

2 V0000 793
723

physio. Nutrition
1976
OK

PRODUCTION DE PROTÉINES UNICELLULAIRES
A PARTIR DE COQUE D'ARACHIDE

Par J. BLANCOU (*), H. CALVET (*) et
R. RIVIERE (**), avec la collaboration
technique de A. NIANG

INTRODUCTION

Il n'est pas possible de détailler ici les très nombreux travaux et publications concernant la production de protéines unicellulaires ("Single cell protein") à partir des différents substrats. Ces travaux ont déjà fait l'objet des revues complètes (2, 6, 9) et récemment d'un symposium international (3) résumant l'avancement actuel des recherches en ce domaine.

Ces recherches s'effectuent encore essentiellement sur la production des protéines unicellulaires à partir de substrats carbonés simples (hydrocarbures alcanes, paraffines, alcools, sucres, amidon hydrolysé) additionnés d'une source d'azote organique ou minéral (5, 7, 8). Très rares sont encore les recherches sur la production des protéines à partir de substrats celluloseux, réputés difficiles à utiliser par les bactéries, et sans addition d'azote (1, 9). C'est l'objet de notre étude, qui emploie par ailleurs des techniques différentes de celles généralement utilisées (fermentation non continue, microflore hétérogène, récolte par décantation) susceptibles d'abaisser considérablement les coûts de production.

MATERIEL & METHODES

MATERIEL

Substrat : Le substrat à fermenter est constitué par la coque d'arachide, résidu du traitement industriel de l'arachide au Sénégal*. Cette coque est constituée essentiellement par l'enveloppe ligno-cellulosique de la graine et parfois quelques résidus de la graine elle-même ("son d'arachide") riches en azote.

* Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires B.P. 2057 DAKAR.

† Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux 10, rue P.CURIE
94 700 MAISONS ALFORT

L'analyse bromatologique de cette coque* est donnée au tableau n°1 , pour en permettre la comparaison directe avec le produit résultant de sa fermentation microbienne.

Fermenteur : Le fermenteur utilisé est du type silo (fermentation discontinue) à paroi métallique ou bétonnée. L'ouverture supérieure doit être assez large pour changer rapidement des quantités importantes de coque mais pouvoir être hermétiquement ^{fermé} (avec soupape d'échappement des gaz). La phase liquide du produit fermenté doit pouvoir être soutirée par la partie inférieure du silo, après presse ^{de la phase} solide fermentée qui est elle-même évacuée par l'ouverture supérieure.

Microbes utilisés : Contrairement à la plupart des procédés actuels de production des protéines unicellulaires, nous n'utilisons pas de souche bactérienne pure, évitant ainsi d'avoir à stériliser préalablement le substrat. Après de nombreux essais (faisant surtout appel à des bactéries du rumen), la microflore nous ayant donné les meilleurs résultats s'est avérée être celle qui est naturellement présente au sein de la coque d'arachide. Cette flore s'est probablement développée et sélectionnée elle-même au cours du stockage des graines d'arachide. Elle présente les caractéristiques générales suivantes, très stables d'un échantillon à l'autre :

- ± Nombre total des bactéries (après 48 h. d'incubation à 37° du mélange: coque 25, eau 75, ClNa 0,7) : $10^7 \times 9 \pm 2,1$ bact./ml
- ± Composition de la flore bactérienne : Cocci : 26 % \pm 7,2 %
Bacilles 72 % \pm 6,9 %. Autres : 2 % \pm 0,8 %
Bactéries à coloration "Gram négative" : 62 % \pm 6,3 %
Bactéries à coloration "Gram positive" : 38 % \pm 5,7 %
- ± Principaux métabolites apparus au cours de la fermentation :
Ammoniac : 52,55 mg/litre \pm 12,3 Acide acétique : 0,325g/l \pm 0,12
Acide propionique : 0,085 \pm 0,003 Acide butyrique : 0,205 \pm 0,012

* Cette coque est en partie brûlée pour fourniture d'énergie à l'huilerie. Le reste (50 à 80 %) est jeté, ou parfois récupéré pour l'alimentation des ruminants ou l'épandage sur les champs.

