

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

3/94

وزارة التربية الوطنية

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT,

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU CRUOR
PAR LA PAPAÏNE

Proposé par :

Dr. D. MAMERI

Mr. H. GHRIB

Etudié par :

Samira OUAMANE

Dirigé par :

Dr. D. MAMERI

Mr. H. GHRIB

PROMOTION

JUILLET 1994

E. N. P 10, Avenue Hassen Badi - EL-HARRACH - ALGER

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التربية الوطنية

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU CRUOR
PAR LA PAPAÏNE

Proposé par ;

Dr. D. MAMERI
Mr. H. GHRIB

Etudié par :

Samira OUAMANE

Dirigé par :

Dr. D. MAMERI
Mr. H. GHRIB

PROMOTION

JUILLET 1994

DEDICACES

المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents.

Mon frère Karim et mes soeurs Karina et Nabila.

Mon futur mari Nacer-Eddine.

Mes tantes et oncles.

Toute ma famille.

ainsi qu'à mes chers amis.

REMERCIEMENTS

المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance envers ma promotrice Dr. D. MAMERI, enseignante à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour sa disponibilité et son aide très précieuse.

Je remercie vivement Mr. H. GHRIB, mon copromoteur, enseignant à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, pour sa présence au laboratoire et tous ses conseils avisés.

Je remercie aussi les membres du jury :

Mme BELHANECHÉ	Présidente de jury.
Mr. MAZIGHI	Examineur.
Mr.	Examineur.

qui ont bien voulu m'honorer de leur présence et apprécier ce modeste travail.

J'exprime ma gratitude à Mr. K. OUAMANE, Ingénieur au Ministère de l'Agriculture, pour l'énorme effort qu'il a fourni et l'immense intérêt qu'il a porté à mon travail.

Je tiens également à remercier :

Mr. S.A. BENHANOUTE, Directeur de l'ITMA de Ain-Taya, pour son aide précieuse.

Mr. N. MOKHTARI pour sa présence, ses encouragements et son aide lors de la récolte du sang, pour cette dernière raison, je remercie également Mr. R. BENACER, pour m'avoir aidé le plus souvent possible.

Mr. R. YEDDOU, pour ses encouragements et ses conseils.

Enfin, j'exprime mes remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

SOMMAIRE

	Page
I- INTRODUCTION	-1-
II- ETUDE THEORIQUE	-3-
II.1- ETUDE BIOCHIMIQUE	-3-
II.1.1- LES PROTEINES	-3-
II.1.1.1- GENERALITES	-3-
II.1.1.2- STRUCTURE DES PROTEINES	-3-
II.1.2- LES ENZYMES	-5-
II.1.2.1- DEFINITION	-5-
II.1.2.2- CLASSIFICATION DES ENZYMES	-5-
II.1.2.3- L'ENZYME PROTEOLYTIQUE UTILISEE : LA PAPAÏNE (Nomenclature : E.C.3.4.22.2)	-7-
II.1.2.3.1- SPECIFICITE	-7-
II.1.2.3.2- STRUCTURE	-7-
II.1.2.3.3- PREPARATION	-8-
II.1.2.3.4- UTILISATION	-8-
II.1.3- CINETIQUE ENZYMATIQUE	-10-
II.1.3.1- INTRODUCTION	-10-
II.1.3.2- RELATION DE MICHAELIS, HENRI ET MENTEN	-10-
II.1.3.2.1- Variation de $P = f(t)$	-12-
II.1.3.2.2- Variation de $v = f(E)$	-13-
II.1.3.2.3- Variation de $v = f(S)$	-13-
II.1.3.3- DETERMINATION DES PARAMETRES K_m ET v_{max}	-14-
II.1.3.4- FACTEURS PHYSIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES AFFECTANT LA REACTION ENZYMATIQUE	-15-
II.1.3.4.1- TEMPERATURE	-15-
II.1.3.4.2- ACTION DU pH	-16-
II.1.3.4.3- EFFECTEURS D'ENZYMES : LES INHIBITEURS	-17-
II.1.3.4.4- AUTRES EFFECTEURS	-21-
II.2- LES EFFLUENTS D'ABATTOIRS	-22-
II.2.1- LES ABATTOIRS	-22-

II.2.1.1-	GENERALITES	-22-
II.2.1.2-	LES ABATTOIRS EN ALGERIE	-22-
II.2.1.3-	LA RECOLTE DU SANG	-23-
II.2.2-	LE SANG	-26-
II.2.2.1-	INTRODUCTION	-26-
II.2.2.2-	COMPOSITION	-26-
II.2.2.3-	PARTICULARITES BIOCHIMIQUES	-28-
II.2.3-	LE PLASMA	-30-
II.2.3.1-	INTRODUCTION	-30-
II.2.3.2-	COMPOSITION	-30-
II.2.4-	LE CRUOR	-32-
II.2.4.1-	INTRODUCTION	-32-
II.2.4.2-	COMPOSITION	-32-
II.2.4.3-	LES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU CRUOR ET DE SES DERIVES	-34-
II.2.4.4-	LES DIFFERENTES VOIES DE VALORISATION DU CRUOR	-36-
II.2.5-	IMPORTANCE ECONOMIQUE GLOBALE DES PROTEINES DU SANG	-38-
II.3-	LES REACTEURS	-40-
II.3.1-	INTRODUCTION	-40-
II.3.2-	CLASSIFICATION DES REACTEURS	-40-
II.3.3-	FORMULATION GENERALE DU BILAN DE MATIERE POUR UN REACTEUR FERME	-41-
II.3.4-	CONCLUSION	-43-
III-	PARTIE EXPERIMENTALE	-43-
III.1-	ETUDE EXPERIMENTALE	-44-
III.1.1-	RECOLTE ET PRETRAITEMENT DU SANG	-44-
III.1.2-	LA CENTRIFUGATION DU SANG	-44-

