

وزارة التعليم العالي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

## ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT *Genie de l'environnement*

# PROJET DE FIN D'ETUDES

### S U J E T

*Traitement et valorisation des  
rejets solides de poissonnerie  
par voie enzymatique.*

Proposé par :

D<sup>r</sup>. D. MAMERI

Etudié par :

M. I. ANNOU

Dirigé par :

D<sup>r</sup>. D. MAMERI

PROMOTION :

1992

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله الذي هدانا لهذا  
الذي كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله

## Dédicaces

- À ma très chère mère qui a consenti  
beaucoup de sacrifices à mon égard
- À la mémoire de mon père.
- À ma chère grand-mère
- À mes frères et sœurs
- À toute ma famille
- À H. BABAHANI.
- À tous mes amis et ceux qui me sont  
chers.

Je dédie ce modeste travail.

# Remerciements

Au terme de ce mémoire, qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde reconnaissance à Mme MAMERI pour avoir proposé et dirigé ce travail avec beaucoup d'attention.

Je remercie, Mr N MAMERI, directeur du Laboratoire des Biotechnologies à l'ENP, où a été réalisé ce travail, pour son aide et ses précieux conseils.

Je remercie également les membres du Jury :

|         |      |            |              |
|---------|------|------------|--------------|
| - Melle | F.   | HADDOUD    | Président    |
| - Mme   | N    | ABDI       | Examinatrice |
| - Mr    | M.S. | BENHABILES | Examinateur  |
| - Mr    | A.   | CHERGUI    | Invité       |

qui ont bien voulu m'honorer de leur présence et d'avoir l'amabilité de juger ce modeste travail.

Je tiens à remercier vivement :

\* Melle SAKHRI directeur de laboratoire de bactériologie au C.A.C.Q.U.E, pour sa contribution à la réalisation des analyses bactériologiques.

\* Les techniciens MAHFOUD et NOUAR pour leurs aides précieuses.

\* L'équipe de nuit : K. AIT ALI ; A FOU DHIL ; A MEDJAHDI et tous les autres pour l'ambiance qui a régné aux laboratoires.

\* Tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance et gratitude à tous ceux qui ont de près ou de loin participé à la réalisation de ce travail.

Brahim

ملخص: يستهدف عملنا هذا تقديم محلول انزيمي لبروتينات السمك بطريقة اقتصادية. لقد استعملنا لهذا الغرض أنزيمه ثم إنتاجها في المخبر، وهي مشتقة من العشاء المعدي للخروف. مصدر البروتينات هو البقايا الصلبة للمعامل تحويل السمك. هذه البقايا كانت موضوع تحليل جراثيمي لمعرفة مدى عدواها. وفي الأخير قمنا بدراسة المحلول (المنتوج) قصد معرفة محتوياته من الأحماض الأمينية الأساسية ومدى قدراته على تقوية أخذية الأنعام.

Summary: This study is concerned with the preparation of a fish protein hydrolysate by an economic process.

The enzyme used for this purpose, is the pepsin obtained from sheep stomach mucosa.

Fisherie solide waste were used as a substrat and their bacteriological quality was assaassed

Finally, the essential amino-acide profil of the hydrolysate was determined in ordre to test his ability to supplemente the animal food.

Resumé: Cette etude concerne la préparation d'un hydrolysate enzymatique, par un processus économique.

L'enzyme utilisée lors de cette etude est une pepsine brute extraite de la muqueuse stomacale d'un mouton.

Les rejets solides de poissonnerie, on fait l'objet d'une analyse bactériologique, pour estimer leur degré de contamination.

En fin, le profil en acides aminés essentiel de l'hydrolysate a été déterminé pour évaluer son aptitude à compléter la ration alimentaire animale.

SOMMAIRE

|   |    |
|---|----|
| Introduction  |    |
| CHAPITRE 1 : Revue bibliographique.....                                       | 3  |
| 1.1 Etudes antérieures.....   | 4  |
| 1.1.1 Procédé de Sripathy et coll.....  | 4  |
| 1.1.2 Procédé de Miyada et coll.....  | 4  |
| 1.1.3 Etude de M.B.Hale .....   | 5  |
| 1.1.4 Etude de E.Yanez et coll. ....  | 5  |
| 1.1.5 Procédé de Pigott et Bucove .....                                       | 6  |
| 1.1.6 Etude de P.A.Carroad et coll. ....                                      | 6  |
| 1.1.7 Travaux de L.L.Lui et G.M.Pigott .....                                  | 8  |
| 1.1.8 Travaux de R.F.Vega et coll. ....                                       | 8  |
| 1.1.9 Travaux de l'équipe de Biotechnologie<br>de l'E.N.P. d'Alger .....      | 9  |
| 1.2 Procédes de valorisation des sous produit<br>de la pêche.....             | 10 |
| 1.2.1 La fabrication de blocs de chair .....                                  | 10 |
| 1.2.2 Extraction par les solvants .....                                       | 10 |
| 1.2.3 Fabrication de la farine de poisson .....                               | 11 |
| 1.2.4 Fabrication de concentré proteique pour<br>l'alimentation humaine ..... | 11 |
| 1.2.5 Fabrication d'hydrolysats .....   | 12 |
| 1.2.5.1 Autolysats.....   | 12 |
| 1.2.5.2 Hydrolysats chimique .....  | 14 |
| 1.2.5.3 Hétérolysats ou hydrolysats enzymatiques.....                         | 14 |
| 1.2.6 Fabrication du Surimi .....   | 14 |
| 1.2.7 Préparation de molécule à usage industriel....                          | 15 |
| 1.3 L'industrie halieutique .....   | 15 |

|  |    |
|--|----|
| 1.3.1 Introduction   | 15 |
| 1.3.2 Industrie halieutique Algerienne                           | 16 |
| 1.3.3. Présentation de l'usine de Dellys                         | 20 |
| 1.3.3.1 Introduction   | 20 |
| 1.3.3.2 Les étapes de traitement de poisson                      | 20 |
| 1.3.3.3 Les rejets solides dans la chaîne<br>de fabrication      | 20 |
| 1.4 Etude du rejet   | 21 |
| 1.4.1 Introduction   | 21 |
| 1.4.2 Valeur nutritionnelle du poisson et<br>importance du rejet | 22 |
| 1.4.3 Analyses bactériologiques du rejet                         | 25 |
| 1.4.3.1 Introduction   | 25 |
| 1.4.3.2 Caractéristiques des germes recherchés                   | 28 |
| 1.5 Etude biochimique  | 28 |
| 1.5.1 Les acides aminés et les protéines                         | 28 |
| 1.5.1.1 Les acides aminés  | 28 |
| 1.5.1.2 Les protéines  | 29 |
| 1.5.2 Les enzymes  | 31 |
| 1.5.2.1 Introduction   | 31 |
| 1.5.2.2 Historique   | 32 |
| 1.5.2.3 Structure des enzymes                                    | 33 |
| 1.5.2.4 Le site actif  | 33 |
| 1.5.2.5 Classification des enzymes                               | 33 |
| 1.5.2.6 Les enzymes protéolytiques                               | 35 |
| 1.5.2.7 Exemple d'enzymes protéolytiques                         | 36 |
| 1.5.3 Cinétique enzymatique                                      | 38 |
| 1.5.3.1 Introduction   | 38 |
| 1.5.3.2 Influence de la concentration en enzyme                  | 38 |
| 1.5.3.3 Influence de la concentration en substrat                | 39 |
| 1.5.3.4 Influence de divers paramètres                           | 42 |
| 1.5.4 Extraction et purification des enzymes                     | 49 |
| 1.5.4.1. Introduction  | 49 |

|  |    |
|--|----|
| CHAPITRE 3: Résultats et discussions.....                                      | 87 |
| 3.1 Etude bactériologique du rejet .....                                       | 68 |
| 3.1.1 Résultats .....  | 68 |
| 3.1.2 Interprétation .....   | 68 |
| 3.2 Production de l'hydrolysate par digestion<br>enzymatique .....             | 69 |
| 3.2.1 Production de l'enzyme .....   | 69 |
| 3.2.1.1 Résultats .....  | 70 |
| 3.2.1.2 Interprétation .....   | 71 |
| 3.2.2 Optimisation des paramètres influençant la<br>réaction enzymatique ..... | 72 |
| 3.2.2.1 Etude de l'influence de la température.....                            | 72 |
| 3.2.2.2 Etude de l'influence du pH .....                                       | 75 |
| 3.2.2.3 Conclusion .....   | 75 |
| 3.2.3 Etude de la cinétique d'action de l'enzyme ...                           | 76 |
| 3.2.3.1 Résultats .....  | 76 |
| 3.2.3.2 Exploitation des résultats .....                                       | 76 |
| 3.2.4 Etude de l'hydrolyse enzymatique des rejets<br>de poissonnerie .....     | 80 |
| 3.2.4.1 Résultats .....  | 80 |
| 3.2.4.2 Interprétation .....   |    |
| 3.2.5 Profil des acides aminés essentiels de<br>l'hydrolysate .....            | 82 |
| 3.2.5.1 Résultats .....  | 82 |
| Conclusion.....  | 84 |
| Références bibliographiques .  |    |
| Annexes .  |    |



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

## *INTRODUCTION*

## INTRODUCTION

---

### INTRODUCTION

La production mondiale des produits de la mer est loin d'être destinée exclusivement aux consommateurs. En effet, entre 30% et 40% du tonnage est destiné à la production de farine de poisson pour l'alimentation des animaux [1].

En 1980, 4600 000 t de farine ont été produit, ce qui correspond à 23 millions de tonnes de poisson frais [2].

Cette farine est en partie produite avec des poissons de peu d'intérêt sur le plan commerciale, mais aussi d'espèce de poisson parfaitement consommable par l'homme (surtout au Chili et au Pérou) [2].

Une substitution, même partielle, de cette quantité par des déchets paraît très intéressante. En effet, elle vise à conserver les ressources halieutiques à caractère limité et à exploiter à mieux les quantités pêchées, tout en évitant les problèmes de pollution.

En Algérie, et malgré sa faiblesse, l'industrie halieutique est considérée comme parmi les plus polluante du littoral. La conserverie de Dellys, à elle seule, rejette entre 40% et 60% de la matière première sous forme de sous-produit de transformation [3]. Ce qui conduit à une forte pollution locale, et par là à une réduction du pouvoir auto-épurateur du milieu récepteur.

## INTRODUCTION

---

Une pleine valorisation de ces sous produits revêt tout son intérêt. Elle permettra de contribuer à la dépollution du littoral d'une part et d'autre part de produire des substances de forte valeur nutritionnelle utilisées comme additif à l'alimentation animale.

C'est dans ce cadre que vient s'inscrire ce modeste travail, qui consiste en:

- une mise en revue bibliographique, des travaux antérieurs, des procédés de valorisation des déchets déjà existants, et de l'industrie halieutique.
- une étude bactériologique du rejet, afin d'évaluer son degré de contamination.
- La production de l'enzyme et l'optimisation des paramètres influençant son activité.
- une étude cinétique de la réaction enzymatique pour la détermination des paramètres caractéristiques de l'enzyme.
- une étude de l'hydrolyse enzymatique des déchets, par différentes concentration en enzyme, afin d'obtenir la concentration en enzyme optimale.
- la détermination du profil en acide aminés essentiels de l'hydrolysate, et sa comparaison avec le modèle de référence (FAO/WHO (1973)).

*CHAPITRE 1*

*REVUE BIBLIOGRAPHIQUE*

## CHAPITRE UN : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1 ETUDES ANTERIEURES

La production d'hydrolysat de protéines de poisson à fait l'objet de plusieurs études.

En 1961, Mc Bride et coll. [4] ont trouvé que la pepsine aboutit à une solubilisation du Hareng meilleure que celle obtenue par la Brolamine et la Rhozyme.

En 1962, Sen et coll. ont étudié l'hydrolyse de la chair de poisson par la papaine [4].

### 1.1.1 PROCÉDÉ DE SRIPATHY ET COLL. (1964) [4]

SRIPATHY et coll. ont proposé un procédé de production d'un hydrolysat de protéines de poisson.

La production d'un concentré soluble de protéine de poisson par une hydrolyse enzymatique du Merlon rouge à fait l'objet d'étude à l'échelle laboratoire, Un tel produit offre l'avantage d'être utilisé pour la préparation de soupes, boissons, et formulation de nourriture d'enfant, pour vu que le goût et la valeur nutritive soient satisfaisants. Le maximum de conversion de protéine de poisson à leur partie soluble à une conséquence économique, et la qualité nutritive et organoleptique du produit final sont les fins désirés.

### 1.1.2 PROCÉDÉ DE MIYADA ET COLL. (1952) [4]

MIYADA et coll. ont comparé l'action de 9 enzymes protéolytiques sur le muscle de bœuf; ils ont trouvé que la

papaine, la broméline, la ficine, la tyrosine, et la rhozyme P-11 ont une bonne activité.

Les essais d'activité de l'enzyme dépendent de la nature du substrat; et le taux d'activité sur l'hémoglobine, la caséine, ou la gélatine n'est pas directement applicable aux protéines de poisson.

#### 1.1.3 ETUDE DE M.B.HALE (1969) [4]

L'auteur a comparé les activités catalytiques de 20 enzymes sur les protéines de poisson, préparées à partir des déchets de traitement des poissons congelés et rincés.

Les concentrations en enzyme sont choisies de façon à obtenir 60 % de digestion en 24 heures, les solides solubles et insolubles totaux sont mesurés et utilisés pour évaluer le degré de digestion.

Le test préliminaire après 1 heure à 40°C et à pH = 7 montre que la ficine est la plus active. Après 24 heures, les tests qui sont effectués dans les conditions optimales révèlent que la meilleure activité est obtenue par la pronase.

En général, les protéases microbiennes ont une activité relativement basse. La pepsine, la pancréatine, et la papaine donnent une activité et un goût modéré.

#### 1.1.4 ETUDE DE E.YANEZ ET COLL. (1976) [5]:

En 1976, E.YANEZ, D.BALLESTER et F.MONCKEBERG ont publié une étude concernant la production d'un hydrolysate de poisson. Il est obtenu par la digestion enzymatique du Hake de Chili, par la broméline comme protéase.

Les auteurs ont étudié l'habilité du produit à compléter les protéines céréalières (blé, riz, et maïs). Ils ont mené une série de tests biologiques sur la croissance de rats.

Les analyses chimiques ont révélé que le produit contient autour de 63% de protéines (N . 6.25).

Le profil des acides aminés indique que tous les acides aminés essentiels sont présents en quantités supérieures à celles établies pour l'homme par le modèle standard élaboré, en 1973, par la FAO/WHO avec seulement l'exception de la Thréonine qui est en léger déficit voir tableau n° 1.

#### 1.1.5 PROCÉDÉ DE BUCOVE ET PIGOTT (1976) [1]:

En 1976, toujours G.O.BUCOVE et G.M.PIGOTT [1] ont présenté une installation pilote pour la production d'un concentré de protéine de poisson par hydrolyse enzymatique des rejets et des sous-produits des industries de la pêche.

Ils ont utilisé comme enzyme la pepsine en raison de son efficacité et la faiblesse de son pH optimum qui fait éviter les problèmes de contamination. Après l'hydrolyse les taux de recouvrement sont les suivants: 84,6% pour les acides aminés, 85% pour les protéines et 0,8% pour les lipides.

#### 1.1.6 ETUDE DE P.A.CARROAD ET R.A.TOM (1978) [6]:

En 1978, CARROAD et coll. [6] ont publié des résultats concernant la bioconversion de rejet de chitine provenant des industries de transformation de crevettes et de crabes.

| acide aminés             | hydrolysats enzymatique de protéine de poisson | Modèle FAO/WHO (1973) |
|--------------------------|--|-----------------------|
| Isoleucine               | 4.4  | 4.0                   |
| Leucine                  | 9.5  | 7.0                   |
| Lysine                   | 11.8   | 5.5                   |
| Méthionine + Isoleucine  | 4.2  | 3.5                   |
| Phénylalanine + Tyrosine | 6.6  | 6.0                   |
| Thréonine                | 3.7 <sup>1</sup>                               | 4.0                   |
| Tryptophane              | 1.3  | 1.0                   |
| Valine                   | 5.7  | 5.0                   |
| Total                    | 47.2   | 36.0                  |

1 cette teneur représente 93% de celle du modèle de référence FAO/WHO .

Tableau n°= 1 : Comparaison entre le modèle d'acides aminés, essentiels et la modèle standard FAO/WHO (en g / 16g d'azote).



La chitinase extracellulaire sécrétée par les micro-organismes sélectionnés est utilisée comme enzyme. L'hydrolysats final peut être converti en un produit utilisable pour l'alimentation animale.

Après l'étude, il s'est avéré que la souche *Serretia marcesceus* QMB1466 est tout à fait appropriée.

#### 1.1.7 TRAVAUX DE L.L.LUI ET G.M.PIGOTT (1981) [7]:

Trois années plus tard, L.L.LUI et coll. ont publié les détails d'un procédé de production d'hydrolysats enzymatique par la pepsine. Cette fois-ci, le procédé est très économique car l'enzyme utilisée n'est pas commerciale, mais une pepsine brute obtenue par l'autodigestion de la muqueuse stomacale du porc.

D'après les résultats obtenues les auteurs ont pu conclure ce qui suit:

- la pepsine activée à pH = 1 donne la meilleure activité et se conserve bien.
- une pepsine brute à 9 % en poids (poids de muqueuse / poids de déchet) donne une activité semblable à celle obtenue par une pepsine commerciale (laboratoire sigma) à 1 % .
- les essais de conservation ont révélé que les solutions pepsique sont conservables une dizaine de jour à 4°C, et que la muqueuse congelée est stable durant au moins cinq mois.

#### 1.1.8 TRAVAUX DE R.F.VEGA ET J.G.BRENNEN (1988) [8]:

Ces chercheurs ont publié une étude concernant l'hydrolyse enzymatique des déchets de poisson sans ajout d'eau. L'enzyme utilisée est la papaine (0.05% poids/ poids à base humide).

Le fait que la viscosité du déchet haché est considérablement réduite à 65°C, l'hydrolyse a pu avoir lieu sans ajout d'eau. Par conséquent, le facteur majeur influençant la transformation, et le capital investi, c'est-à-dire l'énergie, pour l'élimination de l'eau, la puissance de mixage et la taille des équipements peuvent être fortement réduits.

#### 1.1.9 TRAVAUX DE L'ÉQUIPE DE BIOTECHNOLOGIE DE L'ENP D'ALGER:

La production d'hydrolysats enzymatiques à partir des déchets a fait l'objet de plusieurs études, au niveau du laboratoire de recherche sous la direction de Mr N.MAMERI et Mme D.MAMERI.

En 1990, L.SIAMMOUR [9], a procédé à la production d'un hydrolysats enzymatique à partir des protéines du déchet de poisson. L'enzyme utilisée est une pepsine brute obtenue par l'autodigestion de la muqueuse gastrique de mouton.

Les résultats des analyses bactériologiques ont fait état d'une forte contamination des rejets recueillis à la conserverie de Dellys. Les essais d'activité ont montré que la solution pepsique préparée à pH = 1 est la plus active. Après 4 heures d'hydrolyse, à pH = 2 et à 23°C, l'hydrolysats présentait une teneur en protéine de 42 g/l.

Une année plus tard, O.GAOUAR et S.FENNOUH [10], ont fait une étude qui vient compléter la précédente.