METHODES

• Fermentation

Les méthodes de fermentations microbiennes industrielles sont très variées, mais font généralement appel à la technique dite de "culture continue" c'est-à-dire qu'apport des substrat et soustraction du produit formé se font sans arrêter le processus de fermentation. Malgré son rendement inférieur nous avons préféré utiliser la méthode de fermentation discontinue, de type "ensilage", du fait de son moindre coût (installation, fonctionnement, entretien). Cette méthode ne permet donc qu'une cellulolyse partielle, et pourrait être améliorée.

Pour initier la fermentation spontanée de la coque d'arachide, il suffit :

1°/ de la réhydrater. Cette réhydratation se fera de préférence avec de l'eau contenant 6 à 7 p.1000 de chlorure de sodium * rajoutée dans la proportion de trois parties pour une de coque d'arachide.

2°/ De l'exposer à une température de 30 à 40°. Cette température peut être obtenue, au Sénégal, par simple exposition au soleil durant le mois de mai à septembre.

• Récupération des protéines

Après 48 heures de fermentation, la coque est pressée, débarrassée de sa phase liquide, et rejetée. Cette phase liquide est alors décantée 48 heures, le surnageant rejeté et le culot récupéré. Ce culot, qui se présente sous forme d'une boue marron d'odeur aromatique, est desséché en étuve ventilée à 40°. Après cette dessiccation, il ne contient plus que $10^4 \times 8 \pm 7,2$ bactéries revivifiables par gramme. Il s'agit donc d'un mélange des éléments solubles (ou de micro-éléments figurés) présents initialement dans la coque, auxquels sont ajoutés les résidus des corps bactériens qui valorisent les précédents.

* En effet, le rendement de la fermentation mesurée par la quantité d'acides gras volatils formés, est accru de 30 à 40 p.100 lorsqu'on rajoute le chlorure de sodium. Cette eau salée à 7 p.1000 peut être remplacée par de l'eau de mer, diluée à 20 p.1000.

RESULTATS

La valeur du produit résultant d'une culture destinée à l'obtention de protéines unicellulaires est actuellement bien définie (3-7) par la détermination d'un certain nombre de critères qui sont notamment :

- 1 - Le rendement global de la culture (poids du produit final/poids du substrat)
- 2 - Le taux des différents constituants chimiques ou biochimiques du produit (original et final)
- 3 - La composition en acides aminés
- 4 - La digestibilité, le coefficient d'efficacité protéique ("Protein efficiency ratio") et l'utilisation protéique nette ("Net protein utilisation")
- 5 - La recherche des toxines
- 6 - La valeur alimentaire pour l'animal.

En ce qui concerne le produit obtenu par les procédés décrit précédemment, ces critères ont été ainsi évalués :

1 - Rendement : Le rendement d'une production de protéines unicellulaires est défini par la quantité (en kilogramme) de matière sèche ("biomasse") obtenue, par kilogramme de substrat employé pour l'obtenir.

Dans nos expériences, la moyenne des quantités de matières sèches obtenues était de 180 ± 12 grammes pour 20 kg de coque d'arachide, soit un rendement moyen de 0,905 p.100.

Ce rendement est donc proche de celui/pour les protéines unicellulaires cultivées sur parafines (3).
obtenu

2 - Taux des différents constituants, chimiques ou biochimiques, du produit obtenu et du substrat de production

Pour plus de clarté nous ferons figurer sur le même tableau, l'analyse du substrat (coque d'arachide) et du produit final :

.../...