III.1.3-	DETERMINATION DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU CRUOR OBTENU	-45-
III.1.4-	DETERMINATION DES CONDITIONS OPERATOIRES D'HYDROLYSE	-46-
III.1.4.1-	DESCRIPTION DU BIOREACTEUR UTILISE	-47-
III.1.4.2-	DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ENZYME A UTILISER LORS DE L'HYDROLYSE	-50-
III.1.4.3-	OPTIMISATION DE LA TEMPERATURE	-50-
III.1.4.4-	OPTIMISATION DU PH	-53-
III.1.5-	CINETIQUE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	-55-
III.2-	RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATIONS	-58-
III.2.1-	LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU CRUOR OBTENU	-58-
III.2.2-	DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'HYDROLYSE PAPAÏQUE DU CRUOR	-59-
III.2.2.1-	OPTIMISATION DE LA TEMPERATURE	-59-
III.2.2.2-	OPTIMISATION DU pH	-64-
III.2.2.3-	INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SUBSTRAT	-69-
III.2.3-	CINETIQUE D'HYDROLYSE	-71-
III.2.3.1-	DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES K_m et v_{max}	-71-
III.2.3.2-	CALCUL DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME	-71-
III.2.3.3-	INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PROTEINES SUR LA QUANTITE FINALE DE PROTEINES HYDROLYSEES	-72-
III.2.3.4-	EVOLUTION DU TAUX D'HYDROLYSE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PROTEINE	-77-
III.2.4-	ETUDE DU REACTEUR	-79-
IV-	CONCLUSION	-81-
-	ANNEXE	
-	BIBLIOGRAPHIE	

I - INTRODUCTION

I - INTRODUCTION

Les protéines, constituants du bol alimentaire journalier des êtres vivants, sont des substances essentielles à la croissance et au bon équilibre des individus. Elles sont digérées par les enzymes gastriques et pancréatiques. Les acides aminés et peptides ainsi produits sont absorbés au niveau intestinal pour être assimilés par l'organisme.

Parmi les sous produits d'abattage, le sang est sans doute l'un de ceux présentant la plus haute valeur potentielle : il contient en effet environ 150 à 160 g de protéines par litre, c'est à dire qu'il y a autant de protéines dans un litre de sang que dans un kilo de viande maigre [1].

Le sang qui est produit à des tonnages très élevés, fait partie de ces sous produits encore insuffisamment récupérés. D'un point de vue économique, une valorisation optimale du sang permettrait d'une part d'éliminer une source de pollution importante, qui représente une charge polluante journalière équivalente à celle d'un million d'habitants et d'autre part de produire des substances à haute valeur nutritionnelle [2]. Il est urgent et nécessaire de trouver des débouchés pour le sang des animaux de boucherie provenant des abattoirs. Ceci est une nécessité tant sur le plan de l'économie que sur le plan de l'environnement. Pour cette raison plusieurs organismes tel les laboratoires de recherche et industrie, se sont attachés à développer des procédés de valorisation non seulement du sang entier mais aussi des constituants obtenus après centrifugation du sang : le Plasma et le Cruor.

- * Le plasma est déjà utilisé commercialement comme liant protéique et émulsifiant dans la charcuterie et vendu sous formes diverses dans les pays développés.
- * Quand au Cruor, représentant les 2/3 des protéines du sang, son pouvoir colorant si intense limite son utilisation dans l'alimentation animale et ne permet pas, pour l'instant, son utilisation dans l'alimentation humaine.

Aucun des procédés de valorisation du Cruor proposés n'a pu aboutir actuellement au stade industriel.

En Algérie pour des raisons techniques et surtout économiques ; le sang ne fait l'objet d'aucune valorisation, néanmoins certains travaux [3], [4], ont été effectués à échelle laboratoire et même pilote permettant de valoriser certains rejets d'abattoirs tel que : les déchets solides d'abattoirs et le plasma.

Le but de notre travail consiste à mettre en oeuvre un procédé de valorisation du Cruor des abattoirs par hydrolyse enzymatique à l'échelle laboratoire dans un réacteur biologique en batch à l'aide d'une enzyme végétale "la papaïne".

De ce fait, la première étape de notre travail sera consacrée à une étude théorique sur les problèmes de génie enzymatique relative à l'hydrolyse des protéines par des protéases.

