

5/92

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة الجامعات والبحث العلمي  
Ministère aux Universités et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

الدرسة الوطنية للتكنولوجيا  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT **GENIE DE L'ENVIRONNEMENT**

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

Hydrolyse Enzymatique des  
Déchets Solides d'Abattoirs

Proposé par :

M<sup>me</sup> ABDI

Etudié par :

A. FOUJIL

Dirigé par :

M<sup>me</sup> MAMERI

PROMOTION 92.

E.N.P. 10, Avenue Hacén Badi El-Harrachi - Alger

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة الجامعات والبحث العلمي  
Ministère aux Universités et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT **GENIE DE L'ENVIRONNEMENT**

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

**Hydrolyse Enzymatique des  
Déchets Solides d'Abattoirs**

Proposé par :

**M<sup>m</sup> ABDI**

Etudié par :

**A. FOUJIL**

Dirigé par :

**M<sup>m</sup> MAMERI**

PROMOTION **92**

## الهضم الأنزيمي لنفايات المذاح

الهدف من هذا المشروع، التخلّص من نفايات  
المذاح بن طريق تقنية الهضم الإصطناعي  
وتحويلها إلى مضاف غذائي للحيوانات

### Hydrolyse enzymatique des déchets solides d'abattoirs

Cette étude consiste en la récupération et la valorisation des déchets solides d'abattoirs, par la technique de digestion artificielle, en vue de les transformer en additifs alimentaires.

### Enzymic hydrolysis of Solide Wastes Products Of Abattoirs

This studie consists in recouping and valorising solide waste products of abattoirs by artificial digestion in ordre to make with an alimentary additiv

Dedicaces

A mon pere .  
A mes meres .  
A mes freres et soeurs .

A Djacouba

Et a tous ceux qui m'aiment .

je dedie ce travail .

### Remerciement

Nous remercions , pour leur grande aide , M<sup>r</sup>. et M<sup>me</sup> MAMEFI pendant la réalisation , la rédaction et l'exposé de ce travail , en tant que Chef du labo et promotrice , puis en tant que membres de jury .

Merci à madame APDI ma première promotrice , qui m'a le plus aidé .

Merci à tous mes amis qui m'ont aidé matériellement et moralement jusqu'à la dernière seconde de préparation de ce memoire : je citerai Kouki, Khaled , Abcen , Djacouida , et ma sœur Malika .

Nous tenons aussi à remercier , de L'Ecole Nationale Veterinaire.

Madame SELLAMI et M<sup>r</sup> ZOUAMPI , je <sup>leur</sup> dois tout mon travail , pour m'avoir donnée l'espoir de réussir mon projet .

Merci à M<sup>r</sup> CHERGUI pour tous ses conseils et son aide .

Nombreux sont ceux qui m'ont aidé. Que ceux que je n'ai pas cité ne m'en veuillent pas .

## Errata

Localisation de l'erreur			Erreur	Correction
Page	Paragraphe	ligne		
1	3	4	noséabonds	nouséabonds.
4	1	2	équivalant à celle..	équivalant celle..
6	1	2	tripiers- boy diers	tripiers- boyaudiers.
8	1	1	pas de référence	référence [41].
8	2	4	entremets	entremets.
15	Dernier	-	pas de référence	référence [34].
33	1	4	peuvent en modifier l'équilibre.	peuvent en modifier la vitesse.
36	-	14	voir figure	voir figure ci après.
47	2	2	KOH ( $10^{-6}$ )	KOH ( $10^{-6}$ N).
48'	figures 10 et 11		pas de température	à température de 24°C
49'	figure 12		pas de PH	à PH. 8.
50'	figure 13		pas de température	à température de 50°C
52'	figure 14 (ordonnés)		Concentration en protéines	Concentration en peptides.
53'	figures 15 et 16		en ordonnées : absorbance en abscisses : concentration	Concentration en protéines hydrolysées (g/l) temps (minutes).
54	dernier	dernière	sur les figures 16	sur la figure 16.
56	1	5	EIS de 15% et préférable	EIS de 15% est préférable

57'	figure 17 - titre :		Variation de la concentration en $f_{\text{ct}}$ du temps	Variation de la concentration en peptides en $f_{\text{ct}}$ du temps.
57''	figure 18 - titre :		Variation de la concentration en $f_{\text{ct}}$ du temps	Variation de la concentration en acides aminés en $f_{\text{ct}}$ du temps.
60	Interpretation	4		(voir figure 20)
60'	figure 20		en ordonnées : absorbance  abscisses : concentration	concentration en protéines hydrolysées (g/l)  temps (heures).
61	2	1-2-3	pour une première réalisation ... jusqu'à ... : digestion artificielle	Pour une première réalisation, nous obtenons une approche des résultats qui peuvent être améliorés en appliquant le principe de digestion artificielle.

Classification des principaux acides aminés selon leur groupement fonctionnel.

Valeurs des pI et pK

المركز الوطني المتعدد التخصصات  
BIBLIOTHÈQUE  
Egypte Nationale  
1-110

Autre fonction	Acides aminés	Formule	pH I	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	pK <sub>4</sub>
Acide COOH	Acide Aspartique	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	2,97	2,10	3,76		9,82
	Acide Glutamique	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	3,08	2,10	4,07		9,47
Amine carbonée Simple	Glycine (Gly)	$\text{H}-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	6,06	2,35	9,77		
	Alanine (Ala)	$\text{CH}_3-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	6,10	2,35	9,77		
	Valine (Val)	$\text{CH}_3 \begin{matrix} \diagup \\ \text{CH}-\text{CH} \end{matrix} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	6,00	2,28	9,72		
	Isoleucine (Ileu)	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$   CH <sub>3</sub>	6,04	2,32	9,76		
	Leucine (Leu)	$\text{CH}_3-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$   CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	6,04	2,33	9,75		
Alcool -OH	Serine (Ser)	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	5,68	2,21	9,15		
	Thréonine (Thr)	$\text{HO}-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$   CH <sub>3</sub>					
Noyau aromatique	Phénylalanine (Phe)	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	5,91	2,58	9,24		
	Tyrosine (Tyr)	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	5,63	2,20	9,11		
	Tryptophane (Trp)	$\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	5,72	2,38	9,33		
Sulfurés -S	Cystine (cys)	$\text{HCOO} \begin{matrix} \diagup \\ \text{CH} \end{matrix} \text{CH}_2-\text{SS}-\text{CH}_2 \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$   H <sub>2</sub> N	5,02	1,04	2,05	8	10,25
	Cysteine	$\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$					
	Méthionine (meth)	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	5,74	2,28	9,21		
Amide $\text{H}_2\text{N}-\text{C} \begin{matrix} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{matrix}$	Asparagine (ASP)	$\text{H}_2\text{N}-\text{C} \begin{matrix} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{matrix} -\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$					
	Glutamine	$\text{H}_2\text{N}-\text{C} \begin{matrix} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{matrix} -(\text{CH}_2)_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$					
Autre NH	Histidine (His)	$\text{N} \begin{matrix} \diagup \\ \text{H} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{matrix} -\text{C} \begin{matrix} \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{matrix} -\text{CH}_2-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	7,64	1,77	6,10		9,17
basique autre NH <sub>2</sub>	Lysine (Lys)	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{COOH} \end{matrix}$	9,47	2,12	2,95		10,53
	Arginine (Arg)	$\text{HN}=\text{C} \begin{matrix} \diagup \\ \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{NH} \end{matrix} -(\text{CH}_2)_3-\text{CH} \begin{matrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$	10,76	2,01	3,04		11,48
	Proline	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$	6,3	2,00	10,60		



Sommaire

Sommaire

Intoduction..... 1

Première partie: Partie théorique

**CH-I-Considérations générales..... 3**

    I-Généralités..... 3

    II-Les différentes possibilités de valorisation..... 7

        1-Récupération et valorisation du sang..... 7

        2-Valorisation des os et des peaux..... 8

        3-Compostage des déchets d'abattoirs..... 9

        4-Utilisation des sous-produits pour l'alimentation  
            des animaux de compagnie..... 10

        5-Farine de viande..... 11

        6-Production de protéines hydrolysées..... 12

        7-Valorisation du 5<sup>ème</sup> quartier/Production de  
            l'héparine..... 12

            7-1-Valorisation des hydrolysats..... 12

            7-2-séparation des particules en suspension..... 14

                7-2-1-Centrifugation ou floculation..... 14

                7-2-2-Séparation par Ultrafiltration..... 14

            7-3-Valorisation par récupération des amino-acides... 15

**CH-II-Digestion naturelle des protéines..... 16**

    I-Protéases du suc gastrique..... 16

    II-Protéases du suc pancréatique..... 17

        II-A-Endopeptidases..... 18

            1-La trypsine..... 18

            2-La chymotrypsine..... 19

3-L'elastase.....	23
4-La collagenase.....	24
II-B-Exopeptidases.....	24
1-La carboxypeptidase A.....	24
2-La carboxypeptidase B.....	25
3-La leucine-amino-peptidase.....	26
CH-III-Rappels de biochimie.....	27
I-Les protéines.....	27
1-Structure.....	29
2-Denaturation.....	29
3-Critères de dénaturation.....	30
4-Quelques exemples de protéines.....	30
II-Les enzymes.....	30
1-Classification.....	31
2-Caractéristiques de la réaction enzymatique.....	31
3-Specificité de la réaction enzymatique.....	33
4-Mecanisme de la catalyse enzymatique.....	33
III-Cinetique élémentaire des réactions enzymatiques à un seul substrat.....	36
1-Influence de la concentration en enzyme.....	37
2-Influence de la concentration en substrat.....	37
3-Hypothèse de Michaelis-Menten.....	38
3-1-Constante de Michaelis ( $K_m$ ).....	39
3-2-Equation de Michaelis-Menten.....	39
3-3-Méthodes de détermination de $K_m$ .....	40
4-Aberration des cinétiques Michaeliennes.....	41
5-Influence des agents physiques sur la cinétique..	43
5-1-La température.....	43
5-2-Le pH.....	43

Sommaire

Deuxième partie : Partie expérimentale

Introduction.....	44
I-Extraction de la pancréatine brute.....	46
1-Activation de l'extrait pancréatique.....	46
2-Préparation des solutions enzymatiques.....	47
II-Recherche des conditions optimales.....	47
1-Recherche du pH optimal d'activation .....	47
2-Recherche de la température optimale.....	49
3-Recherche du pH optimal d'action.....	50
III-Essai d'hydrolyse par la pancréatine brute.....	52
1-Essai d'hydrolyse des déchets solides d'abattoirs par la pancréatine brute.....	52
2-Etude cinétique de l'hydrolyse .....	56
IV- Essai de digestion artificielle.....	60
<hr/>	
Conclusion.....	62
<hr/>	
Annexe.....	63
I-Réaction du Biuret.....	63
II-Réaction colorée à la ninhydrine.....	64
III-Résultats des expériences.....	66
<hr/>	
Bibliographie.....	70

## INTRODUCTION

### INTRODUCTION

"Les abattoirs ont toujours fait partie des établissements dangereux, insalubres et incommodes dont la puissance publique doit assurer le fonctionnement dans des conditions compatibles avec la protection de l'environnement."

\* Décret Impérial Français  
du 15 octobre 1810 \*

Dans le cas où l'on parle d'une "Industrie de viande", l'on parlera alors d'une concentration industrielle résultant de la disparition des petits abattoirs et s'accompagnant de la manifestation plus évidente de pollution, d'inconvénients ou de risques qui étaient occultes auparavant.

Nous serons alors arrivés au stade de la "civilisation des déchets" dont le volume s'accroît de façon exponentielle avec le niveau de vie et dont les nuisances peuvent affecter d'une façon considérable la salubrité de l'environnement, du fait qu'ils sont de nature organique pouvant être putréfiés et constituer ainsi un siège de prolifération de germes pathogènes et un abri aux animaux indésirables qui y trouvent leur nourriture et qui sont vecteurs de nombreuses maladies: les chiens peuvent transmettre la rage; les poux et les tics; le typhus; l'urine des chiens peut transmettre l'hépatite virale; les rats peuvent apporter la typhoïde, la salmonélose, la dysenterie et la peste; les mouches et les cafards peuvent apporter le choléra et le trachome ...

Mais ne serait-il pas suffisant que l'accumulation des déchets constitue un encombrement désagréable à regarder et que les processus de fermentation entraînent la formation de liquides et de gaz <sup>ou</sup> nuisibles, pour insister sur la nécessité d'éliminer cette pollution?

Il est donc entendu qu'il faudra se débarrasser de ces déchets.

## INTRODUCTION

Mais de quelle manière le ferait-on ?

En matière d'environnement, il faudra toujours, selon les cas, penser à la filière de traitement la moins coûteuse et la plus rentable, si possible (valorisation).

De manière générale, il n'est pas nécessaire d'investir dans des installations trop sophistiquées, dans la mesure où les règles d'hygiène sont respectées, la solution la plus simple reste la meilleure.

Parmi la variété des solutions, nous avons choisi d'étudier l'"Hydrolyse Enzymatique" des rejets solides d'abattoirs :

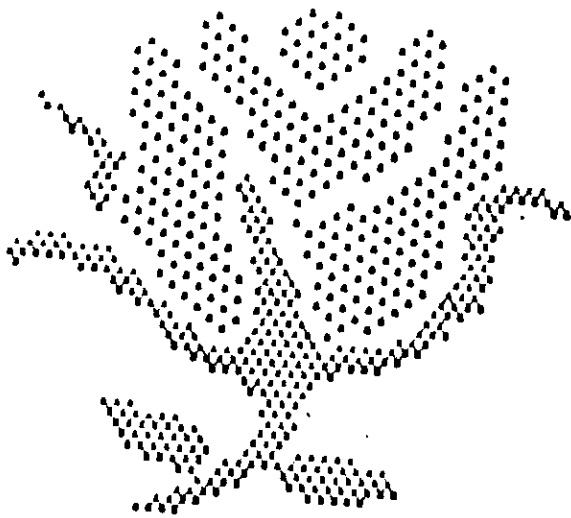
A partir de blocs de viandes abats & déchets de viandes congelés, broyés puis soumis à une hydrolyse enzymatique puis une décantation, filtration et concentration, on obtient les peptones d'abattoirs dont le prix est neuf fois plus petit que celui des peptones de caséine. Ces peptones seront recyclés dans l'alimentation du bétail.

Ainsi, on aura à la fois lutté contre la pollution et valorisé les déchets en alimentation animale. D'où un intérêt économique et écologique important.

□ □ □ □ □

1<sup>ère</sup> partie :

Partie théorique



CH-I-CONSIDERATIONS GENERALES

## CH-I-CONSIDERATIONS GENERALES

- I -GENERALITES:

la gestion d'un abattoir fait partie d'un tout, la protection de l'environnement et la valorisation des sous produits peuvent lui permettre de diminuer les charges qui lui incombent. Le 5<sup>ème</sup> quartier est une mine de protéines. Oui mais les installations coûtent cher et demandent une main d'oeuvre qualifiée. C'est cela qui crée le cercle vicieux dans lequel sont impliqués nombreux abattoirs, surtout dans les pays pauvres: pour réduire les charges il faut récupérer et valoriser les déchets: et pour faire cela, il faut investir dans des installations coûteuses et augmenter ainsi la charge initiale.

Ne trouvant pas une sortie de ce cercle, les pays pauvres continuent à importer du concentré alimentaire pour leurs animaux et jeter la mine de protéines à la décharge.

Mais si ces pays connaissent cette forme de gaspillage, la crise de l'énergie et le renchérissement des matières premières vont les obliger à retrouver les principes ancestraux d'économie et, tenant compte des acquisitions scientifiques et des développements technologiques, à obtenir une valorisation de ces sous-produits et déchets, pour le moment sans valeur, et permettre de combler ainsi des pertes énergétiques et financières.

Par ailleurs, si cette mine de protéines qu'est le 5<sup>ème</sup> quartier, n'est pas récupérée, outre la perte économique, on exposera la nature à un grand danger de pollution: 1l de sang répandu dans le milieu naturel (surtout effluent) entraîne une pollution égale à celle causée par deux habitants et par jour en



## CH I

## Généralités

France, 100 000 t de sang sont jetées annuellement et entraînent une pollution équivalant à celle d'une ville de 500 000 habitants (et selon certains experts, d'un million d'habitants). Ces simples chiffres montrent l'importance du problème à la fois économique et sanitaire.

les industries de viandes restent ainsi la branche industrielle la plus polluante et il est dans l'intérêt des états dont la politique reconquête de la qualité des milieux récepteurs et la défense des droits des citoyens à un environnement de qualité, de concerter avec les professionnels, les instructions techniques concernant la prévention des pollutions, nuisances et risques des abattoirs de boucherie pour mettre au point des règles techniques qui doivent être applicables par les commissaires de la république (les préfets) sans fausser les conditions de concurrence et en continuant également à jeter un regard économique sur les conditions de protection de l'environnement.

En ce qui concerne les possibilités de valorisation des déchets, il existe une source d'apport non négligeable pour l'alimentation animale et même l'alimentation humaine, représentée par les sous-produits du 5<sup>ème</sup> quartier, sang, corps gras, déchets animaux (certains abats, cuirs, arçons, cornes, plumes, os, glandes, tissu conjonctif, etc.).

Notons tout d'abord que les nouvelles technologies proposées, les transformations envisagées, ne seront à prendre en considération que si elles sont poursuivies par des études économiques permettant d'établir la masse de matières premières disponibles et la répartition des approvisionnement utilisables afin de préparer les réalisations industrielles et la mise sur le marché de produits transformés, vendus à des prix compétitifs.

Les déchets qui se prêtent à la production de sous-produits varient beaucoup en qualité et en quantité, d'un pays à l'autre.

Généralement, on entend par "déchets d'abattoirs", les déchets produits par suite des opérations d'abattage et d'exploitation

de l'abattoir [ 36 ] . Ils sont grossièrement représentés par la différence entre le poids de l'animal sur pieds et son poids en carcasse.

La Fédération nationale Française des collectivités locales propriétaires d'abattoirs publics a établi un tableau définissant les principaux éléments du 5<sup>e</sup> quartier (voir tableau 1) [39].

Un tableau établi par J.C Ferentz [37 ] donne une représentation des différents sous produits ainsi que leurs poids et le pourcentage de chaque composant par rapport au total des éléments du 5<sup>e</sup> quartier (voir tableau 2).

Tableau 1 - LES PRINCIPAUX ELEMENTS DU 5<sup>e</sup> QUARTIER - [39]

Classification	Stabulation et abattage	Préparation de la viande Triperie-Bovauderie
ABATS Abats blancs	Pieds de veaux ou de porc têtes - museaux - joues matrices, mamelles estomacs.	intestins Panses et feuilletés estomacs
Abats rouges	Langues	foies - rognons - coeurs - rates poumons ris de veaux ou d'agneaux - cervelles
ISSUES A haute valeur	sang de porc - veaux	caillettes, glandes - gras de rognons, suifs, os
Déchets solides pâteux ou liquide	fumier litière, sang de bovins, cornes, onglons crins, poils, sciende porcs, oreilles, queues	matière stercorale - contenu des intestins viandes saisies

Tableau(2)

[ 37 ]

ème  
Présentation et importance des éléments du V<sup>ème</sup> quartier

			Poids Kg -		‰ du V <sup>ème</sup> quartier	
			veau	G.B	veau	G.B (****)
LES ABATS	les abats rouges 27% veau 25% G.B	foie	3.25	6-8	6	4
		cœur	0.92	2-3	1.7	2
		rate	0.40	0.7	0.75	0.4-0.6
		poumons	2.30	4	4.2	33.3
		têtes	5.3	4-5 <sup>(*)</sup>	15.4	3.7
		cervelle		0.5		0.4
		langues		4		3.7
		rognons	-	0.7	-	0.4-0.6
ris (**)	0.73	-	1.4	--		
LES ABATS BLANCS	les abats blancs 23% veau 20-23% G.B	estomac	4.0	15-20	7.9	10-14
		intestins	6.2	8-10	14.4	5-7.5 (***)
		piéds	3.5	12	6.8	7.6
		muscle	-	2	-	1.5
		osnelles	-	-	-	-
LES ISSUES	54% veau 52-55% G.B	cuir	11	30-40	20.3	20-27
		suis	-	5-10	-	5-11
		grande rognon	-	5-12	-	5-7.5
		sang	8.7 <sup>(*)</sup>	12-15	16.2	8-11
		glandes	-	-	-	-
		caillottes	-	-	-	-
		cornes	-	-	-	-
osillons	-	-	-	-		

\*\* Joints dissociés;

\*\* avec pertes non définies;

\*\*\* N'entrent pas dans le V<sup>ème</sup> quartier;

\*\*\*\* avec contenu chez le veau;

\*\*\*\*\* veau: 100 Kg de carcasse;

G.B : 360 Kg de carcasse. — X G.B = Gros-bovin

En ce qui concerne les abats, la plus part des abattoirs s'en préoccupent car les usagers ou les tripiers-boydiens en tirent un important bénéfice surtout lorsqu'ils sont de bonne qualité.

C'est dans la catégorie des issues où un effort important doit être entrepris. La récupération des glandes à usage pharmaceutique ne demande qu'un seul investissement à faire un congélateur, parce que le personnel sur la chaîne d'abattage peut facilement récupérer ces glandes sans que cela implique une surcharge de main d'oeuvre. La dernière catégorie, appelée déchets semble la plus préoccupante. D'une part par ce qu'ils sont générateurs de pollution mais aussi par leur richesse en protéines. Ils peuvent avoir un pouvoir calorifique. On peut en tirer un bénéfice à condition d'étudier le contexte environnant de l'abattage et d'adapter des solutions à chaque cas particulier. D'une part étudier les charges incombant à l'abattoir: du fait de l'évacuation des déchets (bennes, décharges publiques, transport des bennes, etc.) et du fait du coût de la pollution (coût d'épuration pour la station communale...). Si ces charges sont importantes, en valorisant, on fera de sérieuses économies. D'autre part, tous ces produits de par leur contenu et suivant la disponibilité des marchés, peuvent chacun à leur manière être source de gains: ainsi le sang pour ses protéines utiles à l'alimentation du bétail ou bien le fumier et les effluents méthanisables en remplacement du gaz.

Comme on peut le constater, toutes les solutions ne peuvent s'appliquer à tous, et il faut choisir la valorisation la plus adaptée suivant l'opportunité de chacun. C'est ainsi que récupérer le sang des bovins est d'autant plus rentable pour un abattoir spécialisé dans ce domaine, que le compostage est surtout intéressant quand l'abattoir stocke du fumier et des matières stercoraires abondantes. Ceux qui possèdent des congélateurs ont tout intérêt à récupérer les glandes opothérapiques. Il est donc clair que les cas sont multiples et de ce fait, il n'existe pas de solution générale pour tous les abattoirs.

-II-LES DIFFERENTES POSSIBILITES DE VALORISATION :

-1 - RECUPERATION ET VALORISATION DU SANG :

3000 t de sang contiennent autant de protéines que 1000t de tourteau de soja et il se perd chaque année (en France)l'équivalent de 30 000 t de soja [41 ]

Il existe des installations permettant la récupération à partir de la saignée,la séparation éventuelle en plasma et cruor,le traitement du sang entier pour obtenir de la poudre du sang,ensachée sous vide ou encore le maintien du sang en réfrigération.Il est en effet possible de l'utiliser directement en alimentation animale.Dans le tableau 3,on pourra voir les différentes voies de valorisation du sang de bovins.

Tableau 3 [39]

LES DIFFERENTES VOIES DE VALORISATION DU SANG DE BOVINS

TYPE DE COLLECTE	STOCKAGE OU PREPARATION A L'ABATTOIR	EXEMPLE D'ABATTOIRS CONCERNES	TRANSFORMATION	EXEMPLES D'ENTREPRISES CONCERNES	DESTINATION
Sang industriel	cuvé à équarissage		curseur	Equarisseurs	Farine de sang pour aliments du bétail
			déshydratation par surface raclée	Etis DUPRAT	
Sang industriel et effluents d'abattoirs	cuvé réfrigéré	BOURG EN BRESSE	congelé à l'abattoir	BOURG EN BRESSE	aliments pour chiens et chats
		STRASBOURG	par une entreprise	UNISABI	
		LACAUNE	cuit et déshydraté	Sté COCAT	
			incubation centrifugation		farine de protéine pour aliments du bétail
Sang alimentaire	cuvé réfrigéré	PARTHENAY	Atomisation	Sté EUROPROTEINE	Poudre de sang et de plasma pour aliments du bétail
		ST-POL/TERNOISE	Centrifuge-atomisé	VAPRAN	poudre de plasma pour alimentation humaine
		BOURG EN BRESSE	Congélation	COLLECTORGANI	Produits pharmaceutiques et cosmétologiques.
	conservation du sérum ou de plasma de veau	ST JUNIEN	Traitement au laboratoire		Produits pharmaceutiques et vétérinaires
	conservateur chimique E.O.T.A.	CHAMBERY	Déshydratation - pasteurisation - séchage à l'abattoir	Sté VALORI 5	Aliments semi-humides pour porcs à engraisser
	conservateur chimique formol et réfrigération	EDE du Lot et de l'Aveyron			Industrie des bétons cellulaires
conservateur biologique lactates lactiques et sucres solubles	BOURG EN BRESSE FORGES LES LAUX	Fermentation en cuve hermétique	Sté SOULES à l'abattoir	aliment liquide pour porcs à engraisser	

## -2- VALORISATION DES OS ET DES PEAUX :

A partir des os, peaux, tendons et diverses parties non comestibles du 5<sup>ème</sup> quartier on a depuis longtemps préparé les gélatines obtenues par hydrolyse partielle du collagène dans l'eau chaude (après acidulation, séparation du phosphate et chaulage), puis filtrations multiples, concentration dans un évaporateur, figeage sous forme de nouilles et séchage sur tapis mécanique pendant plusieurs heures.