Les résultats rapportés par ces auteurs montrent que la pepsine activée à pH = 1 était la plus active. C'est une confirmation des résultats rapportés par L.SIAMMOUR.

La même année, A. GUIRAA et M. GUEHDOUNI [11], ont procédé à la production d'un hydrolysate des protéines des déchets solides d'abattoirs. Ils ont utilisé la pepsine brute obtenue par autodigestion de la muqueuse gastrique de mouton. ils ont rapporté que la solution pepsique préparée à pH = 1 est la plus active, et se conserve bien.

## 1-2 PROCÉDES DE VALORISATION DES SOUS-PRODUITS DE LA PÊCHE [2] , [9] , [10] , [11]

Actuellement, et après un effort de recherche considérable, on est arrivé à traiter une portion importante de déchets. Ces déchets étaient autre fois source de pollution locale.

De nombreuses méthodes sont utilisées pour valoriser les sous produits de la pêche ainsi que les espèces représentant peu d'intérêt économique. En effet à partir de ces déchets on peut produire des produits de haute qualité nutritive pour l'alimentation animale et humaine.

Plusieurs voies sont offertes pour cette valorisation, on rencontre entre autre:

### 1.2.1 LA FABRICATION DE BLOCS DE CHAIR:

On utilise des déchets consommables sous forme de chair hachée pour la production de viandes dites "surfines". Le rendement de l'opération est de 10% . On fabrique des blocs congelés qui servent à la préparation de de pâtes, croquettes, plats cuisinés saucisses de poisson et récemment des "fish-burgers".

### 1.2.2 EXTRACTION PAR DES SOLVANTS:

C'est l'un des plus anciens procédés. L'extraction se fait

par ajout d'acide organique.

L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait que le concentré protéique obtenu est une protéine non-fonctionnelle, en plus il y a le problème de récupération du solvant et de sa contamination par le rejet.

### 1.2.3 FABRICATION DE LA FARINE DE POISSON:

La farine de poisson est l'une des principales sources de protéines animales. Cette farine est en partie produite avec des poissons de peu d'intérêt sur le plan commerciale, mais aussi d'espèces de poisson parfaitement consommées par l'homme, aussi l'emploi de déchets devrait être développé.

La technique de fabrication la plus courante comprend les étapes suivantes:

- cuisson à 95 - 100°C dans un cuiseur à double paroi chauffé à la vapeur.
- passage dans une presse dans un séchoir cylindrique rotatif dans lequel est injecté de l'air à 600°C.
- tamisage grossier, broyage puis ensachage et pesée.

A côté du concentré protéique, on retire dans la fabrication l'huile de poisson, qui, solidifiée peut être utilisée dans la fabrication de la margarine et s'emploie également en biscuiterie, ainsi que pour les usages industriels (lubrification, peinture, antioxydants pour caoutchoucs ...).

### 1.2.4 FABRICATION DE CONCENTRE PROTEIQUE POUR L'ALIMENTATION HUMAINE.

Il existe aussi un débouché en alimentation humaine, c'est la fabrication de concentrés protéiques connus sous le nom de F.P.C (fish protein concentrate).

Actuellement deux type de F.P.C sont présentés sur le marché.

- le type A qui nécessite le passage par plusieurs solvants et qui présente des caractéristiques particulières de désodorisation et de sapidité. Sa teneur maximale en matière grasse est 0.75% et sa teneur en protéine varie entre 60 et 80% .

- le type B pour lequel ne sont pas exigées des caractéristiques particulières d'odeur et de saveur.

La composition moyenne, de ce concentré, est de 70 à 75% de protéine, avec un taux d'humidité maximale de 10% et une teneur en matière grasse inférieur ou égale à 10% .

Le schéma de la figure (I-1) représente le résumé d'un processus d'obtention d'un F.P.C établi par PIGOTT et coll.

[11]

#### 1.2.5 FABRICATION D'HYDROLYSATS:

Les hydrolysats de poisson constituent un progrès technologique et qualitatif important pour la valorisation des sous produits de la pêche. On obtient trois type d'hydrolysats.

##### 1.2.5.1 AUTOLYSATS

L' autolyse est un procédé d'hydrolyse qui utilise les enzymes présents dans la chair du poisson. C'est la préparation classique du "Nuoc Man" à partir de petit poissons salés, placés dans un récipient fermé hermétiquement. La version moderne est l'ensilage des poisson amélioré par l'acidification (acide formique et propioïque [12]), le produit obtenu est utilisé comme supplément de l'alimentation des animaux pendant la période de croissance.

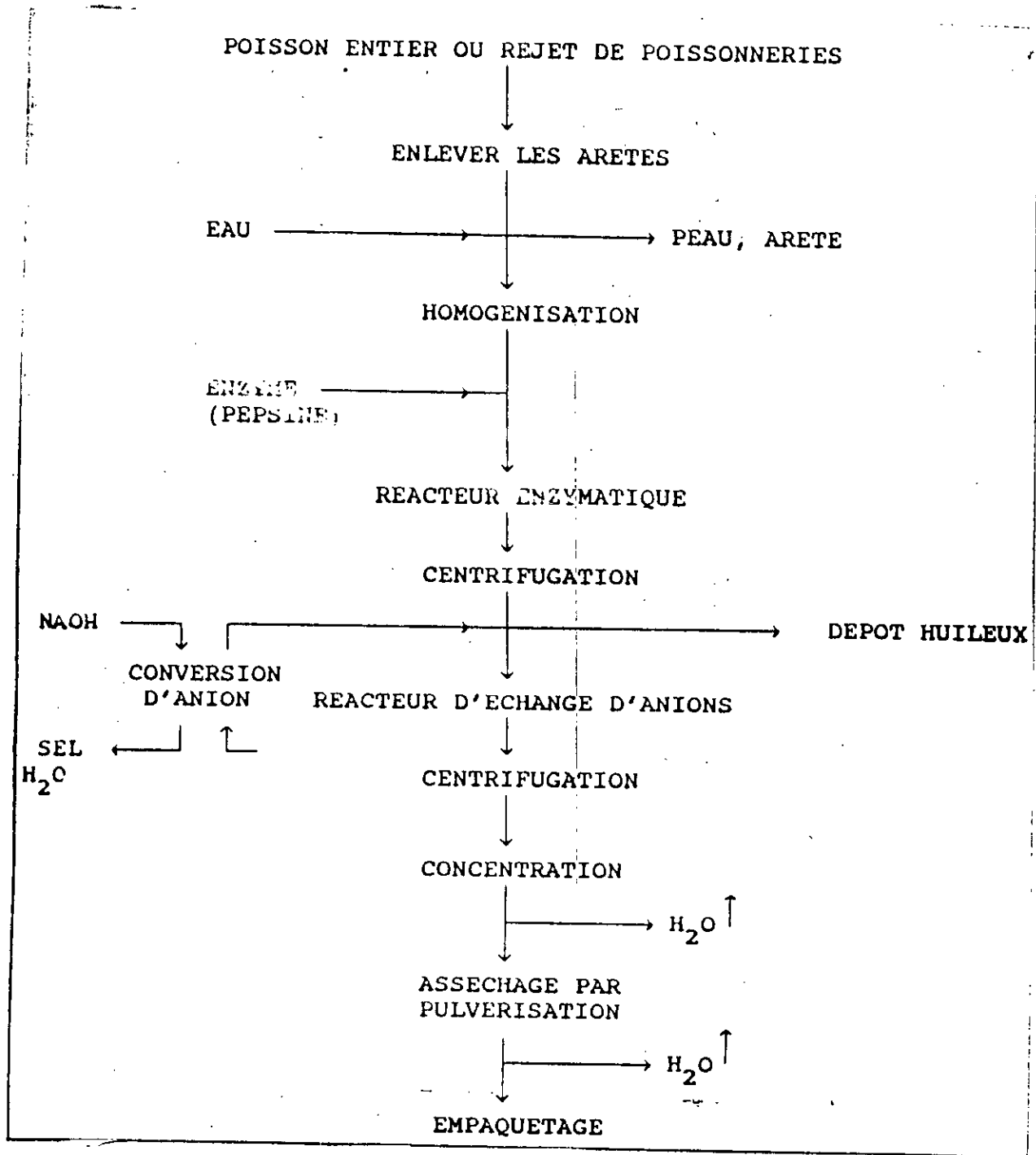


Fig (I-1): Processus de production de concentré protéique [1]

### 1.2.5.2 HYDROLYSATS CHIMIQUE

On fait subir aux déchets une hydrolyse par action d'acides (chlorhydrique, ou sulfurique) ou de base (la soude). Cette méthode est utilisée pour la supplémentation du lait (notamment aux Pays-Bas). Elle a pour inconvénient de détruire certains acides aminés.

### 1.2.5.3 HYTEROLYSATS OU HYDROLYSATS ENZYMATIQUES:

C'est la méthode la plus utilisée actuellement, car elle permet d'obtenir après hydrolyse des protéines fonctionnelles. Elle fait appel à une enzyme déterminée ou plus fréquemment à un mélange d'enzyme.

Dans un procédé d'hydrolyse enzymatique, on rencontre les éléments suivants:

- réacteur enzymatique où l'enzyme est mise en contact du substrat et le tous est amené aux conditions optimales (pH et température) de l'enzyme, et homogénéisé, par simple agitation.
- tamisage : afin d'éliminer les arrêts et les écailles
- séchage : après la concentration, on procède au séchage par la méthode adéquate.

### 1.2.6 FABRICATION DU SURIMI [13]

Le surimi est la chair de poisson broyée et lavée, conservée congelée en présence d'agent cryoprotecteurs.

La préparation du surimi repose sur l'extraction par lavage à l'eau de la chair, des composés de faible masse moléculaire, des lipides et des protéines solubles dites sarcoplasmiques (myoglobine, enzymes). On obtient ainsi un concentré de protéine myofibrillaires sous forme de pâte auquel sont généralement additionnés 4% de saccharose et 4% de sorbitol, ceci permet une conservation congelée (-20 à -30) de durée supérieur à 12 mois sans modification du

pouvoir gélifiant.

Cette pâte sert actuellement à fabriquer des produits à forte valeur ajoutée (par exemple des succédoués de muettes ou de pinces de crabe).

#### 1.2.7 PREPARATION DE MOLECULES à USAGE INDUSTRIEL

On produit des molécules à usages pharmaceutique ou industriel à partir des sous-produit par exemple: des acides aminés, acides nucléiques, protamines, léchitines et surtout chitines et chitinases (à partir des carapaces de crustacés) dont les utilisation sont très nombreuse.

### 13 L'INDUSTRIE HALIEUTIQUE

#### 1.3.1 INTRODUCTION:

De nos jours, la pêche est devenue une véritable industrie industrie et joue un rôle important dans l'alimentation humaine.

Selon les statistique de la F.A.O (1981)[14]: sur une production annuelle mondiale de 72 Mt de produit de la pêche, seule 50 Mt parviennent réellement aux consommateurs: 17 Mt étant destinés pour la fabrication de farines pour l'alimentation animale et 5 Mt sont retirés de la consommation humaine sous forme de sous produits de transformation ou de produits altérés. Ceci sans tenir compte des quantités de poisson rejetés en mer des leur capture (faux-poisson), qui atteignent 25 à 30% du total des captures.

Actuellement, la pêche met à la disposition des consommateurs une quarantaine d'espèces comestibles [15].



Cette grande diversité fait que la demande est concentrée sur les espèces nobles de haute gamme (Soumon, Laugouste, Crevette, crabe, coquilles Saint Jaques ...etc) qui n'est pas satisfaite, généralement. En contre partie, des ressources halieutique appréciable, notamment des poissons pélagique (Chinchard, Sardine, Anchois, Spart et même Germon) disponible dans les zones littorales ou communautaires restent économiquement sous exploités.

Ainsi une pleine valorisation des espèces marines présente un grand intérêt potentiel notamment en vue de :

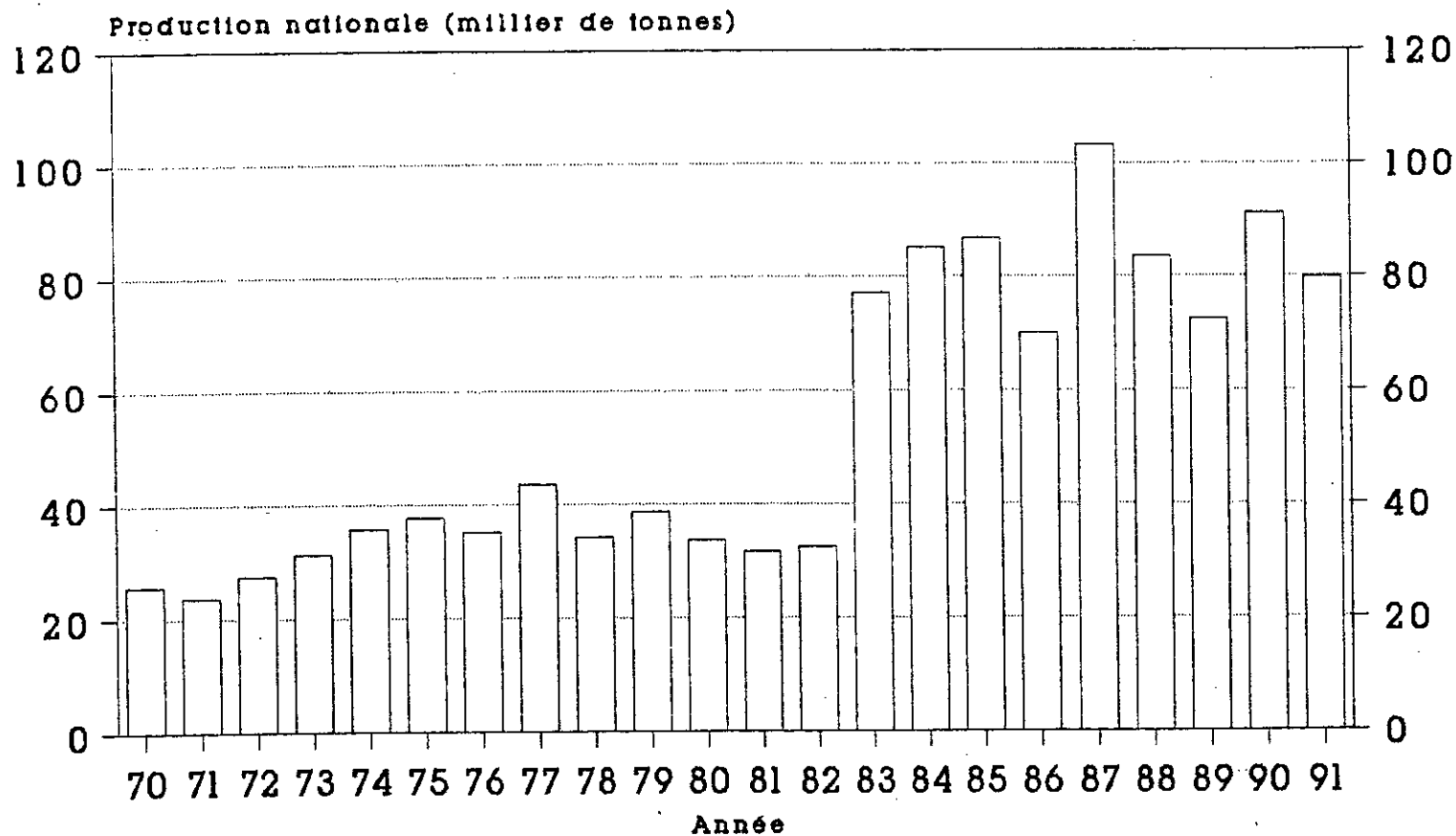
- (1) contribuer à la réduction de la balance commerciale de l'Algérie.
- (2) Promouvoir la consommation ou l'utilisation d'espèces moins prisées sous la forme classique.
- (3) Augmenter la valeur ajoutée des matières premières existant en quantités limitées.
- (4) contribuer à la compétitivité des entreprises nationales de conserverie et de traitement des produit de la pêche et par là au maintien au développement de l'emploi [16]

### 1.3-2 L'INDUSTRIE HALIEUTIQUE ALGERIENNE:

La pêche Algérienne atteint approximativement 1.6 million de tonnes par an [15]. ... Environ 4500 tonnes sont destinés aux usines de transformation et le reste est directement destinés aux consommateurs.

Le thon constitué le principal produit des importations qui se chiffrent à 3113 tonnes par an.

En Algérie, et malgré les 1200 Km de côte l'industrie halieutique reste encore à son point de départ. A titre indicatif la figure (I-2) présente l'évolution de la production halieutique Algérienne de 1970 à 1991 [3].



*FIG(I- 2): Evolution de la production  
Nationale  
de 1970 à 1991*

On constate que la production fluctue autour d'un pic atteint en 1987.

Le tableau n°= 2 indique la production annuelle par espèce et par willaya maritime en 1991 [3].

On remarque que l'espèce bleue est la plus pêchée, en effet elle représente 82% de la production nationale annuelle.

La faiblesse de l'industrie halieutique Algérienne est plus révélée dans le secteur de transformation des produit de la mer. En effet il n'y a que huit entreprises étatiques de traitement et quelques unes du secteur privé encore plus petite.

Les huit conserverie sont situées à: Ghazaouat, Benissaf, Oran, Tennès, Khmisti, Jijel, Collo, et Dellys.

Celles de Tenès et Dellys ont bénéficié d'un nouvel équipement [15].

La plus part des conserveries traitent les Anchois, La Sardine et le Thon.

Dans la présente étude les rejets proviennent de la conserverie de Dellys.

| ESPECES<br>WILAYA | Poisson<br>blanc | Poisson<br>bleu | Crusta-<br>cés | Squales<br>Espadon | Total  |
|-------------------|------------------|-----------------|----------------|--------------------|--------|
| Tlemcen           | 1865             | 6572            | -              | 29                 | 8400   |
| Ain timouchent    | 813              | 10625           | 287            | 144                | 11869  |
| Oran              | 480              | 8441            | 75             | 115                | 9111   |
| Mostaganem        | 2808             | 5029            | 1276           | 73                 | 9186   |
| Chlef             | 79               | 1535            | 33             | -                  | 1647   |
| Tipaza            | 1094             | 10007           | 1410           | -                  | 12511  |
| Alger             | 997              | 1277            | -              | -                  | 2274   |
| Boumèdes          | 270              | 6072            | 13             | 269                | 6624   |
| Tizi-Ouzou        | 99               | 76              | 06             | 79                 | 260    |
| Béjaia            | 364              | 1406            | -              | -                  | 14770  |
| Jijel             | 337              | 3516            | -              | -                  | 3853   |
| Skikda            | 404              | 6076            | 143            | -                  | 6623   |
| Annaba            | 540              | 3368            | -              | -                  | 3908   |
| El Taraf          | 225              | 1338            | 25             | -                  | 1588   |
| Total             | 10375            | 65338           | 3268           | 709                | 79690  |
| Pourcentage       | 13.00            | 82.00           | 4.10           | 0.90               | 100.00 |

Unité: Tonnes

Tableau n°= 2 : Production annuelle par espèce et par wilaya  
maritime année 1991 [3]

### 1.3.3 PRÉSENTATION DE L'USINE DE DELLYS:

#### 1.3.3.1 INTRODUCTION:

La conserverie de Dellys est située à 120 Km vers l'est d'Alger. Elle a ouvert ces portes en 1988 et bénéficie donc d'un équipement neuf. Elle produit des boîtes de thon et de sardine, avec une production théorique de 10 t/j, mais cette production n'a jamais été atteinte, faute d'eau et de matière première. Son rendement réel varie entre 30 et 40% .

