude que la membrane de 5 kDa en PES semble plus hydrophile que les membranes en CR testées.** Les travaux rapportés dans la littérature montrent que les membranes en PES sont hydrophiles ($\theta < 90^\circ$), θ étant l'angle de contact entre la membrane et une goutte d'eau (Zhang et al. 1989), mais que cette hydrophilie relative varie selon les auteurs (Cheryan 1998 - Sethuraman et Belfort 2005). De telles différences s'expliquent

essentiellement par les techniques de production, la taille des pores et la rugosité de surface (Gekas et al. 1992).

Les résultats obtenus dans cette étude pour les membranes en PES ne sont pas du même ordre de grandeur que ceux présentés dans le travail de Chabeaud (2008). En effet, pour des seuils de coupure des membranes en PES très proches des nôtres (4 et 9 kDa) et à une pression de 2 bars, les résultats obtenus par cet auteur sont des flux de 16 L/h.m² pour la membrane en PES 4 kDa et de 41 L/h.m² pour la membrane en PES de 9 kDa. Toutefois, il est important de noter que dans le travail de Chabeaud (2008) la concentration initiale C_0 est de 5 g/L⁻¹, soit 20 fois moins importante que la concentration initiale dans l'hydrolysate objet de notre étude, et que la température de fractionnement est de 60°C contre 20 à 22°C (température ambiante) dans notre cas, ce qui joue considérablement au niveau des flux. Ainsi, on peut mettre en évidence que les flux obtenus dans cette étude sont très corrects malgré une basse température opératoire basse et un hydrolysate à 10% de matière sèche. Les travaux de Jaouen (1989) ont toutefois démontré qu'à seuil de coupure très proche, les membranes en PES sont moins perméables que celles en PES modifié. Ces matériaux différencieraient donc uniquement par leur degré d'hydrophobie vu qu'elles appartiennent à la même famille chimique structurale (Boussu et al. 2006 – Kim et al. 2002). **Ainsi, un seuil de coupure élevé n'est pas le seul critère permettant d'obtenir une perméabilité hydraulique élevée, le type de matériau doit également être considéré lors du choix de la membrane.**

Les taux de rétention globaux ont été calculés à partir des chromatogrammes en effectuant le rapport des aires sous la courbe du perméat et du rétentat correspondants. Tout d'abord, on a pu constater que les taux de rétention sont élevés sauf pour la 30 et la 100 kDa en CR où on observe un taux de transmission relativement important mais qui reste quand même supérieur à 70 %. Ces valeurs sont en accord avec celles préconisées par Vandanjon et al. (2007) qui conseillent l'utilisation des membranes présentant des TR autour de 80% pour le fractionnement des hydrolysats peptidiques. Pour les matériaux identiques on observe une augmentation des taux de rétention lorsque le seuil de coupure diminue. Les TR dépendent également du matériau utilisé et dans cette étude, les membranes en PES présentent une rétention plus élevée que celle en CR. Des résultats similaires ont été rapportés dans le travail de Dumay (2006).

Les profils d'élution ainsi que la distribution en poids moléculaires des peptides (en % d'aire relatif) ont montré que les membranes de faible seuil de coupure (1, 5 et 10 kDa) sont bien appropriées au fractionnement d'un hydrolysate de taille inférieure à 7 kDa. Le seuil de coupure de 5 kDa semble le plus approprié **prenant en compte les objectifs de valorisation fixés dans cette étude, à savoir séparer la fraction valorisable de point de vue alimentaire et la fraction antimicrobienne** et ce en obtenant un perméat riche en petits peptides et en concentrant l'activité inhibitrice. En effet d'après la littérature, l'activité biologique des peptides varie selon le poids moléculaire (Jeon et al. 1999 – Guérard et al. 2001 – Guérard et al. 2002) et pour les peptides antimicrobiens, le PM varie entre 5 et 7 kDa (Bachère et al. 2000 - Destourmieux et al. 2000a,b – Pernice et al. 2007)

Cependant pour ces 3 seuils de coupure, on estime que la discrimination de la composition pour les différents perméats reste plus faible que celle espérée. Deeslie et Cheryan (1991) rapportent n'observer aucune différence de profil entre les perméats obtenus après ultrafiltration d'un hydrolysate de protéines de soja sur des membranes de 5 et 10 kDa. Cette observation pourrait être expliquée d'une part par la présence d'interactions peptides-peptides à l'intérieur de l'hydrolysate, ce qui limiterait l'efficacité du fractionnement, c'est-à-dire la discrimination entre des peptides présentant de faibles différences de taille (LaPointe 2004 – Groleau 2003) et d'autre part par les incertitudes sur la valeur du seuil de coupure déterminées par le fabricant (Cheryan 1998).

Les courbes de tamisage obtenues par SE-FPLC présentent une allure moins régulière que la courbe de tamisage théorique. Dans la littérature, toutes les méthodes référencées sur la détermination de la courbe de tamisage des membranes se basent sur des molécules de dextran ou de polyéthylène glycol dont la géométrie est éloignée des structures plus ou moins linéaire des peptides. Ces irrégularités apparaissent comme indépendantes des paramètres appliqués. En effet dans des travaux de Chabeaud (2008) il a été démontré que les courbes de tamisage pour une membrane en 4 kDa en PES sont irrégulières jusqu'à 5 bars. Les irrégularités observées pourraient provenir de la méthode chromatographique. Une des hypothèses émises serait liée au retard d'élution observé en SE-FPLC pour les molécules de taille inférieure à 300 Da et attribué aux interactions hydrophobes ou électrostatiques établies entre les acides aminés libres et les petits peptides et la phase stationnaire de la colonne (Gilmartin et Jervis 2002 – Smyth et Fitzgerald 1997). Dans notre étude, tous ces phénomènes ont été pris en compte, de nombreuses précautions ont été prises pour préserver la méthode

chromatographique (filtration des échantillons, nettoyage régulier de la colonne). En outre l'injection de l'hydrolysate peptidique des viscères de seiche avant chaque série d'analyse a permis de confirmer la reproductibilité des échantillons. L'autre hypothèse avancée est la faible absorbance (<0,2 nm) des perméats utilisés pour la détermination des courbes de tamisage. Une autre explication serait que l'allure des courbes de tamisage serait due à l'effet de la distribution hétérogène de taille de pores.

La détermination des courbes de tamisage nous a également permis de déterminer des seuils de coupure apparents qui sont de plus souvent inférieurs au seuil de coupure nominal annoncé par le fabricant. De tels résultats ont été rapportés par d'autres auteurs qui ont montré que la détermination du SC dépend (i) de la molécule modèle utilisée (dextran, polyéthylène glycol,...), (ii) des conditions opératoires et (iii) du fabricant de la membrane (Cheryan 1998 - Boussu et al. 2006). Aussi, on a observé que des membranes, de matériaux différents ayant un SC nominal identique ont un SC apparent différent. Ceci nous ramène encore une fois au fait que la capacité de rétention d'une membrane ne dépend pas seulement de la taille des pores et du soluté mais également des interactions pouvant exister entre le produit à fractionner et la membrane.

CONCLUSION

La conduite de ces essais préliminaires nous permet de conclure que les membranes en PES ont montré une rétention quasi-totale des lipides et une transmission relativement faible des peptides de taille moyenne et de grande taille. Cette rétention est importante pour les peptides de taille variant autour de 5 kDa et qui correspond à ceux présentant une activité antimicrobienne. En effet, les tests d'inhibition bactérienne ont montré une activité concentrée surtout dans le perméat. Par ailleurs la transmission aisée obtenue peut être expliquée par le fait que les peptides générés par les hydrolyses enzymatiques sont de très petite taille, avec une bonne proportion d'acides aminés.

A ce stade, le choix du seuil de coupure et du matériau peut être envisagé. **En effet, l'objectif est d'obtenir un perméat riche en oligopeptides et en acides aminés pour une valorisation nutritionnelle potentielle et de concentrer l'activité antibactérienne. Pour cela, la membrane en PES 5 kDa semble la mieux adaptée.** L'utilisation de cette membrane présente également l'avantage de retenir la quasi-totalité des lipides, fraction tout aussi intéressante pour la valorisation alimentaire.

L'objectif fixé ici est donc en partie atteint puisque la membrane en PES 5 kDa possède les caractéristiques intéressantes pour une séparation efficace des peptides de bas et de haut poids moléculaire et donc des deux voies de valorisation ciblées dès le début, à savoir la valorisation

nutritionnelle et l'obtention d'un produit aux propriétés antibactériennes. Par ailleurs, les acides aminés et petits peptides et les lipides ont été séparés et nous avons pu concentrer l'activité antibactérienne, montrant que nous avons pu obtenir à la fin du procédé deux fractions valorisables séparément. Ces résultats sont maintenant à confirmer et à vérifier à grande échelle. De plus, les performances obtenues avec la membrane en PES 5 kDa – à savoir retenir presque totalement les gros et moyens peptides tout en restant fortement perméable aux petits peptides – sont obtenues à une pression de 2 bar, ce qui est intéressant en termes de coûts énergétiques.

II.2.2 Essais de filtration membranaire à échelle pilote

Le but de cette partie est d'évaluer le comportement de la membrane d'UF en PES de seuil de coupure 5 kDa à échelle pré-industrielle sur le pilote Microlab 40. Pour cela, nous avons choisi deux membranes tubulaires film composite la MT44 (ES 404) en PES et la XP 117 (MT 117) en PES greffée. Les deux membranes possèdent un seuil de coupure de 4 kDa. Le principe de cette partie expérimentale est de voir si l'on peut comparer la petite membrane disque en PES 5 KD du mini-pilote Amicon avec la tubulaire 4 kDa et donc de conclure quant à la possibilité de transposition du procédé à grande échelle pré-industrielle et établir, ultérieurement une méthodologie de changement d'échelle quant à l'architecture du procédé.

Pour cela une hydrolyse supplémentaire dans le grand réacteur (8 kg de "viscères noires" + 8 L d'eau) a été réalisée pour la production, proprement dite de l'hydrolysate à fractionner. En effet, lors de la première hydrolyse à grande échelle, des prélèvements ont dû être réalisés afin de caractériser biochimiquement l'hydrolysate de Pepsine à fractionner. A la fin de l'hydrolyse et après centrifugation, on récupère à peu près 12 litres de surnageant d'une concentration $C_0 = 201,14 \text{ g.L}^{-1}$.

La pression maximale d'utilisation des deux membranes ES 404 et XP 117 est de 15 bars. Cependant et afin de rester dans les mêmes conditions que celles utilisées à petite échelle et afin de rendre les procédés comparables, nous avons appliqué une pression de 5 bars, pression minimale applicable sur le pilote Microlab 40. Tous les fractionnements ont été réalisés à une température de 25°C et avec un facteur de réduction volumique $FRV = 4$. Le choix de ce FRV est conditionné par le fait que la "durée de concentration" induit un accroissement des phénomènes d'adsorption à la surface et dans les pores de la membrane. Ce paramètre a été vérifié dans les travaux de Chabeaud (2008) ayant étudié l'influence du FRV . En utilisant une membrane de 4 kDa également, cet auteur a conclu que les phénomènes d'adsorption, sont renforcés par la compaction de la couche de polarisation sous l'effet de la

pression. Ainsi, et afin de limiter les pertes de flux trop importantes et une diminution de la nettoyabilité de la membrane, il vaut mieux ne pas dépasser un FRV de 4.

II.2.2.1 Tests d'adsorption

D'une manière générale, une **membrane efficace doit remplir simultanément 3 conditions principales : flux élevé et stable, bonne sélectivité vis-à-vis de l'espèce cible et bonne régénérabilité**. Ainsi, nous avons choisi comme première étape de cette étude à déterminer laquelle entre les deux membranes testées est la plus performante par des tests d'adsorption (Jaouen 1989) et plus loin par le suivi de l'ultrafiltration de l'hydrolysate des viscères de seiche (c.f. paragraphe II.2.2.2).

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.

Ainsi, 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 :

$$J_a = (N \cdot \pi) \left(\frac{(r - \Delta r)^4}{8\eta} \right) \left(\frac{PTM}{\Delta x} \right) \quad \text{Equation III.6}$$

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)

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. Ainsi, 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 :

$$\frac{\Delta r}{r} = 1 - \left(\frac{J_a}{J_o} \right)^{0,25} \quad \text{Equation III.7}$$

Les résultats obtenus pour un temps d'adsorption de 12 heures en conditions statiques (sans pression, donc sans perméation) à une température de 15°C sont exprimés dans le Tableau III.33 Ici et afin de rester fidèles aux appellations données précédemment le J_o de l'équation sera appelé J_i .

Tableau III.33 : Flux à l'eau des membranes avant et après 20h d'adsorption et réduction du rayon de pore correspondant.

Membrane	J_i (L/h.m ²)	J_a (L/h.m ²)	Réduction du rayon de pore $\Delta r/r(\%) = 1-(J_a/J_i)^{0,25}$
XP 117	612,41	222,06	22,4 %
ES 4040	216,97	98,24	18 %

J_i : Flux à l'eau initial avant adsorption à $\theta = 25^\circ\text{C}$ et $PTM = 15$ bars.

J_a : Flux à l'eau à après adsorption $\theta = 25^\circ\text{C}$ et $PTM = 15$ bars.

Le flux à l'eau le plus élevé avant adsorption est obtenu par la membrane XP 117 (612,41 L/h.m²). Après 12 h de contact avec l'hydrolysate, la membrane ES404 fait preuve d'une plus faible adsorption. En effet l'épaisseur relative de la couche adsorbée est de l'ordre de 18 % alors qu'elle est de 22,4% pour la XP 117. Les flux sont nettement moins importants après ces 12 h de contact. Pour la membrane XP117, la réduction du flux après 12h d'adsorption est de 63% alors qu'elle est de 54% pour la ES 404. L'explication à cette différence d'affinité avec les protéines peut être expliquée d'une part par la différence de matériau (PES et PES modifié) et d'autre part par une différence dans la géométrie ou la disposition des pores ou bien dans la charge des membranes (cationique ou anionique). Ce résultat va être confirmé plus tard (c.f paragraphe II.2.2.2) avec les flux à l'eau obtenus après filtration de l'hydrolysate.

II.2.2.2. Ultrafiltration de l'hydrolysats

La Figure III.63 illustre l'évolution des flux de perméat au cours du temps obtenus lors de la filtration en mode concentration (FRV = 4) de l'hydrolysats des viscères de seiche en fonction du temps. La pression appliquée ici est de 5 bar et la température est de 25°C. La durée de la filtration est de 6 heures pour la XP 117 et de 8 heures pour la ES 404. Pour chacune des 2 membranes, le flux de perméation est mesuré toutes les minutes. Les deux courbes présentent la même allure : le flux diminue au cours temps du fait de l'accumulation de substances colmatantes (protéines, lipides) au niveau de la membrane.

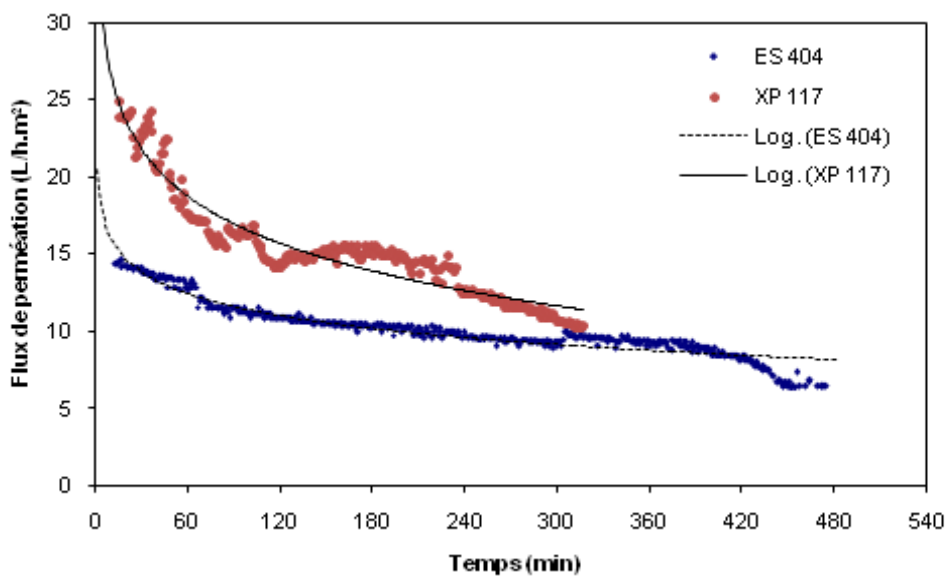


Figure III.63 : Evolution du flux de perméat de l'hydrolysats des viscères de seiche en fonction du temps fractionné avec les membranes XP117 et ES 404 à 25°C et à P = 5 bar s en mode concentration FRV = 4. L'hydrolysats est obtenu avec la Pepsine à échelle pilote (pH 2, 45°C) pendant 2heures.

En observant les deux graphiques, on constate tout d'abord qu'il y a une différence dans les flux de perméation de l'hydrolysats entre les deux membranes. En effet, les flux de la XP 117 sont sensiblement plus élevés que ceux de la ES 404. Pour la ES 404 que le flux commence avec une valeur de 24,9 L/h.m² et baisse d'une manière importante durant la première heure de l'ultrafiltration pour se stabiliser plus ou moins au bout de 90 min, en diminuant très légèrement. La baisse des flux reprend en fin de filtration vers la 420^{ème} minute pour atteindre en fin de filtration 10,41 L/h.m². Ceci montre vraisemblablement l'existence d'un colmatage primaire ayant lieu en début de fractionnement et d'un colmatage secondaire, vers la fin. Pour la membrane XP117, la baisse est beaucoup régulière et surtout beaucoup plus marquée que pour la ES 404. Les premiers flux de perméat commencent avec une valeur

14,4 L/h.m² et se terminent à 7,84 L/h.m². Ainsi, la baisse enregistrée est de 45% pour la membrane ES404 et de presque 60% pour la XP 117.

II.2.2.3 Suivi des flux de perméation et régénération des membranes

Le tableau III.34 regroupe les flux de perméation à l'eau calculés après la procédure de nettoyage base-acide initiale et avant l'ultrafiltration de l'hydrolysate et après passage de l'échantillon et nettoyage identique au précédent. Les flux obtenus en fin de filtration de l'hydrolysate sont également présentés. Pour les essais préliminaires à petite échelle, étant donné que les flux de perméation lors du passage de l'hydrolysate ne varient pas beaucoup, nous avons noté la moyenne des flux, surtout que la durée de la filtration est assez courte. Dans le cas des essais à échelle pilote, nous avons pris en considération le flux à la fin de l'hydrolyse. La surface membranaire pour les deux membranes est de 0,033 m². Les flux de perméation à l'eau pure ont été mesurés à une pression de 15 bar.

Tableau III.34 : Flux de perméation avant, pendant et après ultrafiltration de l'hydrolysate des viscères de seiche à 5 et 15 bar et à 25°C.

Membrane	XP 117	ES 404
J_i (L/h.m ²)	612,41	216,97
J (L/h.m ²)	10,41	7,84
J_0 (L/h.m ²)	80,32	47,74
J_f (L/h.m ²)	458,9	156,17
Taux de régénération	75%	72%

J_i : Flux à l'eau initial à $\theta = 25^\circ\text{C}$ et $PTM = 15$ bar

J : Flux moyen de l'hydrolysate à $\theta = 25^\circ\text{C}$ et $PTM = 5$ bar

J_0 : Flux à l'eau après passage de l'hydrolysate à $\theta = 25^\circ\text{C}$ et $PTM = 15$ bar

J_f : Flux à l'eau final après filtration de l'hydrolysate et nettoyage à $\theta = 25^\circ\text{C}$ et $PTM = 15$ bar

D'une manière générale, les cycles de nettoyage sont composés d'un nettoyage alcalin suivi d'un nettoyage acide. En effet, comme nous l'avons précisé dans la partie matériel et méthodes, avant de commencer la filtration de l'hydrolysate, une préparation de la membrane s'impose selon les conditions préconisées par le fabricant et se déroule en 2 étapes majeures : lavage avec l'Ultrasil 11 à 3g/L pendant 30 min à 45°C suivi d'un rinçage à l'eau distillée et lavage à l'acide nitrique (HNO₃) à 3mL/L pendant 20 min à 30°C suivi également d'un rinçage à l'eau distillée. La Figure III.64 présente l'évolution des flux de perméation à l'eau calculés après conditionnement alcalin et acide, ultrafiltration de l'hydrolysate et nettoyage également alcalin et acide après l'essai des membranes XP 117 et ES 404. On peut constater à

première vue c'est que les flux à l'eau pour la XP 117 sont toujours supérieurs à ceux de la ES 404 et ce quelque soit la phase du cycle de filtration. En effet, le flux initial à l'eau (J_i) de la XP 117 est 3 fois supérieur à celui de la ES 404. Ce facteur de 3 se maintient pour toutes les autres étapes à savoir, pour les flux directement mesurés après passage de l'hydrolysate (J_0) et aussi pour les flux à l'eau calculés après la procédure de nettoyage (J_f). Ce résultat est probablement dû à une différence de la densité des pores.

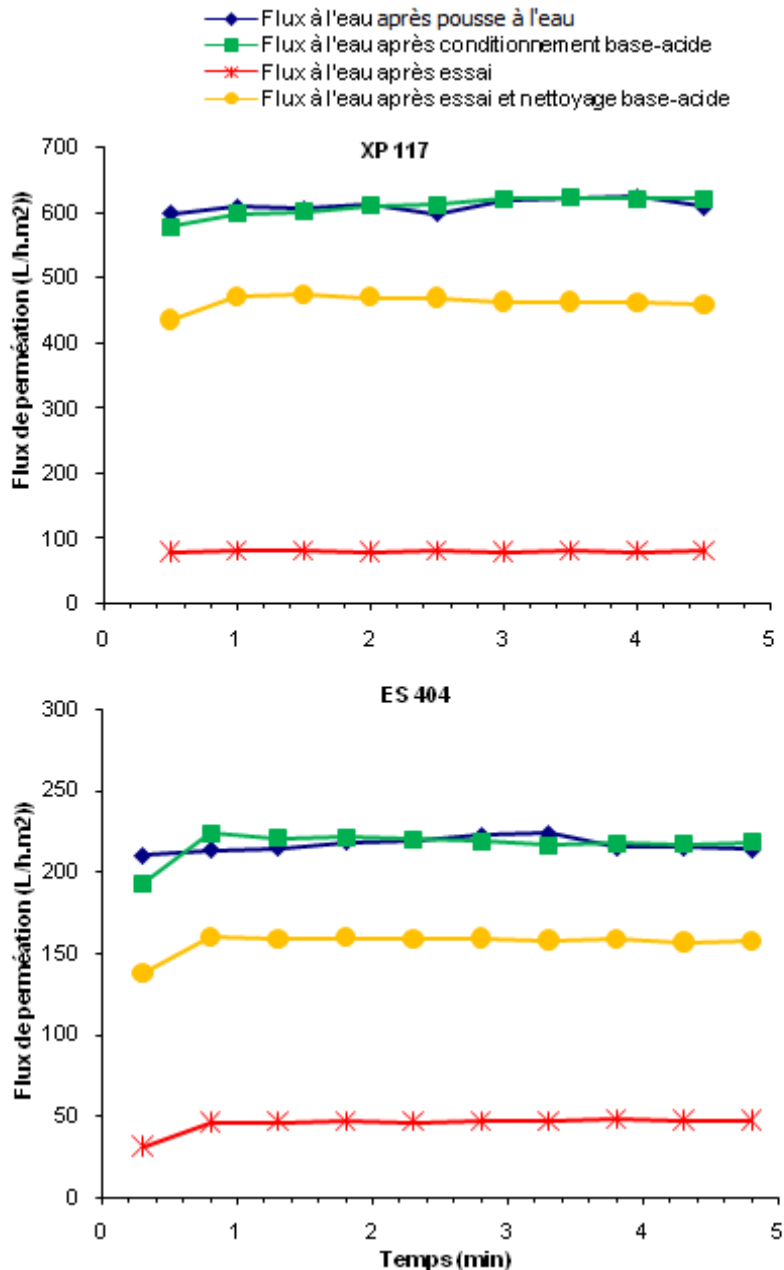


Figure III.64 : Evolution des flux de perméat à l'eau obtenus après chaque étape du cycle de filtration en fonction du temps avec un PTM = 15 bar et à 25°C pour les membranes XP 117 et ES 404.