La deuxième étape sera consacrée à la détermination des paramètres optimaux sur l'hydrolyse papaïque du cruor.

En troisième partie, nous appliquerons ces paramètres optimisés à la cinétique enzymatique du cruor d'où détermination des paramètres caractéristiques de la papaïne.

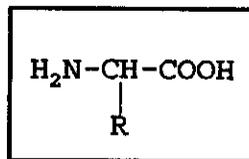
II - ETUDE THEORIQUE

II.1- ETUDE BIOCHIMIQUE

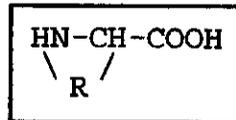
II.1.1- LES PROTEINES :

II.1.1.1- GENERALITES : [17]

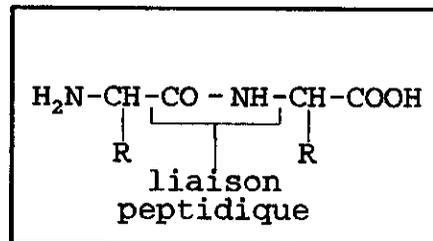
Les protéines sont des composées de poids moléculaire élevé, elles sont formées par un enchainement de constituants de base, les acides aminés dont la structure générale est :



A l'exception de l'un d'entre eux, la proline, qui est un acide iminé :



Ces acides aminés sont liés entre eux par une liaison peptidique :



II.1.1.2- STRUCTURE DES PROTEINES :

Une protéine n'est pas une simple chaîne linéaire, constituée par l'enchainement, dans un ordre précis, d'un nombre déterminé de maillons élémentaires que représentent les vingt acides aminés de base ; c'est un édifice compact de conformation spatiale.

a/ STRUCTURE PRIMAIRE : La séquence des acides aminés d'une protéine représente ce que l'on a coutume d'appeler sa structure primaire. Il s'agit simplement de la représentation unidimensionnelle et séquentielle de son contenu qui peut aller de 50 à 1000 (ou plus) acides aminés. L'enchaînement des acides aminés entre eux est une réaction de condensation s'accompagnant de l'élimination d'une molécule d'eau pour former les liaisons peptidiques. Il se forme ainsi une chaîne polypeptidique (ou chaîne principale) qui constitue le squelette de la protéine [33].

b/ STRUCTURE SECONDAIRE : Les atomes d'oxygène et d'hydrogène des liaisons peptidiques (- CO - NH -) peuvent s'engager dans l'établissement de liaisons hydrogènes de type O...NH et NH...O, respectivement pour produire une configuration locale de la chaîne principale en hélice.

Un autre mode de repliement privilégié de la chaîne principale fait que les liaisons hydrogènes s'établissent entre différents segments de séquence, constituant ce que l'on appelle les feuillets bêta formés par deux ou plusieurs segments approximativement parallèles.

Les deux arrangements locaux que nous venons de décrire sont les éléments principaux de la structure dite secondaire d'une protéine [33].

c/ STRUCTURE TERTIAIRE : L'examen des organisations tridimensionnelles des protéines montre que non seulement les éléments structuraux secondaires sont omniprésents, mais qu'il existe des motifs plus complexes constitués par la combinaison de ces éléments donnant ainsi une configuration spatiale ou tridimensionnelle appelée structure tertiaire.

d/ STRUCTURE QUATERNAIRE : Elle se caractérise par un niveau d'organisation supérieur, par exemple plusieurs chaînes protéiques s'associant pour former un édifice plus complexe appelé structure quaternaire [15].

II.1.2- LES ENZYMES :

II.1.2.1- DEFINITION :

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques appartenant à la classe des protéines globulaires, elles sont capables de catalyser spécifiquement la transformation d'un ou deux substrats.

La plupart des enzymes requierent, pour être actives, un ou plusieurs cations métalliques et une molécule de faible masse molaire, non protéique appelée coenzyme [5], [6].

II.1.2.2- CLASSIFICATION DES ENZYMES :

Les enzymes agissent à tous les stades du métabolisme intermédiaire. Différents types de nomenclature ont été proposés pour les distinguer. Certaines enzymes ont conservé leur nom original et historique : trypsine, pepsine, papaïne ce sont les peptidases et protéases.

Peptidases et protéases :

Cette classe d'enzyme est très importante mais sa classification est très difficile car ces enzymes ont une spécificité parfois très large. Les méthodes font souvent appel à des substrats naturels : caséine, hémoglobine. Il est rare que la relation produit de réaction / activité enzymatique soit une droite, la cinétique d'hydrolyse étant compliquée par l'apparition de peptides plus solubles ou plus ou moins susceptibles à l'action protéolytique [7].

Ces enzymes peuvent être de provenance animale, végétale ou microbienne.

EXEMPLES DE PEPTIDASES ET PROTEASE : [8], [5]

* ANIMALE : La pepsine : elle se rencontre dans le système digestif de nombreux animaux, elle est produite à partir de la muqueuse gastrique où elle se trouve sous la forme d'un précurseur, le pepsinogène. La pepsine purifiée est blanchâtre et soluble dans l'eau. Son activité enzymatique est la plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat ; elle est thermosensible en solution après 55 °C ce qui limite son utilisation en technologie.