#### 1.3.3.2 LES ÉTAPES DE TRAITEMENT DU POISSON :

Dans le cas de la sardine on a les étapes suivantes:

- (1) Livraison: en caisse de 20 à 25 Kg de sardine fraîche ou congelée.
- (2) Étêtage-éviscération: il s'effectue manuellement.
- (3) Saumurage: dans des bacs de saumure à 25% . Le temps de saumurage dépend du calibre de la sardine.
- (4) Emboîtement: c'est la mise en boîtes.
- (5) Egouttage: par renversement des grilles.
- (6) Cuisson: à la vapeur de 100 à 110°C durant 15 à 20 minutes .
- (7) Dosage: à l'huile ou à la tomate (14%)
- (8) Sertissage et pré-lavage.
- (9) Stérilisation: à l'autoclave à 110°C pendant une heure.
- (10) Refroidissement et lavage: des boîtes avec séchage.
- (11) Etiquetage et mise en cartons.

#### 1.3.3.3 LES REJETS DANS LA CHAÎNE DE FABRICATION:

Lors du traitement du poisson, de grande quantité d'eau sont consommées au niveau de l'étêtage-éviscération où la sardine est lavée à part et les déchets sont entraînés par pression d'eau. Donc, après cette étape il y a production de déchets.

Dans le cas de la sardine, on estime que 40% de la matière est perdue sous forme de déchets, dans le cas du thon les pertes sont encore plus importantes, en effet elles atteignent 60% de la matière première.

Actuellement ces déchets sont rejetés directement dans la mer, occasionnant des grands risques de pollution locale, et de là la réduction du pouvoir auto-épurateur du milieu récepteur.

Donc la valorisation de ces déchets permet de protéger le milieu récepteur et de produire des substances de haute valeur nutritive qui sont actuellement importées de l'étranger.

## 1.4 ETUDE DU REJET

### 1.4.1 INTRODUCTION:

Dans la conserverie de Dellys, la production des rejets se fait essentiellement lors de l'opération d'étêtage-éviscération. Actuellement ces déchets sont rejetés directement dans la mer malgré leur richesse nutritive.

En effet la composition de la partie non-comestible du poisson est similaire à celle de la partie comestible, comme on peut le remarquer sur le tableau n°= 3.

| Constituants<br>% en poids | Poisson<br>entier | partie<br>comestible | partie non-<br>comestible |
|----------------------------|-------------------|----------------------|---------------------------|
| Eau                        | 89.9              | 83.6                 | 81.2                      |
| Lipides                    | 3.5               | 0.8                  | 4.4                       |
| Protéines                  | 12.7              | 15.2                 | 11.7                      |
| Cendres                    | 2.7               | 1.1                  | 3.5                       |

Tableau n°= 3 : Composition approximative caractéristique du poisson pêché au chalut. [1].

Donc en quelque sorte, l'étude de la valeur nutritionnelle du rejet sera pratiquement similaire à celle du poisson entier.

#### 1.4.2 VALEUR NUTRITIONNELLE DU POISSON ET IMPORTANCE DU REJET:

La valeur nutritionnelle du poisson rivalise avec celle des viandes et celle des oeufs. A titre d'exemple, 100g nets de poisson sans déchets, sont équivalents à 100g nets de viande ou à 2 œufs.

La valeur énergétique du poisson varie entre 70 et 200 calories pour 100g [10].

Le tableau n°= 4 compare la composition du muscle du poisson et celle du muscle squelettique de mammifère:

|   | muscle de poisson    | muscle squelettique de mammifère |
|---|----------------------|----------------------------------|
| Eau (g pour 100g de muscle                                  | 70 - 80              | 65 - 72                          |
| Protéines (%)   | 15 - 26              | 15 - 23                          |
| Lipides (%)   | 1 - 10               | 4 - 15                           |
| Hydrats de carbon (%)                                       | 0.3 - 1              | 0.5 - 1                          |
| Minéraux (%)  | 1.0 - 1.5            | 1.0 - 1.3                        |
| Protéines sarcoplasmiques (g pour 100g de protéines totale) | 20 - 35              | 30 - 35                          |
| Protéines myofibrillaires (%)                               | 60 - 75 <sup>1</sup> | 50 <sup>1</sup>                  |
| Protéines du stroma   | 2 - 5 <sup>2</sup>   | 15 - 20                          |

- 1 - Les proportions respectives des diverses protéines myofibrillaires sont analogues dans le muscle de poisson et dans le muscle squelettique de mammifère.
- 2 - Jusqu'à 10% dans des poissons cartilagineux comme la raie et le requin.

Tableau n°= 4 : Composition du muscle de poisson et du muscle squelettique de mammifère [13].

L'importance du rejet dépend de la proportion de la partie comestible qui est variable d'une espèce à une autre.

Le tableau n°= 5 , nous donne quelque exemple:



| <u>Poisson frais entiers</u> | <u>Partie comestible % en poids</u> |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Bar                          | 48                                  |
| Morue                        | 48                                  |
| Sole                         | 52                                  |
| Daurade                      | 57                                  |
| Marquerin                    | 57                                  |
| Rale                         | 57                                  |
| Hareng                       | 59                                  |
| Merlan                       | 66                                  |
| Saumon                       | 67                                  |
| Limande                      | 69                                  |
| Sardine                      | 77                                  |
| <u>Poisson frais vidés</u>   |                                     |
| Marquereau                   | 61                                  |
| Morue                        | 65                                  |
| Saumon                       | 73                                  |
| Sole                         | 82                                  |
| Hareng                       | 91                                  |
| <u>Poissons conservés</u>    |                                     |
| Hareng, fumé, saur           | 61                                  |
| Sardine salée                | 75                                  |
| Marquereau salé              | 77                                  |
| Morue séchée                 | 80                                  |
| Saumon fumé                  | 90                                  |
| Mollusque                    |                                     |
| Huitre                       | 17                                  |
| Moule                        | 34                                  |
| <u>Crustacés</u>             |                                     |
| Crabe                        | 44                                  |
| crevette                     | 47                                  |

Tableau n°= 5 : proportion de la partie comestible des principaux poissons [10].

Selon la présentation de poisson, la partie non-comestible varie, voir tableau n°= 6.

| Présentation du Poisson   | % en poids des déchets | Poids équivalent à 100g de viande |
|---------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Filets                    | 0                      | 100                               |
| Darnes en tranche poisson | 10 à 20                | 150                               |
| entier                    | 30 à 50                | 180 à 200                         |

Tableau n°= 6 : Importance du déchets de poissonnerie [10]

#### 1.4.3 ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES DU REJET:

##### 1.4.3.1 INTRODUCTION:

Les rejets recueils; une fois traité sont destinés à être des suppléments pour l'alimentation animale, donc une évaluation de leur qualité bactériologique est indispensable afin de savoir leur degré de contamination.

Les recherches effectuées sont les suivantes:

- estimation de la flore globale: par la détermination des germes aérobies mésophiles.
- étude des germes de contamination fécale: par la recherche des coliformes et E.coli, Streptocoques, Staphylocoques et clostridium sulfito-réducteurs
- Recherche de Salmonella.

## 1.4.3.2 CARACTERISTIQUE DES GERMES RECHERCHES [18],[17]

**(A) Coliformes et E.Coli:**

Ils font partie de la famille des Entérobactriaceae.

Ce sont des bactéries gram<sup>-</sup>, vivant notamment dans l'intestin des humaines et des animaux.

Les bactéries coliformes se caractérisent par leur aptitude à fermenter plus au moins rapidement le lactose. Les coliformes fécaux présentent en plus deux caractéristiques, liées à leur habitat, l'aptitude à se multiplier à 44°C et à le faire en présence de sels biliaries. En fin E.Coli ajoute généralement à ces propriétés celle de produire de l'indole sur eau peptone.

En plus, ces germes représentent les caractéristiques suivantes:

- Ce sont des bacille ou coccobaciles.
- Ils sont oxydase<sup>-</sup>, asporulés.
- Ils réduisent les nitrates en nitrites .
- Ils fermentent le glucose.
- Ils sont anaérobies facultatifs.

**(B) Les Streptocoques:**

Ils font partie de la famille des Streptococcaceae. Ils sont des coques, gram<sup>+</sup>, asporulés, généralement groupées en paires ou surtout en chaînes, de longueur variable. Ils sont catalase<sup>-</sup>. Ils sont micro-aérophiles ou anaérobies.

**(C) Les Staphylocoques:**

Ils font partie de la famille des Micrococcaceae.

Ils sont des coques gram<sup>+</sup>, immobiles, asporulés, groupes généralement en amas irréguliers, ils sont catalase<sup>+</sup>, leurs colonies sont lisses et fréquemment pigmentées.

**(D) Les Clostridium sulfito-réducteurs:**

Ce groupe fait partie du genre Clostridium qui lui-même appartient à la famille des Bacillaceae.

ILs sont des bacilles, gram<sup>+</sup>, souvent de grande taille, isolés en chaînette, généralement mobiles, sporulés, catalase<sup>-</sup> anaérobies stricts.

Quelque espèces sont responsables d'intoxication (Cl.perfringens) ou de graves intoxication souvent mortelles (Cl.botulinum) [17].

**(E) Les salmonella:**

Comme les coliformes et E.Coli, le genre Salmonella appartient à la famille des entérobactériaceae dont ils représente les principaux caractères.

Les Salmonella sont responsable de toxico-infection [17]

Leurs caractères principaux sont:

- mobiles mais il existe des espèces ne possédant pas cette propriété.
- après incubation sur gélose nutritive à 37°C, il y a formation de colonies de forme ronde, de faible convexité, transparente de diamètre variant entre 2 à 4 mm.
- sur gélose de Mac Conkey, les colonies sont incolores contrairement au cas d'E.Coli.
- lactose<sup>-</sup>: elle ne FERMENTE pas le lactose.
- oxydase<sup>-</sup>
- H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>: production d'H<sub>2</sub>S.

## 1.5 ETUDE BIOCHIMIQUE

### 1.5.1 LES ACIDES AMINES ET LES PROTEINES:

#### 1.5.1.1 LES ACIDES AMINES

##### **(A) Introduction**

Les cellules vivantes produisent une grande variété de macromolécule (protéines, acides nucléiques, polysaccharides, etc..) . Ces macromolécules sont des biopolymères composés de monomères ou unités de construction . Dans le cas des protéines ces monomères sont les acides L, $\alpha$ -aminés [19].

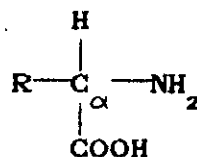
**(B) Définition** Comme leurs nom l'indique , les acides aminés sont des composés organiques qui contiennent une fonction amine et une fonction carboxylique[20] .

##### **(C) Structure générale et quelque propriétés**

Bien qu'il existe un très grand nombre d'acides aminés chimiquement possible (environ 300 [19]) le nombre de ceux qui existent à l'état naturel est relativement restreint[20]. En effet, l'hydrolyse par voie chimique ou enzymatique des protéines \*fornit les 20 acides aminés présents dans les protéines provenant de toutes les formes de vie végétales, animales ou microbiennes [19] .

Pour la quasi totalité d'entre eux il s'agit d'acides carboxylique ayant une fonction amine primaire sur le carbone( $\alpha$ ) porteur du groupement carboxylique .

Leur formules générales est:



R étant un groupement très varié selon les cas aliphatique, ou aromatique, c'est un des critères de classement

Certains a.a. ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent être amenés par l'alimentation, il s'agit d'a.a. essentiel. Chez l'Homme il sont en nombre de huit, à savoir : Leucine, Isoleucine, Lysine, Méthionine, Phénylalanine, Thréonine, Tryptophane, et Valine.[21]

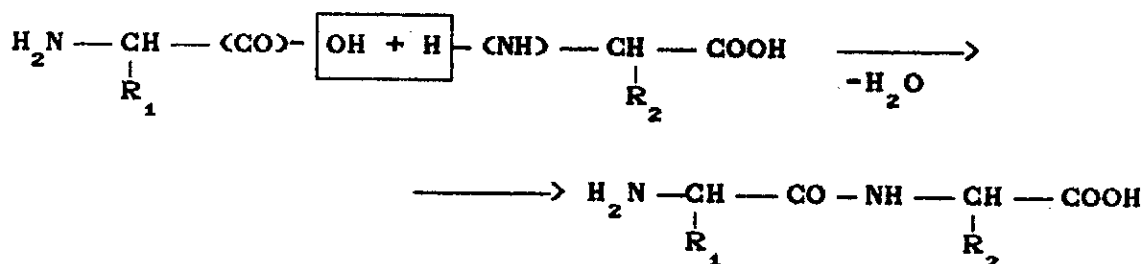
### 2.5.1.2 LES PROTEINES

#### (A) Introduction

Le terme de protéine est dérivé du grec proteis signifiant de "première importance" et ce nom est pleinement justifié. La fonction principale des protéines est de représenter les constituants essentiels du matériel structural par opposition aux glucides et aux lipides qui ont pour rôle principal de fournir de l'énergie[20].

#### (B) Liaisons peptidiques

La réaction du groupement  $\alpha$ -carboxylique d'un acide aminé avec le groupement  $\alpha$ -aminé d'un autre acide aminé permet à ces deux acides aminés de s'unir par formation d'une amide secondaire. Cette liaison aboutit à la formation d'un peptide et la libération d'une molécule d'eau [22].



On appelle les acides aminés constitutifs d'une liaison peptidique résidus d'acides aminés. Un peptide se compose de deux résidus d'acides aminés ou plus. Les polypeptides sont des peptides renfermant plus de dix résidus. Le terme de protéines est réservé aux molécules possédant une masse moléculaire de plusieurs milliers ou plus.

### (C) Niveaux d'organisation des protéines

L'enchaînement des acides aminés constitutifs des protéines est, dans sa forme la plus fréquente, linéaire. Il possède, par convention, à son extrémité gauche un groupement  $\alpha$ -aminé libre dit N-terminal et à l'autre extrémité un groupement  $\alpha$ -carboxylique libre dit C-terminal.

Il est commode de distinguer, dans la structure des protéines, quatre niveaux d'organisation :

#### i) Structure primaire:

Cette structure définit l'ordre d'enchaînement des acides aminés liés de manière covalente [23].

#### ii) Structure secondaire:

Elle représente la configuration spatiale de la chaîne peptidique. Le type de structure secondaire est en relation étroite avec la forme, globulaire ou fibreuse, de la molécule.

### les protéines globulaires

Pratiquement la totalité des protéines douées d'une activité biologique (surtout les enzymes) possèdent une structure globulaire [24] .

La structure secondaire comporte essentiellement:  
des zones à structure hélicoïdale ou hélice  $\alpha$  .  
des zones à structure statique reliant les précédentes .

### Les protéines fibreuses

Ce sont essentiellement des protéines de structure . En rencontre , outre que la structure du type hélice  $\alpha$ , une structure en feuillet plissés  $\beta$  [24] qui résulte de l'influence des liaisons hydrogène intermoléculaires entre les différentes chaînes [23] .

#### iii) Structure tertiaire:

Elle correspond à la structure tridimensionnelle que la protéine adopte grâce à des interactions mettant en jeu les radicaux R .

#### iv) Structure quaternaire:

Elle correspond aux interactions entre les sous unités polypeptidiques; celles-ci sont dues à des liaisons de faible énergie . Les sous unités peuvent être identiques ou différentes.

## 1.5.2 LES ENZYMES

### 1.5.2.1 INTRODUCTION :

Les enzymes ou selon les appellations anciennes les ferments ou diastases [22] sont des molécules protéiques qui catalysent les innombrables réactions très complexes du



---

métabolisme in vivo, avec une facilité étonnante à 37°C et à la pression atmosphérique.[25]

#### 1.5.2.2 HISTORIQUE :[22],[26]

L'homme savait intuitivement, l'existence d'enzyme depuis l'antiquité. Mais la notion d'enzyme a été très longue à se dégager.

Parmi les travaux les plus révélateurs de cette notion, il convient de citer ce qui suit:

En 1860, Pasteur mit en évidence le fait que les réactions de fermentation sont catalysées par des êtres vivants organisés.

C'est Van Kuhue qui propose le terme d'enzyme en 1878.

Il faut attendre 1897, avec l'expérience célèbre des frères Bucher pour que les notions fondamentales se précisent, en effet, en effet ils constatent que le jus extrait de levure a la même activité biologique que la levure toute entière.

Le vingtième siècle voit la confirmation de la nature protéique des enzymes.

En 1926 Summer a réussi à isoler, extraire et cristalliser l'uréase de la fève .

En 1930 Northrop a réussi à cristalliser la pepsine.

Actuellement la biochimie s'efforce de résoudre les problèmes posés par le mécanisme de fonctionnement à l'échelle

moléculaire.

#### 1.5.2.3 Structure des enzymes [19],[27]

Ce sont toutes des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires.

De point de vue structure on distingue deux catégories:

(1) les holoprotéines: constituées seulement par un enchaînement d'acides aminés

(2) Les hétéroprotéines: elles possèdent une partie non protéique, la coenzyme, nécessaire à l'activité catalytique et une partie protéique l'apoenzyme. La coenzyme est liée plus ou moins fortement à l'apoenzyme par des liaisons de nature covalente ou non. Dans le cas où les liaisons sont covalentes la coenzyme est distinguée sous le nom de groupement prosthétique.

#### 1.5.2.4 LE SITE ACTIF: [27]

Le site actif définit la petite portion de l'enzyme impliquée dans la fixation est le positionnement du substrat ainsi que dans la réaction de catalyse.

#### 1.5.2.5 CLASSIFICATION DES ENZYMES: [6]

Les enzymes sont désignées et répertoriées suivant le type de réaction qu'elles catalysent.

En 1961 la commission des enzymes (E.C enzyme commission) de l'Union Internationale de Biochimie (U.I.B) a proposé une classification suffisamment ouverte pour pouvoir y inclure les enzymes reconnues ultérieurement [25]. Cette classification comporte six classes principales chaque classe est divisée en sous-classe, elles-même divisée en sous-sous-classes.

Le tableau n°= 7 nous donne les classes d'enzyme avec quelque spécifications

| ENZYMES             | RÉACTIONS CATALYSÉES   | COMMENTAIRES  |
|---------------------|--|---|
| 1. Oxydo-réductases | réaction redox transfert d'électron d'un substrat à un autre                               | réactions endothermiques qui nécessitent des cofacteurs. Enzymes intracellulaires                           |
| 2. Transférase      | transfert intermoléculaire de radicaux fonctionnels  | réaction exothermiques, groupement méthyl, amino, glycosyl. Transfert enzyme pouvant être extracellulaires. |
| 3. Hydrolases       | réaction d'hydrolyses(1)   | réaction exothermiques intervenant en milieu aqueux très largement utilisées en industrie.                  |
| 4. Lyases           | addition sur les doubles liaisons (2)  | groupement carboxyles, amino ou hydroxyles.   |
| 5. Isomérases       | réactions d'isomérisations (réarrangement structural interne)                              | réactions exothermiques pouvant intervenir en solution libre. Enzyme intramolécule. Enzymes intramolécule   |
| 6. Ligases          | Formation de liaison avec utilisation d'A.T.P (par couplage avec une réaction d'hydrolyse) | réaction exothermiques qui nécessitent des cofacteurs A.T.P. Enzymes intracellulaires.                      |

(1) Rupture d'un enchaînement covalent entre deux atomes avec fixation d'une molécule d'eau sur les valences libérées.