TABLEAU I

Proportion (p.100 de matière sèche) des différents éléments dans la coque d'arachide et dans le culot desséché obtenu après fermentation *

Eléments dosés	Coque d'arachide (substrat)	Culot desséché de fermentation (produit final)
Matières protéiques brutes	8,11	23,96
Cellulose	40,80	14,90
Matières grasses	2,04	10,07
Matières minérales totales	2,41	18,69
Extractif non azoté	46,64	32,38
Insoluble chlorhydrique	0,44	4,42
Calcium	0,15	0,27
Phosphore	0,054	0,225
Magnésium	0,12	0,19
Potassium	0,72	1,21
Humidité	7,95 p.100	5,75 p.100

Remarque :

1/ Ces chiffres concernent l'analyse d'un produit obtenu au mois de décembre. Les chiffres se rapportant à des produits obtenus au cœur de la saison chaude (juin à septembre) sont différents. En particulier la teneur en matières protéiques brutes peut s'élever alors à $38,5 \pm 4$ p.100, chiffre observé également lorsqu'on opère en étuve à 37°.

* Analyse laboratoire I.E.M.V.T. - 94 700 MAISONS ALFORT (France).

2/ Ces chiffres peuvent être rapprochés de ceux rapportés par W.D.BELLAMY(1) à partir de déchets cellulosiques :

Produit original : 23 à 38 p.100 de cellulose - 10 à 18 p.100 de matières protéiques brutes - 2 à 5 p.100 de matières minérales totales.

Produit final : 6 à 30 p.100 de cellulose - 30 à 55 p.100 de matières protéiques brutes - 2 à 3 p.100 de matières minérales totales.

La teneur en matières minérales totales est faible comparée à celle obtenue avec la coque d'arachide, très chargée en poussières : une dépoussiérage préalable de cette dernière devrait permettre de ramener cette teneur à des proportions acceptables.

3/ Composition en acides aminés : elle est figurée au tableau II.

TABLEAU 2

Composition en acides aminés essentiels exprimés en pourcentage de la matière protéique *

Acide aspartique.....	8,76	Méthionine.....	0,80
Thréonine	2,79	Isoleucine	7,52
Sérine	3,23	Leucine	6,37
Acide glutamique.....	11,55	Tyrosine	3,63
Proline.....	9,60	Phénylalanine	4,82
Glycine	9,19	Ornithine	0,40
Alanine	5,22	Lysine	5,26
Valine	4,95	Histidine	2,70
Cystine	1,33	Arginine	9,73

* Analyse laboratoire I.E.M.V.T. - 94 700 - MAISONS ALFORT (France)

On peut déduire de ce tableau :

1/ La classe chimique (indice chimique) de la protéine

$$= \frac{\text{Concentration en cystine + méthionine}}{\text{Concentration en cystine + Méthionine de l'œuf}} \times 100 = \frac{2,13}{6,05} = 35,2$$

c'est-à-dire un indice égal à celui du blé. Les acides aminés soufrés (méthionine principalement) sont considérés comme les acides aminés limitants.

2/ L'indice des acides aminés essentiels d'OSER = 72,1, ce qui correspond à une protéine de valeur moyenne, mais supérieure à la plupart des protéines végétales.

4/ La digestibilité, le coefficient d'efficacité protéique et l'utilisation protéique nette *

Cette recherche est ordinairement effectuée sur rats. Mais compte tenu de la forte teneur en matières minérales et de la teneur relativement élevée en cellulose cet animal éprouve des difficultés à s'adapter à une ration contenant des taux importants du produit à tester. C'est pourquoi, seul le coefficient de digestibilité apparent de l'azote a pu être déterminée : il est de 17,3 (valeur faible, car il s'agit de protéines bactériennes).

5/ Recherches de toxines bactériennes ou de mycotoxines

Cette recherche a été faite "in vivo" et "in vitro".

a) In vivo : des souris, des rats et des poulets ont reçu dans leur ration des taux variant de 10 à 30 p.100 du produit à tester durant une période minimum de 30 jours. Ni troubles pathologiques, ni mortalités n'ont été observés chez ces animaux durant ces essais.

b) In vitro : Le produit liquide, résidu de fermentation contient 6 espèces différentes d'Aspergillus, Absidia corymbifera, Mucor sp et Cladosporium sp. Après dessiccation à 80°, seul ce dernier genre est retrouvé dans le produit.**

Aucune bactérie pathogène ou toxigène n'a pu être mise en évidence par les techniques classiques.