. Trypsine : Protéase intestinale spécificité : Arg-Lys.

. Chymotrypsine : Protéase intestinale spécificité : elle hydrolyse de préférence les liaisons contenant le groupe acide des acides aminés aromatiques Tyr. Trp. Phe. Leu.

* VEGETALE : Les enzymes protéolytiques d'origine végétale sont par ordre d'intérêt décroissant en technologie :

. La papaïne : en provenance d'une plante équatoriale et tropicale (carica papaya L), elle connaît les applications industrielles les plus larges.

. La broméline : extraite de l'ananas (ananas Comosus Merr).

. La ficine : issue de la figue (Ficus Carica).

* MICROBIENNE : Le principe de la production des enzymes microbiennes est très simple : un microorganisme est cultivé dans un milieu approprié à partir duquel l'enzyme est ensuite extraite. Parmi les enzymes microbiennes on retrouve : la Protéase (bacillus) ; Glucoamylase ; Amylase (bacillus) ; Glucoseisomérase ; Amylase fongique ; Pectinases ; Protéase fongique et la Présure microbienne.

II.1.2.3- L'ENZYME PROTEOLYTIQUE UTILISEE :

LA PAPAÏNE (Nomenclature : E.C.3.4.22.2) :

Le papayer, ou arbre à "melons" est largement cultivé dans les régions équatoriales et tropicales, toutes les parties de la plante (tiges, feuilles, fruits) produisent du latex contenant de la papaïne brute, un latex frais contient environ 12% en poids de la papaïne. En fait, cette appellation recouvrait un mélange de trois enzymes : papaïne, chymopapaïne et lysozyme, présentes aux concentrations respectives de 10%, 45% et 20% dans le latex de carica papaya [5].

II.1.2.3.1- SPECIFICITE :

La papaïne est une endopeptidase qui hydrolyse les liaisons peptidiques donnant : L'arginine et la lysine [9].

- La papaïne est une protéine très stable, à large spécificité et résistante à la dénaturation par les solvants organiques [9].
- La papaïne industrielle se caractérise par un optimum de température de 55 / 60 °C et par une bonne thermostabilité (zone critique 65 / 70 °C) ; enfin par une fourchette de pH assez large (5 à 7) ce qui facilite grandement son utilisation en technologie [5].

Elle est facilement inhibée par les thiols, les oxydants y compris l'oxygène atmosphérique et les métaux lourds [5].

II.1.2.3.2- STRUCTURE :

La papaïne est une protéine à groupe sulfhydrile comportant 211 acides aminés et un poids moléculaire de 23 000 [5], c'est une chaîne polypeptidique repliée en deux parties A et B séparée par une cavité, sur les bords de la cavité, la cystéine en position 25 sur la partie A de la molécule est en regard de l'histidine en position 158 sur la partie B à une distance de 4 Angström qui est mesurée entre l'atome de Soufre et le noyau imidazole de l'histidine, de plus, cette zone de la molécule représente la partie active lors de la catalyse enzymatique.

Elle peut être utilisée en solution comme injections intraveineuses juste avant l'abattage de poules (5 minutes) pour permettre d'attendrir leur viande à la cuisson [12].

Du lait d'arachide hydrolysé par la papaïne immobilisée peut être utilisé dans la stabilisation physico-chimique de jus de raisin et de pomme [13].

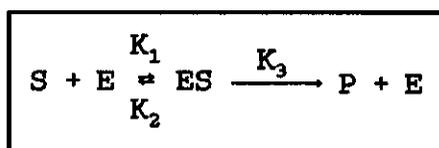
II.1.3- CINETIQUE ENZYMATIQUE

II.1.3.1- INTRODUCTION :

L'objet de la cinétique enzymatique est d'établir les relations qui existent entre la vitesse de la réaction enzymatique et les concentrations en substrat (S) et en enzyme (E), ainsi que l'influence de certains facteurs tels que : pH, température, présence d'effecteurs, etc... .

II.1.3.2- RELATION DE MICHAELIS, HENRI ET MENTEN :

En considérant le modèle simplifié de la réaction enzymatique :



E : enzyme libre

ES : complexe

S : substrat

P : produit

K_1, K_2, K_3 : constantes de vitesse.

En se basant sur ce schéma, on pourra exprimer la vitesse de la réaction par la relation :

$$v = \frac{dp}{dt} = -\frac{ds}{dt} = K_3 \cdot [ES] \quad [14]$$

soit v_1 , la vitesse de formation du complexe :

$$v_1 = K_1 \cdot [S] \cdot [E] \quad [15]$$

et v_2 , la vitesse de destruction du complexe :

$$v_2 = (K_2 + K_3) \cdot [ES] \quad [15]$$

à l'équilibre on a : $v_1 = v_2$

d'où :

$$K_1 \cdot [E] \cdot [S] = (K_2 + K_3) \cdot [ES] \Leftrightarrow \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{K_2 + K_3}{K_1} = K_M \quad [15]$$

K_M : Constante de Michaelis.

soit $[ET]$ la concentration totale de l'enzyme, donc, dans le modèle élémentaire on a :

$$[ET] = [E] + [ES] \quad [6]$$

Lorsque $[S]$ est élevé, on peut admettre que $[ES]$ tend vers $[ET]$.

