

DE GRANADA



THESE (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 Granada

Disciplines : Génie Chimique

Etude de fractionnement des hydrolysats protéiques de co-produits de l'industrie de transformation du thon par ultrafiltration et nanofiltration

Présentée et soutenue publiquement

Par

Houssem SAADAOUI

Le 14 Janvier 2020

Devant le membre de jury composé de

André DÉRATANI	Professeur	Rapporteur
Mohamed BOUAZIZ	Professeur	Rapporteur
Mahmoud TRABELSI	Professeur	Président
Antonio María GUADIX ESCOBAR	Professeur	Examinateur
Raúl PÉREZ GÁLVEZ	Professeur	Directeur de thèse (UGR)
Raja BEN AMAR	Professeur	Directeur de thèse (FSS)

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales Autor: Houssem Saadaoui ISBN: 978-84-1306-595-3 URI: <u>http://hdl.handle.net/10481/63553</u>

INTRODUCTION

Actuellement, selon la FAO la production annuelle mondiale de poisson s'élève à plus de 167 millions de tonnes pêchées ou élevés (FAO, 2102). Ces poissons peuvent être consommés frais, congelés, séchés ou encore transformés. L'industrie de transformation du poisson à destination de l'alimentation humaine génère une énorme quantité de déchets estimée à 50% du volume total transformé (Je et al., 2007). Ces déchets sont très souvent directement rejetés dans l'environnement sans traitement approprié ce qui entraîne des problèmes environnementaux non négligeables. Or parmi les co-produits issus de cette transformation, certains déchets tels que les têtes, viscères, arêtes, queues, nageoires, reliquats de filetage et peaux renferment des constituants potentiellement intéressants (antioxydants, anti-stress, antihypertensifs, collagènes, pigments...) tant pour être utilisés en nutrition animale et humaine, ou encore dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique.

En outre la valorisation de ces coproduits est une solution attractive car elle permet d'une part de compenser la raréfaction de la ressource de certains produits et d'autre part, de limiter les frais de plus en plus importants de traitement des déchets, frais qui sont le plus souvent à la charge de l'entreprise sous forme de taxe d'enlèvement. Parmi les espèces les plus exploités, le thon a une valeur économique très important par rapport à d'autres espèces marines. La capture mondiale est d'environ 90,9 millions de tonnes en 2016 (FAO, 2018). La majorité de la quantité capturée fait l'objet de processus de transformation en usines (congélation, conserve...). Les coproduits générés sont considérables ; Soyiri et al., (2003) ont estimé que dans les conserveries de thon, de l'ordre de 60 à 70% du volume de poisson entrant se retrouvent sous forme de déchets.

Actuellement, ces déchets sont principalement transformés en farine et huile. Mais leur richesse en protéines permet d'envisager des voies de valorisation plus intéressante telle que la production de protéines destinées à l'alimentation humaine ou la production de peptides dotées d'activités biologiques intéressantes.

Récemment la mise en œuvre de procédés biologiques (protéolyse contrôlée utilisant des enzymes exogènes) a permis la récupération de peptides d'intérêt à partir de morue, sardine et de merlon bleu (Picot et al., 2006, Ravallec-Plé et al., 2001). Ces peptides se retrouvent en mélange au sein de l'hydrolysat or il est généralement admis qu'il existe une relation entre le poids moléculaire et les propriétés bio-fonctionnelles des peptides ; en particulier les peptides de masse moléculaire comprise entre 1 et 4 kDa semblent être

les plus intéressants (Hsu, 2010, Klompong et al., 2007, Li et al., 2009b, Li et al., 2009a). Une étape de purification et de concentration de ces hydrolysats s'avère donc indispensable pour augmenter leur valeur ajoutée et rendre économiquement viable la valorisation de ces déchets. Parmi les différents procédés de fractionnement envisageables, les procédés de séparation sur membrane semblent être une alternative intéressante. Il s'agit en effet de procédés de séparation basés sur la taille qui peuvent être mis en œuvre dans des conditions généralement qualifiées de « douces » (faible température, faible pression) garantissant ainsi une meilleure préservation des qualités fonctionnelles des produits traités. D'ailleurs des études centrées sur l'utilisation de ces techniques pour la séparation ou la concentration des protéines de coproduits de poisson ont été publiée récemment (Picot et al., 2006, Vandanjon et al., 2007, Bazinet et al., 2015, R. Abéjon et al., 2017, Pezeshk et al., 2018).

Au cours des 10 dernières années environ, un grand nombre de peptides biologiquement actifs ont été isolés des hydrolysats de protéines de sous-produits marins et, dans certains cas, caractérisés en détail (poids moléculaire, séquence d'acides aminés). Ainsi, la perspective d'utiliser des hydrolysats de sous-produits marins a pris de l'ampleur en se rendant compte que les sous-produits peuvent contenir des composants précieux et que les processus enzymatiques offrent la possibilité d'obtenir des produits sur mesure en termes de degré d'hydrolyse et, par conséquent, de taille de peptides. Un large éventail d'activités physiologiques, y compris les fonctions opioïdes, hypotensives (anti-ACE) et immunomodulantes, ont été associées à certaines fonctions spécifiques dérivées d'hydrolysats de protéines présentent des propriétés antioxydantes. Le terme antioxydant est défini comme "toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche de façon significative l'oxydation de ce substrat".

Toutefois, l'utilisation d'antioxydants synthétiques dans les produits alimentaires est interdite ou soumise à une réglementation stricte en raison des risques potentiels pour la santé causés par ces composés. Par conséquent, la demande d'antioxydants naturels en tant qu'alternative aux antioxydants synthétiques a récemment augmenté en raison de questions concernant la perception négative des consommateurs d'antioxydants synthétiques. En réponse à la communauté scientifique, il y a eu des recherches intensives dans ce domaine au cours des dix dernières années.

4

Dans la production de peptides antioxydants à partir de sous-produits marins à l'aide d'une hydrolyse enzymatique, trois facteurs principaux semblent être les plus importants dans la libération de peptides antioxydants : (i) la nature du matrice, (ii) l'impact du choix de la protéase et (iii) l'étendue de l'hydrolyse enzymatique.

Pour conclure sur les aspects techniques liés à la production d'hydrolysats protéiques aux propriétés antioxydantes, il semble que de nombreux hydrolysats enzymatiques de sousproduits marins présentent certaines propriétés antioxydantes. Cependant, ces propriétés antioxydantes peuvent être maximisées par le choix de la bonne combinaison, c'est-à-dire le choix d'une enzyme spécifique par rapport au choix d'un substrat spécifique à hydrolyser, outre qu'une optimisation des conditions d'hydrolyse en termes de pH, de température, de rapport E/S, etc.

En effet, Les activités antioxydantes résultent d'un mélange peptidique complexe comprenant des composés inactifs, antioxydants, représentent l'activité moyenne de tous les peptides à l'intérieur de l'hydrolysat. Ainsi, des étapes de purification utilisant la séparation membranaire et des techniques chromatographiques ont été utilisées pour isoler les fractions et/ou les peptides purifiés, pour évaluer leurs propriétés physicochimiques et pour déterminer les séquences d'acides aminés des peptides purifiés.

Finalement, Une grande variété de techniques in vitro a été développée pour la détection des antioxydants en raison de la multitude de mécanismes impliqués dans le processus d'oxydation. En effet, les antioxydants sont susceptibles d'agir à différents niveaux de la chaîne oxydative. Ils peuvent empêcher la production de molécules oxydatives, par exemple en chélatant les ions métalliques de transition, retarder la progression de l'oxydation en interférant dans la réaction en chaîne ou, à des stades ultérieurs, piéger et éliminer les composés délétères déjà produits, brisant ainsi la séquence oxydative.

L'objectif de ce travail est la valorisation de coproduits de thon issus de l'industrie de transformation (conserverie) en utilisant des techniques douces et originales de récupération des fractions peptidiques. Cette étude se divise en 3 chapitres distincts :

• Le premier chapitre est une revue bibliographique qui porte sur la situation mondiale de la pêche et de l'aquaculture en général avec une attention particulière apportée au thon. Les différentes stratégies de valorisation des coproduits sont ensuite présentées et discutées et le procédé de l'hydrolyse par enzymatique de la matière première marine est détaillé. Enfin, la dernière partie du chapitre porte sur la présentation des procédés de séparation à membrane et plus particulièrement sur l'utilisation de ces procédés pour le fractionnement des hydrolysats de protéines d'origine marine.

- Le deuxième chapitre détaille les moyens matériels et les démarches expérimentales adoptés ainsi que les méthodes analytiques mises en œuvre pour caractériser les différents phénomènes étudiés.
- Enfin le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats. Ce chapitre se divise en deux parties. La première est dédiée à l'étude de l'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique des coproduits de thon issus d'une conserverie (têtes de thon) en vue de la production d'un hydrolysat protéique.

La seconde partie du chapitre III porte sur l'étude de fractionnement membranaires (ultrafiltration) avec des membranes en céramiques et en nanocomposite de seuil de coupures de 15 KDa, 8 KDa, 3 KDa, 1 KDa, et de taille de pore entre 3 -5 nm, respectivement. Et d'autre part, sur le fractionnement membranaire avec des membranes (ultrafiltration et nanofiltration) organiques de seuil de coupure de 2 KDa et 300Da, pour récupérer à partir de cet hydrolysat, une fraction enrichie en peptides d'intérêt dotés d'activités biologiques (antioxydants et antihypertensives).

Chapitre I ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. TRANSFORMATIONS DES PRODUITS DE LA PECHE ET VALORISATION DES CO-PRODUITS

I.1 Contexte économique

La production mondiale des produits de la pêche est passée de 20 à 171 millions de tonnes (**Figure I-1**) entre 1950 et 2016 (FA0, 2018). La pêche illicite représente quelques 26 millions de tonnes de poisson par habitant, soit 15% de la production totale de la pêche de capture dans le monde. Depuis la fin des années 80, la production de la pêche de capture étant relativement stable, c'est à l'aquaculture que l'on doit la croissance impressionnante de l'offre de poisson destiné à la consommation humaine. Alors que sa proportion d'aquaculture est passé de 39% de l'offre en 2004. Cette augmentation est due essentiellement au développement de fermes aquacoles d'Asie et de la région pacifique. La Chine a joué un rôle majeur dans cette croissance, étant à l'origine de plus de 60 pour cent de la production aquacole mondiale.



Figure I-1 : Evolution de la production halieutique et aquacole mondiales entre 1950 et 2016 (FAO, 2018)

La majorité de cette production, quelle que soit son origine (pêche de capture ou d'élevage) est destinée à la nutrition humaine. Mais seul 25% de la production (de 30 à 36 millions de tonnes selon les années) parmi lesquels on retrouve les déchets solides issus

des procédés de transformation et de conserve des produits de la pêche (têtes, arêtes, peau, viscères, etc.) sont en partie transformés en farine et huile pour la nutrition animale dont l'aquaculture (FAO, 2016).

Dans la plupart des cas, ils sont rejetés directement dans le milieu naturel sans aucun traitement, ce qui pose des problèmes environnementaux et économiques non négligeables. C'est le cas notamment de l'industrie de transformation et de conditionnement du thon dont les co-produits représentent presque 45% de la matière première ; ces déchets sont une source de pollution importante pour les pays producteurs et notamment la Tunisie.

I.2 Pêche et industrie de transformation du thon

Le thon est un des principaux produits de la mer faisant l'objet d'échanges commerciaux internationaux. Dans les années 90, le thon représentait 5% des quantités mondiales pêchées destinées à l'alimentation humaine soit plus de 10% de la valeur des échanges internationaux (Paquotte, 1999). Aujourd'hui cette production s'élève entre 5 et 6 millions de tonnes (FAO, 2016).

Les espèces de thon les plus exploitées et commercialisées sur le marché international sont

La bonite (*Katsuwonus pelamis*), le thon jaune (*Thunnus albacares*), le thon obèse (*Thunnus obesus*), le thon blanc (*Thunnus alalunga*), le thon rouge de l'Atlantique (*Thunnus thynnus*), le thon rouge du Sud (*Thunnus maccoyii*) et le thon rouge du Pacifique (*Thunnus orientalis*). La majorité est pêchée dans le Pacifique (70,2%) et dans l'océan Indien (20,4% en 2008), l'Atlantique et la mer Méditerranéenne ne contribuant qu'à hauteur de 9,5% de la production (FAO, 2016).

Parmi les pays producteurs de thon, on compte le Japon, Taiwan, l'Indonésie, la Corée, les

Philippines, les Etats-Unis, l'Espagne, la France et le Vietnam (Josupeit, 2006). Le thon est commercialisé en frais ou congelé mais 70% du thon capturé est transformé en conserve (Oceanic, 2005). La transformation et la mise en conserve du thon représente d'ailleurs en Tunisie un secteur d'activité important (**Tableau I-1**) avec une capacité de transformation du thon en 2004 de l'ordre de 143 T/jour. Toutefois la production en thon frais étant très insuffisante pour assurer les besoins, 95% de la matière première transformée est importée. En 2008, les quantités de thon transformé ont atteint environ 16230 tonnes, dont 66 tonnes de thon local, contre environ 16870 tonnes (dont 98 tonnes)

de thon local) pour l'année 2007. Ces quantités ont permis de produire 6260 tonnes de conserves de thon en 2008 contre 6715 tonnes en 2007.

Tableau I.1 : Evolution de la production de conserves de thon en Tunisie entre 2012 et 2016 en Tonne (source : GICA/GIPP, 2017)

Année	2012	2013	2014	2015	2016
Quantité transformée de thon frais (T)	15647	17890	20506	16870	1623
					0
Dont thon d'origine Tunisienne (T)	322	450	344	98	66
Production de conserves de thon (T)	6271	6910	7500	6715	6260

A partir de la réception du produit brut jusqu'à la mise en boite du produit fini, la transformation du thon comprend différentes étapes dont trois principales (Figure I.2)

- **Etape de coupe** : lors de cette étape, le thon est coupé en tranches différentes tailles, les parties non désirées telles que les têtes, queues nageoires et viscères etc. sont éliminés
- Etape de cuisson : les tranches récupérées à la première étape sont placées dans des chariots transférées dans des bassins de cuisson ou elles sont cuites à une température de 150°C pendant 3 heures environ.
- Etape de parage : à la sortie des bassins de cuisson, le thon est lavé à l'eau puis égoutté. Lors de cette étape les tranches de thon sont triées pour éliminer la peau, la carcasse et le muscle.



Figure I.2 : Schéma simplifié du procédé de mise en conserve du thon

En fin de procédé, 45% de la matière première sont récupérés sous forme de déchets ou coproduits parmi lesquels on retrouve la tête, la peau, la queue, les nageoires, les arêtes centrales, les viscères, le foie etc. Dans un contexte de développement durable mais aussi

et surtout dans un souci de rentabilité économique, ces co-produits, longtemps rejetés sans traitement dans le milieu naturel, font depuis plusieurs années l'objet de toutes les attentions des industriels ceci afin de les valoriser au mieux et d'en tirer des bénéfices qui compenseront les surcoûts liés à leur retraitement.

I.3 Utilisation et valorisation potentielle des co-produits de l'industrie du thon

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Du fait de leur diversité, les co-produits de l'industrie de transformation des produits de la pêche doivent être valorisés selon différentes voies. Par exemple : la tête d'un poisson pourra être valorisée en tant que farine et huile ; les viscères peuvent conduire à la production des farines et de l'huile, mais aussi à la récupération de vitamines, de phospholipides, la peau pourra être transformée en farine, en cuir ou en gélatine (Guérard et al., 2004). Des arômes alimentaires destinés à la formulation de plats cuisinés pourront être obtenus à partir des jus de cuisson de moules ou de crevettes (Cros et al., 2005a).

Parmi les produits obtenus par valorisation des coproduits issus de la pêche, on retrouve principalement les farines et huiles de poissons, les hachis et les hydrolysats protéiques.

Ces produits sont qualifiés de produits dérivés et non de produits finis car ils sont généralement commercialisés sous forme d'ingrédients ou de produits intermédiaires destinés à la nutrition humaine, l'alimentation animale, la diététique et la cosmétique. Les principales voies d'obtention de farines et huiles de poissons, de hachis et d'hydrolysats protéiques sont détaillés ci-après.

I.3.1 Production de farine et huile de poisson :

La production de farine et d'huile de poisson pour la nutrition animale est actuellement la valorisation de masse des co-produits la plus importante car tous peuvent être utilisés sans distinction. Environ 20,6 millions de tonnes de poisson et de co-produits ont été transformés en farines (FAO, 2016).

Les principaux pays producteurs de farine et d'huile de poisson sont le Pérou, le Chili, le Danemark et la Norvège (FAO Globe Fish, 2009). La farine de poisson est la première source de protéines utilisée pour l'alimentation des animaux d'élevage en raison de ses hautes qualités nutritives. Une partie importante de ces farines est utilisée pour faire des aliments pour l'aquaculture de poissons et de crevettes. L'autre partie est utilisée pour l'alimentation des poulets et des porcs. Les farines contiennent en général de 65 à 67% de protéines et un maximum de 12% de lipides. Elles possèdent de bonnes valeurs nutritives et une grande teneur en acides aminés essentiels mais sont peu solubles, possèdent peu de propriétés fonctionnelles et peuvent causer des inconvénients liés à leur forte teneur en sels minéraux.

I.3.2 Les hachis

La production des hachis représente également une voie très importante de valorisation des

Co-produits issus des industries de transformation des produits de la mer. Dans ce cas cependant, les viscères ainsi que tous les poissons cartilagineux ne sont pas utilisés. Le procédé de préparation des hachis est relativement simple. Les différents coproduits sont triés (on élimine ainsi les viscères et les co-produits de poissons cartilagineux) puis ils sont broyés et ensuite filtrés. Les hachis obtenus sont ensuite congelés pour être utilisés en tant que source de protéines pour la fabrication d'aliments pour animaux domestiques et plus particulièrement pour les chats.

I.3.3 Les hydrolysats

Les hydrolysats de poisson sont obtenus par hydrolyse des protéines de poissons entiers où de coproduits. Il peut s'agir d'autolysats obtenus sous l'action d'enzymes protéolytiques endogènes présentes dans le système digestif (pepsine, trypsine, chymotrypsine) ainsi que dans le tissu musculaire (cathepsines) du poisson ou d'hétérolysats lorsque la réaction d'hydrolyse résulte de l'ajout d'enzymes exogènes. Dans ce dernier cas, la maîtrise des conditions de réaction permet d'obtenir des produits protéiques solubles dotés de bonnes propriétés fonctionnelles. Les hydrolysats de poisson sont caractérisés par une teneur protéique élevée (73 à 85%) et renferment essentiellement un mélange de peptides et d'acides aminés libres. Une fois séchés, ces hydrolysats ont un aspect identique à celui des farines, mais par rapport à ces dernières, ils présentent à la fois une qualité nutritionnelle et une digestibilité plus élevée en raison de leur composition en acides aminés et de leur solubilité plus importante.

Ils peuvent donc être incorporés dans des aliments destinés à l'alimentation humaine et plus particulièrement pour la nutrition de personnes présentant un dysfonctionne de leur système digestif (Abdul-Hamid et al., 2002, Liaset et al., 2003). Ils sont également utilisés en aquaculture (Lian et al., 2005, Kotzamanis et al., 2007), (Tang et al., 2008, Refstie et al., 2004) et comme source d'azote pour la préparation de milieux de culture

pour favoriser la croissance des microorganismes et/ou des cellules en biotechnologie (Martone et al., 2005).

En raison de leurs propriétés fonctionnelles (i.e. hydrophobicité, capacité à former des mousses et des émulsions stables, capacité à retenir l'eau), les hydrolysats protéiques peuvent également être utilisés comme additifs alimentaires dans plusieurs applications.

I.4 Conclusion

Il existe différentes voies possibles de valorisation des co-produits issus de l'industrie de la pêche. Toutefois en raison de l'hétérogénéité et la diversité des coproduits à traiter, les coûts de récupération, de tri et de conservation de la matière première avant transformation renchérissent considérablement le coût de traitement de ces déchets. Ces voies de valorisation ne peuvent être viables que si les produits obtenus présentent une valeur ajoutée suffisante.

Parmi les différents produits dérivés obtenus par valorisation des co-produits issus de l'industrie de la pêche, les hydrolysats protéiques semblent potentiellement les plus intéressants.

En effet en raison de leurs propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et biologiques, ils possèdent une valeur marchande plus élevée susceptible de compenser le prix de revient des voies de valorisation.

La seconde partie de l'étude bibliographique est donc consacrée à la présentation d'un état

de l'art sur la production d'hydrolysats protéiques, le cas des hydrolysats protéiques de poisson est plus particulièrement détaillé.

II. PRODUCTION D'HYDROLYSATS PROTEIQUES

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont perdues par les industries de transformation du poisson qui ne valorisent guère leurs co-produits ou déchets. L'hydrolyse des protéines est donc une des voies privilégiées de la valorisation de ces co-produits mais pour cela il convient d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines présentes afin de pouvoir les utiliser ultérieurement en nutrition humaine ou animale. Cette hydrolyse des protéines, qui peut se faire par voie chimique ou enzymatique, conduit à une grande variété de produits.

II.1 Hydrolyse chimique

L'hydrolyse peut être conduite en milieu acide (HCl ou H2SO4) ou en milieu alcalin (NaOH) dans des conditions drastiques telles que des températures de l'ordre de 100°C et des fortes concentrations en soude ou en acide de l'ordre de 10N.

Dans le cas de l'hydrolyse acide, l'utilisation de l'acide chlorhydrique présente l'avantage, lors de la neutralisation par la soude, de produire du chlorure de sodium qui joue un rôle de conservateur pour le produit obtenu. Cependant l'hydrolyse acide a l'inconvénient de décomposer partiellement certains acides aminés et de détruire complètement le tryptophane. La qualité nutritionnelle de l'hydrolysat en est affectée et ce dernier devra être supplémenté avec cet acide aminé.

L'hydrolyse alcaline provoque la destruction des résidus de cystéine, de cystine, d'arginine et de méthionine d'une part et d'autre part, la racémisation des L-acides aminés en D-acides aminés. Ces derniers n'étant pas absorbés par l'homme, la valeur nutritionnelle de ce type d'hydrolysat est donc limitée.

II.2 Hydrolyse enzymatique

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser les réactions biologiques et en particulier les réactions d'hydrolyse dans des conditions douces (températures et pH physiologiques) ; les phénomènes de dénaturation des produits de réaction sont alors très réduits.

De plus du fait de leur spécificité, l'utilisation d'enzyme conduit à l'obtention de produits parfaitement définis. En particulier, la rupture de liaisons peptidiques par des protéases dépend de la nature des chaînes latérales des acides aminés qui entourent le site de coupure. Ainsi selon le type de protéases utilisées (Alcalase, Neutrase, papaïne, trypsine...) on obtient alors de peptides de différentes tailles qui présenteront des propriétés fonctionnelles et biologiques différentes.

Comparée à la voie chimique, la voie enzymatique présente l'avantage d'être plus facilement contrôlable, elle permet de préserver la valeur nutritionnelle de la matière première et ne nécessite pas l'addition massive d'agent chimique pour neutraliser le milieu en fin de réaction. Un chauffage modéré du milieu permet de stopper la réaction suite à l'inactivation des enzymes.

Les hydrolysats protéiques obtenus conservent toutes leurs propriétés et présentent une valeur marchande supérieure. Toutefois pour garantir la rentabilité économique du procédé, le contrôle en ligne de la réaction et l'optimisation des paramètres opératoires est indispensable.

II.2.1 Contrôle de l'hydrolyse enzymatique

Au cours de l'hydrolyse enzymatique, l'activité des enzymes ne s'arrête que lorsque le substrat est totalement hydrolysé, ou lorsque les conditions opératoires ne sont plus favorables.

L'hydrolyse totale d'un composé ne conduisant pas, dans la majeure partie des cas, aux produits les plus intéressants, il est donc important de suivre l'avancement de la réaction et de le contrôler selon l'objectif de l'hydrolyse et le produit final désiré.

Un des procédés le plus simple et le plus utilisé pour contrôler l'hydrolyse est de suivre l'évolution du pH du milieu réactionnel. En effet, lorsque la réaction d'hydrolyse est conduite à une valeur de pH supérieure à 6,5, la rupture des liaisons peptidiques entraîne la libération de protons H₊ (cf. **Figure I-3**), il en résulte une acidification du milieu suite à la dissociation des composés R-NH₃₊ (Ravalléc-Plé, 2000). Lorsque le pH est plutôt acide (inférieur à 6,5), on observe la libération d'ions OH- dans le milieu réactionnel. Ainsi selon les conditions opératoires, on observe une acidification ou une alcalinisation du milieu.



Figure I.3 : Mécanisme réactionnelle schématique de la rupture d'une liaison peptidique par voie enzymatique en milieu alcalin

Le contrôle du pH est généralement effectué directement à l'aide d'une sonde pH immergée dans le milieu réactionnel. Toute variation du pH peut alors être corrigée par ajout de soude (si libération de H+) ou d'acide (si libération d'OH-) de façon à conserver

le pH du milieu constant et garantir ainsi le bon fonctionnement des enzymes. Le volume de soude ou d'acide ajouté est donc directement proportionnel à la quantité de liaisons peptidiques coupées. Cette méthode est dite : méthode du pH-stat, en référence à l'appareil utilisé (Adler-Nissen, 1986).

Il existe également des méthodes chimiques pour évaluer l'avancement de la réaction d'hydrolyse. Les plus courantes sont celles basées sur le dosage des groupements terminaux (α - NH₂ ou α -COOH) qui sont libérés tout au long de l'hydrolyse. L'avancement de la réaction d'hydrolyse est alors exprimé en termes de degré d'hydrolyse (DH) défini selon **l'équation I-1**.

$$DH(\%) = \frac{Nombre \ de \ liaisons \ peptidiques \ coupées}{Nombre \ de \ liaisons \ peptidiques \ totales} \times 100 \qquad \text{Equation I.1}$$

II.2.2 Optimisation des paramètres opératoires

L'hydrolyse enzymatique des protéines peut être affectée par différents facteurs : la température, le pH, la concentration du substrat et de l'enzyme, la force ionique, la quantité d'eau ajoutée, la présence ou l'absence de substances inhibitrices et activatrices. Nous traiterons ici uniquement les principaux facteurs, à savoir la température, le pH et la concentration en enzymes.

II.2.2.1 Influence de la température

L'enzyme qui est de nature protéique voit son activité modifiée par la température.

Chaque enzyme possède sa propre gamme de température dans laquelle elle est active, cette gamme dépend du pH et de la nature du substrat. En effet, il est préférable de travailler dans la plage de de températures indiquée par le fournisseur d'enzymes pour optimiser le rendement de la réaction.

La plupart des enzymes présentent ainsi une activité maximale à des températures comprises entre 40 et 50°C et sont inactivées lorsque la température dépasse 70°C. Dans la gamme de température optimale, si la température s'élève de 10₀C, la vitesse de l'hydrolyse augmente de 1,5 à 2 fois.

II.2.2.2 Influence du pH

Tout comme pour la température, l'enzyme est très sensible au changement de pH.

Chaque enzyme est ainsi caractérisée par un pH optimum spécifique et une gamme de fonctionnement de pH relativement réduite. Plus le pH du milieu réactionnel est éloigné de ce pH optimal plus il y a de modifications de l'état d'ionisation de certains acides aminés situés sur le site actif pouvant empêcher la formation du complexe enzyme/substrat. En effet, **le tableau I-2**, illustre des exemples de protéases ayant des pH optimaux variant de 2 (Pepsine) à 10 (Alcalase).

Tableau I-2 : Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse des co-produits marins

Enzymes	рН	Références
Alcalase	4-10	(Klompong et al., 2007)
Prolyve BS	6,5-7,5	(S.Saidi et al., 2018)
Neutrase	7	(Shirahigue et al., 2016)
Protamex	6-8	(Dumay et al., 2004)
Alcalase	7,8-8	(Ali hamzeh et al., 2019)
Pronase E	5-9	(Jun et al., 2004)
B. Mojavensis A21	10	(A. Bougatef et al., 2012)
Protease XXIII (PR)	7,5	(Kuo-chiang, 2010)
Flavourzyme	7,5	(Valentina Mangano et al., 2019)
Kojizyme	5,5-6	(Liaset et al., 2002)
Umamisine	7	(Guerard et al., 2002)
Corolase PN-L	7,5	(Kristinsson et Rasco, 2000a)
Cryotin -F	5,5-11	(Raghavan et Kristinsson, 2009)
Pepsine	2,5	(Nazeer and Kumar, 2011)
Trypsine	6-8	(Lee et al., 2010, Rajapakse et al., 2005)
Chymotrypsine	7-8	(Lee et al., 2010)
Bromélaine	5-9	(Aspmo et al., 2005a)
Papaine	5-8	(Shahidi et al., 1995)
Orientase (OR)	7	(Dumay et al., 2004)
Actinidinine	4-7	(Aspmo et al., 2005a, Aspmo et al., 2005c)

Comme pour la température, il est alors important de définir la plage de pH optimale de fonctionnement pour un substrat donné en se basant sur les données fournisseur.

II.2.2.3 Influence de la concentration en enzyme

Comme dans toute réaction enzymatique, la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration en enzyme. Cependant, au-delà d'une certaine concentration en enzyme, la totalité du substrat se trouve complexé et la variation de la vitesse d'hydrolyse est négligeable. Il est donc préférable d'utiliser une concentration d'enzyme convenable pour des raisons d'efficacité maximale et de réduction de coût.

II.2.3 Méthodologie en vue de l'optimisation des conditions opératoires

Le contrôle des conditions d'hydrolyse nécessite la détermination des principaux paramètres opératoires qui sont : la température, la durée de la réaction, le rapport enzyme/substrat, et enfin le pH de la solution. Ces paramètres jouent un rôle très important sur la composition du produit final et sur la vitesse de la réaction. Il existe une méthode d'optimisation des conditions de la réaction qui permet de mesurer et de connaître l'influence de chaque paramètre et son taux d'impact dans la réaction d'hydrolyse. Cette méthode est connue sous le nom de méthodologie des plans d'expériences. Cette méthode propose une expérimentation factorielle, dans laquelle tous les facteurs varient simultanément. La variation de tous les facteurs en même temps présente plusieurs avantages : diminution de nombre d'essais, étude d'un nombre important de paramètres, étude des interactions entre les paramètres et leur influences respectives, et au final, estimation des conditions optimales de fonctionnement grâce à l'obtention d'un modèle mathématique.

Cette méthode a été déjà utilisée pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique des protéines issues de co-produits de l'industrie de la pêche (**Tableau I-3**). La plupart des travaux visent principalement la solubilisation du substrat et la recherche d'un produit final de grande valeur ajoutée.

TableauI-3 : Exemples de mise en œuvre d'un plan d'expériences pourl'optimisation des réactions de valorisation des protéines issues des co-produits de lapêche.