Les gélatines contiennent tous les amino-acides indispensables à l'homme sauf le tryptophane, et sont généralement d'excellente qualité bactériologique. Leurs utilisations sont multiples : citons en alimentation des charcuteries, plats cuisinés, <sup>plats sucrés</sup> entremets, confiseries, les aliments diététiques, la clarification des vins... Une des grandes industries utilisatrices est celle de la photographie, puis la pharmacie (capsules, gélules, ovules...), la cosmétologie, les industries de papier et le collage des cigarettes.

Actuellement en France on développe la production de graisse de moelle d'os pour l'usage capillaire (shampooing en particulier), d'élastine et de collagène soluble, en fin la séparation et la préparation d'acides aminés : à partir des os et peaux : glycine, proline, hydroxyproline, acide glutamique, lysine et méthionine (à partir des plumes).

De nouvelles applications ont été trouvées depuis une vingtaine d'années pour la production et la commercialisation de collagènes obtenus à partir du tissu conjonctif et surtout du derme, utilisant le collagène à l'état natif.

La matière première employée est la peau de veau débarrassée de la kératine, des mucopolysaccharides et des graisses, on obtient des films de 50  $\mu$  d'épaisseur. Les utilisations s'adressent au domaine médical :

- compresses antihémorragiques ;
- poudres à usage chirurgical ;

- pomniades cicatrisantes ;
- films pour pansements (grands brûlés).

En fin le collagène peut servir de support d'enzymes (enzymes greffés ou associés à des glycosaminoglycopes).

### -3-COMPOSTAGE DES DECHETS D'ABATTOIRS :

Les différentes possibilités de compostage des déchets d'abattoirs sont résumées dans le tableau 4 .

Tableau 4 : [39]

#### LES DIFFERENTES POSSIBILITES DE COMPOSTAGE DES DECHETS D'ABATTOIRS

SOUS-PRODUITS	METHODES	UTILISEES EXEMPLES
Matières stercoraires déchets de dégrillage fumier déchets de triperie-boyanderie	compostage lent mise en andains directe - retourne 6 mois à 1 an de fermentation nécessite des surfaces importantes en revanche l'investissement est réduit	Abattoir de Bollac spécialisé ovins abat 5 000 tonnes de carcasse par an  coût de l'opération : 15 000 F/an production de compost : 600 T/an Bénéfice de la vente de précompost : 30 000 F/an
Ajout d'un complément carboné	Compostage aéré mise en andains directe - aspiration ou insufflation d'air pas de malaxage 4 à 6 mois de fermentation nécessite des surfaces importantes - bonne granu- lométrie du complément carboné en revanche, investissement réduit	
Fumier - sang matières stercoraires  déchets de dégrillage graisses de décantation des effluents	Compostage accéléré séjour en stabilisation  insufflation d'air - malaxage mécanique intensif fermentation : 3 à 15 jours de stabilisation et 3 mois de maturation nécessite un investissement élevé avantages : facilité d'insertion en zone urbaine qualité du produit	Abattoir de Castres Abat 12 000 tonnes de carcasse par an coût de l'installation : 2 500 000 F  Production de compost : 1 200 T/an temps de retour de l'investissement : 10 ans économie sur les charges de pollution : 100 000 F/an

#### -4-UTILISATION DES SOUS PRODUITS POUR L'ALIMENTATION DES

##### DES ANIMAUX DE COMPAGNIE :

depuis quelques temps, en Algérie, le marché des aliments préparés pour animaux *familiers*, commence à posséder un fort potentiel de croissance et un débouché intéressant pour les sous produits, mais on ne les exploite toujours pas dans notre pays, alors qu'en France, en 1981, la production d'aliments a atteint les 600 000 t [41]. Tout en espérant y arriver un jour, on signale que dans ce genre de production, tout traitement thermique élevé détruit en partie les qualités nutritionnelles et altère l'aspect, la consistance et le goût de la matière première.

En France, les matières premières d'origine animale utilisées dans ce genre de production avaient, en 1982, les sources suivantes :

viandes et abats :	115000t	:	volailles :	110 000 t
(têtes, pattes, carcasses ,cous, ailes...),			produits de la pêche:	
	18 000 t		[41].	

##### -5-FARINE DE VIANDE :

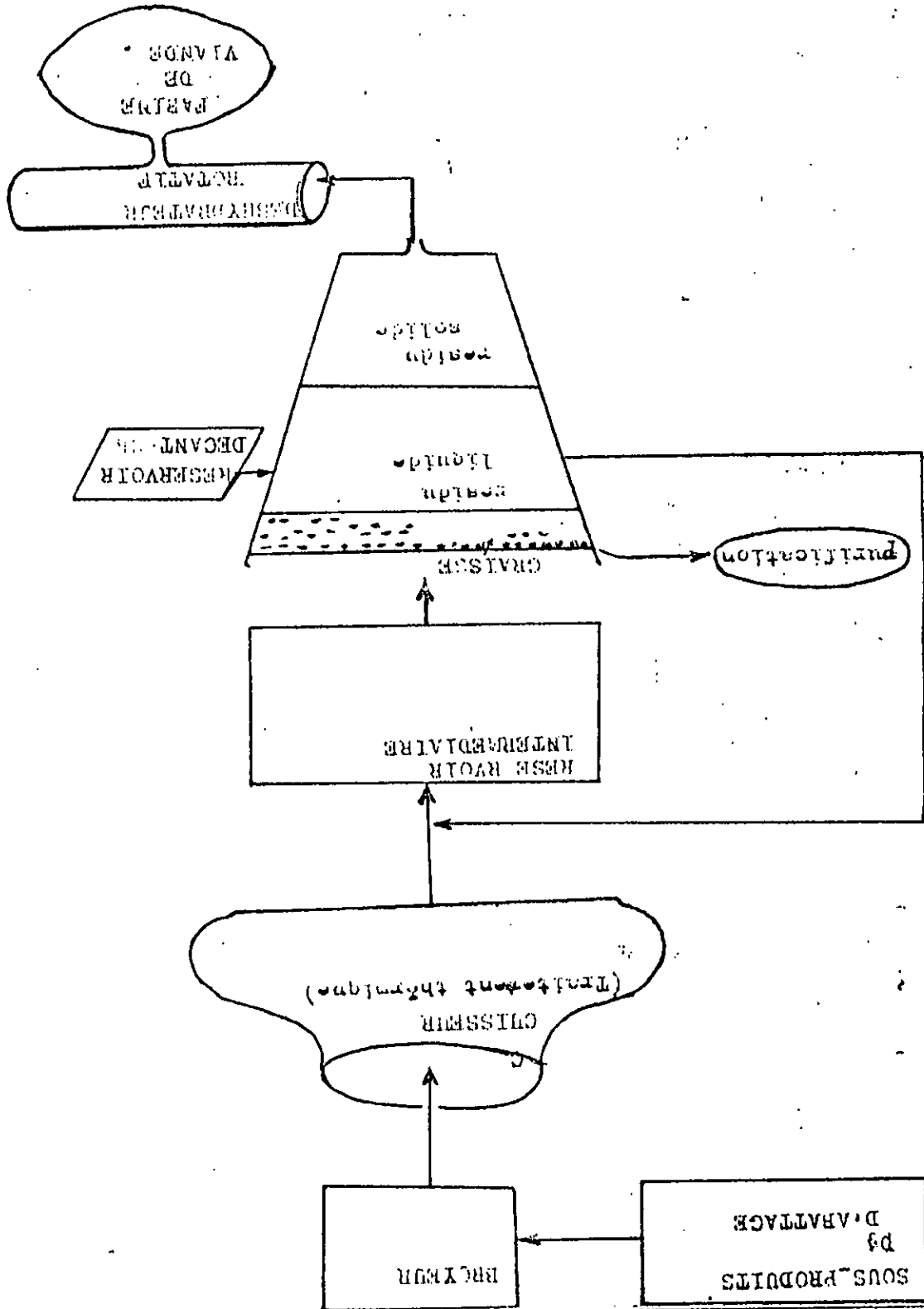
On appelle "Farine de viande", les produits obtenus à partir des tissus animaux. Ces produits ne contiennent pas plus de 4,4% de phosphore mais au moins 55% de protéines (sabots, cornes, sang). La composition de cette farine varie avec la composition des tissus animaux. Elle est préparée par traitement thermique (voir schéma sur figure 1).

La farine de viande donne non seulement des protéines extrêmement utiles mais également des vitamines B12 [25], élément essentiel pour la croissance des êtres vivants. Les protéines provenant de cette farine de viande compensent d'une manière efficace le manque d'acides aminés de l'herbe et des grains.

Ajoutée aux rations journalières, la farine de viande (et même la farine de sang) offre l'avantage de n'augmenter pratiquement pas, le volume de celle-ci et, au contraire, d'augmenter d'une façon sensible le rendement et la productivité du bétail.



FIGURE 4. Préparation de la farine de viande [10]



---

**-6-PRODUCTION DE PROTEINES HYDROLYSEES :**

---

A partir de caséine ou de blocs de viandes, abats, déchets de viandes - comme déjà vu - on peut, après congélation, hachage puis hydrolyse enzymatique, puis décantation, filtration et concentration, obtenir des peptones d'abattoirs dont le prix est neuf fois plus petit que celui des peptones de caséine [39].

---

**-7 -VALORISATION DU 5<sup>e</sup> QUARTIER / PRODUCTION DE L'HEPARINE :**

---

La société VALORI 5 produit dans son usine de PLOERMEL, de l'héparine (substance anticoagulante, utilisée lorsqu'une thrombose est à craindre) après hydrolyse enzymatique des mucus d'intestin de boeuf ou de porc.

Après extraction de l'héparine, l'hydrolysât devient un résidu de fabrication très chargé au point de vue pollution mais sûrement très riche en acides aminés. Le produit séché de composition diverse est recyclé dans l'alimentation du bétail [31].

---

**-7 II -VALORISATION DES HYDROLYSATS :**

---

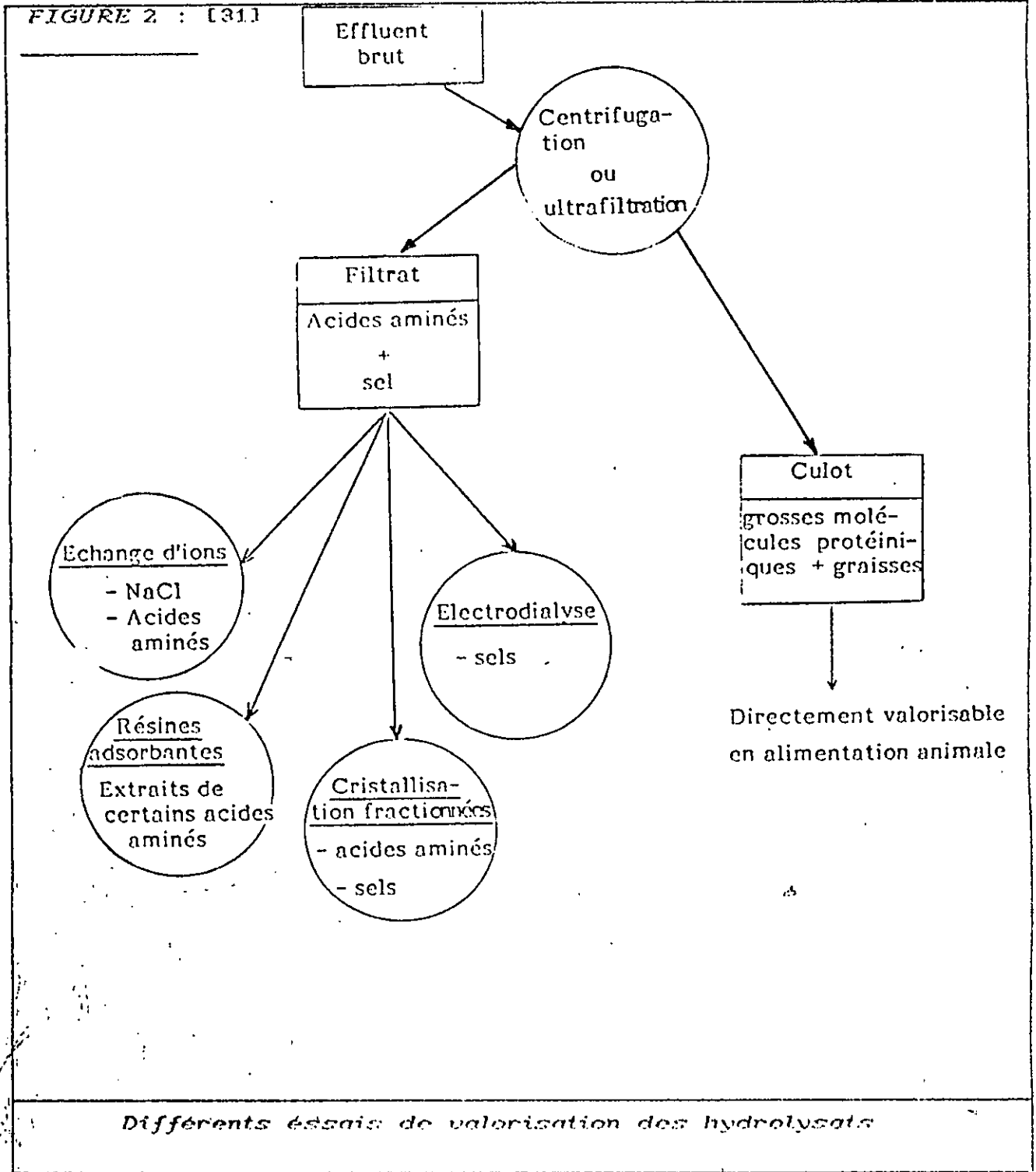
Pour la valorisation de l'hydrolysât (effluent), l'utilisation des techniques séparatives s'avère indispensable en prétraitement permettant d'obtenir :

- d'une part, une masse enrichie en matières sèches : particules ou grosses molécules valorisables par elles-mêmes ;

- d'autre part, un rejet liquide clair contenant des molécules de petites tailles, parmi elles des acides aminés.

(voir schéma sur figure 2)

FIGURE 2 : [31]



*Différents essais de valorisation des hydrolysats*

## -7.2 -SEPARATION DES PARTICULES EN SUSPENSION :

### -7.2.1 -CENTRIFUGATION OU FLOCCULATION :

Les matières en suspension peuvent être extraites par simple décantation, de façon plus efficace, surtout en ce qui concerne les fines particules, par centrifugation. Cette technique ne sépare que les particules solides en suspension, les grosses molécules dissoutes restent en solution; celles-ci peuvent être entraînées dans le culot de centrifugation. L'ajout de chaux améliore la centrifugation.

### -7.2.2 -SEPARATION PAR ULTRAFILTRATION :

L'ultrafiltration est une technique de séparation des molécules en solution selon leurs tailles, par perméation à travers des membranes sous l'action d'un gradient de pression. La sélection se fait en fonction des dimensions ou du poids moléculaire des constituants.

L'ultrafiltration sépare le réjet en :

- une solution claire essentiellement composée de sel et d'acides aminés. La valorisation de cette phase fait l'objet des essais ayant pour but l'extraction des acides aminés.
- un culot contenant encore du sel et des acides aminés est essentiellement composé de grosses molécules d'origine protéique non ou peu hydrolysées, qui peut aisément être incorporé dans l'alimentation animale.

### -7.3 -VALORISATION PAR RECUPERATION D'ACIDES AMINES :

---

La valorisation du rejet, très chargé en acides aminés, peut s'envisager par la récupération. Plusieurs techniques se présentent :

-L'échange d'ions est la technique la plus répandue, surtout pour des rejets d'acides aminés dilués .

-La possibilité d'absorption sur résines peut être retenue pour des effluents essentiellement chargés en phenylalanine ou tyrosine.

-La cristallisation fractionnée peut également être retenue. Elle permet de recueillir une masse cristalline essentiellement constituée d'isoleucine.

-En fin l'électrodialyse pourrait intervenir dans la séparation de certains acides aminés.



CH-II-DIGESTION NATURELLE DES PROTEINES:

CH-II-DIGESTION NATURELLE DES PROTEINES:

Au cours de la traversée du tube digestif, les protéines sont progressivement hydrolysées par les protéases et peptidases qui libèrent finalement des amino-acides resorbés par la muqueuse intestinale.

L'hydrolyse des protéines est uniquement enzymatique. Sauf quelques peptidases, la presque totalité des protéases des sucs digestifs est produite à l'état d'enzymogène qu'une hydrolyse limitée convertit en protéases actives. La sécrétion sous forme inactive protège les cellules de la protéolyse et évite l'autolyse des enzymes.

L'attaque des protéines débute dans l'estomac sous l'effet de la pepsine et celui d'HCl se poursuit dans l'intestin grêle où se déverse le suc pancréatique. [24]

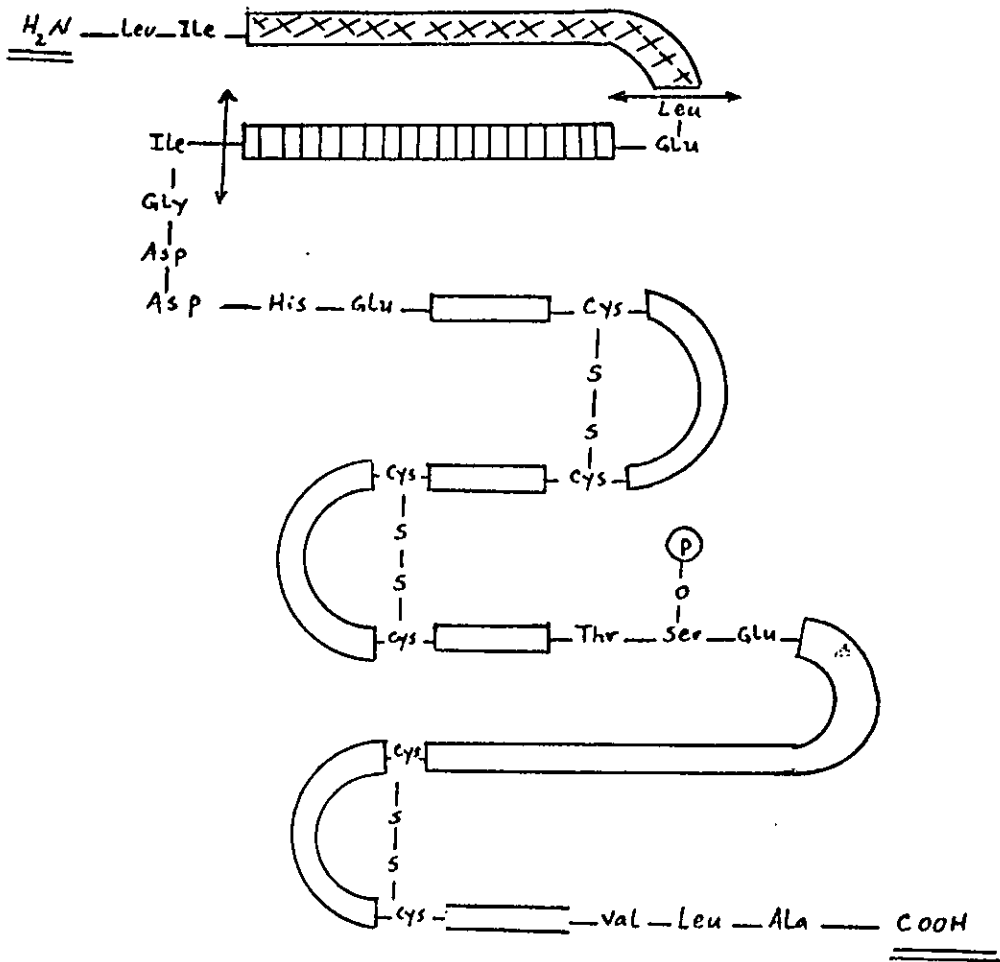
#### -I-PROTEASES DU SUC GASTRIQUE : [26]

La pepsine et le lab-ferment (trypsinogène) proviennent des cellules principales du fundus à partir des trypsinogènes I et II. Leur pH optimal est situé entre 1,5 et 2,5.

##### # 1-Pepsine:

\* Le pepsinogène activé par HCl est formé d'une seule chaîne (P.M 43 000). L'activation exige aussi une trace de pepsine. La conversion s'effectue avec libération de cinq oligopeptides et d'un inhibiteur pepsique polypeptidique (P.M 3000). Le site actif impliquerait deux Asp, l'un ionisé, l'autre protoné.

La pepsine gastrique attaque les liaisons peptidiques de préférence à proximité des acides aminés aromatiques (liaisons engageant le groupe NH<sub>2</sub> de Phe et Tyr).



- [XX] — Peptide foie;
- [|||||] — Inhibiteur;
- [ ] — pepsine.

Figure-3. Activation du pepsinogène en pepsine.



### # 2-Rénine :

Presente dans l'estomac des jeunes mammifères et préparée industriellement à partir de la caillette de veau, elle coagule le lait. Par libération d'un glycopeptide, le caséinogène est converti en paracaséine qui précipite en présence de  $Ca^{++}$ .

### -II-PROTEASES DU SUC PANCREATIQUE : [11] et intestinal

L'action combinée de ces deux sucs poursuit l'hydrolyse des protéines qui a commencé au niveau de l'estomac. L'intestin grêle produisant surtout des peptidases localisées dans la bordure en brosses; le rôle des protéases pancréatiques est alors prépondérant. Ces dernières se distinguent en endopeptidases et exopeptidases:

Les endopeptidases tranchent les liaisons peptidiques à l'intérieur des chaînes. Elles scindent les protéines en protéines plus petites ou en polypeptides. On y note essentiellement la présence de "Trypsine" et "Chymotrypsine" qui diffèrent par leur spécificité, en particulier, par la propriété pour la seconde de coaguler le lait.

L'"Elastase" et la "Collagénase" sont deux protéases qui agissent respectivement sur les chaînes protéiques des fibres élastiques et des fibres collagène.

Les exopeptidases : détachant les acides aminés en bout de chaîne; les "Carboxypeptidases" agissent à l'extrémité N-terminale (portant la copule azotée) <sup>le premier amino</sup> pept. et de C

A ces deux catégories s'en ajoute une troisième, celle des enzymes hydrolysant les nucléoprotéines: les "Nucléases". Les "Ribonucléases A et B" hydrolysent les ribonucléoprotéines. Les "Désoxyribonucléases I et II" hydrolysent les désoxyribonucléoprotéines.