Après filtration de l'hydrolysate des viscères de seiche, le flux de perméat diminue d'une manière importante, il passe de 621,5 L/h.m² (après nettoyage alcalin et acide) à 80,32 L/h.m² pour la membrane XP 117 et de 219,22 L/h.m² à 47,74 L/h.m² pour la ES 404, soit des taux de diminution de 87% et de 78% respectivement. Après la procédure de nettoyage préconisée par le fabricant, les flux à l'eau remontent jusqu'à 458 L/h.m² et 156,17 L/h.m², soit des taux de régénération de 75 et de 72% respectivement.

Dans le tableau ci-dessus (Tableau III.35), le taux de régénération présenté est celui calculé à la fin d'un cycle. Cependant, dans cette étude, les taux de régénération ont aussi été déterminés à la fin de chaque procédure de nettoyage en calculant le flux de perméation à l'eau distillée. Sur la Figure III.65, les flux de perméation à l'eau pure sont mesurés après chaque étape de nettoyage (passage d'acide ou de base).

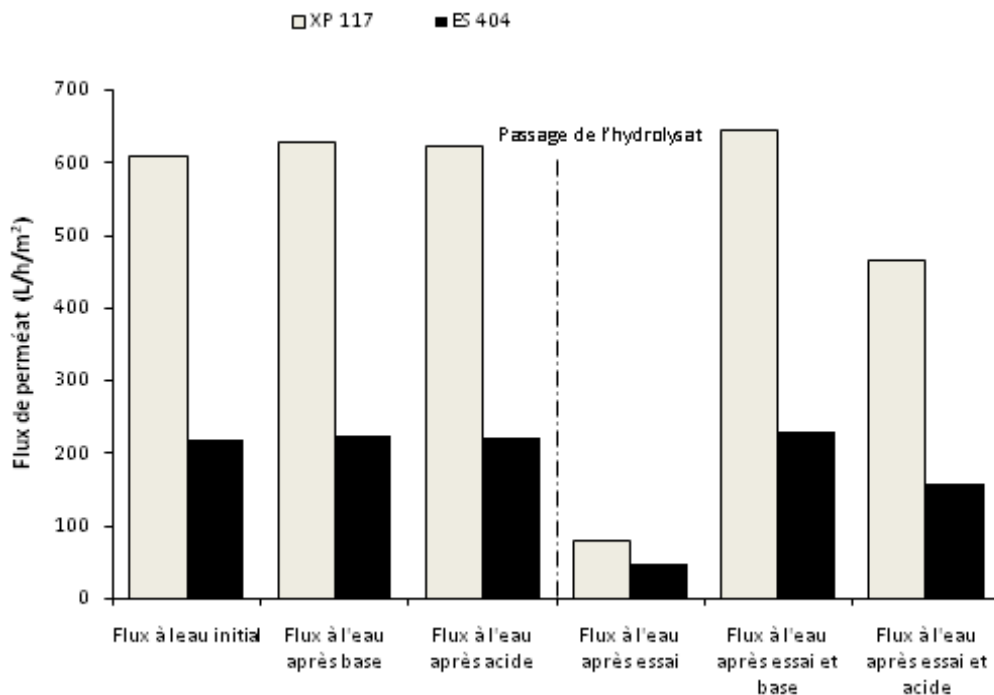


Figure III.65 : Flux de perméat à l'eau obtenus après passage de l'échantillon d'hydrolysate et après chaque étape de la procédure de nettoyage avec un PTM = 15 bar et à 25°C pour les membranes XP 117 et ES 404.

Cette figure nous permet de constater qu'à la suite de la filtration de l'hydrolysate et du nettoyage avec Ultrasil™ comme agent alcalin, aussi bien pour la membrane XP 117 que la ES 404, nous obtenons des flux de perméation à l'eau égaux voir supérieurs (pour la XP 117) à ceux initialement calculés avant passage de l'échantillon. L'apparent resserrement des pores observé serait dû à l'effet de l'acide. Toutefois, la procédure classique préconisée par le

fabricant implique un nettoyage à l'acide nitrique afin de neutraliser le milieu et de ne pas influencer la composition de l'échantillon à filtrer. Dans cette étude et après nettoyage acide, les taux de régénération diminuent pour les deux membranes (Figure III.65). Ainsi dans ce cas, les procédures classiques ne semblent donc pas être efficaces pour restaurer les caractéristiques initiales de la membrane et nous avons donc un certain colmatage qui s'instaure. Un nettoyage plus drastique aurait alors pu être envisagé en augmentant par exemple la concentration en réactif, la température et le temps de contact. Cependant d'après de précédents travaux (Dumay et al. 2006), l'augmentation du taux de régénération ne dépasse pas les 5% par rapport à ce qu'on a trouvé dans cette étude et ne justifie en aucun cas des dépenses énergétiques plus importantes, une perte de temps et une consommation supplémentaire de réactifs. Ainsi, vu que les résultats des régénérations obtenus dans cette étude demeurent acceptables, nous avons préféré nous conformer aux conditions de nettoyage classiques.

II.2.2.4 Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques (perméat et rétentat) ont été réalisées sur l'hydrolysate obtenu à échelle pilote avec la Pepsine après filtration de 6 h de ce dernier sur la XP 117 et au bout de 8 h de filtration sur la ES 404. Avant de calculer les taux de rétention relatifs des peptides et de dresser les courbes de tamisage, nous avons vérifié que les bilans de matière étaient équilibrés pour chaque fractionnement, c'est-à-dire que les volumes et la quantité de matière (protéines et lipides) étaient récupérés à la fin de l'essai. En effet, il peut y avoir, au cours de la filtration plusieurs sources d'erreurs, en particulier l'adsorption de la matière à la surface de la membrane ou des canalisations. Nous avons déjà précisé que l'adsorption membranaire obtenue en conditions statiques pouvait être majorée de 7 à 35% dans les conditions de filtration réelles, ceci étant dû à l'application de la pression. Comme autres sources d'erreurs, il y a aussi la présence de matière dans le volume mort. Ici et à la fin de l'expérience, la majorité du volume mort peu être récupérée mais il reste toujours un petit volume de rétentat dans les tuyaux ou dans le corps de la pompe d'à peu près 160 mL.

Les bilans de matière obtenus pour les 2 essais de concentration sont présentés dans le Tableau III.35.

Tableau III.35 : Bilans de matière : taux de récupération des volumes et de la matière (peptides, lipides) après filtration de l'hydrolysats des viscères de seiche en mode concentration sur les membranes XP 117 et ES 404.

XP117			
	Volumes (mL)	Masse protéique (g)	Masse lipidique (g)
Hydrolysats	$V_i = 4000$	$m_i = 804,56$	$m_i = 5,2$
Rétentat	$V_r = 920$	$m_r = 470$	$m_r = 5,03$
Perméat	$V_p = 3025$	$m_p = 269$	$m_p = 0,04$
Produit final	$V_f = 3945$	$m_f = 739$	$m_f = 5,07$
Taux de récupération (initial/final)	98,62 %	91,85 %	97,5 %
ES404			
Hydrolysats	$V_i = 3800$	$m_i = 764,33$	$m_i = 4,94$
Rétentat	$V_r = 921$	$m_r = 449,32$	$m_r = 4,84$
Perméat	$V_p = 2850$	$m_p = 301$	$m_p = 0,03$
Produit final	$V_f = 3771$	$m_f = 750,33$	$m_f = 4,87$
Taux de récupération (initial/final)	99,23 %	98,16 %	98,58 %

D'après le tableau ci-dessus, on constate qu'en termes de volume récupéré en fin de filtration, les bilans matière bouclent généralement et ce quelle que soit la membrane, en effet la perte est inférieure à 5%. Pour ce qui est des bilans en termes de masse, on remarque qu'ils bouclent mieux sur la membrane ES 404 (perte inférieure à 5%) et ce pour les peptides et les lipides. Pour ce qui est de la masse lipidique, elle est généralement bien récupérée indépendamment de la membrane utilisée. Les bilans de récupération de la masse confirment le colmatage plus prononcé de la XP 117, constaté lors du suivi des flux de perméation de l'hydrolysats.

Les concentrations et teneurs en protéines et lipides sont exprimées en g/L et consignées dans le Tableau III.36.

Tableau III.36 : Charge en peptides et en lipides dans les différentes fractions (rétentat et filtrat) obtenues après ultrafiltration de l'hydrolysate des viscères de seiche sur les membranes XP 117 et ES 404 à (25°C, PTM = 5 bar), avec un FRV = 4.

Echantillons	Protéines g/L	Lipides g/L
Hydrolysate	201,14 ± 5,13	1,3 ± 0,1
Perméat XP 117	88,92 ± 1,4	0,01 ± 0,00
Rétentat XP 117	510,86 ± 11,2	5,46 ± 0,2
Perméat ES 404	105,61 ± 2,1	0,01 ± 0,00
Rétentat ES 404	487,87 ± 10,3	5,26 ± 0,02

La charge protéique, initialement de 201,14 ± 5,13 g/L passe à 510,86 ± 11,2 g/L avec la XP 117 et à 487,87 ± 10,3 g/L avec la ES 404 dans le rétentat, Pour les lipides, la teneur initiale de 1,3 ± 0,1 g/L passe dans le rétentat à 5,26 ± 0,02 g/L et 5,46 ± 0,2 g/L respectivement pour la ES 404 et la XP 117, soit un facteur de concentration de 4 pour les 2 membranes, ce qui est logique car le FRV est de 4 et la rétention des lipides est quasi-totale.

Il est alors important d'écrire le bilan de conservation de la masse suivant afin de comprendre la répartition des lipides et peptides après filtration :

$$V_i.C_i = V_p.C_p + V_r.C_r + pertes \quad \text{Equation III.8}$$

Avec :

V_i : volume initial (L)

C_i : concentration initiale en solutés (g/L)

V_r : volume du rétentat (L)

C_r : concentration des solutés dans le rétentat (g/L)

V_p : volume du perméat (L)

C_p : concentration des solutés dans le perméat (g/L)

A partir de cette relation, le taux de rétention (%) au bout de 6 h de filtration (pour XP 117) et 8 h (pour ES 404) des constituants (peptides et lipides) peut être calculé comme suit :

$$\text{Taux de rétention (\%)} = [(V_i.C_i) - (V_p.C_p)]/V_i.C_i.100 \quad \text{Equation III.9}$$

Les taux de rétention obtenus sont consignés dans le Tableau III.37.

Tableau III.37 : Taux de rétention des protéines et des lipides pour chaque membrane après une ultra filtration de l'hydrolysate Pepsique des viscères de seiche en mode concentration (FRV = 4). $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, PTM = 5 bar.

Membrane	Taux global de rétention (%) des peptides	Taux global de rétention (%) des lipides
XP 117	66,5	96,6
ES 404	60,6	99,4

Les résultats ci-dessus indiquent qu'une d'une manière générale, les lipides sont concentrés dans le rétentat puisqu'une rétention quasi totale des lipides est observée (96 à 99%) quelle que soit la membrane. La charge protéique quant à elle est répartie entre le perméat et le rétentat puisque les taux de rétention sont relativement faibles (60 à 66 %). Ces 2 membranes ont donc une sélectivité différente au niveau des lipides et des protéines. La membrane ES404 paraît retenir plus les lipides ce qui est logique vu qu'elle possède un diamètre de pore un peu plus faible, par contre pour les peptides, la sélectivité est voisine et la XP 117 semble même avoir un TR plus élevé. Cependant, les taux de rétention des peptides calculés ici ne fournissent pas d'idée précise sur la sélectivité des membranes et il faut procéder à l'analyse par différents groupes de tailles de poids moléculaires. Comme dans la partie fractionnement à échelle de laboratoire, ceci peut être réalisé par l'analyse des chromatogrammes et par le pourcentage d'aire relatif sous la courbe.

II.2.2.5 Analyse des poids moléculaires des populations peptidiques

II.2.2.5.1 Profils chromatographiques et intégration des aires

Dans ce paragraphe, nous allons déterminer d'une manière plus fine la sélectivité des membranes et la capacité de ces dernières à retenir certains peptides par rapport à d'autres. Ceci se traduit par une nouvelle répartition des peptides dans le rétentat et le perméat qui peut être déduite par analyse des profils d'élution ainsi que par l'intégration de l'aire sous les chromatogrammes par classe de population peptidique, ce qui nous renseigne très précisément sur les taux de rétention. Les profils chromatographiques des perméats et des rétentats résultant du fractionnement de l'hydrolysate produit avec la Pepsine à échelle pilote sur les membranes ES 404 et XP 117 sont comparés avec le profil peptidique de l'hydrolysate initial brut et non fractionné. Le tout est reporté sur la Figure III.66.

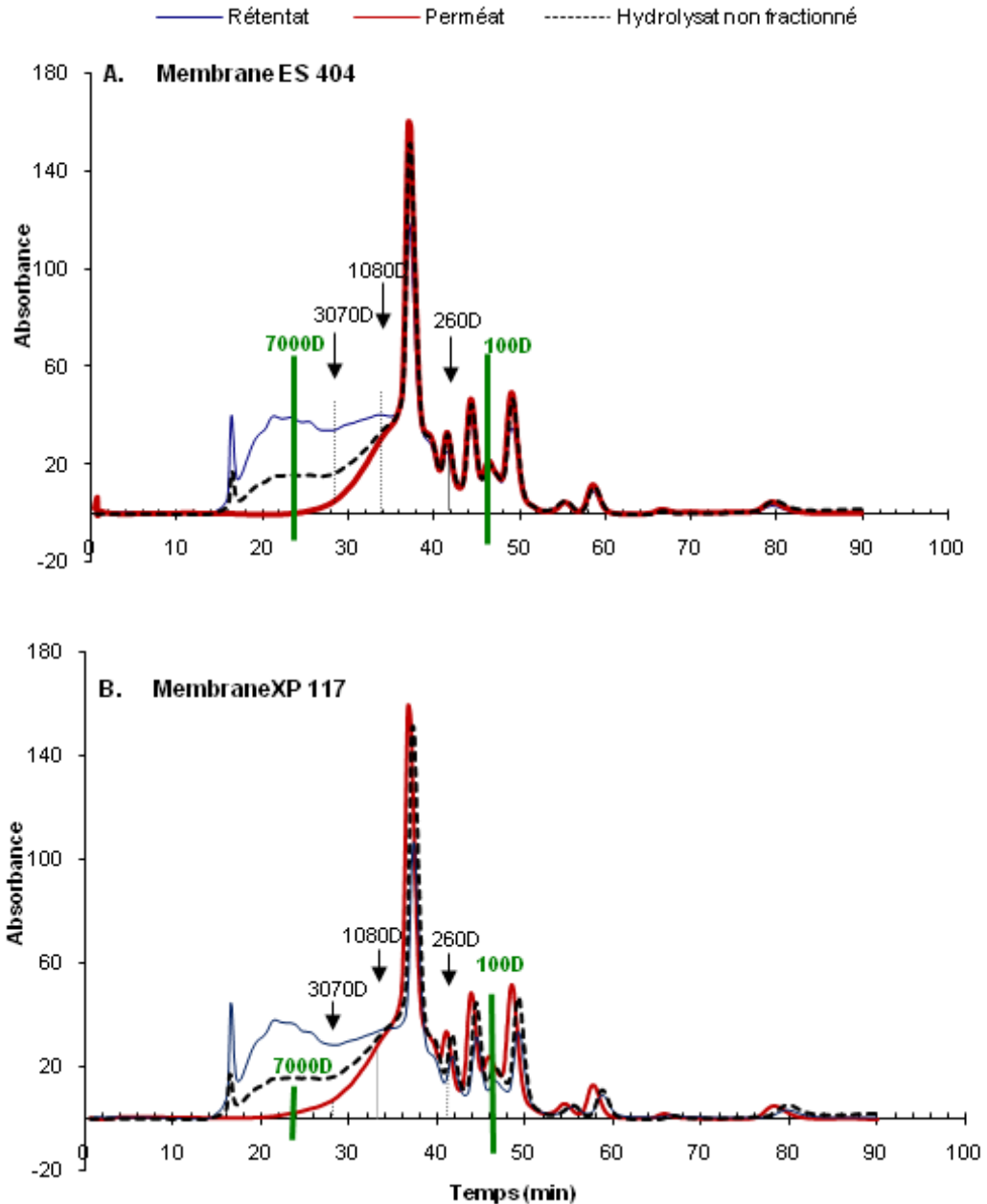


Figure III.66 : Profils chromatographiques des réténats et des perméats obtenus à la suite de l'ultrafiltration de l'hydrolysats sur les membranes ES 404 (A) et XP 117 (B) à 5 bar, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$ et $\text{FRV} = 4$.

Une première comparaison rapide des chromatogrammes permet d'observer que ces derniers possèdent les mêmes profils quelle que soit la membrane utilisée. Une nette discrimination apparaît entre le profil du perméat et celui du réténat au niveau des peptides ayant un PM supérieur à 3000 Da. Comme nous avons déjà trouvé lors du fractionnement à petite échelle et pour un seuil de coupure voisin (5000 Da), les profils d'élution pour les 2 membranes montrent ici que le pic le plus important au niveau du perméat concerne les molécules de poids moléculaire inférieur à 1000 Da. Cependant, au niveau du réténat, nous

observons un pic relatif aux peptides d'une taille voisine de 13000 Da et qui était absent lors des fractionnements précédents. Comme prévu, la distribution des peptides dans l'hydrolysate initial non fractionné montre un matériel peptidique majoritairement inférieur à 3000 Da vue la nature très hydrolysée de notre produit avec la Pepsine et que nous avons déjà souligné, avec l'existence d'une certaine proportion de molécules dont le PM est supérieur à 7000 Da et entre 7000 et 3000 Da.

En outre, on remarque que les trois chromatogrammes présentent, en dessous de 3000 Da, une superposition quasi-parfaite, surtout pour la membrane ES 404, ce qui vérifie clairement la sélectivité des membranes utilisées en fonction du seuil de coupure. Plus encore, il semble même exister un certain point au voisinage duquel ces trois chromatogrammes se croisent pour terminer leur évolution ensemble. **Ces points sont considérés comme des points "pivot" autour desquels va varier la composition peptidique des fractions résultant de la filtration.** Au niveau de la Figure III.66 A (ES 404) la valeur de croisement des profils est de 700 Da. Cette valeur "pivot" indique qu'au cours du fractionnement le rétentat s'enrichit progressivement en peptides de poids moléculaire supérieur à 0,7 kDa. Pour le perméat par contre, il y a enrichissement en peptides de poids moléculaire inférieur à 0,7 kDa.

Au niveau de la Figure III.66 B (XP 117), **le point pivot est légèrement décalé puisqu'il correspond à presque 1080 Da**, ce qui est assez logique étant donné que le seuil de coupure ici est plus important. Nous avons ainsi pu mettre en évidence 2 points pivot :

- Le point pivot de la membrane ES 404 (Figure III.66A), point autour duquel perméat et rétentat s'enrichissent avec des peptides supérieurs (rétentat) et inférieurs (perméat) à 0,7 kDa.
- Le point pivot de la membrane XP 117 (Figure III.66B), point autour duquel perméat et rétentat s'enrichissent avec des peptides supérieurs (rétentat) et inférieurs (perméat) à 1,08 kDa.

Le point pertinent à relever également suite à ces 2 fractionnements c'est que contrairement au fractionnement à petite échelle, le concentrat comporte une proportion assez importante de peptides de poids moléculaire > à 7 kDa et entre 7 et 5 kDa, population presque inexistante lors du fractionnement sur les membranes disque planes du mini-pilote Amicon®. Ceci serait dû à la composition et à la géométrie des pores de la membrane.

Nous allons maintenant comparer les différences obtenues au niveau des profils peptidiques suite au fractionnement sur les 2 membranes. A première vue, on constate que les allures sont pratiquement les mêmes sauf que la superposition des chromatogrammes à partir de 1080 Da n'est pas aussi parfaite que celle obtenue pour la membrane ES 404. En effet, il existe un certain décalage entre la courbe du perméat et celles du rétentat et de l'hydrolysate brut, ces dernières étant pratiquement superposées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que vu le seuil de coupure, quelques molécules peptidiques de poids moléculaire inférieur à 260 Da se retrouvent quand même dans le concentrat et serait vraisemblablement dû à une complexation intermédiaire des oligopeptides et des acides aminés avec les lipides, qui comme on l'a vu sont presque totalement retenus dans le rétentat.

La Figure III.68 présente, sur un même graphique, les perméats et des rétentats obtenus avec les membranes ES404 et XP117. Il en ressort à première vue que les courbes des perméats possèdent le même profil pour les 2 membranes et sont quasiment superposés. La seule différence observable est un léger décalage du chromatogramme de la membrane ES 404 vers les peptides de plus petits poids moléculaires par rapport au chromatogramme de la XP 117. En effet, le profil des pics est le même mais ces derniers apparaissent à des temps d'élution décalés par rapport à ceux de la membrane XP 117, ce qui veut dire que dans le perméat de la ES404, les molécules peptidiques sont de plus petite taille. Le profil d'élution de l'hydrolysate initial non fractionné se superpose également à ceux des deux perméats mais au-delà de 700 Da, la courbe de l'hydrolysate brut se trouve au-dessus des profils des 2 perméats, indiquant ainsi la proportion plus importante des peptides dont le PM est compris entre 1000 et 7000 Da avec même une population supérieure à 7000 Da.

Pour ce qui est des rétentats, les mêmes constatations sont à faire quand à la superposition des deux chromatogrammes, à la seule différence qu'entre 0,7 et 8 kDa, le chromatogramme du rétentat de la ES404 est au-dessus de celui de la XP 117 ce qui est logique puisque la plupart des molécules de taille supérieure à 4 kDa vont être retenues, le passage des molécules à travers les pores de la membranes dépend également de la configuration tridimensionnelle de celles-ci. Ainsi, la différence pour les 2 profils d'élution des rétentats réside essentiellement au niveau des peptides relativement de grande taille puisque la membrane ES 404 va en retenir à un taux plus important que la XP 117. Par ailleurs au niveau de la Figure III.67 B, le profil d'élution de l'hydrolysate initial non fractionné se retrouve au-dessous des courbes des rétentats et ce à partir de 1080 Da pour la XP 117 et 700 Da pour la ES404, contrairement à sa position supérieure par rapport aux

perméats, ce qui est logique. En effet, vu le faible seuil de coupure des deux membranes les peptides les plus gros seront retenus. **On peut donc dire qu'à la fin que les "points pivot" tournent autour des mêmes valeurs pour le fractionnement global, les perméats et les rétentats.** La valeur de ces points est reportée dans le Tableau III.38 pour les deux essais de concentration réalisés.