Plan d'expériences			es		
Substrat Enzyme			Références		
		Plan	Facteurs	réponse	
Coproduits de crabe	Flavourzyme Kojizyme	Plan factoriel 4x5x6	T, [E], d	DH%	(Nilsang et al.,2005)
Coproduits des poissons pierre	Bromelaine	Plan composite centrale	pH, T, E/S temps	DH% DPPH scavenging activité Fe2+ activité chelatrice	(M. Sehu et al., 2017)
Carcasse de crevettes (Penaeus brazilliensis et penaeus subtilis)	Alcalase	Box-Behnken E/S 3niveaux	T, pH, ratio	activité anti- Oxydante, teneur en peptide soluble	(Guérard, 2007)
Viscères et têtes de sardine	Alcalase Flavourzyme Protamex	Plan composite centrale	T, pH, ratio E/S, ratio S/eau, Temps	Libérations des lipides	(Dumay et al., 2006)
Viscères de seiche	Pepsine	Plan composite centrale	T, Temps, E /S	DH% récupération d'azote	(E.Kechaou et al.,2013)
Chair noire de thon (Skipjack)	Protamex	Plan composite centrale (5 niveaux)	T, Temps, [E], pH	DH% teneur en tryptophane libre	(Herpandi et al., 2017)

II.3 Les réacteurs enzymatiques

La réaction enzymatique est menée dans un dispositif appelé « réacteur » qui peut être très simple ou complexe et impliquer parfois l'intervention d'appareils annexes (systèmes d'aération, de stérilisation...). Le choix du type de réacteur dépend de la réaction ou du processus envisagé. Généralement, la réaction enzymatique peut être conduite en discontinu (batch), en alimentation semi-continue (fed batch) ou totalement en continue (alimentation et soutirage).

<u>Réacteurs discontinus (réacteurs « batch »)</u>

Ce type de réacteur est très simple ; il est généralement constitué d'une cuve de réaction munie d'un système d'agitation et de systèmes de régulation de la température et du pH. La matrice à hydrolyser additionnée d'eau si nécessaire et le biocatalyseur sont ajoutés simultanément en début de procédé et on laisse la réaction se dérouler le temps nécessaire. Il n'y a ni entrée ni sortie (mis à part les ajouts d'agents chimiques pour réguler le pH et les prélèvements d'échantillons en vue d'analyse), le volume réactionnel reste le même pendant toute la réaction. Dans le cas des réactions d'hydrolyse de déchets solides, la liquéfaction du substrat au cours du temps rendant l'agitation plus facile, conduit à revoir les conditions d'agitation. Ce type de réacteur est très répandu du fait de sa simplicité de mise en oeuvre, il est très adapté au traitement de petits volumes. L'inconvénient majeur est lié au fait qu'en fin de réaction, les enzymes doivent être inactivées alors qu'elles pourraient être utilisées plus longtemps.

<u>Réacteurs semi-continus (réacteur « fed batch »</u>

Ce réacteur est très semblable au réacteur précédent. Le principal changement provient de la variation du volume durant la réaction. En effet, la réaction démarre avec un faible volume de substrat. La concentration en biocatalyseur est alors plus forte que lors d'un système en batch et la réaction démarre donc plus vite. Le reste de la matrice à hydrolyser est ensuite introduite en continu dans le réacteur. Le volume total est en augmentation constante. Ce mode de fonctionnement, très utilisé dans le cas de fermentation microbienne, est peu répandu dans le cas d'hydrolyses enzymatiques où l'on préfère en général, les hydrolyses en batch ou en continu.

Réacteurs continus

Dans ce type de réacteur, la cuve réactionnelle est alimentée et soutirée en continu. Pour être efficace, le réacteur doit être couplé à un dispositif qui permet la rétention du biocatalyseur dans le milieu réactionnel tout en laissant sortir les produits de la réaction. C'est pourquoi les réacteurs enzymatiques continus sont généralement des réacteurs types « lit fixe » ou « lit fluidisé » mettant en œuvre des enzymes immobilisées sur des billes. Cependant ces réacteurs ne sont pas adaptés pour l'hydrolyse des déchets solides, l'écoulement de la solution d'alimentation étant difficile au travers d'un lit fixe.

Les réacteurs enzymatiques à membrane semblent être une alternative intéressante pour le traitement des déchets solides issus de l'industrie de la pêche. La cuve réactionnelle alimentée en continue est couplée à une unité de filtration équipée de membranes dont la taille des pores a été choisie pour permettre la rétention des enzymes et du substrat non hydrolysé.

II.4 Production d'hydrolysats protéiques à partir des co-produits de l'industrie de transformation des produits de la mer

L'application de l'hydrolyse enzymatique dans le traitement et la valorisation des coproduits des industries de transformation et de conserve des produits la mer a connu une reprise d'intérêt au cours de cette dernière décennie et les travaux consacrés à ce sujet sont nombreux (Dumay et al., 2006, Kechaou et al., 2009, Ovissipour et al., 2010, Bougatef et al., 2012, Saidi et al., 2014, S. Klomklao et al., 2018, AV Le Gouic et al., 2019, D Ananey-Obiri et al., 2019)

Il s'agit généralement d'études réalisées en réacteur fermé à l'échelle du laboratoire et dont l'objectif principal est de mettre en évidence l'intérêt des traitements enzymatiques en vue de la valorisation de ces déchets.

Des études ont dans un premier temps, été consacrées à la recherche de la préparation enzymatique la plus adaptée pour solubiliser les protéines présentes dans les coproduits. Par exemple, Aspmo et al., (2005c) ont comparé les performances différentes préparations commerciales de protéase utilisées seules ou en mélange (Alcalase® 2.4L, Neutrase® 0.8 L,Protamex, Papaïne, Bromélaïne, Actinidinine et un mélange de protéases végétales) vis-à-vis de la solubilisation des viscères de morue (*Gadus morhua* L). Ils ont montré que l'utilis tionl'Alcalase® ou de Papaïne conduisait aux meilleurs résultats, des rendements de 95% de solubilisation ont même été atteints en présence d'Alcalase® combinée aux enzymes endogènes des viscères. Par ailleurs Gildberg (1992) a montré que l'activité hydrolytique des protéases pouvait être affectée par la présence d'inhibiteurs dans les coproduits à traiter.

La plupart des études s'intéresse à l'optimisation des conditions d'hydrolyse enzymatique en vue de l'obtention du degré d'hydrolyse souhaité (Pacheco-Aguilar et al., 2008, Bhaskar et al., 2008, E. Kechaou et al., 2013, S.Saidi et al., 2013, Herpendi et al., 2017, Kang .P.Y et al., 2017, M. Sehu et al., 2017, Ali Hamzeh et al., 2019). Les paramètres étudiés sont essentiellement la température, la durée de l'hydrolyse, la concentration d'enzymes et le pH. Comme on l'a vu précédemment ces études s'appuient sur la méthodologie des plans d'expériences pour l'optimisation du procédé associée (Bhaskar et Mahendrakar, 2008, Bhaskar et al., 2008, Saidi et al., 2013) ou non à la méthodologie des surfaces de réponses (Nilsang et al., 2005). Enfin une part importante des études s'intéresse aux applications potentielles des produits d'hydrolyse obtenus. Le premier débouché considéré est bien évidemment à la production de compléments alimentaires destinés à l'alimentation animale (Bhaskar et Mahendrakar, 2008).

Des études se sont également intéressées aux potentialités des hydrolysats de protéines de poisson en alimentation humaine. L'utilisation de ce type d'hydrolysat remonte à l'antiquité. Il s'agissait essentiellement d'hydrolysats obtenus par fermentation du poisson.

Certaines études ont montré que ces hydrolysats qu'ils soient obtenus à partir de morue (Slizyte et al., 2005a, Slizyte et al., 2005b, Slizyte et al., 2009a, Slizyte et al., 2005c), de tilapia (Abdul-Hamid et al., 2002), de saumon (Liaset et al., 2003, Liaset et al., 2002), de sardine (Kechaou et al., 2009), de merlu (Pacheco-Aguilar et al., 2008) présentent généralement une composition équilibrée en acides aminées et en protéine solubles, leur conférant ainsi une grande valeur nutritionnelle par rapport à celles des régimes synthétiques.

Enfin la recherche d'activités biologiques intéressantes dans les fractions peptidiques d'origine marine a fait l'objet de nombreuses études. Des activités anti-oxydantes ont été trouvées dans plusieurs hydrolysats obtenus à partir des coproduits de processus industriel de transformation de la sardine (*Sardinella aurita*) (Bougatef et al., 2010), des coproduits de thon (Hsu et al., 2010, Saidi et al., 2016, Bougatef et al., 2012, Klomklao et al., 2018, U. Parvathy et al., 2018) et des coproduits de seiche (E. Kechaou et al., 2013, Ali Hamzeh et al., 2019). Ces résultats suggèrent que les hydrolysats de coproduits de thon peuvent être utilisés comme ingrédients dans les aliments fonctionnels (Je et al., 2009).

En effet, Picot et al., 2006, a identifié dans des hydrolysats de protéines de poisson des peptides avec des activités anti-oxydantes ou anti-radicalaires susceptibles d'être utilisé en prévention de certains cancers.

En général, au cours des réactions métaboliques, une grande quantité de radicaux libres sont produits dans le corps humain, comme l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, qui attaquent les macromolécules biologiques comme les protéines, les acides gras insaturés et les acides nucléiques, qui entraînent la destruction de biomolécules significatives pour la réaction métabolique.

Par conséquent, la formation de radicaux libres était liée à de nombreuses maladies humaines, comme les maladies cardiovasculaires, le diabète sucré, les troubles neurologiques, les maladies neurodégénératives, le cancer et même la maladie d'Alzheimer.

Alors, les antioxydants ont des effets bénéfiques sur la santé humaine parce qu'ils protègent le corps contre la nocivité des espèces de radicaux libres en inhibant l'oxydation et la formation de radicaux libres dans les aliments et la prévention de leur détérioration. Ainsi, les antioxydants produits et extraits de sources naturelles étaient indispensables pour inhiber l'oxydation et la formation de radicaux libres.

À l'heure actuelle, de nombreuses études ont isolé différents peptides antioxydants ayant de fortes propriétés antioxydantes, comme la capacité de récupérer les radicaux DPPH, hydroxyles et superoxydes, qui ont été isolés et purifiés à partir de différents hydrolysats de protéines de poissons (Zhang et al. 2012, Je et al. 2013, Luo et al. 2013, Ahn et al. 2014, Najafian and Babji 2015, Song et al. 2016).

De plus, plusieurs études réalisées au cours des dernières décennies ont révélé que les hydrolysats protéiques provenant de diverses sources alimentaires, en plus de leurs propriétés nutritionnelles, présentaient diverses fonctions biologiques, notamment : anticoagulant (Ren et al., 2014), la capacité d'abaisser le cholestérol (Ben Khaled et al., 2012), antimicrobien (Salampessy, Kailasapathy et al., 2010, Sila et al., 2014a, 2014b) et anti-hypertensive (Bougatef et al., 2010, Balti et al., 2015) qui agit dans la réduction de la pression artériel du sang en inhibant l'action de la conversion de l'angiotensine-I enzyme (ACE).

D'autres activités biologiques ont été également identifiées. Ravallec-Plé, (2001) rapporte la présence de peptides favorisant la croissance des cellules épithéliales pour la régénération cutanée ou la croissance des cheveux dans des hydrolysats de sardine.

En raison du domaine potentiel d'utilisation (secteur de la nutrition, de la santé et du cosmétique etc.) ces hydrolysats présentent une valeur ajoutée non négligeable qui rend cette filière de valorisation économiquement viable. Toutefois la plupart de ces études montrent qu'il existe une relation entre les poids moléculaires des fractions peptidiques et

la présence d'activités biologiques. Les fractions peptidiques dotées d'une activité biologique potentiellement intéressante ont une masse moléculaire comprise entre 500 et 4000 Da (Hsu, 2010).

En outre, Les hydrolysats de protéines de poisson sont des ingrédients potentiels pour la formulation de régimes aquacoles, remplaçant la farine de poisson comme source de protéines. Les premiers régimes d'élevage en aquaculture nécessitent une grande quantité de protéines, qui sont généralement incorporées dans la farine de poisson de hareng, d'anchois, de sardines ou d'espèces maigres. À cet égard, le remplacement partiel de la farine de poisson par des hydrolysats protéiques présente un certain nombre d'avantages pour le développement des larves et des individus juvéniles. Chez les larves, l'assimilation des protéines est déficiente en raison du développement incomplet du système digestif et de la faible activité de la trypsine et d'autres protéases (K. Hamre et al., 2013 and Zambonino Infante). Cet inconvénient peut être atténué par l'incorporation d'hydrolysats protéiques dans les régimes alimentaires. À cet égard, Kotzamanis et al. (2007) recommandent la supplémentation de régimes aquacoles avec des peptides compris entre 500 et 2500 Da.

Dans le cas des individus juvéniles, l'incorporation de peptides de faible poids moléculaire et d'acides aminés libres améliore l'appétence de l'alimentation en poudre, augmentant l'apport alimentaire de protéines. Cela a été signalé pour des espèces aquacoles comme la crevette ou la sole sénégalaise.

Outre leur valeur nutritionnelle, les hydrolysats protéiques peuvent exercer plusieurs activités biologiques. Notamment, dans le cas de l'aquaculture, de nombreuses recherches ont été consacrées à la recherche de stimulateurs naturels qui renforcent la réponse immunitaire des poissons d'élevage contre les agents pathogènes. La vaccination des individus matures est difficile et l'incorporation d'antibiotiques dans les régimes aquacoles n'est pas recommandée car ils augmentent la résistance bactérienne. À cet égard, certaines études ont conclu que certains peptides spécifiques pourraient renforcer le système immunitaire des poissons en situation d'élevage. Par exemple, Tang et al. (2008) ont incorporé des niveaux croissants d'hydrolysats de protéines de poisson (5%, 10% et 15% en poids) dans les régimes à base de poudre de maigre (Pseudosciaena crocea). Les auteurs ont signalé une augmentation de l'activité du lysozyme ainsi que des

taux d'immunoglobulines dans le sang, qui sont deux paramètres associés à une résistance immunitaire plus forte.

Par ailleurs la valeur ajoutée des produits obtenus étant liée à leur taux de pureté, il est indispensable de coupler l'étape d'hydrolyse avec des procédés de séparation pour garantir la rentabilité économique du procédé de valorisation de ces coproduits.Parmi les différents procédés séparatifs envisageables, les procédés de séparation membranaire qui offrent des potentialités intéressantes. La troisième partie de cette étude bibliographique est donc consacrée à la présentation de ces techniques séparatives et à leur intérêt pour le fractionnement des hydrolysats protéiques de poisson.

PROCEDES DE SEPARATION SUR MEMBRANES III.

III.1 Généralités

Les procédés de séparation membranaire permettent de séparer sélectivement les constituants d'un mélange qui fait intervenir d'une membrane sélective et semi-perméable sous l'effet d'une force motrice, cette force motrice peut être soit un gradient de pression, un gradient de concentration ou un gradient de potentiel électrique.

La membrane qui peut être vue comme une barrière mince semi perméable, retient ou laisse passer les espèces selon leur nature, leur taille ou leur charge. La solution d'alimentation est alors fractionnée en deux effluents : le rétentat qui s'enrichit en espèces retenues et le perméat qui est récupéré en aval de la membrane. Le schéma de principe est reproduit sur la Figure I-14.



Figure I-4 : Schéma de principe de la séparation sur membrane

Lorsqu'il s'agit d'une action de séparation conduite sous gradient de pression, on parle alors de procédés baromembranaires et la classification des procédés se fait généralement selon la taille des pores des membranes et la tailles des composés retenus. Ces procédés sont donc adaptés pour permettre le fractionnement des hydrolysats protéiques et en particulier la récupération de fractions peptiques de masse moléculaire inférieure à 2500 Da. La suite de cet exposé est donc centrée sur la présentation des procédés baromembranaires.

III.2 Les procédés baromembranaires

III.2.1 Présentation des procédés

Ces procédés dérivent de la filtration classique sur support et se différencient par la taille des solutés retenus. On distingue ainsi :

- La Microfiltration (MF) : Tout comme l'ultrafiltration, la microfiltration se classe dans les procédés nécessitant une faible pression transmembranaire pour leur mise en œuvre (< 1 bar). Toutefois, la microfiltration s'applique plutôt à la clarification de suspensions contenant des particules solides ou des macromolécules de dimension colloïdale (0,1 à 20 μm). Les membranes utilisées ont des tailles de pores variant entre 0,1 et 10 μm. La microfiltration est particulièrement utilisée pour la stérilisation de produits thermosensibles (lait, jus de fruit...).
- Ultrafiltration (UF): Contrairement à l'osmose inverse et à la nanofiltration qui effectue une séparation à haute pression transmembranaire, l'ultrafiltration est une opération de filtration membranaire conduite à faible pression transmembranaire de l'ordre de quelques bars (entre 1 et 5 bar). Elle repose sur l'utilisation de membranes microporeuses avec des diamètres de pores de 3 à 100 nm qui laissent passer partiellement tout soluté d'une taille inférieure au seuil de coupure de celles-ci (Maurel et al., 2013b). L'ultrafiltration trouve des applications diverses notamment dans l'agroalimentaire (clarification du vin, des jus de fruit, fractionnement du lait...) et dans l'environnement (potabilisation de l'eau ou en association à un traitement biologique dans les bioréacteurs à membranes...).
- Nanofiltration (NF): Les membranes de nanofiltration sont partiellement perméables aux sels monovalents et aux molécules organiques de masse molaire inférieure à 300 g mol-1. Elles assurent une sélection entre sels monovalents et

multivalents. Les pressions transmembranaires mises en œuvre sont légèrement inférieures à celles appliquées en OI (entre 10 et 40 bar). La nanofiltration s'applique classiquement en adoucissement de l'eau ou encore dans le domaine pharmaceutique pour la concentration d'antibiotiques, par exemple.

 Osmose inverse (OI) : Typiquement utilisée pour le dessalement de l'eau de mer ou la déminéralisation des eaux saumâtres, l'osmose inverse est la plus ancienne des techniques de séparation par membrane. Elle utilise des membranes denses pour retenir la majorité des solutés et ne laisser passer que le solvant (l'eau, en général). Le principe repose sur l'application, côté alimentation, d'une pression supérieure à la différence de pression osmotique du retentât et du perméat pour forcer le solvant à passer à travers la membrane. Les pressions appliquées sont comprises entre 30 et 80 bar.

Les domaines d'application et les caractéristiques de ces différentes techniques séparatives sont présentés sur la **Figure I-5** et dans le **Tableau I-4** respectivement.



Figure I-5 : Domaines d'application des techniques de séparationvbaromembranaires (Alting)

Techniques	Force motrice	Type de	Mécanisme de	Principales
Membranaires		membrane	séparation	applications
Microfiltration	Δ pression 0,5-1 bar	Membranes poreuses asymétriques 0,1 à 10 μm	Effet tamis PM ≥ 100 kDa	Clarification Filtration stérilisante Concentration de suspension
Ultrafiltration	Δ pression 1-10 bar	Membranes poreuses asymétriques 0,005 à 0,1 μm	Effet tamis PM 10 - 100 kDa	Concentration, Fractionnement et purification de molécules
Nanofiltration	Δ pression 10-30 bar	Membranes poreuses asymétriques ou composites 0,001 à 0,01 µm	Effet tamis Effet Donan et diffusion PM 0,2 - 20 kDa	Séparation des sucres, petites molécules, sels divalents et acides dissociés
Osmose inverse	Δ pression 35-100 bar	Membranes denses asymétriques 0,0001 à 0,001µm	Solubilité et diffusion PM 0,02 – 0,2 kDa	Dessalement de l'eau de mer, concentration de micro-solutés

TableauI-4 :Caractéristiquesetprincipalesapplicationsdestechniquesbaromembranaires (Cheryan, 1998, Zeman et zydney, 1996).

Selon le sens de l'écoulement du fluide à traiter lors d'une opération de filtration sur membrane, on peut distinguer (**Figure I-6**) :

✤ La filtration frontale : le fluide circule perpendiculairement à la membrane sous l'effet d'un gradient de pression. Les solutés rejetés s'accumulent au fur et à mesure de l'avancement de la filtration sur la membrane et le débit du filtrat diminue de façon très importante au cours du temps.



Figure I-6 : Schéma du principe de la filtration tangentielle et frontale (Membrane filtration process from GEA process Engineering)

La filtration tangentielle : le fluide circule parallèlement à la surface de la membrane et se partage en deux débits : un traversant la membrane et appelé perméat, et un deuxième ne la traversant pas nommer retentât. On définit alors un taux de conversion (Y) traduisant la fraction de liquide passant à travers la membrane par rapport au débit initial.

$$Y = \frac{Qp}{Qa}$$
 Equation

I.2

 Q_p et Q_a sont respectivement les débits d'alimentation et de perméat exprimés en L h-1 par exemple.

Ce mode de fonctionnement permet de réduire l'accumulation de la matière à la surface de la membrane mais entraîne une consommation énergétique plus importante qu'en filtration frontale car il nécessite une pompe pour assurer la circulation à haute vitesse du fluide à la surface de la membrane.

Les performances des procédés baromembranaires sont généralement évaluées en termes de densité de flux (i.e. vitesse de filtration) et de sélectivité.

La densité de flux de perméat (J) correspond au débit volumique rapporté à l'unité de surface homogène à une vitesse, elle est généralement exprimée en L.h-1.m-2.

La sélectivité des membranes est généralement évaluée en termes de taux de rétention (TR), appelé aussi taux de rejet et défini comme suit :

$$TR\% = 100 \times [1 - \frac{cp}{c_0}]$$
 Equation I.3

Avec C_p : concentration dans le perméat

C₀ : concentration du soluté initial

Pour améliorer l'efficacité de la séparation et en particulier le taux de pureté des solutions que l'on souhaite concentrer ou encore le taux de récupération des molécules que l'on veut extraire d'un mélange, la filtration sur membrane est réalisée en mode diafiltration. Du solvant est ajouté pendant la filtration à la solution à concentrer, permettant ainsi de réduire la concentration des espèces non retenues tout en maintenant celle des espèces retenues (cf. **Figure I-7**).



Figure I-7 : Schéma de principe de Diafiltration

La mise en œuvre de la diafiltration peut se faire selon différents modes. Le volume de tampon ajouté dans le réservoir d'alimentation peut venir compenser exactement le volume perméat soutiré, on parle de diafiltration à volume constant. Si ces volumes ne sont pas équivalents on parle de diafiltration à volume variable et on procède à une concentration de la solution simultanément à la diafiltration (diafiltration à volume variable). L'opération de diafiltration peut être précédée ou suivie par des étapes de concentrations (pré-diafiltration ou post-diafiltration). Li et al., (2009b) ont montré que la diafiltration est efficace pour la purification de protéases à partir d'un hydrolysat de thon. Lors des différents stades d'un processus de diafiltration, le volume du tampon ajouté est défini en tant que volume de diafiltration (DV), il est défini par l'**Equation I-4** (Simon et al., 2002)

$$DV = \frac{Vb}{V0} = \frac{Vp}{V0}$$
 Equation I-4

III.3 Membranes et modules membranaires

III.3.1 Les membranes

Les membranes sont disponibles en matériaux organiques et minéraux. Les membranes minérales sont plu plus intéressante car ils chimiquement plus résistantes.

Les membranes organiques sont préparées à partir de polymères de type cellulose, acétate de cellulose, polyamide, polyimide, polysulfone... . Les membranes minérales sont essentiellement fabriquées à base d'oxydes métalliques (oxyde d'aluminium, de zirconium ou de titane) déposée sur un support macroporeux d'alumine ou de carbone

formé d'une ou de plusieurs couches destinées à assurer le soutien mécanique pour les couches filtrantes.

Selon l'application et les caractéristiques du fluide à traiter, **Le Tableau I-5** regroupe les principaux matériaux, leurs avantages et leurs inconvénients (Desclaux and Remigy, 2013).

Tableau I-5 : Caractéristiques des principaux types de membranes organiques et
inorganiques (d'après Desclaux and Remigy, 2013).

Matériaux	pH limite	Température maximale tolérée (°C)	Avantages	Inconvénients
Cellulose	2,5-7	50	Peu d'adsorption des protéines, flux importants, coût faible	Sensible à la température, à la pression, aux microorganismes et au chlore
Polyamide	4-11	46	Bonne stabilité aux solvants	Faible perméabilité Phénomènes d'adsorption importants
Poly éther sulfone	1-14	40	Bonne tenue au pH et stabilité thermique	Sensible à l'adsorption des protéines et des matières organiques naturelles
Acryliques	-	-	Bonne stabilité thermique et chimique Stockage à sec possible	Faible résistance mécanique
Matériaux fluorés (PTFE, PVDF)	1-12	150	Résistance thermique et chimique, Tolérance vis-à-vis de la plupart des solvants	Microfiltration uniquement
Céramiques	1-14	300	Résistance chimique et thermique, Possibilité de stérilisation à la vapeur d'eau et aux solvants	Seuil de coupure minimum ≥1KDa. Coût élevé. N'existe qu'en géométrie tubulaire ou plane.

Le coût des membranes minérales est très supérieur à celui des membranes polymères mais comparées à ces dernières, les membranes minérales présentent de meilleures résistances aux températures et pressions élevées ainsi qu'aux attaques chimiques et aux solvants organiques. Elles sont également stérilisables à la vapeur et résistent à toute la gamme de pH rendant ainsi possible l'utilisation de cycles de désinfection et de nettoyage drastiques pour garantir l'hygiène du système, indispensable dans certains secteurs tels que les industries agroalimentaires, sans porter atteinte à la durée de vie « quasi illimitée » de ces membranes.

Toutefois de nombreux progrès ont été faits dans le domaine des matériaux polymères. Il existe maintenant des membranes à base de polyétherimides, de polysulfone ou de fluorure de polyvinylidéne pouvant être stérilisées à la vapeur. L'utilisation de cellulose régénérée conduit à la production de membranes capables de résister à des températures allant jusqu'à 70°C, dans une gamme de pH allant de 2 à 13 et sous une pression transmembranaire de 5,5 bar. De plus, grâce à leur caractère hydrophile, ces membranes présentent une faible capacitée d'adsorption des protéines et conduisent à des flux de perméat plus stables que les membranes en polyéthersulfones lors de la filtration de solutions biologiques (Kallioinen et al., 2006, Zularisam et al., 2006).

III.3.2 Les modules membranaires

La principale nécessitée d'un module de filtration est d'assurer le maintien de la membrane et la séparation de l'alimentation du perméat afin que ces deux flux ne se mélangent pas. Les modules doivent également être capables de supporter le gradient de pression et l'écoulement doit être optimisé pour limiter les risques de colmatage. De plus, le coût de fabrication ne doit pas être trop élevé, le système doit être aussi compact que possible tout en permettant un remplacement facile des membranes. Différents types de modules ont donc été développés selon la géométrie des membranes (**Figure I-8**).



Figure I-8 : Les différentes configurations de modules membranaires

III.4 Phénomènes de Polarisation et colmatage

En théorie, et en absence de de toute matière retenue à la surface de la membrane, le flux de liquide traversant la membrane est directement proportionnel à la pression transmembranaire appliquée (PTM). La constante de proportionnalité est la perméabilité de la membrane. Cela se traduit par dans le cas de la filtration d'un solvant pur par la loi de Darcy (**Equation I-5**).

$$J = Lp \times PTM$$
 ou encore $J = \frac{PTM}{\mu \cdot Rm}$ Equation I-

5

Où :

- J est le débit par unité de surface généralement exprimé en L h⁻¹ m ⁻².
- PTM est la pression transmembranaire exprimée en bar (ou Pa).
- Lp est la perméabilité de la membrane exprimée conventionnellement en L m⁻² h 1 bar⁻¹ (ou m s ⁻¹ Pa⁻¹).
- Rm est la résistance intrinsèque de la membrane (m⁻¹).
- μ est la viscosité dynamique du solvant (Pa.s).

Or pour les fluides réels et en particulier lors de la filtration de solutions biologiques, cette loi n'est plus vérifiée ; au-delà d'une certaine pression, le gain de flux est minime par rapport à la quantité d'énergie apportée, le flux tend vers une valeur limite (**Figure I-9**).



Pression transmembranaire

Figure I-9: Evolution du flux de filtration en fonction de la pression transmembranaire dans le cas d'un solvant pur et d'une solution (fluide biologique) (Aptel et al., 2002).

Le modèle qui implique des résistances en série (**Equation I-6**) est généralement utilisé pour décrire la densité de flux de perméat dans le cas des solutions réelles.

$$J = \frac{PTM}{\mu \cdot (Rm + Rc)}$$
 Equation I-6
Où :

- Rm : Résistance propre de la membrane (m⁻¹)
- Rc : Résistance additionnelle due au colmatage (m⁻¹)
- μ : Viscosité dynamique (Pa.s)

III.4.1 Phénomène de polarisation de concentration

Au cours de l'opération de filtration et à cause de la sélectivité des membranes, les espèces retenues/rejetées (particules, molécules, macromolécules ou sels dissous, selon le type de membrane utilisée) s'accumulent à la surface de la membrane, basé sur la théorie du film. Un gradient de concentration apparait alors de la surface de la membrane vers le volume de la solution/suspension : c'est la polarisation de concentration. Ce phénomène est quasi-instantané, réversible et s'annule avec l'annulation de la force motrice de la filtration (pression). Les espèces accumulées restent dans le même état physique que celui du fluide à traiter (**Figure I-10**).



Figure I-10 : Théorie du film

La convection engendrée par la différence de pression appliquée de part et d'autre de la membrane provoque un transport de matière du volume de la solution vers la surface membranaire. Un profil de concentration apparait à la surface de la membrane avec l'accumulation des espèces retenues (**Figure I-10**). La distance de la membrane dans laquelle la concentration est plus élevée est nommée couche de polarisation (ou couche limite). La théorie du film stipule que le transfert de matière de la couche de polarisation

vers le volume de la suspension se fait sous l'effet du gradient de concentration par diffusion brownienne. C'est le cas notamment des espèces dissoutes (par exemple les sels en osmose inverse et en nanofiltration, des protéines et macromolécules en ultrafiltration). L'état stationnaire est atteint lorsqu'il y a équilibre entre le transfert de matière du volume de la solution vers la surface de la membrane et celui dans le sens contraire.

Donc le flux de perméation est abouti selon l'équation suivante (Equation I-7) :

$$J = \frac{D}{\delta} \operatorname{Ln} \frac{Cm - Cp}{C0 - Cp}$$
 Equation I-7

Où :

- D : coefficient de diffusion du soluté dans la solution (m².s⁻¹).
- Cp : concentration en soluté dans le perméat (mol.m⁻³).
- δ : épaisseur de la couche limite (m).
- D/ δ : correspond au coefficient de transfert de matière, noté k (m.s⁻¹).

La composition de la solution et la nature des espèces contenues dans la solution jouent un rôle très important sur la polarisation. Ainsi plus une solution est concentrée, plus cette dernière aura une viscosité importante ce qui entraîne une augmentation des phénomènes de polarisation.

Il est important de contrôler la mise en place de la polarisation car cette couche limite est une réelle résistance au transfert. Enfin la polarisation est à l'origine et renforce les phénomènes de colmatage.

III.4.1.1 Le colmatage

Le colmatage peut être définit comme l'ensemble des phénomènes qui interviennent dans la modification des propriétés filtrantes d'une membrane. Il résulte de la formation d'un dépôt de matière à la surface ou à l'intérieur des pores de la membrane dont la structure dépend des caractéristiques du fluide filtré. Le colmatage se traduit par une résistance supplémentaire à l'écoulement (en plus de la résistance intrinsèque de la membrane) réduisant ainsi le débit de filtration.

$$J = \frac{PTM}{\mu Rt} = \frac{PTM}{\mu (Rm + Rint + Rex)}$$
 Equation I-

8

Rint et Rex sont respectivement les résistances à l'écoulement induites par le colmatage interne et externe.

Le colmatage est induit par les phénomènes mis en place à l'interface entre le milieu liquide et la membrane. Les particules et/ou les solutés dont la taille est supérieure à celle des pores de la membrane s'accumulent à la surface de cette dernière et forme à terme un dépôt plus ou moins réversible. Il en résulte une réduction du flux mais aussi une modification de la sélectivité (Cheryan, 1998).