Figure (4)

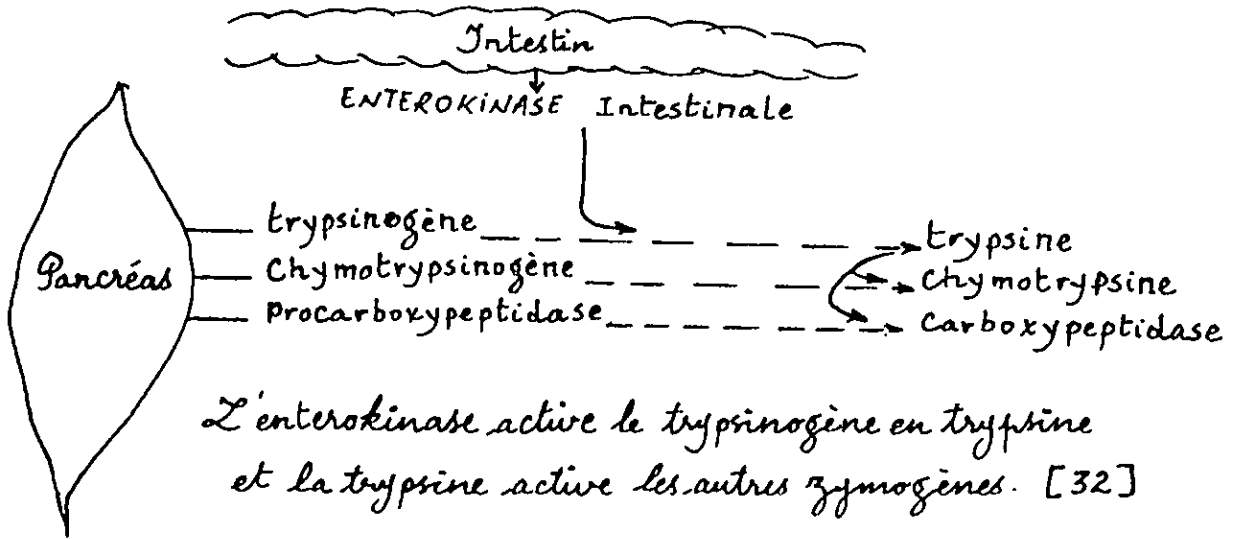
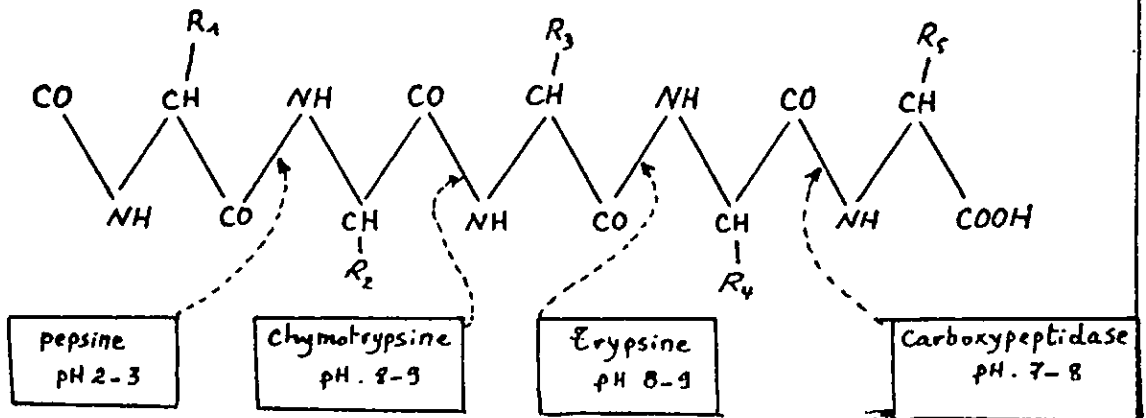


Figure (5)



$R_1$  : tyrosine et  
Phénylalanine

$R_3$  : arginine, lysine

*Scission enzymatique des  
chaines peptidiques. [24]*

-II .A -LES ENDOPEPTIDASES (24)-II .A .1 -LA TRYPSINE:

Présentée par FURKINJE et PAPPENHEIM (1836), étudiée par CL. BERNARD (1856), la trypsine fut obtenue à l'état cristallisé en 1932 et le trypsinogène en 1935.

C'est une endopeptidase qui hydrolyse les liaisons peptidiques impliquant le carboxyle des acides aminés basiques: Arginine, Lysine. Elle est sécrétée sous forme d'un zymogène.

Le trypsinogène:

Il peut être extrait du pancréas ou du suc pancréatique à l'état pur. Il représente une part importante des protéines du suc pancréatique (14 %). Son pHi est élevé (7.4 à 9.3). D'un poids moléculaire de 23700, il est composé d'une seule chaîne peptidique. Six ponts dissulfures jetés entre des points différents de la chaîne peptidique lient celle-ci sur elle-même.

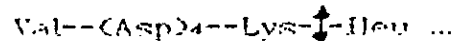
Activation :

Le trypsinogène n'est doué d'aucune activité enzymatique. Il doit subir une transformation aboutissant à la trypsine active.

Mécanisme :

L'activation est obtenue par la rupture d'une liaison Lysyl-Ileu et l'élimination d'un polypeptide constituant l'extrémité N-terminale du trypsinogène. Ce polypeptide diffère selon qu'il s'agisse d'un animal ou d'un autre.

Pour le bœuf, c'est un hexapeptide:

Facteurs activateurs :

Le trypsinogène déversé dans le grêle est activé par une enzyme l'Enterokinase présente dans la muqueuse duodénale. La quantité de trypsine formée est fonction du rapport trypsinogène/enterokinase.

mais l'activation n'est jamais complète.

Une fois entamée, l'activation est complétée par la trypsine, ce qui confère à cette réaction un caractère autocatalytique.

En la présence de  $\text{Ca}^{++}$ , les 4/5 du trypsinogène sont transformés en trypsine active et le pH optimal pour l'activation est compris entre 7 et 8.

#### *Inhibiteurs :*

L'activation du trypsinogène est fortement inhibée par certains acides aminés (*a.c.*-aminocaproïque et *a.p.*-amino-méthyl-benzoïque) ainsi que par des acides  $\alpha$ -cétoniques (*a.p.* hydroxyphenyl-purivique). Ces produits ne sont pas inhibiteurs de la trypsine. Par contre les métaux lourds tels que Ag, Hg sont de puissants inhibiteurs.

#### *La trypsine :*

La trypsine est une protéine hydrosoluble, thermolabile (détruite à 70°C), stable à 0°C. Dans le suc duodénal, elle subit un phénomène d'autolyse qui l'inactive rapidement. Son site actif comprend deux résidus His, un résidu Cys et un de sérine. Ceux-ci sont situés en des points éloignés de la chaîne protéique étalée mais ils sont rapprochés en un même "site" à la faveur de la plicature imposée à la molécule par les six ponts dissulfures.

L'hydrolyse trypsique des substrats naturels libère des protéines plus petites ou des polypeptides. Outre l'activité protéolytique la trypsine possède une activité estérasique s'exerçant sur les liaisons esters ( $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$ ) de la Lysine et de l'Arginine.

Cette activité est due au même site actif. Le pH optimal d'"action" de la trypsine est voisin de 8.

## -II A 2 -LA CHYMOTRYPSINE :

La Chymotrypsine est une endopeptidase. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques où est impliqué le carboxyle d'un acide aminé ramifié ou aromatique;son activité est maximale lorsque ce dernier est la Tyrosine mais elle s'exerce également quand il s'agit de la phénylalanine,du tryptophane,de la méthionine ou de la leucine.

Elle est aussi sécrétée sous forme de chymotrypsinogène inactif. Elle fut séparée de la trypsine,isolée et purifiée par KUNITZ & NORTHOP;ensuite les méthodes de fractionnement des protéines ont amené un dénombrement. À la fois sur le zymogène et sur l'enzyme active.Les plus importants sont le "chymotrypsinogène A"et les différentes formes de chymotrypsine résultant de l'activation de ce dernier.

### *Le chymotrypsinogène A (abrev :CTg A):*

Cette protéine est de pI élevé (9.3).Elle est la plus représentée dans le suc pancréatique du bœuf (16%).Son poids moléculaire est de 22500;constituée d'une seule chaîne peptidique que la trypsine scinde en trois fragments (A,B,C),repliée sur elle même par quatre ponts dissulfures.

#### *Activation :*

Le chymotrypsinogène n'est doué d'aucune activité enzymatique.Il subit une modification qui le transforme en chymotrypsine active mais ce processus donne naissance à plusieurs formes de chymotrypsine.

#### *Mécanisme :*

La première étape fait intervenir la trypsine et aboutit à la libération d'un polypeptide de 15 acides aminés et la formation de la chymotrypsine  $\beta$ ,très instable.

Selon le rapport trypsine/CTg,la réaction suit deux chemins différents :

\* Si la trypsine est en grande quantité (1/40), l'activation est rapide et aboutit à la formation de chymotrypsine  $\delta$ .

\* Si la trypsine est à l'état de traces (1/2000), la transformation de chymotrypsinogène A en chymotrypsine  $\eta$  n'est que partielle. Cette dernière hydrolyse les chymotrypsinogènes A restants en protéines activables par la trypsine: "néochymotrypsinogènes". L'activation de ces derniers aboutit à la formation de chymotrypsine  $\alpha, \beta, \gamma$  (obtenues en mélange).

NB :

Il est à noter que dans le suc pancréatique ou le pancréas, la trypsine est en grande quantité (14%); c'est donc le premier chemin qui sera emprunté pour l'activation du CTg A.

#### Facteurs activateurs :

- \_ La trypsine est l'agent activateur principal, elle est nécessaire au départ et la vitesse de l'activation est fonction de la quantité de trypsine présente.
- \_ La chymotrypsine s'autoactive en présence de faible concentration de trypsine.
- \_ le pH alcalin favorise le phénomène de l'activation.

#### La chymotrypsine :

En réalité, il existe plusieurs formes de chymotrypsine, elles réalisent un mélange dans le suc intestinal. La plus stable est la CHT  $\alpha$  d'un poids moléculaire de 21500 et d'un pH voisin de 8, soluble dans l'eau. Son site actif comprend un résidu de Serine porté par le fragment C et un résidu d'Histidine sur le fragment B, rapprochés l'un de l'autre par les plicatures secondaires de la chaîne protéique.

L'hydrolyse des protéines par la chymotrypsine conduit au fractionnement des chaînes protéiques et à la libération des

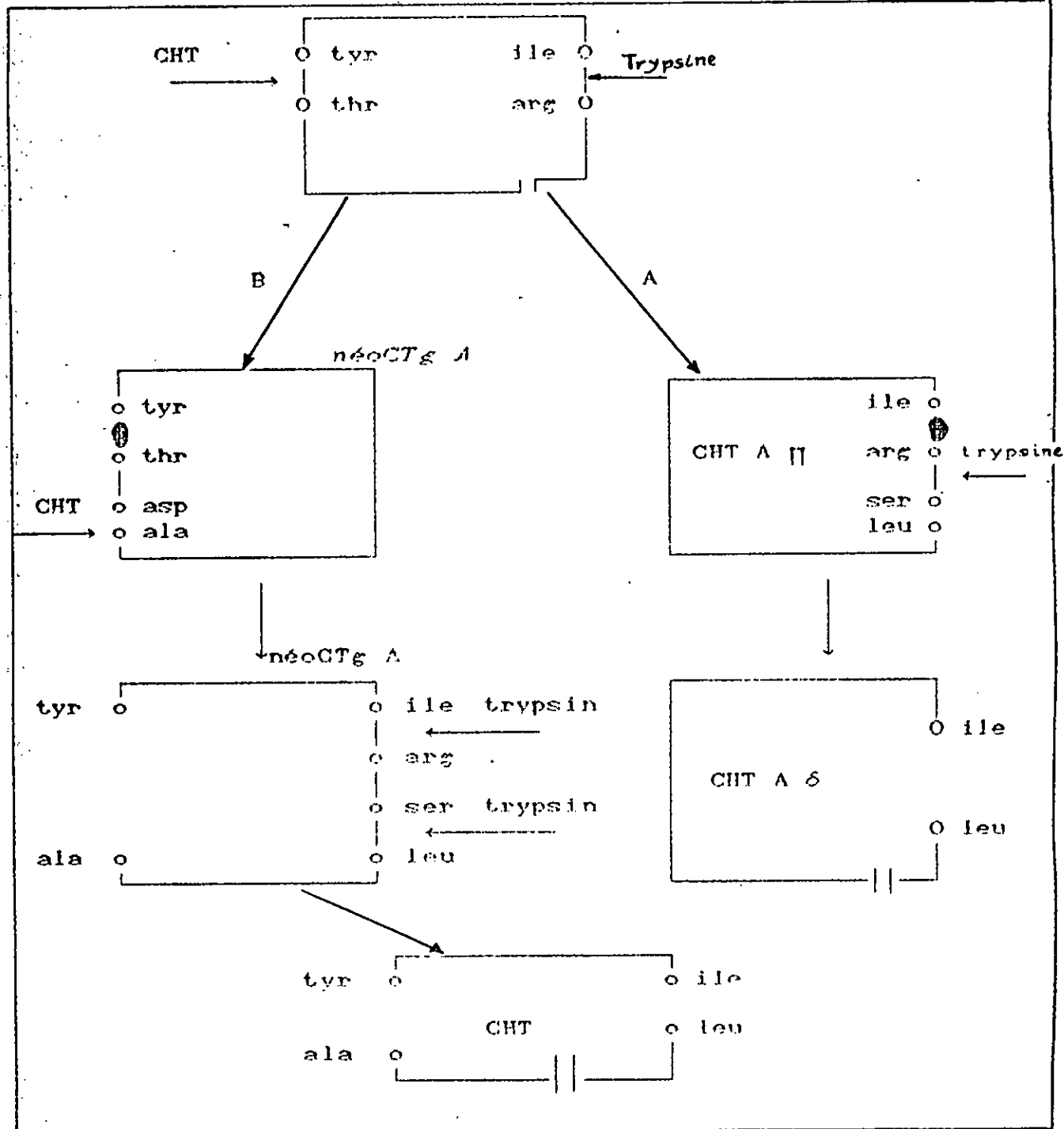


Figure 6 [30]  
 Activation de la chymotrypsine

polypeptides et de quelques acides aminés. outre l'activité protéolytique, la chymotrypsine s'attaque également aux liaisons éthers contractées par les acides aminés aromatiques.

Elle s'attaque aussi sur :

- les liaisons C-C de certains acides cétoniques;
- les liaisons C-S des thio-esters;
- les liaisons C-N des hydrazides et de l'acide hydroxamique.

Ces différentes propriétés enzymatiques sont le fait du même site actif. Toutes les formes de la chymotrypsine n'ont pas la même activité enzymatique. La CHT  $\delta$  est plus active que la CHT  $\alpha$ , celle-ci est plus active que CHT  $\beta$  et la CHT  $\pi$  est la plus active mais aussi la moins stable.

le pH optimal d'action de la chymotrypsine est voisin de 8.

#### -II . A .3-L'ELASTASE :

L'élastase est une enzyme capable de dissoudre l'élastine par hydrolyse des chaînes protéiques de ce substrat. Elle est présente aussi dans le suc pancréatique de l'homme.

L'élastase est sécrétée sous forme inactive. La Proélastase activée dans l'intestin par la trypsine.

c'est une protéine à pI élevé (9.5), instable aux pH acides. Son poids moléculaire serait voisin de 25000. Elle représente chez le porc 13 % des protéines enzymatiques. Elle comprend quatre ponts dissulfures et le site actif implique la présence d'une His et d'une serine situées dans des séquences peptidiques similaires à celles de la trypsine et la chymotrypsine.

Sa propriété essentielle est de solubiliser l'élastine. Son action consiste à hydrolyser la liaison peptidique où est impliqué le carboxyle d'acides aminés aliphatiques neutres : Ser, Ala, Leu, Val et Glycine. De tels acides aminés sont présents en grand nombre dans l'élastine.

Son action s'exerce également sur d'autres protéines: l'hémoglobine l'albumine, la fibrine, la caséine, l'insuline mais non sur le collagène ni la kératine.

Son pH optimal est de 8.8 elle est fortement inhibée par NaCl.



$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  et KCl.

#### -II .A 4 -LA COLLAGENASE

C'est une enzyme qui hydrolyse partiellement le collagène natif. C'est une enzyme thermolabile distincte des autres protéases du pancréas mais elle est aussi présente dans d'autres organes (rein et os). Elle hydrolyse les liaisons peptidiques où sont impliqués les restes prolyl, hydroxyprolyl et glycyl. Son pH optimal d'action est voisin de 8.5 et l'ion  $\text{Ca}^{++}$  accroît légèrement son action.

#### -II . B-LES EXOPEPTIDASES

Les exopeptidases détachant les amino-acides en bouts de chaîne, constituent le deuxième groupe des enzymes protéolytiques du pancréas. On en connaît trois : les carboxypeptidases A et B agissent sur l'extrémité C-terminale et la leucine-amino-peptidase attaquant l'extrémité N-terminale.

#### - II .B 1- LA CARBOXYPEPTIDASE A

Elle attaque le bout des chaînes peptidiques dont l'acide aminé C-terminal porte une formation cyclique, de préférence aromatique. Elle est sécrétée sous forme de zymogène : la Procarboxypeptidase A.

##### *La procarboxypeptidase A :*

Isolée par ANSON, KELLER, NEURATH et COLL. Leurs études ont montré qu'il existe des procarboxypeptidases distinctes présentes dans le rapport de 4/1.

##### \* Procarboxypeptidase A.S 6 :

c'est la plus importante et la plus abondante (19% des protéines chez le bœuf). Son pHi est de 4.5, son poids moléculaire est de 96000. Elle est constituée de trois chaînes protéiques dépourvues d'activité enzymatique.

\* *Procarboxypeptidase A.S 5 :*

---

Moins abondante que la première et constituée de deux chaînes protéiques identiques à celles de la S 6 .

*Activation :*

Se produit sous l'action de la trypsine. Lorsque celle-ci est mise en contact avec la procarboxypeptidase, deux activités enzymatiques apparaissent : d'une faible caractérisant la carboxypeptidase et une autre plus intense représentant une activité endopeptidasique, mais en ajoutant de la trypsine, il y a inhibition de la seconde alors que la première se complète.

*La carboxypeptidase A :*

---

C'est une protéine peu soluble dans l'eau mais soluble dans les solutions salines faibles. De poids moléculaire de 34000, sa molécule contient un atome de zinc entrant dans la composition du site actif. Elle hydrolyse les chaînes peptidiques sur leurs bouts C-terminaux et exige que ceux-ci soient libres son action est maximale lorsqu'il s'agit de la phénylalanine et décroissante lorsqu'il s'agit de :

tyrosine, tryptophane, leucine, méthionine, isoleucine, alanine, glycine.

Son action est inhibée par la présence de proline, hydroxyproline, acide glutamique, arginine et lysine .

Le pH optimal d'activité est entre 7.5 et 8.5 .

La carboxypeptidase est fortement inhibée par les sulfures cyanures, les iodo-acétates, les acides D-aminés aromatiques et surtout par l'acide  $\beta$ -phényl-propionique .

-II .B .2-LA CARBOXYPEPTIDASE B :

---

C'est une exopeptidase qui attaque les bouts de chaînes peptidiques dont l'acide aminé C-terminal est basique (Arg, Orth, Lys) . Ce dernier doit être libre .

Elle a été mise en évidence par FOLK et GLANDER, elle est sécrétée sous forme de procarboxypeptidase (d'un poids de 57000).

Son activation par la trypsine est plus rapide que celle de la procarboxypeptidase A. C'est une protéine soluble dans l'eau d'un poids d'environ 34000. Le site actif comprend une molécule de zinc unie à un groupement thiol. Son pH optimal est de 8,2. Les chélateurs l'inhibent complètement, et l'addition de zinc restaure l'activité.

-II B 3-LA LEUCINE-AMINO-PEPTIDASE : [24]

Elle hydrolyse la liaison peptidique de la L-leucine lorsqu'elle est située en position N-terminale libre.

Mise en évidence par LINDERSTRÖM-LANG. Elle est présente dans de nombreux tissus (rein, foie, pancréas, intestin...)

Contrairement aux autres enzymes du suc pancréatique, la leucine-aminopeptidase est sécrétée sous forme "active".

Le pH optimal de son action est entre 7 et 8.

NB :

□

A noter que le suc pancréatique ne contient pas seulement des protéases. En effet, le pancréas sécrète des hydrolases agissant sur deux autres substances s'offrant à la digestion des lipides (lipase) et les glucides ( $\alpha$ -amylase).

□<sup>0</sup>□

CH-III - RAPPEL DE BIOCHIMIE

CH. III - RAPPEL DE BIOCHIMIE
-------------------------------

I / LES PROTEINES :

Le terme "protéine" vient du mot grec "proteios" signifiant "de première importance" ou qui tient la première place [28].

la fonction principale des protéines est de représenter des constituants essentiels des cellules vivantes tant d'un point de vue quantitatif<sup>(1)</sup> que d'un point de vue qualitatif.

Certaines protéines ont un rôle structural (kératine des ongles et des cheveux ; collagène des tissus conjonctifs [15] ) tandis que d'autres protéines ont un rôle biologique capital, en particulier les enzymes, catalyseurs biologiques indispensables au déroulement des réactions dans les cellules des êtres vivants [35].

Avec le carbone, l'hydrogène et l'oxygène, les protéines renferment de l'azote (moyenne 16 %) mais ce ne sont pas seulement des composés quaternaires. Presque tous renferment du soufre ; certains du phosphore ; d'autres des éléments métalloïdiques (I) ou métalliques (Fe, Mg, etc...) combinés chez les hétéroprotéines, avec la fraction non protéique de la molécule. [17].

Les protéines ont des poids moléculaires très élevés (macromolécule) Leur masse s'exprime par des nombres allant de 16000 à plusieurs millions [17] ; elles sont formées par la condensation d'un grand nombre d'unités (50 à plusieurs milliers) appelées acides aminés.

On distingue deux groupes de protéines :

- Les holoprotéines : constituées uniquement par l'enchaînement des acides aminés.

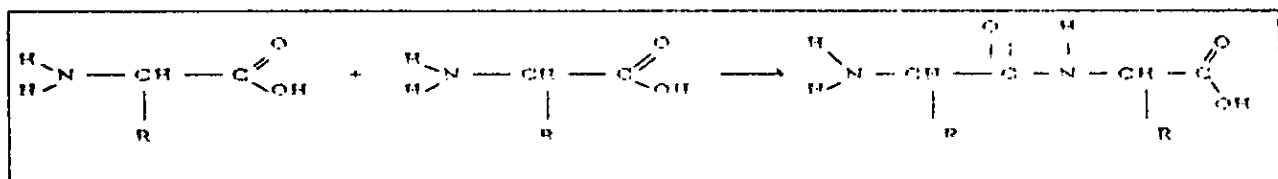
- Les hétéroprotéines : comportent, outre les enchaînements d'acides aminés, des groupements prosthétiques de nature glucidique, lipidique, nucléique ou autre.

Un apport adéquat de protéines est essentiel pour les animaux supérieurs, puisque seuls les organismes inférieurs sont capables de synthétiser leurs protéines à partir d'autres sources d'azote [28].

(1)

Elles représentent en général plus de la moitié du poids sec des cellules [26].

La constitution de ces molécules est révélée par l'hydrolyse. Malgré leur diversité, les agents de l'hydrolyse (acides, alcalis, enzymes), libèrent finalement des acides  $\alpha$ -aminés qui sont facilement séparés et identifiés grâce aux méthodes de la chromatographie sur résine ou sur papier [17]. Ces acides aminés ont un rôle biologique capital dans de nombreuses réactions métaboliques (biosynthèse des hormones, énergétique cellulaire etc.) L'ensemble des protéines constitue un ensemble peu homogène de composés organiques dont les propriétés sont extrêmement variées. Certains sont facilement solubles dans l'eau, d'autres sont insolubles dans tous les solvants usuels; des uns, du point de vue biologique sont de simples agents de protection ou de soutien et d'autres sont hautement spécifiques. Toutes sont pourtant constituées à partir d'environ 20 amino-acides différents. Leurs propriétés particulières sont liées à la nature, au nombre, aux proportions relatives des acides aminés qui les constituent; aux méthodes de liaison qu'ils contractent entre eux; à l'ordre dans lequel ils sont disposés. Mais la connaissance des produits de l'hydrolyse n'apprend pas à connaître la structure de l'édifice. Chacune des molécules d'acides aminés comprenant au moins un groupement carboxylique et un groupement aminé, le mode principal de l'union entre deux molécules est une condensation avec élimination d' $H_2O$ , créant un groupement amide:



et fournissant un dipeptide. Celui-ci possède, en plus de la fonction amide, au moins une fonction acide et une fonction amine libre [17]. De la même façon, l'union de deux ou plusieurs peptides conduit à des chaînes longues, dites polypeptides. Le P.M fixe la limite entre peptides et protéines:

PEPTIDE <P.M 10 000 <PROTEINE

[20]

Deux rôles essentiels pour les peptides: un rôle hormonal (exp ACTH, Insuline) et un rôle d'oxydo-réduction (exp glutathion)[20].

#### I.1 STRUCTURE DES PROTEINES :

Les protéines présentent plusieurs degrés d'organisation structurale, le premier étant "la structure primaire" qui correspond à l'enchaînement des acides aminés [28].