(2) Rupture d'un enchaînement mais sans intervention d'eau avec réarrangement .

Tableau n° 7 : Classification des enzymes. [28]

Une enzyme est désignée par une suite de quatre nombre précédée par deux lettres E.C (Enzymes commission).

E.C.a.b.c.d.

a: classe , b: sous-classe , c: sous-sous-classe

d: numéro de l'enzyme à l'intérieur de la sous-sous-classe

#### 1.5.2.6 LES ENZYMES PROTÉOLITIQUES:

C'est des enzymes très importantes pour les être vivants car elles sont responsables du métabolisme des protéines (nutrition).

Elles catalysent la destruction des liaisons peptidiques des protéines .Ce sont des C-N hydrolases (E.C 3.4. ).

Les enzymes protéolitiques se distinguent selon deux critères principaux:

Critère de répartition intra ou extracellulaire.

Critère de substrat.

#### (A) Répartition cellulaire:

Selon la localisation préférentielle on distingue deux classes d'enzyme:

##### i) Les enzymes extracellulaires:

Ce sont les mieux connues ;elles sont très abondant dans les sécrétions du tube digestif et ses annexes (pepsine, trypsine, chymotrypsine, etc...)

##### ii) Les enzymes intracellulaires:

Ce sont les cathepsines. elles se rencontrent en faible concentration dans les lysosomes de la cellule. Une fois libérées dans le cytoplasme, elles sont responsables de la dégradation des constituants protéiques dans la cellule.

**(B) Spécificité de substrat:**

Les enzymes protéolytiques ont une spécificité de substrat très marquée. On distingue:

**i) Les exopeptidases:**

Elles hydrolysent les liaisons peptidiques situées en bout des chaînes peptidiques.

**ii) Les endopeptidases:**

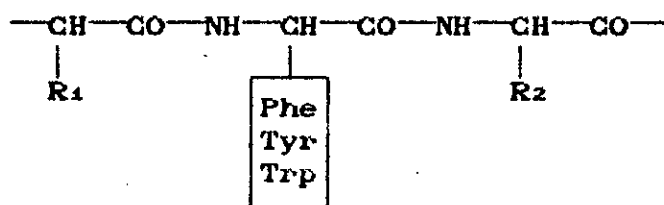
Elles hydrolysent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des chaînes polypeptidiques.

**1.5.2.7 EXEMPLE D'ENZYME PROTÉOLYTIQUES:****(A) La Pepsine:**

Elle est rencontrée dans le système digestif de nombreux animaux (estomac) [29]. Elle résulte de l'activation d'une proenzyme inactive, le pepsinogène. L'activation de la pepsine résulte de l'élimination du côté N-terminal de 42 résidus amino-acyl du proenzyme.

La pepsine gastrique agit sur les protéines natives et sur les protéines dénaturées. Elle agit dans des pH très acides (voisin de 2 [22]).

La pepsine hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques où sont impliqués, par leur groupement carboxyliques des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) selon le schéma suivant :



La pepsine peut aussi hydrolyser, mais à vitesse plus lente, des liaisons peptidiques dans lesquelles sont impliqués des résidus leucyl ou valyl.

L'acide nitreux, le sulfate de Lauryl inhibent l'enzyme. Il en est de même de l'acide malonique qui provoque le blocage des groupements hydrolysés [31].

Dans notre étude l'hydrolyse est réalisée avec la pepsine, ce choix est dû surtout à son pH optimum acide qui inhibe le développement de micro-organismes.

#### (B) La trypsine:

C'est une protéase intestinale [29].

Elle résulte de l'activation du trypsinogène. Elle hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques où sont impliqués les groupements carboxyliques des résidus lysyl et arginyl.

#### (C) La chymotrypsine:

C'est une protéase intestinale [29].

Elle est le résultat de l'activation par protéolyse du chymotrypsinogène.

Elle hydrolyse de préférence les liaisons contenant le

groupement acide des acides aminés suivants:[22]

Tyrosine, Tryptophane, Phénylalanine, Leucine, et Méthionine

### 1.5.3. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE:

#### 1.5.3.1 INTRODUCTION:

L'objet de la cinétique enzymatique est l'étude des enzymes dans leur fonctionnement. Elle se propose en particulier, d'établir les relations qui existent entre la

vitesse de la réaction ( $V = \frac{dP}{dt}$ , dP étant la variation du produit et dt un intervalle de temps) et les concentrations en substrat et en enzyme, ainsi que l'influence de certains facteurs, pH et température notamment [19]

Par ailleurs il faut souligner que l'étude de l'enzymologie repose sur les faits expérimentaux suivants:

- La formation d'un complexe enzyme substrat E-S intermédiaire qui est le résultat de la complémentarité de structure entre le site actif de l'enzyme et le substrat.

- Les études de cinétique enzymatique correspondent toujours au début de la réaction, donc on travaille aux vitesses initiales [27].

#### 1.5.3.2 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME [25],[19]

Dans le milieu réactionnel, la transformation d'une molécule de substrat nécessite la rencontre de cette dernière avec une molécule d'enzyme. Le nombre de molécule de substrat transformé est donc proportionnel au nombre de collisions, qui est d'autant plus élevé que la concentration en enzyme est

élevée. Donc on a :

$$V = K \cdot [E] \quad (1)$$

V :Vitesse ,[E] = concentration en enzyme, K :constante

On constate aisément à partir de (1) que la vitesse de la réaction est directement proportionnelle à la concentration en enzyme.

En pratique pour une concentration en substrat donnée; l'étude des variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en enzyme (voir fig 1-3) montre que la variation n'est pas linéaire.

La courbe présente une allure hyperbolique correspondant au fait qu'au delà d'une certaine concentration en enzyme, la totalité du substrat se trouve sous forme de complexe E-S, d'où l'excès d'enzyme.

Pour les études cinétiques il est nécessaire de se placer dans les conditions de faible concentration en enzyme.

### 1.5.3.3 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT:

Pour une concentration en enzyme donnée l'étude de la variation des vitesses de réaction en fonction de la concentration en substrat donne une allure hyperbolique. On observe d'abord une augmentation rapide de la vitesse, mais quand on fait augmenter la concentration en substrat, la vitesse tend vers une limite  $V_{max}$  .(voir fig(1-4)).



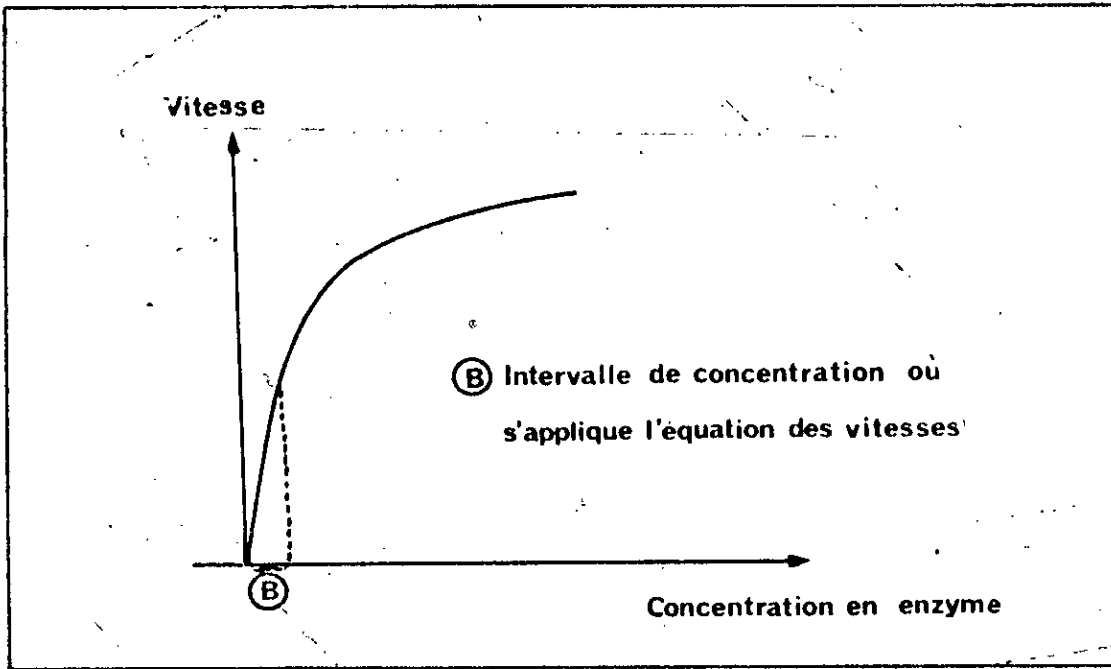


Fig (I-3): Influence de la concentration en enzyme sur la réaction enzymatique [27]

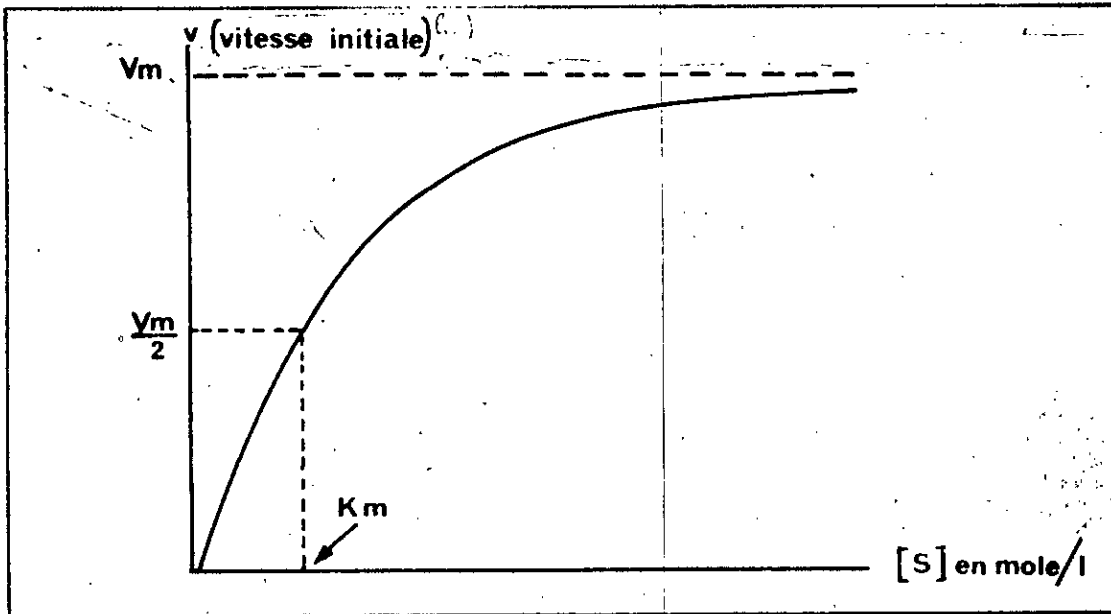
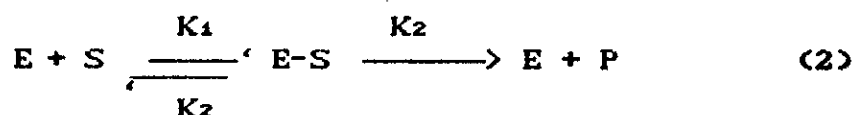


Fig (I-4): Influence de la concentration en substrat sur la réaction enzymatique [27]

Représentation de Michaelis-Menten [27]

La catalyse enzymatique, dans le cas le plus simple, peut être décrite de la façon suivante:



E :enzyme, P :produit, E-S :Complexe enzyme-substrat  
 $K_1$ ,  $K_1$ , et  $K_2$  constante de vitesse

Il faut noter que la représentation (2) n'est correcte que dans les moments initiales de la réaction, où la concentration de P est très faible donc la réaction inverse négligeable.

La variation de la vitesse en fonction de la concentration en substrat est donnée par l'équation de Michelis-Menten:[25]

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (3)$$

$K_m$  :constante de Michelis .

$K_m$  est une caractéristique de l'enzyme. Elle est analogue à une concentration et s'exprime en mole/l .

Pour  $[S] = K_m$  on remplaçant dans (3) on aura:

$$V = \frac{V_{\max}}{2}$$

Donc  $K_m$  est la concentration en substrat correspondant à la moité de  $V_{\max}$  .

$K_m$  peut, en outre, être exprimé en fonction des constantes cinétiques [25]

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad (4)$$

**(A) Représentation de LINWEAVER et BURK :**

La difficulté de tracer avec précision l'asymptote à la courbe, et par suite de déterminer graphiquement  $V_{max}$  et  $K_m$  a conduit LINWEAVER et BURK à proposer un modèle linéaire:

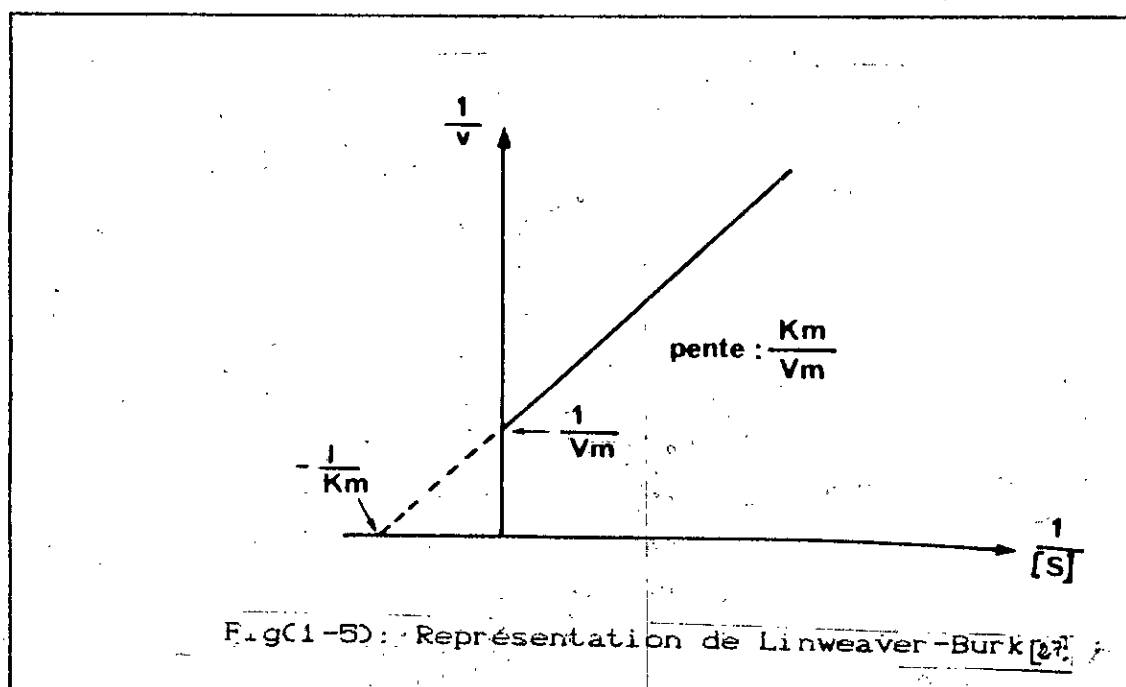
On prenant l'inverse de (3) on aura:

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

ou encore

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (5)$$

La représentation graphique de  $1/V = f(1/s)$  (voir fig(I-5)) est une droite de pente  $K_m/V_{max}$  et d'ordonnée à l'origine  $1/V_{max}$  et coupant l'axe  $1/s$  au point  $-1/k_m$



#### 1.5.3.4 INFLUENCE DE DIVERS PARAMÈTRES:

##### (A) La température: voir Fief (1-6)

L'élévation de la température d'une réaction enzymatique fait augmenter sa vitesse, tout au moins pour des températures relativement basses, arrivée à une certaine température la vitesse diminue. En effet la variation de l'activité enzymatique résulte de deux effets antagonistes: d'une part l'élévation de l'agitation des molécules avec la température d'autre part la dénaturation de la protéine enzymatique. Cette dénaturation modifie les structures tertiaires et quaternaire de la protéine globulaire.

**(B) Le pH: voir Fig (127)**

De légères variations de pH affectent l'état ionique de l'enzyme et souvent celui du substrat. On comprend aisément que quand un groupement  $\text{COO}^-$  du site actif est nécessaire à la fixation du substrat, l'abaissement du pH du milieu entraîne sa transformation, en  $-\text{COOH}$  qui ne permet plus la fixation du substrat et supprime l'activité de l'enzyme .

Le pH optimum est le résultat d'une part de la dénaturation habituelle des enzymes aux pH extrêmes et d'autre part des effets activateurs et inhibiteurs dus à l'apparition des charges électriques sur l'enzyme et le substrat.

**(C) Teneur en eau (127)**

Les enzymes sont des protéines globulaires solubles dans l'eau, et les réactions enzymatiques se déroulent, pour la plus part, en milieu aqueux.

L'eau qui joue habituellement le rôle de solvant de l'enzyme peut être dans des cas indispensable au déroulement de la réaction enzymatique et dans d'autre cas non indispensable .

Dans le premier cas, l'eau joue le rôle de second substrat notamment dans les réaction d'hydrolyse.

Pour le second cas citant le cas des dégradations enzymatiques que subissent des aliments protégés du développement microbien par suite de traitement de déshydratation partielle (séchage).

**(D) Rayonnements: [27]**

Les rayonnements de type électromagnétique ou corpusculaire peuvent avoir, sur l'enzyme, une action dénaturante. Celle-ci s'exerce soit de façon directe: en provoquant des ruptures de liaisons, soit de façon indirecte: en modifiant les caractéristiques physiques du milieu.

**(E) Les cofacteurs: [20]**

Dans de nombreux cas, même si une enzyme est mise en présence de son substrat dans des conditions appropriées, il n'y a pas de catalyse, ou seulement une activité partielle due à l'absence de coenzyme ou d'activateurs.

**i) Les coenzymes: [20],[25]**

Ce sont des composés organique non protéique de petite taille par rapport aux protéines enzymatiques.

**ii) Les activateurs:**

Ils sont chimiquement simple et ne sont pas aussi spécifique que les coenzymes. Ils semble qu'ils agissent en activant le complexe E-S. Certains ions métalliques sont connus pour être des activateurs de nombreuses enzymes.

**iii) Les inhibiteurs:**

De nombreuses substance peuvent réduire de manière plus ou moins importante l'activité catalytique des enzymes.

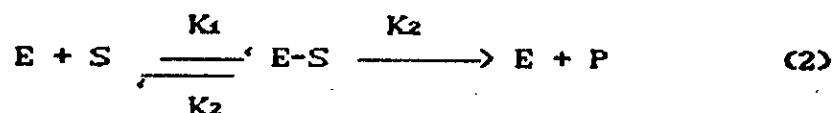
Selon que, ces substances, entrent ou non en compétition avec le substrat pour la fixation au niveau du site actif de l'enzyme, sont classées dans deux groupes principaux: les inhibiteurs compétitifs et les inhibiteurs non compétitifs.