La réversibilité du colmatage dépend de l'existence ou non d'interactions physicochimiques entre la membrane et les solutés retenus (phénomènes d'adsorption). Par exemple les macro-solutés tels que les protéines, les polysaccharides mais aussi les microorganismes peuvent interagir avec la membrane via des liaisons de plus ou moins forte énergie (liaisons type Van der Walls, liaisons hydrogènes ou ioniques) (Pascal, 1989). Les phénomènes d'adsorption se produisent généralement à la surface de la membrane (colmatage externe), voire même si la géométrie des pores le permet, à l'intérieur des pores (colmatage interne). La taille et le nombre des pores sont ainsi réduits, ce qui conduit une augmentation de la résistance à l'écoulement. Dans la plupart des cas, les liaisons sont fortes et conduisent à la formation de dépôts stables. Le colmatage est considéré comme irréversible lorsqu'un simple rinçage ne permet pas de rétablir la perméabilité de la membrane à son niveau initial. Il faut alors envisager un lavage plus drastique qui peut dans certains cas se révéler inefficace.

III.4.2 Nettoyage des membranes

Nous n'avons abordé que la problématique du colmatage des membranes qui est la cause essentielle de la diminution du flux de production ainsi que de la variation de la sélectivité des membranes. Le contrôle et la minimisation de l'effet du colmatage est possible grâce à un choix judicieux des paramètres opératoires. Néanmoins, le nettoyage chimique des membranes est parfois inévitable pour ramener la membrane à son état initial.

Le nettoyage chimique entraine des surcoûts de production qui peuvent représenter jusqu'à 80 % du coût de production total dans l'industrie agroalimentaire. Il fait appel à une consommation importante de produits chimiques, d'eau et d'énergie. La compréhension de la structure et de la nature chimique de la couche colmatante est essentielle pour l'optimisation des conditions de nettoyage (agents nettoyants, concentration, fréquence, durée, température...).

37

Les procédures de nettoyage emploient classiquement des agents de nettoyage de type alcalin, acide ou enzymatique selon la nature de l'agent colmatant. Le choix de la procédure de nettoyage dépend fortement du type de module, de sa configuration et de sa résistance physique et chimique. Les membranes en céramique offrent la possibilité d'appliquer des conditions de nettoyage assez drastiques. Les agents de nettoyage alcalins les plus couramment utilisés sont des solutions d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'hydroxyde de potassium (KOH). Les agents acides sont de type acide nitrique ou phosphorique.

Pour la désinfection des membranes et la limitation de la prolifération bactériologique (surtout dans l'industrie agroalimentaire) les membranes peuvent être traitées par des agents chlorés (hypochlorite de sodium essentiellement)

III.5 Application des techniques baromembranaires pour le fractionnement des hydrolysats protéiques

Les co-produits de l'industrie de conservation des produits issus de la mer qu'ils soient solides (tête, peau, viscères, arêtes etc.) ou liquides (eaux de cuisson) contiennent des composés de haute valeur ajoutée (protéines, peptides, composés d'arômes etc.) dont la valorisation pourrait compenser les coûts de traitement engendrés pour le retraitement de ces déchets. Les procédés de séparation membranaire se présentent comme une bonne alternative pour la concentration et la purification de ces molécules d'intérêt. Ainsi on retrouve dans la littérature depuis plusieurs décennies, des travaux concernant la valorisation des eaux de process et le fractionnement de protéines par membrane pour la récupération ou la purification des fractions peptidiques présentant des activités biologiques intéressantes.

III.5.1 Extraction et concentration de composés d'intérêt

Afin de réduire la pollution mais aussi de récupérer les composés d'intérêt (protéines, composés aromatiques etc.) des eaux de cuisson des produits de la mer, plusieurs études ont été effectuées. En 1985, Almas et al., (1985) ont étudié la concentration de protéines contenues dans l'eau de cuisson de crevette par UF (membrane 10 KDa). Ils ont ainsi pu multiplier par 10 la concentration en protéines de ces eaux initialement égales à 6 g.L⁻¹. En 2002, Vadanjon et al. (2002) ont couplé plusieurs étapes de filtration en vue de concentrer les composés d'arômes des eaux de cuisson de crevettes et de thon. Après une

première étape d'UF (membrane tubulaire en alumine Membralox® (0,02 µm) visant à prétraiter ces eaux, ils ont utilisé différentes membranes de NF (membrane poly-sulfone-polyamide (TFC) Hydranautics (300 Da) et d'OI (membrane poly-sulfone-polyamide (TFC) de Film tec pour la récupération des composés aromatiques. Dans le même but, Cros et al. (2005a, 2005b, 2006) ont utilisé les techniques d'électrodialyse et d'osmose inverse pour la valorisation d'une eau de cuisson de moules préalablement prétraitée par centrifugation.

En 2006, Li et al. (2006b) ont pu récupérer par ultrafiltration un concentrât riche en protéases à partir d'un extrait de rate du thon à nageoires jaunes. Ils ont utilisé des membranes d'ultrafiltration de 30 et 100 KDa en cellulose régénérée. Ils ont observé que la membrane de 30 KDa est plus efficace pour la récupération de ces enzymes. Ils ont montré que la pureté des enzymes récupérées était améliorée en travaillant en mode diafiltration. Ils ont testé deux modes de diafiltration suivie de post-diafiltration). Ils ont montré que le mode 2 (préconcentration suivie de post-diafiltration). Ils ont montré que le mode 1 est plus performant que le mode 2 en termes de pureté de la protéase, de flux de perméation et de durée de fractionnement. En revanche, en mode 2 la consommation de tampon est plus faible. Dans une autre étude, Li et al. (2009b) ont récupéré et purifié par filtration sur membrane une protéase de type trypsine à sérine (TSP) à partir des déchets de conserveries de thon.

III.5.2 Fractionnement des hydrolysats de poisson

On trouve plusieurs études axées sur l'application de la technologie membranaire en vue de la clarification et du fractionnement des hydrolysats peptidiques d'origine marine.

En 1999, Jeon et al. (1999) ont mené une étude sur le fractionnement des hydrolysats protéiques de morue. Ils ont utilisé une série de 4 membranes d'ultrafiltration (Millipore) de seuils de coupures différents (30, 10, 5 et 3 KDa) pour faire une séparation basée sur le poids moléculaire des peptides.

En 2002, Jao et Ko (2002) ont utilisé une membrane d'ultrafiltration de 10 KDa pour le fractionnement des hydrolysats protéiques de jus de cuisson du thon. L'étape de concentration finale est réalisée par OI avec une membrane spiralée.

En 2007, Vandanjon et al. (2007) ont mené une étude sur l'évaluation des performances des procédés membranaires pour le traitement d'un hydrolysat peptidique de merlan bleu (*Micromesistius poutassou*). Au début, ils ont utilisé une membrane d'Ultrafiltration en

polysulfone de 20 kDa pour la séparation des peptides des protéines non hydrolysées. Ils ont montré que cette membrane présentait un taux élevé d'adsorption des protéines rendant difficile sa régénération. Ils ont aussi utilisé des membranes d'UF de seuils de coupure intermédiaires (de 8 KDa en polysulfone (PS) et 4 KDa en polyéthersulfone (PES) modifié) pour la séparation des peptides de poids moléculaire compris entre 1et 7 kDa. Enfin, ils ont concentré les peptides de faible poids moléculaire (inférieur à 1000) en utilisant une membrane de Nanofiltration en polyamide (PA) /Polyethersulfone (PES) de 300 Da. Les 3 membranes retenues sont caractérisées surtout par leur sélectivité et leur facilité de nettoyage.

En 2009, Chabeaud et al. (2009b) ont utilisé 5 membranes tubulaires organiques (membrane Aquious-PCI (UK)) pour étudier l'effet du matériau et du seuil de coupure de la membrane sur les performances lors du fractionnement d'un hydrolysat protéique issu de « lieu noir » (*Pollachius virens*), en vue de la récupération des fractions peptidiques de masse moléculaires inférieures à 2 KDa. Ils ont comparé les résultats obtenus en termes de flux de filtration, d'adsorption et de taux de rétention des peptides. Ainsi ils ont montré que la perméabilité des membranes en PA (8 KDa) et PES-modifié (4 et 6 KDa) est plus importante que celles des membranes en PES de seuil de coupure comparable. Ce résultat confirme que les membranes hydrophobes sont plus colmatantes. Ils ont également mis en évidence que la valeur du taux de rétention varie en fonction de la nature des membranes. Les taux de rétention des membranes en PES, eux-mêmes plus élevés que ceux mesurés avec la membrane en PA.

Bourseau et al. (2009) ont étudié les performances du procédé de fractionnement par UF et NF de deux types d'hydrolysats protéiques de poisson commercialisés. Pour ce fait, ils ont utilisé des membranes organiques tubulaires en polyéther sulfone modifié de 4 KDa (étape d'UF) et des membranes composites en polyamide déposé sur une couche en polyéther sulfone de 0,3 KDa (étape de NF). Le perméat de l'étape d'UF a été utilisé comme solution d'alimentation de l'étape de NF.

Saidi et al. (2014) ont fait une étude sur le fractionnement d'hydrolysat protéiques du muscle rouge de thon en mode de filtration tangentielle et en utilisant des membranes tubulaires céramiques d'UF (une membrane de seuil de coupure de 8 KDa) et de NF (une membrane de NF en polyethersulphone de 1 KDa).

En 2017, Roslan et al. Ont fait étudié le fractionnement membranaire d'hydrolysat protéiques de coproduits de Tilapia (tête, cadres et queue) utilisant des membranes

d'ultrafiltration. Deux différents seuils de coupure de membrane plate en cellulose régénérée de 5 kDa et 10 kDa sont utilisés. La membrane était disposée dans l'orientation de 10/5 kDa et 5/5 kDa, dans laquelle ces deux membranes étaient empilées ensemble dans un même dispositif. Le rendement de la membrane multicouche a été évalué en fonction du flux perméat et de la transmission des peptides, et comparé au système à membrane unique (5 kDa et 10 kDa).

Pezeshk et al. (2018), ont utilisé 3 membranes d'ultrafiltration en cellulose régénérée avec seuil de coupure de 3 kDa, 10 kDa et 30 kDa en vue de séparer l'hydrolysat protéiques de thon jaune by-product (viscère) en en quatre fractions de taille moléculaire (<3, 3–10, 10–30 et 30 kDa <).

III.6 Conclusion

Cette étude bibliographique nous a permis de mettre en évidence une voie de valorisation possible des déchets solides issus des industries de transformation et de conservation du thon. Ces déchets riches en protéines peuvent être hydrolysés par voie enzymatique en vue de la récupération de peptides fonctionnels. La bio-activité des peptides étant dépendante de la masse moléculaire, l'utilisation de techniques membranaires avec différents seuils de coupure devrait nous permettre d'augmenter l'activité biologique spécifique des fractions peptidiques récupérées.

Chapitre II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Co-produits de thon

Skipjack tuna (K. pelamis) ont été récupérés au sein de l'usine de transformation et de conserve de thon (Industrie Thon Al Sultan, Sfax, Tunisie) : Le thon congelé passe par une étape d'abattage ; cette étape consiste à couper les thons en tranches de différents calibres et à éliminer les têtes, les queues et nageoires. Les têtes de thon sont alors récupérées, broyées et conservés en -20°C. C'est cette matière première que nous nous proposons de valoriser dans cette étude.

MATERIEL ENZYMATIQUE

Alcalase

L'Alcalase 2.4.L (EC 3.4.21.62) fournie par Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) est produite par fermentation à partir d'une souche sélectionnée de la bactérie *Bacillus licheniformis*. La fermentation est orientée pour produire essentiellement une protéase alcaline de type sérine dont le principal constituant enzymatique est la Subtilisine A. En plus de son activité endo-peptidasique, il présente également une forte activité stéréosélective d'aminoesters.

Les conditions optimales préconisées par le fournisseur pour l'utilisation de l'Alcalase 2.4.L sont : une température comprise entre 50 et 60°C et un pH compris entre 7 et 10.

Flavourzyme

La flavourzyme est un mélange d'aminopeptidases, endoprotéases et d'exoprotéases extraites from Aspergillusoryazae. Ce cocktail présente une activité protéolytique optimale dans l'intervalle de pH compris entre 7 - 10 et de température entre 40 et 60 °C.

HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Détermination des conditions optimales d'hydrolyses

Afin d'évaluer les potentialités hydrolytiques de nos préparations enzymatiques d'une part et d'autre part d'identifier leurs conditions optimales de mise en œuvre, des essais d'hydrolyse enzymatiques ont été réalisés.

Les expériences d'hydrolyse ont été réalisées dans un réacteur enzymatique à réservoir agité et à double paroi de 250 ml. La matière première a été homogénéisée avec de l'eau distillée pour obtenir un mélange de protéine de 15 % (p/p). Un volume de 200 ml de cette suspension a été transféré au réacteur discontinu, où les conditions de pH et de température ont été ajustées avant l'hydrolyse. Le traitement enzymatique a duré 5 h, comprenant deux étapes séquentielles de durée différente. La première étape a commencé par l'ajout d'une enzyme alcalisée au rapport de substrat de 3 % (p/p). Après une certaine période de temps, la Flavourzyme a été ajouté à un rapport enzyme-substrat de 3% (p/p). À ce stade, la réaction a été accompli jusqu'à la fin de 5 heures de traitement enzymatique.

Toutes les réactions d'hydrolyse ont été réalisées selon les conditions expérimentales (pH, température, temps d'addition de falourzyme) données par le plan d'expériences obtenu par la méthode de CCD (central composite design).

Au cours de la réaction, la valeur du pH est contrôlée et régulée par addition manuelle ou à l'aide d'un pH-stat (718 stat Titrino metrohm-suisse), de solution d'hydroxyde de sodium 1 N (NaOH).

Toutefois, la quantité de soude versée varie en fonction de la concentration des protons H⁺ libérés au cours de l'hydrolyse mais également en fonction des conditions physicochimiques dans lesquelles sont réalisées les expériences. En effet le pK de la réaction d'hydrolyse varie de façon significative avec la température selon la relation donnée par **l'Equation II-1** (Steinhardt and Beychok 1964):

$$pK = 7,8 + \frac{298-T}{298.T}$$
 Equation II-1

Le facteur de dissociation des ions α-NH₂ (groupement amine) qui peut être liée au pH de la réaction et de la température nécessaire pour le calcul du DH peut être exprimé selon **l'Equation II-2.**

$$\alpha = \frac{10 \text{pH} - \text{pK}}{1 + 10 \text{pH} - \text{pK}}$$
 Equation II

2

L'évolution de l'hydrolyse est exprimée à l'aide du degré d'hydrolyse (DH) est présenté dans la **Figure II.1**, dont l'équation déterminée par Adler Nissen (Adler-Nissen, 1986) est la suivante (**Equation II-3**) :

$$DH\% = \frac{Vb \cdot Nb}{\propto \cdot mp \cdot htot}$$
. 100 Equation II-

3

Où :

- Volume de soude consommée durant l'hydrolyse (L)
- Normalité de la soude (eq. L^{-1})
- α : Facteur de dissociation des groupements α -NH2
- Mp : Masse de protéines dans la matière fraîche (kg)
- h tot nombre total de liaisons peptidiques dans la protéine soit 8,6 eq.g.Kg⁻¹ protéines



Figure II.1 : Evolution de degré d'hydrolyse en fonction de temps à pH 8,5 ; T 55°C et après 180 min d'addition de flavourzyme.

Production d'hydrolysat

Après la détermination des conditions optimales de la réaction d'hydrolyse, la production de l'hydrolysat de coproduits de thon a été réalisée à plus grande échelle (**Figure II.2**).



Figure II.2: Dispositif expérimental utilisé pour l'hydrolyse enzymatique: 1. reácteur batch (250 mL) avec chémise de chauffage, 2. agitateur magnétique, 3. bain thermostaté, 4. système de titrage automatique, 5. réservoir de solution de titrage (NaOH), 6. sonde pH/température, 7. burette de dosage de NaOH.

Une quantité de coproduit est introduite dans un recteur enzymatique de double paroi de capacité de 4 L branché à un thermostat pour permettre la circulation de l'eau servant à réguler la température. Après un ajout d'eau distillée, le système est mis en agitation et amené à la température voulue à l'aide d'un bain thermostaté. Dès que la température optimale d'action de l'enzyme est atteinte, le pH initial du substrat est mesuré puis amené au pH optimal. Le pH de la solution à l'intérieur du système est mesuré à l'aide d'une sonde de pH plongée dans la solution et branchée à un pH-stat ; le pH est maintenu constant au cours de la réaction par l'ajout automatique de NaOH, 2N. Après stabilisation du système, la réaction d'hydrolyse est alors initiée par ajout de l'enzyme.

Après hydrolyse, le mélange réactionnel est chauffé dans un bain d'eau bouillante à 90°C pendant 20 min pour inactiver les enzymes. Puis les hydrolysats obtenus sont lyophilisés avec un lyophilisateur (Kansas City, MO, USA) et congelés en vue de leur utilisation pour les essais de fractionnement et d'ultérieure analyse.

METHODES D'ANALYSES

Méthodes physico-chimiques

Teneur en eau

Un poids précis de produit est placé dans une capsule en acier préalablement lavée séchée et tarée. La capsule est ensuite portée à une température de l'ordre de 105°C pendant 24 h dans une étuve puis pesée après refroidissement à température ambiante : l'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en eau est exprimée en pourcentage (%) et calculée selon l'équation II-4.

teneur en eau %
$$= \frac{Pf - Ps}{Pf} \times 100$$
 Equation II-4

Dosage des protéines

Méthodes de Kjeldahl

La méthode Kjeldahl est la méthode de référence pour la détermination des protéines dans les aliments (Crooke et Simpson, 1971). Il existe deux versions de cette méthode qui utilisent le même principe : la méthode macro Kjeldahl et la méthode micro Kjeldahl. Elles diffèrent seulement par l'appareillage utilisé et les quantités d'échantillon mises en oeuvre; la masse d'échantillon analysée par la méthode macro Kjeldahl est environ 5 fois plus élevée que celle analysée par la méthode micro Kjeldahl.

La détermination des protéines par la méthode Kjeldahl s'effectue en trois étapes :

- Digestion ou minéralisation de l'échantillon :

Au cours de cette étape, l'azote protéique est transformé en azote ammoniacal (NH₃) suite à l'oxydation de la matière organique par l'acide sulfurique concentré à haute température, en présence d'un catalyseur (Hg, (HgO), Cu (CuSO₄) ou Se) et d'un sel (K₂SO₄). L'ajout de sel permet d'accélérer la réaction suite à une élévation de la température d'ébullition. L'ammoniac produit est piégé dans le milieu réactionnel sous la forme de sulfate d'ammonium.

- <u>Distillation de l'ammoniac :</u>

L'ammoniac piégé sous la forme du sel (NH4)2SO4 est libéré par l'addition d'une solution concentrée de NaOH en excès puis distillé par entraînement avec la vapeur d'eau. Les vapeurs émises sont recueillies dans une solution d'acide borique, l'ammoniac réagit alors avec cet acide pour former du borate d'ammonium.

<u>Titrage de l'ammoniac :</u>

L'ammoniac sous la forme de borate d'ammonium est titré directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide chlorhydrique (HCl 0,1N) en présence d'un indicateur coloré de Tashiro (mélange de rouge de méthyle et de bleu de méthylène) amené au préalable à sa teinte sensible (gris sale) : Pour prendre en compte l'ammoniac contenu dans les réactifs, un essai blanc est réalisé en mettant tous les réactifs sauf l'échantillon. Le taux d'azote de l'échantillon est calculé par la formule suivante (**Equation II-5**) :

$$N \% = \frac{14.N.V}{Pe} \times 100$$
 Equation II-5

Où :

- 14 est le Poids moléculaire de l'azote (g.mol⁻¹)
- N : Normalité de l'acide chlorhydrique utilisé (eq. L⁻¹)
- V : Volume d'acide sulfurique versé en ml.
- Pe : Prise d'essai (mg)

On estime la quantité de protéines en g par $100 \text{ g} (g.100 \text{ g}^{-1})$ en multipliant le pourcentage d'azote trouvé par le coefficient conventionnel 6,25.

Dosage des acides aminés

Les acides aminés libres libérés par le traitement enzymatique ont été récupérés par séparation par SEC et analysés selon Liu et al. (1995). L'hydrolysat de tête de thon a été produit dans les conditions optimales de pH, de température et de durée du traitement du flavourzyme pour obtenir une teneur maximale en acides aminés libres. L'hydrolysat a été lyophilisé et la poudre obtenue a été dissoute dans de l'eau déionisé à une concentration en protéines de 5 mg / ml. Une fraction aliquote de 500 L a été injectée dans la colonne Superdex peptide 100/300 GL pour la séparation SEC. Les acides aminés libres ont été

définis à partir du profil SEC comme la fraction de masse moléculaire inférieure à 250 Da, notée F250. Cette fraction a été récupérée au moyen d'un collecteur de fractions FRAC-920 (General Electric Healthcare, Chicago, USA). Cette procédure a été répétée plusieurs fois afin de recueillir suffisamment d'échantillon pour l'analyse des acides aminés.

Les échantillons recueillis ont été regroupés et lyophilisés avant la détermination des acides aminés par Liu et al. (1995). À cette fin, les échantillons ont été filtrés et mélangés avec du tampon borate. La solution résultante a été transformée à 55 °C pendant 10 minutes avec 20 litres de réactif AccQ Fluor (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyle carbamate). Les dérivés ont été ensuite séparés par chromatographie en phase inverse, en utilisant le système Waters Alliance 2695 monté sur une colonne Acc-QTag (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, États-Unis). Les échantillons ont été élués dans une phase mobile composée d'éluant AccQ • Tag A, d'acétonitrile et d'eau à 37 ° C et les dérivés ont été détectés après séparation par le détecteur de fluorescence à balayage Waters 474.

Détermination des masses moléculaires

Afin de déterminer la distribution de poids moléculaires de nos hydrolysats protéiques ainsi l'efficacité du fractionnement par techniques membranaires sur la distribution des masses moléculaires des protéines et peptides présents dans les différentes fractions du perméats et concentrats obtenus a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique.

Principe

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC d'après l'anglais Size Exclusion Chromatography) est une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des molécules en fonction de leur taille ou plus spécifiquement de leur volume hydrodynamique. En effet selon leur taille, les molécules auront ou non accès à la microporosité des billes de gel constituant la phase stationnaire et seront plus ou moins ralenties ; il existe donc une relation logarithmique entre le volume hydrodynamique ou taille des molécules et leur volume ou temps d'élution. Un étalonnage de la colonne avec des molécules calibrées permet d'estimer la masse moléculaire d'un composé à partir de la détermination du temps d'élution. Détermination des distributions des masses dans les hydrolysats

La distribution du poids moléculaire des hydrolysats a été déterminée par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex peptide 100/300 GL (GE, Health care, Uppsala, Suède), montée dans un purificateur Akta UPC100 (Pharmacia LKB Biotech-nology AB, Uppsala, Suède). Les échantillons d'hydrolysat séchés ont été dissous dans de l'eau déionisée à une concentration protéique de 5 mg/ml. Pour effectuer l'analyse, on a injecté 100 μ l de la solution ci-dessus dans le système et on l'a éluée à 0,5 mL/min avec une phase mobile d'eau ultra pure et d'acétonitrile (70:30) contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique. L'absorbance des échantillons élués a été surveillée à 280 nm. Au total, huit étalons ont été utilisés pour étalonner la colonne : Gly (75 Da), Ala (89 Da), Phe-Gly-Gly (279 Da), (Gly)6(360 Da), vitamine B12(1355 Da), insuline (5733 Da), aprotinine (6511 Da) etribonucase (13700 Da) afin de tracer une courbe (**Figure II.3**) [(Volume d'élution Ve = f (poids moléculaires) Da].



Figure II.3 : Droite d'étalonnage pour déterminer les poids moléculaires du peptide.

Méthode statistique

Principe de la méthodologie des plans d'expériences

Cette méthode développée dans les années 1920 par Ronald A. Fischer a pour objectif d'étudier l'incidence de plusieurs facteurs sur un phénomène donné tout en limitant au maximum le nombre d'essais expérimentaux et assurant une bonne répartition des résultats mesurés. Pour cela, une expérimentation factorielle est proposée, c'est-à-dire une variation simultanée de tous les facteurs.

Comme connu, un plan expérimental de base est le plan factoriel 2^k , lorsque chaque expérience est effectuée à la combinaison des facteurs k expérimentaux, fixé à leurs valeurs maximales et minimales. Ces valeurs extrêmes pour les valeurs expérimentales sont normalement codées comme -1 et +1. Le nombre total de passages N dépendra du nombre de facteurs expérimentaux considérés (k), N = 2^{K} .

En effet, Un plan factoriel 3^k offre une densité plus élevée de points à l'intérieur de l'espace expérimental, puisque chaque facteur expérimental est fixé à ses valeurs minimales, moyennes et maximales de gamme, notées comme (-1, 0, +1).

En outre, Les inconvénients des conceptions factorielles, en particulier les conceptions 3k, sont surmontés par les conceptions centrales en composite (CCD). Ils impliquent moins de passages des variables expérimentales qu'un plan 3^k, mais leur densité à l'intérieur de l'espace d'expérience est plus élevée, ce qui permet un meilleur ajustement de la variable de sortie à la surface de réponse.

En ce qui concerne le terme Méthodologie de surface de réponse (RSM), il se réfère à différentes procédures mathématiques utilisées pour rechercher un optimum d'une variable Y étudiée à l'intérieur d'une gamme de variables expérimentales testées (Montgomery et Myers, 1995; Erikson et coll., 2000). En plus la (RSM), consiste à adapter la variable de sortie ou de réponse Y a un polynôme de second degré présenté par l'**Equation II-6** contenant les facteurs expérimentaux.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i X_i + \sum_{i \neq j}^N \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{for } n=1$$

Equation II-6

Le traitement des résultats se fait à l'aide de régressions multiples et l'analyse de variance (Goupy, 1988) et conduit à l'élaboration de modèles qui permettent la mise en évidence des facteurs les plus influents mais aussi des interactions entre facteurs en vue

de l'optimisation du phénomène. Le logiciel Statgraphic [™] a été utilisé pour générer le plan expérimental, l'analyse statistique et le modèle de régression. Ainsi on peut établir un modèle mathématique permettant de représenter au mieux le degré d'hydrolyse 'modèle descriptif', de l'expliquer 'modèle explicatif' et de prévoir la réponse en un point où aucune expérience n'est faite 'modèle prévisionnel' (Gacula et Singh, 1984, Montgomery, 1991).

Plan d'expériences en vue de l'optimisation des conditions d'hydrolyse

L'optimisation des paramètres opératoires a consisté à étudier l'avancement de la réaction enzymatique estimé par le degré d'hydrolyse (réponse) et la distribution de poids moléculaires de l'hydrolysat protéiques en fonction des valeurs de différents paramètres opératoires encore appelés facteurs (température, pH et durée du traitement de flavourzyme).

Les valeurs de différents paramètres opératoires ont été analysées à différents niveaux selon un plan composite central (CCD) de 16 expériences dont deux répétitions du point central.

Le degré final d'hydrolyse et la distribution du poids moléculaire des hydrolysats résultants étaient liés aux facteurs d'entrée définis ci-dessus.

Le degré d'hydrolyse DH a été calculé par Equation II-3 et exprimé en pourcentage.

Deux fractions SEC ont été choisies pour étudier l'influence du traitement enzymatique sur la distribution du poids moléculaire des hydrolysats : la fraction inférieure à 250 Da, et une seconde fraction comprise entre 700 et 2500 Da. Chaque fraction a été quantifiée en fonction de la superficie et notée comme F250 et F2500, respectivement.

Statgraphic Centurion XV (Statistical graphic corps, Rockville, MD, USA) a été utilisé pour la modélisation de régression et l'analyse statistique. Selon la méthode de surface de réponse, les réponses étaient liées aux facteurs d'entrée par des polynômes de deuxième ordre. Les modèles de régression ont été exprimés par l'équation quadratique suivante (Faustion II 7)

$(Equation \ II-7).$

 $(DH, F2500, F250) = b0 + b1 \cdot pH + b2 \cdot T + b3 \cdot texo + b11 \cdot pH^2$ $+ b12 \cdot pH \cdot T + b13 \cdot pH \cdot texo + b22 \cdot T^2 + b23 \cdot T \cdot texo + b33 \cdot t^2exo$ Equation II-7

Méthodologie d'optimisation

Optimisation unique des variables des réponses

Les équations de régression pour les deux variables de réponse (DH, F250et F2500) ont permis l'optimisation des conditions expérimentales de l'hydrolyse (c.-à-d. pH, T et Texo) maximiser soit le degré d'hydrolyse DH, soit les pourcentages de surface F250etF2500.

L'algorithme de gradient réduit généralisé (GRG), mis en œuvre dans l'outil Solver du logiciel MS Excel, a été choisi pour l'optimisation. Cette méthode de solveur est basée sur l'algorithme développé par Lasdon et al. (1978). Par cette approche, un gradient réduit généralisé est calculé par une combinaison du gradient de la fonction objective (i.e. vecteur de dérivés partiels de la variable réponse par rapport aux facteurs expérimentaux) et un pseudo-gradient dérivé des contraintes d'égalité. Sur la base du gradient réduit, l'algorithme détermine la direction de recherche pour l'optimum solution. Etant donné que cet algorithme est local, les solutions optimales dépendent fortement des conditions de départ (pH, T, Texo) et peuvent ne pas trouver l'optimum global. Pour surmonter ce recul, l'outil Solver comprend une méthode multi-départ qui permet de sélectionner l'algorithme GRG à partir d'une grille de points de départ) puis de sélectionner la meilleure solution parmi l'ensemble des optimums locaux.

D'après la littérature, les objectifs des problèmes d'optimisation unique seraient la maximisation de DH, F2500et F250. La maximisation de la DH a un impact positif sur certaines propriétés technologiques de l'hydrolysat qui en résulte, comme la solubilisation ou la capacité de rétention d'eau/de matières grasses (Gbogouriet al., 2004 ; Balti et al., 2010 ; García-Moreno et al., 2017).

Ces propriétés sont souhaitables pour l'incorporation des hydrolysats de poisson comme ingrédients des régimes alimentaires. Tenant compte sur la répartition du poids moléculaire, certaines études établissent un lien entre le remplacement partiel de la farine de poisson par des hydrolysats de l'ordre de 500 à 2500 Da pour et l'utilisation alimentaire plus élevée chez les larves (Kotzamanis et coll., 2007 ; Hamre et coll., 2013). La plupart des études sur l'approvisionnement en acides aminés mettent en évidence leur

rôle en tant que stimulants alimentaires chez les individus injustes, augmentant l'utilisation des aliments et la prise de poids (Barroso et coll., 2013 ; Morais, 2017). Au stade larvaire, les acides aminés libres et d'autres petits composés peuvent moduler l'activité de certaines enzymes et hormones spécifiques liées à l'immunité larvaires et à l'assimilation des nutriments (Li et al., 2009 ; Cai et al., 2015).

Problème d'optimisation bi-objectif (MOP)

Un problème d'optimisation multi-objectif (MOP) se pose lorsque plusieurs objectifs (éventuellement contradictoires) doivent être satisfaits. Dans MOP il n'y a pas de solution optimale unique (i.e. combinaison des variables de décision) qui optimise simultanément toutes les fonctions objectives.

Dans ce travail, la maximisation simulée de F2500 et F250 ne peut être réalisée par une seule combinaison de pH, T et Texo.

En effet, il est prévisible que la maximisation de la teneur en acides aminés F250 serait atteinte en employant des conditions optimales pour une activité du flavourzyme maximale. Néanmoins, un traitement intensif de l'exoprotéase réduirait la teneur en peptides de grande et moyenne taille (c.-à-d. serait préjudiciable à la maximisation de F2500).