On a alors :

$$v_{max} = K_3 [ET] \text{ soit } \frac{v}{v_{max}} = \frac{[ES]}{[ET]} \quad [6]$$

v_{max} : vitesse maximale.

$$\text{on a : } \frac{v}{v_{max}} = \frac{[ES]}{[ES] + [E]} = \frac{1}{1 + \frac{[E]}{[ES]}}$$

$$\text{avec : } \frac{[E]}{[ES]} = \frac{K_M}{[S]}$$

$$\text{dont : } \frac{v}{v_{max}} = \frac{1}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

on a alors :

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

II.1.3.2.1- Variation de P = f (t) :

Dans des conditions expérimentales définies de concentration en substrat, de température et de pH, il est possible de suivre l'évolution de la réaction, en dosant à partir de la (mise en contact du substrat et de l'enzyme) le produit P à intervalles de temps constants. On obtient la courbe de la figure n°1.

Celle-ci est tout d'abord rectiligne et la vitesse constante. Elle s'infléchit ensuite pour atteindre un plateau quand tout le substrat est transformé, traduisant une diminution de la vitesse.

La vitesse observée au début de la réaction correspondant donc à la partie droite de la courbe soit à sa tangente à l'origine [16].

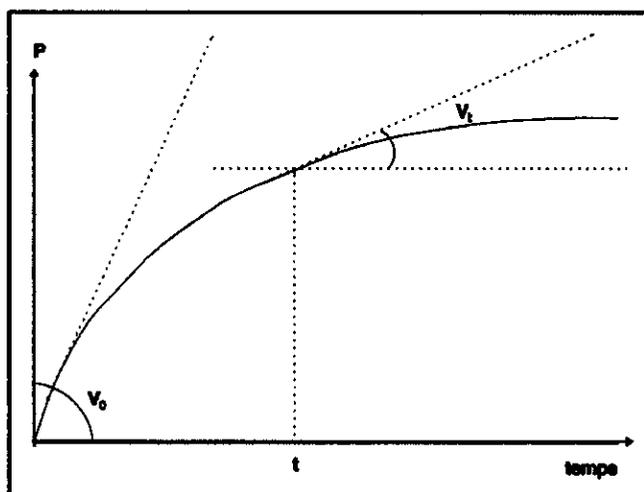


Figure n°1: Vitesse d'une réaction enzymatique.

II.1.3.2.2- Variation de $v = f(E)$:

L'équation des vitesses des réactions enzymatiques indique que ces réactions sont du premier ordre par rapport à la concentration d'enzyme, la vitesse est proportionnelle à E. Or, ceci n'est valable que si $E \ll S$. Si l'on suit expérimentalement les variations de la vitesse en fonction de la concentration d'enzyme, en faisant varier largement celle-ci, on observe une variation d'abord linéaire, puis la courbe expérimentale s'incurve et atteint un palier (figure n°2). [17]

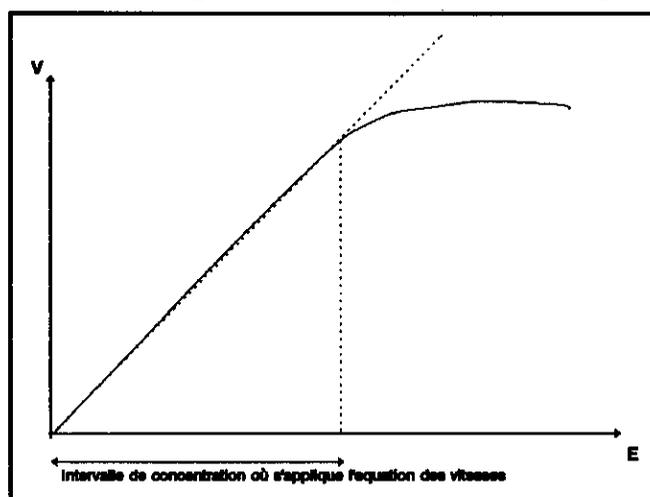


Figure n°2: Loi de variation de la vitesse avec la concentration d'enzyme $v=f(E)$.

II.1.3.2.3- Variation de $v = f(S)$:

Lorsque, en revanche, on fait varier la concentration en substrat pour une dose constante d'enzyme, la courbe (figure n°3) est cette fois, de type hyperbolique. Pour de fortes teneurs en substrat, il y a saturation de l'enzyme et v tend asymptotiquement vers un maximum v_{max} [16].