CAS PARTICULIER: INHIBITION PAR EXCÈS DE SUBSTRAT:

Lorsque, dans le milieu réactionnel, le substrat est présent en forte concentration, la vitesse de la réaction enzymatique peut diminuer par suite d'interaction entre le substrat et le complexe E-S, suivant la réaction



D'autre part l'équation représentant une réaction enzymatique est (2):



$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

La vitesse de la réaction est donnée par :

$$V = K_s [ES] \quad (7)$$

La vitesse est maximale quand toute la quantité d'enzyme se trouve à l'état de complexe E-S

$$V_{max} = K_s [E_t] \quad (8)$$

où  $E_t$  est la quantité totale d'enzyme qui est égale à :

$$[E_t] = [E] + [ES] + [ESS] \quad (9)$$

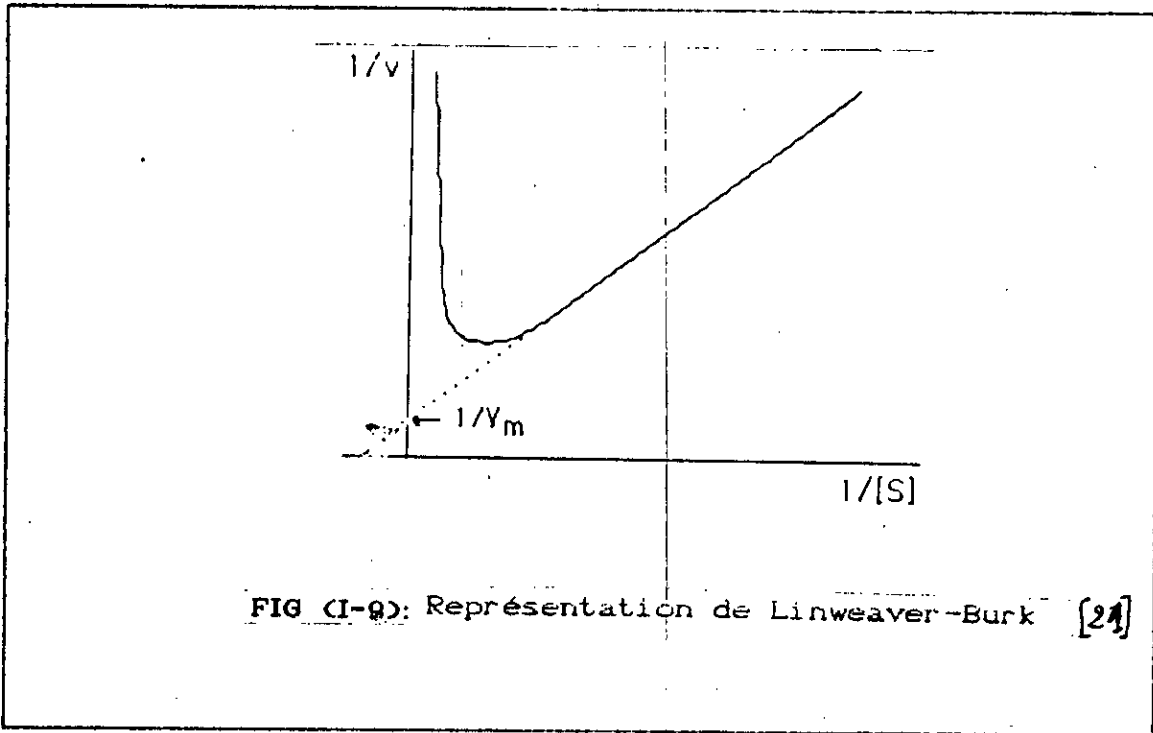
En divisant l'équation (9) par  $[ES]$  on aura:

$$\frac{[E_t]}{[ES]} = \frac{[E]}{[ES]} + 1 + \frac{[ESS]}{[ES]} = \frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_I} = \frac{V_{max}}{V}$$

et finalement on a :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_I} \right) \quad (10)$$

Dans ce cas d'inhibition, la représentation de Linweaver-burk n'est plus une droite, mais une hyperbole. Voir Fig (I-8)





---

## 1.5.4 EXTRACTION ET PURIFICATION DES ENZYMES:[22][19][27]

### 1.5.4.1 INTRODUCTION:

La purification d'une enzyme consiste à isoler une protéine enzymatique spécifique d'un extrait brut de cellules entières contenant beaucoup d'autres composés.

Le problème est de séparer l'enzyme recherchée d'un mélange contenant des centaines de protéines chimiquement et physiquement semblables.

La purification des protéines nécessite des conditions opératoires très rigoureuses: ainsi, il est indispensable de maintenir les solutions aqueuses entre 0 et 4°C, de travailler à des températures comprises entre -10 et -20°C, si l'on utilise des solvants organiques, de choisir avec beaucoup de discrimination le pH ou la force ionique des solutions, d'éviter les mousses etc...

### 1.5.4.2 TECHNIQUE CLASSIQUE DE PURIFICATION:

Parmi les techniques les plus utilisées, il y a: La précipitation par différentes concentrations de sels (généralement des sulfates d'ammonium ou de sodium) ou de solvants (l'acétone ou l'éthanol), la dénaturation différentielle, la filtration sur gel, l'évaporation, le séchage et l'électrophorèse. L'adsorption sélective et l'éluion des protéines au moyens de la cellulose échangeuse d'anions, la diéthylaminoéthylcellulose, et de la cellulose échangeuse de cations, la carboxyméthylcellulose, ont donné de bon résultats comme méthode de purification rapide et poussée.

On utilise aussi beaucoup la séparation des protéines sur tamis moléculaire comme le Sephadex. Cette technique est basée sur la taille moléculaire des protéines.

Cependant, ces méthodes sont relativement peu sélectives; elles ne séparent pas, sauf à l'état de combiné, une seule protéine de toutes les autres. Une telle séparation est plus facilement effectuée par chromatographie d'affinité.

Les préparations enzymatiques peuvent être commercialisées sous différentes formes: liquide, concentrée, poudre, lyophilisée, immobilisée, etc...

Dans le cas des enzymes endocellulaires, la récupération est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules. Après ce traitement ces enzymes sont purifiées comme les enzymes cellulaires.

La figure (I-9) représente cinq schéma possible d'extraction et de purification des enzymes.

Dans la figure on a:

- A: Enzyme exocellulaire conditionnée sous forme liquide concentrée.
- B: Enzyme exocellulaire conditionnée sous forme de poudre.
- C: Enzyme exo ou endocellulaire ayant subi une purification poussée conditionnée sous forme lyophilisée.
- D: Enzyme endocellulaire conditionnée sous forme liquide concentrée.

E: Enzyme endocellulaire utilisée sous forme insoluble éventuellement après immobilisation.

Les formes les plus faciles à manipulées sont les formes liquides. Mais les formes déshydratées présentent une meilleure stabilité à la conservation .

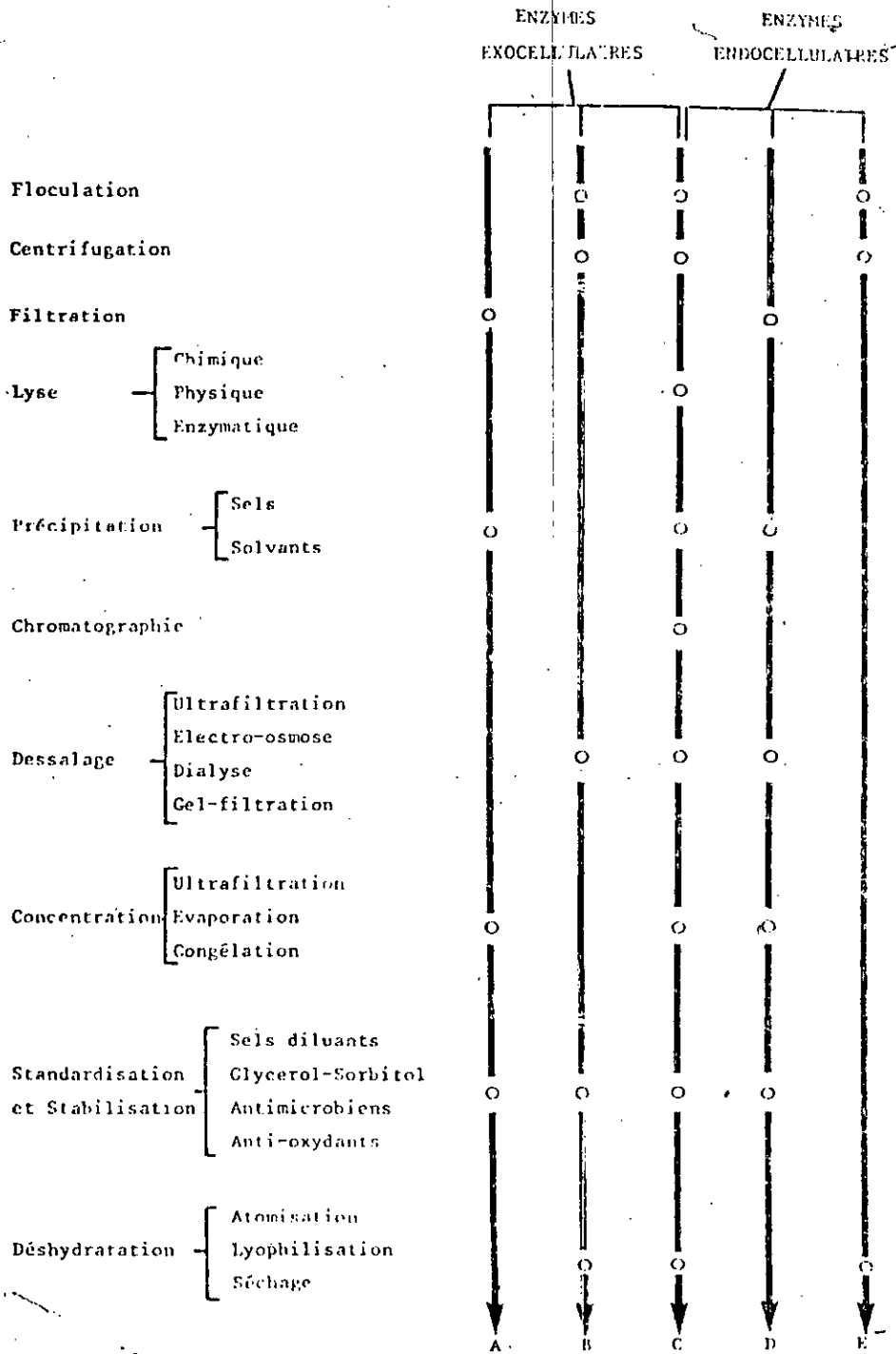


FIG (I-9): Extraction et purification des enzymes

127

**CHAPITRE 2**

**MATERIELS ET METHODES**

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

2.1. ETUDE BACTERIOLOGIQUE DU REJET

2.1.1 INTRODUCTION

Pour avoir des résultats représentatifs, les prélèvements se feront avec précaution, le transport se fera dans une glacière (température aux environs de 4°C), et l'analyse bactériologique se fera au plus tard huit heures après le prélèvement.

2.1.2 PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR L'ANALYSE

On procède au broyage de l'échantillon à l'aide d'un broyeur-mélangeur jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène.

On prépare la solution mère au  $1/10^{\text{ième}}$  de la manière suivante:

on prélève 20g de l'échantillon et on complète à 200 ml avec le diluant T.S (Tryptone-Sel).

une fois la suspension mère préparée, on procède à la préparation des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-6}$ .

2.1.3 APPAREILLAGE ET VERRERIE

Le matériel utilisé durant toutes les analyses est:

- un autoclave,
- une étuve,
- un four pasteur,
- un agitateur magnétique,
- un bec Bunsen,
- un bain marie,

- un microscope optique,
- des boîtes de pétri,
- des pipettes graduées stériles,
- des pipettes Pasteur stériles,
- une anse de platine à boucle et à fil droit,
- des tubes stériles,
- des étales,
- des lames et des lamelles,
- des béciers à pissette,
- un pot rempli d'eau de javel.

### 2.1.4 MODES OPERATOIRES

#### 2.1.4.1 RECHERCHE DES GERMES AÉROBIES MÉSOPHILES à 30°C

On ensemence 1ml de la suspension mère et des différentes dilutions décimales dans des boîtes de petri stériles auxquelles on ajoute environs 18 ml de gélose (G.N) fondue (40 à 45°C), on homogénise l'inoculum et le milieu on attend la solidification, après quoi on incube à 30°C pendant 72 heures.

#### 2.1.4.2 RECHERCHE DES COLIFORMES

##### (A) Coliformes totaux à 30°C

On ensemence 1ml de la suspension mère et des dilutions décimales dans des tubes de B.L.B.V.B(Bouillon, Lactosé, Billé au Vert Brillant). On incube à 30°C pendant 48 heures.

Une fois le temps d'incubation écoulé, on note comme positifs les tubes ayant cultivé (trouble) et présentant un dégagement gazeux dans la cloche de Durham.

Remarques:

- Le milieu peut être trouble, sans gaz, le tube est négatif.
- La cloche peut renfermer une bulle de gaz appréciable, mais le milieu est limpide, négatif.

**(B) Coliformes fécaux (E-coli)**

A partir de chaque tube considéré comme positif après incubation de 24 à 48 heures à 30°C, on ensemence avec une pipette Pasteur, un tube du milieu sélectif B.L.B.V.B et un tube d'eau peptonée exempte d'indole. On fait incuber ces tubes à 44°C pendant 24 à 48 HEURES tubes présentant un dégagement gazeux appréciable dans la cloche du Durham avec une présence d'indole dans le tube d'eau peptonée affirme la présence d'E-coli: c'est le test de Mackenzie.

La présence d'indole dans le tube d'eau peptonée est mise en évidence par le réactif de covacs qui se traduit par un anneau rouge dans l'eau peptonée.

**2.1.4.3 RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES**

Transférer, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 0.1 ml de la suspension mère et des différentes dilutions retenues à la surface du milieu de Baird-Parker (milieu gélosé, enrichi à l'oeuf). L'inoculum est étalé sur toute la surface avec un étaleur en verre.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures à 48 heures, après quoi, on procède au comptage des colonies caractéristiques.

On entend par colonies caractéristiques celles qui sont noires, brillantes, bombées, cerclées d'un petit lisère blanc opaque, et entourées d'un halo d'éclaircissement du milieu



de culture bien visible [17].

La confirmation de la présence des staphylocoques se fait suivant leur caractéristiques biochimiques et surtout la recherche de la caogulase.

#### 2.1.4.4 RECHERCHE DES STREPTOCOQUES FÉCAUX

Chaqu'un des tubes contenant 10 ml de milieu de Rothe sont incubés par 1 ml de la suspension mère et des dilutions décimales; la suspension mère est en outre inoculée à raison de 10 ml dans 10 ml de Rothe à double concentration. On incube à 37°C pendant 48 heures. L'ensemencement est réalisé a raison de 5 tubes par dilution.

Les tubes présentant un trouble sont considérés comme positifs.

Pour la confirmation, on repique à partir de tube positif deux gouttes à l'aide de pipette Pasteur dans le milieu de litsky qu'on incube à 37°C pendant 24 heures.

La présence des S.fécaux se manifeste par l'apparition d'un trouble microbien et la formation d'une pastille violette au fond du tube.

#### 2.1.4.5 RECHERCHE DES CLOSTRIDIUM-PERFRENGENS

A partir de la suspension mère et des dilutions effectuées, on prélève 1 ml dans des tubes à hémolyse stériles, on pasteurise à 80°C pendant 10 minutes. Ce traitement permet la destruction de toute forme végétative. En parallèle, on procède à la liquéfaction de la gélose viande-foie (v-f) sulfitée au bain marie à 45°C.

Après refroidissement, on porte en double, à partir de la solution mère et de chaque dilution, 1 ml dans les tubes

regénérés, on mélange pour répartir l'inoculum dans le milieu gélosé sans introduction d'air. Après solidification de la gélose, on incube les tubes ensemencés au bain marie à +46°C.

On effectue les lectures après 24 et 48 heures.

La présence de colonies paraissant en noir (en réalité, elles sont blanches entourées d'un halo de précipitation de sulfite de fer) est présomptif de la présence des C-perfrengens.

#### 2.1.4.6 RECHERCHE DE SALMONELLA.

Pour cette recherche, on prépare une nouvelle suspension mère au 1/10<sup>ième</sup> toujours, en diluant dans une érlène stérile 25g de produit avec 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT).

On incube à 37°C pendant 18 heures: ceci constitué l'étape de préenrichissement qui permet la récupération des bactéries "stressées" [17]

Pour l'étape d'enrichissement, on incube environ 0.2 ml dans un tube bouillon au sélénite de sodium à 43°C pendant 24 heures.

L'isolation se réalise sur milieu du désoxychlorate citrate lactose (DCL ou DCLS) et sur milieu Hektoeu avec une anse bouclée on incube à 37°C pendant 24 heures et 48 heures. Une fois ce temps écoulé, on repère les colonies suspectes sur DCL colonies incolores à centre noires, et sur gélose Hektoeu colonies bleues à centre noires.

Les colonies suspectes feront objet d'une identification biochimique par repiquage sur milieu de TSI ou kligler par strie longitudinales sur la pente et piqure du culot.

Les souches de salmonella donnent les résultats suivants:

culot: jaune (fermentation du glucose) noircissement

(H<sub>2</sub>S) qui peut masquer le virage au jaune gaz (bulles, fissures et décollement de la gélose).

pente: rouge (lactosé, saccharosé).

On procède après à la confirmation par le biais de tests biochimiques notamment l'uréase, l'oxydase et la  $\beta$ -galactozidase.

## 2.2 PRODUCTION DE L'HYDROLYSAT PAR DIGESTION ENZYMATIQUE

### 2.2.1 INTRODUCTION

L'enzyme utilisée durant cette étude est une pepsine brute extraite de l'estomac d'un mouton. Cette production a été faite en s'inspirant de la méthode proposée par L.LLUI et G.M PIGOTT [7], lors de leurs travaux sur la muqueuse gastrique d'un porc.

Dans cette étude, on s'est fixé les objectifs suivants:

- production de l'enzyme,
- optimisation des paramètres influençant la réaction enzymatique,
- étude de la cinétique d'action de l'enzyme,
- essais d'hydrolyse.

### 2.2.2 MATERIEL ET APPAREILLAGE UTILISES

la réalisation de ces objectifs a nécessité l'utilisation de produits, verrerie et appareillage courant du laboratoire, notamment

- une pepsine commerciale (1:60000 sigma company),
- un BSA protéine standard (Bovin Serum Albumine)

- des rejets de poissonnerie broyés et conservés congelés à -20°C
- du papier Whatmann N°3,
- du TCA acide trichloroacétique
- de l'éthanol,
- du chloroforme,
- un spectrophotomètre (Milton Spectronic 1201
- une centrifugeuse (Hettich)

### 2.2.3 PRODUCTION DE L'ENZYME

#### 2.2.3.1 PRÉPARATION DE LA MUQUEUSE

Juste après l'égorgement du mouton, on prélève l'estomac que l'on vide de son contenu et on la rince avec de l'eau froide délicatement en évitant de toucher la muqueuse à main nue. Il est préférable de se munir de gants.

La muqueuse est détachée de son support et est rincée à l'eau froide après quoi, on procède à son broyage par un hachoir à viande (moulinex) et on la conserve congelée à -20°C dans des sachets en plastiques en vue d'une utilisation ultérieure.

#### 2.2.3.2 ACTIVATION DE LA MUQUEUSE

La pepsine est sécrétée dans les villosités de la muqueuse sous forme de pepsinogène inactif.

L'obtention de l'enzyme nécessite, donc, la lyse des cellules de la muqueuse et l'activation du pepsinogène en milieu acide.

La muqueuse est activée à différents pH afin d'obtenir le pH optimum d'activation qui est, selon beaucoup d'auteurs, variable entre 1 et 2 [21], [7].