Dans ce contexte, lorsque deux ou plusieurs objectifs sont poursuivis et que l'amélioration d'un objectif peut être préjudiciable à l'autre, des techniques d'optimisation multi-objective sont nécessaires. Contrairement à l'optimisation unique, le résultat d'un MOP n'est pas une solution unique mais un ensemble de solutions intermédiaires (c.-à-d. solutions optimales de Pareto) qui satisfont dans une certaine mesure les deux objectifs.

Les solutions non inférieures sont celles qui ne peuvent pas améliorer une fonction objective sans en dégrader au moins une autre (Halsall-Whitney et Thibault, 2006 ; Mavrotas, 2009).

Les méthodes les plus utilisées pour estimer le domaine Pareto sont la méthode de la somme pondérée et la méthode de la \mathcal{E} -contrainte. Les deux techniques peuvent constituer un sous-ensemble représentatif du Front Pareto, ce qui est, dans la plupart des cas, est suffisant pour le décideur. La première consiste à obtenir une fonction objective unique, exprimée en combinaison linéaire des objectifs individuels du MOP. La fonction objective combinée est obtenue au moyen d'un ensemble de facteurs de poids, qui

quantifient l'importance relative attachée à chaque objectif individuel (Kim et de Weck, 2004 ; Marler et Arora, 2009).

La sélection des coefficients de pondération, ainsi que la mise à l'échelle adéquatent des fonctions objectives uniques, sont les principales questions relatives à l'application de la méthode de la somme pondérée. En effet, il existe plusieurs combinaisons de poids menant à la même solution non inférieure, ce qui entraîne une utilisation inefficace du temps de calcul (Mavrotas, 2009). Cette méthode de \mathcal{E} -contrainte consiste à optimiser un seul objectif tandis que les autres sont utilisés comme équations de contraintes (Chaturvedi et Bandyopadhyay, 2014 ; Morales-Medina et coll., 2017).

Dans notre cas, le problème d'optimisation a été déclaré comme la découverte des conditions opératoires (pH, T, texo) dans leur condition expérimentale qui maximise la fraction F2500 pour une valeur fixe de F250 (notée \mathcal{E}), comme suit :

Maximiser F2500 (pH, T, texo)

Conditions opératoires soumis à :

 $7.2 \le pH \le 8.8$ $41.6 \le T \le 58.4$ $19 \le texo \le 221$

Equation II-8

METHODES DE FILTRATION

Les membranes

Les caractéristiques des différentes membranes de filtration qui ont été utilisées pour le fractionnement des peptides de nos hydrolysats protéiques, sont présentées dans le **Tableau II-1** ci-dessous.

 Tableau II-1 : Caractéristiques des membranes utilisées pour le fractionnement des hydrolysats protéiques.

	Matériau	Seuil de coupure (KDa)	Fournisseur	Configuration
	Polyéthylène imine	2	Synthétisée au	
Membranes	(PEI)		sein IEM	Plane
Organiques	Polyamide (PA)	0,3	MicroNadir	(Film tec)
	Céramique-Alumine	8, 3, 1	Tami (France)	
Membranes inorganiques	Boues (Zéolite) Couche active : smectite (nanoparticules) modifié par oxyde de titane	2	Synthétisée au sein de MES lab.	Tubulaire

Les membranes organiques planes (Filmtec) ont été mises en œuvre soit dans une cellule de filtration frontale (**Figure II-4**) de 900 ml ce qui correspond à une surface utile de filtration de 44 cm^2 .

Les membranes céramiques tubulaires (longueur 250 mm, diamètre extérieur 10 mm, monocanale de 3,5 mm de diamètre hydraulique) présentent une surface effective de filtration de 42 cm², soit dans le membrane de boues (Zéolite) de filtration tangentielle de surface utile de 17,7 cm² (dimensions de membrane : longueur 120 mm, diamètre extérieur 9 mm, monocanale de 5 mm de diamètre hydraulique).

Les unités de filtration

Filtration frontale

Le dispositif expérimental est présenté par la **Figure II-4.** Après avoir mis en place la membrane (**Figure II-5**), la cellule est remplie avec la solution à filtrer et le système est fermé puis mis sous pression grâce à une arrivée d'air comprimé (azote). L'agitation est réglée à 350 tr/min et une pression égale à 2 et 10 bar pour le procédé d'ultrafiltration et nanofiltration, respectivement. Le perméat obtenu est collecté dans un bécher placé sur une balance. Ainsi l'évolution de la masse de perméat au cours du temps est enregistrée afin de permet de déduire le débit du perméat.



Figure II.4 : Dispositif expérimental de filtration frontale : 1. Perméat, 2. Membrane,
3. Cuve d'alimentation, 4. Agitateur, 5. Manomètre, 6. Régulateur de pression, 7. Air comprimé.



Figure II.5 : Membrane organique et son imagerie (MEB)

Afin d'étudier la performance des deux membranes organiques UF et NF à écoulement frontale sur le fractionnement d'hydrolysats protéiques de têtes de thon, Trois étapes séquentielles sont effectuée selon la **Figure II.6**.





2 kDa (le rétentat a été recyclé tandis que le perméat a été collecté. À la fin de cette étape, le rétentat UF a été diafiltré sur la même membrane UF. Enfin, les deux perméats obtenus à la fin de ces deux étapes ont été mélangés pour être utilisés comme solution d'alimentation à l'étape NF avec une membrane de 0.3 kDa.

Trois fractions ont été récupérées et testées pour des activités antioxydantes in vitro et inhibitrices de l'ACE :

- Les rétentats obtenus à partir de la première étape d'UF suivi d'une étape de diafiltration DF à travers la membrane de MWCO de 2 kDa, appelées, R2 et R'2, respectivement.
- Le rétentat obtenu après filtration des deux perméats (UF+DF) de la membrane de MWCO de 2 kDa, à travers la membrane NF de MWCO de 0.3 kDa nommée, F'2R0.3.
- Le flux de perméat obtenu après la seconde étape NF de à travers la membrane de 0.3 kDa, nommée, F2F0.3.

Filtration tangentielle

Membranes céramiques tubulaires

Les essais d'ultrafiltration ont été réalisés à l'aide de trois membranes en céramique (**Figure II.6**) avec des seuils de coupure (MWCO) de 15 kDa, 8 kDa, 3 kDa et 1 kDa, achetées de Tami (Nyons, France).





Figure II.6 : Membranes céramiques monocanaux et son imagerie MEB



Chaque stade de concentration membranaire a été réalisé selon la même procédure selon le dispositif expérimental de concentrations batch (**Figure II.7**).

Figure II.7 : Schéma de dispositif de concentration en batch

Afin d'étudier la performance des quatre membranes UF en céramique à écoulement transversal sur le fractionnement d'hydrolysats protéiques de têtes de thon, trois configurations séquentielles sont effectués selon la **Figure II.8**.



Figure II.8 : Schéma de configurations séquentielles des étapes de fractionnement.

Deux stratégies ont été testées pour séparer les fractions de peptidiques, chacune consistant en deux filtrations consécutives. Comme le montre **Figure II.8**, chaque stratégie comprenait une première étape où l'hydrolysat était concentré dans les membranes MWCO de 8 kDa ou de 3 kDa. Les flux de perméat obtenus à partir de la première étape ont été filtrés à travers la membrane de 1 kDa. Six fractions ont été récupérées et testées pour des activités antioxydantes in vitro et inhibitrices de l'ACE :

- Les rétentats obtenus à partir de la première étape à travers les membranes de MWCO de 8 kDa et 3 kDa, appelées, R8 et R3, respectivement.
- Les rétentats obtenus après filtration des perméats des membranes de MWCO de 8 kDa et 3 kDa à travers la membrane de 1 kDa, nommée, F8R1 et F3R1, respectivement.
- Les flux de perméat obtenus après la seconde étape de à travers la membrane de 1 kDa, nommée respectivement, F8F1 et F3F1.

Tout d'abord, les membranes ont été hydratées avec de l'eau déionisée à 50 °C pendant 1 h, avec recyclage des flux perméat et rétentat. À ce stade, la perméabilité à l'eau de la membrane a été déterminée en passant de l'eau déionisée à 50°C et en mesurant le flux de perméat à une pression transmembranaire croissante. La vitesse d'écoulement transversal a été réglée à 3,3 m/s pour toutes les expériences, assurant un régime d'écoulement turbulent. La résistance intrinsèque de la membrane a été calculée comme l'inverse de la pente du flux de perméat d'eau en fonction de la pression transmembranaire.

En effet, avant les essais de concentration de lots, un essai d'étalonnage a été effectué sur chaque membrane en passant la solution d'alimentation à une vitesse d'écoulement transversal de 3,3 m/s et en augmentant les valeurs de la pression transmembranaire. Le perméat et le rétentat ont été recyclés dans le réservoir d'alimentation. La courbe d'étalonnage a été construite en traçant le flux perméat d'hydrolysat par rapport à la pression transmembranaire. Enfin, Les expériences de concentration de lots ont été effectuées pour chacune des membranes étudiées selon le dispositif expérimental présenté dans la **Figure II.9**.

A cette fin, 2 L de solution d'alimentation ont été concentrés à 50°C pendant 3 heures. Les conditions de fonctionnement étaient de 1 bar de pression transmembranaire et de vitesse d'écoulement transversal de 3,3 m/s, avec recyclage du flux de rétentat pendant que le perméat était continuellement enlevé.



Figure II.9 : Dispositif expérimentale d'ultrafiltration pour le fractionnement des peptides avec des membranes en céramiques.

Membranes en nanocomposite tubulaires

Le dispositif expérimental de filtration tangentielle est présenté par la Figure II-10.

Il comprend outre un carter membranaire adapté à la géométrie de la membrane (Figure II-11) testée.



Figure II-11 : Membrane en nanocomposite tubulaires utilisée et son imagerie (MEB).

Une cuve d'alimentation (3L) double enveloppe de façon à contrôler la température de filtration, une pompe de circulation, un manomètre et une vanne de contre-pression permettant de contrôler la pression transmembranaire. Le perméat est recueilli dans un bécher placé sur une balance de façon à déterminer en continu les débits de filtration. Le rétentat est recyclé dans la cuve d'alimentation tout comme le perméat lors des expériences où l'on souhaite maintenir la composition de l'alimentation constante.



Figure II.10: Dispositif expérimental de filtration tangentielle avec membrane en nanocomposite tubulaire: 1. Balance, 2. Sortie de perméat, 3. Membrane, 4. Manomètre,
5. Vanne régulateur de pression, 6. Cuve d'alimentation, 7. Pompe.

Afin d'améliorer le fractionnement de l'hydrolysat protéiques, trois modes de fonctionnement différents ont été testés. Pour cela une membrane céramique UF en nanocomposite à écoulement transversal et une membrane NF organique en polyamide à écoulement frontale sure le fractionnement d'hydrolysat protéiques de têtes de thon sont effectués selon la **Figure II-11**.



Figure II-12 : Schéma de configurations séquentielles des étapes de fractionnement.

Le mode de fonctionnement de cette configuration consistait en un processus en trois étapes. La première étape était la concentration par UF avec une membrane céramique tubulaire de 2 kDa (le rétentat a été recyclé tandis que le perméat a été collecté. À la fin de cette étape, le rétentat UF a été diafiltré sur la même membrane UF. Enfin, les deux perméats obtenus à la fin de ces deux étapes ont été mélangés pour être utilisés comme solution d'alimentation à l'étape NF avec une membrane organique de 0.3 kDa.

Trois fractions ont été récupérées et testées pour des activités antioxydantes in vitro et inhibitrices de l'ACE :

- Les rétentats obtenus à partir de la première étape d'UF suivi d'une étape de diafiltration DF à travers la membrane céramique de MWCO de 2 kDa, appelées, R2 et R'2.
- Le rétentat obtenu après filtration des deux perméats (UF+DF) de la membrane céramique de MWCO de 2 kDa, à travers la membrane organique NF de MWCO de 0.3 kDa nommée, F'2R0.3.
- Le flux de perméat obtenu après la seconde étape NF de à travers la membrane organique de 0.3 kDa, nommée, F2F0.3.

Caractérisation des membranes

La détermination des caractéristiques d'une membrane a pour objectif d'aider au choix de celle-ci pour une application donnée, mais aussi d'acquérir une meilleure compréhension de l'évolution de ses performances en cours d'utilisation.

La densité de flux de perméat, la sélectivité et l'indice de colmatage sont les critères classiques de quantification d'une opération de filtration et permettent ainsi de comparer les différentes membranes utilisées vis-à-vis d'une application. Pour évaluer ces différents paramètres, un protocole de caractérisation a été établi (cf. **Figure II-12**).



Figure II.12 : Protocole de caractérisation des membranes et évaluation du colmatage

La mise en œuvre de ce protocole diffère légèrement selon que l'on opère en mode frontal ou tangentiel.

Filtration frontale

Après avoir placé la membrane dans sa place, la cuve est remplie d'eau osmosée et mise sous pression. On mesure alors le débit à l'eau initial de la membrane (Q_{eau} 0). Après vidange de la cuve, le réservoir est rempli avec la solution à filtrer et on mesure le débit de filtration en fonction de temps (Q_s). En fin de filtration, un échantillon de filtrat final et du concentrât sont récupérés en vue d'analyses ultérieures.

La cuve et la membrane sont ensuite rincées avec d'eau osmosée puis, cette dernière est à nouveau remplie d'eau osmosée afin de mesurer le débit à l'eau après filtration (Q_{eau 1}).

Filtration tangentielle

Comme pour les essais en mode frontal, les essais réalisés sur le pilote de filtration tangentielle se déroulent en trois temps. Tout d'abord, le débit à l'eau de la membrane propre ou neuve ($Q_{eau 0}$) est relevé, puis on mesure le débit de filtration de la solution (Q_s) et on prélève des échantillons de perméat et rétentat en vue d'analyses ultérieures. Enfin, après avoir rincé l'installation pendant 5 minutes sans pression, on mesure le débit à l'eau ($Q_{eau 1}$). Afin de simuler un régime stationnaire lors de ces essais, le perméat et le rétentat sont recyclés (fonctionnement en boucle fermée).

Détermination de Flux de perméat

Tous les débits de filtration sont évalués par pesée et pour faciliter la comparaison des membranes, ils sont rapportés à l'unité de surface, on parle alors de densité de flux notées J et exprimées en L.h⁻¹.m⁻².

La densité de flux de perméat est calculée en assimilant la masse volumique de l'hydrolysat à celle de l'eau selon l'équation (**Equation II-9**) suivante :

$$J = \frac{Q}{S} = \frac{PTM}{Rm}$$
 Equation II-9

Où :

- J : densité de flux de perméat exprimée en L.h⁻¹.m⁻²
- Q : débit de solution à filtrer exprimé en L.h⁻¹
- S : aire de surface de la membrane exprimée en m²
- Rm : Résistance intrinsèque en bar.m².h. L⁻¹

Par conséquent, le flux de perméat (J) peut être lié à la pression transmembranaire (PTM) en fonction de l'équation (**Equation II-10**) suivante :

$$J = \frac{PTM}{\alpha + \beta. PTM}$$
 Equation II-10

Où α représente la résistance aux faibles valeurs de pression transmembranaire. Ce paramètre est lié à la résistance intrinsèque de la membrane et à toute résistance initiale due au colmatage. Le second terme dans le dénominateur (β .PTM) représente la résistance de la couche de polarisation du gel, qui est supposé être proportionnel à la pression transmembranaire appliquée (PTM) avec une constante de proportionnalité β . La valeur de Jmax peut être facilement obtenue comme 1/ β en supposant une pression transmembranaire élevée qui rendrait α négligeable.

On détermine ainsi pour chaque membrane testée, la densité de flux à l'eau sur membrane propre ou neuve (J_{eau,0}), la densité de flux de la solution J_s, la densité de flux à l'eau sur membrane colmatée (après le test de fractionnement) (J_{eau,1}) et enfin la densité de flux de l'eau sur membrane nettoyé avec un protocole de nettoyage approuvé.

Détermination du colmatage de la membrane :

Dans une situation idéale, le flux d'eau pure à travers une membrane (sans particules en suspension ou solutés dissous capables d'interagir avec la surface de la membrane) sera lié aux deux conditions fluidodynamiques (viscosité du perméat et chute de pression à travers le pore) et les dimensions du canal poreux (rayon et épaisseur du pore). Le débit dans la membrane devrait respecter la loi de Hagen-Poiseuille pour le débit dans les canaux selon **Equation II-11** suivantes (Cheryan, 1986) :

$$\mathbf{J} = \frac{\boldsymbol{\mathcal{E}} \cdot \boldsymbol{r}^2 \cdot \boldsymbol{\Delta} \boldsymbol{P}}{\mathbf{8} \cdot \boldsymbol{\eta} \cdot \boldsymbol{\Delta} \boldsymbol{x}}$$
 Equation II-11

Où J représente le flux de perméat, η est la viscosité du perméat, P est la chute de pression le long du canal d'épaisseur x et du rayon r, et ε représente la porosité superficielle de la membrane.
Cependant, le flux pendant le traitement membranaire d'une solution ou d'une suspension est généralement beaucoup plus faible que celui observé pour l'eau pure, pour plusieurs raisons (Cheryan, 1986) :

- Détérioration de la membrane, principalement attribuable à des régimes de nettoyage rigoureux, utilisant des agents de pH, de température et de nettoyage incompatibles avec le matériau de la membrane.
- Polarisation de la concentration : Les molécules de soluté sont transportées de la solution en vrac à la surface de la membrane. Les protéines et autres grosses particules sont en grande partie rejetées par la membrane, ayant tendance à former des couches assez visqueuses et gélatineuses sur la membrane, ce qui entraîne une résistance supplémentaire au flux de perméat.
- Colmatage de la membrane : Le terme colmatage désigne le déclin du flux dû au dépôt ou à l'accumulation de particules à la surface de la membrane et/ou à la précipitation de plus petits solutés à la surface ou dans les pores. Contrairement aux effets de polarisation de la concentration, le colmatage est irréversible, et le flux de perméat de la membrane ne peut être restauré sans un processus de nettoyage approprié.

Déclin du flux dû au colmatage de la membrane :

La Figure II.13 montre l'évolution typique du flux de perméat au cours d'une filtration à écoulement transversal. La courbe flux-temps peut être divisée en trois zones : une baisse rapide du flux au début de l'opération (zone I), une décroissance du flux de perméat à un taux inférieure (zone II) et un état stable où le flux reste constant dans le temps (zone III). Au début de l'opération de filtration, le flux de perméat est maximum puisque tous les pores de la membrane sont ouverts, offrant une zone de filtration maximale. La forte descente du flux de perméat est due au colmatage rapide des pores de la membrane par les solutions d'alimentation, ce qui réduit la zone de filtration. Les pores de la membrane seront complètement ou partiellement bloqués en fonction de la taille relative des solutés et des pores de la membrane. Plus la taille du soluté et le diamètre des pores sont semblables, plus le blocage des pores est complet (Belfort et al., 1994; Hlavacek et Bouchet, 1993).

À mesure que la membrane rejette d'avantage de molécules ou de particules de la solution d'alimentation, d'autres phénomènes acquièrent de l'importance, comme la formation d'une couche de gel en raison de la polarisation de la concentration, spécialement dans l'ultrafiltration des hydro-colloïdes tels que les protéines (Baccin et al., 2002) et le dépôt de matières colmatantes à la surface de la membrane, plus pertinent dans les opérations de microfiltration avec des particules plus grosses (Ho et Zydney, 2000). Tous ces phénomènes, qui augmentent la résistance hydraulique à l'écoulement, sont connus sous le nom de Colmatage.



Figure III-13 : Représentation schématique montrant la diminution du flux de perméat pendant une opération de filtration à écoulement transversal.

Le plateau final observé pour le flux de perméat (zone III) peut indiquer que la couche de gel a atteint son épaisseur maximale d'équilibre (Song, 1989b). Dans les procédés à haute pression transmembranaire et à faibles concentrations d'alimentation, où les solutés sont rapidement transportés de la solution en vrac vers la surface de la membrane, le flux de perméat diminue continuellement sans atteindre un état stable (Song, 1998a).

A cet égard, le modèle de Suki s'appuie sur le modèle de base série-résistance en tenant compte de trois résistances de série : la résistance intrinsèque de la membrane (R_M), la

résistance de la couche de gel de concentration de polarisation (RG) et celle fournie par les matières colmatantes (R_F), qui dépend du temps :

$$J = \frac{TMP}{R_M + R_G + R_F(t)}$$
 Equation II-

La résistance au colmatage R_F est supposée être proportionnelle à la quantité M de matière déposée sur la surface de la membrane :

12

$$R_F(t) = \lambda \cdot M(t)$$
 Equation II-13

Le taux de dépôt des solutés colmatantes sur la surface de la membrane (dM/dt) suit une cinétique de premier ordre constante de vitesse k, jusqu'à ce que la masse du gâteau atteigne une valeur maximale M*. À ce stade, le dépôt de matières colmatantes sur la couche de gâteau est équilibré par la migration tangentielle des particules entraînées par le flux de rétentat.

Pour les étapes de filtration frontale, M* dans le modèle de Suki représente la masse maximale de composés présents dans la cuve d'alimentation qui peuvent être retenus par la membrane. Il sera fonction de la charge en protéines de l'alimentation, et du rapport entre leur poids moléculaires et le seuil de coupure de la membrane.

$$\frac{dM}{dt} = k \cdot (M^* - M)$$
 Equation II-14

Par intégration de l'équation II-14 et substitution dans les équations II-12, et II-13 on obtient l'Equation II-15:

$$J = \frac{TMP}{R_M + R_G + \lambda \cdot M^* (1 - e^{-k \cdot t})}$$
 Equation II-15

Lorsque le produit λ M* représente la valeur maximale de la résistance à l'encrassement $(R_{F\infty})$ qui est atteinte à un temps de filtration important $(t \rightarrow \infty)$. À ce stade, le flux de perméat présentera une valeur minimale constante J_{∞} :

$$J_{\infty} = \frac{TMP}{R_M + R_G + \lambda \cdot M^*}$$
 Equation II-16

Au contraire, au début de la filtration (t=0), la résistance hydraulique ne sera assurée que par le matériau de la membrane et la couche de polarisation du gel, qui est supposée se développer instantanément. Par conséquent, le flux initial du perméat J_0 sera calculé par l'**Equation II-17**.

$$J_0 = \frac{TMP}{R_M + R_G}$$
 Equation II-

17

Enfin, en substituant les équations **II-10** et **II-11** à l'équation **II-9**, on obtient la forme générale du modèle de Suki :

$$J_{\infty} = \frac{J_0}{\left(1 + \frac{J_0}{J_{\infty}}\right) \cdot (1 - e^{-k \cdot t})}$$
 Equation II-

18

Détermination de l'efficacité de nettoyage

L'efficacité de nettoyage a été évaluée par l'évolution des résistances totales et de colmatage, ce qui a permis d'évaluer un indice d'efficacité de nettoyage pour chaque étape de nettoyage. La résistance hydraulique totale (RT) fournie par les membranes après chaque étape de nettoyage a été déterminée comme étant l'inverse de la pente du flux d'eau par rapport à la pression transmembranaire selon l'**Equation II-18**. En supposant que la résistance totale de la membrane colmatée est la contribution de la résistance intrinsèque de la membrane (R_M) et que celle fournie par les dépôts coltmatantes restants notés (R_F), ces derniers pourrait être évalués par l'**Equation II-19** suivante :

$$RF = RT - R_M$$
 Equation II-

19

En ce qui concerne l'indice d'efficacité du nettoyage, qui tient compte de la contribution d'une phase de nettoyage à la récupération totale du flux d'eau d'une membrane encrassée, il a été défini comme fonction des résistances hydrauliques au moyen de l'**Equation II-20** suivantes :

$$E = \frac{\mathrm{Ri} - 1 - \mathrm{Ri}}{\mathrm{R0} - \mathrm{Rm}} * 100$$

Equation II-

20

Où R_{i-1} et R_i représentent la résistance hydraulique de la membrane avant et après la ième étape de nettoyage, RM est la résistance intrinsèque de la membrane et R_0 représente la résistance initiale de la membrane colmatée. Les indices globaux d'efficacité de nettoyage, calculés comme la somme des indices de nettoyage pour chaque étape de nettoyage.

Détermination des activités antioxydants des fractions peptidiques

Deux propriétés antioxydants ont été étudiées sur les fractions peptidiques obtenues après UF et NF, à savoir la capacité de séquestrer les radicaux DPPH et l'activité chélatante des ions ferreux. L'activité de balayage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été déterminée par la méthode de Picot et al. (2010). À cette fin, une dilution en série des hydrolysats (1 ml), allant de 10 à 1 mg de protéines/ml, a été mélangée à 1 ml de solution de DPPH 0,1 mM dans du méthanol. Après incubation pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 515 nm. L'activité de balayage du DPPH a été exprimée en pourcentage d'inhibition par **l'Equation II-21** suivante :

DPPH scavenging activity,
$$\% = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{blank}}}\right)$$
 Equation II-21

Lorsque l'échantillon témoin a été obtenu en remplaçant la solution de DPPH par du méthanol, et que le témoin était un mélange 1:1 de DPPH et d'eau distillée. Pour chaque traitement enzymatique, une valeur IC_{50} a été obtenue en interpolant la concentration d'hydrolysat (exprimée en mg de protéines/ml) correspondant à 50 % de l'activité de balayage du DPPH.

La capacité de chélation des ions ferreux fait référence à la capacité d'hydrolyser les protéines de tête de thon en cations métalliques chélatés, qui agissent comme catalyseurs des processus d'oxydation. Cette activité antioxydant a été déterminée selon la méthode proposée par Decker et Welch (1990). Un ensemble de dilutions d'hydrolysats (1 ml) allant de 2 à 0,2 mg de protéines/ml a été mélangé avec 3,7 ml d'eau distillée et 0,1 ml de solution de Fecl₂. Après incubation pendant 3 min à température ambiante, on a ajouté un

volume de 0,2 ml de FerrozineTM (5 mM) et on a incubé la nouvelle solution pendant 10 min. L'absorbance a ensuite été mesurée à 562 nm. Le pourcentage d'activité chélatrice d'ions ferreux a été exprimé par l'**Equation II-22** mentionné ci-dessous :

Ferrous ion chelating activity,
$$\% = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{blank}}}\right)$$
 Equation II-22

Nettoyage des membranes

Après utilisation, les membranes sont nettoyées selon la procédure suivante :

- Pour les membranes en céramiques (Alumine), Une étape de traitement alcalin a été appliquée après l'opération d'ultrafiltration. Cette séquence de nettoyage comprend les étapes suivantes :

La membrane colmatée a été rincée en passant 20 L d'eau déminéralisée à une vitesse d'écoulement transversal de 3,3 m/s et à température ambiante. Cette étape a traîné les dépôts de port de rétentat, alors qu'aucune pression de transmembranaire n'a été appliquée.

Un traitement alcalin a été appliqué en utilisant une solution de 20 g/L de NaoH plus 2 g/L de sulfate de dodécyle sodique à 50 °C. Le perméat et le rétentat ont été retournés dans le réservoir d'alimentation pendant 30 minutes. La vitesse d'écoulement transversal et la pression de transmembranaire ont été réglées à 1,5 bar et 3,3 m/s, respectivement. Au stade de neutralisation, les ports du perméat et du rétentat ont été rincés à l'eau déminéralisée jusqu'à obtention d'un pH neutre des deux flux.

- Pour les membranes en boues (tubulaire) et organiques (plane), on réalise un premier lavage avec une solution alcaline (soude à 1,5% à 40°C). La solution circule tout d'abord 5 minutes sans pression puis 20 minutes sous une pression de 2 bar. L'objectif de ce nettoyage est la dégradation de la matière organique. L'installation et la membrane sont ensuite rincées à l'eau osmosé jusqu'à l'obtention d'un filtrat neutre. Un second lavage est réalisé avec une solution acide (acide nitrique à 1,5% à 40°C) dans les conditions similaires à celles du nettoyage basique. Ce second nettoyage permet de dissoudre les composés minéraux et le reconditionnement chimique de la membrane. En effet, après chaque étape de nettoyage en vérifie la densité de flux de perméat afin d'évaluer l'efficacité de protocole choisie.

Après le rinçage à l'eau, les membranes tubulaires sont soit conservées à 4°C dans l'eau osmosé en présence d'azide de sodium 0,02% ou soit séchées et stockées jusqu'à leur utilisation.

Chapitre III RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie I. Hydrolyse enzymatique

Partie 1 : HYDROLYSE ENZYMATIQUE

I. OPTIMISATION DES CONDITIONS DES HYDROLYSES

I.1 Etude préliminaire

Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié la faisabilité du procédé d'obtention d'hydrolysats protéiques à partie des têtes de thon (15 % de protéines) au moyen des protéases commerciales. Pour cela, un criblage initial des 3 enzymes, notamment : Alcalase, Protamex et PTN sous formes protéases sont appliqués afin d'obtenir un degré d'hydrolyse le plus élevé qui assure une plus grande teneur en peptide à basse taille et en acides aminés libre dans l'hydrolysat final.

Par conséquence, ces protéases (Alacalse, Protames et PTN) sont testées selon leur condition opératoires optimal de pH et de température : pH 8, T° 50°C ; pH 8, T° 45°C et pH 8, T° 50°C, respectivement.

Selon la **Figure III.1** l'hydrolyse enzymatique de tête de thon avec l'alcalase a abouti le meilleur degré d'hydrolyse DH% égale à 32,7 %.



Figure III.1 : Evolution de degré d'hydrolyse en fonction de temps des 3 protéases utilisés.

Pour ce regard, nous avons choisi l'alcalase comme un endoprotéase pour la suite de notre étude enzymatique.

I.2 Présentation de l'étude

Les hydrolysats protéiques des poissons sont des ingrédients potentiels pour la formulation des régimes aquacoles. L'enrichissement de cet ingrédient en polypeptides et en acides aminés libres a pour but d'améliorer le développement larvaire et l'assimilation alimentaire.

En général, Le processus de la réaction d'hydrolyse enzymatique est complexe et influencé par plusieurs facteurs tels que la température, la concentration initiale en enzymes, la durée de la réaction, la quantité d'eau ajoutée, etc.

Dans ce travail, nous avons produit des hydrolysats de tête de thon à l'aide d'un traitement enzymatique séquentiel utilisant Alcalase et Flavourzyme pour produire un hydrolysat protéique avec le profil de poids moléculaire désiré. Plus précisément, notre travail est porté sur la teneur en petits peptides compris entre 700 et 2500 Da (F2500) et celle en acides aminés libres (F250), soutenus par leurs avantages en tant qu'ingrédients alimentaires pour l'aquaculture. Seuls, le pH, la température et la durée du traitement de Flavourzyme sont abordés dans le cadre de notre étude.

I.3 Présentation du plan d'expérience

Les effets du pH, de la température et de la durée du traitement flavourzyme étaient liés à la fois au degré final d'hydrolyse (DH %) et à la distribution du poids moléculaire de l'hydrolysat résultant. Le traitement enzymatique a commencé par l'addition d'alcalase, qui a agi jusqu'à l'achèvement de 5 h d'hydrolyse. Flavourzyme a été ajouté à un deuxième stade. Le premier stade, où seulement l'endoprotéase (i.e. alcalase) agissait comme enzyme, a été noté comme Tendo. La durée de la deuxième étape, au cours de laquelle flavourzyme et alcalase agissaient toutes deux dans le récipient de réaction, a été noté comme Texo. Étant donné que la durée totale du traitement enzymatique a été fixée à 5, les deux variables d'entrée sont liées comme indiqué dans l'**Equation III.1**

Texo + Tendo = 300 min Equation III.1

Les variables d'entrée décrites ci-dessus ont été analysées à différents niveaux selon un plan composite central (CCD) de 16 essais expérimentaux, dont 2 répétitions du point

central. Ainsi que les valeurs observées pour les variables de réponse, sont présentées

dans le **tableau III.1**.