La courbure des chaînes polypeptidiques « ouvertes » peut rapprocher les groupements atomiques capables de réagir entre eux (fonction acide et fonction amine, principalement). Ainsi de nouvelles condensations se produisent, créant des chaînes polypeptidiques cycliques. De plus, des fonctions, autres que les fonctions acides et amines, peuvent participer à des liaisons de natures différentes entre amino-acides (fonction alcool, phénol, thiol). Ceci confère à la protéine sa "structure secondaire". [17]

La "structure tertiaire" d'une protéine correspond à sa forme qui dépend de l'arrangement des amino-acides qui la constituent. On parle de structure 'allongée' des protéines fibreuses (fibroïne de la soie, etc); et de structure 'globulaire' comme les hémoglobines. Certaines protéines sont constituées de plusieurs unités polypeptidiques non liées covalamment, et l'association de ces sous unités confère à la protéine sa "structure quaternaire". L'exemple le plus connu est celui de l'hémoglobine. [28]

#### I.2. DENATURATION DES PROTEINES :

Une protéine acquiert, lors de sa biosynthèse, une structure bien déterminée qui lui est propre. C'est son état natif.

A l'état natif est associée l'activité biologique dans le cas d'une protéine enzymatique. Cet état, relativement fragile, peut être détruit par action d'agents plus ou moins brutaux. La protéine est alors dénaturée. La dénaturation d'une protéine affecte les structures quaternaires et tertiaires, éventuellement la structure secondaire; ceci peut être par modification des radicaux R, R', R" etc... des acides aminés constitutifs. [20]

Tout agent provoquant la rupture de liaisons assurant le maintien de la structure de la protéine est appelé agent dénaturant. (protéolyse, réduction par rupture des ponts disulfure, augmentation de la température, variation du pH, coagulation par le T.G.A...)[26]

### I.3 CRITERES DE DENATURATION :

Un premier critère physique est l'insolubilisation de la protéine (coagulation). On peut également observer une augmentation de la viscosité des solutions protéiques. Cependant, même en l'absence des deux caractéristiques précédentes, il faut citer la perte d'activité biologique [26].

### I.4 QUELQUES EXEMPLES DE PROTEINES :

Les membranes : Les membranes de toutes les cellules ou des organites cellulaires sont constituées de protéines associées aux lipides .

Les protéines plasmatiques : Le plasma sanguin contient de nombreuses protéines ayant chacune une fonction biologique bien spécifique: l'albumine agit comme une protéine de réserve. Les globulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont au transport des lipides, tandis que les  $\gamma$  globulines possèdent une activité anticorps. Le fibrinogène est une protéine soluble qui est transformée en fibrine insoluble lors de la coagulation du sang.

Les hormones : Plusieurs protéines présentent des propriétés hormonales, l'insuline sécrétée par le pancréas, contrôle le métabolisme des glucides. La gastrine stimule la sécrétion acide de l'estomac et l'hormone parathyroïdienne est impliquée dans la régulation du métabolisme du calcium et des phosphates.

Les enzymes : Toutes les enzymes sont des protéines. Elles doivent leur haute spécificité et leur activité catalytique à un arrangement spatial correct des acides aminés qui constituent le site de fixation du substrat .

## II / LES ENZYMES :

### Introduction :

Les enzymes sont des catalyseurs qui permettent aux réactions biochimiques de s'effectuer à vitesse élevée, à température peu élevée (0-45°C) et avec une spécificité qui élimine la formation de sous produits [23].

Ce sont des protéines (qu'on appela tout d'abord diastases) le plus souvent thermolabiles. Présenties au XVIII<sup>ème</sup> siècle par Reaumur et Spallanzani d'une part, et d'une autre part, en 1814 par



Kirchoff. Mais c'est à Pavy et Perroz que revient le mérite d'obtenir la première préparation enzymatique en 1833. Par la suite, Sumner obtint pour la première fois une enzyme sous forme cristallisée: l'uréease en 1926 [26]. Actuellement, près de 3000 enzymes sont répertoriées dont 1770 ont été publiées en 1972 par l'Union Internationale de Biochimie [34].

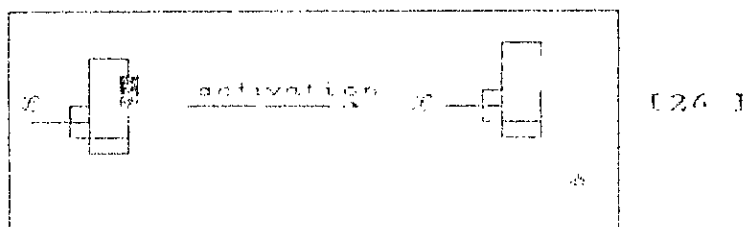
#### II.1. CLASSIFICATION : [29]

Différents types de nomenclature ont été proposés pour distinguer les enzymes. Certaines ont conservé leur nom original: trypsine, pepsine, papaine. La plus part des autres sont désignées en appliquant le suffixe "ase" en se référant :

- a) soit au nom du substrat qu'elles dégradent: protéinases..
- b) soit à la localisation cellulaire: exoenzyme, perméase..
- c) soit au type de la réaction catalysée. (voir Tableau 5)

En plus des classes figurées dans le Tableau, il y'a la classe des protéases et peptidases, très difficile à classer en raison de la large spécificité des enzymes qui la constituent.

La presque totalité des protéases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, appelés pro-enzymes ou zymogènes, pour éviter la protéolyse *in situ* des protéines des cellules qui les élaborent. Leur transformation en zymogène met en jeu leur protéolyse limitée



La transformation peut être réalisée selon plusieurs modalités:

- \* par les ions  $H^+$  (pepsinogène) ;
- \* par l'enzyme active elle-même, par un processus autocatalytique;
- \* par une autre enzyme (l'entérokinase qui active le trypsinogène).

#### II.2. CARACTERISTIQUES DE LA REACTION ENZYMATIQUE :

Toute réaction enzymatique peut être représentée par la formule suivante dans laquelle E est l'enzyme, S le substrat, et P le produit obtenu au cours de la réaction :

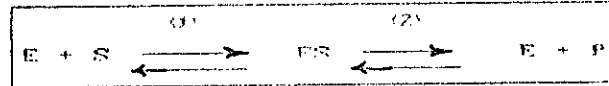


Tableau (5.) Classification des enzymes [38 ]

Enzymes	Réaction catalysée	Schéma [29]
oxydo-réductase	oxydo-réduction	$\text{P-H} + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{R-O}$
Transferase	transfert intermoléculaire de radicaux fonct <sup>1s</sup>	$\text{R} + \text{R}'\text{X} \rightarrow \text{R-X} + \text{R}'$
Hydrolase	hydrolyse	$  \begin{array}{c}  \text{RH} \\    \\  \text{R-OH}  \end{array}  \rightarrow  \begin{array}{c}  \text{R} \\    \\  \text{R}'  \end{array}  + \text{H}_2\text{O}  $
Lyases	addition sur les doubles liaisons	_____
Isomérases	isomérisation	_____
Ligases	formation de liaisons avec utilisation d'ATP	_____

Elle comporte deux phases de substrat, se combine dans un 1<sup>er</sup> temps avec l'enzyme puis le composé obtenu se dissocie pour redonner l'enzyme initiale et le produit, résultat de l'action enzymatique. L'enzyme qui catalyse cette opération est donc régénérée rapidement, les vitesses des réactions (1) et (2) étant très grandes; elle se retrouve de nouveau libre pour intervenir dans d'autres réactions. Les réactions enzymatiques sont aussi caractérisées par leur réversibilité et leur spécificité.

#### Reversibilité :

Les réactions enzymatiques dans leurs deux phases sont toujours réversibles, le produit pouvant être, par action de l'enzyme libérée, reconverti en substrat. Elles tendent toujours vers un état d'équilibre au cours duquel le substrat et le produit restent quantitativement fixes. L'accumulation du produit P, lorsqu'elle devient importante, peut être à l'origine d'un mécanisme "réflexe" qui inhibe le développement de la réaction dans son

déroulement initial (répression enzymatique). Ainsi les enzymes n'ont aucune influence sur l'énergie libre de la réaction. Ils n'en déplacent pas son équilibre mais en revanche, peuvent en modifier l'équilibre.

L'activation du substrat par l'enzyme et corrélativement leur union, s'explique par l'existence d'une affinité<sup>2</sup> pour les sites actifs de l'enzyme. L'enzyme est libérée et libre d'agir sur une nouvelle molécule de substrat.

### II.3. SPECIFICITE DES REACTIONS ENZYMATIQUES : [26]

Une des caractéristiques fondamentales des enzymes est leur spécificité comparativement aux réactifs chimiques: alors qu'un acide peut hydrolyser des composés divers que des esters, des peptides ou des glucides, chacune des fonctions de ces composés sera hydrolysée par une classe différente d'enzyme.

On distingue plusieurs degrés dans la spécificité :

#### Spécificité de réaction :

Une enzyme en présence d'un substrat déterminé, est capable de catalyser une seule des réactions thermodynamiquement possibles.

Le substrat se combine à l'enzyme de façon à ce que la fonction chimique visée soit placée favorablement au niveau du site actif.

#### Spécificité de substrat :

En général<sup>(2)</sup>, une enzyme n'agit pas sur tous les amino-acides, mais préférentiellement sur l'un d'eux. Ceci signifie que l'enzyme reconnaît la structure de la chaîne latérale de l'acide-amino.

Un degré plus avancé de spécificité de substrat se manifeste dans certains cas, la stéréospécificité: une enzyme pourra reconnaître seulement un amino-acide de la série L ou de la série D. [29]

### II.4. MECANISME DE LA CATALYSE ENZYMATIQUE : [30]

Lorsque la combinaison ENZYME-SUBSTRAT est réalisée, la réaction catalytique proprement dite peut prendre place. L'efficacité de la catalyse enzymatique est étonnante, elle multiplie, en général, par un facteur compris entre  $10^6$  et  $10^{10}$  la vitesse de la réaction.

<sup>2</sup>La spécificité peut être plus ou moins étroite. On connaît des peptidases (pronases) capables d'hydrolyser n'importe quelle liaison peptidique d'une protéine. [26]

a

réactions .  
jouer un rôle important dans le déclenchement de certaines  
-un effet de contrainte conformationnelle est capable de

amino-acides.  
les liaisons osidiques est expliquée par la mise en jeu de ces  
l'histidine peuvent ainsi intervenir. l'action hydrolysante sur  
peu dissociés. Les acides aspartique et glutamique, la lysine et  
de l'environnement hydrophobe (au niveau du site actif). Ils sont  
quand il sont exposés à l'extérieur de la molécule, mais au sein  
groupes fonctionnels ionisables, leur dissociation dépend du pH  
plusieurs amino-acides des protéines enzymatiques possèdent des

-un effet de catalyse acide-base :

en électrons des substrats .  
réactifs. Ils réalisent des combinaisons avec les sites pauvres  
bien connus, particulièrement riches en électrons et très  
possédant les caractéristiques d'un réactif nucléophile. Ils sont  
catalyse. En outre, il existe dans les enzymes, des groupements  
atteindraient les niveaux énergétiques requis pour la suite de la  
structures très réactives qui, beaucoup plus facilement,  
Une liaison covalente est susceptible de donner naissance à des

-un effet de catalyse covalente :

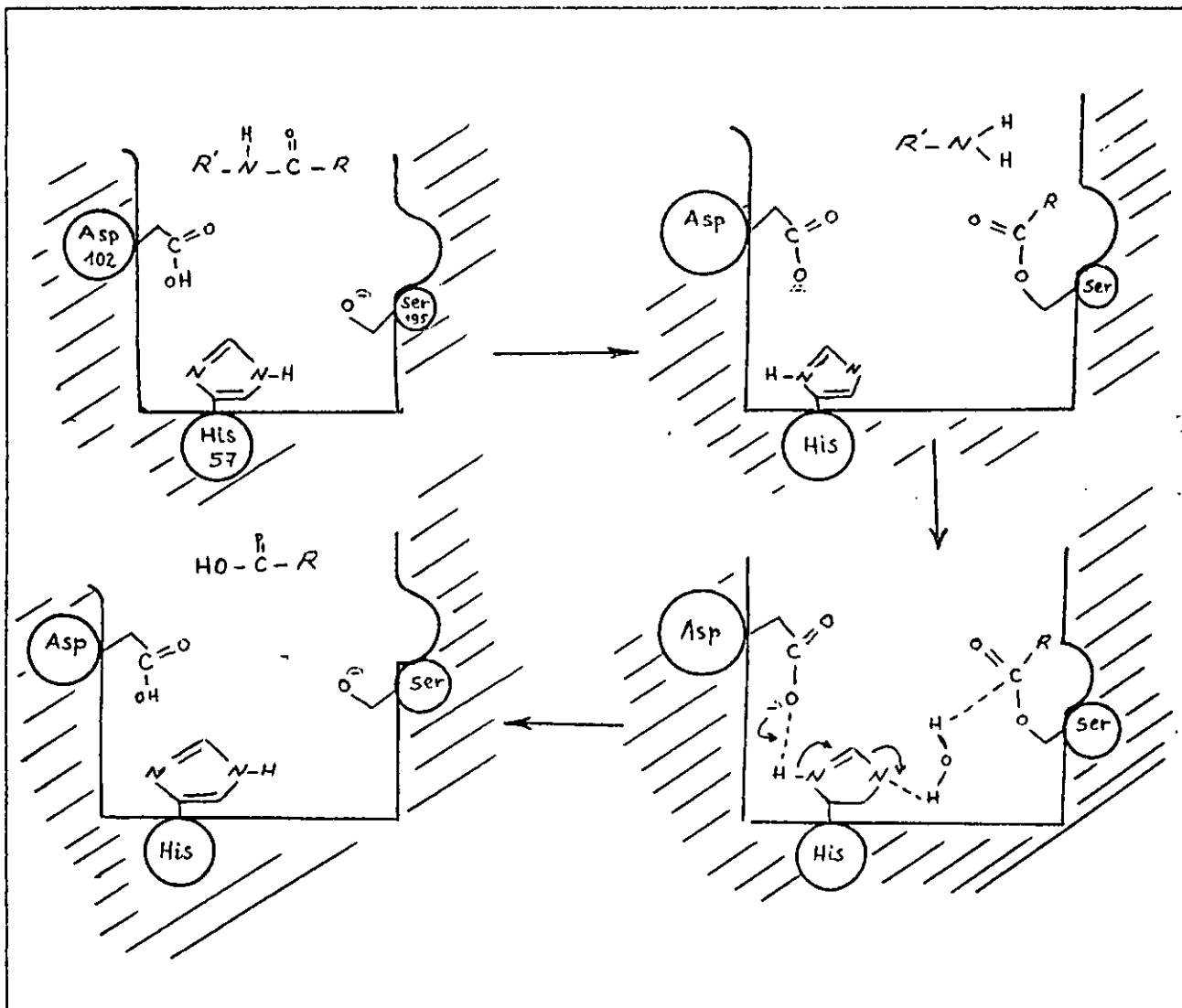
réagissantes peut accélérer considérablement la réaction .  
Grâce au site actif, la mise en contact des espèces chimiques

-un effet de positionnement et de proximité :

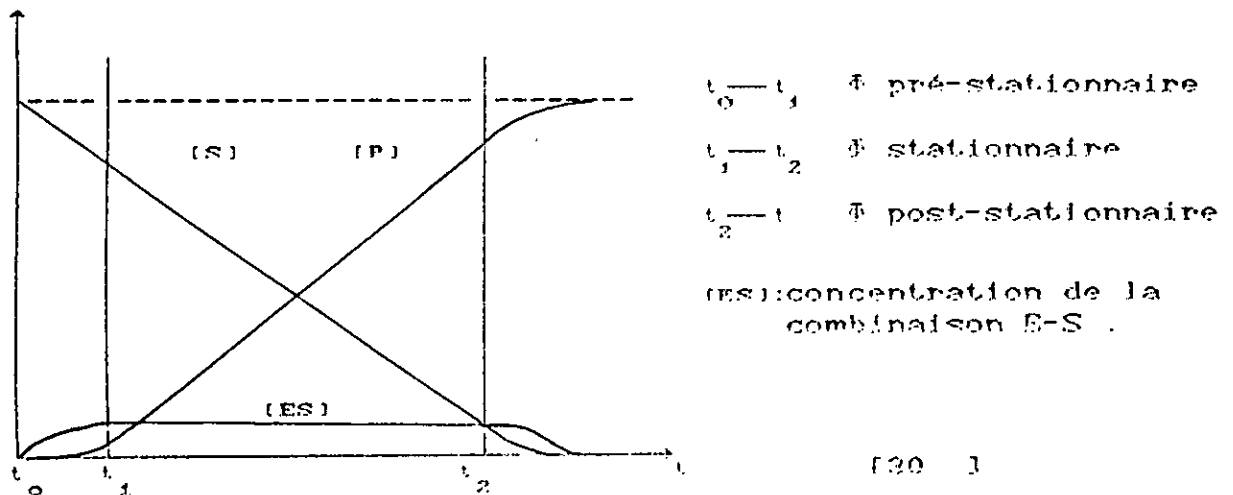
Au niveau moléculaire, quatre mécanismes principaux sont à évoquer :

Figure : ( 7 ) :

Mécanisme proposé pour l'hydrolyse d'un peptid  
par l' $\alpha$ -Chymotrypsine .

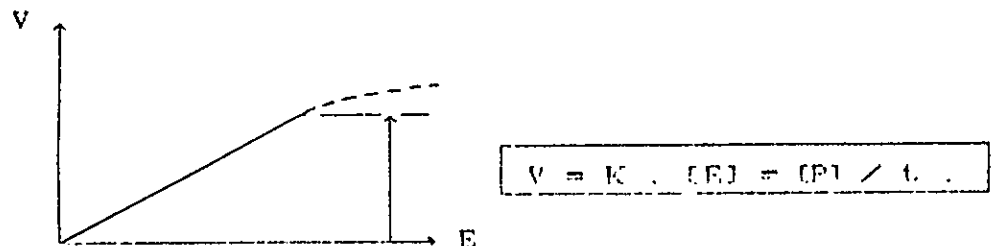


Un rôle essentiel est joué par Ser 195 (formation d'intermédiaire covalent). His 57 et Asp 102 exercent une catalyse acide-base qui exalte le caractère nucléophile de Ser 195. Celle-ci attaque le carboxyle de la fonction amide du substrat; il se forme "l'acyl-enzyme" et l'amine est libérée comme molécule d'eau intervient alors et par un processus inverse du précédent le site actif fonctionnel se retrouve régénéré, alors que l'acide provenant du substrat est libéré à son tour. [24]



### III-1-INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE L'ENZYME [26 ]

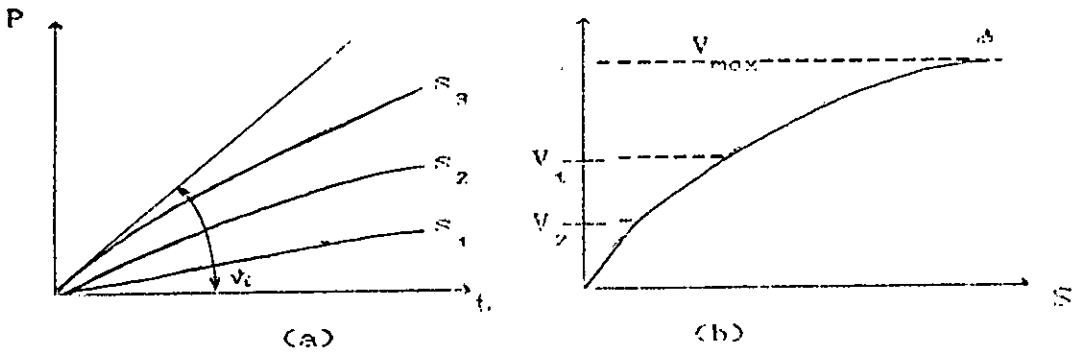
En présence d'une quantité définie de substrat, si l'on fait agir des quantités croissantes d'enzyme, on constate que la vitesse augmente proportionnellement à la concentration en enzyme.



Ceci n'est vrai que dans certaines limites, tant que le substrat est présent en excès, sinon la courbe s'infléchit. En pratique, la concentration en enzyme est toujours trop faible pour atteindre ce stade, car les protéines enzymatiques ont un poids moléculaire en général, de beaucoup supérieur à celui du substrat et les concentrations molaires en enzymes ne peuvent atteindre des valeurs élevées.

### III-2-INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT [30 ]

Si l'on fait croître la concentration du substrat [S], alors que la concentration de l'enzyme reste constante, on constate que la vitesse initiale de la réaction varie selon le schéma de la figure suivante. Elle augmente progressivement, pour atteindre une valeur maximale et constante  $V_{max}$ .



$S_3 > S_2 > S_1$  pour une même  $[E]$

(a) produit formé

(b) vitesse initiale

figure ( 8 )

Influence de  $[S]$

[34]

### III-3-HYPOTHESE DE MICHAELIS MENTEN :

Ces deux auteurs ont fait une étude quantitative des variations de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Cette étude est basée sur la représentation :  $E + S \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} E-S \xrightarrow{k_3} E + P$  (1) et sur le fait que l'obtention de l'équilibre entre E.S et E-S est un processus rapide, comparé à la réaction  $E-S \longrightarrow E + P$  (laquelle commande donc la vitesse de la réaction enzymatique). L'avantage de l'équation de Michaelis est, qu'elle ne nécessite, pour l'étude de la vitesse de la réaction, ni de connaître  $[E]$ , ni de connaître  $[E-S]$ . [28]

La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration  $[E-S]$ , donc :  $v = k[E-S]$  (2)

La vitesse maximale ( $V_{max}$ ) est observée à une concentration en substrat telle que  $[E-S] = [E]_t$  (concentration totale en enzyme, donc  $V_{max} = k[E]_t$ )

alors

$$v/V_{max} = [E-S] / [E]_t$$

(3)

### III.3.1 LA CONSTANCE DE MICHAELIS :

(Ou constante de dissociation du complexe [E-S])

Nous avons  $dS/dt = -dp/dt$

et  $dS/dt = v_2 - v_1 = -k_1[E][S] + k_2[E-S]$

donc  $[E-S] \cdot (k_1 + k_2) = k_1[E][S]$

alors 
$$\frac{[E][S]}{[E-S]} = \frac{k_2 + k_1}{k_1} = K_m \quad (4)$$

$K_m$  est d'autant plus grande que la dissociation de E-S est plus forte, donc que l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible. [28]

### III.3.2 EQUATION DE MICHAELIS MENTEN :

La concentration d'enzymes libres est :

$$[E] = [E_t] - [E-S]$$

$$K_m \text{ est alors : } K_m = \frac{([E_t] - [E-S]) \cdot [S]}{[E-S]} = \frac{[E_t][S]}{[E-S]} - [S] \quad ([E-S] \neq 0)$$

$$\Rightarrow \frac{[E_t][S]}{[E-S]} = K_m + S$$

$$\Rightarrow [E-S] = \frac{[E_t][S]}{[S] + K_m}$$

$$\Rightarrow \frac{[E-S]}{[E_t]} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Or  $[E-S]/[E_t] = v/v_{\max}$

On peut écrire alors :

$$v/v_m = [S] / (K_m + [S]) \quad (5)$$



Cette équation permet, après avoir déterminé expérimentalement les variations de  $v$  en fonction de  $[S]$ , d'obtenir la valeur de  $V_{\max}$  et calculer  $K_m$ . Il n'est pas nécessaire de connaître la concentration en enzyme, et on peut donc déterminer le  $K_m$  sur des préparations incomplètement purifiées.

### III.3.3 METHODES DE DETERMINATION DE $K_m$ [30]

#### 1) Arithmétique :

Si dans l'équation (5) nous posons :  $v = \frac{V_m}{2}$  ;

$$\text{on a } V_m / 2 = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{donc } K_m = [S].$$

La constante  $K_m$  est égale à la concentration du substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale.

#### 2) Graphique : [26]

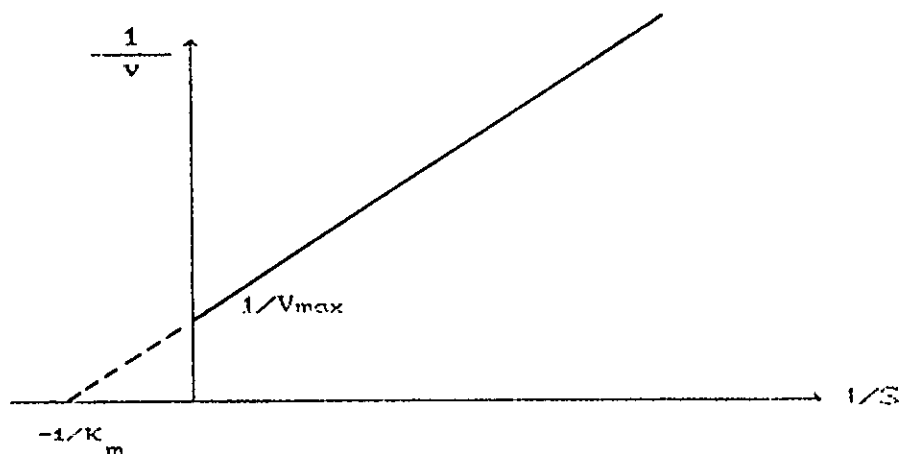
L'inverse de l'équation (5) peut s'écrire :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{K_m}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

La courbe  $1/v = f(1/S)$  est une droite dont les points caractéristiques sont :

$$1/v = 0 \longrightarrow 1/S = -1/K_m$$

$$1/S = 0 \longrightarrow 1/v = 1/V_{\max}$$



Le tracé de cette droite exige de connaître au moins trois valeurs de la vitesse de réaction de trois concentrations du substrat [30].