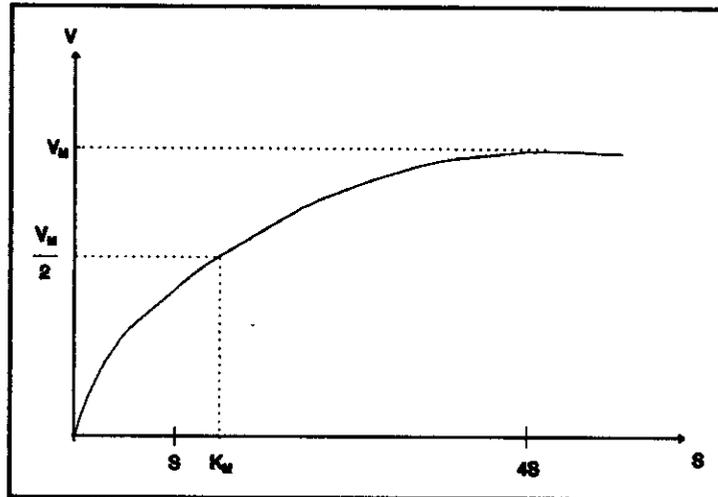


Figure n°3: Variation de v en fonction de la concentration en substrat.

II.1.3.3- DETERMINATION DES PARAMETRES K_m ET v_{max} :

REPRESENTATION DE LINEWEAVER-BURK :

c'est la représentation de la fonction $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S}\right)$. (figure

n°4)

De la relation de Michaelis on déduit la relation suivante:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{S}\right) + \frac{1}{v_{max}}$$

C'est l'équation d'une droite du type $y = a x + b$

avec $y = \frac{1}{v}$ et $x = \frac{1}{S}$; pour $\frac{1}{S} = 0$ on a $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}}$

et pour $\frac{1}{v} = 0$ on a $\frac{1}{S} = -\frac{1}{K_m}$.

Il devient alors aisé de déterminer graphiquement $\frac{1}{v_{max}}$ et $\frac{1}{K_m}$; en outre, la pente de la droite est : $\frac{K_m}{v_{max}}$. [6]

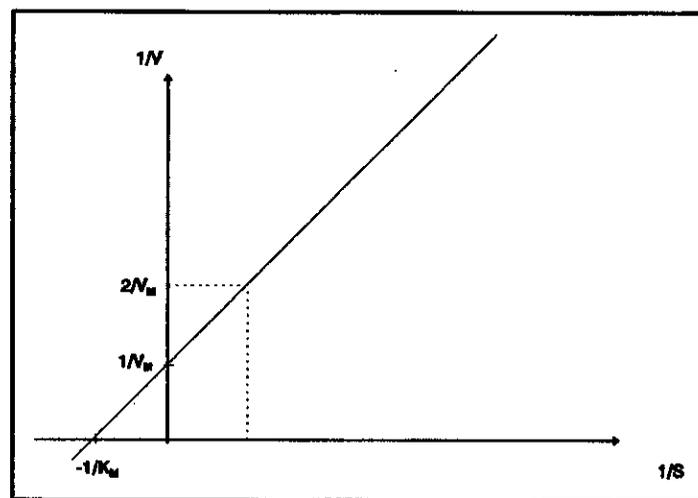


Figure n°4: Représentation de Lineweaver-Burk.

II.1.3.4- FACTEURS PHYSIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES AFFECTANT LA REACTION ENZYMATIQUE :

II.1.3.4.1- TEMPERATURE :

La formation des liaisons hydrogènes est exothermique ($\Delta H < 0$) et une élévation de température tend à les rompre. Le phénomène de dénaturation est généralement associé à la scission en cascade d'un grand nombre de liaisons. D'un autre côté, la formation des liaisons hydrophobes est légèrement endothermique; un abaissement de température les rompt. Une température optimale existe donc pour laquelle la stabilité de l'enzyme est

maximale[6] ainsi que leur activité (figure n°5).

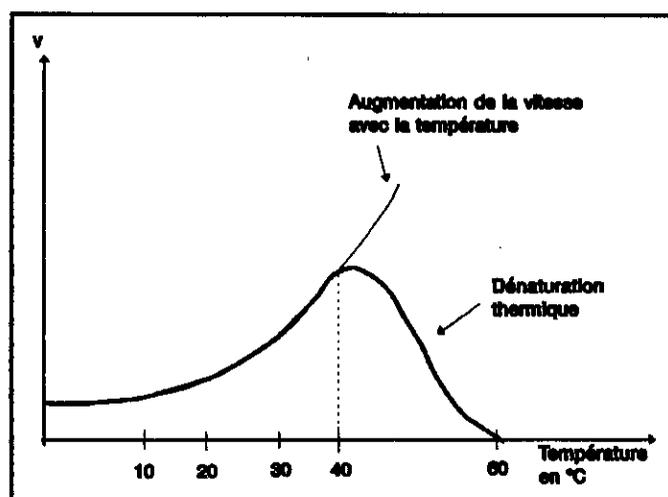


Figure n°5: Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique avec la température

II.1.3.4.2- ACTION DU pH :

L'activité d'une enzyme varie avec le pH ; expérimentalement les variations de la fonction $v_{\max} = f(\text{pH})$ revêtent généralement les formes de la courbe représentée dans la figure n°6.