	Operating conditions				Molecular weight distribution Percentage area, %					
Exp. No.	рН	T,°C	t _{endo} , min	t _{exo} , min	- Final DH %	>5000 Da	5000 – 2500 Da	2500 -700 Da	700 – 250 Da	< 250 Da
1	8.5	45	240	60	31.51	8.68	10.53	23.63	40.18	17.3
2	8.5	45	120	180	32.18	8.77	10.43	23.76	41.87	15.4
3	7.5	45	240	60	10.55	3.54	6.41	19.40	41.27	29.7
4	8	41.6	180	120	11.80	6.84	8.93	22.89	41.15	20.19
5	8.5	55	120	180	25.83	5.04	7.76	20.07	44.72	22.7
6	7.5	55	240	60	18.32	9.18	10.59	29.29	35.51	15.43
7	7.2	50	180	120	15.58	4.61	7.13	18.04	42.33	28.2
8	8.5	55	240	60	25.46	9.68	7.38	22.93	36.91	23.10
9	8.8	50	180	120	26.73	4.50	7.59	19.10	42.34	26.8
10	8	50	79	221	28.33	4.10	7.31	20.35	45.15	22.0
11	7.5	45	120	180	14.09	4.46	7.40	19.26	42.85	24.8
12	7.5	55	120	180	19.86	4.25	11.74	10.11	43.96	25.69
13	8	50	281	19	13.91	4.65	9.62	22.55	41.24	17.4
14	8	58.4	180	120	29.91	6.35	10.50	19.94	41.50	21.71
15	8	50	180	120	24.76	4.36	7.66	19.97	42.80	25.6
16	8	50	180	120	24.76	3.52	6.39	17.78	41.89	29.0

Tableau III.1: Final degree of hydrolysis (DH, %) and molecular weight distribution (percentage area, %) of the tuna head hydrolysates as a function of the reaction parameters.

Les niveaux de pH (7,2 à 8,8) et de température (41,6 à 58,4 C) ont été choisis en tenant compte des intervalles d'activité déclarés pour alcalase et flavourzyme. Le troisième facteur d'entrée était la durée du traitement Flavourzyme (Texo), qui variait de 19 à 221 minutes. Tenant compte de la dépendance linéaire exprimée en **Equation III.1**, Tendo et Texo ne peuvent pas être présents dans le même modèle de régression. Le degré d'hydrolyse DH est calculé et exprimé en pourcentage. Deux fractions SEC ont été choisies pour étudier l'influence du traitement enzymatique sur la distribution du poids moléculaire des hydrolysats : la fraction inférieure à 250 Da, et une seconde fraction comprise entre 700 et 2500 Da. Chaque fraction a été quantifiée en pourcentage de superficie et notée F250et F2500, respectivement.

Statgraphic Centurion XV (corps graphique statistique, Rockville, MD, USA) a été utilisé pour le modèle de régression et l'analyse statistique. Selon la méthode de surface de réponse, les réponses étaient liées aux facteurs d'entrée par des polynômes de deuxième ordre. Les modèles de régression ont été exprimés par l'Equation quadratique général décrite ci-dessus (**Equation II.7**).

 $(DH, F2500, F250) = b_0 + b_1 \cdot pH + b_2 \cdot T + b_3 \cdot texo + b_{11} \cdot pH^2 + b_{12} \cdot pH \cdot T + b_{13} \cdot pH \cdot texo + b_{22} \cdot T^2 + b_{23} \cdot T \cdot texo + b_{33} \cdot t^2 exo$

L'interception b_0 et les coefficients B_1 à B_{33} ont été estimés par régression multiple. La signification de chaque terme des variables de réponse a ensuite été évaluée statistiquement au moyen de l'analyse de la variance (ANOVA). Cette approche calcule une probabilité associée (p-valeur) pour chaque effet (c.-à-d. linéaire, quadratique ou terme d'interaction dans le polynôme) à un niveau de confiance de 95 %.

Les effets dont la valeur p est inférieure à 0,05 ne sont pas statistiquement significatifs et ont par la suite été éliminés du modèle de régression. Parmi les différentes techniques disponibles pour réduire les modèles de régression, la sélection rétrospective (Kroese et Chan, 2014) a été choisie dans ce travail. Cette approche commence avec le modèle complet, et élimine progressivement les termes avec la valeur p (p > 0,05). La qualité du modèle quadratique a été évaluée par le coefficient de détermination \mathbb{R}^2 , ainsi que par l'erreur absolue moyenne (c.-à-d. la valeur moyenne des résidus) et l'erreur type d'estimation (écart-type des résidus).

I.4 Modélisation Mathématique

I.4.1 Estimation des paramètres du modèle

Les coefficients des modèles prédictifs ont été obtenus par régression non linéaire et réduit par élimination rétrospective, où les termes associés à la valeur p inférieur à 5 % ont été supprimés. Les résultats du coefficient de régression du modèle sont rapportés dans le **tableau III.2**. La qualité d'ajustement du modèle réduit a été confirmée par le coefficient de détermination R².

	Response variables					
Source	Final degree of hydrolysis	Percentage area 700 – 2500 Da	Percentage area < 250 Da			
Intercept	-717.6120	128.6030	8.7249			
рН	120.9560	-11.8449	-32.6041			
Т	7.8787	-1.9119	3.9332			
t _{exo}	0.1635	-0.2819	0.8255			
pH ²	-7.2015	-	-			
рН•Т	-	-	0.8051			
pH·t _{exo}	-	0.1055	-0.0752			
T^2	-0.0685	0.0345	-0.1019			
T·t _{exo}	-	-0.0128	-			
t _{exo} ²	0.0004	0.0002	-0.0008			
Lack of fit (p-value)	p > 0.05	p>0.05	p > 0.05			
R-squared (r2)	93.3%	89.8%	89.6%			
Adjusted r2	88.8%	79.6%	79.3%			
$\mathbf{M.A.E.}^{1}$	1.19	1.83	1.24			
S.E.E. ²	2.31	1.03	2.03			

Tableau III.2: Coefficients	de régression	n des modèles	réduits p	our le degr	é final
d'hydrolyse et les fractions	SEC F2500 ((2500-700 Da)	et F250 (inférieurs 2	250 Da)

I.4.1.1 Modélisation du degré d'hydrolyse

Les valeurs finales de DH sont résumées dans le **tableau III.1** et présentés en fonction des conditions expérimentales (pH, température de réaction et durée du traitement par exoprotéase). On remarque que les valeurs observées de degré d'hydrolyse DH% varient de 11,79% à 32,18%.

Ce modèle prédictif réduit a été confirmé par l'analyse de variance R² égale à 93,18% et présenter selon l'**Equation III.2**

$$DH = -717.612 + 120.956*pH + 7.8787*T + 0.1635*texo$$
 Equation III.2
- 7.2015*pH² - 0.0685*T² - 0.0004*texo²

Le modèle prédit de DH a permis de générer une placette de surface (**Figure III.2**) où le degré final d'hydrolyse, calculé par l'**Equation III.2**, a été tracé en fonction des conditions opératoires (pH et température dans le réacteur).



Figure III.2 : Tracé de la surface du degré final d'hydrolyse en fonction du pH et la température de la réaction à temps fixes du traitement par flavourzyme.

La surface de réponse illustrée dans la **Figure III.2** présente une condition de crête montante typique, où le maximum se situe à la valeur supérieure de l'un des facteurs expérimentaux. En effet, on observe que le degré d'hydrolyse DH% était favorisée par des niveaux croissants de pH égale à 8,4 et de température de réaction à 57,4 °C, tout en atteignant un maximum du DH% (31,7%) après 183 min de traitement par flavourzyme. En effet, l'alcalase est une endoprotéase de type sérine, qui coupe de préférence des liaisons peptidiques impliquant des résidus aromatiques et de méthionine. Il présente une activité protéolytique maximale à un pH compris entre 8 et 9 et des températures comprises entre 50 et 60 C (Nissen, 1986 ; Valencia et al., 2014). Compte tenu de sa grande sélectivité et de son activité endoprotéasique élevée dans notre range expérimentale, il est probable que l'ampleur de la réaction serait principalement déterminée par l'intensité du traitement par alcalase. En ce qui concerne l'exoprotease (flavourzyme), il est vendu sous forme de cocktail enzymatique extrait d'Aspergillus oryzae, principalement composé d'amino et di-peptidases. Ces enzymes catalysent le

clivage des liaisons peptidiques terminales ou pénultièmes, libérant respectivement des acides aminés et des dipeptides.

Selon (Merz et al.2015), les fractions de di-peptidase et d'aminopeptidase contenues dans le complexe flavourzyme présentent une activité optimale à pH neutre (environ 6-7) et à des températures relativement élevées (55-65 C°).

Dans les conditions expérimentales maximisant le degré d'hydrolyse (pH 8.4, T°57.4 C et texo égal à 183 min), alcalase présente une activité protéolytique optimale, tandis que l'activité aminopeptidase du flavourzyme est limitée. Il prévu alors que le traitement par alcalase été le responsable de la majeure partie de la solubilisation et de l'hydrolyse des protéines de thon. Néanmoins, la combinaison d'alcalase et de flavourzyme a permis d'obtenir des degrés d'hydrolyse plus élevés que l'Alcalase seul (Nchienzia et al., 2010). Une digestion antérieure de protéines brutes par alcalase augmente la disponibilité des sites N-terminaux disponibles pour l'attaque d'exopeptidase.

En outre, plusieurs auteurs ont signalé que le traitement combiné avec Alcalase et Flavourzyme permettait d'obtenir des hydrolysats à partir de sous-produits d'origine animale. Nchienzia et al. (2010) ont transformé des sous-produits de volaille en utilisant comme catalyseurs lcalase et flavourzyme (1:2 v/v), soit simultanément, soit ajoutés de manière séquentielle (Alcalase puis Flavourzyme). Les auteurs ont constaté que le traitement séquentiel, dans lequel alcalase permettait de digérer l'hydrolysat avant l'ajout de flavourzyme, a conduit à une DH % légèrement plus élevée que l'addition simultanée des deux enzymes. Ceci est en accord avec nos résultats, où le degré d'hydrolyse maximal a été atteint lorsque le flavourzyme a été ajouté après 117 min de traitement par alcalase.

I.4.1.2 Modélisation de la distribution des poids moléculaires

Les deux fractions de poids moléculaires F2500 et F250 ont été modélisées en fonction des conditions expérimentales (pH, température de réaction et durée du traitement par exoprotéase) par le modèle quadratique complet énoncé par l'**Equation II.7**. Les deux modèles empiriques ont été réduits par élimination rétrospective, où les termes présentant une valeur de probabilité associée inférieure à 5 % ont été éliminés. Les modèles réduits résultants pour F2500 et F250 sont exprimés par l'**Equation III.3 et Equation III.4**, respectivement.

F2500 = 128.603 - 11.8449*pH - 1.9119*T - 0.2819*texo +Equation III.3 $0.1055*pH*texo + 0.0345*T^{2} - 0.0128*T*texo + 0.000242*texo^{2}$

F250 = 8.7249 - 32.6041*pH + 3.9332*T + 0.8255*texoEquation III.4 + 0.8051*pH*T - 0.0752*pH*texo - 0.1019*T² - 0.0008*texo²

La qualité de l'ajustement des deux modèles réduits a été confirmée par leurs coefficients de détermination R², qui étaient de 89,8 % et 89,6 % pour F2500 et F250, respectivement. Le modèle prévu des deux fractions SEC a été tracé en fonction des conditions opératoires (pH, température) dans une placette de surface présentée sur la **Figure III.3**.



(a)

(b)

Figure III.3 : tracé de la surface de pourcentage en peptide (a) SEC profile F2500, (b) SEC profil F250, en fonction de pH et la T°C à temps fixes du traitement par flavourzyme.

La durée du traitement par flavourzyme (texo) a été fixée à sa valeur optimale pour maximiser chaque pourcentage de surface (c.-à-d. 19 min et 172 min pour un maximum de F2500 et F250, respectivement). La parcelle de surface de F2500 présente une forme

de flanc de colline, où le maximum était situé à un sommet extrême de la région de conception. Selon la procédure d'optimisation, les conditions expérimentales pour un maximum de F2500 (42,5% de la superficie totale) étaient atteintes à pH 7,2 et à température égale à 58,4C°. Ces conditions sont en dehors de la plage d'activité protéolytique optimale pour l'hydrolyse enzymatique avec l'alcalase, ce qui réduit la disponibilité des résidus terminaux pour l'attaque par Flavourzyme (Nchienzia et al., 2010). De plus, la durée du traitement par flavourzyme (19 min), responsable de la libération des peptides à chaîne courte et des acides aminés, est courte. Plusieurs études sur les régimes d'élevage larvaire confirment que la substitution partielle de protéines alimentaires (principalement sous la forme de farine de poisson) par des hydrolysats de protéines de poisson a un impact positif sur le gain de poids et le taux de survie (Zhenget al., 2013 ; Ovissipour et al., 2014 ; Cai et al., 2015 ; Khosraviet al., 2017). Plus précisément, Kotzamanis et al. (2007) recommandent l'enrichissement de protéines alimentaires avec des peptides courts de l'ordre de 500 à 2500 Da pour un développement larvaire optimal.

En addition, La représentation en surface de la teneur en acides aminés libres F250, présentée dans la (**Figure III.3.b**) montre que la libération d'acides aminés libres est favorisée par de faibles niveaux de pH et des températures modérées autour de 50 C°. Le maximum de la surface de la réponse F250 (30,7 % de la superficie totale) a été atteint à pH 7,2 à température égale à 48,3 C et après172 min de traitement par Flavourzyme. Ces valeurs de la température et de durée du traitement par exoprotéase assurent l'obtention d'une teneur maximale en acides aminés comprise entre 30,7 et 25,9 % pour l'intervalle de pH varie de 7,2 à 8,8.

Dans les conditions optimales estimées ci-dessus, le substrat a été digéré pendant 128 minutes par alcalase avant l'addition de Flavourzyme. Le relâchement des acides aminés libres a été ensuite contrôlé par l'activité aminopeptidase de Flavourzyme, qui est inversement corrélée avec le pH dans l'intervalle 7.2-8.8.

La plupart des études traitant de la supplémentation en acide des régimes aquacoles mettent en évidence leur rôle en tant que stimulants alimentaires, augmentant l'utilisation de l'alimentation et donc le gain de poids, en particulier chez les individus juvéniles (Nunes et coll., 2006 ; Li et coll., 2009 ; Barroso et coll., 2013 ; Morais, 2017). En plus

d'être des éléments attirants pour l'alimentation, certains acides aminés sont d'importants régulateurs des voies métaboliques clés qui impliquent l'immunité larvaire, la résistance, la croissance et l'assimilation des nutriments (Li et al., 2009). À cet égard, Cai et al. (2015) ont conclu que les acides aminés alimentaires et les petits peptides avaient un effet significatif sur la digestion et l'absorption des protéines dans le croaker jaune (Larimichthys crocea), en modulant l'activité enzymatique et d'hormones spécifiques.

La distribution du poids moléculaire des hydrolysats a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique. À titre d'exemple, la **Figure III.4** montre les profils SEC des hydrolysats expérimentaux N°13, 10 et 15, tous sont produits à un pH de 8, T° 50 C et avec durées croissantes du traitement par flavourzyme (19, 120 et 221 min, respectivement).



Figure III.4 : Chromatographie d'exclusion stérique des profils des hydrolysats protéiques produits à pH 8, 50°C après 19 min, 120 min et 221 min de traitement par flavouzyme.

Quant à cet objectif, nous avons divisé les profils des hydrolysats protéiques en quatre régions distinctes, soit F5000, F2500, F700 et F250. Indépendamment des conditions

d'hydrolyse, tous les profils des poids moléculaires présentaient une large région dominante comprise entre 2500 et 5000 Da (F5000), associée aux protéines partiellement hydrolysées. Un deuxième pic, entre 700 et 2500 Da (F2500), correspond à une gamme de peptides dont la longueur de chaîne se situe entre 4 et 15 résidus.

La troisième région comprise entre 250 et 700 Da correspond à des peptides courts entre 2 et 3 résidus. Enfin, un seul pic a été observé aux temps de rétention supérieurs à 43 min correspond à F250 (poids moléculaire inférieur à 250 Da). Ce pic est associé aux acides aminés libres libérés pendant l'hydrolyse. On a observé que l'augmentation de la durée du traitement flavourzyme avait un impact significatif sur la teneur en acides aminés libres dans l'hydrolysat final, ce qui en témoigne avec l'activité aminopeptidase du complexe flavourzyme.

Comme mentionné ci-dessus, nous sommes concentrés sur les fractions F2500 et F250 afin d'évaluer l'influence des conditions expérimentales sur la distribution du poids moléculaire des hydrolysats résultants. Les deux fractions sont des ingrédients d'intérêt pour les régimes aquacoles, d'après la documentation scientifique qui appuie leur effet positif sur la croissance des larves et la palatabilité alimentaire (Nunes et al., 2006 ; Li et al., 2009).

I.4.1.3 Optimisation bi-objective de la distribution du poids moléculaire

Les résultats obtenus après optimisation unique des fractions F2500 et F250 sont contradictoires, car les Optimaux sont situés dans des conditions expérimentales différentes. Par exemple, avec les conditions optimales pour un maximum de F2500 (42,4%), la quantité d'acides aminés libres dans l'hydrolysat résultant n'était que de 2,28%.

En revanche, les conditions optimales d'hydrolyse pour un F250 maximal (30,7%) conduisent à 15,2% de la fraction F2500.

D'une manière générale, les conditions opératoires conduisant à des taux croissants d'acides aminés libres ont été préjudiciables au contenu de la fraction F2500 dans l'hydrolysat final.

Ceci suggérait d'utiliser une approche d'optimisation bi-objective, capable de trouver des solutions intermédiaires satisfaisant à un certain degré des deux objectifs (i.e. maximisation de F2500 et F250). Il existe un intérêt croissant pour la littérature scientifique dans la conception de stratégies de valorisation par des techniques d'optimisation multicritères.

A titre d'exemple, Antelo et al. (2015) ont proposé une technique d'optimisation à objectifs multiples (la méthode de la contrainte d'epsilon) afin de choisir la meilleure voie pour convertir les espèces de poissons en produits précieux.

De plus, des méthodes d'optimisation multi-objectifs ont déjà été utilisées pour produire des hydrolysats de protéines de poisson à partir de maquereau avec des propriétés antioxydantes optimisées (Morales-Medina et al., 2017). De même, García-Moreno et al. (2014) ont optimisé simultanément le rendement et la stabilité d'oxydation de l'huile de poisson extraite mécaniquement à partir des rejets de sardines.

Tenant compte du problème d'optimisation bi-objectif énoncé dans l'équation II.8, la procédure d'optimisation (\mathcal{E} -contrainte) peut être formulée mathématiquement comme suit :

Maximiser F2500 = 128.603 - 11.8449*pH - 1.9119*T - 0.2819*texo + 0.1055*pH*texo + 0.0345*T² - 0.0128*T*texo + 0.000242*texo

Opérer à :

 $7.2 \le pH \le 8.8$ $41.6 \le T \le 58.4$ $19 \le texo \le 221$

Maximiser F250 = 8.7249 - 32.6041*pH + 3.9332*T + 0.8255*texo + 0.8051*pH*T - 0.0752*pH*texo - 0.1019*T² - 0.0008*texo² = \mathcal{E}

Cependant, de la nature des SEC profile F2500 et F250 dans leur gamme expérimentale de pH, T et texo, le Pareto Front est une courbe continue sur l'ensemble de son domaine.

Le **Tableau III.3** présente un ensemble de 17 solutions du problème d'optimisation, qui représente une approximation discrète du front de Pareto.

Chaque ligne du **tableau III.3** contient les conditions optimales de fonctionnement (pH, T et texo) pour maximiser la teneur en F2500 à une valeur fixe d'acides aminés libres comprise entre 2,28 % et 30,7 %.

Tableau III.3 : Ensemble de solutions optimales (front de Pareto) pour le problème d'optimisation multi-objectif : maximisation de F2500 à un contenu fixe en acides aminés libres F250.

Fraction below 250 Da F_{250} , %	рН	T, °C	t _{exo} , min	Fraction 700-2500 Da F ₂₅₀₀ , %
2.28	7.39	58.4	19	42.4
4	7.52	58.4	19	41.1
6	7.68	58.4	19	39.6
8	7.83	58.4	19	38.1
10	7.98	58.4	19	36.6
12	8.14	58.4	19	35.1
14	8.29	58.4	19	33.6
16	8.45	58.4	19	32.0
18	8.60	58.4	19	30.5
20	8.72	58.4	22	29.0
22	8.80	58.4	30	27.5
24	8.80	58.4	51	25.8
26	8.80	57.7	76	23.3
27.6	8.80	55.5	94	20.6
28	7.20	42.6	181	20.0
30	7.20	45.2	164	17.2
30.7	7.20	48.3	169	15.2

La teneur inférieure en acides aminés libres (2,28 %) du **tableau III.3** a été obtenue dans les conditions optimales suivantes (pH 7,4, 58,4 C et 19 min de traitement par exoprotéase) pour une teneur maximale de la fraction F2500 (42,4 %).

Au-dessus de cette valeur, un ensemble de solutions intermédiaires a été calculé en permettant à la teneur de F250 d'augmenter jusqu'à son unique optimum de 30,7 % à (pH 7,2, T 47,3 C° et 169 min).

Dans cet intervalle, le Pareto Front peut être décomposé en trois sous-ensembles principaux :

• Sous-ensemble I : La teneur en acides aminés libres a augmenté de 2,28 % à 22 % en maintenant la température à 58,4 °C et en permettant au pH d'augmenter de 7,4 à sa limite supérieure de 8,8. Toutes les solutions optimales dans cette gamme impliquent de courtes durées de traitement par flavourzyme, en assurant une augmentation légère de 19 à 30 min. Dans ces conditions expérimentales, une augmentation du pH a favorisé l'activité endoprotéase d'alcalase.

Cette action a augmenté la disponibilité de sites terminaux pour l'attaque de flavourzyme, et donc la libération d'acides aminés libres.

- Sous-ensemble II : Une augmentation de fraction F250 (acides aminés libres) de 22 % à 27,6 % a été obtenue en maintenant le pH à sa limite expérimentale supérieure (pH égale à 8,8) et en permettant à la variable texo d'augmenter de 30 à 94 min. Quant à la température de réaction, elle a diminué légèrement de 58,4 C° à 55,5 C°.
- Sous-ensemble III : Le triplet (pH égale à 8,8, T 55,5 C°, texo 94 min) est un point critique au-dessus duquel une augmentation de la teneur en acides aminés libres a déterminé une forte diminution du pH, tandis que la température jusqu'à leurs limites inférieures (7,2 et 42,6 C°, respectivement). À partir de ce point, la valeur de la fraction F250 pourrait être améliorée en augmentant à la fois la température de réaction et la durée du traitement par flavourzyme. La valeur maximale des acides aminés libres obtenu par les conditions opératoires d'hydrolyse (pH égale à 7,2, T° 48,3 C° et texo 169 min) était de 30,7 %.

I.4.2 Composition des acides aminés libres

Le tableau III.4 montre le profil des acides aminés de la fraction F250 récupérée de l'hydrolysat obtenu dans des conditions optimales pour optimiser les profils moléculaires F250 (pH 7,2, T° 48,3 C° et 172 min de traitement par flavourzyme).

Les résultats des compositions en acides aminés libres se fait en triplicata.

Dans ces conditions, la superficie en pourcentage de la fraction inférieure à 250 Da était de F250 = $31,1 \pm 0,6$ % (écart-type moyen des mesures en trois exemplaires), proche de la valeur estimée par optimisation statistique (30,7 %).

Tableau III.4 : Composition en acides aminés libres (pourcentage molaire) de l'hydrolysat obtenu dans les conditions opératoires pour maximiser F250 à (pH 7.2, 49 ° C et 172 min de traitement par flavourzyme).

Amino acid	Molar percentage
HIS	5.19 ± 0.06
ILE	5.12 ± 0.05
LEU	8.70 ± 0.06
LYS	3.08 ± 0.06
MET	3.78 ± 0.07
PHE	9.34 ± 0.03
TYR	6.10 ± 0.06
PRO	0.69 ± 0.03
THR	4.22 ± 0.23
ARG	18.17 ± 0.32
VAL	7.04 ± 0.11
ASP + ASN	0.03 ± 0.00
GLY	15.86 ± 0.18
ALA	7.40 ± 0.06
SER	3.64 ± 0.08
GLU + GLN	1.65 ± 0.07
TAA ¹	100
THAA ²	60.24
TEAA ³	46.47

Les acides aminés alimentaires jouent un rôle important dans la croissance et le développement physiologique des espèces aquacoles. La quantité d'acides aminés essentiels fournis par le régime alimentaire est particulièrement importante, car ils ne peuvent pas être synthétisés par le métabolisme des poissons. La composition en acides aminés des hydrolysats de protéines de poisson est fortement influencée par la source de protéines utilisée pour l'hydrolyse. Par exemple, les acides aspartiques et glutamiques sont habituellement présents en grandes concentrations dans les hydrolysats des muscles des poissons (Chalamaiah et al., 2012).

Dans notre cas, l'hydrolysat de la tête de thon présente une forte concentration d'arginine et de glycine, comme le montre **tableau III.4**. Cela correspond à la composition en acides aminés rapportée pour les hydrolysats de co-produits du thon produits par l'attaque du flavourzyme, qui présentaient des concentrations élevées en arginine, lysine et l'histidine (Nilsang et al., 2005). Ces acides aminés essentiels sont nécessaires dans la formulation des régimes alimentaires par rapport à d'autres sources de protéines. Dans notre cas, la qualité nutritionnelle de l'hydrolysat protéique de tête de thon, en termes d'acides aminés essentiels est de (46,5% M), est plus élevé que la plupart des hydrolysats trouvés dans la littérature. Seul l'hydrolysat produit à partir de scad rond (Decapterus maruadsi) par traitement enzymatiques en utilisant le flavourzyme (Thiansilakul et al., 2007) avait une teneur légèrement supérieure en acides aminés essentiels était de 48% M.

La teneur en acides aminés hydrophobes est également pertinente puisqu'elle pourrait déterminer une gamme de propriétés fonctionnelles et biologiques de l'hydrolysat.

Par exemple, Cai et al. (2015) ont démontré que certains composés de faible poids moléculaire, tels que les acides aminés libres, peuvent être essentiels à l'absorption normale de petits peptides dans l'intestin de larves de croaker jaune (L. crocea). Plus spécifiquement, Chi et al. (2015). Plus précisément, Chi et al. (2015) ont établi un lien entre la présence d'acides aminés hydrophobes et l'activité antioxydante des hydrolysats musculaires du thon skipjack (K. pelamis). Dans notre cas, le pourcentage molaire d'acides aminés hydrophobes (60,2 % M) se situe dans la limite supérieure de la gamme (30 à 60 %) habituellement déclarée pour les hydrolysats de poisson (Chalamaiah et al., 2012).

I.5 Conclusion

La mise en œuvre de la méthodologie des plans d'expériences associée à l'analyse des surfaces de réponse avec une approche d'optimisation multi-objectif, nous a permis de déterminer les conditions optimales d'hydrolyse (pH, température et temps de traitement par flavourzyme).

Cependant, Les modèles statistiques proposés ont adapté de façon satisfaisante les réponses observées (DH, F2500, F250) aux conditions d'exploitation (R²= 93,3%, 89,8% et 89,6%, respectivement). Le modèle prédictif du degré d'hydrolyse DH% nous a permis de conclure que cette variable était favorisée par l'augmentation du pH et de la température de réaction, atteignant un maximum de 31,7 % à un pH de 8.4, T° 57,4 C° et après 183 min de traitement par un exoprotéase.

Dans ces conditions, l'alcalase présente une activité protéolytique optimale, responsable de la majeure partie de la solubilisation et de l'hydrolyse du substrat.

Quant au traitement par flavourzyme, il a eu un impact majeur sur le profil de poids moléculaire des hydrolysats, notamment sur la teneur en acides aminés libres. Les conditions de réaction optimales pour maximiser la libération d'acides aminés libres (pH 7,2, 43-49 C, durée du traitement avec flavourzyme supérieure à 160 min) sont préjudiciables au contenu en petits peptides à chaîne de F2500.

En addition, une approche d'optimisation bi-objective a ensuite été proposée, capable de trouver un ensemble de solutions intermédiaires (Pareto Front) répondant dans une certaine mesure aux deux objectifs prévus (maximisation des F2500 et F250).

Cette approche permet de prévoir les paramètres de fonctionnement optimaux pour produire un hydrolysat avec un profil de poids moléculaire désiré.

Finalement, le choix d'une solution optimale à l'intérieur du Pareto Front dépend dans une large mesure des besoins alimentaires spécifiques des espèces d'élevage.

Bien que, les teneurs en protéines alimentaires soient déterminées pour la plupart des espèces commerciales, d'autres recherches sur les besoins et la composition en acides aminés sont nécessaires.

Partie II. Fractionnement d'hydrolysats protéiques

Partie 2 : FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS PROTEIQUES

CAMPAGNE EXPÉRIMENTALE DE GRANADA. FRACTIONNEMENT PAR ULTRAFILTRATION SÉQUENTIALE AVEC MEMBRANES CÉRAMIQUES

L'utilisation des procédés de séparation membranaire ont pris une place importante dans de nombreux domaines comme la production d'eau douce à partir d'eau de mer, le traitement de l'eau et des effluents domestiques et industriels, la purification et le fractionnement des solutions dans le domaines des industries biotechnologiques, pharmaceutiques et agroalimentaires. Leur utilisation n'est pourtant pas aussi simple qu'il n'y parait, elle demande une compréhension et une étude approfondie du procédé de séparation à utiliser (définition des objectifs de séparation, caractéristiques des membranes à mettre en œuvre, définition des conditions opératoires, etc...). En effet, Les procédés de séparation membranaires présentent des avantages importants. Ces technologies n'ont pas besoin de produits chimiques et fonctionnent à la température ambiante, ce qui minimise les coûts économiques et préserve la valeur biologique des composés récupérés. De plus, l'utilisation de l'hydrolyse enzymatique couplée à la séparation membranaires est largement mentionnée dans la littérature pour produire et récupérer simultanément des fractions peptidiques d'intérêt pour des applications biotechnologiques (Pezeshk et coll., 2018; Saidi et coll., 2014).

Dans notre étude, nous avons étudié la performance de trois membranes céramiques d'ultrafiltration (UF) à flux croisé de seuil de coupure (MWCO) 8 kDa, 3 kDa et 1 kDa, une membrane en nanocomposite d'oxyde de titane-smectite UF à partir de zéolite avec une taille de pore entre 3-5 nm. Nous avons également étudié la mise au point de deux membranes organiques Dead-end filtration avec un seuil de coupure (MWCO) 2KDa et 300 Da. Ces membranes ont été utilisées pour produire des fractions peptidiques à partir d'hydrolysats de tête de thon. À cette fin, les membranes ont été disposées en différentes configurations séquentielles. Le comportement fluide-dynamique de chaque unité UF et NF ont été étudié en termes de flux de perméat initial, de baisse de flux pendant la concentration du lot, de transmission des peptides et d'efficacité de nettoyage d'un traitement chimique approprié.