### III-4- ABERRATION DES CINÉTIQUES MICHAELIENNES:

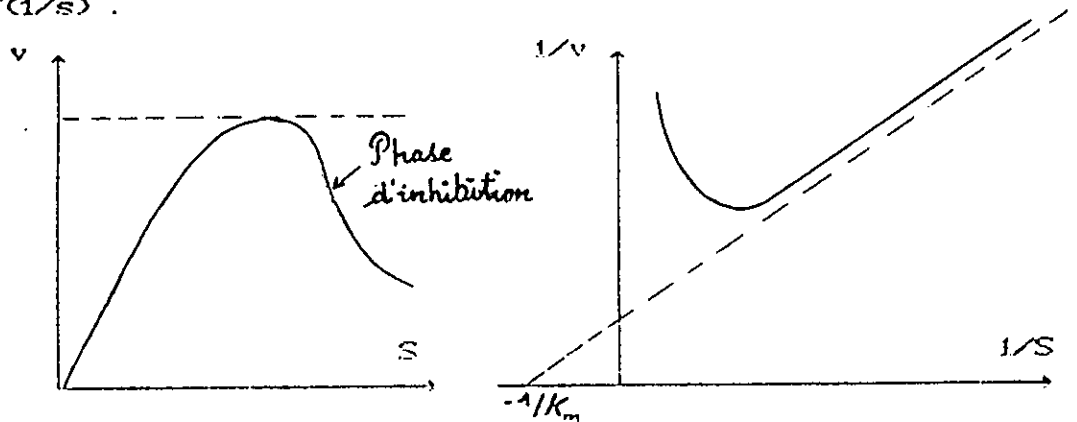
En l'absence de tout effecteur étranger au système enzyme-substrat, certains systèmes enzymatiques à un substrat se présentent dans des conditions cinétiques telles qu'elles constituent de manière surprenante des aberrations de la cinétique Michaelienne, d'ailleurs assez aisément détectables:

Ce sont l'inhibition par le substrat, l'activation par le substrat, l'autocatalyse et les distortions par non solubilité du système [30].

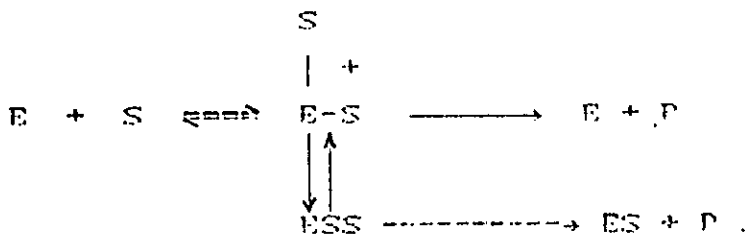
#### Inhibition par excès de substrat [26]

On observe parfois une diminution de la vitesse de réaction pour de fortes concentrations en substrat, ce qui conduit à une forme caractéristique de la courbe  $v = f(S)$  ou de la courbe

$$1/v = f(1/s) .$$



On peut représenter l'ensemble du phénomène comme suit :



On admet qu'en presence d'un très grand excès de substrat ,le complexe E-S fixe une nouvelle molécule de S ,donnant un complexe ternaire inactif .

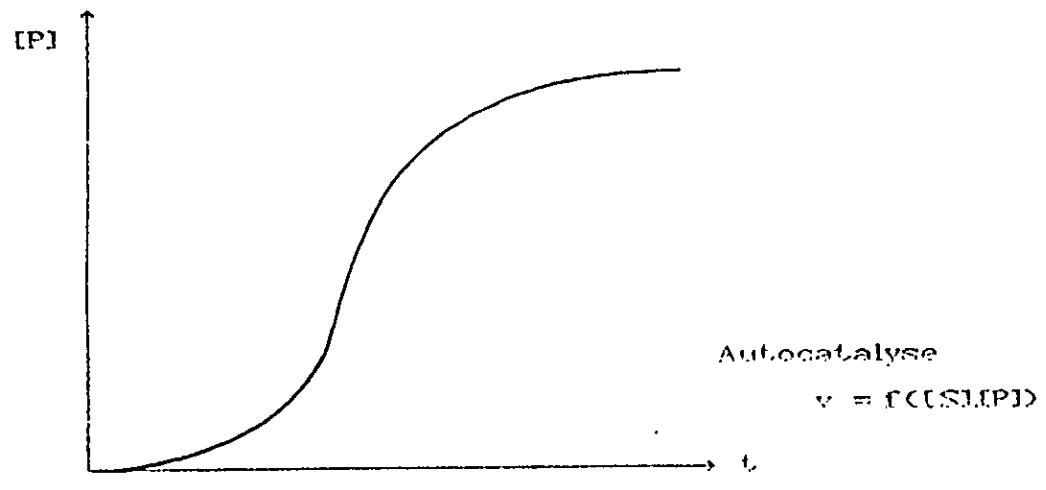
Activation par le substrat :

Certaines réactions enzymatiques ont une faible vitesse aux faibles concentration en substrat .A des valeurs anormalement basses pour une cinétique Michaelienne classique .

Le substrat se lierait à l'enzyme dans une combinaison majoritaire inactive, en équilibre elle-même avec une combinaison minoritaire active d'apport de substrat , supplémentaire favoriserait le passage de la 1<sup>ère</sup> combinaison à la seconde .

Autocatalyse :

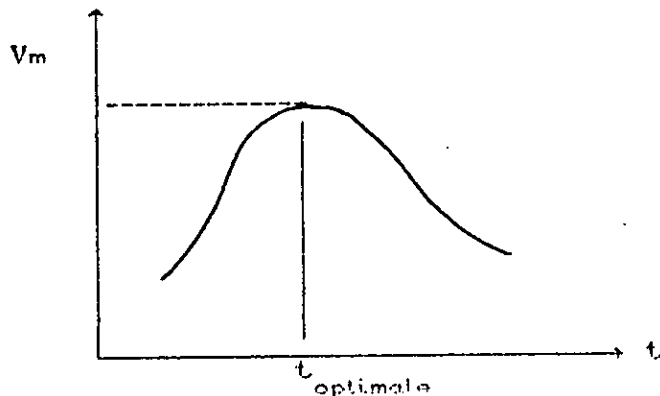
C'est un phénomène au cours du quel un produit d'une réaction enzymatique active la réaction ou catalyse lui même la réaction.  
exemple : activation du trypsinogène en trypsine .



### III-5- INFLUENCE DES AGENTS PHYSIQUES SUR LA CINÉTIQUE :

#### III.5.1 TEMPERATURE :

La vitesse de réaction enzymatique augmente avec la température selon la loi d'Arrhénius, mais au delà de la valeur optimale il y a désactivation de la chaîne protéique (modification de la conformation au niveau des structures secondaire, tertiaire et quaternaire) qui n'est pas accompagnée par la rupture des liaisons peptidiques impliquées dans la structure primaire. [38]



#### III.5.2 LE pH :

L'influence du pH s'exerce à deux niveaux :

- Au niveau du substrat, dont le degré d'ionisation permet ou non sa combinaison avec l'enzyme. Ce n'est que dans une zone restreinte de pH que les groupements ionisables sont dans l'état convenant à la formation du complexe enzyme-substrat.

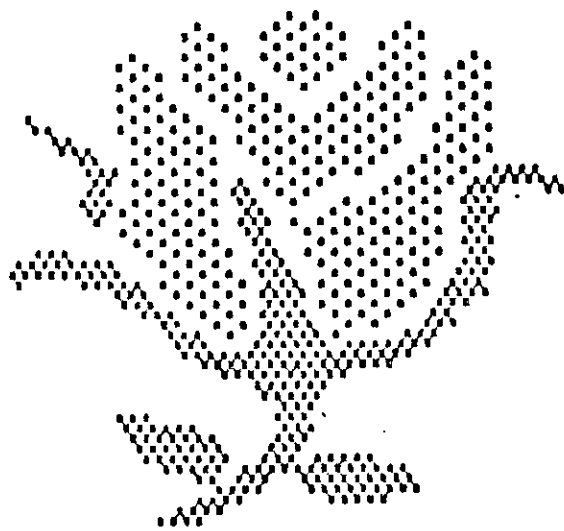
- au niveau de la protéine enzymatique :

D'une part sur le site actif, en réglant le degré d'ionisation des groupes fonctionnels des acides aminés impliqués dans la réaction et d'une autre part, sur les acides aminés participant au maintien de la structure tertiaire active de la protéine [26].

□<sup>0</sup>□

2<sup>ème</sup> partie :

Partie expérimentale



INTRODUCTION :

Notre étude consiste en la valorisation des déchets d'abattoirs par hydrolyse enzymatique et donc en la récupération des protéines et acides aminés à haute valeur nutritive en vue de les injecter dans l'alimentation animale.

L'avantage de cette récupération réside dans l'utilisation d'enzymes brutes pas du tout coûteuses : "Pancréatine brute, Pepsine" La première étant facilement récupérable sans aucune surcharge de main d'œuvre il suffit de prélever le pancréas frais à l'abattoir et le mettre au congélateur. La pepsine, par contre nécessite un lavage avant de la congeler.

Les deux organes porteurs d'enzymes, après avoir été broyés et activés, serviront à la digestion des rejets solides d'abattoirs.

Mais avant d'entamer la digestion artificielle proprement dite, il importe de faire une étude préalable permettant de déterminer les conditions optimales pour chaque type d'enzyme brute utilisé, qui mènent à bien l'opération d'hydrolyse. Pour ce, nous avons fixé les objectifs suivants :

-1-Extraction de l'enzyme brute à partir du tissu porteur, son activation par autodigestion et préparation des solutions enzymatiques ;

-2-Détermination des conditions optimales de température et de pH et étude de la conservation des solutions enzymatiques. Cette partie sera effectuée à l'aide d'une protéine standard : B.S.A (Bovin Serum Albumin);

-3-Un essai d'hydrolyse pour chacun des types d'enzyme;

-4-Un essai de digestion des rejets solides par les deux types d'enzyme en série : la première étant la pepsine travaillant à pH acide puis la pancréatine à pH basique.

## PARTIE EXPERIMENTALE

---

A la fin, l'hydrolysat pourra être valorisé par ultrafiltration en séparant les protéines et les polypeptides dans le culot et les acides aminés en solution .

N.B :

                      
*L'étude sur la pepsine brute a été effectuée parallèlement à la notre par Mr. ANNOU Med Ibrahim dans son projet de fin d'étude consistant en l'hydrolyse enzymatique des rejets de poissonneries. Nous avons rapporté ses résultats et les avons utilisé pour réaliser la digestion artificielle .*

           0

PARTIE EXPERIMENTALE



I / EXTRACTION DE LA PANCREATINE BRUTE
--

Les enzymes se trouvant dans le suc pancréatique sont issues, comme attendu du pancréas où elles sont sous forme inactive. Pour leur extraction et activation, nous nous sommes inspiré de la méthode citée par G.M. PIGOT et L.L. LIU [18] pour l'extraction de la pepsine brute qui consiste en une autodigestion du tissu porteur des zymogènes.

Juste après avoir égorgé le mouton, encore chaud, prélever le pancréas et la partie supérieure de l'intestin grêle (duodénum) et les transporter au laboratoire dans de la glace. Hacher dans un même hache-viande, le pancréas et l'intestin et veiller à ce que le hachis soit bien homogène. Congeler alors le hachis dans des sacs en plastique jusqu'à utilisation.

#### I-1- ACTIVATION DE L'EXTRAIT PANCREATIQUE :

Comme déjà vu, le pancréas sécrète des zymogènes (en général). Cela voudrait dire que le tissu que nous avons congelé ne contient que des zymogènes et aussi de l'entérokinase (tissu de l'intestin). Il faudra alors activer cet extrait pour obtenir de la pancréatine brute et ce ci en affrontant les zymogènes à l'entérokinase par agitation et en agissant sur le pH du milieu à l'aide d'une base forte (KOH).

Prendre une quantité du hachis pancréatique congelé; le mettre dans un béccher avec un volume d'une solution de potasse à un pH voulu. Agiter pendant 6 heures (temps pendant lequel il y'a activation de la trypsine puis les autres enzymes et autodigestion du tissu).

Vu le rôle de  $Ca^{++}$  dans l'activation, il est important de travailler en sa présence.

Le pH d'activation choisi est ajusté à l'aide d'une solution de KOH concentrée pendant les 30 premières minutes de l'agitation .

## I-2- PREPARATION DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES :

Activer au pH voulu une quantité du bachi congelé dans 10 ml de KOH ( $10^{-6}$  ). Une fois l'agitation terminée, compléter le volume du mélange à 500 ml à l'aide de la potasse. Filtrer alors la solution à travers une étamine .

Ainsi la solution obtenue sera conservée à 4°C pour les éventuelles utilisations .

NB :

— L'étude de l'activité de la pancréatine brute montrera que celle-ci resterait stable pendant quelques jours à un certain pH après avoir été activée à un certain pH jugé optimal .

## II / RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES

### II-1- RECHERCHE DU pH OPTIMUM D'ACTIVATION :

Cette recherche servira d'une part à déterminer le pH optimal d'activation et d'une autre part, à étudier la stabilité de la solution enzymatique .

Peser une quantité de pancréatine brute et préparer quatre solutions selon le mode opératoire précité en choisissant les pH d'activation suivants : 5,5; 6,5; 7,5 et 8 . Le pH de la solution qui servira à l'ajustement des solutions enzymatiques à 500 ml sera choisi arbitrairement voisin de 8 (c'est le pH d'activation imposé à l'enzyme) .

Tester l'activité à température ambiante de ces solutions enzymatiques sur un substrat standard (R.S.A) .

Refaire les tests pendant 10 jours .

MESURE DE L'ACTIVITE :

Prélever 4 ml de la solution d'enzyme dans un tube à essai; ajouter 1 ml de substrat (BSA à 2.5%), homogénéiser et incubé pendant 10 minutes. Arrêter la réaction à l'aide de 6 ml d'acide trichloroacétique (T.C.A) à 4%. Laisser agir pendant 5 à 10 minutes puis filtrer le contenu du tube à travers un papier Watmann n°2. Lire l'absorbance du filtrat sur un spectrophotomètre UV à 290 nm.

REMARQUES : \* Le T.C.A a la propriété de coaguler les protéines non hydrolysées et de solubiliser les peptides et les acides aminés. (20)

\* La longueur d'onde 290 nm est spécifique à tryptophane, à la tyrosine et à la phénylalanine et ceci grâce la présence d'un cycle dans leurs structures (21).

EXPLOITATION :

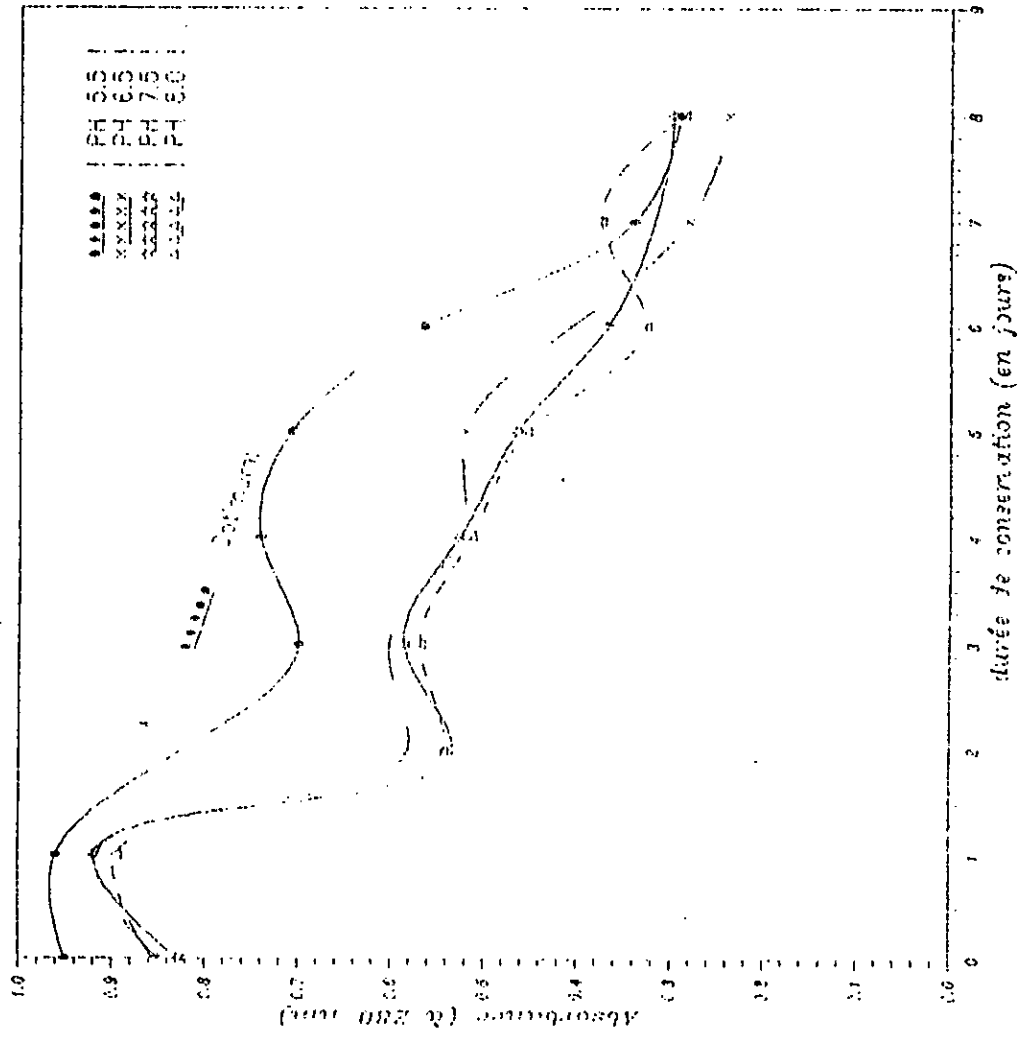
Les résultats obtenus dans cette partie serviront au tracé des courbes de variation de l'absorbance en fonction du temps et ceci pour chaque pH d'activation ainsi on pourra déterminer le pH optimum d'activation et étudier la stabilité de la solution d'enzymes.

INTERPRETATION

L'évolution de l'absorbance en fonction de la durée de conservation à 4°C pour les différents pH d'activation est donnée dans le tableau (6) et illustrée par la figure (10) sur laquelle on voit bien que la solution enzymatique activée à pH5 possède la plus grande absorbance pendant toute la durée de conservation. Néanmoins cette absorbance qui traduit l'activité augmente au premier jour puis diminue pour arriver au troisième jour à une certaine valeur qui restera pratiquement constant pendant les trois jours qui suivent. Au septième jour, l'activité chute rapidement au tiers de sa valeur initiale à ce moment l'enzyme n'est plus active.

PARTIE EXPERIMENTALE

Figure-10 - ETUDE DE LA CONSERVATION DES SOLUTIONS ENZYMATIQUES ACTIVEES A DIFFERENTS PH



PARTIE EXPERIMENTALE

re: *Etude de la Congelation des Solutions Enzymatiques Actives a differents pH.*

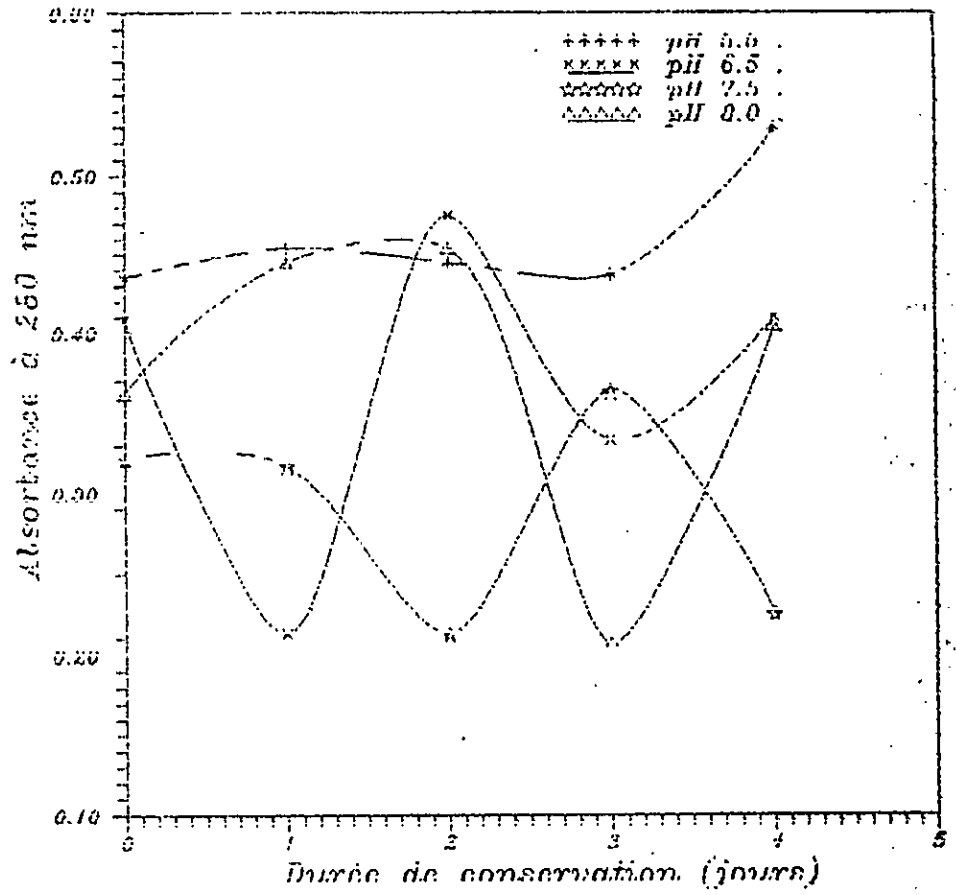


Figure 11

L'augmentation de l'activité au premier jour peut s'expliquer par l'insuffisance du temps d'activation -que nous avons pris arbitrairement de 4 heures-. L'activation se poursuit alors lentement pendant la conservation jusqu'à arriver à son maximum puis laisse place au phénomène d'autolyse -aussi lent que la température est plus basse -. Il aurait été donc préférable de s'arrêter sur ce point et étudier la durée optimale d'activation (ce qui n'a pas été envisagé dans notre plan de travail )

Les résultats de l'étude de la conservation au congélateur (à 0°C), représentés dans le Tableau ( 7 ) et la figure ( 11 ) nous laissent préférer ce mode de conservation, puisque au congélateur l'activité ne chute pratiquement pas .

Ainsi une meilleure utilisation de la pancréatine brute exige une activation à pH 5,5 et une conservation à 0°C sinon une utilisation immédiate .

## II-2- RECHERCHE DE LA TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTION :

Préparer une nouvelle solution d'enzyme à un pH voisin de 8 après l'avoir activée à pH optimum déterminé dans la partie précédente .

Mesurer l'activité à différentes températures selon le mode opératoire précité. Pour notre étude , nous avons choisi la gamme de températures suivante : 25/27/30/40/45/50/55/60/63/66 et 70 .

Cette gamme a été choisie aussi large de façon à bien localiser la température optimale.