* Nous remercions vivement le Docteur M. NDIAYE, Directeur de l'Organisme de Recherches sur l'Alimentation et la Nutrition Africaine à Dakar, qui a bien voulu effectuer ces mesures.

** Analyse Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie de l'INRA - 31 300 - Toulouse (France).

6/ Valeur alimentaire pour les volailles

Afin d'apprécier la valeur alimentaire des protéines contenues dans le produit étudié, nous l'avons incorporé, en substitution à des taux variables au tourteau d'arachide, dans des rations destinées à des poussins de huit jours (lot de 12 individus).

La croissance pondérale de ces poussins a été comparée durant 30 jours à celle de sujets témoins (lot 2) recevant une ration de composition suivante :

. farine de maïs	: 25 p.100	. farine de sorgho	: 26 p.100
. son de remoulage	: 18 p.100	. farine de poisson	: 9 p.100
. carbonate de chaux	: 1,2 p.100	. chlorure de sodium	: 1,2 p.100
. mélange polyvitaminé	: q.sp.100	. complément protéique :	
		tourteau d'arachide	: 20 p.100

N.B. - Ce complément protéique varie selon les lots (voir tableau n°3), la proportion des autres composants étant ajustée en conséquence.

Les résultats sont les suivants :

Tableau n°3

Lots	1	2	3	4
Complément protéique	Néant	Tourteau d'arachide 20 p.100	Produit à tester 20 p.100	Produit à tester 33 p.100
Gain de poids moyen quotidien	6,55 g	10,66 g	8,6 g	5,51 g
Quantité d'aliment consommé par jour	19,14 g	29,51 g	23,96 g	14,48 g
Indice de consommation (g d'aliment par g de poids)	2,92 g	2,76 g	2,78 g	2,62 g

Les poussins consomment donc moins d'aliment lorsqu'il y est incorporé plus de produit à tester, quoique leur indice de consommation ^{ne} soit pas significativement différent. Cette sous-consommation tient ~~probablement~~ à l'encombrement

relatif plus élevé de la ration, qui freine l'appétit des volailles.

L'autopsie des volailles en expérience ne révèle aucune différence par rapport aux témoins, non plus que les caractères organoleptiques de leur chair.

DISCUSSION

Les différents analyses réalisées sur le produit résiduel de la coque d'arachide fermentée permettent, par leur résultat, de la comparer favorablement à la moyenne des protéines unicellulaires bactériennes obtenues par d'autres méthodes. Toutefois, il convient de bien remarquer que le produit analysé est brut c'est-à-dire contient un mélange de protéines bactériennes et de certaines protéines solubles déjà présentes dans la coque d'arachide.

Les essais préliminaires de valeur alimentaire effectués sur volailles donnent des résultats très proches de ceux obtenus avec d'autres protéines d'origine microbienne, en particulier celle du microchampignon Fusarium gramineum testées par I.F. DUTHIE (9). Ce dernier auteur notait une baisse de consommation (donc de gain de poids) de 12 à 18 p.100 lorsque le taux d'incorporation de la protéine microbienne atteint 30 p.100 : cette baisse s'annule lorsqu'on réduit le taux d'incorporation à 10 p.100, pour un indice de consommation (= "Feed conversion ratio") égal à celui des témoins.

Par analogie, il conviendrait donc, dans les cas des protéines obtenues sur coque d'arachide fermentée :

1. D'accroître la teneur en matières protéiques brutes (on peut atteindre 35 p.100 en effectuant les fermentations durant la saison sèche).
2. De réduire le taux d'incorporation à 10 p.100.

Dans ces conditions, et compte tenu du très faible coût de la protéine (de 60 à 80 p.100 inférieur à celui du tourteau), l'utilisation du produit de fermentation de la coque d'arachide pourrait s'avérer rentable.

.../...