Enfin, ce travail évalue l'impact de la configuration de traitement sur le profil de poids du peptide, l'activité antioxydante et inhibitrice (ACE) des fractions résultantes, en discutant de leur potentiel pour les applications alimentaires.

ANALYSE DE PROCEDE :

Cette étape consiste à définir les objectifs de la séparation en s'appuyant sur la connaissance de la solution à traiter d'une part et sur les spécifications à atteindre d'autre part.

L'hydrolysat de tête du thon contient différents types de composés : des matières insolubles résiduelles, des protéines, des peptides, des acides aminés, etc... Le fractionnement et la séparation de ce mélange sur la base de la masse moléculaire des composés présents est envisageable grâce à une succession d'étapes de séparation mettant en œuvre des membranes d'ultrafiltration et de nanofiltration. En effet, on peut imaginer une première étape d'UF en utilisant des membranes dont le seuil de coupure (MWCO) de 8 kDa, 3 kDa, 2 kDa et 1 kDa. Le perméat obtenu après cette étape d'UF peut être concentré par NF en utilisant une membrane organique en polyamide de 0,3 kDa, on obtient alors un rétentat riche en peptides d'intérêt.

ETUDES DES ETAPES DE FILTRATION

Sélection des membranes

Le choix de la bonne membrane n'est pas aussi simple qu'il n'y parait en particulier lorsque l'on doit traiter des solutions biologiques. Ces dernières sont généralement complexes et renferment des espèces chimiques susceptibles d'interagir avec les membranes. De plus, vu la diversité des formes des molécules présentes dans la solution à filtrer et la distribution souvent non homogène des pores des membranes de filtration, la rétention réelle ou effective peut être différente du seuil de coupure nominal annoncé par le fabriquant (Zeman et Zydney, 1996).

Jusqu'à maintenant, la plupart des études sur le fractionnement membranaire des hydrolysats protéiques sont fondées sur des matériaux polymériques comme le polysulfone ou le polyamide (Saxena et coll., 2009). Bien que rarement rapportées dans la littérature, les membranes céramiques présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux matériaux organiques. En effet, ils peuvent supporter des températures élevées (jusqu'à 350°C) ainsi qu'une large gamme de pH (1 à 13). Cette résistance aux conditions ambiantes difficiles rend les membranes céramiques facilement adaptées aux scénarios industriels, où les membranes sont périodiquement soumises à des procédures de nettoyage chimique.

Il convient donc de tester des matériaux de nature différente qui vont favoriser ou non certaines interactions et induire ainsi des changements tant sur la valeur des flux de perméat que sur la rétention des espèces.

Etude des performances de membranes céramiques d'UF :

Etude fluide-dynamique :

Perméabilité à l'eau et étalonnage avec la solution d'alimentation :

La perméabilité à l'eau des trois membranes céramiques testées (8 kDa, 3 kDa et 1 kDa) a été évaluée par régression linéaire des valeurs observées du flux d'eau (Jw) par rapport à la pression transmembranaire appliquée (PTM). Un exemple de cette procédure est montré dans la **Figure III.5**, où les données expérimentales ont été ajustées à une ligne droite passant par l'origine. La résistance intrinsèque de la membrane (R_m) a été calculée comme étant l'inverse de la pente de Jw par rapport à la PTM, selon l'**équation III-1 :**

$$J_W = \frac{TMP}{R_M}$$
 Equation III-1

Tableau III.5 montre les valeurs calculées de la résistance intrinsèque (R_m , bar.m².h/L) pour les trois membranes céramiques testées.

Membrane	Solution	Résistance de la membrane		
MWCO	d'alimentation	Initial, bar·m²·h/L	Colmaté bar·m²·h/L	
8 kDa	THH	$1.31 \cdot 10^{-2}$	$2.50 \cdot 10^{-2}$	
3 kDa	THH	$1.98 \cdot 10^{-2}$	3.10·10 ⁻²	
1 kDa	F8	$2.12 \cdot 10^{-2}$	$3.75 \cdot 10^{-2}$	
	F3	$2.12 \cdot 10^{-2}$	$4.02 \cdot 10^{-2}$	

Tableau III.5 : Résumé des résistances hydrauliques des membranes céramiques utilisées.

En accord avec le modèle de résistances en série, la résistance de la membrane contre le flux d'eau augmente de $1,31.10^{-2}$ à $2,12.10^{-2}$ bar.m².h/L lorsque le MWCO diminue de 8 à 1 kDa. **La figure III-5 (a, b, c, d)** illustre la régression linéaire des valeurs observées du flux d'eau par rapport à la pression transmembranaire pour les membranes de seuil de coupure (MWCO) de 8 kDa, 3KDa, et 1KDa, respectivement.



Figure III-5 : perméabilité d'eau et solution d'alimentation (étalonnage) par rapport à la pression transmembranaire : a) membrane de 8 kDa, b) membrane de 3 kDa, c) membrane de 1 kDa alimentée par F8, d) membrane de 1 kDa alimentée par F3.

De même, un certain nombre d'essais d'étalonnage ont été effectués sur les membranes céramiques, qui ont évalué leur résistance au passage de la solution d'alimentation (c.-à-d. hydrolysat protéique ou perméat obtenu du premier stade UF à travers des membranes de 8 ou 3 kDa) à des valeurs croissantes de pression transmembranaire. Dans ce cas, on a observé que le flux de perméat augmentait linéairement avec la pression transmembranaire appliquée (c.-à-d. la zone de contrôle de la pression) puis se stabilise progressivement jusqu'à atteindre un plateau où il devient indépendant de la pression transmembranaire (c.-à-d. zone de contrôle du transfert de masse). Ce comportement est généralement modélisé par l'**Equation III-2** qui suppose que la résistance totale contre le flux de perméat est la contribution de la résistance fournie par le matériau de la membrane et celle de la couche de polarisation du gel. Cette dernière est supposée être proportionnelle à la pression transmembranaire appliquée avec une constante de proportionnalité β .

$$J = \frac{TMP}{\alpha + \beta \cdot TMP}$$
 Equation III-

2

Les valeurs de α et β ont été obtenues par régression linéaire de TMP/J par rapport à TMP, et énumérées dans le **Tableau III.5**. Par exemple, la figure 2a représente les valeurs observées du flux de perméat initial à travers les 8 kDa, ainsi que des lignes pleines qui adaptent les données à l'**Equation III-5**.

	Flux d'eau	Calibration avec solution d'alimentation			
MWCO	R _M , bar.m ² .h/l	Solution d'alimentation	α, bar.m².h/l	β, m².h/l	
8 kDa	1.31.10-2	THH	$2.26 \cdot 10^{-2}$	$2.21 \cdot 10^{-3}$	
3 kDa	$1.98 \cdot 10^{-2}$	THH	$2.86 \cdot 10^{-2}$	$2.15 \cdot 10^{-3}$	
1 kDa	$2.12 \cdot 10^{-2}$	F8	$2.30 \cdot 10^{-2}$	$1.41 \cdot 10^{-3}$	
		F3	$2.19 \cdot 10^{-2}$	$1.03 \cdot 10^{-3}$	

Le **Tableau III.5** illustre Les valeurs de régression α et β obtenues par les essais d'étalonnage.

Tableau III.5 : Résumé des paramètres des essais d'étalonnage avec l'eau et la solution d'alimentation et l'évolution temporelle du flux de perméat modélisée par le modèle de Suki.

On a observé que les valeurs de α étaient plus grandes que les résistances intrinsèques correspondantes de la membrane R_M. Le principal facteur expliquant ces différences est la concentration de solutés dans les flux d'alimentation (hydrolysat de tête du thon, F8 et F3, principalement des protéines ainsi que des lipides, qui réduisent leur perméabilité à travers les membranes céramiques. En effet, les valeurs les plus élevées de α ont été observées pour les membranes de 8 et 3 kDa nourries au THH, où la concentration de solides était plus élevée (p.ex. la teneur en protéines était d'environ 15 g par 100 ml). Autrement, les résistances fournies par la membrane de 1 kDa contre le passage des flux F8 et F3 préfiltrés n'étaient que légèrement supérieures à la résistance intrinsèque de la membrane (R_M= 2,12.10-2 bar.m².h/l).

Le paramètre β dans l'**Equation III-2**, qui indique l'influence de la pression transmembranaire sur la résistance à la polarisation-concentration, était similaire pour les membranes MWCO 8 et 3 kDa alimentées en hydrolysats de tête de thon, calculer une valeur moyenne de 2,18 •10-3 m2•h/L. Cette valeur a diminué de 40 % en moyenne pour le deuxième étage avec des membranes de 1 kDa. Ces différences sont attribuables à la plus
faible concentration de protéines dans les solutions perméates F8 et F3, qui sont responsables du développement de la couche de polarisation du gel.

Les valeurs de β obtenues dans le cadre de ce travail sont différentes de celles obtenues lors du traitement membranaire d'autres effluents de poissons. Dans un ouvrage précédent, Pérez-Gálvez et al. (2011) ont procédé à la d'épuration des eaux de presse (44,1 g/L de protéines solubles) à partir de sous-produits de sardines par des membranes UF céramiques de 0,14 µm, 200 et 50 nm. Selon les essais d'étalonnage, les valeurs β étaient 8 à 10 fois plus grandes que celles rapportées dans ce travail, indépendamment de la taille des pores de la membrane. Ce fait s'explique par la plus grande quantité de solutés transportés par les eaux de presse, ce qui entraîne la formation rapide d'une couche de gel polarisant la concentration. Comme pour les valeurs de α , nos résultats sont 2 ordres de grandeur plus grands que ceux estimés pour la membrane de 1,4 µm. Ce paramètre est affecté par la taille moyenne des pores de la couche de filtration membranaire.

Évolution du flux de perméat pendant la concentration en batch :

Figure III-6 montre l'évolution du flux de perméat pendant trois heures de concentration en batch pour les trois membranes et les quatre étapes étudiées dans ce travail. Les points marqués représentent les valeurs observées du flux de perméat et les lignes solides ont été obtenues par régression non linéaire des données expérimentales au modèle théorique développé par Suki et al. (1984).



Figure III-6 : Evolution du flux de perméat pendant la concentration en batch. Valeurs observées et flux prédits par l'équation de Suki.

Pour toutes les membranes et les étapes de filtration, on a observé un déclin continu du flux de perméat observé, qui a diminué à plus grande dans les 60 premières minutes de concentration, puis lentement stabilisé vers un état stationnaire avec un flux constant de perméat.

Ce comportement, largement décrit pour les opérations d'ultrafiltration à flux transversal, est lié à la formation d'une couche de colmatage dynamique sur la surface de la membrane dont la croissance est freinée par la force de dragage du flux de rétentat (Hermia, Suki).

A cet égard, le modèle de Suki s'appuie sur le modèle de résistance en série qui dépend du temps est présenté selon l'équation **Equation II-18** suivantes :

$$J_{\infty} = \frac{J_0}{\left(1 + \frac{J_0}{I_{\infty}}\right) \cdot \left(1 - e^{-k \cdot t}\right)}$$
 Equation II-18

Les paramètres de modèle de Suki (explique précédemment dans la partie matériel et méthode) J_0 , J et k ont été obtenus par régression non linéaire et sont énumérés dans le **Tableau III.6**.

Flux d'eau Paramètre de la modèle de Suk		e de Suki		
MWCO	R _M ,bar·m ² ·h/L	J ₀ , L/m ² ·h	J∞, L/m²∙h	k, h ⁻¹
8 kDa	1.31·10 ⁻² THH	57.49	46.28	0.4794
3 kDa	1.98·10 ⁻² THH	49.66	35.16	0.4933
1 kDa	2.12·10 ⁻² F8	35.04	24.75	0.7227
	F3	39.06	28.28	0.5892

Tableau III.6 : Résumé des paramètres de modèle développé par Suki.

Comme le montre la **Figure III-6**, le modèle proposé correspond de manière satisfaisante aux données expérimentales, avec des coefficients de détermination allant de $r^2=0,9723$ (membrane de 1 kDa alimentée F3) à $r^2 = 0,9977$ (membrane de 8 kDa alimentée aux hydrolysats de tête de thon).

Les valeurs de J_0 estimées par régression non linéaire étaient très semblables au flux initial de perméat observé. Comme prévu, cette valeur augmente avec la taille des pores de la membrane (et donc, MWCO), allant de 57,49 L/(m².h) pour la membrane de 8 kDa MWCO à 35,04 L/(m².h) pour la membrane de 1 kDa MWCO alimentée en F8. Dans le cas de la membrane de 1 kDa, l'étape de préfiltration à travers 3 kDa a augmenté de 10 % le flux initial (39,06 L/(m².h)), par rapport à la même membrane alimentée de 8 kDa. Cela est attribuable à la plus faible concentration de grosses protéines et d'autres substances polluantes dans le flux F3, comparativement à F8.

Le flux de perméat a diminué continuellement pendant les 3 heures de concentration, sans atteindre les valeurs prévues du flux stable J_{∞} énumérées dans le **Tableau III.6**. Le déclin relatif maximal du flux entre la valeur initiale et la valeur finale (à 180 min) a été observée

pour les membranes MWCO de 1 kDa (29 % et 27 % lorsqu'elles étaient alimentées en F8 et en F3, respectivement), tandis que le déclin relatif du flux observée pour la membrane de 8 kDa n'était que de 15 %.

En ce qui concerne le paramètre k, qui contrôle l'accumulation de la couche de colmatage, il variait de 0,7227 h^{-1} (membrane de 1 kDa alimentée en F8) à 0,4794 h^{-1} (membrane de 8 kDa). Comme prévu, ces résultats sont en accord avec le déclin relatif du flux observé pendant les expériences de concentration en batch.

Taux de rejet des protéines :

Dans le but d'estimer le taux de rejet des protéines des membranes céramiques étudiées, des échantillons de perméat et rétentat ont été prélevées à 15, 90 et 150 minutes d'opération afin d'effectuer le dosage des protéines. Le taux de rejet (R) des protéines (i.e. les proportions de peptides retrouvés dans le rétentat) de la membrane peut être calculé selon l'**Equation III-3** :

$$\% R = \left(1 - \frac{c_P}{c_C}\right) \cdot 100$$
 Equation III-3

Ou :

C_P : concentration de protéines dans le perméat (g/L)

C_R: concentration de protéines dans le rétentat (g/L)

Le pourcentage de récupération de peptides dans le perméat est exprimé par le taux de transmission (% T), qui est calculé avec l'**Equation III-4** :

$$\% T = \frac{c_P}{c_C} \cdot 100$$
 Equation III-4

Le **Tableau III.6** recense les concentrations de protéines retrouvées dans les fractions de perméat et rétentat, en fonction du temps de concentration et de la membrane utilisée.

Étape d'ultrafiltration	Temps, min	Concentration de protéines dans le perméat, C _P (g/L)	Concentration de protéines dans le rétentat, C _R (g/L)	Transmission des peptides (%)
Concentration TILL our	15	6.25 ± 0.29	9.97 ± 0.24	62.7
8 kDa (\rightarrow 8 kDa)	90	5.73 ± 0.30	10.53 ± 0.13	54.4
	150	5.86 ± 0.46	10.73 ± 0.26	54.6
	15	5.74 ± 0.49	10.36 ± 0.38	55.4
Concentration de THH sur 3 kDa (\rightarrow 3 kDa)	90	5.86 ± 0.08	10.15 ± 0.43	57.7
	150	5.90 ± 0.37	10.29 ± 0.29	56.9
Concentration de F8	15	5.35 ± 0.18	6.44 ± 0.47	83.1
sur 1 kDa $(8 \rightarrow 1)$	90	5.07 ± 0.18	6.22 ± 0.24	81.5
kDa)	150	4.92 ± 0.29	6.36 ± 0.49	77.4
Concentration do E2	15	5.40 ± 0.48	5.49 ± 0.39	98.4
sur 1 kDa $(3 \rightarrow 1 kDa)$	90	5.40 ± 0.17	5.50 ± 0.34	98.2
	150	5.17 ± 0.14	5.50 ± 0.56	94.0

Tableau III.6 : Variation de la concentration de protéines dans les fractions de perméat et rétentat en fonction du temps de concentration batch et la membrane d'UF.

On constate que la transmission des protéines est fortement dépendante du seuil de coupure des membranes, de sorte que les membranes de 8 et 3 kDa présentent une transmission moyenne du 55% alors que cette valeur augmente au-dessus 95% pour l'étape de filtration du perméat F3 sur la membrane de 1 kDa. La forte augmentation de transmission observée dans les membranes de 1 kDa s'explique par la charge faible en protéines présente dans les perméats issus des premières étapes.

Concernant l'évolution du taux de rejet /transmission des protéines dans le temps, la **Figure III-7** montre que la réjection des peptides par la membrane augmente en général au cours de la concentration. Le taux de rejet est lié au seuil de coupure de chaque membrane, ainsi que à la distribution de poids moléculaire de l'alimentation. En général, l'augmentation du taux de rejet observée au cours de la concentration est liée à l'adsorption et déposition des

protéines présentes dans l'alimentation sur la surface et les pores de la membrane. Cette interaction entre les protéines et la couche active de la membrane s'explique par les charges négatives résiduelles présentes dans les matériaux alcalins. Ce phénomène a été reporté dans la filtration des hydrolysats (Mancinelli and Hallé, 2015) et des jus de pressage de poisson (Pérez-Gálvez et al., 2013, 2011).



Figure III-7 : Évolution du taux de rejet des protéines en fonction du temps de concentration batch et la membrane d'UF.

La répartition des protéines dans les fractions de perméat et rétentat peut être exprimée sous la forme d'un bilan de matière selon l'**Equation III-5** suivantes :

$$V_0 \cdot c_0 = V_P \cdot c_P + V_R \cdot c_R + Pertes$$
 Equation III-5

Avec

V₀ : volume initial dans la cuve d'alimentation (L)

C₀ : concentration initial en protéines (g/L)

- V_P : volume total de perméat accumulé (L)
- C_P : concentration en protéines dans le perméat (g/L)
- V_R : volume total de rétentat accumulé (L)
- C_R : concentration en protéines dans le rétentat (g/L)

Pertes : masse de protéines (g) absorbée par la membrane ou retenue dans le système de filtration

Ce bilan nous a permis d'estimer le pourcentage de pertes de protéines dans notre système, ce qui est indicatif de du colmatage de la membrane par ces composants. Il faut souligner que des autres composés non protéiques présents dans les hydrolysats, tels que les lipides, contribuent en grande quantité au colmatage observé dans les membranes de 8 kDa et 3 kDa. La déposition des lipides n'est pas significative dans les étapes ultérieures.

Selon le **Tableau III.7** ci-dessous, les pertes de protéines dans les étapes d'UF à 8 et 3 kDa sont environ 29%. Ces pertes sont probablement liées à la rétention simultanée des protéines et des lipides dans les membranes. Les pertes de protéines quantifiées pour les étapes de filtration à 1 kDa sont en dessous du 10%.

Étape d'ultrafiltration	FRV	% Pertes
Concentration THH sur 8 kDa $(\rightarrow 8 \text{ kDa})$	1.54	29.7
Concentration de THH sur 3 kDa (\rightarrow 3 kDa)	1.37	28.9
Concentration de F8 sur 1 kDa ($8 \rightarrow 1$ kDa)	1.38	9.6
Concentration de F3 sur 1 kDa (3 \rightarrow 1 kDa)	1.43	8.0

Tableau III.7 : Bilan de matière : facteur de réduction volumique et pourcentage de pertes des protéines.

Nettoyabilité des membranes céramiques :

Après l'ultrafiltration, les trois membranes étudiées ont suivi un protocole de nettoyage alcalin (NaOH 20 g/L, à 50°C pendant 30 minutes) suivi d'un rinçage jusqu'à neutralité des eaux de lavage. Après rinçage, la perméabilité des membranes a été déterminée et comparée avec celle qui présentait la membrane avant l'ultrafiltration. Le dégrée de colmatage des membranes après l'opération a été déterminée par les résistances hydrauliques (i.e. pente du flux d'eau en fonction de la pression transmembranaire). Les **Figures III-7** (a, b, c, d)

illustrent la récupération de la perméabilité des membranes colmatées avec le traitement alcalin, où le trait discontinu représente la résistance intrinsèque de la membrane.



Le **Tableau III-8** présente un bilan des résistances hydrauliques des membranes colmatées, ainsi que l'efficacité de nettoyage atteint par l'étape ou étapes alcalines. Cette dernière est calculée par l'**Equation III-6** :

$$\% E = \frac{R_1 - R_{NaOH}}{R_1 - R_0} \cdot 100$$
 Equation III-6

Avec :

% E : pourcentage d'efficacité.

 R_0 : résistance hydraulique intrinsèque de la membrane (bar·m²·h/L).

 R_1 : résistance hydraulique de la membrane colmatée après UF (bar·m²·h/L).

 R_{NaOH} : résistance hydraulique de la membrane après le traitement alcaline (bar·m²·h/L).

	Résistance h	nydraulique	Efficacité de nettoyage	
Étape d'ultrafiltration	Intrinsèque bar∙m²∙h/L	Colmatée bar·m ² ·h/L	E ₁ , %	E ₂ , %
Concentration THH sur 8 kDa	$1.31 \cdot 10^{-2}$	2.50.10-2	66.87	23.13
Concentration de THH sur 3 kDa	$1.98 \cdot 10^{-2}$	3.10.10-2	99.79	-
Concentration de F8 sur 1 kDa	$2.12 \cdot 10^{-2}$	3.75.10-2	99.90	-
Concentration de F3 sur 1 kDa	$2.12 \cdot 10^{-2}$	$4.02 \cdot 10^{-2}$	99.24	-

Tableau III-8 : Bilan de résistances hydrauliques des membranes après le protocole de nettoyage.

Selon le tableau ci-dessus, deux conclusions principales peuvent être formulées sur la nettoyabilité des membranes :

- Les membranes les plus colmatées après la filtration ont été les membranes de 8 kDa et 1 kDa, avec une chute de la perméabilité initiale des membranes de 90%. Par contre, la membrane de 3 kDa est moins susceptible au colmatage.
- 2. Le traitement alcalin étudié a permis de régénérer totalement la perméabilité des membranes, avec taux d'efficacité supérieures à 99%. La capacité de nettoyage des agents alcalins s'explique par l'hydrolyse des dépôts de protéines adsorbées à la surface de la membrane ou à l'intérieur des pores. Ces composants sont hydrolysés donnant lieu à des peptides à petite taille qui sont rincés facilement (Beyer et al., 2017; Li et al., 2019)

3. Le traitement alcalin n'a pas été suffisant pour régénérer totalement la perméabilité de la membrane de 8 kDa. En effet, la première étape n'a obtenu qu'un 66.9% d'efficacité, de sorte qu'une deuxième étape de nettoyage a été nécessaire pour rétablir la perméabilité de cette membrane. Ce fait peut être attribué à la grande taille des pores, ce qui favorise la déposition de composants à l'intérieur (i.e. « fouling » interne). Ce mécanisme de colmatage a été reporté, par exemple, dans la récupération des protéines de lactosérum par microfiltration, où le rapport entre le seuil de coupure et taille des composants filtrés est élevé (Mourouzidis-Mourouzis and Karabelas, 2008).

CAMPAGNE EXPÉRIMENTALE À SFAX. FRACTIONNEMENT MEMBRANAIRE COUPLÉE D'ULTRAFILTRATION ET NANOFILTRATION

ETUDE FLUIDE-DYNAMIQUE :

Perméabilité à l'eau et calibration avec la solution d'alimentation :

La perméabilité à l'eau des trois membranes testées (2 kDa organique, 2 kDa nanocomosite et 0.3 kDa organique) a été évaluée par régression linéaire des valeurs observées du flux d'eau (Jw) par rapport à la pression transmembranaire appliquée (PTM). Un exemple de cette procédure est montré dans la **Figure III.9**, où les données expérimentales ont été ajustées à une ligne droite passant par l'origine. La résistance intrinsèque de la membrane (R_M) a été calculée comme étant l'inverse de la pente de Jw par rapport à la PTM, selon l'**équation III-4.**

Le **Tableau III.11** montre les valeurs calculées de la résistance intrinsèque (R_M , bar.m².h/L) pour les trois membranes céramiques testées.

Membrane	Solution	Résistance membranaire		
MWCO	d'alimentation	Initiale, bar·m2·h/L	Colmatée bar·m2·h/L	
2 kDa-UF1	THH	5.46.10-2	$0.18 \cdot 10^{-2}$	
2 kDa-DF1	C _{UF1} +eau	$5.46 \cdot 10^{-2}$	$0.38 \cdot 10^{-2}$	
0.3 kDa-NF ₁	P_{UF1} + P_{DF1}	3.56·10 ⁻²	$4.43 \cdot 10^{-2}$	
2 kDa-UF ₂	THH	$1.74 \cdot 10^{-2}$	$2.73 \cdot 10^{-2}$	
2 kDa-DF ₂	C _{UF2} +eau	$1.74 \cdot 10^{-2}$	$2.41 \cdot 10^{-2}$	
0.3 kDa-NF ₂	$P_{UF2} + P_{DF2}$	$3.98 \cdot 10^{-2}$	6.6·10 ⁻²	

Tableau III.11 : Résumé des résistances hydrauliques des membranes utilisées.

En accord avec le modèle de résistances en série, la résistance de la membrane contre le flux d'eau augmente de $1,74.10^{-2}$ à $3,98.10^{-2}$ bar.m².h/L lorsque le MWCO diminue de 2 à 0.3 kDa avec une membrane en nanocomposite UF et une membrane en polyamide NF, respectivement.

Contrairement, le flux d'eau a diminué de 5,46.10⁻² à 3,56.10⁻² bar.m².h/L lorsque le MWCO diminue de 2 à 0.3 kDa avec une membrane en polyéthylène imine UF et une membrane en polyamide NF, respectivement. Ceci est expliqué par le caractère hydrophobe de la membrane organique UF de MWCO de 2 kDa qui rend la membrane assez sensible au colmatage.

La figure III-9 (a, b, c, d, e, f) illustre la régression linéaire des valeurs observées du flux d'eau par rapport à la pression transmembranaire pour les membranes de seuil de coupure (MWCO) de 2 kDa-UF1 organique, 2 kDa-DF1 organique, 2 kDa-UF2 nanocomposite, 2 kDa-DF2 nanocomposite, 0.3 kDa (UF1+DF1) et 0.3 kDa (UF2+DF2).





Figure III-9 : perméabilité d'eau et solution d'alimentation (étalonnage) par rapport à la pression transmembranaire : a) membrane de 2 kDa-UF₁ organique, b) membrane de 2 kDa-DF₁ organique, c) membrane de 2 kDa-UF₂ nanocomposite, d) membrane de 2kDa-DF₂-nanocomposite, e) membrane de 0.3 kDa-NF organique alimentée par $(P_{UF1}+P_{DF1})$, f) membrane de 0.3 kDa-NF organique alimentée par $(P_{UF2}+P_{DF2})$

De même, nombreux essais de calibration ont été effectués sur les membranes en nancomposite et organiques utilisées, qui ont évalué leur résistance au passage de la solution d'alimentation à des valeurs croissantes de pression transmembranaire. Dans ce cas, on a observé que le flux de perméat augmentait linéairement avec la pression transmembranaire appliquée puis se stabilise progressivement jusqu'à atteindre un plateau où il devient indépendant de la pression transmembranaire. Ce comportement est généralement modélisé par l'**Equation III-5** qui suppose que la résistance totale contre le flux de perméat est la contribution de la résistance fournie par le matériau de la membrane et celle de la couche de polarisation du gel. Cette dernière est supposée être proportionnelle à la pression transmembranaire appliquée avec une constante de proportionnalité β .

$$J = \frac{TMP}{\alpha + \beta \cdot TMP}$$
 Equation III-5

Les valeurs de α et β ont été obtenues par régression linéaire de TMP/J par rapport à TMP, et énumérées dans le tableau 1. À titre d'exemple, la **figure III5-a** représente les valeurs observées du flux de perméat initial à travers la membrane de seuil de coupure de 2 kDa organique (points repères), ainsi que la ligne pleine qui adapte les données à l'**Equation III-5**.

Membrane Flux d'eau		Calibration avec solution d'alimentation			
MWCO	R _M , bar.m².h/l	Solution d'alimentation	α, bar.m².h/l	β, m².h/l	
2 kDa-UF ₁	5.46.10-2	THH	$7 \cdot 10^{-2}$	$1.44 \cdot 10^{-2}$	
2 kDa-DF1	5.46.10-2	C _{UF1} + eau	$6.98 \cdot 10^{-2}$	$2.69 \cdot 10^{-2}$	
0.3 kDa-NF1	$3.56 \cdot 10^{-2}$	$P_{UF1} + P_{DF1}$	$2.11 \cdot 10^{-2}$	$2.17 \cdot 10^{-3}$	
2 kDa-UF ₂	$1.74 \cdot 10^{-2}$	THH	$1.21 \cdot 10^{-2}$	$3.22 \cdot 10^{-3}$	
2 kDa-DF ₂	$1.74 \cdot 10^{-2}$	C _{UF2} + eau	$1.34 \cdot 10^{-2}$	$2.55 \cdot 10^{-3}$	
0.3 kDa-NF ₂	$3.98 \cdot 10^{-2}$	$P_{UF2}+P_{DF2}$	$2.27 \cdot 10^{-2}$	$2.84 \cdot 10^{-3}$	

Le **Tableau III.12** illustre Les valeurs de régression α et β obtenues par les essais d'étalonnage.

 Tableau III.12 : Résumé des paramètres des essais d'étalonnage avec l'eau et la solution

 d'alimentation. Evolution temporelle du flux de perméat modélisée par le modèle de

 Suki.

A partir des résultats mentionnés dans le **tableau III-12**, on a observé que les valeurs de α qui correspond à la résistance hydraulique fournie par la solution d'alimentation pour la membrane de 2kDa organique suivi d'une étape de diafiltration (C_{UF1} +eau distillé) étaient plus grandes que la résistance intrinsèque correspondante de la membrane R_M. Cela peut être expliqué que la concentration de solutés dans les flux d'alimentation est principalement des protéines ainsi que des lipides, qui réduisent leur perméabilité à travers les membranes organiques. Autrement, les résistances fournies par les autres membranes de 2 kDa en nanocomposite suivie d'une étape de diafiltration et de 0.3 kDa (alimenté d'une part par P_{UF1}+P_{UF2} et d'autre part de P_{UF2}+P_{UF2}) sont plus faibles que la résistance intrinsèque.

En ce qui concerne le paramètre β , qui représente la résistance de la couche de gel de polarisation, on constate les valeurs de β obtenus lors de traitement sur membrane organique de 2kDa sont 5 fois plus grandes que celles obtenues lors de traitement sur membranes de 2kDa et 0.3kDa en nanocomposite et organique, respectivement. Indépendamment de la taille

des pores de la membrane. Ce fait s'explique par le caractère hydrophobe de la membrane qui rend la membrane assez sensible au colmatage, et ce qui entraîne la formation rapide d'une couche de gel de polarisation.

Les valeurs de β obtenues lors de traitement membranaire avec la membrane organique de MWCO de 0.3 kDa, d'une part, et avec la membrane en nanocomposite de 2kDa, d'autre part sont presque de même grandeurs de celles obtenues lors du traitement membranaire avec les membranes en céramiques de 8 kDa, 3kDa et 1kDa.

Evolution de flux de perméat et rejet de la protéine pendant la concentration en batch du procédés couplées UF et NF :

La **Figure III-10** (**a**, **b**) montre l'évolution du flux de perméat pendant deux heures de concentration en batch UF suivi d'une étape de diafiltration avec deux membranes de 2 kDa organique et en nanocomposite d'une part, une heure de concentration en batch NF en utilisant une membrane organique de 0.3 kDa et les six étapes étudiées dans ce travail. Les points marqués représentent les valeurs observées du flux de perméat et les lignes solides ont été obtenues par régression non linéaire des données expérimentales au modèle théorique développé par Suki et al. (1984).