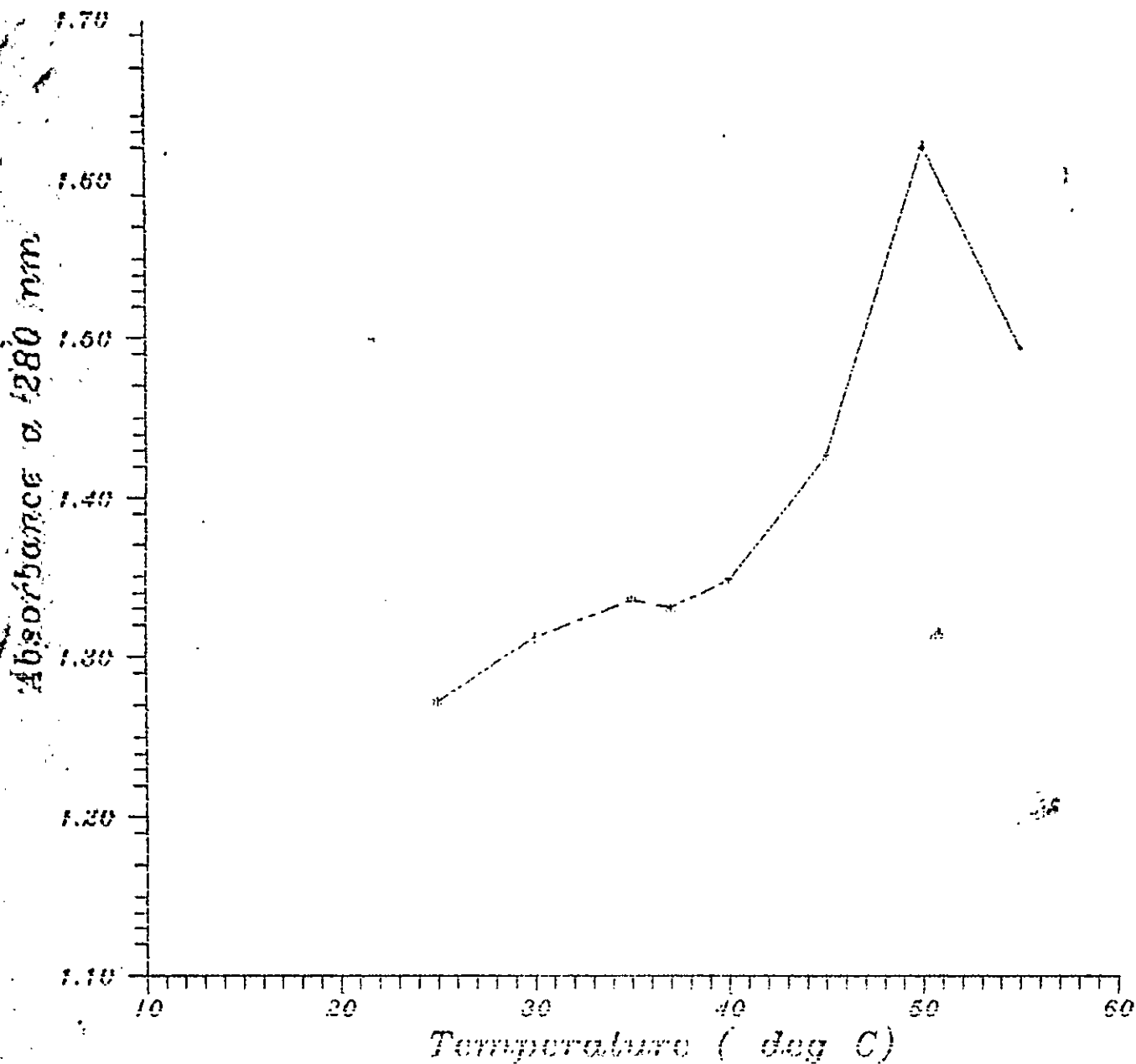
REMARQUE : Avant de réaliser le mélange enzyme-substrat pour enclancher la réaction, il est recommandé de ramener chacune des deux solutions à la température voulue, puis mélanger et incuber à cette même température.

### EXPLOITATION :

Les résultats de cette partie permettent de tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la température, ce qui

Figure: 12

*Influence de la Température sur l'activité enzymatique*



permet de déterminer la température optimale d'action de la pancréatine brute

Interprétation :

La variation de l'activité de la pancréatine avec la température est représentée dans la figure (12) dans la gamme de températures comprises entre 40 et 50, l'activité enzymatique augmente pour atteindre son maximum à 50°C, après lequel elle chute aussi rapidement qu'elle est montée. Arrivée à la température de 55°C, l'absorbance reprend sa croissance, mais cette fois-ci, d'une façon étonnante. Cette absorbance ne traduit plus l'activité enzymatique. Cela pourrait s'expliquer par l'effet dénaturant et solubilisant de la température sur les protéines. En effet, à une température dépassant 55°, les protéines insolubles dans le T.C.A. sont solubilisées et le mélange d'enzymes est dénaturé et peut être solubilisé lui aussi. Ceci a été remarqué par l'observation de l'augmentation de la turbidité des filtrats alors qu'auparavant, ils étaient clairs.

En conclusion, on dira que la température optimale de la pancréatine brute est de 50°C.

II-3-RECHERCHE DU pH OPTIMAL D'ACTION :

Après avoir déterminé le pH optimal d'activation, la température optimale d'action de l'enzyme brute, il reste l'autre paramètre, aussi important que les autres, le pH optimal d'action<sup>(1)</sup>. Pour sa recherche, nous proposons la méthode suivante : Activer une quantité du bichis pancréatique au pH optimal d'activation. En préparer une solution d'enzyme avec de l'eau distillée dont le pH est voisin de 4. Mesurer l'activité à ce pH selon la méthode déjà utilisée dans les parties expérimentales précédentes.

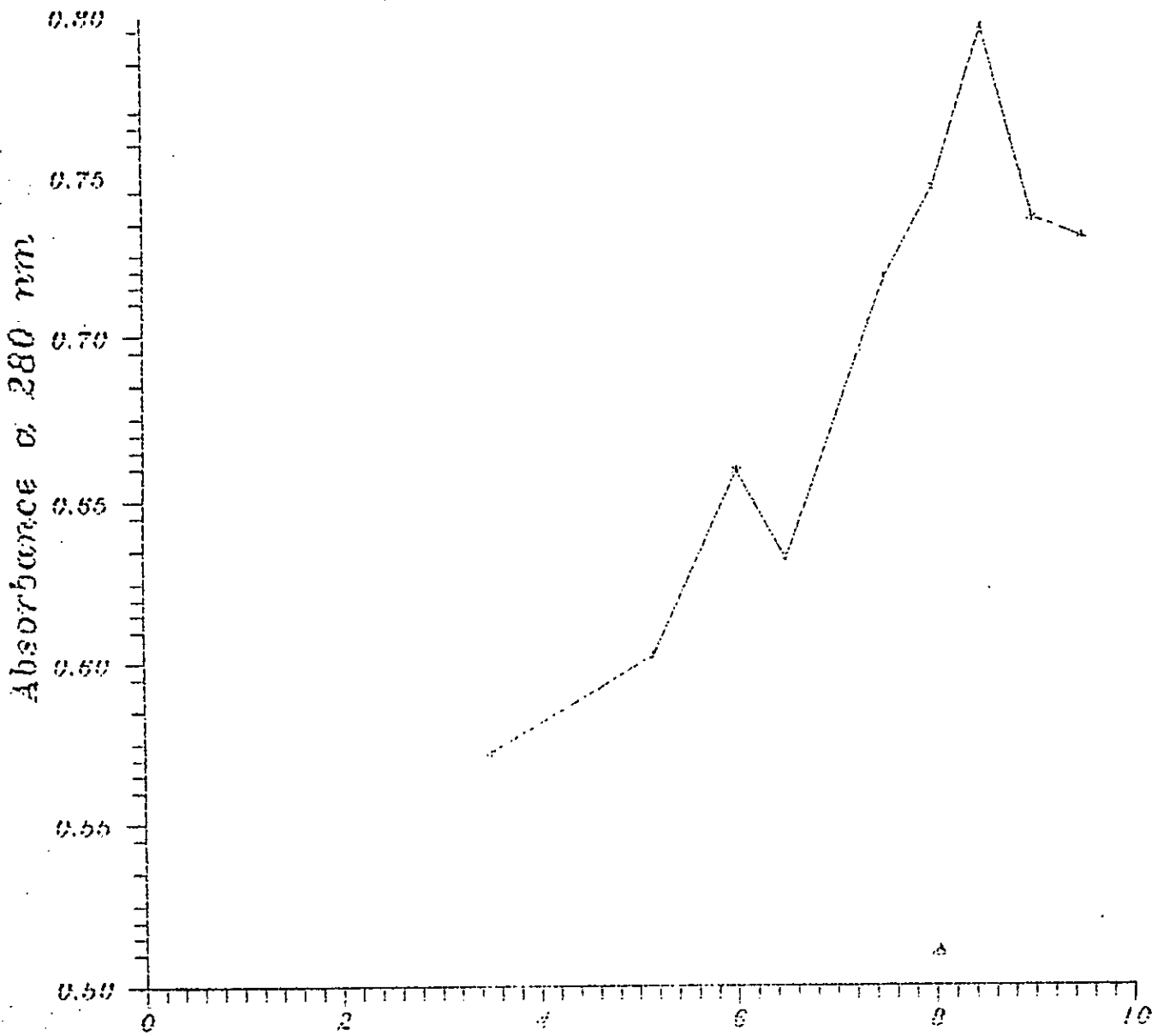
(1) qui correspond à la solution enzymatique la plus active (ayant une absorbance maximale).



PARTIE EXPERIMENTALE

Figure: 13

Influence du pH sur l'activité enzymatique .



P.H

Pour passer d'un pH à un autre, il suffit d'ajouter 2 à 3 gouttes de KOH concentrée et mesurer l'activité pour chaque nouveau pH. La gamme d'acidité est choisie de façon à bien entourer la valeur 9 car tous les pH optimaux des différentes enzymes contenues dans le suc pancréatique sont voisins de 9. Pour notre étude nous avons choisi un intervalle de 8.5-9.5.

REMARQUE : Nous considérons dans cette partie que l'ajout de 2 ou 3 gouttes de la solution de KOH ne modifie pas la concentration de la solution en enzyme (le volume est pratiquement inchangé).

#### EXPLOITATION :

Les résultats de cette dernière partie nous permettront de tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction du pH de la solution enzymatique. Le pH optimum est alors celui correspondant à la plus grande absorbance.

#### Interprétation:

Le pH optimal de la pancréatine se remarque sur la figure (43) et le tableau ( 9 ). En effet, l'absorbance qui traduit l'activité du mélange d'enzymes croît avec le pH depuis la valeur pH 8.5 jusqu'au pH 9.5 où elle rebrousse chemin.

#### Conclusion :

Les conditions optimales d'action de la pancréatine (activation : pH 7.5, température 40°C, activité pH 9.5) déterminées lors de notre étude sont proches de celles dictées par la bibliographie :

Dans le journal *of food engineering* t. 33, on rapporte les résultats suivants (température 40°C, activité pH 7.5).

Dans le "Pancreas Exocrinus" de J. Pascal t. 41, le pH d'activation de la pancréatine est entre 7 et 8 et le pH d'activité est voisin de 9.

Dans l'article t. 42, on mentionne les conditions optimales suivantes pour la pancréatine commerciale (température 40°C et pH entre 7 et 8).

Ainsi on pourra dire que les résultats que nous avons obtenus pour cette partie sont quand même satisfaisants.

III / ESSAI D'HYDROLYSE PAR LA PANCREATINE BRUTE

### III-1-ESSAI D'HYDROLYSE DES DECHETS D'ABATTOIRS PAR LA PANCREATINE BRUTE :

Préparer par autodigestion, une quantité d'enzyme brute activée à son pH optimum d'activation (5,5), pendant 12 heures et l'ajuster au pH optimal d'activité.

Le substrat étant un broyat de déchets d'abattoirs dilué avec de l'eau distillée dans la proportion de 100 pour 100 en poids.

La proportion Enzyme/Substrat (en poids) variera de façon à entourer la proportion optimale de l'hydrolyse. Dans notre expérience nous avons choisi la gamme de proportions suivante :

7,5%, 9%, 11,5% et 15% et ce pour un volume réactionnel de 200 ml tout en gardant constante la concentration en enzyme.

La réaction devra être effectuée dans les conditions optimales de température et de pH (50° et 5,5 resp.). Le dosage se fera par la méthode du Biuret, et à la Ninhydrine.

#### MODE OPERATOIRE :

Incuber les solutions d'enzyme et de substrat dans le bain marie à 50°C et attendre que celles-ci atteignent l'équilibre (10 min.). Mélanger alors les deux solutions et placer le mélange sous agitation magnétique. A la 15 minute de l'enclenchement de la réaction, faire un prélèvement de 10 ml du mélange réactionnel et le verser dans un tube à essais contenant 5 ml de T.C.A. à 20%.

Laisser agir pendant 10 min et filtrer à l'aveugle un papier Watman (n°3) Faire de même chaque 20 min jusqu'à la 7<sup>ème</sup> heure de réaction et sans arrêter l'agitation, faire un dernier prélèvement après 24 heures.

Les filtrats obtenus seront dosés par la réaction du Biuret et à la Ninhydrine, au spectrophotomètre à 540 nm et 570 nm respectivement (voir annexe).

PARTIE EXPERIMENTALE

A

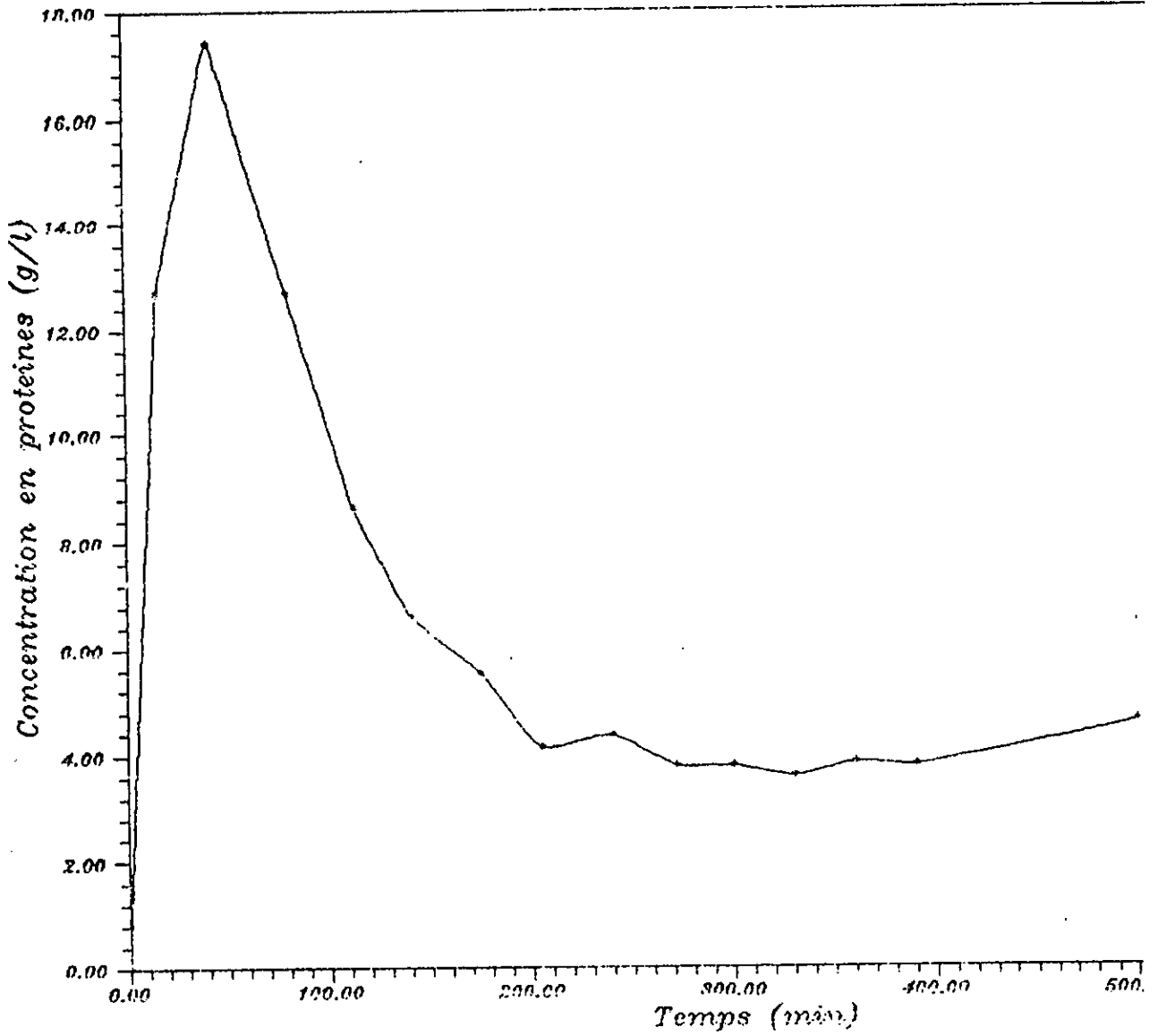


Figure 44 premier essai d'hydrolyse (E/S = 9%)

EXPLOITATION :

Cette partie de l'expérience fournira, pour différents temps de réaction, des densités optiques qui seront converties en concentrations en protéines au moyen d'une courbe d'étalonnage établie préalablement. Cela permet de tracer la courbe de l'évolution de la concentration de protéines hydrolysées en fonction du temps et déterminer le rendement de l'hydrolyse pour chaque proportion E/S et voir la meilleure.

Interprétation :

Le suivi de cette hydrolyse nous a été très difficile et complexe. D'une part, par ce que la pancréatine a tendance à transformer les protéines en acides aminés en passant, bien sûr, par le stade polypeptides et peptides. D'une autre part, notre étude n'avait pas envisagé de prévoir toutes les conditions optimales pour mener à bien la réaction d'hydrolyse. En effet à part l'influence de la température et le pH le régime de l'agitation et la dilution jouent un rôle dans l'hydrolyse. Et si ces paramètres ne sont pas fixés pendant les expériences, on risque d'avoir une irreproductibilité et une faiblesse des résultats. C'est d'ailleurs notre cas et nous allons le montrer tout de suite.

En un premier essai, nous avons réalisé une hydrolyse avec un rapport E/S de 0%, dans un volume total de 250 ml, dans les conditions optimales de température et de pH (sans tenir compte des autres paramètres).

L'évolution de la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps s'est avérée - comme le montre la figure - une hyperbole signifiant que la concentration en peptides diminuait au fur et à mesure que l'expérience avançait, dans le temps, pour qu'elle reste constante après la cinquième heure. Un dernier prélèvement a été effectué au bout de 24h la concentration en peptides restait la même que celle mesurée à la 5<sup>ème</sup> heure nous

PARTIE EXPERIMENTALE

Essai d'hydrolyse des déchets solides  
d'obtours pour différentes proportions  
en enzyme brute

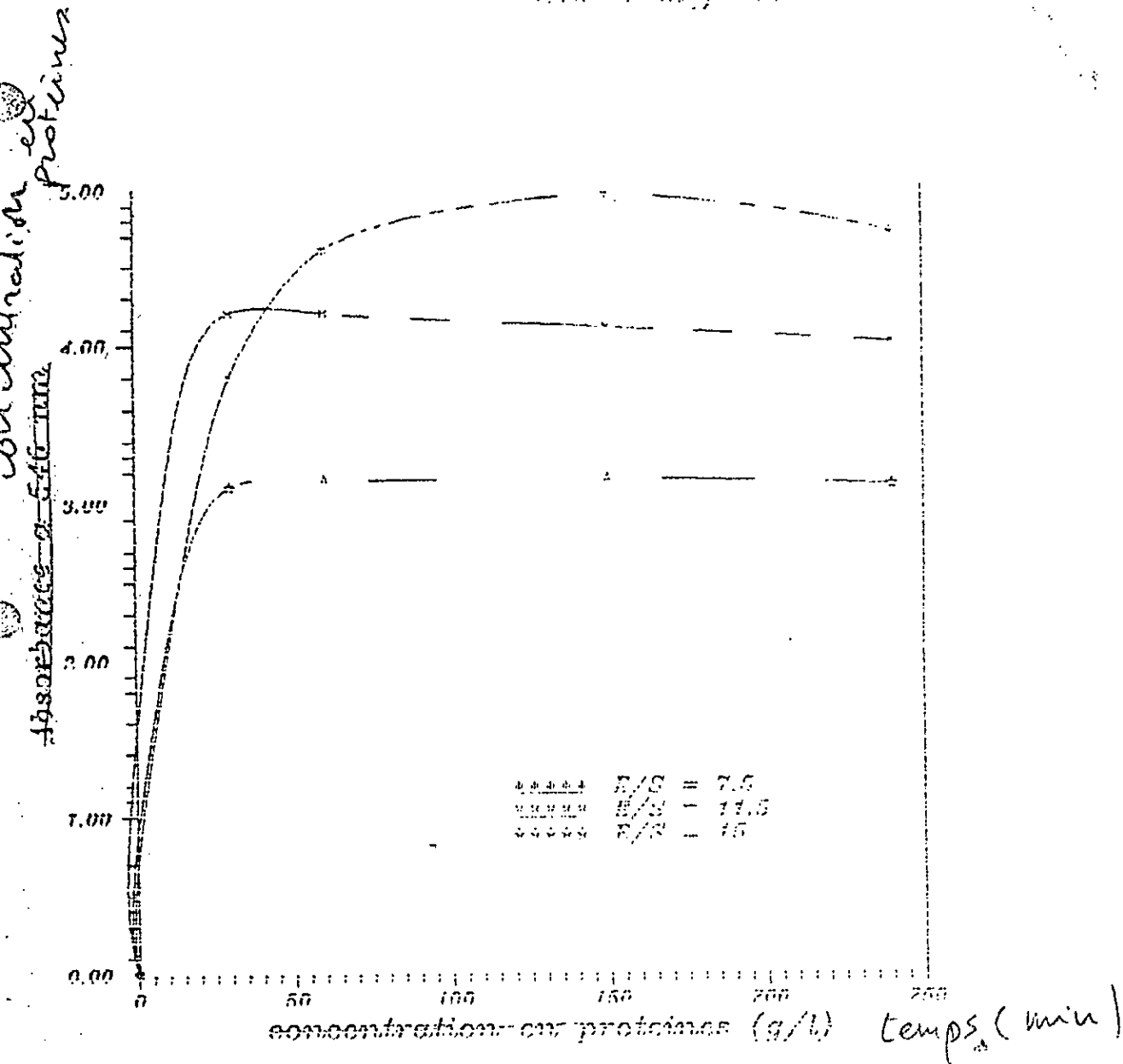
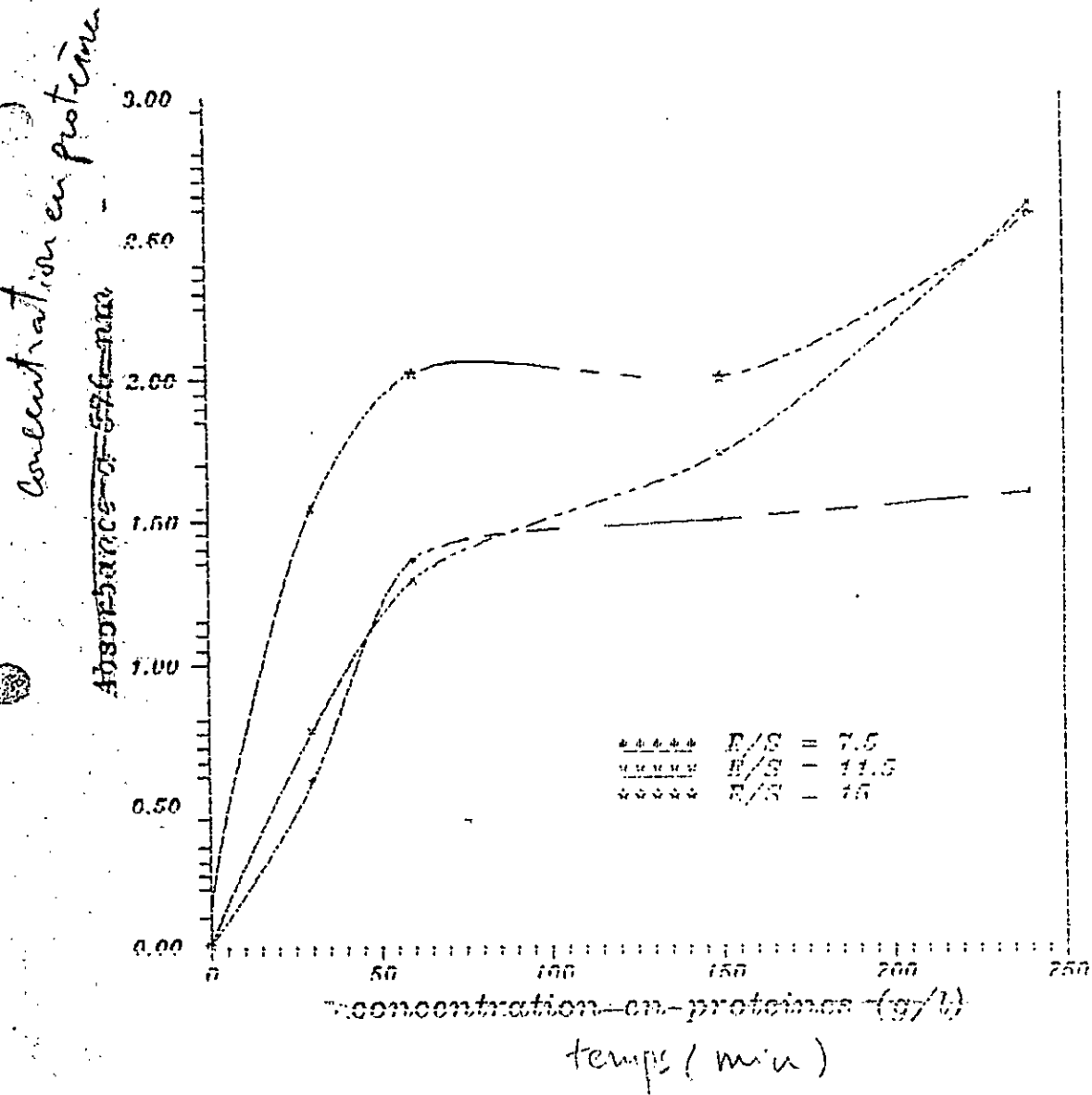


Figure 15

PARTIE EXPERIMENTALE

Figure: 16 Essai d'hydrolyse des déchets solides d'abattoirs pour différentes proportions en enzyme brute (ninhhydrine).



avons alors conclu que l'hydrolyse ne prend que 5 heures de temps.