CONCLUSION

La fermentation spontanée de la coque d'arachide, réhydratée par de l'eau salée et exposée à la chaleur tropicale, permet la multiplication d'une abondante flore bactérienne. Une partie de cette flore, recueillie par simple décantation avec des résidus du substrat, peut être considérée comme une source éventuelle intéressante de protéines unicellulaires pour les volailles.

Les résultats des différentes analyses chimiques, biochimiques et toxicologiques ainsi que ceux des essais "in vivo" sur animaux, permettent de penser que ces protéines pourraient être incorporées à des aliments destinés aux volailles. L'intérêt majeur de la production de telles protéines reste leur prix de revient faible, le matériel de production étant très sommaire et le substrat utilisé ayant une valeur commerciale nulle.

RESUME

La coque d'arachide, réhydratée à 300 p.100 en eau salée à 7 p.1000, dans une enceinte exposée 48 heures au soleil, permet le développement d'une abondante microflore. Le filtrat, sédimenté, de ce mélange renferme de 24 à 38 p. 100 de matières protéiques brutes, et un mélange d'acides aminés essentiels dont l'indice d'OSER est de 72,1.

Ce sédiment, desséché, ne s'est pas montré toxique "in vivo" pour le rat ou les volailles.

Incorporé à des taux variant de 20 à 33 p.100 à la ration de ces volailles, il réduit leur consommation, donc leur gain de poids, mais leur conserve l'indice de consommation observé avec une ration contenant du tourteau d'arachide.

Le coût de production de ces protéines, avec les méthodes utilisées, est inférieur à ceux des autres procédés actuellement employés en matières de protéines unicellulaires.

.../...

SUMMARY

SINGLE CELL PROTEIN PRODUCTION FROM PEANUT HULLS

When peanut hulls rehydrated (300 %) in salt water (7°/°°) are left in a tank during 48 hours under tropical sun an important bacterial celled growth occurs. The bulk of this mixture, after filtration, contains 24 to 38 % of protein with an amino-acids OSER index of 72,1.

Dried, this product ^{proved} atoxic for rats and poultry.

When incorporated in chicken feed, at 20 to 33 % levels average feed intake and body weight gains are reduced, but feed conversion ratio is still the same that in controls fed with equivalent levels of groundnut cake.

Production costs, with described methods, are lower than others usual single cells protein processings.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BELLAMY (W.D.) - Single cell proteins from cellulosic wastes. *Biotech. and Bioeng.* 1974, 16 (7) : 869-880.
- 2 - BOMBAL (J.), NDIAYE (L.), FERNADJI (F.), FERRANDO (R.) - Concurrence des protéines conventionnelles et des protéines non conventionnelles. *Rev. Elev. Méd. vét.*, 1974, 125 (4) : 469-491.
- 3 - DAVIS (P.) - Single cell Protein. *Proceedings of the international Symposium Rome 1973.* Academic Press London, N.Y., S.F., 1974.
- 4 - DREYFUS (A.) - Etude de la production de protéines d'organismes unicellulaires à partir du manioc. *DFA de microbiologie. I.R.C.H.A. 91710 Vert-Le-Petit (France)*, 1975.
- 5 - FERRANDO (R.) - Au sujet des protéines unicellulaires et de leur nomenclature. *Ann. Hyg. L. Fr. Méd. et Nut.* 1974, TX (4) : 347-349.
- 6 - JACQUET (J.) - Sur le domaine de la microbiologie alimentaire. *C.R. Acad. Agr.* 1967 (7) : 503-514.
- 7 - LICHTFIELD (J.H.) - The facts about food from unconventional sources. *Chem. Proc.* 1974, 20 (9) : 11-18.
- 8 - SENEZ (J.C.) - Acquisitions et perspectives économiques de la microbiologie du pétrole. *Bull. Inst. Pasteur*, 1969, 67 (8) : 1771-88.
- 9 - TANNENBAUM (S.R.), WANG (D.I.C.) - Single cell protein II. M.I.T. Press, Cambridge London, 1975.