122



Figure III-10 : Evolution du flux de perméat pendant la concentration en batch (UF, NF). Valeurs observées et flux prédits par l'équation de Suki.

Pour toutes les membranes et les étapes de filtration, on a observé un déclin continu du flux de perméat, puis lentement stabilisé vers un état stationnaire avec un flux de perméat constant. Ce comportement est largement décrit pour les opérations de filtration à flux transversal (comme représenté précédemment dans la partie de fractionnement avec des membranes céramiques de 8 kDa, 3kDa et 1 kDa), est lié à la formation d'une couche de colmatage dynamique sur la surface de la membrane dont la croissance est freinée par la force de dragage du flux de rétentat (Hermia, Suki).

Comme le montre la **Figure III-10**, le modèle proposé correspond de manière satisfaisante aux données expérimentales, avec des coefficients de détermination allant de r²=0,9798 (membrane de 2 kDa organique alimentée par hydrolysats de tête de thon) à r² = 0,9987 (membrane de 0.3 kDa alimentée par P_{UF2}+P_{UF1}).

Membrane	Flux d'eau		Para	amètres de la mode	el de Suki
MWCO	R _M , bar.m².h/l		J ₀ , L/(m ² /h)	J_{∞} , L/(m ² /h)	k, h ⁻¹
2 kDa-UF1	5.46.10-2	THH	22.08	14.39	0.7739
2 kDa-DF ₂ 0.3 kDa-NF ₁	5.46·10 ⁻² 3.56·10 ⁻²	C _{UF1} +eau P _{UF1} +P _{DF1}	14.51 230.77	11.08 189.29	4.2692 2.7
2 kDa-UF ₂	$1.74 \cdot 10^{-2}$	THH	76.69	65.21	1.4176
2 kDa-DF ₂ 0.3 kDa-NF ₂	1.74·10 ⁻² 3.98·10 ⁻²	C _{UF2} +eau P _{UF2} +P _{DF2}	82.91 191.69	64.40 168.19	0.4647 3.0013

Tableau III-13 : Résumé des paramètres de modèle développé par Suki

Les valeurs de J₀ estimées par régression non linéaire étaient très semblables au flux initial de perméat observé. Dans le cas de la membrane NF de 0.3 kDa organique, l'étape de préfiltration à travers $P_{UF1}+P_{DF1}$ a augmenté de 16 % le flux initial (230.77 L/(m².h)), par rapport à la même membrane alimentée de $P_{UF2}+P_{DF2}$. Cela est attribuable à la plus faible concentration protéines et d'autres substances polluantes dans le flux $P_{UF1}+P_{DF1}$, comparativement à $P_{UF2}+P_{DF2}$.

Le flux de perméat a diminué continuellement pendant les étapes de concentration et de diafiltration, sans atteindre les valeurs prévues du flux stable J_{∞} énumérées dans le **Tableau III.13**. Le déclin relatif maximal du flux entre la valeur initiale et la valeur finale a été observé pour la membrane organique MWCO de 2 kDa (34 % et 23 % lorsqu'elles étaient opérer a une étape de diafiltration), tandis que le déclin relatif du flux observé pour la membrane en nanocomposite de 2 kDa et celle de la membrane organique de 0.3 kDa n'était que de 15 %.

En ce qui concerne le paramètre k, qui contrôle l'accumulation de la couche de colmatage, il variait de 0,4647 h^{-1} (diafiltration avec la membrane de 2 kDa en nanocomposite) à 4,2692 h^{-1} (diafiltration avec la membrane de 2 kDa en nanocomposite).

Comme prévu, ces résultats sont en accord avec le déclin relatif du flux observé pendant les expériences de concentration en batch.

Le **Tableau III.14** montre les concentrations de protéines retrouvées dans les courants de perméat et concentrat issus des étapes de filtration et diafiltration.

Procédé	Étape d'ultrafiltration	Temps, min	Concentration de protéines (perméat) c _P (g/L)	Concentration de protéines (rétentat) c _R (g/L)	Trans- mission (%)
1	Concentration de THH sur 2 kDa	120	4.60 ± 1.02	16.58 ± 0.55	29.5
UF/DF frontale sur membrane 2 kDa	Diafiltration du rétentat R1 sur 2 kDa	120	3.21 ± 0.40	15.90 ± 0.72	20.1
organique	Concentration des perméats F1 + DF1 sur 0.3 kDa	60	1.05 ± 0.32	10.40 ± 0.44	10.1
2	Concentration de THH sur 2 kDa	120	7.90 ± 0.25	17.20 ± 0.26	45.9
UF/DF tangent. sur membrane	Diafiltration du rétentat R2 sur 2 kDa	120	6.80 ± 0.61	13.85 ± 0.33	49.3
nanocomposite	Concentration des perméats F2 + DF2 sur 0.3 kDa	60	1.81 ± 0.95	8.92 ± 0.15	20.3

Tableau III-14: Variation de la concentration de protéines dans les fractions de perméat et rétentat pour chaque étape de filtration.

Nous pouvons conclure que la transmission des protéines vers le perméat est influencée par le mode d'opération (i.e. filtration frontale ou tangentielle), ainsi que pour le matériel de la couche active (i.e. organique, nanocomposite ou poliamide). Les valeurs les plus hauts de transmission sont retrouvés dans les étapes d'ultrafiltration et diafiltration tangentielle avec la membrane de 2 kDa nanocomposite (46 et 49% de transmission de protéines, respectivement). La teneur en protéines des fractions de perméat et retentat issus des opérations de filtration tangentielle sur la membrane de nanocomposite a été déterminée à 30, 90 et 120 min d'opération. À la différence, les étapes de filtration frontale avec membrane organique dont lieu à des taux de transmission au-dessous 30%. Cette diminution est liée à la nature hydrophobique de la membrane, ce qui réduit le passage des peptides vers le perméat.

Concernant les étapes de nanofiltration, on constate des taux de rétention des peptides élévées (80 - 90% de retention), ce qui s'explique par le seuil de coupure des membranes de poliamide (300 Da).

La **Figure III-11** montre les taux de rejet de chaque étape de filtration membranaire. Il y a des différences significatives entre les opérations avec la membrane organique

hydrophobique et la membrane nanocomposite. En général, le procédé 2 (filtration tangentielle avec membrane nanocomposite suivi de nanofiltration sur 300 Da) donne lieu à des transmissions des peptides plus hautes, surtout dans les étapes initiales d'ultrafiltration et diafiltration tangentielles sur 2 kDa. Ces valeurs sont similaires à ceux déterminés pour les membranes céramiques de 8 et 3 kDa. On a observé aussi une augmentation du taux de rejet dans le temps d'opération, au fur et à mesure que des composants sont déposés sur la surface et à l'intérieur des pores du matériel filtrante.

Figure III-11. Taux de rejet des protéines en fonction du temps de concentration batch pour les étapes de ultrafiltration, diafiltration et nanofiltration.



Le bilan de matière des protéines, montré dans le tableau ci-dessous, nous a permis d'estimer le pourcentage de pertes de protéines dans notre système, ce qui est indicatif de du colmatage de la membrane par ces composants. Selon le tableau, les pertes de protéines sont bases dans les étapes avec la membrane organique. Ceci s'explique par la faible interaction entre les peptides et le matériel de la membrane, qui est hydrophobe. La diminution du flux de perméat observé dans cette membrane seront donc liées à l'absorption de composés non polaires, notamment des lipides, présents dans l'hydrolysat. En général, les pertes observées pour les étapes de filtration à Sfax sont inférieures à celles estimées pour les membranes céramiques à Granada. Les membranes employées à Granada ont une surface filtrante supérieure, ainsi que volume mort (tuyaux) du pilote d'ultrafiltration.

Procédé	Étape d'ultrafiltration	FRV/DV	% Pertes
1	Concentration de THH sur 2 kDa	1.64	3.3
UF/DF frontale sur membrane 2 kDa	Diafiltration du rétentat R1 sur 2 kDa	0.55 DV	2.5
organique	Concentration des perméats F1 + DF1 sur 0.3 kDa	2.05	8.4
2	Concentration de THH sur 2 kDa	1.60	21.4
membrane 2 kDa	Diafiltration du rétentat R2 sur 2 kDa	0.72 DV	10.2
nanocomposite	Concentration des perméats F2 + DF2 sur 0.3 kDa	1.60	7.8

Tableau III-15. Bilan de matière : facteur de réduction volumique, nombre de diavolumes et pourcentage de pertes des protéines.

Nettoyabilité des membranes organiques et en nanocomposite :

Une fois que les essais d'ultrafiltration ont été terminés, la membrane colmatée a été nettoyée à la suite du protocole en deux étapes décrit précédemment. Après chaque phase de nettoyage chimique, la membrane a été rincée avec de l'eau déminéralisée jusqu'à ce que la neutralité du flux de perméat, ensuite son flux d'eau est mesuré. La restauration de la perméabilité de la membrane tout au long du traitement de nettoyage est présentée dans le **Tableau III-14**.

La pente des lignes de régression (c.-à-d. la perméabilité de l'eau) augmente après chaque étape de nettoyage jusqu'à ce que la perméabilité de la membrane non colmatée (représentée par la ligne pointillée) soit atteinte.

En ce qui concerne l'indice d'efficacité de nettoyage, qui tient compte de la contribution d'un stade de nettoyage à la récupération totale du flux d'eau d'une membrane colmatée, il a été défini comme une fonction des résistances hydrauliques au moyen de **l'Equation III-7** suivantes :

$$\% E = \frac{R_{i-1} - R_i}{R_1 - R_M} \cdot 100$$
 Equation III-7

Avec :

 R_{i-1} : résistance hydraulique de la membrane avant l'ième étape de nettoyage (bar·m²·h/L).

 R_i : résistance hydraulique de la membrane après l'ième étape de nettoyage (bar·m²·h/L).

 R_M : résistance hydraulique intrinsèque de la membrane (bar·m²·h/L).

R0 : résistance hydraulique initiale de la membrane colmatée (bar \cdot m²·h/L).

%E : Pourcentage d'efficacité

Les indices globaux d'efficacité de nettoyage, calculés comme la somme des indices de nettoyage pour chaque étape de nettoyage, étaient proches de 100% pour les trois membranes.

Comme le montre le **Tableau III-16**, l'efficacité du nettoyage a été évaluée en fonction de l'évolution des résistances totales et des résistances aux colmatages, ce qui a permis d'évaluer un indice d'efficacité du nettoyage pour chaque étape.

Membrane Solution		Résistance membranaire		Efficacité de nettoyage			
MWCO	d'alimentation	Initiale bar·m2·h/L	Colmatée bar·m2·h/L	E _{NaoH} , %	E _{HNO3,} %	E _{Naocl} , %	E _T , %
2 kDa-UF ₁	THH	5.46.10-2	$0.18 \cdot 10^{-2}$	90.78	4.02	-	94.8
2 kDa-DF ₁	C _{UF1} +eau	5.46.10-2	$0.38 \cdot 10^{-2}$	96.48	1.54	-	98.01
0.3 kDa-NF ₁	$P_{UF1} \!\!+\! P_{DF1}$	3.56.10-2	$4.43 \cdot 10^{-2}$	79.41	-5.25	25.19	74.16
2 kDa-UF ₂	THH	$1.74 \cdot 10^{-2}$	$2.73 \cdot 10^{-2}$	51.37	40.11	-	91.48
2 kDa-DF ₂	C _{UF2} +eau	$1.74 \cdot 10^{-2}$	$2.41 \cdot 10^{-2}$	27.36	59.92	12.17	87.28
0.3 kDa-NF ₂	$P_{UF2} \!\!+\! P_{DF2}$	$3.98 \cdot 10^{-2}$	$6.6 \cdot 10^{-2}$	96.49	-0.9	-	95.59

 Tableau III-16 : Bilan de résistances hydrauliques des membranes après le protocole de nettoyage.

Selon le tableau ci-dessus, on peut conclure :

- Les deux stages de traitement acido/basique pour nettoyer les membranes utilisées réalisent une récupération complète de la résistance initiale de la membrane : la résistance hydraulique de la membrane après le traitement de nettoyage est légèrement faible que celle évalué avant l'ultrafiltration, avec une efficacité de nettoyage plus proche de 100%.
- la phase alcaline permet de restaurer dans une large mesure la perméabilité de la membrane colmatée. une première phase de nettoyage avec NaoH s'est avérée très efficace puisqu'elle est capable d'hydrolyser, de solubiliser et d'éliminer les dépôts protéiques (Bartlett et al., 1995).
- le stade acide a eu un effet néfaste sur la perméabilité de la membrane de MWCO de 0.3 kDa organique, puisque la résistance hydraulique mesurée après ce traitement était supérieure de 5 % à celle obtenue après le stade alcalin. Pour la membrane de 2 kDa organique, son effet de la récupération du flux d'eau était très faible avec une efficacité de nettoyage de 4%. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés précédemment par certains auteurs (Blanpain-Avent et al., 2004 et R. Pérez-Gálvez et al., 2011). Selon R. Pérez-Gálvez et al., (2011), cette mauvaise efficacité de nettoyage était probablement attribuable aux interactions physico-chimiques entre l'acide nitrique et les dépôts responsables au colmatage qui subsistent à la surface de la membrane après le nettoyage alcalin.
- En outre, Le traitement acido/basique n'a pas été suffisant pour régénérer totalement la perméabilité de deux membrane de 2 kDa en nanocomposite et 0.3 kDa organique. En effet, ce traitement n'a obtenu qu'un 87.28% et 74.16 % d'efficacité, respectivement, de sorte qu'une étape de désinfection avec l'hypochlorite de sodium a été nécessaire pour rétablir la perméabilité de ces deux membranes. Outre son action désinfectante, en raison de la libération de chlore libre (Cl₂), le NaoCl peut enlever la matière organique déposée sur la surface de la membrane et dans les pores (Cheryan, 1998). Cela est dû à l'oxydation des composés organiques en d'autres groupes, tels que les aldéhydes, les cétones ou les acides carboxyliques, qui présentent une hydrophilicité plus élevée et donc une adhérence plus faible au matériau de la membrane.

Partie III. Distribution des poids moléculaires et activités antioxydantes des fractions peptidiques

Partie 3 : Distribution des poids moléculaires et activités antioxydantes des fractions peptidiques

1. RÉPARTITION DES POIDS MOLÉCULARIES DES FRACTIONS PEPTIDIQUES

Cette partie porte sur la caractérisation des fractions peptidiques issues des procédés de séparation membranaire étudiés. Dans ce but, les fractions produites ont été lyophilisées et ensuite analysées pour détermination de la distribution des poids moléculaires et des activités antioxydantes.

Nous commençons par les fractions obtenues dans la campagne expérimentale à Granada, qui se caractérisent en ce qu'elles ont été obtenues par ultrafiltration avec des membranes céramiques de 8, 3 et 1 kDa. La **Figure III-12** montre les six fractions, R8, R3, F8R1, F8F1, F3R1 et F3F1, qui ont été retenues pour notre étude.

Figure III-12 Schéma des fractions peptidiques retenues pour analyse dans la campagne expérimentale à Granada



Pour la détermination du profil des poids moléculaires, les échantillons ont été lyophilisées et conservées à -16°C pour l'analyse. Des échantillons à concentration 10 mg/mL ont été injectées dans la colonne d'exclusion stérique. Le **Tableau III-17** donne le pourcentage relatif de chaque taille de peptides, exprimé par pourcentage d'aire sous la curve. Les populations de peptides ont été

classées dans cinq familles, compris entre plus de 6 kDa et mois de 0.5 kDa. Ces profils de répartition des peptides sont aussi montrés dans la **Figure III-13**.

	Distribution des poids moléculaires (kDa)					
Fraction peptidique	A > 6 kDa	B 6 – 3 kDa	C 3 – 1 kDa	D 1 – 0.5 kDa	E < 0.5 kDa	
R8	41.63	16.13	21.22	9.84	11.18	
R3	38.09	15.29	21.87	10.87	13.87	
F8R1	25.62	14.86	17.82	32.34	9.35	
F3R1	25.65	14.99	20.00	28.71	10.65	
F8F1	15.47	10.77	18.29	24.66	30.82	
F3F1	17.07	10.41	15.44	30.64	26.44	

 Tableau III-17. Distribution des poids moléculaires (aire sous la courbe) des fractions peptidiques

 obtenues par ultrafiltration sur membranes céramiques.

Figure III-13. Profil de répartition des poids moléculaires des fractions peptidiques étudiées dans la campagne expérimentale à Granada



Les fragments à grande taille, ayant un poids moléculaire supérieur à 6 kDa, sont majoritaires dans les rétentats issus des membranes à 8 et 3 kDa (41.6 et 38.1 %, respectivement). Ces populations comprennent des protéines non hydrolysées et surtout des fragments à grande taille libérés par l'action protéolytique de l'Alcalase.

La famille des peptides C (1 - 3 kDa) sont présents dans les rétentats R8 et R3 avec un pourcentage relatif entre 21 - 22%. Il faut souligner que ces fractions contiennent aussi des pourcentages

significatifs de peptides inférieurs à 1 kDa (familles D + E, 21% et 24.6% pour R8 et R3, respectivement). Cette population comprend des molécules constituées de 1 à 6 résidus.

Les peptides de faible poids moléculaire (groupes D + E) sont majoritaires (40 – 56%) dans les rétentats comme des perméats issus de la membrane à 1 kDa. La fraction E, qui comprend des acides aminés libérés principalement par le cocktail enzymatique Flavourzyme, représente le 26% et 31% des peptides des perméats F8F1 et F3F1, respectivement. Le procédé où l'hydrolysat est alimenté dans une membrane à 8 kDa suivi d'une séparation à 1 kDa donne lieu à des teneurs les plus hautes en acides aminés libres.

Concernant la campagne expérimentale à Sfax, six fractions ont été caractérisées quant à la distribution des poids moléculaires et ses activités antioxydantes *in vitro*. Le schéma ci-dessous montre les fractions retenues pour notre étude. Il faut noter que tant les perméats issus des étapes de diafiltration comme ceux obtenus dans les étapes de nanofiltration n'ont pas pu être analyses car ils présentaient des concentrations en protéines très faibles donc non détectables par notre colonne d'exclusion stérique.

Figure III-14. Schéma des fractions peptidiques retenues pour analyse dans la campagne expérimentale à Sfax



Le **Tableau III-18** montre la répartition des poids moléculaires des peptides présents dans les fractions obtenues à Sfax. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les populations de peptides ont été classées dans cinq familles A - E, ayant un poids entre plus de 6 kDa et mois de 0.5 kDa. Ces profils de sont représentés dans la Figure XXX.

4.	Distribution des poids moléculaires (kDa)					
Etape de filtration	A > 6 kDa	B 6 – 3 kDa	C 3 – 1 kDa	D 1 – 0.5 kDa	E < 0.5 kDa	
R1	54.69	11.32	14.46	8.97	10.55	
F1	19.66	11.02	28.89	9.24	31.20	
F1R0.3	17.59	12.52	25.13	14.09	30.67	
R2	49.64	11.93	19.02	9.13	10.29	
F2	42.55	13.74	16.49	4.39	22.83	
F2R0.3	26.50	15.81	15.83	17.20	24.65	

CHAPITRE III. Partie III. Distribution des poids moléculaires et activités antioxydantes des fractions peptidiques

Tableau III-18. Distribution des poids moléculaires (aire sous la courbe) des fractions peptidiques obtenues par les procédés d'ultrafiltration, diafiltration et nanofiltration (campagne expérimentale à Sfax).

Figure III-15. Profil de répartition des poids moléculaires des fractions peptidiques obtenues dans la campagne expérimentale à Sfax



Selon les résultats, on constate que les peptides à grande taille (> 6 kDa) sont les espèces majoritaires dans les rétentats R1 et R2. En raison du taux de rejet élevé observé dans la membrane organique à 2 kDa, cette famille de peptides, ainsi que ceux entre 1 - 3 kDa, sont présents en plus grande concentration dans le rétentat R1. Quant à la famille E, composée des dipeptides et des acides aminés libres, les proportions les plus abondantes (> 30%) sont présentes dans le perméat F1 et le rétentat F1R0.3. Ces valeurs sont liées à la forte rétention de peptides à grande taille observée

dans la membrane organique, ce qui donne lieu à un perméat F1 riche en acides aminés. Ces composés sont de nouveau retrouvés dans le rétentat F1F0.3. La distribution des poids moléculaires des perméats F1F0.3 et F2F0.3 n'ont pas pu être déterminées en raison de leurs faibles concentrations en protéines. En conclusion, l'étape de filtration à membrane organique suivie de nanofiltration permet de récuperer en grande quantité les dipeptides et acides aminés dans le rétentat F1R0.3

En raison d'un taux de rejet plus bas dans l'étape d'ultrafiltration tangentielle, le procédé 2 est moins efficace pour concentrer des acides aminés et des peptides à petite taille. En effet, on retrouve un pourcentage de fragments supérieurs à 6 kDa très élevée dans le perméat F2 (42.6 % tandis que cette proportion est inférieure à 20% dans le perméat F1).

La distribution moléculaire des peptides d'un hydrolysat permet d'appréhender les voies de valorisation potentielles. En effet, une corrélation est très souvent observée entre cette taille et les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de ces hydrolysats telles que la solubilité ou capacité de rétention d'eau. Les activités biologiques éventuelles des peptides (antioxydante, antihypertensive, immunomodulante, antiprolifératrice, parmi d'autres) sont aussi influencées par la taille moyenne des peptides. Pourtant ce rapport n'est pas direct car les activités vont dépendre en grande partie de leur composition et séquence des acide aminés (S. Saidi, Belleville, Deratani, & Ben Amar, 2016; S. Saidi & Ben Amar, 2016; S Saidi, Deratani, Belleville, & Amar, 2014; Villamil, Váquiro, & Solanilla, 2017a).

Activités antioxydants in vitro des fractions peptidiques

Les deux activités antioxydantes (piégeant des radicaux DPPH et chélateur des metaux) étudiées sont influencées par la distribution des poids moléculaires des fractions récupérés par les procédés membranaires. Les activités reportées en bibliographie (par exemple, activité antioxydante des peptides entre 1 - 3 kDa, activité DPPH des peptides à grande taille, etc....) ne montrent pas un rapport direct entre la longueur de la chaine peptidique et les bioactivités. La composition et sequence en acides aminés explique en grande partie les propriétés biologiques potentiels des peptides.

Méthode de détermination de l'activité antioxydante	Fractions peptidiques					
	R8	R3	F8R1	F3R1	F8F1	F3F1
Piégeage du radical DPPH (IC ₅₀ , mg/mL)	2.13 ± 0.18	3.01 ± 0.07	1.32 ± 0.02	1.04 ± 0.01	2.05 ± 0.01	1.79 ± 0.03
Chélation des ions de Fe ²⁺ (IC5 ₀ , mg/mL)	1.35 ± 0.08	2.8 ± 0.07	3.44 ± 0.06	3.23 ± 0.21	2.42 ± 0.15	2.03 ± 0.15

Tableau III-19. Résumé des valeurs d'IC₅₀ obtenues dans les essais des activités antioxydantes.

Figure III-16 Activités antioxydantes par la méthode de piegeage du radical DPPH et chélation des ions Fe2+ Valeurs de bioactivités reportées par IC₅₀ (moyenne de trois déterminations).



BIBLIOGRAPHIE
- A.O.A.C. (2012). Official Methods of Analysis of the AOAC (19th ed.). Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Abdul-Hamid, A., Bakar, J., Bee, G. H. (2002). Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (Oreochromis mossambicus). Food Chemistry, 78, 69-74.
- Abejón, R., Belleville, M. P., Sanchez-Marcano, J., Garea, A., & Irabien, A. (2018). Optimal design of industrial scale continuous process for fractionation by membrane technologies of protein hydrolysate derived from fish wastes. Separation and Purification Technology, 197, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.12.057
- Adler Nissen. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers LTD.
- Ahn C-B, Kim J-G, Je J-Y (2014) Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. Food Chem 147:78– 83.
- Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B. T., & Albrektsen, S. (2006). Sizefractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization, 261(1), 305–317. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.025
- Ali Bougatef., Rafik Balti., Anissa Haddar., Kemel Jellouli., Nabil Souissi., and Moncef Nasri. 2012. Protein Hydrolysates from Bluefin Tuna (Thunnus thynnus) Heads as Influenced by the Extent of Enzymatic Hydrolysis. Biotechnology and Bioprocess Engineering 17:841-852 (2012).
- Ali Hamzeh., Masoud Rezaei., Saber Khodabandeh., Ali Motamedzadegan.,Mehrdad Noruzinia., Joe Mac Regenstein. 2019. Optimization of Antioxidant Peptides Production from the Mantle of Cuttlefish (Sepia pharaonis) Using RSM and Fractionation. Journal of Aquatic Food Product Technology.
- Alice B Nongonierma., Cloé Cadamuro., Aurélien Le Gouic., Priti Mudgil., Sajid Maqsood., Richard J FitzGerald. 2019. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of a camel whey protein enriched hydrolysate preparation. Food chemistry. 279 : 70-79.
- Almas, K. A. (1985). Applications of crossflow membrane technology in the fishing industry. Desalination, 53, 167-180.
- Aloulou, W., Hamza, W., Aloulou, H., Oun, A., Khemakhem, S., Jada, A., ... Amar, R. Ben. (2018). Developing of titania-smectite nanocomposites UF membrane over zeolite based ceramic support. Applied Clay Science, 155(August 2017), 20–29. https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.12.035
- Ananey-Obiri, D., Matthews, L. G., & Tahergorabi, R. (2019). Proteins From Fish Processing By-Products. Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816695-6.00006-4

- Aptel, P., Moulin, P., Quemeneur, F. (2002). Micro et Ultrafiltration : conduite des essais pilotes, traitements des eaux et effluents. . Club Français des membranes. Lavoisier, Paris.
- Aspmo, S. I., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. (2005a). Hydrolysates from Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera as components of microbial growth media. Process Biochemistry, 40, 3714-3722.
- Aspmo, S. I., Horn, S. J., Eijsink. V. G. H. (2005c). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera. Process Biochemistry, 40, 1957-1966.
- Auwal, S. M., Zarei, M., Abdul-Hamid, A., & Saari, N. (2017). Response Surface Optimisation for the Production of Antioxidant Hydrolysates from Stone Fish Protein Using Bromelain. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. https://doi.org/10.1155/2017/4765463
- Balti, R., Bougatef, A., Ali, N. E.-H., Zekri, D., Barkia, A., & Nasri, M. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzymeinhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (Sepia officinalis) by-products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(12), 2006–2014. https://doi.org/10.1002/jsfa.4045
- Balti, R., Bougatef, A., Sila, A., Guillochon, D., Dhulster, P., & Nedjar-Arroume, N. (2015). Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish(Sepia officinalis) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry, 170, 519–525.
- Barroso, F. G., Rodiles, A., Vizcaino, A. J., Martínez, T. F., & Alarcón, F. J. (2013). Evaluation of feed attractants in juvenile senegalese sole, Solea senegalensis. Journal of the World Aquaculture Society, 44(5). https://doi.org/10.1111/jwas.12068
- Bazin, M. M., Nakamura, Y., & Ahmad, N. (2018). Chemical cleaning of microfiltration ceramic membrane fouled by nom. Jurnal Teknologi, 80(6), 95–103. https://doi.org/10.11113/jt.v80.12156
- Ben Khaled, H., Ghlissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M. A., Barkia, A., Sahnoun, Z., & Nasri, M. (2012). Effect of protein hydrolysates from sardinelle (Sardinella aurita) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. Food Research International, 45, 60–68.
- Beyer, F., Laurinonyte, J., Zwijnenburg, A., Stams, A. J. M., & Plugge, C. M. (2017). Membrane Fouling and Chemical Cleaning in Three Full-Scale Reverse Osmosis Plants Producing Demineralized Water. Journal of Engineering (United Kingdom), 2017. https://doi.org/10.1155/2017/6356751
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, 99, 335-343.

- Bhaskar, N., Mahendrakar, N. S. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (Catla catla): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease.Bioresource Technology, 99, 4105-4111.
- Bougatef, A., Balti, R., Haddar, A., Jellouli, K., Souissi, N., & Nasri, M. (2012). Protein hydrolysates from bluefin tuna (Thunnus thynnus) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 17(4), 841–852. https://doi.org/10.1007/s12257-012-0053-y
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinella aurita) by-products proteins. Food Chemistry, 118, 559–565.
- Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Massé, A., Guérard, F., Chabeaud, A., Fouchereau-Péron, M., Le Gal, Y., Ravallec-Plé, R., Bergé, J. P., Picot, L., Piot, J. M., Batista, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I. (2009). Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. Desalination, 244, 303-320.
- Cai, Z., Li, W., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., & Ai, Q. (2015). Effects of dietary sizefractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow croaker (Larimichthys crocea) larvae, 440, 40–47. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.026
- Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Guérard, F. (2009b). Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (Pollachius virens): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances. Journal of Food Engineering, 91, 408-414.
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Food Chemistry, 135(4), 3020–3038. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100
- Chaturvedi, N. D., & Bandyopadhyay, S. (2014). Simultaneously targeting for the minimum water requirement and the maximum production in a batch process. Journal of Cleaner Production, 77, 105–115. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.079
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, Pennsylvania, USA.
- Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, Z. R., & Luo, H. Y. (2015). Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (Katsuwonus pelamis) dark muscle. Marine Drugs, 13(5), 2580–2601. https://doi.org/10.3390/md13052580
- Cho, J., Amy, G., & Pellegrino, J. (2000). Membrane filtration of natural organic matter: Factors and mechanisms affecting rejection and flux decline with charged ultrafiltration

(UF) membrane. Journal of Membrane Science, 164(1–2), 89–110. https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00176-3

- Cros, S., Lignot, B., Bourseau, P., Jaouen, P. (2005a). Reverse osmosis for the production of aromatic concentrates from mussel cooking juices: a technical assessment. Desalination, 180, 263-269.
- Cros, S., Lignot, B., Bourseau, P., Jaouen, P. (2005a). Reverse osmosis for the production of aromatic concentrates from mussel cooking juices: a technical assessment. Desalination, 180, 263-269.
- Cros, S., Lignot, B., Bourseau, P., Jaouen, P., Prost, C. (2005b). Desalination of mussel cooking juices by electrodialysis: effect on the aroma profile. Journal of Food Engineering, 69, 425-436.
- Cros, S., Lignot, B., Jaouen, P., Bourseau, P. (2006). Technical and economical evaluation of an integrated membrane process capable both to produce an aroma concentrate and to reject clean water from shrimp cooking juices. Journal of Food Engineering, 77, 697-707.
- Daniel Ananey-Obiri., Lovie G. Matthews., Reza Tahergorabi. 2019. Proteins From Fish Processing By-Products. Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications. Chapter 6.
- de la Casa García, E. (2006). UNIVERSIDAD DE GRANADA. Doctoral Thesis. University of Granada.
- de Oliveira, D. A. S. B., Licodiedoff, S., Furigo, A., Ninow, J. L., Bork, J. A., Podestá, R., Waszczynskyj, N. (2017). Enzymatic extraction of oil from yellowfin tuna (Thunnus albacares) by-products: a comparison with other extraction methods. International Journal of Food Science and Technology, 52(3). https://doi.org/10.1111/ijfs.13324
- Di Bella, G., & Di Trapani, D. (2019). A brief review on the resistance-in-series model in membrane bioreactors (MBRs). Membranes, 9(2). https://doi.org/10.3390/membranes9020024
- Dong, Z., Tian, G., Xu, Z., Li, M., Xu, M., Zhou, Y., & Ren, H. (2017). Antioxidant activities of peptide fractions derived from freshwater mussel protein using ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. Czech Journal of Food Sciences, 35(4), 328–338. https://doi.org/10.17221/421/2016-CJFS
- Dumay J., Donnay-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P., et Bergé J. P. (2006) Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (Sardina pilchardus) viscera using industrial protases. Process Biochem., in press.
- Dumay, J. (2006). Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteurs enzymatique combine a l'ultrafiltration: Application a la valorisation de coproduits de poisson (Sardina pilchardus). Thèse de doctorat, Université de Nante.
- Dumay, J., Barthomeuf, C., Berge, J. P. (2004). How Enzymes May Be Helpful for Upgrading Fish By-Products -- Enhancement of Fat Extraction. Journal of Aquatic Food Product Technology, 13, 69 - 84.