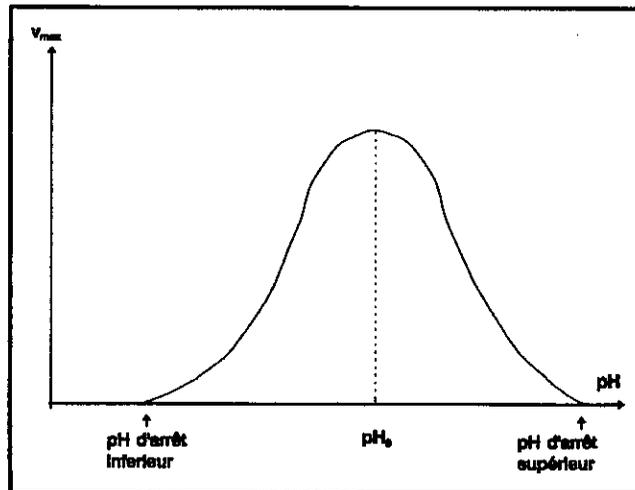


Figure n°6: Courbe de variation de l'activité d'une enzyme en fonction du pH.

La plupart des enzymes présentent une courbe de variation de l'activité en fonction du pH en forme de cloche, avec un maximum correspondant au pH optimale (pH_0). Le pH_0 varie selon l'enzyme et pour la majorité des enzymes, il est voisin de la neutralité et la zone optimale est assez large [6].

II.1.3.4.3- EFFECTEURS D'ENZYMES : LES INHIBITEURS

a/ INHIBITION COMPETITIVE :

Les inhibiteurs compétitifs sont des molécules inactives, mais qui par leurs structures moléculaires sont assez semblables pour occuper la place du substrat sur l'enzyme [6]. (figure n°7)

La loi des vitesses est donnée par :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + \frac{1}{v_{max}} \quad [15]$$

K_I : Constante de dissociation

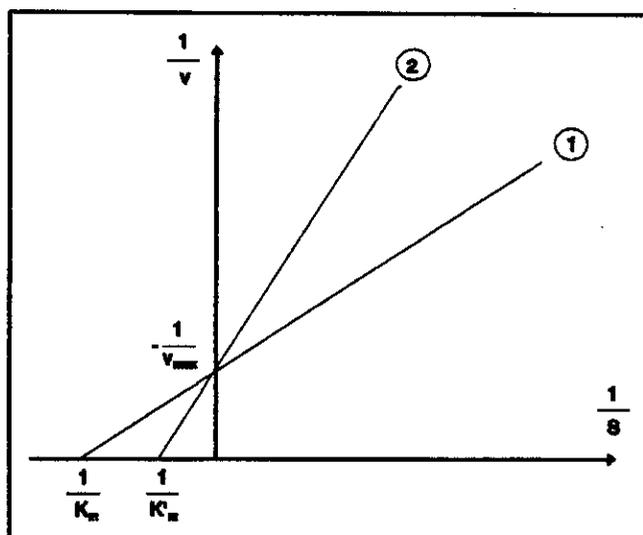


Figure n°7: Représentation selon LNEWEAVER et BURK d'une inhibition compétitive.

- (1) Sans inhibiteur : [I] = 0.
- (2) Avec inhibiteur à la concentration [I].

b/ INHIBITION NON COMPETITIVE :

Ce type d'inhibition se produit lorsque l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme à un emplacement différent du site de fixation du substrat [17] ; il conduit à la formation des complexes ES, EI et ESI [6]. (figure n°8)

La loi des vitesses est donnée par :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{s} \cdot \left(\frac{K_m}{v_{max}} + \frac{I}{v_{max}} \cdot \frac{K_m}{K_I} \right) + \frac{1}{v_{max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \quad [15]$$

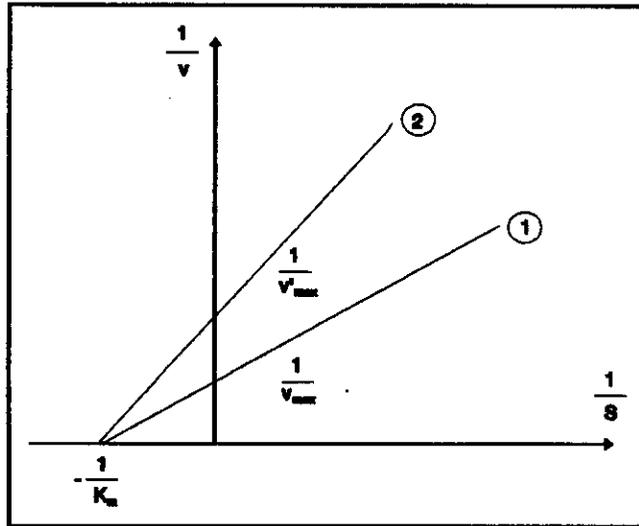


Figure n°8: Représentation selon LINEWEAVER et BURK d'une inhibition non compétitive.