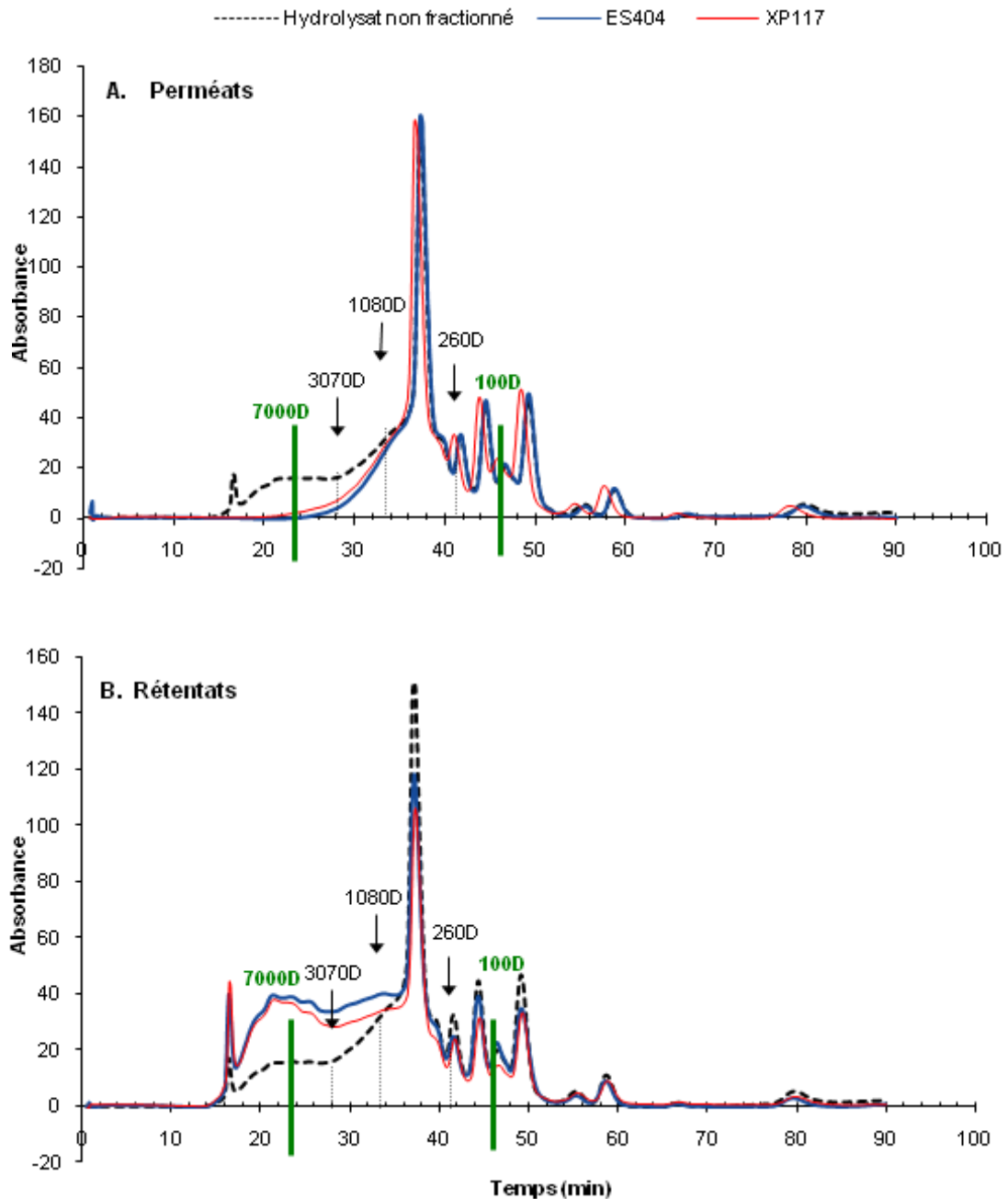


Figure III.67 : Comparaison des profils chromatographiques des perméats (A) et rétentats (B) des membranes ES 404 et XP 117 à 5 bar, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$ et $\text{FRV} = 4$.

Tableau III.38: Valeur des points pivot du fractionnement global, du perméat et du rétentat en fonction des membranes utilisées. PTM = 5 bar, FRV = 4 et $\theta = 25^{\circ}\text{C}$.

	ES 404	XP117
Point pivot du fractionnement global	700 Da	1080 Da
Point pivot des perméats	700 Da	700 Da
Point pivot des rétentats	700 Da	1080 Da

Afin de conforter les résultats obtenus par l'analyse des chromatogrammes, une analyse plus fine se basant sur les aires relatives sous les chromatogrammes est indispensable afin de connaître les populations peptidiques présentes dans les perméats issus des 2 filtrations et ce par classe de poids moléculaire mais également de calculer les taux de rétention des deux membranes également par classe de PM, ce qui est plus pertinent que de se baser uniquement sur le taux de rétention global qui ne renseigne pas sur la sélectivité de la membrane.

Le tableau III.39 montre la distribution en poids moléculaires des peptides contenus dans le perméat résultant de la filtration de l'hydrolysate des viscères de seiche sur les membranes ES 404 et XP 117 à une pression transmembranaire de 5 bar, une température de 25°C et un FRV de 4.

Tableau III.39 : Distribution des poids moléculaires (% d'aire relative) des perméats obtenus par fractionnement sur les membranes en ES 404 et XP 117 et de l'hydrolysate initial produit par la Pepsine et non fractionné.

Classe de PM (KD)	>7,1	7,1-5,4	5,4-3	3-2,1	2,1-1	1-0,46	0,46-0,26	0,26-0,1
Hydrolysate brut	9,39	3,07	6,55	4,87	12,63	40,81	14,3	16,88
Perméat ES 404	0	0,06	0,99	2,09	10,29	48,17	17,82	20,11
Perméat XP117	1,39	0,56	2,24	2,95	11,01	48,44	14,6	19,69
TR (%) ES404	100	99,03	92,13	75,14	35,32	0	0	0
TR (%) XP117	93,47	91,52	82,5	63,07	29,91	0	0	0

Ce que l'on peut constater tout d'abord c'est que plus de 90% des peptides de taille supérieure à 3 kDa sont retenus par les 2 membranes. **Cependant, il s'avère que la membrane ES 404 est plus efficace car plus sélective.** En effet, si l'on compare les TR (%) pour les classes de populations peptidiques supérieures à 2,1 kDa, on constate que les taux de rétention sont toujours inférieurs pour la XP 117 et ce quelque soit la classe de poids moléculaire considérée (Figure III.68). Par exemple, pour les molécules de taille supérieure à 7 kDa où la rétention devrait normalement être totale, le TR est de 100% pour la ES 404 et n'est que de 93,47% pour la XP 117. De même pour les peptides compris entre 5,4 et 7,1 kDa,

le TR est de 99 % pour la membrane ES404 alors qu'il n'est que de 91,52% pour la XP 117 alors que normalement le TR (%) devrait être plus élevé à cette taille de peptide. A partir d'un PM de 5 kDa, c'est assez logique que les taux de rétentions obtenus pour la membrane ES 404 soient supérieurs prenant en considération les seuils de coupure différents des 2 membranes. Toutefois pour les peptides supérieurs à 5 kDa, les taux de rétention de la membrane XP 117 devraient normalement être supérieurs à 95% ce qui n'est pas le cas. En-dessous de 3 kDa, les TR(%) baissent mais restent toujours plus élevés pour la ES 404. Pour les peptides compris dans l'intervalle 2,1-3 kDa, les taux de rétention sont de 75,14% et 63,07%, respectivement pour la ES 404 et la XP 117. Pour la classe peptidique comprise entre 1 et 2,1 kDa, l'écart entre les 2 membranes est réduit (35,32% et 29,91%). Bien évidemment à partir de 1 kDa, les taux de rétention sont nuls pour les 2 membranes, toutes les populations passent dans le perméat.

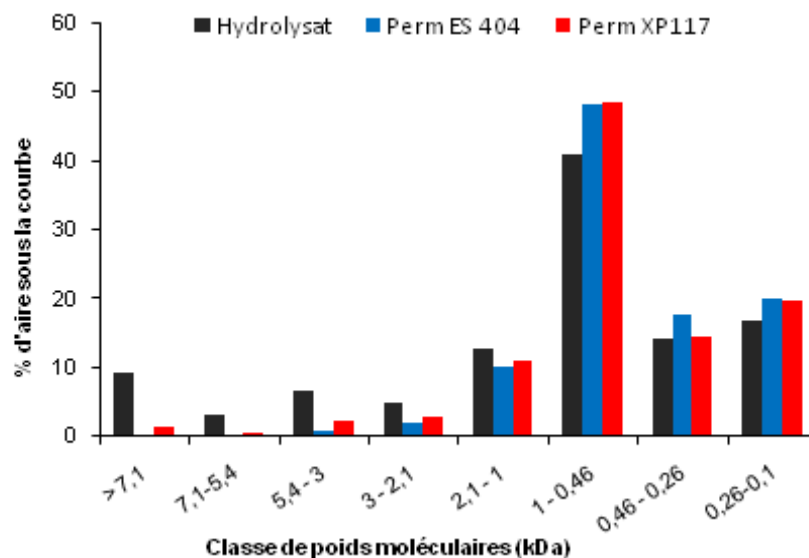


Figure III.68 : Taux de rétention des peptides (%) par classe de poids moléculaires calculés après filtration de l'hydrolysate des viscères de seiche avec la membrane ES 404 et la membrane XP 117. PTM = 5 bar, FRV = 4, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$.

En examinant les contenus des perméats (Figure III.69), on remarque que le pourcentage le plus important de peptides possède un PM inférieur à 1 kDa quelle que soit la membrane utilisée, ce qui confirme les profils chromatographiques des perméats analysés précédemment et qui montrent une discrimination très nette par rapport au rétentat. Une analyse plus fine des classes de poids moléculaire montre que les molécules dont les tailles sont comprises entre 460 et 1000 Da représentent 48,17 et 48,44% (respectivement pour ES 404 et XP 117). Cette classe de PM est également majoritaire dans l'hydrolysate initial non

fractionné. La deuxième population moléculaire la plus importante est représentée par les peptides ou plutôt oligopeptides (dipeptides, etc...) dont les poids moléculaires sont compris entre 260 et 460 Da (17,82% pour ES 404 et 14,6% pour XP 117). Les molécules, ou acides aminés dont les PM sont compris entre 100 et 260 Da occupent la 3^{ème} place avec des taux relativement importants variant autour de 20% quelque soit la membrane utilisée. Ces oligopeptides ou acides aminés représentent 16,88 % de l'hydrolysats non fractionné des viscères de seiche et est placé en seconde position après les l'intervalle de molécules 460-1000 Da. Ceci confirme la nature hydrolysée de l'hydrolysats de départ avec la Pepsine. **Après fractionnement, le perméat se trouve enrichi en acides aminés ou oligopeptides inférieurs à 260 Da, ce qui remplit en partie l'objectif de départ fixé par la technique de fractionnement et qui est d'obtenir un perméat riche en acides aminés et donc valorisable pour la nutrition animale.** Reste maintenant à analyser cette composition en acides aminés et à vérifier sa valeur nutritive, c'est-à-dire sa richesse en acides aminés essentiels (cf. § II.2.2.5). Par ailleurs, avec les seuils de coupure utilisés, particulièrement celui de la ES404, nous avons également réussi à retenir dans le concentrat les peptides de taille supérieure à 5 kDa, peptides possédant des activités antibactériennes.

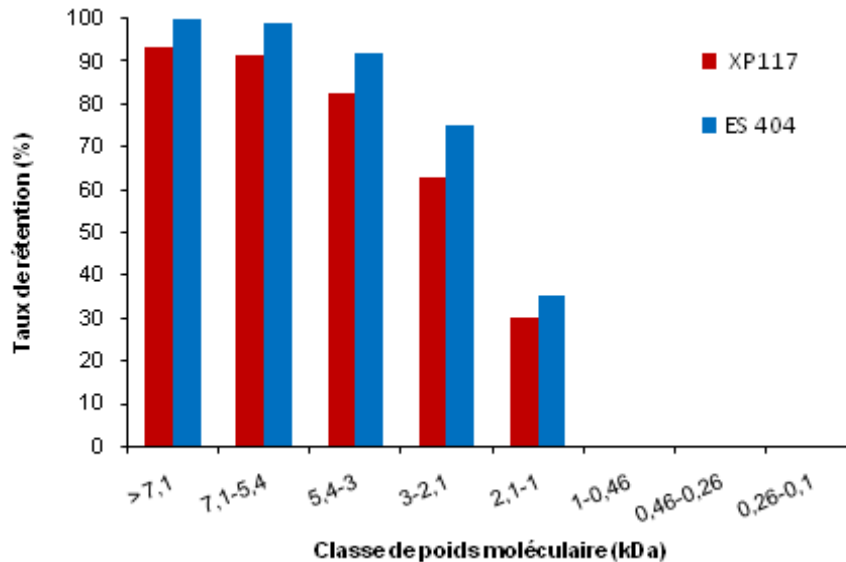


Figure III.69 : Répartition des poids moléculaires des peptides dans le perméat issu de l'ultrafiltration de l'hydrolysats des viscères de seiche avec la membrane ES404 et la membrane XP117. PTM = 5 bar, FRV = 4, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $v = 2,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

II.2.2.5.2 Courbes de tamisage

L'évolution des courbes de tamisage des membranes ES 404 et XP 117 après le fractionnement de l'hydrolysate des viscères de seiche à échelle pilote avec Pepsine en mode concentration (FRV = 4) sont représentées sur la Figure III.70. En comparaison avec les courbes de tamisage des essais préliminaires à petite échelle, on constate que l'allure de celles-ci est beaucoup plus régulière avec une phase de croissance exponentielle suivie de l'établissement d'un plateau. Par ailleurs, à partir d'un poids moléculaire de 1500 Da, la courbe de tamisage de la membrane ES 404 se trouve au-dessus de la XP 117, alors que jusqu'à 1200 Da, ces courbes sont pratiquement superposées. Cette allure est prévisible et s'explique par le SC nominal plus petit de la ES404 ce qui va comme on l'a vu plus haut engendrer des TR (%) plus élevés pour les peptides en-deçà de 4400 Da. **L'écart entre les 2 courbes commence à se réduire à partir de 5000 Da puisqu'à partir de ce poids moléculaire, les espèces peptidiques sont sensées être retenues par les deux membranes, sauf que comme mentionné plus haut la ES 404 semble montrer une meilleure sélectivité.**

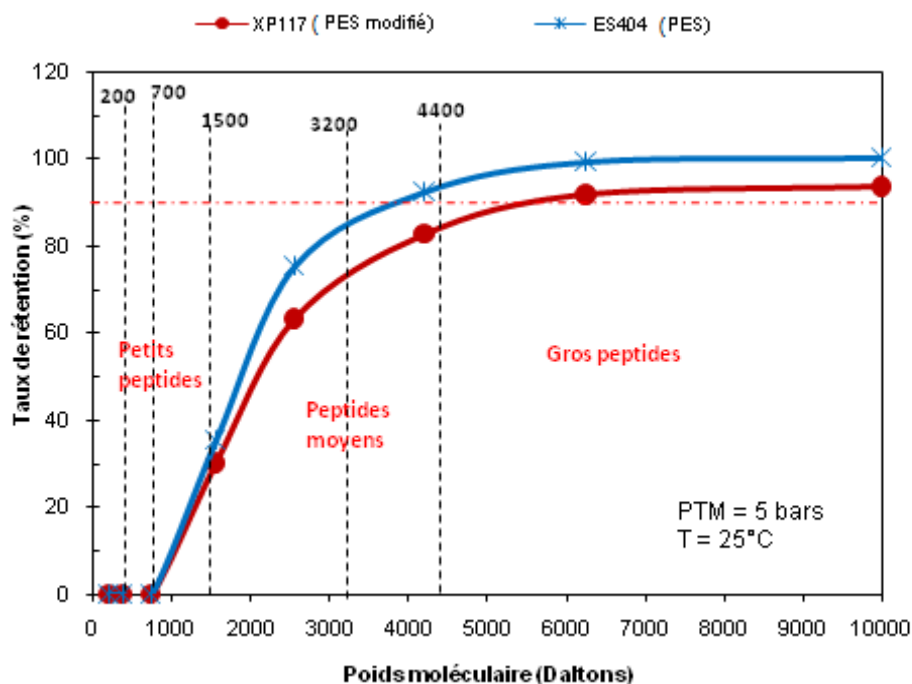


Figure III.70 : Evolution du taux de rétention en fonction du poids moléculaire (Daltons) des membranes en PES 4 kDa (ES 404) et PES modifié (XP 117) au cours de la concentration de l'hydrolysate des viscères de seiche. Conditions : PTM = 5 bar, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, FRV = 4, $v = 2,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Le seuil de coupure apparent est déterminé par l'intersection de la droite correspondant à un taux de rétention de 90% avec les courbes de tamisage. La courbe de la membrane ES 404 coupe la droite TR = 90% à 3700 Da, alors que la courbe de tamisage de la XP 117 semble couper cette droite 5500 Da. Les valeurs des SC nominaux et apparents sont reportées sur le Tableau III.40.

Tableau III.40 : Seuils de coupure nominaux et apparents des membranes Es404et XP117 obtenus après calcul des TR (%) et traçage des courbes de tamisage.

	SC nominal	SC apparent
ES404 (4 kDa, PES)	4000 Da	3700 Da
XP117 (4 kDa, PES modifié)	4000 Da	5500 Da

Les résultats des SC apparents consignés dans ce tableau expliquent les résultats que nous avons obtenus quand à la distribution des populations peptidiques et aux taux de rétentions. En effet, le SC apparent de la XP 117, qui possède un seuil de coupure expérimental inférieur ou égal à 4000 Da (résultats expérimentaux non présentés) est largement supérieur au SC nominal, expliquant ainsi les taux de rétention peptidiques faibles que nous avons obtenus surtout pour des poids moléculaires supérieurs à 5 kDa et qui étaient sensés être retenus dans le concentrat. Contrairement, pour la ES 404, le SC apparent est inférieur au SC nominal, ce qui explique donc les TR élevés obtenus par cette membrane pour des peptides de poids moléculaire compris entre 2,1 et 3 kDa et dont la valeur de TR dépasse les 70%. Ainsi, pour les objectifs que nous nous sommes fixés la membrane ES 404 semble être la mieux adaptée pour garder dans le rétentat les peptides à activités biologiques et laisser passer dans le perméat les oligopeptides et les acides aminés à valorisation nutritionnelle.

II.2.2.6 Analyse de la composition en acides aminés

L'analyse des acides aminés dans les perméats et les rétentats obtenus après fractionnement de l'hydrolysate produit à échelle pilote avec Pepsine sur les membranes 4 kDa en PES modifié (XP 117) et en PES (ES 404) nous fournit des résultats similaires à ceux obtenus suite au fractionnement à échelle pilote. D'un point de vue qualitatif, la Figure III.71 montre que les acides aminés présents en quantités majoritaires et qui ont été enrichis dans le perméat sont la Glycine (GLY) avec une teneur de $0,585 \pm 0,007$ mmoles/ mg de M.S pour la ES404 et de $0,451 \pm 0,02$ mmoles/ mg de M.S pour la XP117, suivie de l'Acide Glutamique (GLU). Viennent ensuite se classer l'Acide Aspartique (ASP) et l'Alanine avec des concentrations variant autour de 0,3 mmoles/ mg M.S. A part l'Ornithine, (ORN) l'Histidine

(HIS) et la Cystine (C-C) qui sont détectés à de très faibles quantités et parfois même non détectés, tous les autres acides aminés sont présents à des quantités correctes.

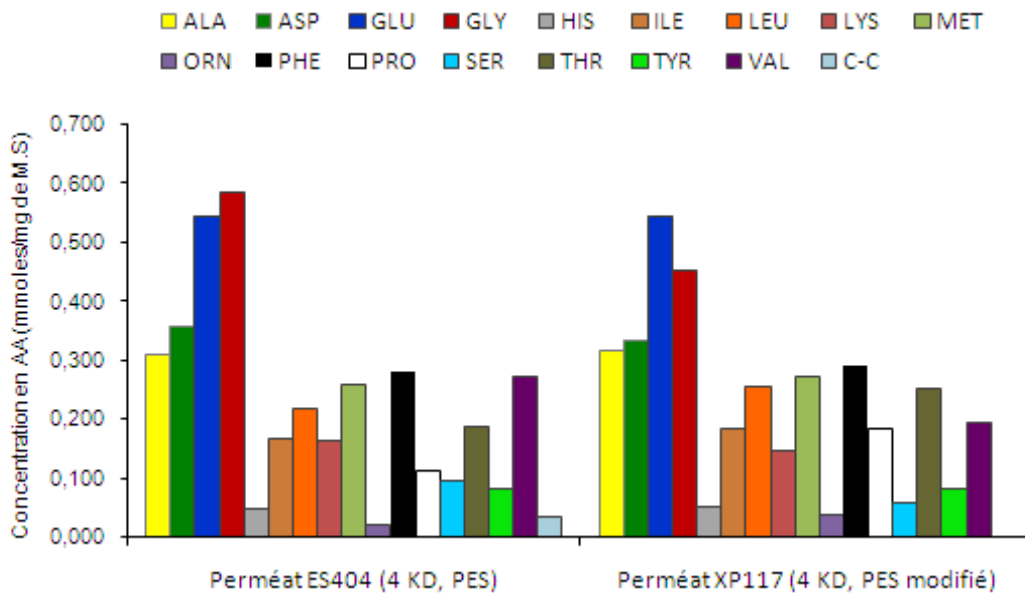


Figure III.71 : Répartition des concentration en acides aminés (en mmole/ mg M.S) dans les perméats issus des ultrafiltrations sur les membranes 4 kDa (PES et PES modifié). Conditions : PTM = 5 bar, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, FRV = 4, $v = 2,3 \text{ m.s}^{-1}$

La Figure III.72 montre la distribution des acides aminés dans les perméats et les rétentats obtenus par fractionnement sur les membranes ES 404 et XP 117. Cette figure nous montre que comme dans le cas du fractionnement à petite échelle, les perméats sont nettement plus riches en acides aminés que les rétentats et ce pour les 2 membranes testées. Cependant, on constate que les rétentats dans le cas de la filtration à grande échelle, les teneurs en acides aminés dans le rétentats sont plus importantes, comparées à celles trouvées dans les rétentats à échelle de laboratoire puisque les quantités dans le perméat ne sont que de 2 à 5 fois supérieures à celles des concentrats. La concentration en AA totaux est de 3,729 mmoles/mg M.S pour la ES 404 et de 3,645 mmoles/mg M.S pour la XP 117. On remarque ainsi que ces teneurs restent quand même du même ordre de grandeur que celles obtenues lors des essais de fractionnement à échelle de laboratoire. Ce qui est à noter toutefois c'est qu'avec la membrane en PES 4 kDa (ES404), on arrive à avoir des taux de transmission des acides aminés dans le perméat supérieurs à ceux obtenus avec la membrane PES modifié (XP 117).

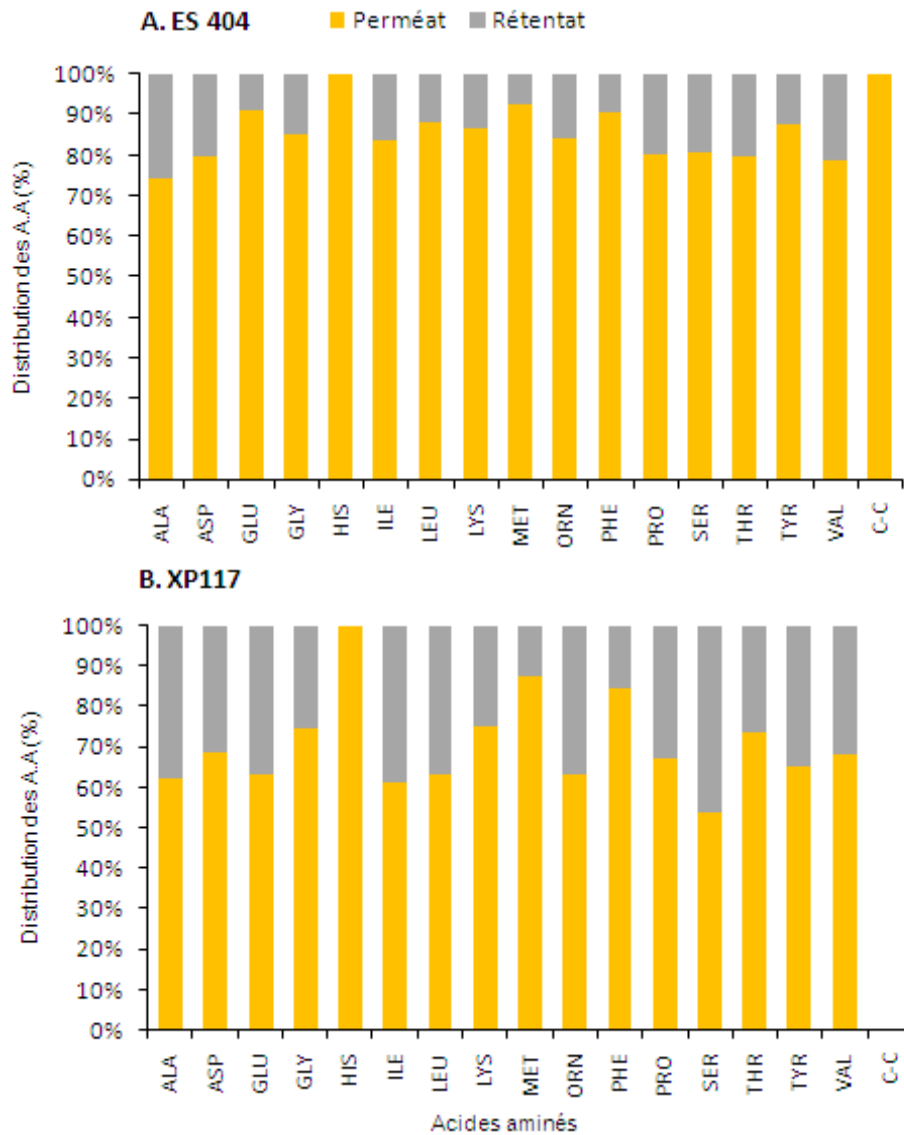


Figure III.72 : Répartition des acides aminés (%) dans les fractions (perméat et rétentat) obtenues après ultrafiltration de l'hydrolysate des viscères de seiche sur les membranes PES (A) et PES modifié (B). Conditions : PTM = 5 bar, $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, FRV = 4, $v = 2,3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$

Le tableau III.42 regroupe les taux de transmission des acides aminés dans le perméat. En effet avec la membrane XP 117, et pour certains AA notamment la Serine, il reste quand même des quantités relativement importantes dans le rétentat. Des taux de transmission de 100% sont observés uniquement pour l’Histidine et la Cystine, acides aminés déjà faiblement présents dans l’hydrolysate, ce qui explique l’obtention de ce pourcentage. Pour la PES (ES 404), les taux les plus forts (supérieurs à 80%) correspondent à l’Acide Glutamique (90%) et à la Méthionine (91,7%), suivis par la Phénylalanine (89,41%), la Leucine (86,74%) et la Tyrosine (85,96%) et enfin la Lysine (84,56%). Il est à noter ici que 4 de ces acides aminés sont essentiels. Pour ce qui est de la composition en AAE, on retrouve encore une fois pratiquement les mêmes proportions avec des taux de 42,73% dans le perméat de la ES 404 et

de 45,12% pour la XP 117. **Ainsi l'objectif initialement fixé est atteint puisqu'en changeant d'échelle de fractionnement membranaire, on conserve le résultat intéressant consistant au passage des acides aminés, plus particulièrement les AAE dans le perméat,** ce qui en fait une source potentiellement valorisable d'un point de vue nutritionnel. **En outre, il est clair que la membrane en PES 4 kDa non modifié est la plus intéressante pour les objectifs que l'on vise.**

Tableau III.41 : Taux de transmission des acides aminés dans les perméats obtenus après fractionnement de l'hydrolysate sur les membranes ES 404 et XP 117.