- 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 Biochemistry, 41, 2327-2332.
- Dutourni, P., & Limousy, L. (2017). Modification of the selectivity properties of tubular ceramic membranes after alkaline cleaning. https://doi.org/10.3390/membranes7040065
- Emna Soufi Kechaou., Jean-Pascal Bergé., Pascal Jaouen., Raja Ben Amar. 2013. Optimization of common cuttlefish (Sepia officinalis) protein hydrolysate using Pepsin by Response Surface Methodology. Journal of Aquatic Food Product Technology.

FAO Globe Fish, 2009.

- FAO. (2018). fisheries departement: La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture.
- FAO. (2018). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018. Atteindre les objectifs de développement durable. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO/WHO. (1985). Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University. Series No. 724. Geneva.
- FAO/WHO. (1999). Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University. Geneva.
- García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F. J., Ruiz-Quesada, C., Pérez-Morilla, A. I., Martínez-Agustín, O., Guadix, E. M. (2017). Functional, bioactive and antigenicity properties of blue whiting protein hydrolysates: effect of enzymatic treatment and degree of hydrolysis. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(1), 299–308. https://doi.org/10.1002/jsfa.7731
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. Journal of Food Science, 69(8). https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x
- GICA/GIPP, Groupement des Industries de Conserves Alimentaires. 2017
- Gildberg, A. (1992). Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera. Bioresource Technology, 39, 271-276.
- Guérard, F. (2007). Enzymatique esxtraction methods for by-product recovery. In Maximissing the Value of Marine By-Product. IN F., G. S. (Ed.) Part 2: By-products Recovry and Processin. Woodhead.
- Guérard, F., Batista, I., Pires, C., Thorkelson, G., Le Gal, Y. (2004). Repport on sources and selection criteria for raw material. Rapport établi pour le programme SEAFOODplus.
- Guerard, F., Guimas., L. Binet., A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 19-20, 489-498.

- Halsall-Whitney, H., & Thibault, J. (2006). Multi-objective optimization for chemical processes and controller design: Approximating and classifying the Pareto domain. Computers & Chemical Engineering, 30(6–7), 1155–1168. https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2006.02.010
- Hamre, Kristin, Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L. E. C., & Izquierdo, M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. Reviews in Aquaculture, 5(s1), S26–S58. https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01086.x
- Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S., Motamedzadegan, A., Noruzinia, M., & Regenstein, J. Mac. (2019). Optimization of Antioxidant Peptides Production from the Mantle of Cuttlefish (Sepia pharaonis) Using RSM and Fractionation. Journal of Aquatic Food Product Technology, 28(4), 392–401. https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1594480
- Han, Y., Byun, S.-H., Park, J.-H., & Kim, S.-B. (2015). Bioactive properties of enzymatic hydrolysates from abdominal skin gelatin of yellowfin tuna (Thunnus albacares). International Journal of Food Science and Technology, 50(9). https://doi.org/10.1111/ijfs.12890
- Harnedy, P. A., Parthsarathy, V., McLaughlin, C. M., O'Keeffe, M. B., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., ... FitzGerald, R. J. (2018a). Atlantic salmon (Salmo salar) co-productderived protein hydrolysates: A source of antidiabetic peptides. Food Research International, 106(January), 598–606. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.025
- Herpandi, N. H., Rosma, A., & Wan Nadiah, W. A. (2011). The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10(4), 195–207. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00155.x
- Herpandi., A. Rosma., W. A. W. Nadiah, N. A. Febrianto., N.Huda. 2017. Optimisation of enzymtic hydrolysis of skipjack tuna by product using protamex : Response surface approach. J Fundam Appl Sci. 2017, 9(2S), 845-860.
- Hsu, K. C. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. Food Chemistry, In Press, Corrected Proof.
- Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga, K., Zavaleta, A. I., & Hernández-Ledesma, B. (2018). Production of antioxidant hydrolyzates from a lupinus mutabilis (Tarwi) protein concentrate with alcalase: Optimization by response surface methodology. Natural Product Communications, 13(6), 751–756. https://doi.org/10.1177/1934578x1801300626
- Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. (2018). A Review of Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides Deriving from Wastes Generated by Fish Processing. Food and Bioprocess Technology, 11(1), 2–16. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1
- Jao, C. L., Ko, W. C. (2002). Utilization of cooking juice of young tuna processed into canned tuna as condiments: Effect of enzymatic hydrolysis and membrane treatment. Fisheries Science, 68, 1344-1351.

- Je J-Y, Cha J-Y, Cho Y-S, Ahn H-Y, Lee JH, Cho Y-S, Ahn C-B (2013) Hepatoprotective effect of peptic hydrolysate from salmon pectoral fin protein byproducts on ethanol-induced oxidative stress in Sprague Dawley rats. Food Res Int 51:648–653.
- Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International, 42, 1266-1272.
- Josupeit, H. (2006). Commodity Trade: shrimp, groundfish, tuna and cephalopods. Regional Seminar of TCP/3011/RAS, June 2006.
- Jumardi Roslan., Siti Mazlina Mustapa Kamal., Khairul Faezah Md. Yunos., Norhafizah Abdullah. 2017. Assessment on multilayer ultrafiltration membrane for fractionation of tilapia by-product protein hydrolysate with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Separation and Purification Technology 173 (2017) 250–257.
- Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., Kim, S. K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (Limanda aspera) frame protein. European Food Research and Technology, 219, 20-26.
- Kallioinen, M., Pekkarinen, M., Manttari, M., Nystrom, M., Nuortila-Jokinen, J. (2006). Stability of two different regenerated cellulose ultrafiltration membranes under varying solution temperature. Desalination, 199, 204-206.
- Kang, P. Y., Ishak, N. H. and Sarbon, N. M. 2018. Optimization of enzymatic hydrolysis of shortfin scad (Decapterus macrosoma) myofibrillar protein with antioxidant effect using alcalase. International Food Research Journal 25(5): 1808-1817.
- Kang, P. Y., Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. (2018). Optimization of enzymatic hydrolysis of shortfin scad (Decapterus macrosoma) myofibrillar protein with antioxidant effect using alcalase. International Food Research Journal, 25(5), 1808–1817.
- Kechaou, E. S., Bergé, J. P., Jaouen, P., & Ben Amar, R. (2015). Optimization of common cuttlefish (Sepia officinalis) protein hydrolysate using pepsin by response surface methodology. Journal of Aquatic Food Product Technology, 24(3), 270–282. https://doi.org/10.1080/10498850.2013.773116
- Kechaou-Soufi, E., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J. I., 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. Journal of Bioscience and Bioengineering, 107, 158-164.
- Khosravi, S., Bui, H. T. D., Herault, M., Fournier, V., Kim, K. D., Lee, B. J., ... Lee, K. J. (2017). Supplementation of Protein Hydrolysates to a Low-fishmeal Diet Improves Growth and Health Status of Juvenile Olive Flounder, Paralichthys olivaceus. https://doi.org/10.1111/jwas.12436
- Kim, I. Y., & de Weck, O. L. (2004). Adaptive weighted-sum method for bi-objective optimization: Pareto front generation. Structural and Multidisciplinary Optimization, 29(2), 149–158. https://doi.org/10.1007/s00158-004-0465-1

- Klomklao, S., & Benjakul, S. (2017). Utilization of Tuna Processing Byproducts: Protein Hydrolysate from Skipjack Tuna (Katsuwonus pelamis) Viscera. Journal of Food Processing and Preservation, 41(3). https://doi.org/10.1111/jfpp.12970
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry, 102, 1317-1327.
- Kotzamanis, Y. P., Gisbert, E., Gatesoupe, F. J., Zambonino Infante, J., & Cahu, C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, 147(1). https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.037
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 147, 205-14.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 147, 205-14.
- Kristin Hamre., Manuel Yúfera., Ivar Rønnestad., Clara Boglione., Luis E. C. Conceição., Marsol Izquierdo. 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. Reviews in aquaculture. Volume 5, Issue 1.
- Kristinsson, H. G., Rasco, B. A. (2000a). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40, 43-81.
- Kroese, D. P., & Chan, J. C. C. (2014). Statistical Modeling and Computation. New York: Springer-Verlag New York.
- Kuo-Chiang, H. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. Food Chemistry, 122, 42-48.
- Laroque, D., Chabeaud, A., & Guérard, F. (2008). Antioxidant capacity of marine protein hydrolysates. Transworld Research Network., (January), 147–161.
- Lasdon, L. S., Waren, A. D., Jain, A., & Ratner, M. (1978). Design and Testing of a Generalized Reduced Gradient Code for Nonlinear Programming. ACM Transactions on Mathematical Software (TOMS), 4(1), 34–50. https://doi.org/10.1145/355769.355773
- Lee, S. H., Qian, Z. J., Kim, S. K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry, 118, 96-102.

- Li, K., Li, S., Huang, T., Dong, C., Li, J., Zhao, B., & Zhang, S. (2019). Chemical cleaning of ultrafiltration membrane fouled by humic substances: Comparison between hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(14). https://doi.org/10.3390/ijerph16142568
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., & Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Amino Acids, 37(1), 43–53. https://doi.org/10.1007/s00726-008-0171-1
- Li, Z, H-Kittikun, A., Youravong, W. (2009b). Purification of protease from pre-treated tuna spleen extract by ultrafiltration: An altered operational mode involving critical flux condition and diafiltration. Separation and Purification Technology, 66, 368-374.
- Li, Z., Youravong, W., H-Kittikun, A. (2006b). Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. Bioresource Technology, 97, 2364-2370.
- Lian, P. Z., Lee, C. M., Park, E. (2005). Characterization of squid-processing by-product hydrolysates and its potential as aquaculture feed ingredient. Journal of Agricultur and Food Chemistry, 53, 55-87-92.
- Liaset, B., Julshamn, K., Espe, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex (TM). Process Biochemistry, 38, 1747-1759.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar, L.) frames by Protamex (TM) protease. Process Biochemistry, 37, 1263-1269.
- Liu, H. J., Chang, B. Y., Yan, H. W., Yu, F. H., & Liu, X. X. (1995). Determination of amino acids in food and feed by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and reversed-phase liquid chromatographic separation. Journal of AOAC International (USA).
- Luo H-Y, Wang B, Li Z-R, Chi C-F, Zhang Q-H, He G-Y (2013) Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of Sphyrna lewini muscle protein. LWT Food Sci Technol 51:281–288.
- Mahmoudreza Ovissipour., Abdolmohammad Abedian Kenari., Ali Motamedzadegan., Rajab Mohammad Nazari. (2010). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (Thunnus albacares). Food Bioprocess Technol (2012) 5:696– 705.
- Mahmoudreza Ovissipour., Abdolmohammad Abedian Kenari., Ali Motamedzadegan., Rajab Mohammad Nazari. 2012. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (Thunnus albacares). Food Bioprocess Technol (2012) 5:696– 705.
- Mancinelli, D., & Hallé, C. (2015). Nano-Filtration and Ultra-Filtration Ceramic Membranes for Food Processing: A Mini Review. Journal of Membrane Science & Technology, 05(02). https://doi.org/10.4172/2155-9589.1000140

- Mangano, V., Gervasi, T., Rotondo, A., De Pasquale, P., Dugo, G., Macrì, F., & Salvo, A. (2019). Protein hydrolysates from anchovy waste: purification and chemical characterization. Natural Product Research, 0(0), 1–8. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1634711
- Marler, R. T., & Arora, J. S. (2009). The weighted sum method for multi-objective optimization: new insights. Structural and Multidisciplinary Optimization, 41(6), 853–862. https://doi.org/10.1007/s00158-009-0460-7
- Martone, C. B., Pérez Borla, O., Sánchez, J. J. (2005). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and aracha growth media. Bioresource Technology., 96, 383-87.
- Mavrotas, G. (2009). Effective implementation of the ε-constraint method in Multi-Objective Mathematical Programming problems. Applied Mathematics and Computation, 213(2), 455–465. https://doi.org/10.1016/j.amc.2009.03.037
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., ... Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(23), 5682–5693. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665
- Morais, S. (2017). The Physiology of Taste in Fish: Potential Implications for Feeding Stimulation and Gut Chemical Sensing. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture, 25(2), 133–149. https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1249279
- Morales-Medina, R., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2017). Multiobjective optimization of the antioxidant activities of horse mackerel hydrolysates produced with protease mixtures. Process Biochemistry, 52. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.001
- Morales-Medina, Rocío, García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Muñío, M. M., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2016). Nutritional indexes, fatty acids profile, and regiodistribution of oil extracted from four discarded species of the Alboran Sea: Seasonal effects, 118(9), 1409–1415. https://doi.org/10.1002/ejlt.201500486
- Mourouzidis-Mourouzis, S. A., & Karabelas, A. J. (2008). Whey protein fouling of large pore-size ceramic microfiltration membranes at small cross-flow velocity. Journal of Membrane Science, 323(1), 17–27. https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2008.05.053
- Najafian L, Babji AS (2015) Isolation, purification and identification of three novel antioxidative peptides from patin (Pangasius sutchi) myofibrillar protein hydrolysates. LWT Food Sci Technol 60:452–461.
- Naqash, S. Y., & Nazeer, R. A. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from muscles of Nemipterus japonicus and Exocoetus volitans using response surface methodology. Amino Acids, 43(1), 337–345. https://doi.org/10.1007/s00726-011-1084-y

- Nchienzia, H. A., Morawicki, R. O., & Gadang, V. P. (2010). Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. Poultry Science, 89(10), 2273–2280. https://doi.org/10.3382/ps.2008-00558
- Nguyen, H. T. M., Sylla, K. S. B., Randriamahatody, Z., Donnay-Moreno, C., Moreau, J., Tran, L. T., & Bergé, J. P. (2011). Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (Thunnus albacares) by-products using protamex protease. Food Technology and Biotechnology, 49(1).
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering, 70(4), 571–578. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.011
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering, 70, 571-578.
- Nunes, A. J. P., Sá, M. V. C., Andriola-Neto, F. F., & Lemos, D. (2006). Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. Aquaculture, 260(1–4). https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.027
- Ovissipour, M., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., & Nazari, R. M. (2012). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (Thunnus albacares). Food and Bioprocess Technology, 5(2), 696–705. https://doi.org/10.1007/s11947-010-0357-x
- Ovissipour, M., Abedian Kenari, A., Nazari, R., Motamedzadegan, A., & Rasco, B. (2014). Tuna viscera protein hydrolysate: Nutritive and disease resistance properties for Persian sturgeon (Acipenser persicus L.) larvae. Aquaculture Research, 45(4). https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03257.x
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M. A., Ramírez-Suárez, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (Merluccius productus) muscle produced by a commercial protease. Food Chemistry, 109, 782-789.
- Pan, S., Wang, S., Jing, L., & Yao, D. (2016). Purification and characterisation of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptide derived from the enzymatic hydrolysate of Enteromorpha clathrata protein. Food Chemistry, 211, 423–430. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.087

Paquotte, P. (1999). La situation du marché du thon. Ofimer, 12, 6-9.

- Park, S., Kang, J.-S., Lee, J. J., Vo, T.-K.-Q., & Kim, H.-S. (2018). Application of physical and chemical enhanced backwashing to reduce membrane fouling in the water treatment process using ceramic membranes. Membranes, 8(4) https://doi.org/10.3390/membranes8040110
- Parvathy, U., Binsi, P. K., Jeyakumari, A., Ninan, G., Zynudheen, A. A., Ravishankar, C. N., & Island, W. (2018). Fish Protein Hydrolysates : A potential additive in foods, 31–35.

- Parvathy, U., Binsi, P. K., Joshy, C. G., Jeyakumari, A., Zynudheen, A. A., Ninan, G., & Ravishankar, C. N. (2018). Functional Hydrolysates from Yellow Fin Tuna Red Meat Using RSM Based Optimization. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(11), 1462–1474. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.711.169
- Parvathy, U., Binsi, P. K., Zynudheen, A. A., Ninan, G., & Murthy, L. N. (2018). Peptides from white and red meat of yellowfin tuna (Thunnus albacares): A comparative evaluation. Indian Journal of Fisheries, 65(3), 74–83. https://doi.org/10.21077/ijf.2018.65.3.78269-10
- Pascal, J. (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. Nantes, Université de Nantes.
- Pérez-Gálvez, R., Guadix, E. M., Bergé, J.-P., & Guadix, A. (2011). Operation and cleaning of ceramic membranes for the filtration of fish press liquor. Journal of Membrane Science, 384(1–2). https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.09.019
- Pérez-Gálvez, R., Guadix, E. M., Bergé, J.-P., & Guadix, A. (2013). Processing fish press waters using metallic and ceramic filtration. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 88(10). https://doi.org/10.1002/jctb.4043
- Pezeshk, S., Ojagh, S. M., Rezaei, M., & Shabanpour, B. (2018). Fractionation of Protein Hydrolysates of Fish Waste Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activities. Probiotics and Antimicrobial Proteins. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9483-y
- 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 Biochemistry, 41, 1217-1222.
- Raghavan, S., Kristinsson, H. G. (2009). ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. Food Chemistry, 117, 582-588.
- 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, 2607-2619.
- Ravalléc-Plé, R. (2000). Valorisation d'hydrolysat d'origine marine: optimisation de la concentration des peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents séctrétagogues., Université de Bretagne Occidentale.
- Ravallec-Plé, R., Charlot, C., Pires, C., Braga, V., Batista, I., Van Wormhoudt, A., Le Gal, Y., Fouchereau, P. M. (2001). The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (Sardina pilchardus). Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 1120-1125.

- Reeves, R. R., Breiwick, J. M., & Mitchell, E. D. (1999). History of Whaling and Estimated Kill of Right Whales, Balaena glacialis, i...: at USF Libraries. Marine Fisheries Review, 61(3), 1–37. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18
- Refstie, S., Olli, J. J., Standal, H. (2004). Feed intake, growth and protein utilization by postsmolt Alantic salmon (Salmo salar) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. Aquaculture, 239, 331-49.
- Ren, Y., Wu, H., Lai, F., Yang, M., Li, X., & Tang, Y. (2014). Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates of scorpion (Buthus martensii Karsch) protein. Food Research International, 64, 931–938.
- Roslan, J., Mazlina, S., Kamal, M., & Faezah, K. (2018). Separation and Purification Technology Evaluation on performance of dead-end ultra fi ltration membrane in fractionating tilapia by-product protein hydrolysate, 195(June 2017), 21–29. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.020
- Roslan, J., Mustapa Kamal, S. M., Khairul, K. F., & Abdullah, N. (2017). Assessment on multilayer ultrafiltration membrane for fractionation of tilapia by-product protein hydrolysate with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Separation and Purification Technology, 173, 250–257. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.09.038
- Roslan, J., Mustapa Kamal, S. M., Khairul, K. F., & Abdullah, N. (2018). Evaluation on performance of dead-end ultrafiltration membrane in fractionating tilapia by-product protein hydrolysate. Separation and Purification Technology, 195, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.020
- Roslan, J., Yunos, K. F. M., Abdullah, N., & Kamal, S. M. M. (2014). Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (Oreochromis Niloticus) by-Product. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2, 312–319. https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.044
- Rutherfurd, S. M. (2010, September). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A Review.
- Saadaoui, H., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, E. M., Amar, R. Ben, & Pérez-Gálvez, R. (2019a). Bi-objective optimization of tuna protein hydrolysis to produce aquaculture feed ingredients. Food and Bioproducts Processing, 115, 26–35. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.03.001
- Saidi, S., Belleville, M.-P., Deratani, A., & Ben Amar, R. (2016). Production of Interesting Peptide Fractions by Enzymatic Hydrolysis of Tuna Dark Muscle By-Product Using Alcalase. Journal of Aquatic Food Product Technology, 25(2). https://doi.org/10.1080/10498850.2013.844753
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. Ben. (2014). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. Food Research International, 65(PC), 453–461. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026

- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M., & Ben, R. (2014a). Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. FRIN, 65, 329–336. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.023
- Saidi, S., Deratani, A., Ben Amar, R., & Belleville, M.-P. (2013). Fractionation of a tuna dark muscle hydrolysate by a two-step membrane process. Separation and Purification Technology, 108, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.048
- Saidi, S., Saoudi, M., & Ben Amar, R. (2018). Valorisation of tuna processing waste biomass: isolation, purification and characterisation of four novel antioxidant peptides from tuna by-product hydrolysate. Environmental Science and Pollution Research, 25(18), 17383– 17392. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1809-5
- Salampessy, J., Phillips, M., Seneweera, S., & Kailasapathy, K. (2010). Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (Meuchenia sp.) insoluble proteins. Food Chemistry, 120, 556–560.
- Samaneh Pezeshk., Seyed Mahdi Ojagh., Masoud Rezaei., Bahareh Shabanpour.2018. Fractionation of Protein Hydrolysates of Fish Waste Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activities. Probiotics and Antimicrobial Proteins.
- Sami Saidi, André Deratani, Marie-Pierre Belleville, Raja Ben Amar. 2014. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by Ultrafiltration and Nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. Food Research International. Volume 65, Part C, Pages 453-461.
- Sami Saidi., André Deratani., Raja Ben Amar., Marie-Pierre Belleville. 2013. Fractionation of a tuna dark muscle hydrolysate by a two-step membrane process. Separation and Purification Technology 108 (2013) 28–36.
- Sappasith Klomklao., Soottawat Benjakul. 2018. Protein Hydrolysates Prepared from the Viscera of Skipjack Tuna (Katsuwonus pelmamis): Antioxidative Activity and Functional Properties. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 18: 69-79..
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., & Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. Advances in Colloid and Interface Science, 145(1–2), 1–22. https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.004
- Service, A. N. P., & Wildlife. (1986). Special issue. Special issue. Australian Ranger Bulletin, 4(1), 9–10.
- Shahidi, F., Han, X. Q., Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus). Food Chemistry, 53, 285-293.
- Shehu Muhammad Auwal., Mohammad Zarei., Azizah Abdul-Hamid., Nazamid Saari. 2017. Response Surface Optimisation for the Production of Antioxidant Hydrolysates from Stone Fish Protein Using Bromelain. Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 10 pages

- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. Journal of Functional Foods, 21, 10–26. https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.11.007
- Sila, A., Hedhili, K., Przybylski, R., Ellouz-Chaabouni, S., Dhulster, P., Bougatef, A., & NedjarArroume, N. (2014a). Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against Listeria monocytogenes. Journal of Functional Foods, 11, 322–329.
- Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., Dhulster, P., & Bougatef, A. (2014b). Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. LWT – Food Science and Technology, 55, 183–188.
- Simon, A., Vandanjon, L., Levesque, G., Bourseau, P. (2002). Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes. Desalination, 144, 313-318.
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storr, I., Rustad, T. (2005a). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (Gadus morhua) by-products. Process Biochemistry, 40, 2021-2033.
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storr, I., Rustad, T. (2005b). Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (Gadus morhua) byproducts. Process Biochemistry, 40, 1415-1424.
- Slizyte, R., Mozuraityte, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., Rustad, T. (2009a). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (Gadus morhua) backbones. Process Biochemistry, 44, 668-677.
- Slizyte, R., Rustad, T., Storro, I. (2005c). Enzymatic hydrolysis of cod (Gadus morhua) byproducts: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. Process Biochemistry, 40, 3680-3692.
- Song R, K-q Z, R-b W (2016) In vitro antioxidative activities of squid (Ommastrephes bartrami) viscera autolysates and identification of active peptides. Process Biochem 51:1674 1682.
- Steinhardt, H., & Beychok, S. (1964). Interaction of Proteins with Hydrogen Ions and Other Small Ions and Molecules. In H. Neurath (Ed.), The Proteins (pp. 139–304). New York: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395724-5.50012-0
- Suki, A., Fane, A. G., & Fell, C. J. D. (1984). Flux decline in protein ultrafiltration. Journal of Membrane Science, 21(3), 269–283. https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)80218-5
- Tang, H.-G., Wu, T.-X., Zhao, Z.-Y., & Pan, X.-D. (2008). Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (Pseudosciaena crocea R.). Journal of Zhejiang University: Science B, 9(9). https://doi.org/10.1631/jzus.B0820088

- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (Decapterus maruadsi). Food Chemistry, 103(4), 1385–1394. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.055
- U. Parvathy., P.K. Binsi., C.G. Joshy., A. Jeyakumari., A.A. Zynudheen., George Ninan., C.N. Ravishankar. 2018. Functional Hydrolysates from Yellow Fin Tuna Red Meat Using RSM Based Optimization. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 7 (11): 1462-1474.
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. Process Biochemistry, 49(2), 258– 264. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012
- Vandanjon, L., Cros, S., Jaouen, P., Quéméneur, F., Bourseau, P. (2002). Recovery by nanofiltration and reverse osmosis of marine flavours from seafood cooking waters. Desalination, 144, 379- 385.
- Vandanjon, L., Johannsson, R., Derouiniot, M., Bourseau, P., Jaouen, P. (2007). Concentration and purification of blue whiting peptide hydrolysates by membrane processes. Journal of Food Engineering, 83, 581-589.
- Villamil, O., Váquiro, H., & Solanilla, J. F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. Food Chemistry, 224, 160–171. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., Liu, S., Chen, X., & Li, P. (2019). Preparation and Identification of Antioxidative Peptides from Pacific Herring (Clupea pallasii) Protein. Molecules, 24(10). https://doi.org/10.3390/molecules24101946
- Wang, Y., Leng, Y., Chen, H., & Wang, H. (2015). Studies on enzymolysis technology of collagen peptide and antioxide activities from tuna skin. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 15(2). https://doi.org/10.16429/j.1009-7848.2015.02.011
- Weng, W., Tang, L., Wang, B., Chen, J., Su, W., Osako, K., & Tanaka, M. (2014). Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (Prionace glauca) skin gelatin hydrolysates. Journal of Functional Foods, 11(C), 342–351. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.021
- Wuyin Weng., Lanlan Tang., Baozhou Wang., Jun Chen., Wenjin Su., Kazufumi Osako., Munehiko Tanaka. Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (Prionace glauca) skin gelatin hydrolysates. Journal of functional foods 11 (2014) 342–351.
- Zambonino Infante, J. L., & Cahu, C. L. (2010). Effect of nutrition on marine fish development and quality. In Giorgos Koumoundouros (Ed.), Recent Advances in Aquaculture Research (pp. 103–124). Transworld Research Network.
- Zambonino-Infante J.L., Cahu, C.L. Effect of nutrition on marine fish development and quality. In Recent advances in aquaculture research 2010, p103-124.

- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., & Prentice, C. (2018). Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. Marine Biotechnology, 20(2), 118–130. https://doi.org/10.1007/s10126-018-9799-3
- Zarkadas, D., & Sirkar, K. K. (2010). Membrane Systems for Pharmaceutical Applications. Chemical Engineering in the Pharmaceutical Industry: R&D to Manufacturing, 299–314. https://doi.org/10.1002/9780470882221.ch16
- Zeman, L. J., Zydney, A. L. (1996). Microfiltration and ultrafiltration, principles and applications, New York.
- Zhang Y, Duan X, Zhuang Y (2012) Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (Oreochromis niloticus) skin gelatine. Peptides 38:13–21.
- Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J., & Chang, Q. (2013). Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (Scophthalmus maximus L.). Aquaculture Research, 44(6). https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03094.x
- Zhong, S., Ma, C., Lin, Y. C., & Luo, Y. (2011). Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food Chemistry, 126(4), 1636–1642. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.12.046
- Zularisam, A. W., Ismail, A. F., Salim, R. (2006). Behaviours of natural organic matter in membrane filtration for surface water treatment a review. Desalination, 194, 211-231.

ANNEXES

Annexe I. Curves d'hydrolyse



Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 45°C, pH 8, texo = 60 min

Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase --flavorzyme : 45°C, pH 8, texo = 180 min





Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase –flavorzyme : 45°C, pH 7.5, texo = 60 min

Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 41.6°C, pH 8, texo = 120 min





Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 55°C, pH 8.5, texo = 180 min

Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 55°C, pH 7.5, texo = 60 min





Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 50°C, pH 7.2, texo = 120 min

Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase –flavorzyme : 55°C, pH 8.5, texo = 60 min





Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 50°C, pH 8.8, texo = 120 min







Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 45°C, pH 7.5, texo = 180 min

Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 55°C, pH 7.5, texo = 180 min





Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 50°C, pH 8, texo = 19 min

Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 58.4°C, pH 8, texo = 120 min





Curve d'hydrolyse des têtes de thon avec alcalase -flavorzyme : 50°C, pH 8, texo = 120 min

Annexe II. Distribution des poids moléculaires des hydrolysats enzymatiques



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 45° C, pH 8, texo = 60 min

Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 45° C, pH 8, texo = 180 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 45° C, pH 7.5, texo = 60 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 41.6° C, pH 8, texo = 120 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 55° C, pH 8.5, texo = 180 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 55° C, pH 7.5, texo = 60 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 50° C, pH 7.2, texo = 120 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 55° C, pH 8.5, texo = 60 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 50° C, pH 8.8, texo = 120 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 50° C, pH 8, texo = 221 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 45° C, pH 7.5, texo = 180 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 55° C, pH 7.5, texo = 180 min






Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 58.4° C, pH 8, texo = 120 min



Chromatogramme d'exclusion de taille des hydrolysats des têtes de thon avec alcalase – flavorzyme : 50° C, pH 8, texo = 120 min



Annexe III. Distribution des poids moléculaires des fractions séparées par procédés d'ultrafiltration, diafiltration et nanofiltration





Chromatogramme d'exclusion de taille du rétentat R3 obtenu par UF sur membrane céramique de 3 kDa (campagne expérimentale de Granada)



Chromatogramme d'exclusion de taille du rétentat F8R1 obtenu par UF sur membrane céramique de 1 kDa (campagne expérimentale de Granada)



Chromatogramme d'exclusion de taille du rétentat F3R1 obtenu par UF sur membrane céramique de 1 kDa (campagne expérimentale de Granada)







Chromatogramme d'exclusion de taille du perméat F3F1 obtenu par UF sur membrane céramique de 1 kDa (campagne expérimentale de Granada)



Chromatogramme d'exclusion de taille du rétentat R1 obtenu par UF sur membrane organique de 2 kDa (campagne expérimentale de Sfax)



Chromatogramme d'exclusion de taille du rétentat F1 obtenu par UF sur membrane organique de 2 kDa (campagne expérimentale de Sfax)



Chromatogramme d'exclusion de taille du rétentat F1R0.3 obtenu par NF sur membrane de polyamide de 0.3 kDa (campagne expérimentale de Sfax)



Chromatogramme d'exclusion de taille du rétentat R2 obtenu par UF sur membrane nanocomposite de 2 kDa (campagne expérimentale de Sfax)



Chromatogramme d'exclusion de taille du perméat F2 obtenu par UF sur membrane nanocomposite de 2 kDa (campagne expérimentale de Sfax)



Chromatogramme d'exclusion de taille du retentat F2R0.3 obtenu par NF sur membrane de polyamide de 0.3 kDa (campagne expérimentale de Sfax)