Par ailleurs, si la concentration en peptides diminuait avec le temps, cela ne nous a pas du tout surpris, du moment que l'on a affaire à la pancréatine des peptides qui disparaissent, se transforment en acides aminés indifférenciables par la réaction du Biuret. Cette première expérience ne peut nous permettre de déterminer le rendement de l'hydrolyse, toute fois elle nous a orienté vers une autre méthode de dosage, une méthode qui dose et les peptides et les acides aminés, pour mieux observer l'évolution de l'hydrolyse.

Pour les trois essais d'hydrolyse suivants et parmi les nombreuses méthodes de dosage des acides aminés, nous avons choisi par faute de moyens, la méthode à la ninhydrine avec laquelle toute molécule est comptée comme un acide aminé (l'acide aminé utilisé pour établir la courbe d'étalonnage) qu'elle soit vraiment un acide aminé ou bien un polypeptide.

Dans les trois essais d'hydrolyse représentés par les figures (45) et (46), les deux méthodes de dosage ont été utilisées pour chaque échantillon prélevé.

-La première méthode au réactif de Biuret, s'est révélée très peu efficace, du fait qu'au bout des 30 premières minutes, la concentration en peptides atteint un équilibre, avant que l'hydrolyse ne s'arrête.

En effet, les peptides apparus dans la solution, s'hydrolysent en acides aminés et d'autres peptides issus de l'hydrolyse des rejets solides viennent les remplacer pour que la concentration globale en peptides reste pratiquement constante.

Il est, toutefois, important de noter que ces résultats ne sont pas pareils à ceux du premier essai. Ceci est dû à l'importance des paramètres omis dans notre expérience (agitation et dilution).

-La deuxième méthode de dosage, à la Ninhydrine, justifie nos propos. En effet, par cette méthode, nous constatons sur les figures (46), que la concentration en molécules assimilées à la



molécule de glycine (peptides et acides aminés) augmentait avec le temps. Par faute de réactif, nous n'avons pu suivre attentivement la réaction ni aller jusqu'à son bout.

mais nous pouvons tout de même voir qu'il y'a effectivement un enrichissement des échantillons prélevés en protéines hydrolysées bien que la réaction du Biuret ne le prouvait pas.

En ce qui concerne les rendements de l'hydrolyse, ni l'une ni l'autre des méthodes ne permet de les déterminer exactement, car dans la première, on n'a point le droit de faire correspondre la quantité de peptides dosés à la quantité de protéines hydrolysées (par ce que les acides aminés ne sont pas dosés). Mais à titre de comparaison, nous avons calculé le pourcentage  $\eta$  de peptides présents en solution par rapport à la concentration initiale de protéines ( $P_0$ ) :

E/S	7.5%	11.5%	15%
$\eta$ %	17	21	21

La deuxième méthode, par contre est plus proche de la réalité que la première, sans toutefois être exacte, car, même ici, on ne peut faire correspondre la masse d'acides aminés à la masse de protéines hydrolysées par ce que la méthode assimile une molécule d'un polypeptide de masse "m" à la molécule d'un acide aminé (ici glycine) de masse  $m/n$  (n étant le nombre d'acides aminés formant le polypeptide). Ainsi les rendements calculés ne seront pris qu'en outils de comparaison :

E/S	7.5%	11.5%	15%
$\eta$ %	5.3	10.05	17.13

Ces rendements calculés et comparés, il en ressort, qu'une proportion E/S de 11,5 est optimale pour la transformation des protéines en peptides. Par contre, si l'on veut aller plus loin dans l'hydrolyse et produire beaucoup plus d'acides aminés, une proportion E/S de 15% est préférable.

Les rendements réels de l'hydrolyse, bien que non déterminés d'une façon exacte, sont faibles. Cela est dû à un problème que nous avons rencontré pendant l'expérience de substrat broyé soumis à l'agitation s'agglomérant autour du barreau magnétique pour former un bloc de sorte que la concentration en protéines en solution soit considérablement réduite. Pour assurer un bon déroulement de l'hydrolyse, il faudra régler ce problème.

En conclusion, nous dirons que cette étude pourra être améliorée en utilisant des méthodes de dosage plus adéquates.

#### Résumé :

nous donnons comme premiers résultats pour d'autres études ultérieures :

- Température optimale : 50°C;
- pH optimal d'activation : 5,5 ;
- pH optimal d'action : 9,5 ;
- rapport E/S : 15 % .

Le régime de l'agitation et le facteur de dilution sont des paramètres à étudier .

Pour le dosage, il faudra penser à une méthode qui tienne compte de la présence simultanée de peptides et d'acides aminés .

III-2-ETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE :

La cinétique de la réaction de l'hydrolyse des protéines peut-être suivie par quantification des protéines hydrolysées (acides aminés et peptides) pendant les premières minutes de la réaction .

MODE OPERATOIRE :

Préparer dans les conditions optimales de pH une solution de pancréatine brute. Les solutions de substrat sont préparées à partir de bœuf de déchets solides de façon à avoir les concentrations suivantes : 4000:20 et 160 g/l .

Ramener les solutions d'enzyme et de substrat aux conditions optimales de travail (pH 8.5 et T° 50°C)

A un instant choisi comme zéro, déclencher la réaction en assurant une bonne agitation . Un échantillon de 5 ml est prélevé du mélange réactionnel à la deuxième minute de la réaction puis un autre à la dixième minute .

L'échantillon prélevé ,le mélanger à 3 ml de TCA à 20%, attendre 5 à 10 minutes puis filtrer à l'aide d'un papier Whatman (n°2) .

doser alors les peptides et les acides aminés contenus dans le filtrat ,par une méthode convenable (dans notre cas nous avons dosé par la méthode du Biuret et à la Ninhydrine simultanément) .

EXPLOITATION :

Les résultats obtenus dans cette partie, consistent des densités optiques en fonction du temps qui seront converties en concentrations en peptides et acides aminés .

Il sera alors possible de tracer des courbes d'évolution de la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps, pour chacune des concentrations en substrat, et déterminer la vitesse maximale et la constante de MICHAELIS (Km), paramètres cinétiques de l'hydrolyse .

PARTIE EXPERIMENTALE

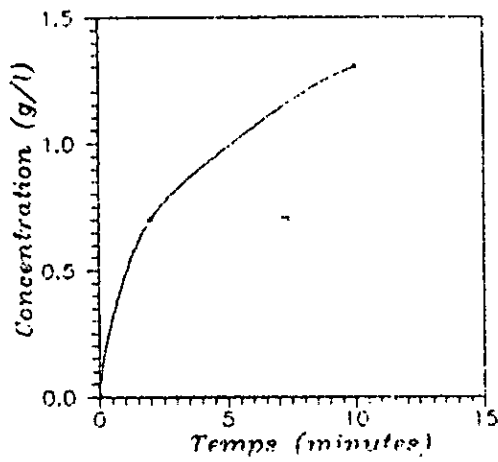


Figure: 17 (a)

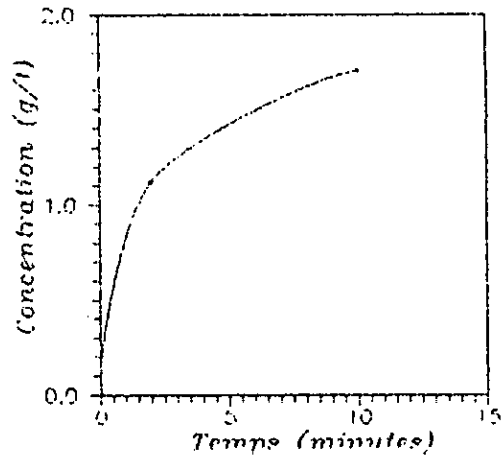


Figure: 17 (b)

Figure: 17 (d)

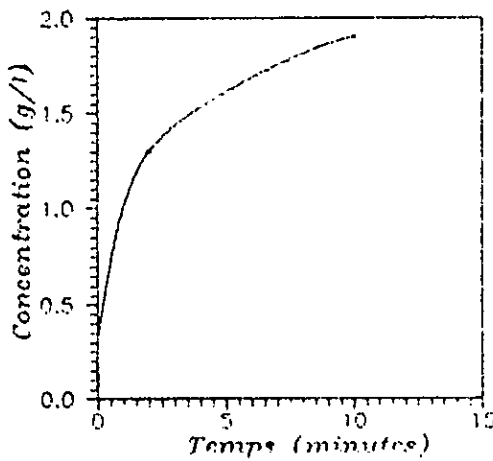


Figure: 17 (c)

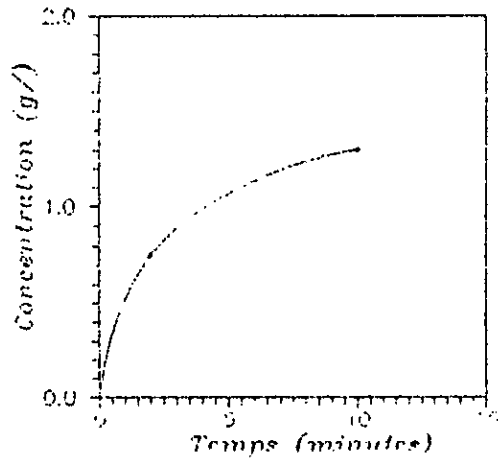


Figure: 17. - Cinétique -  
variation de la concentration en fonction du temps - Biuret

PARTIE EXPERIMENTALE

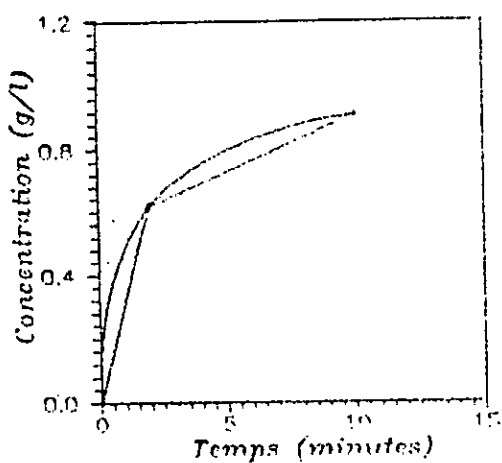


Figure: 18 (a)

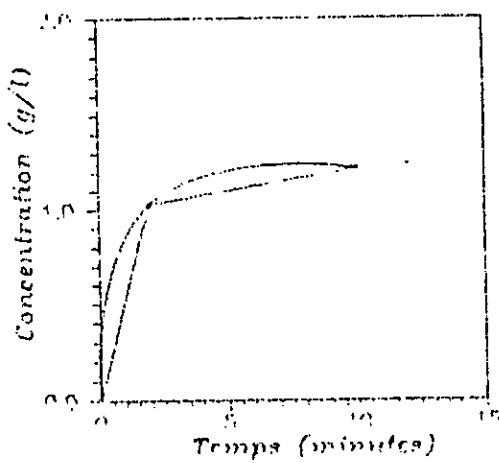


Figure: 18 (b)

Figure: 18 (d)

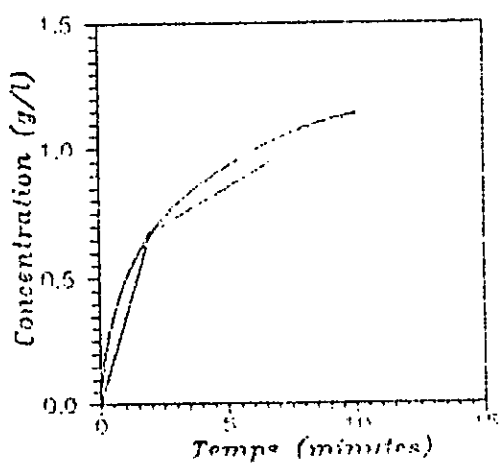


Figure: 18 (c)

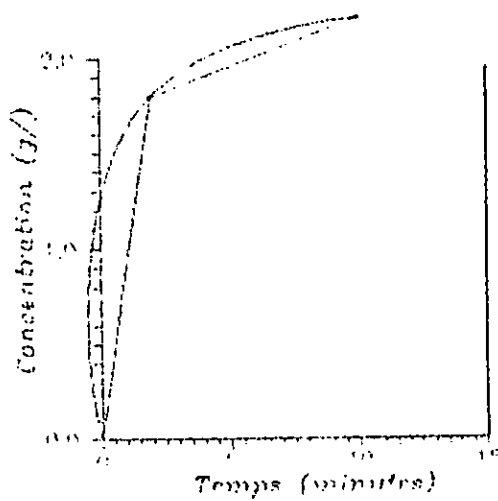


Figure: 18 - Cinctique -  
variation de la concentration en fonction du temps - Ninhydrine -

PARTIE EXPERIMENTALE

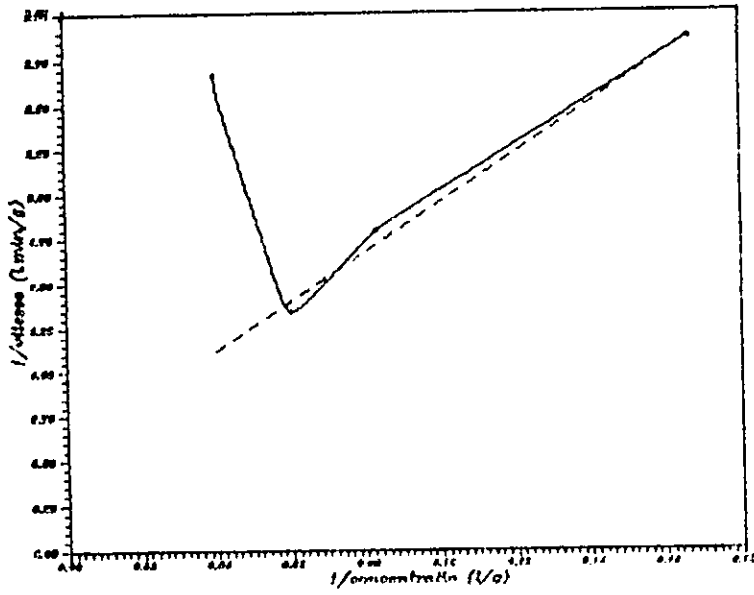


Figure : 14) Représentation de LINWEAVER BUNK  
(A) Biuret

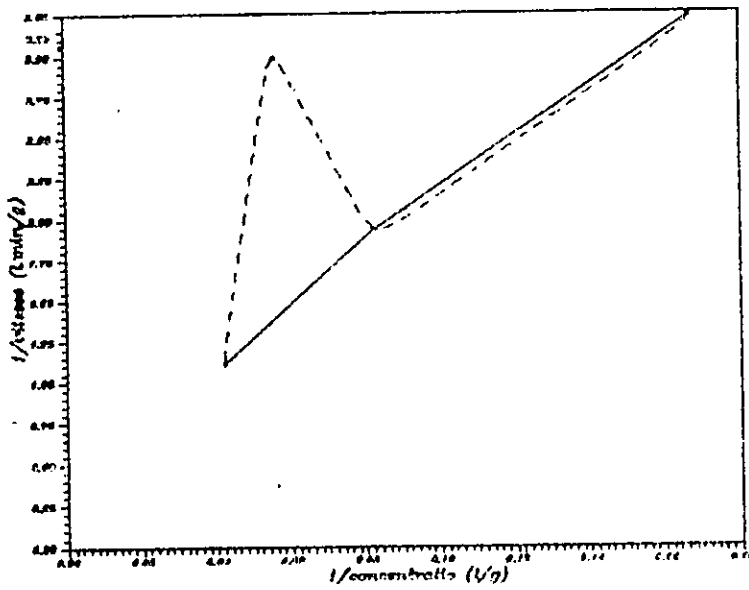


Figure : 15) Représentation de LINWEAVER BUNK  
(B) HIndydrise

Interprétation :

Les courbes de variation de la concentration en fonction du temps ayant été tracées (Figures 418), nous avons déterminé les vitesses initiales de l'hydrolyse :

Les courbes de variation des vitesses initiales en fonction de la concentration initiale en protéines, donnent des résultats apparemment contradictoires, mais en analysant les choses, nous trouverons une corrélation entre les deux :

-Par la méthode du Biuret, en utilisant le tracé de LINWEAVER BURK, nous obtenons une courbe rappelant celle du cas d'une inhibition par le substrat. En effet, on observe une linéarité de la relation vitesse-concentration en substrat, jusqu'à une concentration de 120 g/l (P=19 g/D). A partir de laquelle la vitesse devient inversement proportionnelle à la concentration. Par projection de la partie linéaire de la courbe sur l'axe des vitesses, on obtient la vitesse maximale de l'hydrolyse:  $[V_m = 11,36 \text{ g/lmin}]$ , et par projection sur l'axe des concentrations, on tire la valeur de la constante de Michaelis :  $[K_m = 11,36 \text{ g/l}]$ .

-Par la méthode à la ninhydrine, par contre, on obtient, en omettant le point aberrant, une droite presque identique à la précédente et dont les intersections avec les axes de coordonnées sont proches de ceux tracées par la méthode du Biuret :  $[V_m = 11,25 \text{ g/lmin}]$  et  $[K_m = 11,36 \text{ g/l}]$ .

La seule différence fondamentale qui existe entre les résultats obtenus par l'une et l'autre des méthodes, réside dans la nature des courbes. En effet, à la ninhydrine, l'hydrolyse paraît Michaelienne et, au Biuret, elle est inhibée par l'excès de substrat. Nous pourrions expliquer cela comme suit :

Les paramètres cinétiques des deux méthodes étant très

préches, il s'agit donc de résultats reproductibles normalement logiques. La logique des choses s'observe lorsqu'on se rend compte que l'on est en présence d'un mélange d'enzymes où l'on peut trouver celles dont l'action s'inhibe par l'excès de substrat et d'autres qui ne s'inhibent pas, c'est ainsi que par exemple la trypine libérant les peptides dosés par la méthode du filmot, est inhibée par le substrat, par contre la carboxypeptidase qui libère les acides aminés n'est pas inhibée lorsque la chymotrypsine l'est.

En résumé :

*La cinétique de l'hydrolyse des rojets solides d'abattoirs par la pancréatine brute est michaelienne inhibée (sous réserve) par l'excès de substrat.*

Les valeurs moyennes des paramètres cinétiques sont :

$$V_m = 1.31 \text{ g/lmin} \quad ; \quad K_m = 17.60 \text{ g/l}$$

L'équation de la cinétique est :

$$V / 1.31 = S / (S + 17.6) \quad \text{g/lmin}$$

$$\square \square \square \square \square$$



## IV / ESSAI DE DIGESTION ARTIFICIELLE

La digestion artificielle des protéines a été effectuée en simulation de celle qui se passe à l'intérieur d'un organisme vivant .

C'est une opération qui se passe en deux étapes : une hydrolyse par la pepsine à pH acide et une température de 48°C, puis dans un autre réacteur par la pancréatine à pH basique et une température de 50°C.

MODE OPERATOIRE :

Le mode opératoire est le même que celui de l'essai d'hydrolyse précité et ce pour les deux étapes de la digestion .

Nous avons imaginé un montage (voir figure 21) qui pourra être adopté pour réaliser cette expérience même à l'échelle semi-pilote .

Interprétation :

Par faute de ninhydrine nous n'avons dosé les protéines hydrolysées que par la méthode du Biuret, peu efficace .

Pendant la première étape de l'opération plusieurs essais ont été effectués, mais la pepsine nous a paru peu active .

Cependant la même préparation a été utilisée dans l'expérience de notre collègue pour hydrolyser les déchets de poissonneries et a donné un rendement élevé . Nous avons aussi rencontré le problème de l'agglomération des particules de broyat autour du barreau magnétique, ce qui explique la faiblesse du rendement de la pepsine par rapport à l'heure de réaction nous avons obtenu un rendement de 15,5% .

Nous sommes alors passés à la deuxième étape de l'expérience, où le rendement a repris ses conclusions. Un