	Taux de transmission (%)	
	ES404	XP117
ALA	65,77	39,54
ASP	74,32	54,62
GLU	90,09	41,84
GLY	82,28	65,79
HIS	100,00	100,00
ILE	80,69	36,76
LEU	86,74	42,40
LYS	84,54	66,83
MET	91,70	85,58
ORN	81,23	42,75
PHE	89,41	81,88
PRO	74,94	51,97
SER	76,39	15,17
THR	74,60	64,83
TYR	85,96	47,01
VAL	73,21	53,28
C-C	100,00	-

II.2.2.7 Tests d'activité antimicrobienne

Les fractions (perméat et rétentat) obtenus suite au fractionnement par les 2 types de membranes ont été testés sur les souches *Bacillus megaterium*, *E.coli*, *Lactococcus graviae*, *Micrococcus luteus* et *Vagococcus salmonarium*. Comme prévu, les rétentats ont montré une activité inhibitrice de la croissance bactérienne contre toutes les souches testées. Pour le rétentat de la ES 404, le diamètre de la zone d'inhibition était de $20,5 \pm 0,03$ mm et de $18,1 \pm 0,1$ pour la XP117. Ces résultats montrent que même après séparation de l'hydrolysate à échelle pilote, il y a conservation de l'activité antimicrobienne dans le rétentat. De plus et après mesure du diamètre du disque d'inhibition, on peut conclure que le fractionnement selon la

taille par filtration membranaire est tout aussi efficace que celui effectué selon la charge des peptides. En effet, les halos d'inhibition sont du même ordre de grandeur. Concernant les perméats issus des 2 fractionnements, on constate la présence autour du puits creusé de gélose d'une très faible auréole mais au niveau de laquelle il y a eu inhibition puis recroissance des cellules bactériennes.

Ainsi, on conclue que l'activité antimicrobienne a été enrichie dans le rétentats, ce qui confirme bien le fait que le poids moléculaire des peptides antimicrobiens est compris entre 4 et 7 kDa conformément à la littérature, mais également comme nous avons pu le démontrer en réalisant la méthode des gels recouverts (SDS-PAGE), aussi bien sur l'hydrolysats initial de Pepsine, où le poids moléculaire de la fraction active a été estimé à 6 kDa que pour les rétentats issus de l'ultrafiltration à échelle de laboratoire (peptides actifs estimés à 4 kDa).

II.2.2.8 Discussion

II.2.2.8.1 Choix des membranes

Suite au choix du seuil de coupure déterminé lors de la partie précédente de fractionnement à échelle de laboratoire et qui était de 5 kDa, l'objectif de cette partie était de vérifier la transposition des résultats obtenus à petite échelle à échelle pilote et semi-industrielle. Les essais ont été réalisés sur 2 membranes de 4 kDa, l'une en PES, ayant pour nom commercial ES 404 de seuil de coupure 4 kDa et l'autre en PES modifiée commercialisée sous le nom de MT 117 et ayant pour nom expérimental de laboratoire XP 117 et de seuil de coupure 5 kDa. Le choix du seuil de coupure a été conditionné par le fait qu'en termes de membranes tubulaires en PES, ces seuils de coupure étaient les seuls disponibles et nous voulions également rester le plus proche possible du SC choisi lors des essais préliminaires. Par ailleurs, nous avons également choisi la XP 117 (membrane PES greffée) afin de tester l'influence de la variante apportée dans ce matériau mais aussi d'effectuer des études complémentaires sur cette membrane expérimentale dont le seuil de coupure, notamment la sélectivité sont restés imprécis (Vandanjon et al. 2007 – Chabeaud et al. 2008).

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.

II.2.2.8.2 Flux de perméation et nettoyage des systèmes

Avant de procéder à la filtration de l'hydrolysate sur les membranes, des tests d'adsorption ont été effectués afin de tester la tendance que possèdent les 2 matériaux au colmatage. Les résultats de ces tests ont montré qu'après 12 h de contact avec l'hydrolysate, la membrane ES 404 fait preuve d'une plus faible adsorption par rapport à la XP 117 avec diminution plus importante des flux pour cette dernière ainsi qu'une couche adsorbée de 22,4% contre 18% pour la ES 404. Cependant, il est important de noter que les flux initiaux à l'eau ont été supérieurs avec la XP 117, ce qui montre que le matériau PES modifié se comporte différemment avec l'hydrolysate protéique. A part la différence dans la composition du matériau, cette différence d'affinité avec les protéines peut être expliquée par une différence dans la géométrie ou la disposition des pores ou bien dans la charge des membranes (cationique ou anionique). Ce résultat va être confirmé plus tard avec les flux en cours et après filtration de l'hydrolysate. En effet, le suivi de l'évolution des flux de perméation montrent que la membrane en PES modifié se colmate plus rapidement et que les taux de régénération sont également plus bas que pour la ES 404, **ce qui nous permet d'avancer préliminairement que l'utilisation de la 4 kDa en PES est plus avantageuse étant donné un colmatage minime et des flux de filtration de l'hydrolysate plus stables.** Concernant le nettoyage appliqué aux membranes, celui conseillé par le fabricant a été suivi et a permis une bonne régénération pour la ES 404, c'est pourquoi nous n'avons pas jugé utile de procéder à d'autres techniques plus drastiques. En effet, la technique de nettoyage est l'un des facteurs limitant de la viabilité économique des procédés et souvent sous-estimé (Aptel al. 2002).

Cependant, dans des études futures, une campagne expérimentale de nettoyage en utilisant diverses combinaisons de réactifs pourrait être envisagée. 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 de filtration (Aptel et al. 2002). Par ailleurs, 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 également sur le profil de pression rencontré à l'intérieur de la cellule pressurisée. Enfin, d'autres systèmes de nettoyage pourraient être étudiés, comme l'utilisation d'enzymes. Par exemple dans le cas du colmatage des membranes en PES par les

protéines ou les lipides, l'utilisation de lipases et des protéases permettait d'obtenir une bonne régénération (Allie et al. 2003 - Kartika 2005).

II.2.2.8.3 Sélectivité des membranes et distribution des peptides et lipides

Dans cette partie, on s'est focalisé sur la comparaison de la sélectivité des deux membranes et l'influence sur la distribution des populations peptidiques dans le perméat et le rétentat. Le principal objectif de cette étape est de séparer les "gros" peptides intervenant dans les activités biologiques, en l'occurrence dans ce cas les activités antimicrobiennes et les oligopeptides et acides aminés, valorisables sur le plan nutritionnel.

Les conditions de filtration ont été fixées au préalable : (i) une PTM de 5 bars pour rester les plus proches possible de la pression appliquée lors du fractionnement à petite échelle (2 bars) et en-dessous de laquelle il est impossible de fractionner sur le pilote Microlab 40 ; (ii) une température de 25°C afin de ne pas induire de variations biochimiques supplémentaires à l'hydrolysate au cours du procédé et d'avoir comme effet final uniquement le fractionnement ; (iii) un FRV de 4 car on pense toujours à la faisabilité du procédé d'un point de vue industriel et donc un minimum de coût énergétique.

L'étude des profils chromatographiques a démontré que pour les 2 membranes testées, le taux de rétention global n'est pas très élevé. En effet, ceci est dû essentiellement à la nature "très hydrolysée" de notre produit obtenu après hydrolyse à échelle pilote avec la Pepsine et que nous avons démontré précédemment, dans le chapitre consacré à l'hydrolyse enzymatique. Les peptides étant de très petite taille, ils passent en majorité dans le perméat, il s'agit en fait essentiellement d'acides aminés. L'intégration de l'aire sous la courbe montre que les peptides de poids moléculaire supérieur à 7 kDa sont présents à des pourcentages très faibles. Vu la nature très hydrolysée du produit, il s'agirait plutôt de complexes lipides-peptides. En effet, des analyses biochimiques supplémentaires réalisées après la filtration ont également permis de montrer la concentration des lipides dans le rétentat, surtout pour la membrane ES404. **Les peptides de poids moléculaire entre 4 et 5 kDa sont également retenus en majorité. Il s'agit des peptides possédant une activité antimicrobienne, ce qui a pu être vérifié à la suite des tests antibactériens.** D'une manière générale dans les perméats, on ne retrouve que des peptides de taille inférieure à 1 kDa.

Toutefois, nous avons distingué une différence entre les 2 matériaux membranaires testés venant du fait que la membrane en PES 4 kDa est beaucoup plus sélective que la

XP117. Ceci a pu être vérifié en traçant les courbes du taux de rétention (%) en fonction des poids moléculaires, ce qui nous a permis de déterminer les seuils de coupure réels, qui sont différents des seuils nominaux : **la membrane ES404 possède un SC réel plus bas que 4 kDa et la XP117, supérieur à 5 kDa.**

Les bilans massiques réalisés montrent une meilleure récupération des volumes pour les 2 membranes, mais une boucle moins complète pour la XP117 en PES modifié, ce qui confirme ce que nous avons observé au niveau des flux de perméats en cours de filtration de l'hydrolysate, que ce matériau semble se colmater plus que la ES404 (PES) et aussi plus rapidement. Ces pertes correspondent donc en grande partie aux composés lipidiques et protéiques adsorbés par la membrane ou retenus dans le système de filtration (canaux de recirculation, volume mort, ...).

Les analyses relatives à la composition et aux quantités d'acides aminés ont montré que le perméat est enrichi en AA, notamment les AAE est que les quantités présentes, rapportées par mg de matière sèche sont très supérieures à celles détectées dans le rétentat, la concentration de ce dernier est de 1 mmole/mg M.S. Ce résultat confirme donc la forte transmission des acides aminés dans le perméat que nous avons trouvé en analysant les profils d'élution. C'est pour cette raison donc que les membranes présentaient un taux de rétention faible vis-à-vis des petits peptides, cette transmission étant expliquée par la petite taille de ces composés (< 200 Da). Par ailleurs on observe également une récupération d'une concentration en acides aminés légèrement plus importante que celle initialement présente dans l'hydrolysate des viscères de seiche produit à échelle pilote avec la Pepsine (~ 4,5 mmol/mg M.S) et ce dans le perméat de la membrane ES 404. Ayant réalisé les injections en GC en triplicats (écart-type = 0,03) la seule explication plausible étant une hydrolyse supplémentaire de quelques oligopeptides sous l'effet de la température. Une étude complémentaire sur le comportement des peptides de l'hydrolysate au cours de la filtration devrait néanmoins être réalisée et ce en faisant varier la température et la pression et en jouant sur ces 2 paramètres comme leviers de sélectivité.

Quoi qu'il en soit, cette combinaison de conditions opératoires permet de distinguer entre les deux membranes et donc les deux matériaux et de faire ressortir la ES404 en PES 4 kDa comme la membrane intéressante à utiliser à une échelle industrielle. Ce choix est également conforté par les similitudes trouvées dans les compositions des perméats et des rétentats produits à échelle de laboratoire et à échelle

pilote, nous amenant ainsi à conclure quant à la possibilité de transposition du procédé et aussi quant la validité de la procédure de changement d'échelle.

II.2.2.8.4 Up-scaling et transposition du procédé

La filtration sur membrane en polyéthersulfone 4 kDa (ES 404) à échelle pilote de l'hydrolysate avec Pepsine des viscères de seiche a permis de dégager des ordres de grandeurs très proches de ceux obtenus lors du fractionnement à échelle de laboratoire avec le mini-pilote sur les membranes planes et aussi de dégager les mêmes conclusions quant à la sélectivité du matériau, à la composition biochimique du perméat et du rétentat et à l'activité antimicrobienne. Il existe toutefois quelques différences entre les 2 échelles, notamment au niveau des flux de perméation. Ceci est dû d'une part à la géométrie différente des 2 membranes (plane à petite échelle, tubulaire à échelle pilote) et d'autre part au fait que les conditions de filtration ne se déroulent pas exactement de la même manière. Pour les 2 échelles et 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 pour les membranes planes. 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'hydrolysats de co-produits marins. En effet, des flux de ce type se situent dans les standards de performance généralement observés au niveau industriel en ultrafiltration de protéines.

CONCLUSION

L'ultrafiltration, en particulier avec une membrane de seuil de coupure 4 kDa en PES semble donc une technologie adaptée à la récupération des peptides à activités biologiques et des lipides issus et à la transmission des acides aminés contenus dans l'hydrolysate produit avec la Pepsine durant 2 heures et à 45°C. Par ailleurs, en termes de flux et de sélectivité, les performances de la membrane sélectionnée sont très proches de ceux obtenus à échelle de laboratoire. Cette étude préliminaire confirme le potentiel de ce type de technologie propre. Ainsi à partir d'un hydrolysate chargé initialement en particules très denses de mélanine de l'encre de seiche, il a été possible par une centrifugation et une hydrolyse enzymatique de courte durée, couplées à des technologies membranaires, de récupérer des substances valorisables (lipides, acides aminés essentiels et peptides antimicrobiens), d'identifier des nouvelles voies de valorisation (nutrition animale, agents

antimicrobiens pour les produits de la mer conditionnés) tout en réduisant très significativement la pollution engendrée par les rejets de ce type de co-produits à partir des industries de conditionnement.

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. En outre, une optimisation de ce procédé pour des applications économiquement viables passera nécessairement par un facteur de réduction volumique plus élevé que celui de cette étude.

II.3 TRANSPOSITION A ECHELLE INDUSTRIELLE : INTEGRATION DE L'HYDROLYSE ET DU FRACTIONNEMENT SUR MEMBRANE DANS UN PROCEDE INDUSTRIEL COMPLET

Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude constituent une étape préliminaire en vue du développement d'un procédé industriel complet couplant l'hydrolyse enzymatique et le fractionnement membranaire produisant un hydrolysate commercialisable et valorisable tant pour ses propriétés nutritionnelles (alimentation animale) que bioactives (activités antimicrobiennes).

Dans une première approche, nous étudions la faisabilité procédé/produit à échelle de laboratoire. Pour cela, nous identifions l'ensemble des étapes unitaires concevables dans le procédé de fabrication de l'hydrolysate, leur organisation et les technologies nécessaires pour chacune des étapes. Dans un second temps, nous effectuons un changement d'échelle par passage au pilote pré-industriel.

II.3.1 Architecture du procédé et opérations unitaires

La Figure III.73 représente toutes les opérations unitaires possibles en vue de la production industrielle de l'hydrolysate ainsi que des différentes techniques déployées et ce en fonction du produit fini visé (fractionné ou non) ainsi que de sa forme finale (liquide ou poudre).

Les différentes étapes et opérations unitaires sont pensées en fonction des résultats trouvés dans cette étude et des différentes contraintes et limites auxquelles nous nous sommes confrontés. Ainsi, on propose un procédé discontinu commençant par une hydrolyse enzymatique en batch du substrat (co-produit). L'étape d'hydrolyse se déroulerait en 3 phases :

- **Broyage du substrat** dans un hachoir de taille industrielle, ou bien dans une extrudeuse. En effet, nous avons vu lors du broyage à petite échelle qu'il y avait beaucoup de risque de perte de matière avec un blender. Cette phase de broyage a pour but de faciliter le travail de l'enzyme.
- **Lancement de l'hydrolyse** avec introduction du substrat dans un grand réacteur industriel équipé d'une tige d'agitation mécanique. Là, vu la taille du réacteur et l'important volume du produit, il est très important que la tige assure une agitation homogène en tout point. Pour cela, des lames métalliques horizontales pourront être incorporées tout le long de la tige. Par ailleurs, vue la longueur de cette dernière et la distance importante entre le point de rotation et l'extrémité, il est nécessaire de rajouter un dispositif de fixation de manière à ce que la tige ne subisse pas un effet de torsion et maintienne une rotation suivant son axe.
- **Inactivation de l'enzyme** pour arrêter la réaction d'hydrolyse. Une inactivation thermique par jets de vapeurs pourrait s'effectuer directement dans le réacteur. En effet lors de notre hydrolyse à grande échelle nous avons bien vu les problèmes engendrés par le volume important de l'hydrolysate à gérer pour une inactivation traditionnelle en bain-marie ainsi que le temps nécessaire pour atteindre 85 °C. Un autre avantage de l'inactivation thermique au sein du réacteur est que cette dernière est réalisée de la même manière en tout point de l'hydrolysate, contrairement à une inactivation classique par chauffage au bain-marie.

Etant donnée la particularité du substrat étudié et consistant en la présence de la fraction encre et donc des particules de mélanine, il est important que l'hydrolysate soit débarrassé des parties insolubles. En premier lieu, une **ultra-centrifugation** doit obligatoirement être envisagée afin de séparer au maximum la fraction soluble de celle insoluble. Cependant, lors de la procédure de changement d'échelle, il n'est pas possible de centrifuger dans les mêmes conditions qu'à échelle de laboratoire. En effet pour obtenir une séparation quasi-parfaite, il faut une vitesse de rotation d'au moins 20000 g, ce qui est possible uniquement pour des tubes d'une contenance maximale de 50 mL. Pour de grandes quantités d'hydrolysate, la vitesse maximale à laquelle on peut monter est de 8000 g. De cette manière beaucoup de particules de mélanine restent en suspension dans le surnageant. Une étape supplémentaire à la centrifugation devrait donc être envisagée. Une étape de **clarification** serait envisagée afin d'éliminer les particules insolubles qui persistent. Elle

pourrait s'effectuer après la centrifugation et en aval de l'hydrolyse par une **microfiltration**. Une simple décantation, suivie du pompage du surnageant et du pressage du culot est également envisageable, mais elle engendrerait une perte de temps considérable pour l'industriel. **Ainsi, l'utilisation de microfiltration semble être l'étape supplémentaire idéale avant la centrifugation puisqu'elle permettrait à la fois l'inactivation de l'enzyme et la clarification de l'hydrolysat et un gain en temps et en énergie considérable.** Cependant, nous ne pouvons affirmer la faisabilité de cette étape qu'après avoir réalisé une étude complète à échelle pré-industrielle. En effet, la microfiltration pourrait avoir l'inconvénient de retenir une partie des peptides et de préfractionner ainsi l'hydrolysat.

Après obtention de l'hydrolysat et séparation de la fraction soluble de celle insoluble, plusieurs traitements peuvent être envisageables dépendant du type de produit voulu et de la commercialisation visée. Les différentes formes de produits peuvent être :

- **L'hydrolysat brut**, non fractionné en tant que source de protéines et d'acides gras comme complément ou substitut à incorporer en nutrition animale, particulièrement dans les granulés en alimentation aquacole. Dans la formulation du produit, il est important de prendre en compte la teneur en sels et le pH bas et envisager une neutralisation de l'hydrolysat. Ce dernier pourra éventuellement être pré-concentré selon la charge initiale en peptides, séché et vendu sous forme de poudre.
- **L'hydrolysat fractionné** selon leur poids moléculaire. Les fractions bioactives du concentrat seraient utilisées en tant que conservateur des produits de la mer vues leurs propriétés antimicrobiennes ou en cosmétique. Le perméat enrichi en oligopeptides et acides aminés essentiels pourra subir une **nanofiltration**. En effet, l'étude des profils peptidiques avait montré une majorité de molécules de poids moléculaire très bas. La NF permettrait d'obtenir une concentration et une purification supplémentaires du produit qui sera ensuite concentré et séché.

Dans ce qui suit, nous choisissons de développer l'étape de nanofiltration à appliquer (i) au perméat, afin de mieux sélectionner les acides aminés et d'obtenir une fraction prépurifiée, (ii) au rétentat, selon l'activité biologique visée.

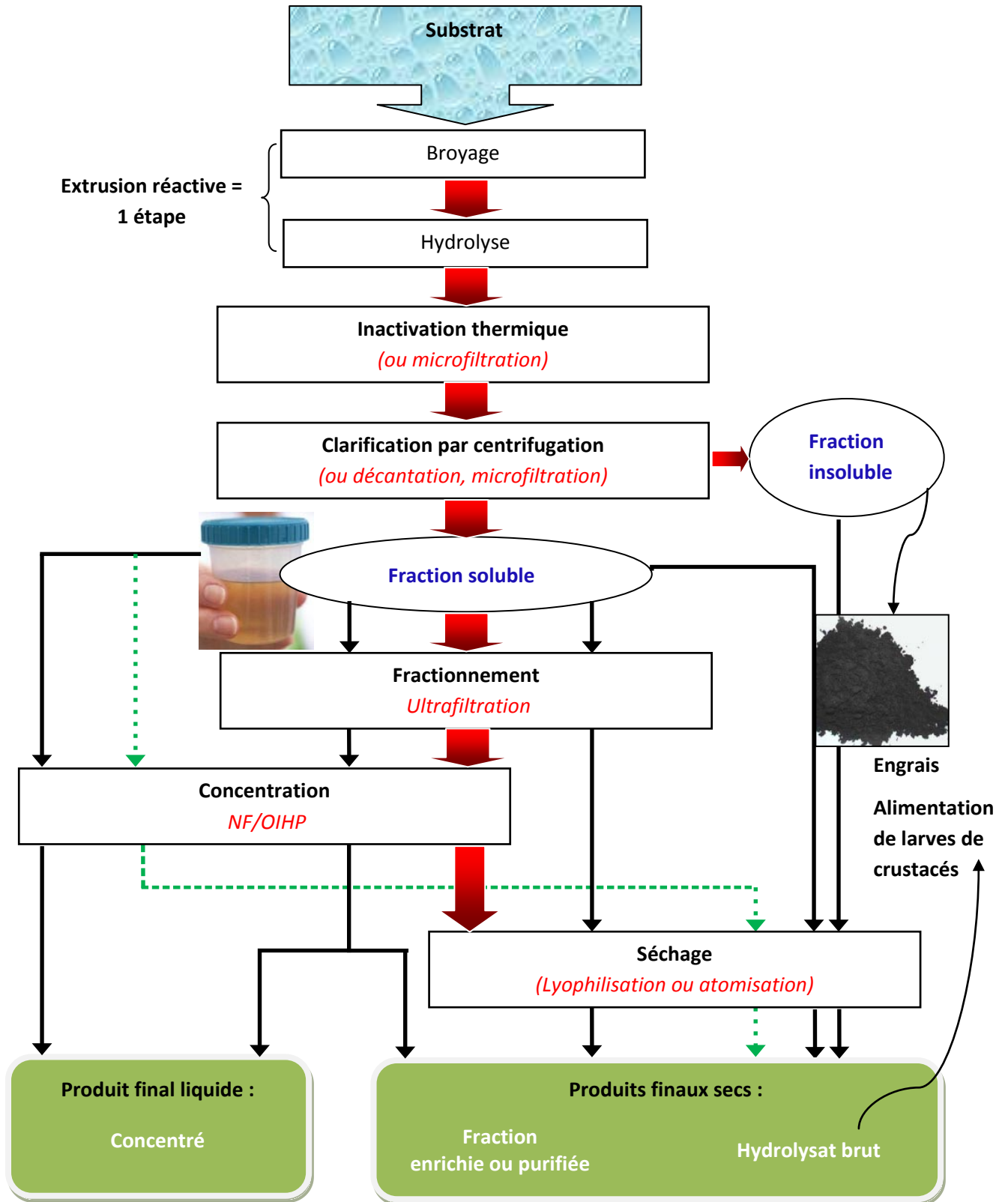


Figure III.73: Architecture d'un procédé industriel intégré : proposition de l'agencement des éléments et opérations unitaires.