Dans notre étude, on a testé six valeurs qui sont: 0.75, 1, 1.5, 1.75, 2, et 2.25 afin de pouvoir étudier l'évolution de l'activité de l'enzyme en fonction du pH d'activation.

### MODE OPERATOIRE

Dans six béchers de 500 ml, propres et secs, contenant chacun 100 ml d'HCl 0.01 N, introduire 1g de muqueuse tout en maintenant une agitation constante et continue à l'aide d'un agitateur magnétique, le pH est ajusté à la valeur désirée par du HCl 4N durant les 30 premières minutes.

Après six heures d'agitation, on ramène le volume du bécher à 500 ml par du HCl 0.01N et on filtre le contenu des béchers à travers une gaze pour retenir les portions de la muqueuse. Ceci permet d'éviter la formation de mucus dans la solution pepsique.

La conservation des solutions pepsiques se fait à 4°C pendant 7 jours durant lesquels l'activité des solutions pepsiques est mesurée quotidiennement.

### 2.2.3.3 ESSAI D'ACTIVITE DES SOLUTIONS PEPSIQUES

Les essais d'activité sont effectués sur un substrat standard la B.S.A et sur le substrat (protéine de poisson).

L'essai d'activité consiste en:

- l'introduction dans un tube propre, sec et étiqueté de 4 ml de solution pepsique,
- l'incubation du tube, et un petit bécher contenant la solution de substrat à 2.5% séparément à la température d'essai durant au moins 10 minutes .
- Après 10 minutes de réaction, verser 6 ml de la solution de

TCA à 4% pour arrêter la réaction en coagulant les protéines non hydrolysés. On laisse agir 5 à 10 minutes, et on filtre le contenu du tube à travers le papier Whatmann N°3 qui retient les protéines coagulées.

La densité optique (D.O) à 280 nm contre de l'eau distillée du produit soluble dans le TCA est déterminée.

Dans notre étude, les essais d'activité sont réalisés à la température ambiante (22°C ).

### 2.2.4 OPTIMISATION DES PARAMETRES INFLUENCANT LA REACTION ENZYMATIQUE

#### 2.2.4.1 ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

L'étude consiste à faire des essais d'activité des solution pepsiques à différentes températures afin d'obtenir la température donnant le maximum d'activité.

La gamme des températures est choisie de façon à tester le maximum de valeurs, surtout celles rapportées par les différents chercheurs comme étant la température correspondant au maximum d'activité.

Les essais sont réalisés par l'enzyme brute et une solution de pepsine commerciale, sur la B.S.A et le protéine de poisson, afin de pouvoir comparer le comportement de l'enzyme brute et celui de l'enzyme commerciale.

La solution pepsique commerciale est préparée en faisant dissoudre la quantité d'enzyme voulue dans du HCl 0.01 N.

La gamme des températures choisie comporte 14 valeurs de

températures qui sont: 22, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50, 55, 60, 62, 65 et 70.

#### 2.2.4.2 ETUDE DE L'INFLUENCE DU pH

On procède de la même manière que précédemment, mais cette fois en maintenant la température dans son optimum et on faisant varier le pH dans la gamme des valeurs choisies.

Les valeurs du PH testés sont 1, 1.5, 1.8, 2, 2.5 et 3.

Le pH de la solution est ajusté par ajout d'acide HCl 4N ou de base NaOH 2N

#### 2.2.5 ETUDE DE LA CINETIQUE D'ACTION DE L'ENZYME

L'étude de la cinétique d'action de l'enzyme permet d'étudier le comportement de l'enzyme durant la réaction d'hydrolyse ainsi que la détermination des constantes caractéristiques de l'enzyme brute en l'occurrence  $K_m$  et  $V_{max}$ .

##### 2.2.5.1 Préparation des Solutions

Pour la préparation de la solution pepsique, on procède de la même manière, cependant cette fois, l'activation se fait par autodigestion acide durant 12 heures et non pas 6 heures car selon L.L.LUI et G.M.PIGOTT [7], le maximum d'activité est atteint après 12 heures d'activation. C'est le résultat de l'essai d'activation de la muqueuse durant 45 heure au cours desquelles l'activité est mesurée toutes les deux heures. Pour des raisons pratiques, on n'a pas pu réaliser cette expérience.

Les solutions de substrat sont préparés par dilution des rejets de poissonnerie broyés dans de l'eau distillée.

Les concentrations en substrat testés sont 50, 100, 150, 200,

250, 350, 400, 450 et 500 g/l.

### 2.2.5.2 MODE OPERATOIRE

Une fois les solutions de substrat et d'enzyme sont prêtes, on procède à l'ajustement du pH de chacune d'elles à la valeur correspondant à l'optimum d'activité par ajout d'acide ou de base. Par la suite, on incube séparément la solution d'enzyme et celle du substrat à la température d'essai durant 10 minutes, après quoi, on effectue le mélange des solutions d'enzymes et du substrat tout en maintenant une agitation constante et continue et en ajustant le pH à sa valeur optimale si nécessaire.

Des aliquotes de 10 ml sont prélevés à différents moments (1 min, 3 min, 6 min, 9 min, 12 min, et 15 min) par une seringue dans de petits béchers contenant 5 ml de T.C.A à 20%. Après 5 à 10 minutes, le contenu du bécher est filtré à travers le papier Whatmann N°3 dans un tube à essai.

La concentration en protéines dans le filtrat est évaluée par la méthode de biuret (voir annexe) contre une courbe d'étalonnage.

### 2.2.6 ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS DE POISSONNERIE

Dans cette étude, on s'est conformé aux indications rapportées par L.L.LUI et G.M.PIGOTT [7].

Les essais d'hydrolyse ont deux fins:

- de déterminer la concentration en enzyme brute optimale donnant un taux d'hydrolyse maximum.



- de comparer le taux d'hydrolyse obtenu avec celui obtenu par l'action d'une enzyme commerciale, et une enzyme purifiée au laboratoire.

### 2.2.6.1 PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Dans cette étude, on effectue six différents essais d'hydrolyse, dont trois avec l'enzyme brute à 3%, 6% et 9% (poids de la muqueuse/ poids du rejet), un essai avec de la pepsine commerciale à 0.2%, un essai avec l'enzyme purifiée à 3 %, et un essai sans ajout d'enzyme.

Les solutions d'enzyme brute sont préparées de la même manière que précédemment.

Les solutions de substrat sont préparées par dilution de 50g de rejet dans 50 ml d'eau distillée.

En ce qui est de la préparation de l'enzyme purifiée, on procède de la manière suivante:

- peser la quantité de muqueuse voulue, l'homogénéiser à 0°C avec un même volume d'eau distillée à l'aide d'un mixeur jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène.

- prélever un volume de cette pâte et lui ajouter un même volume du mélange binaire éthanol à 98% : chloroforme 1:1, tout en maintenant une agitation continue pendant dix minutes à 0°C.

- Le mélange est ensuite centrifugé à 8000 t/min à 5°C pendant dix minutes afin d'éliminer le précipité de floculation.

Une fois le temps écoulé, reprendre le culôt et lui ajouter la moitié du volume de pâte prélevée initialement de l'eau distillée, après homogénéisation on centrifuge à nouveau dans

les mêmes conditions que précédemment.

Le surnageant contient l'enzyme.

Enfin la solution du surnageant est activée pendant 12 heures.

### 2.2.6.2 MODE OPERATOIRE

On procède de la même manière que dans l'étude de la cinétique, mais cette fois, on étudiera l'évolution de l'hydrolyse pendant 4 heures durant lesquelles des prélèvements d'échantillons seront effectués 0.5; 1; 2; 3 et 4 heures de l'hydrolyse.

Il est très important de contrôler le pH et de l'ajuster à l'optimum par ajout d'acide ou de base tout au long de la réaction.

**CHAPITRE 3**

**RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

|  |
|--|
| CHAPITRE TROIS RESULTATS ET DISCUSSION |
|--|

### 3.1 ETUDE BACTERIOLOGIQUE DU REJET:

#### 3.1.1 RÉSULTATS:

Les résultats des analyses bactériologiques du rejet sont les suivants:

|                                  |                            |
|----------------------------------|----------------------------|
| - les germes aérobies mésophiles | 7.10 <sup>6</sup> germes/g |
| -Coliformes à 30°C               | 1.10 <sup>6</sup> germes/g |
| -Coliformes fécaux et E.Coli     | 10000 germes/g             |
| -Staphylocoques                  | absence                    |
| -Streptocoques                   | 1000 germes/g              |
| -Clostridium perfringens         | 400 germes/g               |
| -Salmonella                      | absence dans 25g           |

#### 3.1.2 INTERPRETATION

Pour pouvoir conclure à propos de la qualité bactériologique du rejet et exploiter à bien les résultats des testes, nous disposons des normes suivantes:

(1) norme dérivée des normes ISO adopté par le ministère de l'agriculture et de la révolution agraire (projet FAO ALG/77/006 Algérie 1981) [32] dont on a extrait ce qui suit:

poissons tranches et filets réfrigérés ou congelés:

|                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| - germes totaux     | < 10 <sup>6</sup> germes / gramme   |
| - coliformes fécaux | < 30 germes / gramme                |
| - staphylocoques    | < 3.10 <sup>2</sup> germes / gramme |
| - salmonella        | absence dans 25g                    |

(2) critères sanitaire défini par l'arrêté du 21/12/79 en France

Pour les poissons tranchés panés ou non, filets de poisson frais réfrigérés:

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| - flore aérobies mésophiles     | 10 <sup>5</sup> germes / gramme |
| - coliformes fécaux             | 10 germes / gramme              |
| - staphylocoques aureus         | 10 <sup>2</sup> germes / gramme |
| - anaérobies sulfito-réducteurs | 10 germes / gramme              |
| - salmonella                    | absence dans 25 gramme          |

La comparaison des résultats obtenus avec les normes mène à dire que les rejets représentent une forte contamination due notamment à une flore totale très importante et la présence en force des coliformes, sulfito-réducteurs, et streptocoques. Donc c'est une contamination d'origine fécale.

Ces résultats viennent confirmer ceux rapportés par L. Siammour [9]; et O. Guaouar et S. Fennouh [10].

Donc une stérilisation des rejets avant leurs utilisation est indispensable car ils sont destinés, après traitement, à l'alimentation animale et éventuellement humaine.

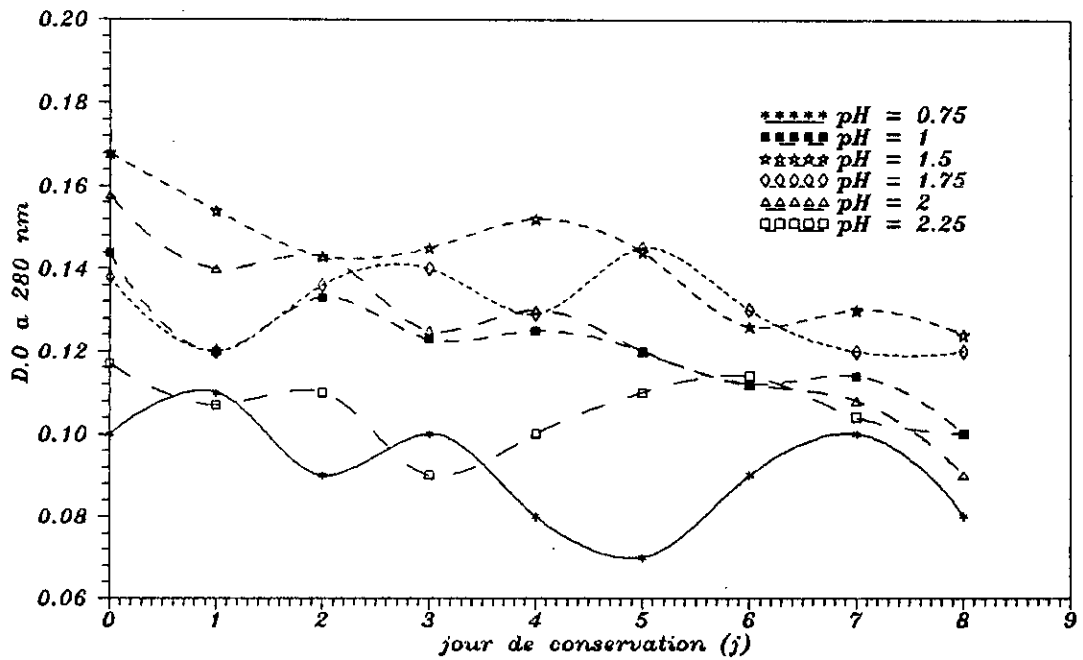
### 3-2 PRODUCTION DE L'HYDROLYSAT PAR DIGESTION ENZYMATIQUE

#### 3-2-1 PRODUCTION DE L'ENZYME:

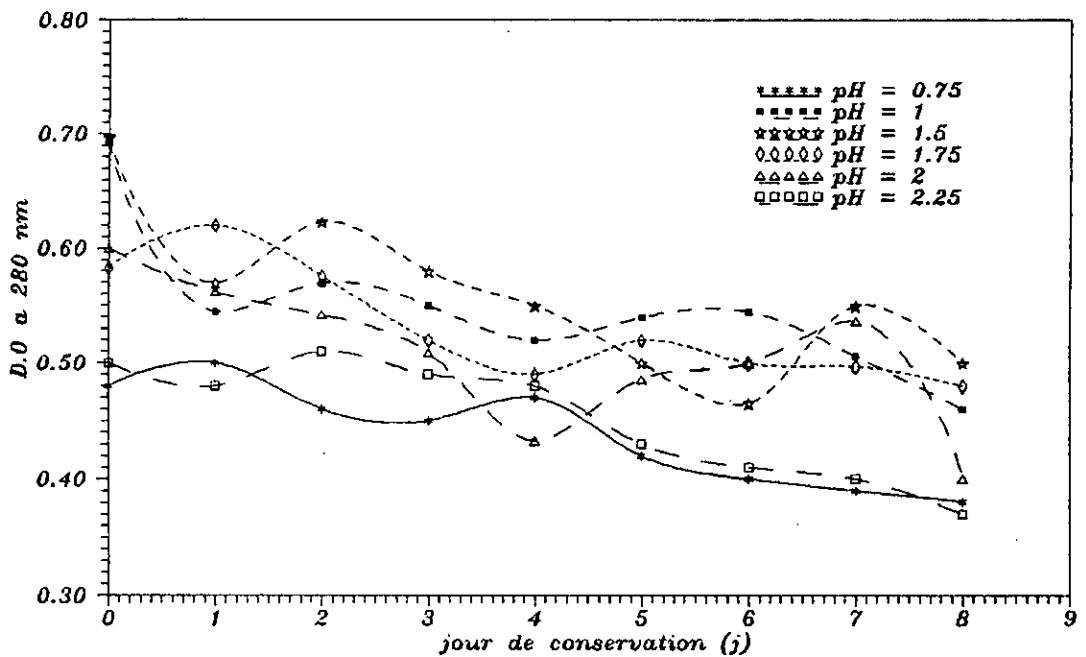
##### 3-2-1-1 RÉSULTATS

Les essais d'activité de l'enzyme durant les huit jours de conservation sur substrat et sur BSA se représentés graphiquement sur la fig(II-1).

1 Essai d'activite sur BSA



2 Essai d'activite sur substrat (proteine de poisson)



FIG(III-1) : Variation de l'activite de la pepsine brute en fonction du nombre de jour de conservation

## 3.2.1.2 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS:

L'examen des deux graphes permet de remarquer ce qui suit:

- la solution pepsique qui apparait comme ayant la plus grande activité est celle préparée à pH = 1.5, surtout dans le cas de l'essai sur BSA, du moins après deux jours de conservation; et celle qui apparait ayant la plus faible activité est celle préparée à pH = 0.75.

- dans le cas d'essai sur substrat, on remarque que la solution pepsique préparée à pH = 1 rivalise avec la solution pepsique activée à pH = 1.5 notamment le 5<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour où elle apparait plus active.

- les solutions pepsiques préparées à des valeurs de pH situées

en dehors de l'intervalle 1-2, en l'occurrence pH = 0.75 et pH = 2.25 sont les moins active.

- les activités de toutes les solutions pepsiques diminué le long de la conservation, et ceci est dû au fait de l'autolyse de l'enzyme.

G.M.Pigott et coll. [7] rapportent que la solution pepsique préparée à pH = 1 est la plus active.

Les auteurs ont utilisé comme matière première l'estomac du porc, qui est un omnivore dont l'estomac est plus acide que celle du mouton qui est herbivore [22].

L.Siammour [9]; O.Guaouar et S.Fennouh [10]; et A.Guiraa et M.Guehdouni [11], ont arrivé à la même conclusion, lors de leur travaux, malgré qu'ils ont utilisé l'estomac du mouton

pour extraire l'enzyme.

En fait, l'analyse approfondie des graphes permet de déduire que les solutions pepsiques activées à des valeurs de pH comprises entre 1 et 2 (notamment pH = 1 et pH = 1.5) ne pressentent pas une grande différence dans les activités. Donc on peut dire qu'il s'agit d'une gamme de pH compris entre 1 et 1.5 pour les quelles l'enzyme acquiert une activité optimale.

Mais pour des raisons économiques, le pH = 1.5 sera considéré comme pH optimum d'activation pour les essais suivantes. A ce pH l'enzyme se conserve très bien.

En fin, on remarque que les solutions conservées voient leur activité diminuer notamment après le 4<sup>me</sup> jour de conservation, donc pour les essais ultérieures on utilisera des solutions pepsiques fraîchement préparées ou du moins datant d'au plus quatre jour, et conservées à 4°C. Pour des conservations de longue durée, il faut plutôt conserver la muqueuse à l'état congelé (-20°C), comme le recommande G.M.Pigott et coll. [7], ce qui conserve l'activité enzymatique pour une durée d'au moins cinq mois.