PARTIE EXPERIMENTALE

FIGURE: 20. Essai de digestion des déchets solides d'abattoirs

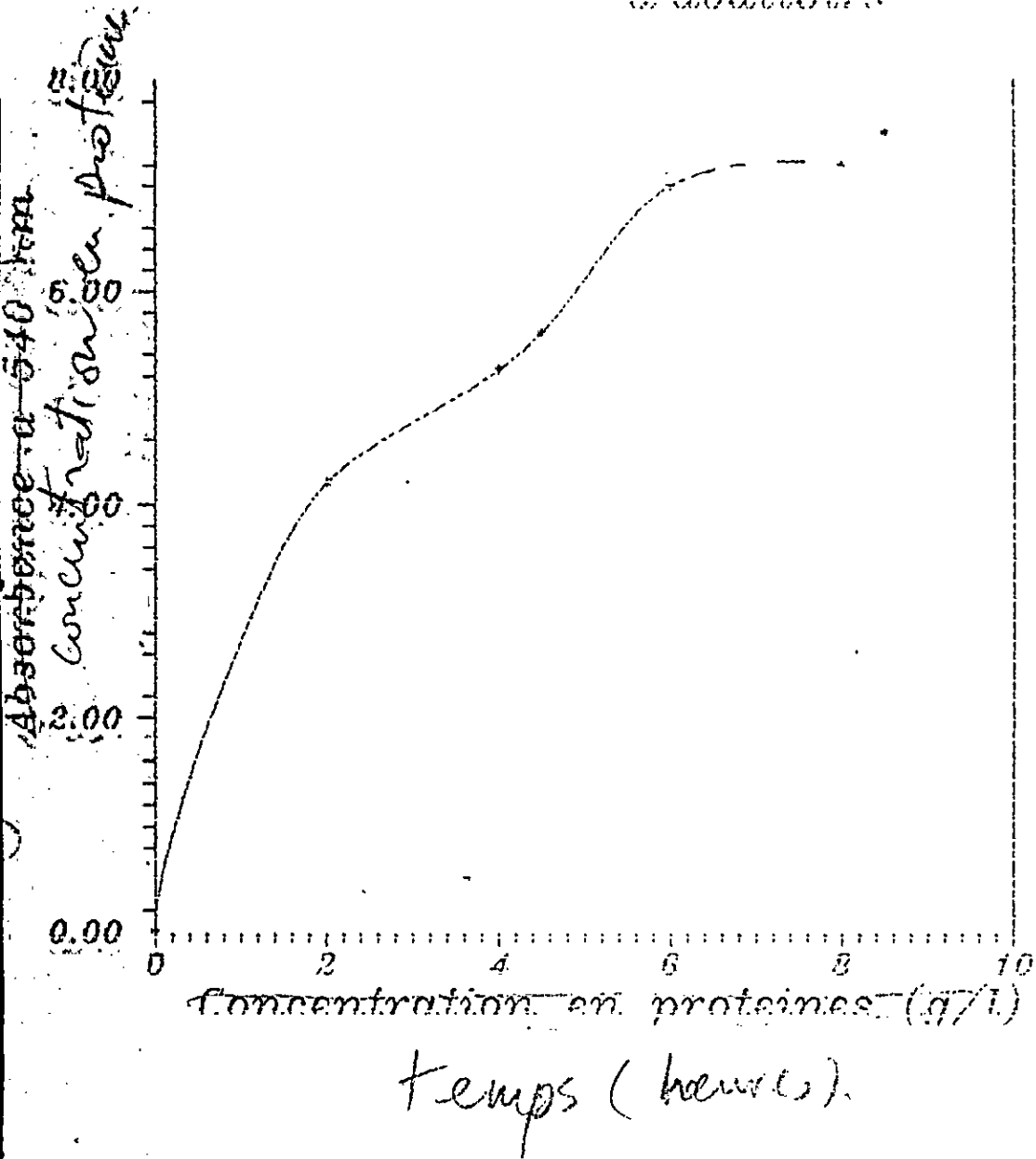
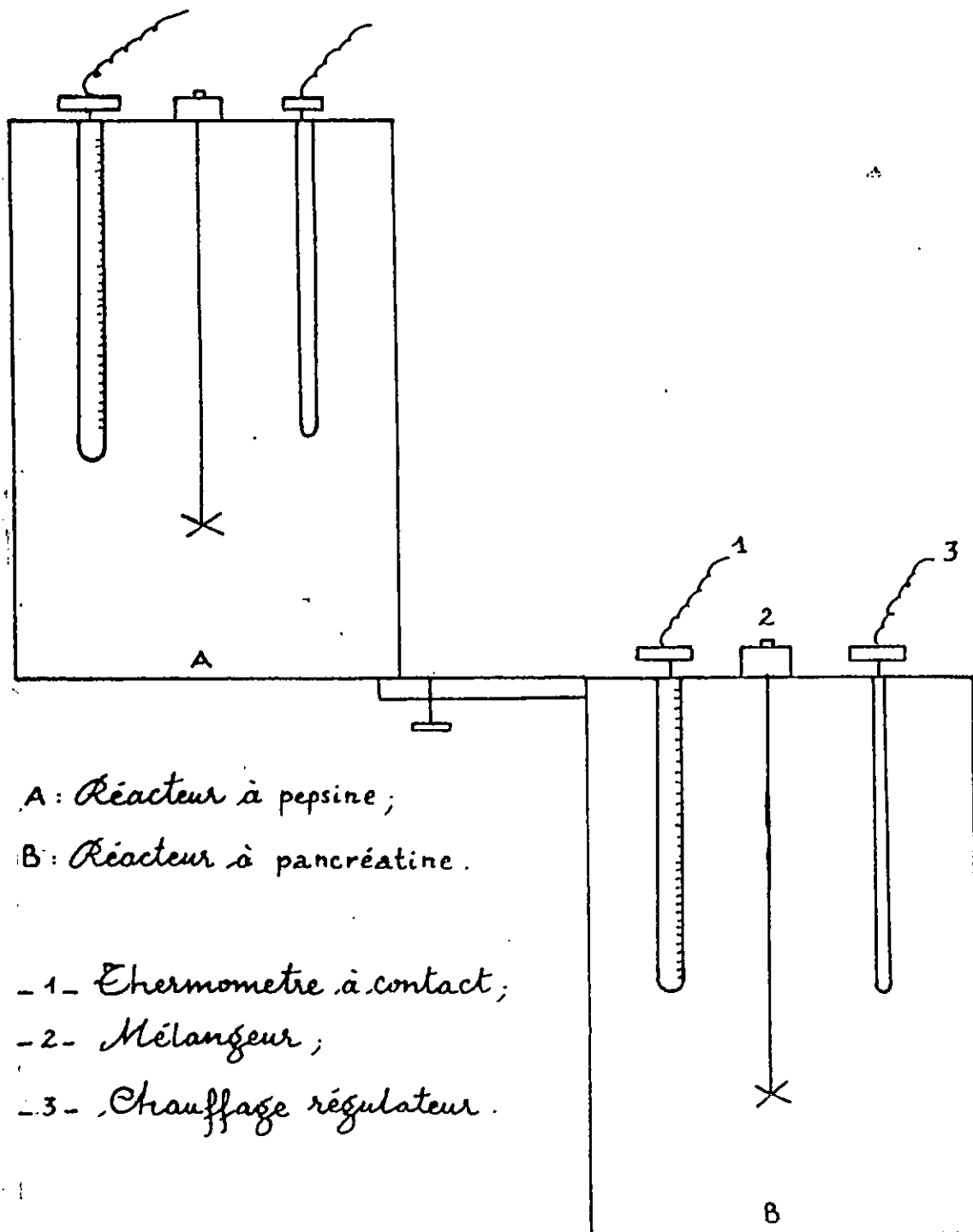


Figure: 21 Schéma du réacteur de digestion



## PARTIE EXPERIMENTALE

---

rendement final de 25 % a été obtenu après 5 heures du déclenchement de cette étape, mais ce chiffre ne reflète point le taux exact du bon déroulement de l'opération.

Pour une première réalisation, nous obtenons le principe et une approche des résultats qui peuvent être obtenus en réalisant une digestion artificielle. Nous retenons que pendant la première étape, les protéines sont hydrolysées en peptides et polypeptides dans un certain rendement, puis dans la seconde, les protéines non hydrolysées s'hydrolysent et les peptides se transforment en acides aminés et on atteint alors un autre rendement, encore meilleur.

□ 0 □

### Conclusion

C'est dans l'espoir de pouvoir poursuivre cette étude, que nous terminons notre travail qui sera un pas en avant dans le chemin de l'exploration des bienfaits de la biochimie sur l'environnement.

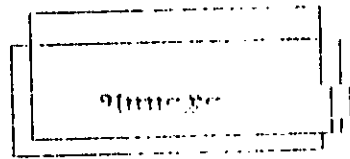
Parti de l'idée de nous débarrasser de la pollution causée par les abattoirs, par le biais de la biochimie nous sommes arrivé à une nouvelle technique de valorisation dont l'avantage réside dans l'utilisation de moyens modestes et pas dutout chers : des enzymes brutes de la nature des déchets, nous avons appelé "Digestion artificielle".

Cette technique consiste en deux réactions d'hydrolyse consécutives. La première à l'aide de la pepsine, travaille le mieux à un pH acide de 2.5 et une température de 48°C. Sa cinétique est Michaelienne et présente une inhibition au delà d'une certaine concentration en substrat.

La seconde réaction d'hydrolyse à l'aide de la pancréatine qui préfère travailler à un pH de 8.5 et une température de 50°C. Sa cinétique est partiellement inhibée en présence d'un excès de substrat. Une proportion Enzyme/Substrat de 11.5% a été jugée optimale pour mener à bien l'hydrolyse par la pancréatine brute.

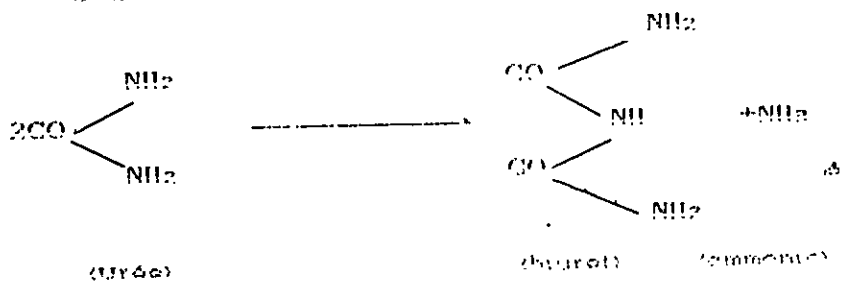
Le rendement de la digestion a été estimé à 25 % par approximation. L'imprécision des résultats découle de celle des méthodes de dosage utilisées.

Cependant, pour une étude première en son genre, les résultats sont, dans l'ensemble, acceptables à condition de servir de support pour des études visant leur amélioration en envisageant des méthodes de dosage plus adéquates et en s'arrêtant sur l'étude des paramètres omis dans notre travail.



I. REACTION DU BIURET

Elle se produit avec le biuret, corps qui se forme quand on chauffe de l'urée avec précaution, par union de deux molécules d'urée et dégagement d'ammoniac :



d'où le nom de "réaction de biuret". Elle se produit avec tous les corps qui renferment dans leur molécule la liaison peptidique -NH-CO-. Quand on ajoute à une solution de protéines et de polypeptides, alcalinisée par la soude ou la potasse, une petite quantité de sulfate de cuivre, il apparaît une coloration violette.

Réactif

- 1° solution de NaCl à 9 % ;
- 2° solution alcaline du complexe cuivrique, .... :
  - sulfate de cuivre cristallisé 5 H<sub>2</sub>O sp. .... 0,225 g ;
  - tartrate double de Na et de K. .... 0,94 g ;
  - soude caustique en pastilles pure. .... 2,60 g ;
  - eau distillée. .... 100 ml .

Introduire dans une fiole jaugée de 100 ml, le sulfate de cuivre et 40 ml d'eau distillée. Après dissolution ajouter le tartrate double. D'autre part, dissoudre la soude caustique dans 50 ml

d'eau distillée. Après dissolution complète de part et d'autre, verser la soude caustique dans le ballon de 100 ml, agiter de façon à obtenir un liquide bleu limpide. Attendre le complet refroidissement et compléter à 100 ml par de l'eau distillée. Le réactif ainsi préparé se conserve plusieurs semaines à condition d'être bien bouché.

Cette réaction du Bijouet est utilisée pour le dosage des protéines :

#### MODE OPERATOIRE

Diluer l'échantillon à doser au 1/20<sup>ème</sup> avec de l'eau physiologique. Prélever 1 ml de cette dilution et ajouter 4 ml de réactif de connalibion mélanger, attendre 30 min à l'obscurité et lire l'absorbance au spectrophotomètre UV.

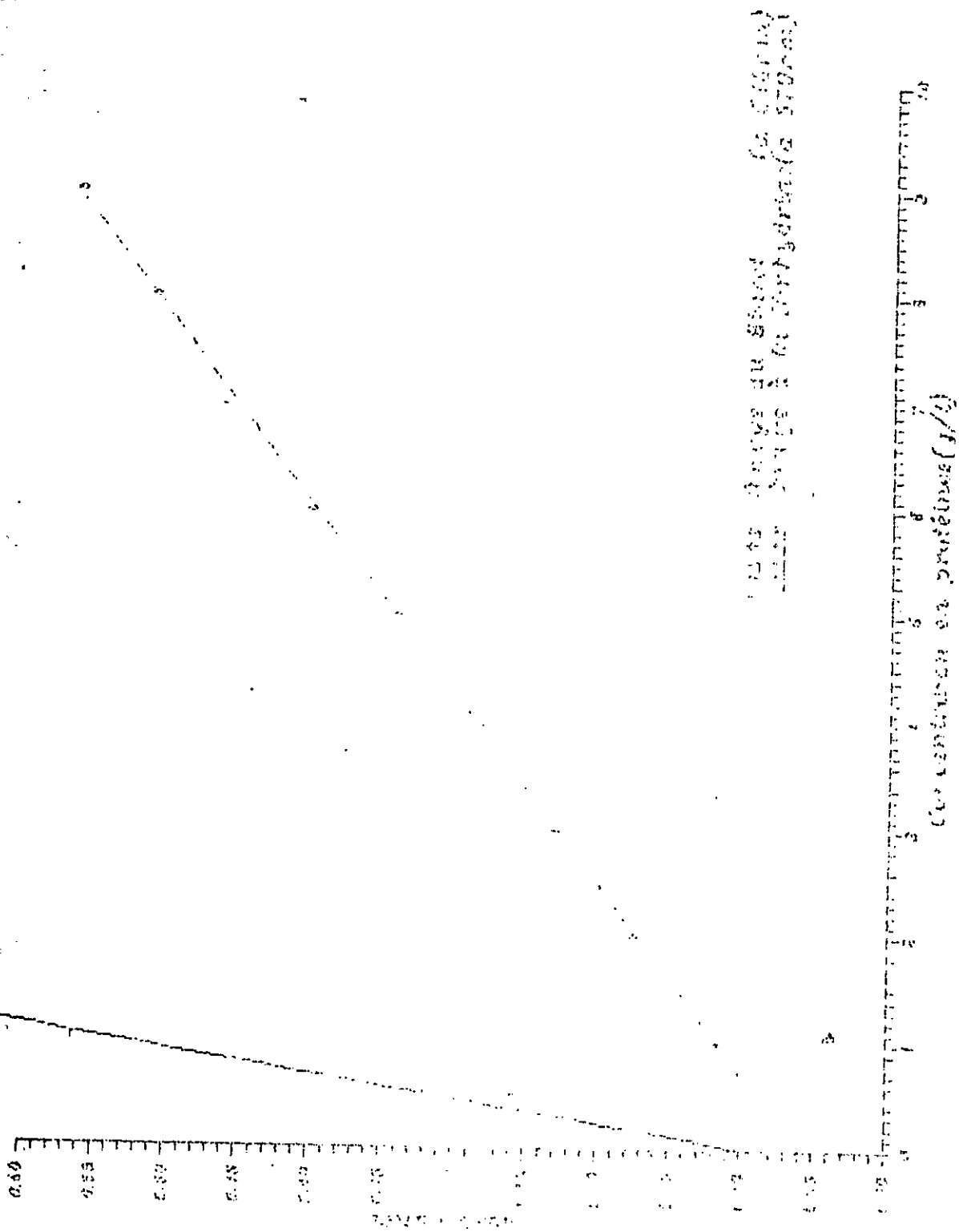
A partir des absorbances et en tenant compte de la dilution, déduire la concentration sur la courbe d'étalonnage établie à l'aide d'un sérum étalon.

## II. REACTION COLOREE A LA NINHYDRINE

C'est une réaction fondamentale pour la détection des acides aminés. La ninhydrine a remplacé tous les réactifs utilisés autrefois pour le dosage des acides aminés. La réaction qu'elle donne avec les groupements aminés est complexe, le produit final est coloré (violet) et la coloration obtenue permet une mesure directe de la concentration en acides aminés avec une *grande sensibilité*.

La ninhydrine est un oxydant puissant qui par une déamination oxydative des acides aminés, conduit à l'aldéhyde correspondant, avec libération d'ammoniac et de CO<sub>2</sub> et formation de ninhydrine réduite (hydrindantine). Dans un second temps, l'ammoniac réagit avec l'hydrindantine et une autre molécule de ninhydrine pour donner un composé bleu violacé, le pompe de bihémato.

PARTIE EXPERIMENTALE



Concordance des courbes pour le dosage des protéines et des Actes Actives par les deux méthodes

Figure 22



DOSAGE A LA NINHYDRINE

PRINCIPE

La ninhydrine (hydrate de triisobutylindène) réagit avec les acides aminés entre pH 4 et 11 pour donner un composé coloré en pourpre.

Les acides aminés ne donnent pas tous la même intensité de coloration (ce qui doit être pris en compte).

La proline et l'hydroxyproline donnent une coloration jaune visible à 440 nm.

Réactif à la ninhydrine

Dissoudre 0,8g de ninhydrine et 0,12g d'hydrindantine dans 20 ml de méthyl-cellosolve et 10 ml de tampon acétate (1 mole/litre, pH 5,5) préparer extemporanément, et garder à l'abri de la lumière (attention :CACERIGENE D).

MODE OPERATOIRE

Pipetter 2 ml de la solution d'acide dans un tube, ajouter 2 ml de réactif à la ninhydrine et incubé 15 min dans un bain marie bouillant. Laisser refroidir à la température de la pièce, ajouter 3 ml d'éthanol à 50 % et lire l'absorbance à 570 nm après 10 minutes. (ne pas oublier le blanc d'aire une courbe d'étalonnage).

PARTIE EXPERIMENTALE

III / RESULTATS DES EXPERIENCES

Tableau (6) Conservation à 4°C

pH/jours	0	1	2	3	4	5	6	7	8
5.5	951	960		790	741	707	565	330	290
6.5	850	916	582	602	526	520	407	281	238
7.5	828	919	593	586	527	465	368	/	297
8.0	855	895	544	560	514	455	327	375	286

Tableau (7) Conservation au congélateur

pH/jours	0	1	2	3	4
5.5	0.443	0.452	0.441	0.437	0.530
6.5	0.412	0.213	0.472	0.393	0.410
7.5	0.320	0.325	0.212	0.361	0.225
8.0	0.361	0.442	0.454	0.207	0.404

Variation de l'absorbance(x 1000) pendant la conservation

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau (8) Recherche de la température optimale

Temp °C	25	30	35	37	40	45	50	55	60
ABSorbance à 280	1.272	1.312	1.335	1.33	1.347	1.425	1.620	1.492	1.872
T °C	62.5	65.5	70						
ABS	1.09	1.04	2.50						

Tableau (9) Recherche du pH optimal d'action

pH	3.5	5.2	6.0	6.5	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
ABSORBANCE à 280 nm x1000	572	602	650	682	717	746	795	736	730

TEMPS	30'	1 h	2h 30'	4h	E/S %	P <sub>0</sub> (g/l)	
BIURET 42 510 mμ 1/1000	275	319	339	325	7.5	30	ABSORPTION
	256	300	285	280	11.5	20	
	251	255	234	231	15	15	
NINHYDRINE 570 mμ 1/1000	314	657	705	715	7.5	Rendement (%)	CONCENTRATION
	123	628	707	1140	11.5		
	725	807	85	1130	15		
BIURET	7.0	4.5	4.25	1.70	7.5	-> η = 1%	CONCENTRATION
	1.2	1.2	1.0	1.0	11.5	-> 2%	
	3.1	3.15	3.15	3.1	15	-> 2%	
NINHYDRINE	0.58	1.26	1.50	1.30	7.5	-> η = 5.5%	CONCENTRATION
	1.75	1.22	1.74	1.51	11.5	13.03%	
	1.54	2.0	2.0	2.57	15	17.03%	

Tableau (10)

Resultats des essais d'hydrolyse:  
 Enzyme/Substrat / 7.5 ; 11.5 ; 15%  
 Dosage à la Ninhydrine et au Biuret

PARTIE EXPERIMENTALE

TEMPS	ABSORBANCE à 540 nm	CONCENTRATION (g/l)
16'	845	12.72
42'	715	17.80
1h20'	846	12.60
1h52'	576	8.64
2h21'	440	6.6
2h55'	368	5.52
3h25'	270	4.14
4h	290	4.35
4h32'	270	3.78
5h	252	3.78
5h30'	239	3.58
6h	256	3.84
6h30'	270	3.78
7h	307	4.60

Tableau (11)

Premier essai effectué avec une D/S de  
 $w = 30 \text{ g/l}$   
 A la 42 MINUTE le rendement était de 50%

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau (12) Cinétique - Dosage au Biuret

( Les absorbances sont multipliées par 1000 )

Temps (min)	S=40 g/l		S=80 g/l		S=120 g/l		S=160 g/l	
	ABS	CONC	ABS	CONC	ABS	CONC	ABS	CONC
2'	108	0.7	122	1.12	131	1.3	114	0.75
10'	138	1.3	158	1.7	165	1.9	133	1.3

Tableau ( ) Cinétique - Dosage au Biuret

2'	368	0.62	528	1.03	388	0.67	822	1.80
10'	480	0.91	602	1.22	570	1.14	982	2.21

Tableau (13) Variation de 1/V en fonction de 1/C

c (g/l)	vitesse (g/l.min)		1/c (l/g)	1/vitesse	
	Biuret	ninhydrine		Biuret	ninhydrine
40	0.35	0.310	0.167	2.86	3.23
80	0.56	0.515	0.089	1.70	1.94
120	0.65	0.235	0.056	1.54	2.99
160	0.325	0.000	0.042	2.60	1.11

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau (14) Digestion - Dosage au Biuret

temps	2 h	4 h	4h 30'	6 h	8 h	8h 30'
absorbance	0.294	0.354	0.372	0.449 <sup>A</sup>	0.460	0.475
concentration (g/l)	4.20	5.25	5.60	7.00	7.20	7.50
Rendement	17.5 %		25 %			

## Bibliographie

- (1) P. BOULANGER "Traité de biochimie générale " (2-les enzymes.
- (2) M. CHEVREMMONT. "Notions de cytologie et histologie".
- (3) Y. RUCKEBUSCH. "La mécanique digestive chez les mammifères".  
 Institut technique de l'élevage ovin et caprin .  
 (Notions élémentaires d'anatomie du mouton) I.T.O.VIC. PARIS. 75.
- (4) CLAUDE PAVAU. "Atlas en couleur d'anatomie des bovins."
- (5) J. JANIN. "Méthodes biophysiques pour l'étude des macromolécules"  
 HERMANN. PARIS. 1985.
- (6) SYDNEY A. BERNARD. "Structure et fonction des enzymes."  
 EDISCIENCE 1969. PARIS.
- (7) OLIVIER QUÉBEC C. BOURGEOIS. "Valorisation du sang animal".  
 APRIA. PARIS. 1985.
- (8) Manuel de TP de biochimie. INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE
- (9) SALINA TERRANTI. "Intérêt nutritionnel des farines d'abattoirs  
 de volailles en alimentation animale."  
 P.F.E. INA 1990
- (10) M. MOULAY. "INCORPORATION DES DÉCHETS D'ABATTOIRS  
 EN ALIMENTATION DE POULET DE CHAÎNE"  
 P.F.E. INA 1990 ( étude  
 expérimentale )
- (11) A. ERIBET J.P. PASCAL. "Le pancréas équine - physiologie.  
 Introduction à l'exploration fonctionnelle."  
 MASSON. 1979
- (12) H.W. SCHULTZ. "Food enzymes."  
 AVI-PHET. 1980
- (13) G.A. PALMER. "Cinétique enzymatique."  
 EDISCIENCE. 1979
- (14) L. GHANEM. "Etude de l'extraction et des propriétés  
 de la pepsine ovine pour la coagulation du lait."  
 P.F.E. INA 1990



- (15) C. AUDIGE, G. DUPONT. "Principes des méthodes d'analyses biochimiques."
- (16) O. RE. GAMA. G. MEFORT. "Sciences naturelles."  
HACHETTE, 1968
- (17) J. LAVOLLAY. "La chimie des êtres vivants."  
EDITION Que sais je, 1970
- (18) L. L. LIN, G. M. PIGOTT "Preparation and use inexpensive crude pepsin for enzyme hydrolysis of fish."  
Journal of Food Science, Vol. 46, 1980 X
- (19) CHAPVILLE, H. CLAISER. "Pêche."  
HERMANN, 1976
- (20) C. KESSOUS. "Biochimie structurale."  
C.T.U., 1987
- (21) A. I. LENNINGER. "Biochimie."  
Flammarion, 1977
- (23) KELLOU. "Cours de déchets solides."  
E.N.P., 1992
- (24) Y. RUCKERUSCH. "Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animale." Maloine, S.A. Paris 1991.
- (25) Anonyme "Traitement et utilisation des sous produits animaux"  
F.A.O. 1962
- (26) F. PERCHERON. "Abrégé de biochimie générale." G.L.  
Masson, 1991.
- (28) WEIL. "Biochimie générale."
- (29) Anonyme. "Physiologie - métabolisme."
- (30) P. LUISOT. "Biochimie générale et médicale." vol. 4  
Simep 1983 Lyon
- (31) VALORI S. "Valorisation du 5<sup>ème</sup> quartier."
- (32) J. KRUIH. "Biochimie, étude médicale et biologique II. Métabolisme." Hermann, Paris 1990.
- (33) R. E. VEGA. "Enzymic hydrolysis of fish offal with out added water." Journal of food engineering n° 9. 1988.
- (34) A. GUERRA. "Hydrolyse enzymatique des déchets solides d'abattoirs." P.F.E. E.N.P. 1991.
- (35) O. GAOUAR. "Hydrolyse enzymatique des déchets de poissonneries et ultrafiltration de la biomasse." P.F.E. E.N.P. 91.

- (36) L.DEFAVERI. "Les sous produits " Conference de m<sup>lle</sup> DEFAVERI  
à AUGERS 25-26/10/83 Symposium international .
- (37) J.G. FRENTZ . "Sécurité ,protection de l'environnement,  
prévention des nuisances"Colloque de Poitiers  
17-18 /10 /1984 .
- (38) J.C CHEFTEL . "Protéines alimentaires "  
Techniques et documentation Lavoisier 1985
- (39) "Pourquoi et comment valoriser le 5<sup>ème</sup> quartier ? "  
Fédération Nationale des collectivités locales  
R.T.V.A nov 1984. P27-
- (40) M<sup>r</sup> DAVID -directeur de la prévention des pollutions au  
secrétariat d'état chargé de l'environnement. R.T.V.A 1984 P 22- 26  
"Pollution ,quelle solution ?"
- (41) Compte rendu "Journée d'étude sur la valorisation des déchets  
des industries agro-alimentaires et agricoles"  
RTVA n° 182 -oct 82, Lyon 20-21 /10/82. Page 61-66
- (42) MALCOLM. B. HALL. "relative activities of commercially  
Available enzymes in the hydrolysis of fish protein"  
Food Technology janvier 1969
- (43) Les abattoirs "Manuel de l'agent d'assainissement."  
O.M.S bureau régional de l'Europe 1965.
- (44) M.DERATISSE . "Techniques d'analyse et de contrôle dans les  
industries agro-alimentaires " VOL.2, Ed AFRIA PARIS 1981
- (45) DAVID J.FLUMMER "Introduction aux techniques de biochimie"  
Ed Mc Graw Hill Paris 1980.