II.3.2 Concentration par nanofiltration

Un des procédés de concentration envisageables et pouvant faire suite à l'étape d'UF dans cette étude est la nanofiltration. Ce procédé possède l'avantage d'être non dénaturant puisque la température est modérée, contrairement à l'évaporation thermique sous vide où il peut y avoir une dégradation partielle des peptides (Vaillant et Dornier 2001). Par ailleurs, le coût énergétique de ce procédé incluant une récupération d'énergie est en moyenne de l'ordre de 20 à 40 kWh/m³ d'eau évaporée (Mafart 1996). Un autre avantage de la NF est le fait que ce procédé permet la réalisation à la fois de la concentration du produit et sa déminéralisation partielle en une seule opération. Dans ce sens, Jeantet et al. (1996) ont d'ailleurs utilisé la NF pour la production de poudres de lactosérum acide déminéralisées ($V_0 = 1200 \text{ L}$; $C_0 = 62,1 \text{ g.L}^{-1}$ de matière sèche). Ces auteurs ont montré que la NF avec des membranes spirales organiques (Desal 5, Desalination Systems) d'un SC de 200 Da, $\Delta P = 26,2$ bars, durée de 3 h 30 et $T = 45^\circ\text{C}$ permet d'obtenir à un facteur de concentration volumique égal à 4, un concentré à $205,6 \text{ g.L}^{-1}$ de matière sèche déminéralisée de 40 à 48 % avec des pertes en protéines inférieures à celles observées en électrodialyse et en échange d'ions. Par ailleurs, la concentration par NF s'est avérée économique d'un point de vue énergétique puisque dans cette même étude, une diminution de 44% de l'énergie totale consommée sur une installation industrielle a été constatée. Dans leurs travaux, Bourseau et al. (2006) ont estimé le coût énergétique moyen pour atteindre un concentré protéique de 300 g.L^{-1} (FRV ~ 7) à $1,07 \text{ kWh/m}^3$ d'eau évaporée, soit 20 à 40 fois moins cher que l'évapo-concentration.

Il est donc nécessaire de réaliser une étude de faisabilité technique complète à propos de l'opération de concentration par NF de l'hydrolysate des viscères de seiche afin de vérifier si les flux sont acceptables et de voir si le FRV et la teneur finale en peptides sont suffisants pour envisager l'utilisation de la NF à échelle industrielle

CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons établi une étude préliminaire de conception d'un procédé industriel intégré à partir de technologies propres. Le couplage hydrolyse enzymatique/centrifugation permet d'obtenir 2 fractions valorisables sous formes de produits frais ou séchés par lyophilisation ou atomisation. En effet, nous avons vu après hydrolyse et centrifugation que le culot est enrichi en lipides. Des analyses complémentaires d'appétence et de digestibilité (notamment pour les larves de crustacés) pourraient indiquer si le culot représente ou non une matrice de choix pour l'alimentation animale. Les performances du procédé peuvent être améliorées en faisant varier les paramètres opératoires (pression, vitesse, température). Pour la partie filtration, une optimisation du procédé pour des applications bien déterminées comme l'alimentation animale ou l'extraction de produits bioactifs et qui sont économiquement viables passera nécessairement par un facteur de réduction volumique beaucoup plus élevé que celui utilisé dans cette étude. Ces travaux pourront se poursuivre en se focalisant sur la minimisation des besoins énergétiques et le nettoyage et la régénération du système afin d'obtenir des performances satisfaisantes permettant d'envisager le passage à échelle industrielle dans des conditions économiques réalistes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de recherche, inscrit dans la cadre de la valorisation des co-produits issus des industries de transformation des produits de la seiche a porté sur la mise en œuvre de procédés innovants d'extraction et de récupération de fractions peptidiques et lipidiques à partir de biomasses marines sous-exploitées et ce par des techniques non agressives alliant une consommation énergétique et un coût modérés. Ces procédés sont l'**hydrolyse enzymatique** et les techniques de fractionnement par la taille, à savoir les **procédés membranaires**. La conception du procédé, transposable à l'échelle industrielle s'est basée sur les parties suivantes :

- L'étude de l'influence du choix du substrat, des enzymes et du temps d'hydrolyse sur le déroulement de la réaction d'hydrolyse enzymatique.
- L'effet du fractionnement de l'hydrolysate sur la répartition des populations peptidiques puis sur les propriétés antimicrobiennes.
- Le passage de l'échelle du laboratoire à l'échelle pré-industrielle aussi bien pour l'hydrolyse enzymatique que pour le fractionnement en vue de conception d'un procédé intégré.

La seiche *Sepia officinalis* a été choisie vue l'importance de cette ressource et de ses débarquements à l'échelle tunisienne mais également au niveau de la région Bretagne et Basse-Normandie. De plus, la demande croissante de ce céphalopode au marché de l'export entraîne une activité de conditionnement produisant des quantités importantes de co-produits, engendrant un coût d'enlèvement conséquent. Ces co-produits représentent pourtant une biomasse en quantité assez importante à fort potentiel de valorisation et à faible coût. L'activité de transformation des céphalopodes a donc engendré une concentration des unités industrielles sur le littoral avec une pression anthropique importante. Notre choix dans cette étude a porté sur les viscères en particulier étant donné qu'il s'agit de la fraction principale rejetée au niveau de la chaîne transformation de la seiche (15 à 20% des co-produits rejetés), mais également à cause de l'existence de la glande d'encre ou à "noir de seiche" très dispersible dans l'eau et très polluante, posant ainsi un problème d'ordre environnemental.

Dans ce but, la qualité biochimique du substrat initial a d'abord été évaluée. Le couplage des analyses biochimiques et celle des profils peptidiques de la matière première et

des hydrolysats ont permis de connaître leurs caractéristiques et ainsi les voies de valorisation envisageables.

La première partie de ce travail a permis une caractérisation biochimique complète des deux types de matrices utilisées au niveau de l'hydrolyse enzymatique à savoir les viscères de seiche dépourvues de la glande d'encre et les « viscères noirs ». Cette caractérisation a révélé des teneurs importantes en protéines d'une manière générale (jusqu'à 80% de la matière sèche), mais les teneurs étaient plus élevées pour les viscères noirs de seiche. L'analyse plus fine de la composition en acides aminés a montré une forte concentration de ces composés, notamment en acides aminés essentiels. Les lipides étaient également présents en quantités significatives mais beaucoup moins importantes que les protéines surtout pour les viscères avec la glande d'encre (8% de la matière sèche). Ces résultats justifient l'utilisation des protéases pour déstructurer les tissus et l'orientation de la valorisation vers les fractions d'abord protéique puis lipidique dans un second temps.

Par ailleurs, même si la teneur en lipides n'est pas aussi importante que pour d'autres co-produits comme ceux des têtes ou des viscères des poissons bleus, la qualité des fractions lipidiques de ces deux types de co-produits s'est avérée intéressante, notamment au niveau de la présence de phospholipides et de la proportion des acides gras insaturés de la famille des $\omega 3$. Il apparaît donc que la matière première brute non traitée possède déjà une bonne qualité biochimique et un profil équilibré en acides gras et en acides aminés.

L'étude de l'activité protéolytique des différentes enzymes a permis de déterminer les rapports enzyme/substrat à appliquer et de standardiser ainsi les résultats des réactions d'hydrolyse. Ainsi, pour les hydrolyses de longue durée (24 heures) avec les enzymes Protamex, Alcalase et Flavourzyme, une température de 50°C et un pH de 8 ont été appliqués. Les quantités d'enzymes requises par rapport au poids frais sont de 0,1% pour Protamex et Alcalase et 1,5% pour Flavourzyme. Ces mêmes conditions ont été utilisées pour mesurer l'activité des enzymes endogènes des viscères. Aussi bien pour le substrat avec ou dépourvu d'encre, l'activité enzymatique s'est révélée importante, due essentiellement à la fonction digestive de cette fraction d'organes. Les activités protéolytiques des enzymes Delvolase, Pepsine et Multifect Neutral utilisées pour les hydrolyses de 6 heures sans contrôle de pH ont également été étudiées.

Sur la base de ces résultats, et par la volonté de développer une technique non polluante, peu coûteuse et pouvant être appliquée à échelle industrielle, un protocole d'hydrolyse

enzymatique des viscères de seiche a été mis en place. Les hydrolyses menées sur ces co-produits ont montré que le traitement enzymatique de chaque matrice engendrait des résultats différents. Pour les hydrolyses de longue durée, uniquement le substrat viscères sans encre a été testé afin d'observer le comportement de cette matrice au cours de la réaction d'hydrolyse sans interférence de l'encre. Ainsi, les résultats des hydrolyses de 24 heures sur les viscères de seiche sans encre avec Protamex, Alcalase et Flavourzyme. Les résultats obtenus montrent que malgré de faibles degrés d'hydrolyse (DH), la solubilisation des viscères est importante et l'hydrolyse semble être arrêtée dès les premières heures. Au bout de 24 heures d'hydrolyse, les teneurs en acides aminés sont augmentées par rapport aux valeurs obtenues pour la matière brute non hydrolysée démontrant ainsi la dégradation des protéines au cours du processus d'hydrolyse. Ce résultat est d'autant plus important que la qualité de ces acides aminés est intéressante d'un point de vue nutritionnel vu que la majorité acides aminés essentiels (AAE) sont augmentés et représentent plus de 50% de la totalité.

La protéolyse des viscères de seiche a de plus permis une augmentation des rendements d'extraction des lipides par rapport à une extraction classique avec une localisation dans les fractions liquides. Cette augmentation de la quantité de lipides extraits viendrait vraisemblablement du fait que l'hydrolyse enzymatique permet une meilleure accessibilité aux lipides par rapport à une extraction par solvants. D'un point de vue qualitatif comme pour les acides aminés, ces lipides sont également qualitativement intéressants puisqu'ils possèdent une part importante de phospholipides et d'acides gras insaturés.

La conduite de ces hydrolyses préliminaires à échelle de laboratoire a permis de nous orienter vers l'enzyme à choisir pour la suite des hydrolyses et ce en fonction de la fraction biochimique, de nature lipidique ou protéique sur laquelle nous nous concentrons pour une éventuelle valorisation ultérieure. Cependant, ces critères ne justifient pas à eux seuls le choix de l'enzyme pour la conduite des hydrolyses. En effet, même si Flavourzyme conduit à des rendements intéressants, son coût élevé fait que cette enzyme est non adéquate, surtout si on passe à une application industrielle. Alcalase permettait quant à elle une bonne extraction de lipides et des phospholipides. Même si en termes de degré d'hydrolyse et d'extraction de lipides, Protamex n'a pas montré de bonnes performances, elle reste relativement efficace pour la solubilisation de la matière sèche et est surtout peu coûteuse. C'est pour cette raison que cette enzyme a été retenue pour la suite des hydrolyses de 6 heures sans contrôle de pH.

La conduite des hydrolyses de courte durée (6 heures) avec des enzymes opérant à des conditions d'hydrolyse (température et pH) différents paraît un choix judicieux. En effet, les résultats obtenus pour les hydrolyses de 24 heures ont montré qu'un plateau est atteint au bout de pratiquement 6 heures et que le rajout de soude pour la méthode de pH-stat n'est pas réaliste d'un point de vue industriel, à la fois en termes de coût mais également en terme d'élimination des sels de soude rajoutés dans l'hydrolysats. Un tel procédé engendre donc un surcoût inutile. Ainsi, une deuxième série d'hydrolyses à échelle de laboratoire, sans contrôle de pH a été conduite avec Protamex, Delvolase, Pepsine et Multifect Neutral. Pour ces hydrolyses, les viscères de seiche avec et sans encre ont été utilisés dans le but de voir l'importance de la « fraction encre » dans ce co-produit. Le choix de ces enzymes vient du fait qu'elles nécessitent des conditions opératoires différentes en termes de température et de pH. L'étude de la cinétique de solubilisation de la matière a montré qu'au bout de 2 heures d'hydrolyses, la quasi-totalité des protéines est solubilisée et passe dans la phase soluble. Après analyse de la composition des hydrolysats obtenus, notamment de point de vue des profils des poids moléculaires, Pepsine a été identifiée comme l'enzyme permettant une meilleure dégradation des peptides et l'obtention d'une proportion élevée en acides aminés essentiels.

Après analyse de la composition biochimique ainsi que celle en poids moléculaires des hydrolysats, nous avons investigué leur potentiel antimicrobien. Pour cela, des tests préliminaires de diffusion en puits de gélose ont été réalisés. Ces essais ont été positifs uniquement avec la Pepsine et ont montré des halos d'inhibition jusqu'à 20 mm de diamètre. Ainsi, même si la libération des lipides et des phospholipides n'est forcément la meilleure avec cette enzyme, la Pepsine a été choisie pour le passage à échelle pilote des hydrolyses enzymatiques. Des travaux futurs de purification et de caractérisation permettront de savoir quelles sont les molécules à l'origine de cette activité.

La conduite d'un plan d'expériences a permis la détermination "préalable" des conditions d'hydrolyse par la Pepsine sur les viscères de seiche avec encre. L'hydrolyse menée pendant 98 min, à 52°C et avec 0,45% d'enzyme et 0,5% d'eau a été définie comme étant la plus efficace pour obtenir de grandes quantités d'acides aminés ainsi qu'au niveau de l'inhibition microbienne. En effet, l'étude des cinétiques de croissance et les biomasses des diverses souches bactériennes ont été étudiées ont montré une corrélation entre les conditions d'hydrolyse et les l'inhibition de la croissance des micro-organismes. Ce procédé est d'autant plus intéressant que les coûts énergétiques sont restreints et la préservation de la qualité des

composés biochimiques, grâce à la température modérée et à la réaction de courte durée. Cependant, le domaine d'étude choisi pour la réalisation du plan d'expériences et les bornes de chaque paramètre n'ont permis l'obtention d'une réponse très pertinente que pour le DH. Pour les peptides et les lipides, il convient de rester prudent et de mener une autre campagne expérimentale en modifiant le domaine d'étude avant de confirmer les conditions optimales d'hydrolyse.

Le procédé d'hydrolyse a ensuite été **transposé à échelle pilote** afin de produire une quantité d'hydrolysats suffisante pour le fractionnement sur membranes. Chacune des étapes de production a été reproduite de manière à obtenir un hydrolysats comparable à celui obtenu à petite échelle. L'analyse de l'hydrolysats obtenu à grande échelle a permis de vérifier la conservation des caractéristiques biochimiques. Cependant, des DH importants ont été notés et un enrichissement peptidique a été observé. Ceci est probablement dû à une plus grande disponibilité des sites de coupure due à une plus importante quantité de substrat. L'analyse des profils peptidiques et la conservation de l'activité antimicrobienne ont permis de valider la transposition du procédé à l'échelle pilote.

La **deuxième partie** de ce travail était relative au **fractionnement** selon la **charge** et la **taille** de l'hydrolysats pepsique et à l'étude de l'effet de ce fractionnement sur la distribution en poids moléculaire des fractions puis sur la capacité antimicrobienne. **Le fractionnement** de l'hydrolysats **selon la charge** réalisé par chromatographie échangeuse d'ions a révélé la présence d'une activité antimicrobienne liée à la fraction cationique. Les profils d'élution ont démontré que les peptides actifs possèdent un poids moléculaire compris entre 5000 et 6000 Da.

La fraction soluble de l'hydrolysats a ensuite été traitée par ultrafiltration (UF). Les essais préliminaires à échelle du laboratoire ont été réalisés sur des membranes planes de seuil de coupure variant entre 1 et 30 kDa. Les performances des deux types de membranes ainsi que l'effet de leurs seuils de coupure sur la répartition des populations peptidiques ont été testés. Malgré que la cellulose régénérée soit considérée comme ayant la plus faible affinité avec les protéines, les membranes en PES ont présenté des caractéristiques plus intéressantes en termes de flux ainsi qu'une meilleure régénérabilité (par un simple nettoyage à l'eau). Le matériau polyéther sulfone (PES) a permis, avec un seuil de coupure de 5 kDa une séparation des lipides et des peptides de petite taille recueillis dans le perméat. L'analyse de ce dernier a également révélé une activité antibactérienne.

Suite à ces résultats, le passage au fractionnement membranaire à échelle pilote a été réalisé sur des membranes industrielles en PES et en PES modifié de seuil de coupure de 4000 à 5000 Da. La membrane ES404 (en PES, 4 kDa) a présenté des caractéristiques intéressantes vu qu'elle se colmate moins et qu'elle permet un fractionnement efficace des peptides de l'hydrolysate des viscères de seiche. Le flux de perméation est par ailleurs dans les ordres de grandeur de ceux habituellement rencontrés pour des applications similaires (7 à 10 L/h.m²). L'analyse des profils chromatographiques du perméat et du rétentat a montré une rétention des peptides de taille comprise entre 5000 et 7000 Da et un enrichissement du perméat en oligopeptides, voire en acides aminés avec la majorité des molécules de tailles comprises entre 250 et 500 Da. En outre, les profils d'éluion ont permis la détermination des courbes de tamisage des membranes étudiées. Ceci permet de comprendre le comportement de la membrane lors du fractionnement d'un hydrolysate peptidique. Il ressort ainsi de cette étude que le seuil de coupure apparent (SC_a) est en général sensiblement différent du seuil de coupure nominal donné par les fabricants.

Enfin, l'analyse de l'activité antimicrobienne a montré que l'inhibition de la croissance bactérienne est inhérente aux peptides présents dans le concentrat, ce qui confirme bien que cette activité est liée à des peptides de taille variant entre 5000 et 6000 Da. Par ailleurs, il a été démontré que le fractionnement améliore la capacité antimicrobienne du concentrat en mode concentration à FRV 4. L'étude du profil en acides aminés a montré, quant à lui, un enrichissement du perméat en acides aminés essentiels.

Dans la dernière partie de ce travail nous avons identifié les différentes étapes unitaires à mettre en place dans un procédé industriel pour la production d'un hydrolysate à partir d'un co-produit issu des industries de transformation des produits de la pêche, puis de son fractionnement. Cette partie présente également des perspectives d'amélioration de ces différentes étapes. Ainsi, il apparaît que l'étape de centrifugation préalable que nous avons utilisée dans ce travail est un choix judicieux vu que la microfiltration tangentielle n'est pas très adaptée et engendrerait une contamination supplémentaire de l'hydrolysate. Par ailleurs, un séchage par atomisation à la place de lyophilisation pourrait être envisagé. En dernier lieu, il serait intéressant de fractionner le perméat par nanofiltration pour une concentration performante des oligopeptides et acides aminés obtenues en vue d'une valorisation en nutrition animale et aquacole.

Ainsi, le présent travail montre qu'il est possible de valoriser des co-produits issus d'une chaîne de transformation de céphalopodes en agissant sur deux technologies complémentaires : (i) l'hydrolyse enzymatique, avec comme moyens d'action le choix et la performance de l'enzyme, ainsi que sur les paramètres opératoires, puis (ii) le fractionnement sur membranes avec comme leviers le choix du matériau, le seuil de coupure, le FRV et la pression. Aussi bien pour le choix de l'enzyme que du matériau et du seuil de coupure membranaire, tout dépend de l'objectif que l'on cherche à atteindre en termes de qualité d'hydrolysats. Dans notre cas nous avons pu obtenir un hydrolysats et des fractions répondant à des bioactivités intéressantes ainsi qu'une bonne qualité nutritionnelle. Cette étude met aussi en évidence la forte potentialité de l'outil de chromatographie d'exclusion stérique, se situant à l'interface de la biochimie et du génie des procédés. En effet, cette technique permet à elle seule (i) l'évaluation la distribution en poids moléculaire et de déterminer la teneur en peptides de l'hydrolysats, (ii) de suivre la cinétique d'hydrolyse, (iii) de comparer le degré d'hydrolyse entre deux échantillons, (iv) de vérifier la reproductibilité du procédé et enfin (v) d'observer l'effet du fractionnement sur les populations peptidiques. De plus nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des fractions lipidiques de qualité sans avoir recours aux solvants, en conservant les fractions peptidiques. Ainsi, le potentiel de la combinaison des traitements enzymatiques et membranaires dans ce domaine ouvre des perspectives encourageantes à l'utilisation de ces techniques douces, s'inscrivant dans une politique actuelle de « zéro déchets » de gestion durable et intégrée de la biomasse marine, mettant en œuvre des technologies propres.

Le présent travail présente l'originalité de l'étude d'un co-produit - les viscères de seiche *Sepia officinalis* - n'ayant pas fait, auparavant et à notre connaissance, l'objet d'une étude de leur valorisation par l'hydrolyse enzymatique et le fractionnement membranaire. Les résultats obtenus laissent présager plusieurs applications des composés obtenus dans divers domaines. Ces travaux débouchent également sur des perspectives pour les usines de transformation surtout que la matière première est présente en quantités importantes. En effet, la valorisation de ces co-produits s'avère intéressante pour l'alimentation animale, notamment pour les fabricants d'aliments aquacoles vue la quantité importante en AAE. De plus, les propriétés antimicrobiennes mises en évidence laissent envisager un avenir prometteur pour les industriels eux-mêmes puisqu'ils peuvent s'affranchir du recours aux substances chimiques pour la conservation des produits conditionnés (crevettes, seiches, poulpes,...) et utiliser les produits inhibiteurs des pathogènes marins à partir de leur propre biomasse, ce qui

pourrait engendrer un gain intéressant rentrant dans le cadre d'un processus de gestion intégrée.

Perspectives

Néanmoins, cette voie de valorisation n'est certainement pas la seule envisageable. En effet, nous avons démontré une richesse lipidique non négligeable des viscères de seiche tant au niveau qualitatif que quantitatif. Ainsi, ils se caractérisent par un contenu important en acides gras essentiels caractéristiques des huiles marines. Dans le futur, l'amélioration de la méthode d'extraction des huiles en utilisant l'enzyme adéquate sera envisagée. Ces huiles marines sont extrêmement prisées au niveau des marchés de la cosmétique, de la pharmaceutique et de la nutraceutique. Parallèlement, il existe encore tout un panel de bioactivités à explorer. Il s'agit de rechercher la présence potentielle de molécules facteur de croissance-like et d'étudier leur impact sur l'immunité via leurs effets sur des cellules d'autres organismes marins. Une autre perspective réside dans la recherche de molécules à potentiel sécrétagogue via des bio-essais réalisées sur des ressources marines d'intérêt commercial. Cependant, la voie la plus intéressante actuellement et sur laquelle on compte compléter cette étude consiste en la recherche d'une activité antitumorale en procédant à des tests d'adhésion, de prolifération puis d'apoptose sur des cultures de fibroblastes (Naraoka et al. 2000). En effet la présence de la "fraction encre" dans les viscères possède des propriétés qui ne sont pas encore bien explorées.

D'un point de vue biochimique, il serait intéressant d'approfondir l'étude du contenu enzymatique propre aux viscères de seiche et d'effectuer des recherches complémentaires permettant de déterminer la nature et la quantité de ces enzymes. L'étude de ce mélange enzymatique permettra de rechercher les éventuels effets de synergie ou d'antagonisme entre les enzymes commerciales et les enzymes endogènes et de mieux comprendre ainsi le déroulement de la réaction d'hydrolyse.

De point de vue du génie des procédés, ce travail révèle par ailleurs le besoin de mieux comprendre les effets de la réaction d'hydrolyse et du fractionnement sur la composition peptidique et la capacité antimicrobienne de l'hydrolysate. Ainsi, cette étude impose certaines questions : quels sont les processus des phénomènes d'oxydation des peptides ? Quels sont les interactions peptides-peptides et peptides-lipides ayant lieu au cours du procédé et

particulièrement l'hydrolyse enzymatique et quels types de modifications structurales induisent-ils ?