### 3.2.2 OPTIMISATION DES PARAMETRES INFLUENCANT LA REACTION ENZYMATIQUE:

#### 3.2.2.1 ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPURATURE

##### (A) Résultats

Les résultats obtenus durant les quatres essais, effectués, sont représentés graphiquement sur la figure(III-2)



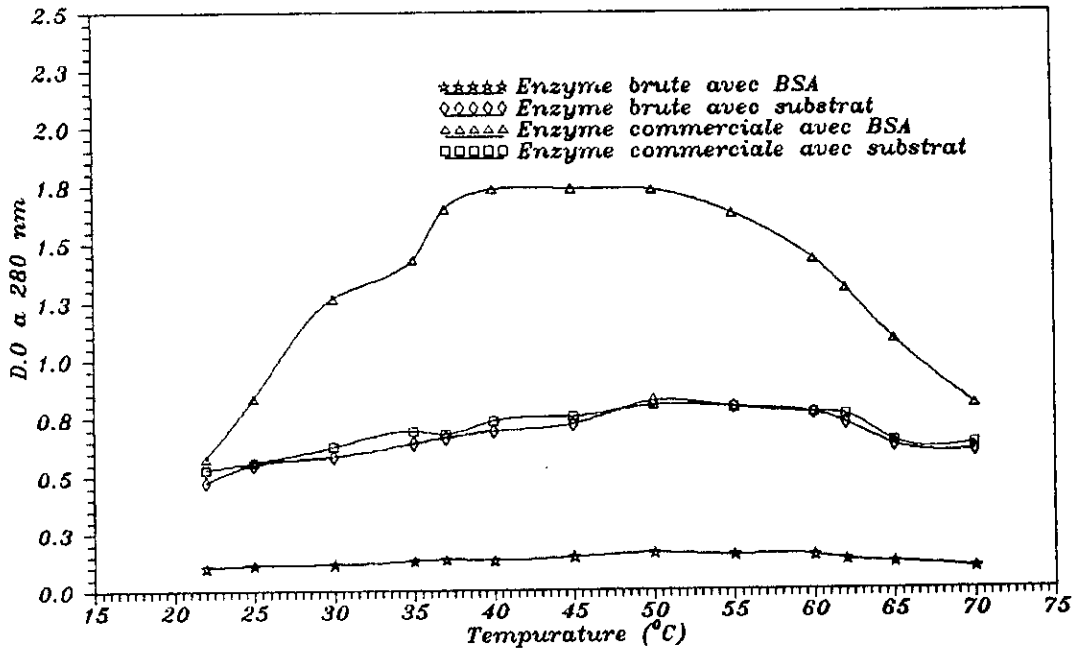
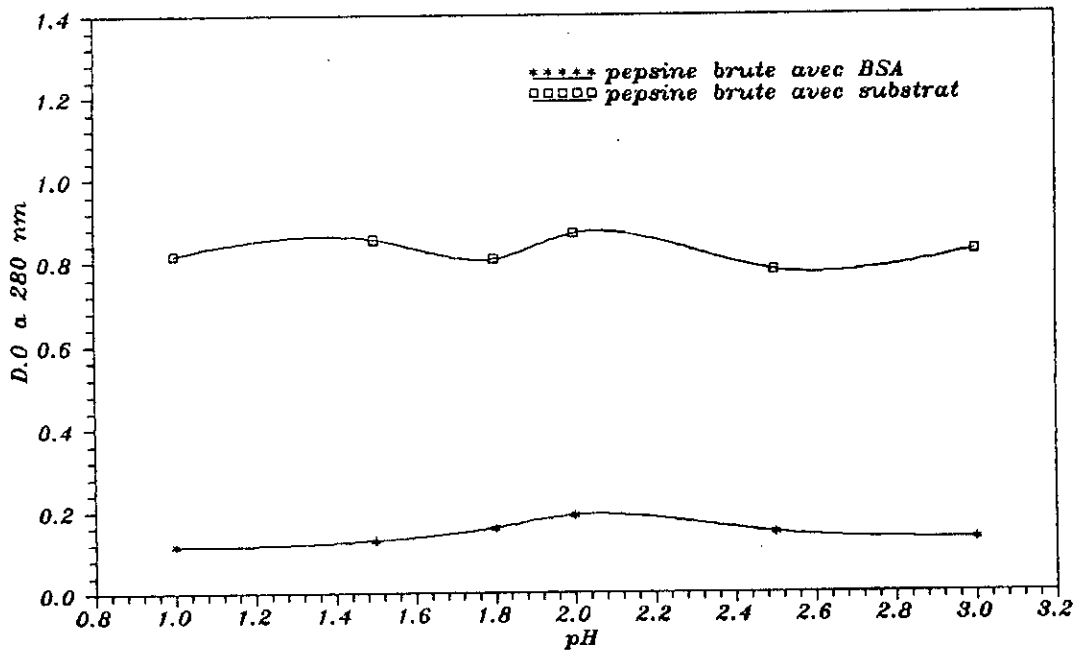


FIG ( III - 2 ) : Profil des variation des activites des enzymes brute ( $E = 0.002 \text{ g/ml}$ ) et commerciale ( $E = 0.0004 \text{ g/ml}$ ) sur BSA et substrat ( proteine de poisson ) a  $25 \text{ g/l}$



FIG(III-3) : Profil des variations de l'activite de l'enzyme brute en fonction du pH (essai a  $50^\circ \text{c}$  avec  $E = 0.002 \text{ g/l}$ )

**(B) Interprétation**

Pour les quatres essais on remarque une allure en cloche représentant un optimum vers 50°C.

Des quatre courbes, celle qui reflète une grande activité est celle représentant l'essai de la pepsine commerciale avec la BSA qui atteint une D.O de l'ordre de 1.7 et qui reste presque constante entre 37 et 50°C. Cette grande activité s'explique par le fait que l'enzyme et le substrat sont à l'état pure.

L'essai de la pepsine brute sur BSA représente la plus faible activité parmi les quatres, ceci peut être dû au fait que l'enzyme, ayant une activité relativement faible, n'arrive pas à dégrader la BSA à l'état de peptides solubles dans le TCA. donc la plupart du substrat fera partie des protéines non hydrolysées.

En ce qui est des courbes représentant l'essai sur protéine de poisson, des enzymes brute et commerciale, les activités sont pratiquement du même ordre de grandeurs représentant un optimum de D.O de 0.8 . Ceci peut être dû au fait que le substrat n'étant pas pur, et ayant une teneur en protéine relativement faible d'environ 12% [1], influence la concentration en acide aminés aromatique dans la solution. Cette dernière sera faible devant celle de la solution de BSA. Donc lors de l'essai les deux enzymes arrivent à dégrader toutes les quantités de protéine présente dans la solution de substrat et delà ils libèrent la même quantité d'acides aminés aromatique, d'où on aura pratiquement le même ordre de grandeur de D.O à 280 nm.

En conclusion on peut dire que l'enzyme brute a un comportement semblable à celui de la pepsine commerciale, et

qu'elle présente une activité optimale à une température de 50°C.

3.2.2.2 ETUDE DE L'INFLUENCE DU PH:

(A) RÉSULTATS:

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement sur la figure (III-3).

(B) Interprétation

L'analyse de chacune des deux courbes mène à dire que dans l'intervalle de pH testé et notamment pour des valeurs de pH comprises entre 1.5 et 2.5 les activités sont du même ordre de grandeur, Ceci est conforme avec la littérature où l'on trouve que le pH optimum d'activité de la pepsine est généralement situé entre 1.5 et 2.5 [27],[29].

dans cet essai, il est aisément remarquer que l'activité est maximale pour la valeur de pH = 2.

3.2.2.3 CONCLUSION:

Cette étude des deux paramètre a abouti aux résultats suivants: température optimale de 50°C et pH optimum de 2.

| Auteurs         | température optimale | pH optimum | référence |
|-----------------|----------------------|------------|-----------|
| M. B. Hale      | 40 - 50              | 2          | [N]       |
| Pigott et coll. | 48                   | 2          | [S]       |
| Pigott et coll. | 37 - 62              | 1.7 - 2    | [S]       |

Tableau n°= 8 : Conditions d'activité optimale rapportées partées par différents auteurs.

Ces résultats sont conforme aux résultats obtenus par beaucoup d'auteurs. Le tableau (n° 8) donne quelque exemple

En ce qui concerne l'enzyme commerciale, on remarque que dans le cas de l'essai avec substrat la température optimale est de 50°C alors que la température indiquée par le fabricant est de 37°C . Ceci peut être dû au fait que l'augmentation de la température de la solution de substrat fait diminuer la viscosité [8], d'où une augmentation des collisions entre enzyme et substrat et par là une augmentation de l'activité de l'enzyme. Mais au delà de 55°C il y a réduction de l'activité car la pepsine devient thermosensible [27].

### 3-2-3 ETUDE DE LA CINÉTIQUE D'ACTION DE L'ENZYME:

#### 3.2.3.1 RÉSULTATS:

Les résultats de l'évolution de la concentration en protéine soluble dans le T.C.A (20%) avec le temps sont représentés graphiquement sur la figure (III-4).

#### 3-2-4-2 EXTRAPOLATION DES RESULTATS ET INTERPRETATION

La détermination graphique de la vitesse initiale se fait en traçant la tangente à l'origine de la courbe.

L'obtention de la concentration initiale en protéines dans la solution se fait en considérant que 12% en poids de la masse du substrat est sous forme de protéines.

Le tracé graphique de la variation de la vitesse en fonction de la concentration initiale en protéines est représenté sur la figure (III-5) .

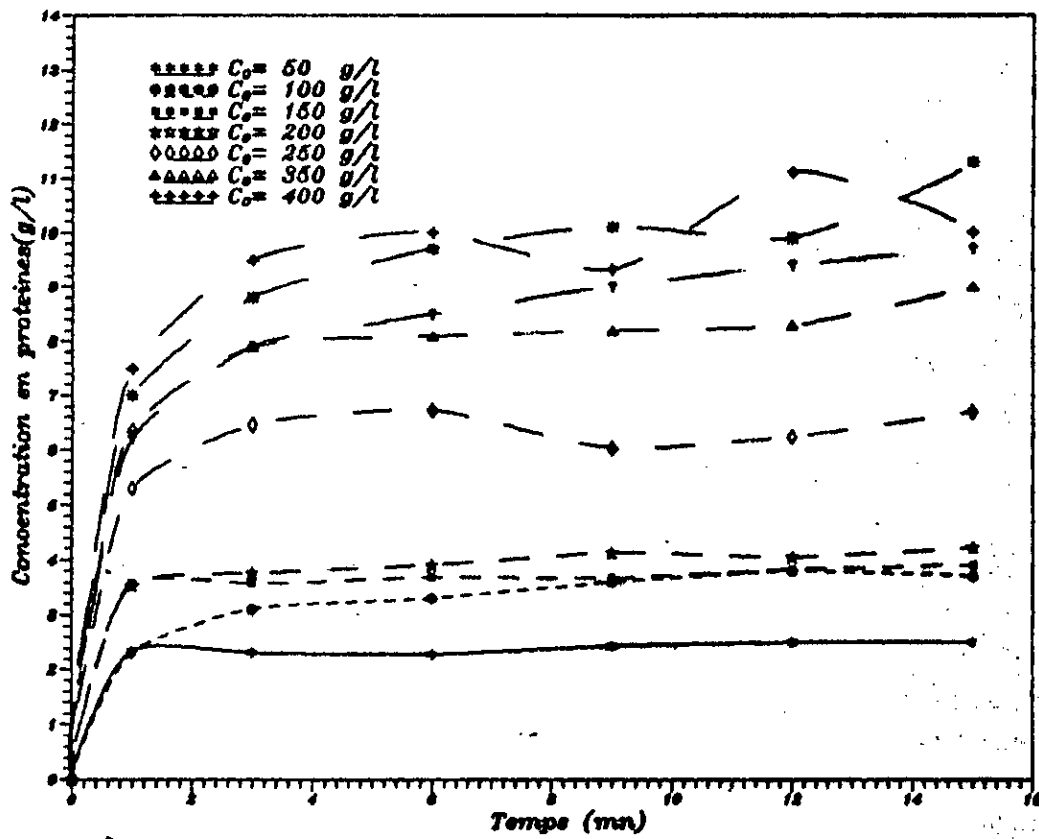


FIG ( III - 4 ): Evolution de la concentration en proteines avec le temps pour differentes concentration initiales en substrat

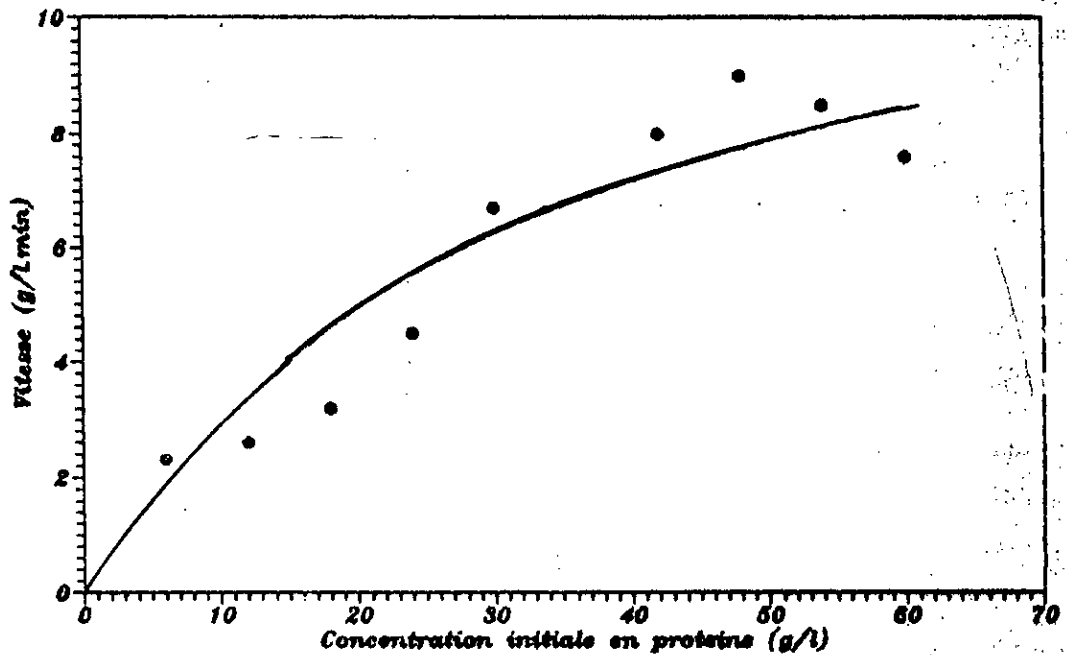


FIG ( III - 5 ): Effet de la concentration du substrat sur l'activite enzymatique

L'examen de ce tracé graphique permet de déduire que l'enzyme brute <sup>n'</sup>obéit <sup>pas</sup> à la loi de Michaelis-Menten, donc la cinétique <sup>n'</sup>est <sup>pas</sup> méchaélienne.

Afin de pouvoir déterminer les constantes cinétiques de l'enzyme, on a procédé à la représentation de  $1/V$  en fonction de  $1/S$  (voir figure (III - 6)).

A partir de la figure (III-6) on remarque que, au delà de la valeur  $S = 400$  g/l on a une inhibition par le substrat.

La détermination graphique des constantes cinétiques donne les résultats suivants:

$$K_m = 50 \text{ g/l} \quad \text{et} \quad V_{\max} = 20 \text{ g/(l.mn)}.$$

O. Guaouar et S. Fennouh [10], ont procédé à l'étude de la cinétique de la réaction enzymatique en utilisant, comme enzyme, la pepsine commerciale. Ils ont utilisé deux concentrations en enzyme, et ils ont rapporté les résultats suivants:

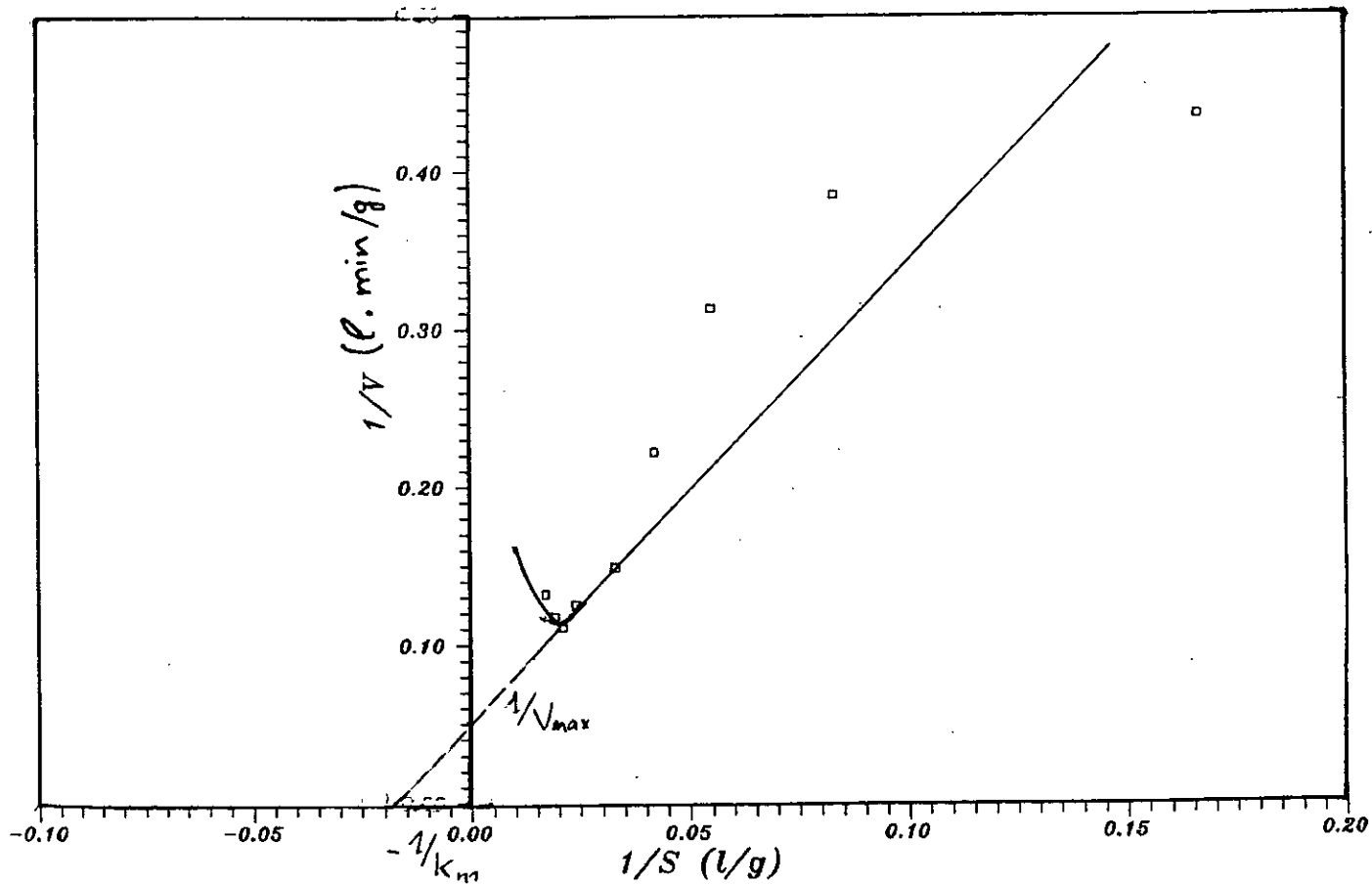
- pour une concentration en enzyme de 0.8 g/l on a :

$$V_{\max} = 0.2 \text{ g/l.mn} \quad \text{et} \quad K_m = 70 \text{ g/l}.$$

- pour une concentration en enzyme de 10 g/l on a :

$$V_{\max} = 0.094 \text{ g/l.mn} \quad \text{et} \quad K_m = 33.33 \text{ g/l}$$

On remarque que les valeurs des paramètres cinétiques obtenues ne sont pas constantes en faisant varier la concentration en enzyme. en effet les premières valeurs sont pratiquement le double des deuxièmes valeurs. Ceci peut être dû à des erreurs de manipulation puisque c'est une détermination graphique.



FIG( III- 6 ): Representation selon Lineweaver-Burk  $1/V = f(1/S)$

Si l'on compare nos résultats avec ceux rapportés par les auteurs, on pourra conclure ce qui suit:

- la valeur de  $K_m$  qu'on trouve est du même ordre de grandeur que celles rapportées par les auteurs, mais la vitesse maximale est très grande devant celles rapportées.
- la pepsine brute, ayant un  $K_m$  du même ordre de grandeur que celui de la pepsine commerciale, aura donc une affinité en vers le substrat du même ordre que celle de l'enzyme commerciale.