Enfin, dans la perspective d'une industrialisation du procédé, l'intégration de l'hydrolyse enzymatique et des techniques membranaires au sein d'un même bioréacteur à membrane (BAM) pourra être envisagée afin de raffiner en une étape la fraction peptidique qui nous intéresse pour une activité donnée. La transposition de ce procédé à d'autres co-produits marins en visant les activités biologiques citées précédemment pourra également être envisagée. De plus, une évaluation économique devra être réalisée afin de comparer le coût engendré par un procédé en deux étapes distinctes ou un seul procédé intégré (BAM) pour la fabrication d'un produit possédant à la fois une richesse nutritionnelle intéressante et une bioactivité élevée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abdelmouleh, A. (1997) Etude expérimentale de la valorisation de l'allache et de la seiche en Tunisie. *Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie*, 130-135.
- Abdul-Hamid A., Bakar J., Bee, G.H. (2002) Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chem.* **78**: 69-74.
- Adamo, S.A., Hanlon, R.T. (1996) Do cuttlefish (Cephalopoda) signal their intentions to conspecifics during agonistic encounters? *Anim. Behav.* **52**, 73-81.
- Adler-Niessen, J. (1977) Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochem.* **12**: 18-23.
- Adler-Niessen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **27**: 1256-1263.
- Adler-Niessen, J. (1986) Enzymatic Hydrolysis of Food Protein. Elsevier Applied Science Publishers (Eds.), London, 132-145.
- Adler-Nissen, J. (1982). Limited enzymic degradation of proteins: a new approach in the industrial application of hydrolysates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **32**, 138-156.
- Agin, V., Poirier, R., Chichery, R., Dickel, L., Chichery, M.P. (2006) Developmental study of multiple memory stages in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Neurobiol. Learn. Mem.* **86**: 264-269.
- Aimar, P., Dauphin, G. (2004) Séparations par membranes dans l'industrie alimentaire. *Traité en agro-alimentaire – Techniques de l'ingénieur.* **W4**: 120.
- Aime, S., Fasano, M. Tereno, F., Groombridge, C.I. (1991) NMR studies of Melanins: Characterization of a soluble melanin free acid from Sepia ink. *Pigment Cell. Res.* **4**: 216-221.
- Akbache, A., Lamiot, B., Moronib, O., Turgeona, S., Gauthiera, S.F., Pouliot, Y. (2009) Use of membrane processing to concentrate TGF- β 2 and IGF-I from bovine milk and whey. *J Memb. Sci.* **326**: 435-440.
- Alarcón, F.J., Moyano, F.J., Díaz M. (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *J. Sci. Food Agric.* **82** : 679 – 704.
- Alhendi, A.B., El-Sanhousi, S.M., Al-Ghasnawi, Y.A., Madawi, M. (1993) An outbreak of abscess disease in goats in Saudi Arabia. *J. Vet. Med.* **40**: 646-651.
- Allie, Z., Jacobs, E.P., Maartens, A., Swart, P. (2003) Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by abattoir effluent. *J. Memb. Sci.* **218**: 107-116.
- Alraçon, F.J., Moyano, F.J., Diaz, M., (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *J. Sc. Food Agric.* **82**(7): 697-704.
- Althouse, P. J. (1995). Screening of proteolytic enzymes to enhance foaming of whey protein isolates. *J. Food Sci.* **60**: 1110-1112.
- Altmann, J., Ripperger, S. (1997) Particle deposition and layer formation at the crossflow microfiltration. *J. memb. Sci.* **124**: 119-128.

- Amjad, S. Jones, D.A. (1992) An evaluation of artificial diets used in the culture of penaeid shrimps larvae *Penaeus monodon* (Fabricius). *Pakistan J. Zool.* **24**(2): 135-142.
- Andres, E. Dimarcq, J.L. (2007) Cationic antimicrobial peptides : from innate immunity study to drug development. Up date. *Med. Mal. Infect.* **37** : 194.
- Anonyme, *Arrêté du ministre de l'agriculture du 28 septembre 1995 réglementant l'exercice de la pêche*. Journal Officiel de la République tunisienne du 6 oct. 1995. n° 80, 1896-1900.
- APIP, (1999) Rapport d'activité de l'Agence des Ports et des Installations de Pêche, 35 p.
- Aptel, P., Buckley, C.A. (1996) Categories of membrane operations. In: "Water Treatment Membrane Process". Chapitre II, McGraw-Hill (Eds.): 24 p.
- Aptel, P., Moulin, P., Quéméneur, F. (2002) Micro et ultrafiltration: conduite des essais pilotes – traitement des eaux et effluents. Les cahiers du CMF, N°2. France: 102 p.
- Argüello, M.A., Alvarez, S., Riera, F.A., Álvarez, R. (2005) Utilization of enzymatic detergents to clean inorganic membranes fouled by whey proteins. *Sep. Purif. Technol.* **41**(2): 147-154.
- Ariyoshi, Y. (1993) Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* **4**: 139-44.
- Aspelunda, M.T., Rozeboom, G., Hengc, M., Glatza, C.E. (2008) Improving permeate flux and product transmission in the microfiltration of a bacterial cell suspension by flocculation with cationic polyelectrolytes. *J. Memb. Sci.* **324**: 198–208.
- Aspmo, S.I., Horn, S. J., Eijsink, V.G.H. (2005a) Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem.* **40**: 1957-1966.
- Aspmo, S.I., Horn, S. J., Eijsink, V.G.H. (2005b) Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a component of microbial growth media. *Process Biochem.* **40**: 3714-3722.

B

- Bacchin, P., Meireles, M., Aimar, P. (2002). Modelling of filtration: from the polarised layer to deposit formation and compaction. *Desalination* **145** (1-3):139-146.
- Bachère, E. Destoumieux, D., Bulet, P. (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* **191** : 71–88.
- Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, Å., Buddington, R.K. (2000). Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* **22** : 33–44.
- Balcázar, J.L., Blas, I.d., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* **114** : 173–186.
- Bald, C., Aurrekoetxea, G., Perera, N., Gartzia, I., Aguirre, P., Boujard, T., Kaushik, S. (2002) Essai d'utilisation de déchets de thons pour la fabrication d'aliments pour poissons. *Dossiers environnement de l'INRA* 26: 26-31.
- Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Morinigo, M.A., Borrego, J.J. (1998) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4269 – 4275.

- Balti, R., Barkia, A., Bougateg, A., Ktari, N., Nasri, M. (2009) A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation. *Food Chem.* **113** : 146-154.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* **252** : 79–84.
- Barnerjee, I., Saha, S., 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** : 425-428.
- Belfort, G., Davis, R.H., Zydney, A.L. (1994) The behaviour of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *J Memb Sci* **96**: 1-58.
- Ben Amar, R., Ellouze, E., Ayadi, M., Gupta, B. (2002) Traitement d'effluents de tannerie par microfiltration. *Revue des sciences de l'eau* **12** : 445-464.
- Benjakul, S., Morrissey, M.T. (1997) Protein hydrolysates from Pacific Whiting solid wastes. *J. Agric. Food Chem.* **45** (9): 3423-3430.
- Benoist, D., Tourbier, Y., Germain-Tourbier, S. (1994) Plans d'expériences : construction et analyse, Tec & Doc, Lavoisier (Eds.), Paris : 375 p.
- Benoist, D., Tourbier, Y., Germain-Tourbier, S. (1994) Plans d'expériences : construction et analyse. Tec & Doc, Lavoisier (Eds.): 275 p.
- Berge, G.E., Bakke-McKellep, A.M., Lied, E. (1999). In vitro uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **179** :181–193.
- Berge, G.E., Goodman, M., Espe, M., Lied, E. (2004). Intestinal absorption of amino acids in fish: kinetics and interaction of in vitro uptake of L-methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **229** : 265–273.
- Berghe, V.A., Vlietinck, A. J. (1991). Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Met. for Plant Biochem.* **6**: 47-68
- Bernay, B. (2005) Contrôle de la ponte ovulaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : utilisation du modèle *Sepia officinalis* pour la caractérisation des peptides régulateurs. *Thèse de Doctorat, Université de Caen*, 183 p.
- Bernet, F., Montel, V., Noël, B., Dupouy, J.P. (2000) Diazepan-like effects of a fish protein hydrolysate (Gabolysat PC60) on stress responsiveness of the rat pituitary-adrenal system and sympathoadrenal activity. *Psychopharmacology* **149**: 34-40.
- Bérot, S., Popineau, Y., Compoin, J.P., Blassel, C. Chaufer, B. (2001) Ultrafiltration to fractionate wheat polypeptides. *J. Chromatography* **753**: 29-35.
- Bessière, Y., (2005) Filtration frontale sur membrane : mise en évidence du volume filtré critique pour l'anticipation et le contrôle du colmatage. *Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier. Toulouse, France* : 345 p.
- Bhaskar, K., Pavankumar Shetty, A., Shareef, M.M., Ramamohan, Y., Taranath Shetty, K. (2002) Dinitrophenol derivatization of proteolytic products and its application in the assay of protease(s) activity. *J. Neurosc. Meth.* **120** : 155-161.
- Bjarnason-Baumann, B., Pfaender, P., (1977) Enhancement of the biological value of whey protein by cocatalytic addition into peptide linkage of limiting essential amino acids. *Nutr. Metab.* **21** (1) : 170-171.

- Blanc, A. and Daguzan, J. (2000) Size selectivity in the diet of the young cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca : Sepiidae). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **80**, 1137-1138.
- Blatt, W.F., Dravid, A., Michaels, A.S., Nelson, L. (1970) Solute polarization and cake formation in membrane ultrafiltration, causes, consequences and control techniques. J.E Flinn (Eds.), *Membrane Science and Technology*, Plenum Press, New York: 47-97.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. (2006). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **23** : 26–78.
- Boletzky, S.V. (2003) Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Advances in Mar. Biol.* **44** (44): 143-203.
- Bordenave S., Fruitier I., Ballandier I., Sannier F., Gildberg A., Batista I., Piot J. M. (2002) HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on Guinea pig ileum and ACE activity. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **32** : 65-77.
- Bott, R. (1938) Kopula and Eiablage von *Sepia officinalis* L. *Zeitschr Morph u Oekol Tiere* **34** (1), 150-160.
- Boucaud-Camou, E. (1973) Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque : Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs. *Thèse de Doctorat. Université de Caen, France* : 208 p.
- Boucaud-Camou, E., Boismery, J. (1991) The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) in the English Channel. In "The Cuttlefish". (Université de Caen) : 179-189.
- Boucher-Rodoni, R. (1982) La glande digestive des céphalopodes, organe de synthèse et de sécrétion d'enzymes digestives. *Cahiers de Biol. Mar.* **23**: 299-318.
- Bouglé, D. (2007) Les peptides fonctionnels marins. *Phytothérapie* **5**(1): 22-26.
- Bouhallab, S. (1998) Bioréacteurs enzymatiques à membranes. In: Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire. Boyaval, P. (Eds). *Tec et Doc, Lavoisier, Paris* : 553-572.
- Bouhallab, S., Mollé, D., Leonil, J. (1992) Trypic hydrolysis of caseinomacropéptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnol. Letters* **14**: 805-810.
- Bouhallab, S., Mollé, D., Léonil, J. (1993). Continuous hydrolysis of β -casein in a membrane reactor: preparation of a bioactive peptide. *Biotechnol. Letters* **15**: 697-702.
- Boukerrou, A., Ganière, J.P., El Solh, N., André, G., Garros, D. (1985) Analyse bactériologique d'un coque à Gram positif (microcoque de Morel) isolé chez des ovins atteints de la maladie des abcès. *Revue Méd. Vét.* **136** : 391-397.
- Bourre, J.M. (2005) Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress depression, dementia and aging. *J. Nutr. Health Aging* **9**: 31-38.
- Boury, M. (1950) Les hydrolysats de poisson. *Rev. Trav. Office Pêches Marit.* **13** : 599-626.
- Boussu, K., Van der Bruggen, B., Volodin, A., Van Haesendonck, C., J.A. Delcour, Van der Meeren, P., Vandecasteele, C. (2006) Characterization of commercial nanofiltration membranes and comparison with self-made polyethersulfone membranes. *Desalination* **191** : 245-253.
- Boyle, P., Boletzky, S. (1996) Cephalopod populations: definition and dynamics. In: "philosophical transactions of the Royal Society of London Biological Sciences" **351**, 985-1002.

- Bradford, M.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**, 248-254.
- Bressolier, P., Petit, J. M., Julien, R. (1988) Enzyme hydrolysis of plasma proteins in a CSTR ultrafiltration reactor: performances and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 650-658.
- Brisset, S., Gillon, F., Vivier, S., Brochet, S. (2001) Optimization with Experimental Design: An approach using Taguchi's Methodology and finite element simulations. *IEEE Transactions on magnetics* **37 (5)**: 305 p.
- Broussous, L. (1999) Elaboration de nouvelles géométries tubulaires de membranes céramiques. Application à la réduction du colmatage. *Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II.* 194 p.
- Brun, J.P. (1988) Procédés de séparation par membranes. Ed. Masson, Paris : 78-82.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y. (1999) Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **180** : 345-358.

C

- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. (1999) Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* **171**: 109-119.
- Capannelli, G., Vigo, F., Munari, S. (1983) Ultrafiltration membranes-Characterization methods. *J Memb. Sci.* **15 (3)**: 289-313.
- Caponio, F., Lestingi, A., Summo, C., Bilancia, M.T. and Laudadio, V. (2004) Chemical characteristics and lipid fraction quality of sardines (*Sardina pilchardus*): influence of sex and length. *J. Appl. Ichthyol.* **20**: 530-535.
- Castillo-Yañez, F.J., Pacheco-Aguilara, R., Garcia-Carreño, F.L., De los Angeles Navarrete-Del Toro (2004) Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem.* **85** : 343-350.
- Castro-Rosas, J., Escartin, E. F. (2002) Adhesion and colonization of *Vibrio cholerae* O1 on shrimp and crab carapaces. *J Food Prot.* **65 (3)** : 492-498.
- Cavalli, R.O., Tamtin, M., Lavens, P., Sorgeloos, P. (2001) Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. *Aquaculture* **193** : 311-324.
- CEE (1991) Directive du Conseil 91/493/CEE du 22 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche. *Journal officiel des Communautés européennes* N° **L268** : 15p.
- Centenaro, G.S., Mellado, M.S. (2008) Influence of substrate and enzyme concentrations on the hydrolysis degree and protein content of Corvina (*Micropogonias furnieri*) enzymatic hydrolysates. *Boletim Do Centro De Pesquia De Processamento De Alimentos*: **26 (1)**: 61-70.
- Chabbert, Y.A. (1963) L'antibiogramme : sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques. *De La Tourelle (eds.). Collection techniques de base.*
- Chabeaud, A., (2008) Production de peptides de lieu noir dotés d'une capacité antioxydante par hydrolyse enzymatique en réacteur discontinu et fractionnement sur membranes. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Sud, France.*

- Chakraborty, P.K., Madavan, P. (1977) A pilot scale set up for the manufacture of fish hydrolysate. *Fish. Technol.* **14**: 159-158.
- Charbonnier, D. (1990) Pêche et aquaculture en Méditerranée. Etat actuel et perspectives. *Les fascicules du plan bleu n°1, Economica*, Paris, 99 p.
- Cheang, B., Zydney, A.L. (2004) A two stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *J. Memb. Sci.* **231**: 159-167.
- Cheftel, C., Ahren, M., Wang, D. I. C., Tannenbaum, S. R. (1971) Enzymatic solubilization of FPC: batch studies applicable to continuous enzyme recycling process. *J. Agric. Food Chem.* **19**: 155-161.
- Chen, V., Fane, A. G., Madaeni, S., Wenten, I. G. (1997). Particle deposition during membrane filtration of colloids: transition between concentration polarization and cake formation. *J. Memb. Sci.* **125** (1), 109-122.
- 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., 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** : 1523-1531.
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and microfiltration handbook. *Technomic Publishing Co.* (Eds), Lancaster. 304 p.
- Chhaya, C., Rai, P., Majumdar, G.C., Dasgupta, S., De, S. (2008) Clarification on watermelon (*Citrullus lanatus*) juice by microfiltration. *J. Food Process Eng.* **31**: 768–782.
- Christie, W.W., (1989) Acid-catalysed esterification and transesterification. In: “*Gas chromatography and lipids*”, the Oily press, Glasgow: 67-69.
- Church, F.C, Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catigniani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phtaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* **66**: 1219-1227.
- Church, F.C., Porter, D.H., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. (1985) An *o*-phtaldialdehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal. Biochem.* **146** (2): 343-348.
- Clancy, C.M.R. and Simon J.D. (2001) Ultrastructural organization of eumelanin from *Sepia officinalis* measured by atomic force microscopy. *Biochem.* **40**: 13353–13360.
- Clarke, A., Rodhouse, P.G., Holmes, L.J., Pascoe, P.L. (1989) Growth rate and nucleic acid ration in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca Cephalopoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*: **133**: 229-240.
- Creach, P.V. (1950) Composition et utilisation des aliments protidiques liquides retirés du poisson. Congrès International d'Etudes sur le rôle du poisson dans l'alimentation, Paris. *Off. Pêches Marit., Notes et Rapport.* **7**: 158-160.
- Crooke, W. M., Simpson, W. E. (1971) Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *J. Agric. Food Chem.* **27**: 1256-1262.
- Cuvellier, G.F. (1999) Enzymologie et biocatalyse. In: *Biotechnologie. Tec et Doc*, Lavoisier, Paris: 319-342.

D

- D'Abramo, L.R., Sheen, S.S. (1993) Polyunsaturated fatty acid nutrition in juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* **115** : 63 – 86.
- D'Alelio, G.F. US Pat. (1945) 2 366 007.
- Dal-Cin, M.M., McLellan, F., Striez, C.N., Tam, C.M., Tweedle, T.A., Kumar, A. (1996) Membrane performance with a pulp mill effluent: Relative contributions of fouling mechanisms. *J. memb. Sci.* **120** : 273-285.
- Damodaran, A., Paraf, S. (1997) Food proteins and their applications. Edited by S. Damodaran and A. Paraf. Marcel Dekker Inc, New York, in *J. Dairy Sci.* **7 (6-7)**: 487.
- Daufin, G., Kerhervé, F., Aimar, P., Mollé, D., Léonil, J., Nau, F. (1995). Electrofiltration of solutions of amino acids or peptides. *Lait* **75**: 105-115.
- Daufin, G., René, F., Aimar, P. (1998) Les séparations par membranes dans les procédés de l'industrie alimentaire. *Tec & Doc*, Lavoisier, Paris : 234-235.
- Daukšas, E., Falch, E., Šližyte, R., Rustad, T. (2005) Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) byproducts. *Process Biochem.* **40**: 2659-2670.
- Davies, O.L. (1985) The design and analysis of industrial experiments. Oliver & Boyd (Eds.). : 235p.
- Deeslie, W.D., Cheyran, M. (1991) Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Food Sci.* **57**: 411-413.
- Defrence, L., Jaffrin, M.Y. (1999) Comparison between filtration at fixed transmembrane pressure and fixed permeate flux: application to a membrane bioreactor used for wastewater treatment. *J. Memb. Sci* **152**: 203-210.
- Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noel, J., Fleurence, J. (2004). Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post-mortem storage on ice: time dependant changes in the activity of the components of the calpain system. *Food Chem.* **84** : 441–446.
- Frister, H., Meisel, H., Schlimme, E. (1988). OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chloride as thiol component. *Fresenius J. Anal. Chem.* **330**: 631–633.
- D'Ischia, M., Napolitano, A., Prota, G. (1991) Peroxidase as an alternative to tyrosinase in the oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindoles of melanin(s). *Biochem. Biophys. Acta* **1073**: 423-430.
- De La Fuente, R., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Cid, D. (1993) Experimental intramammary infection of ewes with *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*. *Res. Vet. Sci.* **54**: 221-226.
- De Vecchi, S., Coppes, Z. (1996) Marine fish digestive proteases - Relevance to food industry and the South-West Atlantic region - A review. *J. Food Biochem.* **20**: 193 - 214.
- Delignette-Muller, M.L. (1995) Méthodes de prediction des aptitudes de croissance des population de micro-organismes. *Thèse de Doctorat, Université de Lyon*: 143 p.
- Demonstant, J. (1996) Comprendre et mener des plans d'expérience. Ed.AFNOR: 205 p.

- Derby, C.D. (2007) Escape by inking and secreting: Marine molluscs avoid predators through a rich array of chemicals and mechanisms. *Biol.Bull.* **213**: 274-289.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C. Rodriguez, J. Bulet, F., Comps, M., Bachère, E. (2000a) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.* **113** : 461-469.
- Destoumieux, D., Munoz, M., Bulet, P. and E. Bachère, E. (2000b) Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *C.M.L.S.* **57** : 1260 –1271.
- DGPA, (2007) Annuaire des statistiques de la pêche en Tunisie. *Ministère de l'agriculture et des ressources hydrauliques*, 102 p.
- Dhulster, P., Bazus, A., Gerard, M. (1994) Valorisation de déchets d'abattoirs: couplage réacteur enzymatique / ultrafiltration. *Recueil des conférences Interfiltra/Intermembrane, 15-17 Novembre* : 68-73.
- Dickel, L., Chichery, M.P., Chichery, R. (2001) Increase of learning abilities and maturation of the vertical lobe complex during postembryonic development in the cuttlefish, *Sepia*. *Dev Psychobiol* **39**: 92-98.
- Die, D.J., Everett, G.V. (1993) Rapport préparé pour le gouvernement tunisien sur l'aménagement de la pêche dans le Golfe de Gabès. *ONU/CGP/INT/466/NOR, doc.93/26*, 27 p.
- Diniz F.M., 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**: 419-26.
- Diniz F.M., Martin A. M. (1998) influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle proteins. *Food Sci. Technol. Int.* **4(2)**: 91-98.
- Diniz, F. M., Martin, A.M. (1997b). Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. *Int. J. of Food Sci. Nutr.* **48**: 191-200.
- Diniz, F.M., Martin, A. M. (1997a) Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm.-U.-Technol.* **30**: 266-272.
- Dong Y.L., Sheng G. Y., Fu J. M., et Wen K. W. (2005) Chemical characterization and antianaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongata*. *J. Sci. Food Agric.* **85**: 2033-2039.
- Dreyfus, H., Guerold, B., Freysz, L., Hicks, D. (1997). Successive isolation and separation of the major lipid fractions including gangliosides from single biological samples. *Anal. Biochem.* **249**: 67-78.
- DSM - Food Specialities – Beverage Ingredients (2003) DELVOLASE[®] Alkaline protease from *Bacillus licheniformis* for protein hydrolysis. Application Data Sheet. Delft, Netherlands : 5 p.
- 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., Donnay-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P., Bergé J. P. (2006) Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochem.* **41(11)**: 2327-2332.

Dumay, J. (2006) Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration : application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). *Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, France* : 283 p.

Durand, P., Lagoin, Y. (1983) Valorisation des sous-produits de la pêche. *Bull. Inst. Pêches Marit.* **330** : 5-19.

Du Toit, E.A., Rautenbach, M. (2000) A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity. *J. Microbiol.Methods* **42**: 159–165

E

Ersillon, J.L., Mallevalle, C.J. (1991) Ultrafiltration in drinking water treatment. Long-term estimation of operating conditions and water quality for 3 water plants. *Proc. Memb. Process Conf.* Orlando: 359-370.

Espe, M., Lemme, A., Petri, A., El-Mowafi, A. (2006) Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture* **255**: 255-262.

Eymard, S. (2003) Mise en évidence de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. *Thèse de doctorat. Université de Nantes*, 143 p.

Ezzeddine-Najai, S. (1984) Reproduction de la seiche *Sepia officinalis* Linné, 1758 (Mollusque, Céphalopode) du Golfe de Tunis. Etude morphologique et morphométrique. *Bull INSTOP, Salammbô* **11**: 93-140.

F

Fane, A.G. (1986) Ultrafiltration factors influencing flux and rejection. In: "Progress in filtration and separation". R.J., Wakeman (Eds.), Elsevier, Amsterdam: 101-179.

FAO (1986). The production of fish meal and oil. *FAO Fisheries and Aquaculture Department, Technical paper*, 142 p.

FAO, (2004). Situation mondiale de la pêche et de l'aquaculture. *FAO Fisheries and aquaculture department*, Sofia, 164 pp.

FAO, (2005). Review of the state of world fishery resources. *FAO Fisheries and Aquaculture Department, Technical paper*. FAO, Rome: 457 p.

FAO, (2007). Situation mondiale de la pêche et de l'aquaculture en 2006. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*, Rome: 162 p.

FAO, (2009). Situation mondiale de la pêche et de l'aquaculture en 2008. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*, Rome: 194 p.

FAO, Fisheries Report, no. 579 (2000) Report of the second session of the working party on fisheries economics and statistics. Appendix E, Report of the ad hoc Experts Group on Socio-economic indicators: 54-57.

FAO, Fisheries Technical Paper, no. 377 (1999) Economic viability of marine capture fisheries. Findings of a global study and an interregional workshop. Rome, 1998.

FAO/SMIAR, (2001). Poissons et produits halieutiques. Perspectives de l'alimentation **2** : 11 p.

- FAO/WHO (1999) Energy and protein requirements. Technical report of joint FAO/WHO/UNU expert consultation. *FAO/WHO and United Nations University, Geneva*, **724** : 116-129.
- FAO/WHO/UNU (1985) Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and the United Nations University, Geneva. Series n°. 724 : 113-121.
- Fernandez, L., Lopez, J.R., Secades, P., Menendez, A., Marquez, I., Guijarro, J.A. (2003). In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** : 7328 – 7335.
- Fields, R. (1971) The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods in Enzymology* **25**: 464-468.
- Fischer, D.J., Liliom, K., Guo, Z., Nusser, N., Virag, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, S., Erickson, J. R., Sun, G., Miller, D. D., Tigyi, G. (1998) Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **54**: 979-988.
- Fischer, W., Schneider, M. and Bauchot, M.L. (1987) Guide Fao d'Identification des Espèces pour les Besoins de la Pêche. Méditerranée et Mer Noire - Zone de Pêche 37. Volume 1: Végétaux et invertébrés. FAO, Rome.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.
- Food, P.R., Deibel, D. Morris, C.C. (1990) Visualization of the transparent, gelatinous house of the pelagic tunicate *Oikopleura vanhoeffeni* using *Sepia* ink. *Mar. Biol.* **115** (3): 445-452.
- Foster, N., Pestel, B., Mease, B. (1985) Ion exchange Chromatography and Spectrophotometry. *J. Chem. Ed.* **62**: 170-172.
- Fujimaki, M., Arai, S., Yamashita, M. (1977) Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. *Adv. Chem. Series* **160**: 156 - 184.
- Fujita, H, Yokoyama, K, Yoshikawa, M. (2000) Classification and antihypertensive activity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity derived from food proteins. *J Food Sci.* **65**: 564-569.

G

- Garcia-Diaz, Phillips, D.T. (1995) Principles of experimental design and analysis. Chapman & Hall (Eds.): 263 p.
- Garem, A., Daufin, G., Maubois, J.L., Chaufer B., Léonil, J. (1998). Ionic interactions in nanofiltration of β -casein peptides. *Biotechnol. Bioeng.* **57**: 109-117.
- Garem, A., J. Léonil, G. Daufin, Maubois, J.L. (1996). Nanofiltration d'acides aminés sur membranes organiques : influence des paramètres physico-chimiques et de la pression transmembranaire sur la sélectivité. *Lait* **76**: 267-281
- Gbogouri, G.A., Linder M., Fanni, J., Parmentier, M. (2006) Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by-products hydrolysates. *J. Food Sci.* : 69 (8): 615-622.
- Gekas, V., Persson, K.M., Wahlgren, M., Sivik, B. (1992) Contact angles of ultrafiltration membranes and their possible correlation to membrane performance. *J. Memb.Sci.* **72** (3): 293-302.

- Genecor International Inc. (2001) GC 710 Bacterial Neutral Protease - Product Information. Leiden, Netherlands: 2p.
- Gildberg A., Stenberg E. (2001) A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochem.* **36**: 809-12.
- Gildberg, A. (1992) Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.* **28**: 1-15.
- Gildberg, A. Raa, J. (1983) Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **B 114**: 97-101.
- Gildberg, A., Almas, J. (1986) Utilization of fish viscera. In "M. LeMaguer & P. Jelen (Eds). Food engineering and process applications – unit operations". Vol. 2 London, UK: Elsevier Science Publications: 383 – 393.
- Gildberg, A., Arnesen, J. A., Carlehög, M. (2002) Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.* **38**: 475-80.
- Gilmartin, L., Jervis, L. (2002) Production of cod (*Gadus morhua*) muscle hydrolyates. Influence of combinations of commercial enzyme preparations on hydrolysate peptide size range. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5417-5423.
- Giménez, B., Gomez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C., Montero, M.P. (2009) Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food Hydrocolloids* **23**: 1322–1327.
- Goupy, J. (1996) La méthode des plans d'expériences – Optimisation du choix des essais & de l'interprétation des résultats *Ed. Dunod.*, 324 p.
- Goupy, J. (1999) Plans d'expériences pour surfaces de réponse. *Ed. Dunod.*, 301 p.
- Gourley, L., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. (2003) Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied *Lait* **75** : 259-269.
- Groleau, P. E., Lapointe, J.-F., Gauthier, S. F., Pouliot, Y. (2004). Effect of aggregating peptides on the fractionation of β -LG tryptic hydrolysate by nanofiltration membrane. *J. Memb. Sci.* **234**: 121-129.
- Gueguen, Y., Herpin, H., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.M., Bulet, Gonzalez, M., Lelong, C. Favrel, P. Bachère, E. (2005) Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities and gene expression. *J. Biol. Chem.* **281** (1): 313–323.
- Guérard, F. (2004) New and exciting use of peptides from by-products and under-utilised resources. In "SEAFOODplus". Copenhagen, Danemark: 1-20.
- Guérard, F., Batista, I., Pires, C., Thorkelson, G., Le Gal Y. (2004) Report on sources and selection criteria for raw material. *Rapport établi pour le programme SEAFOODplus*, 57 p.
- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., Binet, A. (2001) Enzymatic hydrolysis of protein from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **11**: 1051-1059.
- Guérard, F., Guimas, L., Binet, A. (2002) Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic* **19-20**: 489-498.

- Guérard, F., Sellos, D., Le Gal, Y. (2005). Fish and Shellfish Upgrading, Tracability. In: *Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer, Le Gal et Ulber Eds, **96**: 127-163.
- Guerra, A. (2006) Ecology of *Sepia officinalis*. *Vie Et Milieu* **56**, 97-107.
- Guizani, N., Rolle, R.S., Marshall, M.R., Wei, C.I. (1991) Isolation, purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* **89**: 517-521.

H

- Haard, N.F., Simpson, B.K. (1994) Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In: *Fisheries Processing: Biotechnological applications*. A.M. Martin (Eds), Chapman & Hall Press, London: 132-154.
- Hanlon, R.T., Ament, S.A. and Gabr, H. (1999) Behavioral aspects of sperm competition in cuttlefish, *Sepia officinalis* (Sepioidea: Cephalopoda). *Mar Biol* **134** (4): 719-728.
- Hardwick, J.E., Glatz, C.E. (1989) Enzymatic hydrolysis of corn gluten meal. *J. Agric. Food Chem.* **37**: 1188-1192.
- Henry, J., Koueta, N., Boucaud-Camou, E. and Lubet, P. (1994) Recent advances in cephalopod reproduction: the cuttlefish as a model. *Année Biologique* **33**: 139-155.
- Hétru, C., Hoffmann, D., Bulet, P. (1998) Antimicrobial peptides from insects. In: "Brey, P.T., Hultmark, D. (Eds). Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects". Chapman & Hall, London, pp: 40-66.
- Heu, M. S., Kim, H. R., Pyeun, J. H. (1995). Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem Physiol. B* **112**: 557-567.
- Hevia, P., Whitaker, J.R., Olcott, H.S. (1976) Solubilisation of fish protein concentrate with proteolytic enzymes. *J. Agric. Food Chem.* **24** (2): 383-385.
- Horvath, C (1981) Ion Exchange and Solvent Extraction, J. A. Marinsky et Y. Marcus (Eds.), C.R.C. Press: 45-52.
- Hoyle, N.T., Merrit, J. H. (1994) Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* **59**: 76-79.
- Huang, X. L., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E. (1996) Improved emulsifying properties of β -barrel domain peptides obtained by membrane-fractionation of a limited tryptic hydrolysate of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 3437-3443.
- Humphrey, J.L., Keller, G.E. (2001) Procédés de séparation : techniques, sélection dimensionnement. Ed. Dunod, Paris: 352 p.
- Huss, H.H. (1988) Le poisson frais: qualité et altération de la qualité. Manuel de formation préparé pour le programme de perfectionnement FAO/DANIDA sur la technologie du poisson et le contrôle de qualité. Collection FAO: Pêches n° 29: 130 p.
- Huss, H.H. (1995) Assurance qualité des produits de la mer. FAO, Document techniques sur les pêches - **T334**: 186 p.

Iacobucci, G.A., Myers, M. J., Emi, S., 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**: 83-95.

James, D. (1992) Seafood technology in the 90s: the needs of developing countries. In: "*Seafood science and technology*". Blight E.G (Eds), Fishing new books, Oxford: 12-23.

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 p.

Jayaraj, S.S., Thiagarajan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P. (2008). Isolation, purification and characterization of [beta]-1,3-glucan binding protein from the plasma of marine mussel *Perna viridis*. *Fish Shellfish Immunol.* **24**: 715–725.

Je, J.Y., Park, P. J., Kim, S. K. (2005) Antioxydant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theraga chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.* **38**: 45-50.

Jeantet, R. Schuck, P., Famelart, M.H., Maubois, J.L. (1996) Nanofiltration benefit for production of spray-dried demineralized whey powder. *Lait* **76**: 283-301.

Jeon, Y.J., Byun, H.G. et al. (1999) Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochem.* **35**: 471-478.

Jia, J., Zhou, Y., Lu, J., Chen, A., Li, Y., Zheng, G. (2010) Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. *J. Sci. Food Agric.* **90**: 635–640

Jones, D.A., Kanazawa, A., Rahman, S.A. (1979) Studies of the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus* bate. *Aquaculture* **17**: 33-43.

Jonsson, G. Boesen, C.E. (1977) Concentration polarization in a reverse osmosis test cell. *Desalination* **21(1)**: 1-10

JORT, (1994) Journal Officiel de la république Tunisienne: 288-302.

Joseph, S.M., Nair, R.J., George, M.C., Pillai, D., Sherief, P.M. (2006) Antiatherogenic activity of cuttlefish liver oil in rats fed high fat diet. In: Book of Abstracts, pp. 82. 7th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, November 2–5, Kochi, India, National Institute of Oceanography, Goa, India.

Jun S.Y., Park P. J., Jung W. K., 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**: 20-26.

Jung, S., Roussel-Philippe, C., Briggs, J.L., Murphy, P.A., Johnson, L.A. (2004) Limited hydrolysis of soy proteins with endo- and exoproteases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81(10)**: 953-960.



- Kabre, P., Prtit, M. (1994) Fish-meal supplement for severely undernourished ewes: effects on apparent digestibility and utilization of diet. *Anim. Prod.* **58**: 127-133.
- Kanazawa, A., Shimana, M., Kawazaki, M., Kashiwada (1970) Nutritional requirements of prawn. I. Feeding on artificial diet. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **36**: 949-954.
- Kappenstein, C. (1978) Les résines échangeuses d'ions. Notions théoriques et expériences de cours. *Bull. Un. Phys.* **606**: 1341-1348.
- Kartika, I.A (2005) Nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol: expression et extraction en extrudeur bi-vis, purification par ultrafiltration des graines de tournesol. *Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse*: 339 pages.
- Kazemimoghadan, M., Mohammadi, T.(2007) Chemical cleaning of ultrafiltrati on membranes in the milk industry. *Desalination* **204**: 213-218.
- Kemphorne, O. (1952) The design ans analysis of experiments. John Wiley & Sons (Eds.): 104 p.
- Kim, S, Cho, S.H, Park, H. (2002) Effects of particle size distribution on the cake formation in crossflow microfiltration. *Proceedings of the 2nd World Water Congress: Drinking Water Treatment*: Oct 15-19, 2001 Berlin, Germany. Volume 2, issue 2: 305-311
- Kim, S.K., Mendis, E. (2006) Bioactive compounds from marine processing by-products - A review. *Food Res. Int.* **39**: 383-393.
- Kinsella, J.E. (1988) Food lipids and fatty acids: Importance in food quality, nutrition and health. *Food Technol. - Chicago, october, 1988*: 124-145.
- Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., Nonami, Y. (2005) Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *J. Food Biochem.* **29**: 459-469.
- Kishimura, H., Hayashi, K., Myashita, Y., Nonami, Y. (2006) Characteristics of trypsins from the viscera of the true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric caeca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chem.* **97**: 65-70.
- Klompong, V. Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. (2009) Characteristics and use of yellow Stripe trevally hydrolysate as culture media. *J. Food Sci.* **74** (6): 219-225.
- Knicker, H., Almendros, G., González-Vila, F.J., Lüdemann, H.D., Martin F. (1995) C13 and N15 NMR analysis of some fungal melanins in comparison with soil organic matter. *Org. Geochem.* **223**: 1023–1028.
- Kolega, M., Grohmann, G.S., Chiew, R.F., Day, A.W. (1991) Disinfection and clarification of treated sewage by advanced microfiltration. *Water Sci and Technol* **23** (7-9): 1609-1618.
- Kolodziejska, I., Sikorski, Z.E. (1996) The digestive proteases of marine fish and invertebrates. *Bull. Sea Fish Inst.* **1**: 51-56.
- Kris-Etherton, P., Psota, T. L., Gebauer, S. K. (2006) Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am. J. Cardiol.* **98**: 3-18.
- Kristinsson H.G., Rasco B. A. (2000b) Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochem.* **36**: 131-9.

- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A. (2000a) Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.* **40** (1): 43-81.
- Ktari-Chakroun, F. et Azouz, A. (1971). Les fonds chalutables de la région sud-est de la Tunisie (golfe de Gabès). *Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Mer* **2** (1): 5-47.
- Ktari-Chakroun, F., Azouz, A. (1971) Les fonds chalutables de la région sud-est de la Tunisie (golfe de Gabès). *Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Mer.* **2** (1), 5-47.
- Kyllönen, H.M., Pirkonen, P., et al. (2005) Membrane filtration enhanced by ultrasound: a previous review. *Desalination* **181** (1-3): 319-335.

L

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lahl, W. J., Braun, S. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* **48** : 68-71.
- Lalasis, G., Boström, S., Sjöberg, L. B. (1978) Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: chemical composition and nutritive values. *J. Agric. Food Chem.* **28** 751-756.
- LaPointe, J.F. (2004) Etude du fractionnement par nanofiltration et électrofiltration de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique de la beta-lactoglobuline. *Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'Alimentation, Laval, Canada*: 302 p.
- Larsson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., 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**: 935-945.
- Le Bihan, E. (2006) Valorisation des co-produits issus de la pêche des céphalopodes : applications à la seiche *Sepia officinalis*. *Thèse de Doctorat, Université de Caen (France)*: p 6.
- Le Bihan, E., Perrin, A., Koueta, N. (2004) Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **309**, 47-66.
- Le Bihan, E., Perrin, A., Koueta, N. (2007) Effect of different treatments on the quality of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) viscera. *Food Chem.* **104** (1): 345-352.
- Le Bihan, E., Zatylny, C., Perrin, A., Koueta, N. (2006) Post-mortem changes in viscera of cuttlefish *Sepia officinalis* L. during storage at two different temperatures. *Food Chem.* **98** (1): 39 - 51.
- Le Guilly, L. (1996) Séparation par méthodes chromatographiques de deux acides a-aminés présents dans un produit pharmaceutique. *Bull. Un. Phys.* **668**: 269-275.
- LeBrun, F., Bazus, A. et al. (1998) Influence on molecular interactions on ultrafiltration of a bovine haemoglobin hydrolysate with an organic membrane. *J. Memb. Sci.* **146**: 113-124.
- Lee, D.N., Merson, R.L. (1975) Chemical treatments of cottage whey to reduce fouling of ultrafiltration membranes. *J Food Sci* **41** (4) : 778-786.
- LeGoff, R., Daguzan, J. (1991) Growth and life cycles of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) in south Brittany (France). *Bull. Mar. Sci.* **49**: 341-348.

- LeMoullac, G., Van Wormoudt, A., Aquacop (1994) Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* (Crustacea, decapoda) larvae. *Aqua. Living Res.* **7**: 203-210.
- Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S., Henry, G. (1994). Precipitation of hydrophobic peptides from tryptic casein hydrolysate by salt and pH. *Enzyme Microb Technol.* **16**: 591-595.
- Leveau, J.Y., Bouix M. (1999) Bio-ingénierie. In: "Biotechnologie". *Tech et Doc, Lavoisier, Paris* : 229-313.
- Lian, P. Z. and C. M. Lee. (2003) Characterization of squid hydrolysate for its potential as aquaculture feed ingredient. Pages 379–380 in Proceeding of the First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT), June 10–14, Reykjavik, Iceland.
- Lian, P.Z., Lee, C.M. (2008) Development of a squid-hydrolysate-based larval diet and its feeding performance on summer flounder, *Paralichthys dentatus*, larvae. *J. World Aquacul. Soc.* **39** (2): 196 - 204.
- Lian, P.Z., Lee, C.M., Park, E. (2005) Characterization of squid-processing byproduct hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient *J Agric. Food Chem.* **53** (14): 5587-5592 .
- Liaset, B. and Espe, M. (2008) Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochem* **43**: 42-48.
- Liaset, B., Julsham, K., Espe, M. (2003) Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex. *Process Biochem.* **38**: 1747-1759.
- Liaset, B., Lied, E., Espe, M. (2000) Enzymatic hydrolysis of by-products from the fishfilleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric.* **81**: 881-889.
- Lin, L., LI, B. (2006) Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. *J. Sci. Food Agric.* **86** (14): 2290-2295.
- Livingstone, D.R., Pipe, R.K. (1992) Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. *Dev Aquac Fish Sci* **25**, 424–464.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lucero, M.T., Farrington, H., Gilly, W.F. (1994) Quantification of L-Dopa and Dopamine in squid ink - Implications for chemoreception. *Biol. Bull.* **187**, 55-63.

M

- Mackie, I.M. (1982) General review of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Technol.* **7**: 113-124.
- Mackintosh, J.A. (2001) The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *J. Theor. Biol.* **211**: 101-113.
- Mafart, O. (1996) Génie industriel et alimentaire - Les procédés physiques de conservation. Tome I. "Tec & Doc", Lavoisier (Eds), Paris: 235-312.
- Mafart, P., Béliard, E. (2004) Génie industriel alimentaire - Les procédés physiques de conservation, Tome I. "Tec & Doc", Lavoisier (Eds), Paris: 235-312.

- Mahadik, S.P., Evans, D., Lal, H. (2001) Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acids supplementation on schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **23**: 463-493.
- Mahmoud, M.I. (1994) Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* **48**: 89-95.
- Mai, K., Li, H., Ai, Q., Duan, Q., Xu, W., Zhang, C., Zhang, L., Tan, B., Liufu, Z. (2006) Effects of dietary squid viscera meal on growth and cadmium accumulation in tissues of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier 1828). *Aquaculture Res.* **37**: 1063-1069.
- Maktoob, A., Ronald, H.T. (1997) Handbook of natural products from marine invertebrates. *Phyllum mollusca Part. 1*. Harwood academic publishers: 1-288.
- Mangold, K. (1982). Quelques aspects de la croissance des Céphalopodes. *Océanis* **8** (7), 533-549.
- Mangold, K. (1989) Organes génitaux. In "Traité de zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes". Paris. pp 459-492.
- Mangold, K., Bidder, A.M. and Portmann, A. (1989) Organisation générale des cephalopodes. In "Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes". Paris pp 7-69.
- Mangold, K., Boletzky, S. (1973) New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.*, **19** : 7-12.
- Mannheim, A., Cheryan, M. (1990). Continous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.* **55**: 381-385.
- Martínez-Montaña, E., Peña, E., Focken, U., Viana, M.T. (2010) Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): In vitro uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture* **299**: 134-139
- Martin-Orue, C., S. Bouhallab, Garem, A. (1998). Nanofiltration of amino acid and peptide solutions: mecanisms of separation. *J. Memb. Sci.* **142**: 225-233.
- Maubois, J.L., Roger, L., Brulé, G., Piot, M. (1979) Hydrolysats enzymatique total de protéines de lactosérum, obtention et applications. *Fr. Patent n° 79 16483*.
- Maurel A. (2001) Dessalement de l'eau de mer et des eaux saumâtres - Et autres procédés non conventionnels d'approvisionnement en eau douce, "Tec et Doc", 274 p.
- Maurel, A. (1993) Techniques séparatives à membrane. Considérations théoriques. *Doc. Int* **6**, 2792.
- Mavrov, V., Bélières E. (2000) Reduction of water consumption and wastewater quantities in food industry by water recycling using membrane processes. *Desalination* **131** (1-3), 75-86.
- Mayer, A.M.S., Rodriguez, A.D., Berlinck, R.G.S., Hamann, M.T. (2007). Marine pharmacology in 2003-4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* **145**: 553-581.
- Mc Burney, C.H. (1947) US Pat. 2 591 573.
- Médale, F., Lefèvre, F., Corraze, G. (2003) Qualité nutritionnelle des poissons. Constituants de la chair et facteurs de variations. *Cahiers de la Nutrition et de la diététique* **38**, 37- 44.

- Meisel, H., Frister, H. (1989). Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digests of casein. *J. Dairy Res.* **56**: 343-349.
- Melhaoui, A., Ben Salem, W., Ahdad, F., Decontencin, F.X. (1998) Plans d'expériences selon la méthode Taguchi. *La Technique Moderne*, **9-10**. 241 p.
- Mendjel, H. (1984) Synthèse et caractérisation de nouvelles membranes synthétiques asymétriques à propriétés hémocompatibles. *Thèse d'état. Université Montpellier II*. 416 p.
- Merritt, J.H. (1982) Assessment of the production costs of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1**: 147-151.
- Mertz, E.T. (1975) Breeding for improved nutritional values in cereals, 1-12 in Friedman M.
- Michel, C., Nougayrède, P., Eldar, A., Sochon, E., deKinkelin, P. (1997). *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Dis. Aquat. Organ.* **30**: 199-208
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P. (2000) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters* **486**: 185-190.
- Mizuki, H., Washio, S., Morita, T., Itoi, S., Sugita, H. (2006) Distribution of a fish pathogen *Listonella anguillarum* in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery. *Aquaculture* **261**, 26-32.
- Mochizuki, A. (1979) An antiseptic effect of the cuttlefish ink. *Bull Jap Soc Sci Fish* **45 (11)**, 1401-1403.
- Montfort, P., Baleux, B. (1990) Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1999-2006.
- Mortensen, S.H., Børsheim, K.Y., Rainuzzo, J.R., 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**: 173-185.
- Mukundan, M., Antony, P., Nair, M. (1986) A review on autolysis in fish. *Fish. Res.* **4** : 259-269.
- Mulder, M. (1951) Basic principles of membrane technology. 2nd ed. *Kluwer Academic Publishers*, London: 564 p.
- Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, S., Onimura, K., Matsumoto, M., Shioda, M., Yoshida, S., Shoji, M., 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**: 57-60.
- Muthukumar, S., Yang, K., et al. (2004) The use of ultrasonic cleaning for ultrafiltration membranes in the dairy industry. *Sep. Purif. Technol.* **39**: 99-107.

N

- Najai, S. (1983) Contribution à l'étude de la biologie des pêches des céphalopodes de Tunisie. Application à l'espèce *Sepia officinalis* Linné, 1758. *Thèse de Doctorat. Université de Tunis*, 229 p.
- Najai, S. et Ktari, M.H. (1979) Etude du régime alimentaire de la seiche *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda) du Golfe de Tunis. *Bull Inst Nat Sci Techn Océan Pêche, Salammbô, Tunis.* **6 (1-4)**, 55-61.