### 3.2.4 ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS DE POISSONNERIE

#### 3-2-4-1 RÉSULTATS

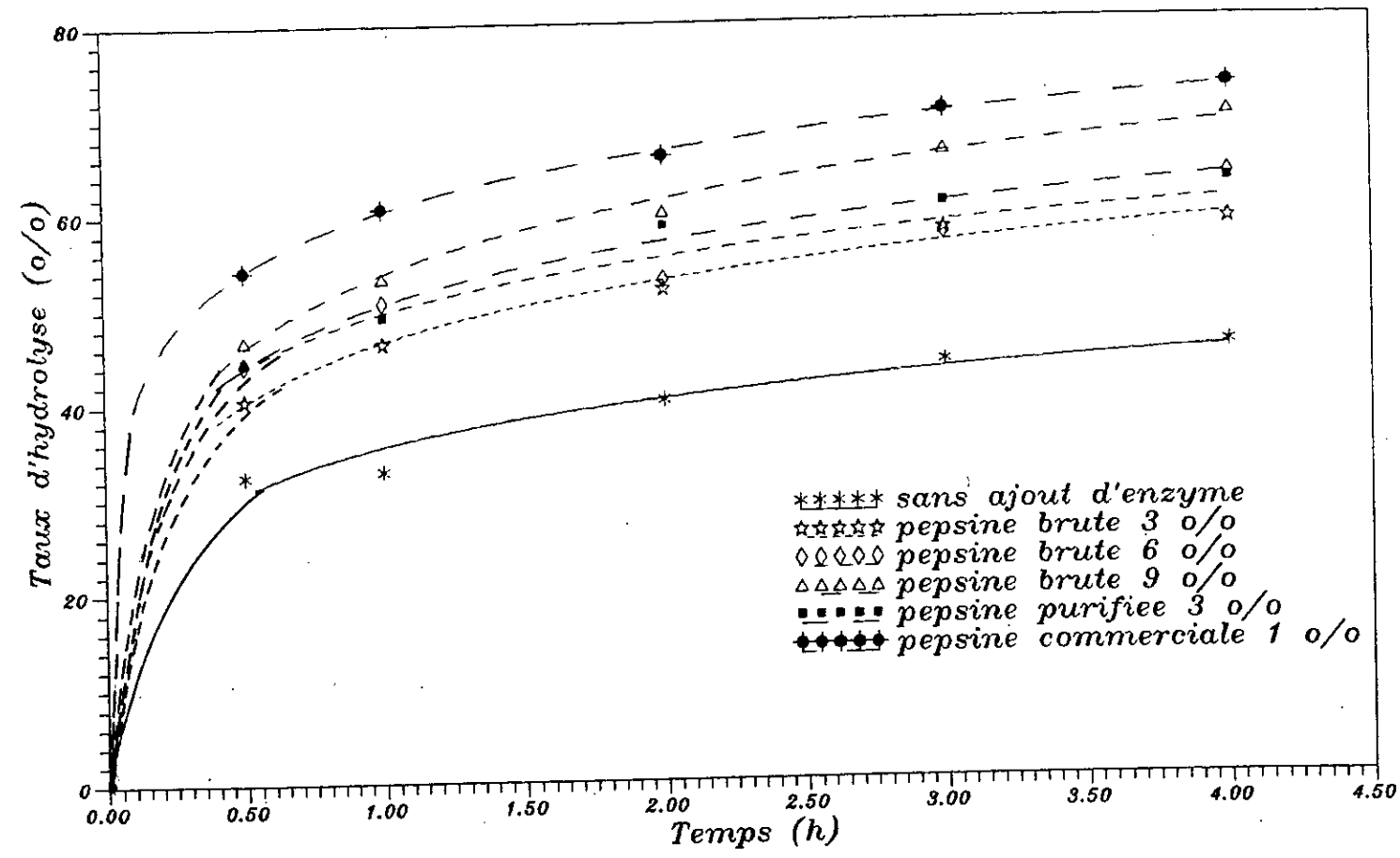
Les résultats des essais d'hydrolyse sont représentés graphiquement sur la figure (III-7).

#### 3-2-4-2 INTERPRÉTATION

L'examen de six courbes montre que le taux d'hydrolyse maximum est atteint avec la pepsine commerciale à 0,2% qui est de l'ordre de 73% au bout de quatre heures d'hydrolyse et que le taux d'hydrolyse minimum est celui de l'essai sans ajout d'enzyme qui de l'ordre de 44% (phénomène d'autolyse) .

En ce qui est de l'essai avec l'enzyme brute, on remarque que l'essai avec la muqueuse stomacale de mouton à 9% atteint le taux d'hydrolyse le plus élevé parmi les trois. En effet, il est de l'ordre de 70% . Pour les concentrations de 6% et 3% , on atteint des taux d'hydrolyse de l'ordre de 63,33% et 58,6% respectivement.





FIG(III-7) : Evolution du taux d'hydrolyse avec le temps  
 essais à 50°C et à pH = 2

L'essai avec l'enzyme purifiée à 3% donne un taux d'hydrolyse de 62,30% après le temps d'incubation.

on peut aisément remarquer que l'augmentation de la concentration en enzyme induit une augmentation du taux d'hydrolyse. Mais, puisque l'hydrolysate est destiné à l'alimentation, un taux d'hydrolyse très avancé influe sur le goût du produit qui aura un goût amer dû à la forte présence d'acides aminés [8].

Donc, puisque on veut optimiser le procédé, on opte enfin pour une hydrolyse avec la pepsine brute à 9% qui donne un taux d'hydrolyse de 70% et elle est peu coûteuse à comparer avec le procédé utilisant la pepsine commerciale ou le prix de revient du procédé de purification.

### 3.2.5 PROFIL EN ACIDES AMINÉS ESSENTIELS DE L'HYDROLYSAT:

#### 3.2.5.1 RESULTATS

Le profil en acides aminés essentiels de l'hydrolysate est présente dans le tableau n°= 9

Si l'on procède à la comparaison des résultats avec le modèle de référence on constate que:

- le total des teneurs en acide aminé essentiel de l'hydrolysate est supérieur à celui du modèle de référence. Ceci reflète la richesse quantitative en acide aminé essentiel du produit final.

- l'hydrolysate présente un déficit en Isoleucine, Lysine, Thréonine et Tryptophane, les teneurs en ces acides aminés représentent, 33% , 62.5% , 40% , et 66% respectivement des

teneurs de référence.

- l'hydrolysate présente une forte teneur en Leucine, en effet elle est le double de la teneur de référence.

| acides aminés            | teneur dans<br>l'hydrolysate | modèle<br>FAO/WHO |
|--------------------------|------------------------------|-------------------|
| Isoleucine               | 1.32                         | 4.0               |
| Leucine                  | 14.30                        | 7.0               |
| Lysine                   | 3.44                         | 5.5               |
| Méthionine + Cystine     | 3.97                         | 3.5               |
| Phénylalanine + Tyrosine | 10.60                        | 6.0               |
| Thréonine                | 1.60                         | 4.0               |
| Tryptophane              | 0.66                         | 1.0               |
| Valine                   | 5.60                         | 5.0               |
| Total                    | 41.49                        | 36.0              |

-Tableau n° = 9 : Comparaison entre le modèle d'acides aminés essentiel et le modèle standard de la FAO/WHO

Donc l'utilisation de l'hydrolysate comme additif et conditionnée par l'ajout d'aliment dont l'apport en acides aminés essentiel permettrait de combler ce déficit.

**CONCLUSION**

CONCLUSION

L'étude de l'hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie par la pepsine, a révélé que le procédé est réalisable à l'échelle laboratoire par l'utilisation de matériel simple.

Le procédé est très économique car l'enzyme utilisé lors du traitement, est produite au sein même du laboratoire par autodigestion de la muqueuse stomacale de mouton issue d'abattoir.

Les résultats obtenus sont les suivants:

- pH d'activation optimum 1.5
- la température optimale d'activité 50°C
- Le pH optimum d'activité 2
- Les constantes cinétiques sont:  $K_m = 50 \text{ g/l}$  ;  
 $V_{max} = 20 \text{ g/l.min}$
- le taux d'hydrolyse atteint après 4 heures par la pepsine brute à 9% est de 70% .

On a opté pour l'utilisation de l'enzyme brute à 9 % compte tenu du prix dérisoire de l'estomac du mouton (300 g de muqueuse pour 120 DA) à comparer avec celui de la pepsine commerciale (des laboratoires Sigma, 100 g pour 5400 F.F.)

Les analyses bactériologiques du rejet ont révélé une forte contamination d'origine fécale. Donc une stérilisation des déchets avant leurs utilisation s'impose, mais il faut procéder par des méthodes qui permettent la stérilisation sans destruction des propriétés fonctionnelles des protéines.

Le profil des acides aminés essentiels indique que l'hydrolysate présente un déficit en Isoleucine, Lysine, Thréonine et Tryptophane.

En ce qui est de l'utilisation de l'hydrolysate, après séchage, pour la supplémentation de la ration alimentaire animale, il est nécessaire de procéder à des essais sur des animaux de laboratoires afin d'obtenir le taux optimum de fortification.

Ce travail peut être complété par des essais à l'échelle semi-pilote et pilote afin de pouvoir maîtriser le processus et à long terme, le faire sortir du laboratoire vers l'industrie.

Ceci présente les avantages suivants:

- faire l'économie des devises destinées à l'importation des concentrés protéiques.
- contribuer à la lutte contre la *málnutrition* dans certains pays du tiers monde.
- contribuer à la lutte contre la pollution maritime.
- développer l'industrie halieutique Algérienne.

***REFERENCES***

***BIBLIOGRAPHIQUES***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) G. O. BUCOVE and G. M. PIGOTT, pilot plan production of a fonctionnel protein from fish waste by enzymatic digestion, Proceeding of the 7<sup>th</sup> annual symposium on food process waste, p. 66-81, 1976.
- (2) Compte rendu: journées d'étude sur la valorisation des sous- produits et des déchets des industries agro-alimentaires et agricoles, Lyon 20 et 21 septembre 1982, RTVA n°=182, octobre 1982.
- (3) Document ENAPECHE 1991.
- (4) M. B. HALE, Relative activites of commercially available enzyme in the hydrolysis of fish protein, food technology vol.23, p. 107-110, January 1969.
- (5) E. YANEZ; D. BALLESTER; F. MONCKEBERG, Enzymatic fish protein hydrolysate: chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein, Journal of food science, vol.41, p. 1289-1292, 1976.
- (6) P. A. CARROAD; R. A. TOM, Bioconversion of shellfish chitine wastes: process conception and selection of microorganismes, Journal of food science, vol.43, p. 1158-1161, 1978.
- (7) L. L. LUI; G. M. PIGOTT, Preparation and use of inexpensive crude pepsine for enzyme hydrolysis of fish, Journal of food science, vol.46, p.1569-1572, 1981.
- (8) R. E. VEGA; J. G. BRENNAN, enzymic hydrolysis of fish offal without added wather, Journal of food engineering, vol.8, p.201-215, 1988.
- (9) L. SIAMMOUR, Etude microbiologique et biochimique d'un concentré de protéines obtenu par digestion enzymatique



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- des rejets de poissonneries, P.F.E. INES de Biologie Tizi-Ouzou, December 1990.
- (10) O. GUAOUAR et S. FENNOUH, Hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie et ultrafiltration de la biomasse, P.F.E. ENP, Juin 1991
- (11) A. GUIRAA et M. GUEHDOUNI, Hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs, P.F.E. ENP, Juin 1991.
- (12) T. STROM and B.O. EGGUM, Nutritional value of fish viscera silage, J. science food Agric., vol.32 p.115-120, 1981.
- (13) T. AKANE et J.C. CHEFTEL, Surimi et analogues de produits de la mer, I.A.A. p.881-897 Octobre 1989.
- (14) D.P. LAGOIN, Valorisation des sous produits de la pêche, Science et pêche, Bull. inst. Pêche Mar. n°= 330, p.5-9 1983.
- (15) K. DENDENE, Optimisation du procédé d'U.F. pour la récupération des protéines des eaux de lavage de poissonnerie, P.F.E. ENP, Juin 1990.
- (16) D. ABDESSEMED, Valorisation et traitement des eaux de lavage de poissonnerie par U.F., Thèse de Magister ENP, Juillet 1992.
- (17) M. DEBATISSE, Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, tome 3, Ed. technique et documentation, 1981.
- (18) J. GIRAUD; P. GALZY, L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, Collection génie alimentaire, Ed. de l'Usine nouvelle, 1980.
- (19) D.K. GRANNER; P.A. MAYES; R.K. MURRAY et V.W. RODWELL, Précis de biochimie, Les presses de l'université LAVAL Ed Eska Quebec (Paris) 1989.
- (20) D.T. LUMMER, Introduction aux techniques de biochimie, Ed Mac Graw-Hill, 1989.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- (21) J. PELMONT, Les enzymes, Presse Universitaire de Grenoble, 1989.
- (22) P. LUISOT, Biochimie générale et médicale, Ed Sinep 1983.
- (23) P. N. CAMPBELL; A. D. SMITH Biochimie illustrée, Ed Masson, 1985.
- (24) CL. AUDIGIE, Biochimie structurale, Dion editeurs, 1976.
- (25) M. DEBATISSE, Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Tome 2, Techniques et Communication, 1981.
- (26) F. PERCHERON; R. PERLES; M. J. FOGLETTI, Abrégé de biochimie générale, Tome 1, Ed Masson, 1981.
- (27) R. SCRIBAN, Biotechnologie, Ed Lavoisier, 1982.
- (28) J. C. CHEFTEL; D. LORENT, Protéines alimentaires, Ed Lavoisier, Paris, 1985.
- (29) J. C. COLLIN; R. DELCOURT, Actualité des industries alimentaires et agro-alimentaires, I-A-A, p 448-460, Juin 1988.
- (30) M. JAVILLE; M. POLOPOUSK; M. FLORKIN; R. BOULANGER; M. LEMAIGRE; J. ROCHE; R. WARMSER, Traité de biochimie générale, Tome 2, Ed Masson et Cie, 1964.
- (31) D. MAMERI, Cours de biochimie 4<sup>ième</sup> année E.N.P, Département Génie de l'Environnement, 1991.
- (32) ANONYME, Méthodes microbiologiques pratiques: dérivées des méthodes internationales ISO pour l'analyse des dérivées alimentaires.



***ANNEXES***

## DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BIURET [22].[26]

### PRINCIPE

L'ajout à une solution de protéine, une solution de sulfate de cuivre fortement alcaline entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et les liaisons peptidiques, qui se traduit par une coloration bleu-violacée.

Il faut au moins trois liaisons peptidiques pour que le complexe se forme, c'est-à-dire que la réaction du biuret s'applique à partir des tétrapeptides (quatre résidus d'acides aminés) à toutes les peptides et les protéines.

La réaction du biuret est exploitée pour le dosage des protéines, puisque le rapport entre l'intensité de la coloration (déterminée au spectrophotomètre à 540 nm) et le poids des protéines est sensiblement le même pour toutes les protéines.

L'étalonnage du spectrophotomètre est réalisé à partir d'un ou plusieurs étalon de la même protéine.

### MODE OPERATOIRE

(1) Tracé de la courbe d'étalonnage (voir figure A→1)

- A partir d'un sérum étalon de BSA, dont le titre en protéine est connu, on procède à des dilutions par de l'eau physiologique.

- Dans une série de tube à essai propre et sec introduire:
  - 1 ml de chacune des dilution
  - 4 ml du réactif de Coronal<sup>1</sup>

Le blanc est réalisé à partir d'un ml d'eau physiologique et 4 ml du réactif de Coronal.

Après une bonne agitation du tube, on incube 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Après quoi, la coloration est évaluée par un spectrophotomètre à 540 nm contre le blanc.

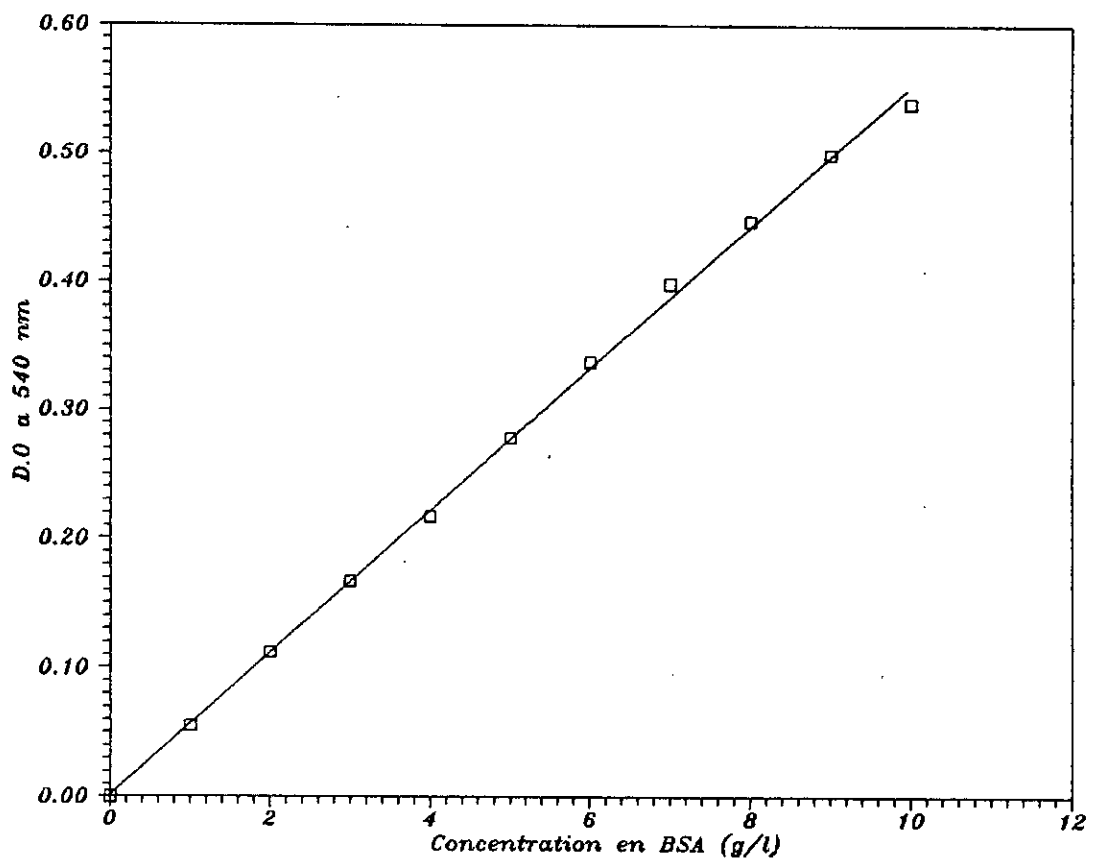
## (2) Dosage des protéines

Dans un tube à essai, on prélève 1 ml de la solution de protéines à doser, on lui ajoute 4 ml du réactif de Coronal. Après 30 d'incubation à l'obscurité, on lit la D.O à 540 nm contre le blanc.

La teneur en protéine de l'échantillon est obtenue par la projection de la D.O mesurée sur la courbe d'étalonnage.

Quand la D.O mesurée se trouve en dehors des D.O relatives à la courbe d'étalonnage, il faut procéder à la dilution de l'échantillon. Dans ce cas la teneur en protéine obtenue par la projection sur la courbe d'étalonnage doit être multipliée par le facteur de dilution.

- 
- 1- Réactif de Coronal: il est préparé de la façon suivante:  
dissoudre:- 1.5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans 250 ml d'eau distillée, - 6.0 g de tartrate double de Na et K dans 250 ml d'eau distillée,  
- 30 g de NaOH dans 900 ml d'eau distillée.  
faire le mélange des trois solutions et compléter à 1000 ml par de l'eau distillée.



FIG( A - 1 ): Courbe d'étalonnage pour la méthode de BUIRET