- Nakajima, M., Shoji, T., Nabetani, H. (1992) Protease hydrolysis of water soluble fish protein using a free enzyme membrane reactor. *Process biochem.* **27**: 166-170.
- Naraoka, T., Chung, H.S., Uchisawa, H., Sasaki, J.I., Matsue, H. (2000) Tyrosinase activity in antitumor compounds of squid ink. *Food Sci. Technol. Res.* **6 (3)**: 171-175.
- Neifar, A., Ben Rebah, F., Gargouri, A., Abdelmouleh, A. (2008) Physicochemical characterization of *Sepia officinalis* ink and the effects of storage conditions on the coagulation process. *J.Mar. Biol. Assoc. U. K.* **89(4)**: 803–807.
- Nicolaus, R.A. (1968) Melanins. *Hermann Press*, Paris, 180 p.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001) Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Food Chem. Toxicol.* **66**: 642–646.
- Nielsen, P.M. (1997) Functionality of protein hydrolysates. In: Damodaran S. et Paraf A. (Eds), Food proteins and their applications. Marcel Dekker, NY (USA): 443-473.
- Normah, I., Jamilah, B., Saari, N., Che Man Yaakob, B. (2005) Optimization of hydrolysis conditions for the production of Threadfin Bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by Alcalase. *J. Muscle Food* **16(2)**: 87-102.
- Novozymes (2001a). Protamex[®] Special food product sheet: 1-3. Novozymes A/S. Bagsvaerd, Denmark: 2p.
- Novozymes (2001b). Alcalase[®] Special food product sheet: 1-3. Novozymes A/S. Bagsvaerd, Denmark: 2p.
- Novozymes (2001c). Flavourzyme[™] Special food product sheet: 1-3. Novozymes A/S. Bagsvaerd, Denmark: 2p.
- NRC, National Research Council (1993) Nutrient requirements of fish. Washington, National Academy of Science. p.124.

O

- OFIMER (2007) La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture : Situation et perspectives. 4ème symposium Santé Mer - octobre 2007
- OFIMER, (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 p.
- 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 p.
- Olicard, C. Didier, Y. Marty, C., Bourgougnon, N., Renault, T. (2005) In vitro research of anti-HSV-1 activity in different extracts from Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **67 (1-2)**: 141-147.
- Olivari, C. (1933) La farine de poisson. *Recherches et techniques* Tome **VI**. - Fas. **4 (24)**: 330-500.
- Olivia-Teles, A., Cerqueira, A. L., Gonçalves, P. (1999) The utilisation of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture* **179**: 195-201.

- ONAS (1989) Rejets d'effluents dans le milieu hydrique. Norme tunisienne homologuée par arrêté du ministre de l'économie nationale du 20 juillet 1989. *Rapport interne sur la protection de l'environnement*, 30 pages.
- Ono, S., Kasai, D., Sugano, T., Ohba, K., Takahashi, K., (2004) Production of water soluble antioxydative plastein from squid hepatopancreas. *J. Oleo Sci.* **53** (5): 267-273.
- Ørskov, E.R., Soliman, H. S., Clark, C. F. S. (1982) Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. *Anim. Feed Sci. Tech.* **7**: 135-140.
- Ortonne, J.P., Voulot, C., Khatchadourian, C., Palumbo, A. Prota, A. (1981) A reexamination of melanogenesis in the ink gland of cephalopods. In Seiji M. (ed.) Phenotypic expression in pigment cells. Tokyo: University of Tokyo Press: 49-47.
- Ozyurt, G., Duysak, O., Akamca, E. and Tureli, C. (2006) Seasonal changes of fatty acids of cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca : Cephalopoda) in the north eastern Mediterranean sea. *Food Chem.* **95**, 382-385.

P

- Palumbo, A. and Jackson, I.J. (1995) Peroxydase activity in the ink gland of *Sepia officinalis* and partial nucleotide sequence of a candidate cDNA encoding the enzyme. *Biochem Biophys Acta* **1247**: 173-178.
- Panasiuk, R., Amarowicz, R., Kostyra, H., Sijtsma, L. (1998) Determination of aminonitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of the three analytical methods. *Food Chem.* **62**: 363-367.
- Panizzi, I. and Nicolaus R.A. (1952) Ricerche sulle melanine. I. Sulla melanina di seppia. *Report of Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali della Accademia dei Lincei, Serie VIII, Vol. XII*, 420.
- Parant, M. (1998) Le métabolisme des xénobiotiques chez les bivalves. *C R Acad Sci., Paris* **321**, 485-494.
- Pastoriza, L., Sampedro, G., Cabo, M.L., Herrera, J., Bernardez, M. (2003) Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. *J Sci Food Agric.* **84**: 83-88.
- Patterson Edward, J.K., Murugan, A. (2000) Screening cephalopods for bio-activity. *Proceedings of the 10th International Congress and Workshop of The Tropical Marine Mollusc Programme (TMMP)*, 20-30 october, **21** (1), 253-256.
- Pawson, M.G. (1977) Analysis of a natural chemical attractant for whiting *Merlangius merlangus* L. and cod *Gadus morhua* L. using a behavioural bioassay. *Comp. Biochem. Physiol.* **56A**: 129-135.
- Pernice, M., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S. and Boucher-Rodoni, R. (2007) Identification of a *Vibrio* strain producing antimicrobial agents in the excretory organs of *Nautilus pompilius* (Cephalopoda : Nautiloidea). *Rev Fish Biol Fish.* **17**: 197-205.
- Perrin, A. (2004) Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode): Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. *Thèse de Doctorat, Univ. Caen*: 152 p.
- Perrin, A., Le Bihan, E., Koueta, N. (2004) Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **311** (2): 267-285

- Pezzella, A., d'Ischia, M., Napolitano, A., Palumbo, A., Prota, G. (1997) An integrated approach to the structure of Sepia melanin. Evidence for a high proportion of degraded 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid units in the pigment backbone. *Tetrahedron* **53**: 8281-8286.
- Pezzella, A., Vogna, D., Prota, G. (2003) Synthesis and optically active tetrameric melanin intermediates by oxidation of the melanogenic precursor 5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid under biomimetic conditions. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**: 1133-1140.
- Piattelli, M. and Nicolaus, R.A. (1961) The structure of melanins and melanogenesis. I. The structure of melanin in *Sepia*. *Tetrahedron* **15**, 66.
- Piattelli, M., Fattorusso, L., Magno, S. and Nicolaus R.A. (1963) The structure of melanins and melanogenesis. III. The structure of sepiomelanin. *Tetrahedron* **19**: 2061.
- Piclet, G. (1987) Le poisson aliment. Composition - intérêt nutritionnel. *Cahiers de la Nutrition et de la Diététique* **4**, 317-36.
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, J.P., Guérard, F., Chabeaud, A., Piot, J.M. (2006) Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochem.* **41** (5): 1217-1222.
- Pigott, G.M. (1997) Enzyme hydrolysis of fish waste for animal feed and fertilizer. In: *Seafood safety processing and biotechnology*. F. Shahidi, Y. Jones, and D.D. Kitts (Eds). Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster, PA (USA): 249 - 258.
- Pillet, M (1994) Introduction aux plans d'expériences par la méthode Taguchi. *Les Editions d'Organisation Université* (Eds): 203 p.
- Pinczon Du Sel, G et Daguzan, J. (1991) Contribution à la connaissance du régime alimentaire de la seiche (*Sepia officinalis* L.) (Mollusque, Céphalopode) dans le nord du Golfe de Gascogne et dans le Golfe du Morbihan : résultats préliminaires. *Ifremer, Actes de Colloques*, no. **14**. In "Les mollusques marins. Biologie et aquaculture". Ed. Société Française de Malacologie, 155-172.
- Piot, M., Maubois, J.L., Schaegis, P., Veyre R. (1984) Microfiltration en flux tangentiel des lactosérums de fromagerie. *Le Lait* **64**, 102-120.
- Pirini, M., Gatta, P.P., Testi, S., Trigari, G., Monetti, P.G. (2000) Effect of refrigerated storage on muscle lipid quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) des on diets containing different levels of vitamin E. *Food Chem.* **68**: 289 - 293.
- Pontie, M., Buisson, H., Diawara, C.K. (2003) Studies of halide ions mass transfer in nanofiltration - application to selective defluorination of brackish drinking water. *Desalination* **157** (1-3), 127-134.
- Pouliot, Y., M. C. Wijers, S. F. Gauthier, Nadeau, L. (1999). Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *J. Memb. Sci.* **158**: 105-114.
- Pouliot, Y., S. F. Gauthier, L'Heureux, J. (2000). Effect of peptide distribution on the fractionation of whey protein hydrolysates by nanofiltration membranes. *Lait* **80**: 113-122.
- Prota, G. (1992) Melanins and melanogenesis. *New York: Academic Press*, 1-290.
- Prota, G., Ortonne, J.P., Voulot, C., Khatchadourian, C., Nardi, G., Palumbo, A. (1981) Occurrence and properties of tyrosinase in the ejected ink of cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol.* **68**: 415-419.

Puglia, C., Tropea, S., Rizza, L., Santagati, N. A., 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: 41-48.

Puigserver, A.J., Sen, L.C., Clifford, A.J., Feeney, R.E., Whitaker, J.R. (1978) A method for improving the nutritional value of food proteins: Covalent attachment of amino acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **105**: 587 - 612.

Q

Quaglia, G.B., Orban, E. (1990) Influence of enzymatic hydrolysis on the stability of the protein hydrolysates from sardine *Sardina pilchardus* protein hydrolysate. *J. Sci. Food Agric.* **55**: 1571-1573.

Quaglia, G.B., Orban, E. (1987) Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.* **38**: 271-276.

R

Raa, J., Gildberg, A. (1976) Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. *J. Food Technol.* **11**: 619-628.

Rajapakse N., Jung W. K., Mendis E., Moon S. H., Kim S. K. (2005) A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences* **76**: 2607-2019.

Raksakulthai, R., Haard, N.F. (2003) Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: A review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* **43(4)**: 401-445.

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.* 1120-1125.

Ravallec-Plé R., 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**: 669-679.

Ravallec-Plé, R. (2000) Valorisation d'hydrolysats d'origine marine: optimisation de la concentration des peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétragogues. *Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*: 171 p.

Ravallec-Plé, R. Gilmartin, L., Van Wormhoudt, A., Le Gal, Y. (2001) Influence of the experimental conditions on the hydrolysis process in fish hydrolysates. *M. Hofman and P. Thonart (Eds.), Engineering and Manufacturing for Biotechnology*: 51-58.

Remigy, J.C., Desclaux, C. (2007) Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. *Génie des Procédés. Techniques de l'ingénieur W4*: 90 p.

Reynolds, E. C., Riley, P. F., Adamson N. J. (1994). A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification. *Anal. Biochem.* **217**: 277-284.

Rhodes, M.W., Kator, H. (1988) Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2902-2907.

- Richard, A. (1971) Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (mollusque : céphalopode). *Thèse, Université de Lille, France*: 264 p.
- Richard, A. (1975) L'élevage de la seiche (*Sepia officinalis* L, Mollusque: Céphalopode). *10th Europ Symp Mar Biol Ostend (Belgium)* **1**,359-380.
- Riley, P.A. (1997) Melanin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29**, 1235-1239.
- Ringo, E. (2008). The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquacult. Res.* **39**: 171–180.
- Ritchie, A.H., Mackie, I. M. (1982) Preparation of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **7**: 125-133.
- Robles, R. (1999) Review of Mediterranean Fisheries Situation and Management, Informes y estudios COPEMED, n°1: 120 p.
- Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., Aumelas, A. (2008) NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Developmental and Comparative Immunology* **32**: 227 - 238.
- Rocha, F., Guerra, A., Gonzalez, A.F. (2001) A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biol. Rev.* **76**, 291-304.
- Roose, P., Smedes, F. (1996) Evaluation of the QUASIMEME lipid intercomparison: the Bligh & Dyer total lipid extraction method. *Mar. Poll. Bull.* **32 (8-9)**: 674-680.
- Rose, E. (1921) Un mode Indo-Chinois d'utilisation du poisson: le «Nuoc-mam ». *Bul. Soc. Hyg. Alim.* **9**: 547-557.
- Rosset, R. Caude, M., Jardy, A. (1991) Chromatographies en phases liquide et supercritique, Ed. Masson, Paris, 3^e éd: 362 p.
- Rouessac, F., Rouessac A. (1997) Chromatographie en phase gazeuse. *Dans Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. Masson, Paris* : 21-42.
- Rousseau, M., Batista, I., Le Gal, Y., Fouchereau-Péron, M. (2001) Purification of a functional competitive antagonist for calcitonin gene related peptide action from sardine hydrolysate. *EJB*, **4**: 25-32.
- Roy, P., Durand, P. (1997). Les enzymes dans la fabrication d'aliments à base de produits de la mer. *In: Enzymes en agroalimentaire. Larreta-Garde (Eds). Tec et Doc, Lavoisier, Paris*: 95-120.
- Royer, J. (2002) Modélisation des stocks de céphalopodes de Manche. *Thèse de Doctorat, Université de Caen, France*. 242 p.
- Rozanowska, M., Sarna, T., Land, E.J., Truscott, T.G. (1999) Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biol Med* **26**: 518-525.

S

- Sadok, S., Abdelmouleh, A. and El Abed, A. (2004) Combined effect of *Sepia* soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus*. *Food Chem.* **88**, 115-122.

- Sainclivier, M. (1985) L'industrie alimentaire halieutique - Chapitre VII: Les hydrolysats.. *R. Sciences Agronomiques. Rennes. Bulletin Scientifique et Technique de l'Ecole Nationale supérieure Agronomique et du centre de recherches de Rennes. Volume I: Le poisson matière première: 230 p.*
- Saksena, S., Zydney, A.L. (1994) Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins (IgG) by selective filtration. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 960-968.
- Sandifer, P.A. Joseph, J.D. (1976) Growth responses and fatty acid composition of juvenile prawns *Macrobrachium rosenbergii* fed on prepared ration augmented with shrimp head oil. *Aquaculture* **8**: 129 – 139.
- Sanger, F. (1949) The terminal peptides of insulin. *Biochem. J.* **45**: 563-574.
- Sarna, T., Rozanowska, M., Edge, R., Land, E.J., Truscott, T.G. (1999) Interaction of melanin with carotenoid radical cations. *Photochem Photobiol* **69**, 63S-63S.
- Sato, M, Hosokawa, T, Yamaguchi, T (2002) Angiotensin 1- converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria Pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J Agric. Food Chem.* **50**: 6245-6252.
- Sato, M., Funakoshi, I., Hayashi, K., Yamashina, I. (1982) Isolation and characterization of four forms of kallikrein from hog pancreas autolysate. *J. Biochem.* **92**: 1337-1345.
- Schimmer, S. (1981) Source book of enzymology. inc, Westport: 452 p.
- Schneider, M. (2001) Phospholipids for functional food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**: 98-101.
- Schraermeyer, U. (1994) Fine structure of melanogenesis in the ink sac of *Sepia officinalis*. *Pigment Cell Res* **7**, 52-60.
- Sen, D.P., Sripathy, N.V. (1962) Fish hydrolysates. I. Rate of fish flesh with papain. *Food Technol.* **16**: 138-141.
- Senan, V.P., George, M.C., Joseph, S.M., Pillai, D., Nair, J.R. and Sherief, P.M. (2004) Antiproliferative effect of cuttlefish ink extract on chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Seminar on New Frontiers in Marine Bioscience Research*, January 22-23: 35-39.
- Seo, J.K., Myron Crawford, J., Stone, K.L., Noga, E.J. (2005) Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**: 1998-2004.
- Sepulveda., P., Tang, J., Marcinişzyn, Jr., K. C. (1975) Primary Structure of Porcine Pepsin. III. Amino Acid Sequence of a Cyanogen Bromide Fragment, CB2A, and the Complete Structure of Porcine Pepsin. *J. Biol. Chem.*, **250**: 5082.
- Sgarbieri, V.C. (1987). Alimentacao e Nutricao: Fator de saude edesenvolvimento. UNICAMP, Campinas, Brazil.
- Shahidi F., Han X., Synowiecki J. (1995) - Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* **53**: 285-93.
- Shen, C., Xie, J., Xu., X.S. (2007) The components of cuttlefish (*Sepiella maindroni* de Rochebrunns) oil. *Food chem.* **102** (1): 210-214.
- Sherief, P.M., George, M.C., Nair, J.R., Pillai, D., Joseph, S.M., and Senan, V.P. (2004) Antibacterial activity in the extract of accessory nidamental glands of squid and cuttlefish. *Proceedings of the*

- National Seminar on New Frontiers in Marine Bioscience Research, January 22-23, 2004. pp. 47-51.
- Sherief, P.M., Pillai, D., Nair, R.J., George, M.C., Joseph, S.M., Senan, P.V. (2006) Bioactive substances from squid and cuttlefish processing waste. *In: Book of Abstracts*, pp. 81. 7th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, November 2–5, Kochi, India.
- Shimmerling, P., Sisson, J.C., Zaidi, A. (1998) Pratique des plans d'expériences. Lavoisier (Eds.) *Tec & Doc*: 154 p.
- Shraemayer, U. (1994) Fine structure of melanogenesis in the ink sac of *Sepia officinalis*. *Pigment Cell Res.* **7**(1): 52-60.
- Shyla, G., Nair, C.M., Salin, K.R., Sherief, P.M., Mukundan, M.K. (2009) Liver oil of Pharaoh cuttlefish *Sepia pharaonis* Ehrenberg 1831 as a lipid source in the food of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). *Aquacult. Nutr.* **15**: 273-281.
- Sikorski, Z.E., Nacz, M. (1981) Modification of technological properties of fish protein concentrates. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*: 201-230.
- Sikorski, Z.E., Nacz, M. (1981) Modification of technological properties of fish protein concentrates. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*: 201-230.
- Silvestre, M. P. C. (1997) Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* **60** (2): 263-271.
- Simon, J.D. and Ito, S. (2004) The Chemical Structure of Melanin. *Pigment Cell Res.* **17**: 422-424.
- Simpson, B.K., Nayeri, G., Yaylayan, V., Ashie, I. N. A. (1998) Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chem.* **61**: 131-138.
- Šližyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., Rustad, T. (2005a) Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.* **40**: 2021-2033.
- Šližytė, R., Dauksās, E., Falch, E., Storrø, I., Rustad, T. (2005b) Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products, *Process Biochem.* **40**: 1415–1424 .
- Šližyte, R., Rustad, T., Storrø, I. (2005c) Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochem.* **40**: 3680-3692.
- Small, A.L., McFall-Ngai, M.J. (1999). Halide peroxidase in tissues that interact with bacteria in the host squid *Euprymna scolopes*. *J. Cell Biochem.* **72**: 445–457.
- Smyth, M., Fitzgerald, R.J. (1997) Characterization of a new chromatography matrix for peptide molecular mass determination. *Int. Dairy J.* **7**: 571-577.
- Soufi-Kechaou, E. Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P. Gouygou, J.P., Bergé, J.P., Ben Amar, R. (2009) Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *J. Biosc. Bioeng.* **107**(2): 158-164.
- Sousa, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F., Giordano, R.C. (2004) Kinetic model for whey protein hydrolysis by Alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Braz. J. Chem. Eng.* **21**(2): 147 - 153.

- Sovik S.L., Rustad, T. (2005) Proteolytic activity in by-products from cod species caught at three different fishing grounds. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 452-458.
- Sripathy, N.V., Sen, D.P. (1962) Fish hydrolysates. II. Standardisation of digestion conditions for preparations of hydrolysates rich in peptones and proteoses. *Food Technol.* **16**: 141-142.
- Stewart, J. C. M. (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **104**: 10-14.
- Stoknes, I., Rustad, T., 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**: 613-619.
- Strom, T., Eggum, B.O. (1981) Nutritional value of fish viscera silage. *J. Sci. Food Agric.* **3** : 115-120.

T

- Tacon, G.J. (1994) Feed ingredients for carnivorous fish species alternatives to fishmeal and other fishery resources. FAO Fisheries Circular, Roma: 24 p.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M.B., Styrvold, O.B., Haug, T. (2008) Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *J. Invert. Path.* **99**: 286-293.
- Takahashi, T. (1960) Studies on utilization of cuttlefish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* **26**: 95 – 98.
- Takai, M., Yamazaki, K., Kawai, Y., Imoune, N., Shinano, H. (1993) Effect of squid liver, skin, and ink on microbiological characteristics of ika-shiokara during ripening process. *Bull. Jap. Soc. Fish.* **59**: 1609-1615.
- Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H., Ochi, K. (2002) Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 315-320.
- Tanguy, H. (2006) Les pêches maritimes françaises : entre le défi du marché et le défi de l'aménagement du territoire : 83 p.
- Taylor, W.H. (1957) Formol filtration: an evaluation of its various modifications. *The Analyst* **82**: 488-498.
- Tessier, B., Harscoat, C. et al. (2006) Procédé membranaire pour la production de fractions peptidiques biologiquement actives issues de protéines de colza. *Récents Progrès en Génie des Procédés* **93(C26)**: 1-8.
- Timmer, J. M. K., Speelmans, M. P. J., Van Der Horst, H. C. (1998). Separation of amino acids by nanofiltration and ultrafiltration membranes. *Sep. Purif. Technol.* **14**: 133-144.
- Turgeon, S.L., Gauthier, S.F. (1990) Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. Production and characterization. *J. Food Sci.* **55**: 106 - 110.

V

- Vaillant, F., Dornier, M. (2001) Clarification et concentration des jus de fruits par techniques membranaires (évaporation osmotique, microfiltration tangentielle). *Fruitrop* **85**: 10-11.

- Vandanjon, L. Johansson, R. et al. (2007) Concentration and purification of blue whiting peptide hydrolysates by membrane processes. *J. Food Eng.* **83**: 581-589.
- Vidotti, R.M., Viegas, E.M.M., Careiro, D.J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Sci. Technol.*, 105: 199–204.
- Vigier, M.G. (1988) Pratique des plans d'expériences - Méthodologie Taguchi. *Ed. Les Editions d'Organisation* : 406 p.
- Visser, S., Noorman, H. J., Slangen, C. J., Rollema, H. S. (1989) Action of plasmin on bovin b-casein in a membrane reactor. *J. Dairy Res.* **56**: 323-333.
- Vizcarra-Magana, L., Avila, E., Sotelo, A. (1999) Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in boilers. *J. Sci Food Agric.* **79**: 1915-1922.

W

- Wakamatsu, K. and Ito, S. (2002) Advanced Chemical Methods in Melanin Determination. *Pigment Cell Res.* **15**, 174-183.
- Wang, Y., Zhu, F., Han, F., Wang, H. (2008) Purification and characterization of antioxydative peptides from salmon protamine hydrolysate. *J. Food Biochem.* **32** (5): 654-671.
- Wassawa J., Tang, J., Gu, X. (2008) Optimization of the production of hydrolysates from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin using Alcalase. *J. Food Biochem.* **32** (4): 460-473.
- Wavhal, D.S., Fisher, E.R. (2005) Modification of polysulfone ultrafiltration membranes fouled by CO₂ plasma treatment. *Desalination* **172** (12): 189-205.
- Weisinger, H.S., Armitage, J. A., Sinclair, A. J., Vingrys, A. J., Burns, P. L., Weisinger, R. S. (2001) Perinatal omega-3 fatty acid deficiency affects blood pressure later in life. *Nature Medecine* **7**: 258 - 259.
- Wijmans, J.G., Nakao S., Smolders, C.A. (1984) Flux limitation in ultrafiltration: Osmotic pressure model and gel layer model. *J Memb. Sci.* **20** (2) : 115-124.
- Wilson, R.P. (2002) Amino acids and proteins, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, CA, pp. 143–179.
- Wu, H.C., Chen, H. M., 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**: 949-957.

Z

- Zanetti, S., Deriu, A., Dupre, I., Sanguinetti, M., Fadda, G., Sechi, L.A. (1999). Differentiation of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from sardinian waters by ribotyping and a new rapid PCR fingerprinting method. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 1871–1875.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415** (6870): 389-395.
- Zatylny, C. (2000) Etude du contrôle de la ponte chez la seiche *Sepia officinalis* L.: Applications à la conservation des stocks et au repeuplement dans l'Ouest Cotentin. *Thèse de Doctorat, Université de Caen* : 1-119.

- Zeman, L.J. (1983) Adsorption effects in rejection of macromolecules by ultrafiltration membranes. *J. Memb. Sci.* **15**: 213-230.
- Zhang, W., Wahlgren, M., Sivik, B. (1989) Membrane Characterization by the Contact Angle Technique: II. Characterization of UF-Membranes and Comparison between the Captive Bubble and Sessile Drop as Methods to obtain Water Contact Angles. *Desalination* **72 (3)** : 263-273.
- Zhu, Y., Zhang, J., Shi, Z. M. (2004) Optimization of operating conditions in rice heat blast process for chinese rice wine. Production by combinational utilization of neural network and genetic algorithms. *J. Inst. Brew.* **110 (2)** : 117-123.
- Zydney, A.L. (1998) Protein separations using membrane filtration: new opportunities of whey fractionation. *Int. Dairy J.* **8**: 243-250.