- (1) Sans inhibiteur : $[I] = 0$.
- (2) Avec inhibiteur à la concentration $[I]$.

c/ INHIBITION INCOMPETITIVE :

Ce type d'inhibition comporte la formation du complexe ternaire ESI ; l'inhibiteur ne s'associe qu'une fois le complexe enzyme -substrat formé [17]. (figure n°9)

La loi des vitesses est donnée par :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \quad [15]$$

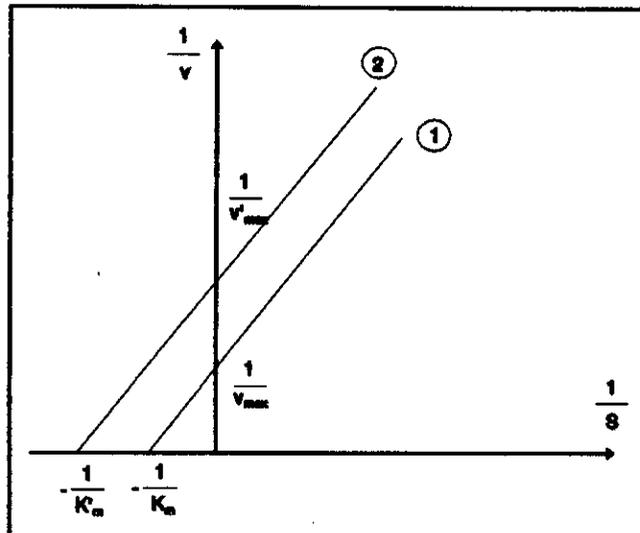


Figure n°9: Représentation selon LINEWEAVER et BURK d'une inhibition incompétitive.

- (1) Sans inhibiteur : $[I] = 0$.
- (2) Avec inhibiteur à la concentration $[I]$.

d/ INHIBITION PAR LE SUBSTRAT :

La vitesse de la réaction enzymatique a tendance à diminuer par suite de l'interaction entre le complexe ES et le substrat lorsque ce dernier est présent en forte concentration [18]. (figure n°10)

La loi des vitesses est donnée par :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}} + \frac{1}{K_I \cdot v_{max}} \cdot S \quad [15]$$

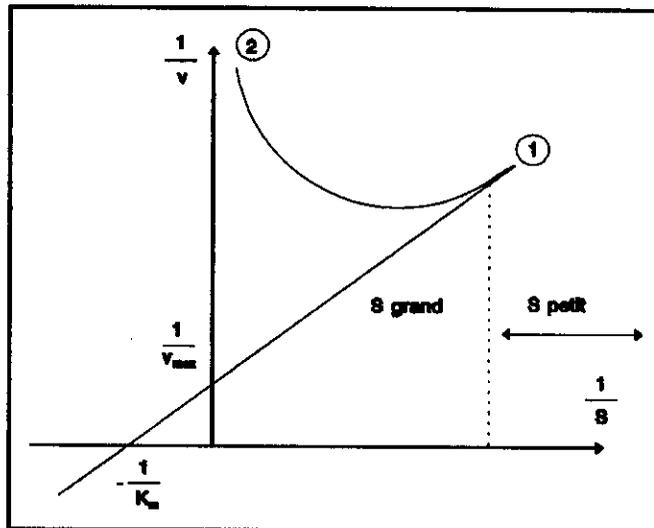


Figure n°10: Représentation selon LINWEAVER et BURK d'une inhibition par substrat.

- (1) Sans inhibiteur : $[I] = 0$.
- (2) Avec inhibiteur à la concentration $[I]$.

II.1.3.4.4- AUTRES EFFECTEURS : [5]

Toutes les enzymes dont le cofacteur est un ion métallique seront sensibles aux agents complexant les métaux : éthylène-diamine-tétracétique, diéthylthiocarbonate plus spécifique des enzymes à Cu^{++} , cyanure, oxyde de carbonate, sulfure, etc... .

Les ponts disulfure se réduisent facilement en thiols (-SH) avec souvent perte de l'activité enzymatique. Tout composé réagissant avec les groupements -SH sera un inhibiteur potentiel de certaines enzymes, tel est le cas de l'iodoacétate et des métaux lourds (Ag^+ , Pb^{++} , Cd^{++} , Mercure).

Le site actif peut fixer un analogue du substrat qui bloquera l'action de l'enzyme.

II.2- LES EFFLUENTS D'ABATTOIRS :

II.2.1- LES ABATTOIRS

II.2.1.1- GENERALITES :

Les abattoirs considérés comme lieu destiné à l'abattage des animaux de boucherie ont été classés parmi les industries agro-alimentaires les plus nuisibles à l'environnement.

En effet, leurs rejets présentent de grandes concentrations de matières organiques putrescibles pouvant atteindre de 1460 à 1774 mg/l, un taux élevé de matière en suspension représentant au moins 85% de l'azote total [19], une couleur sombre, une odeur très offensive et des germes pathogènes. Les abattoirs représentent donc une source de pollution très importante, leurs effluents peuvent être traités selon deux optiques :

- La première qui les considère seulement comme des effluents polluants, consiste à les jeter complètement dans la station d'épuration, ou directement dans l'égout.

- La seconde, par contre, et qui est très ingénieuse, les considère comme une véritable ressource de protéines qui doivent être récupérées et valorisées.

II.2.1.2- LES ABATTOIRS EN ALGERIE :

Parmi les 350 abattoirs qui sont en activité sur le territoire national nul n'est doté de normes d'hygiène de laboratoire d'analyse ou d'une station de traitement avant rejet, le sang n'est donc pas valorisé et se trouve rejeté à l'égout causant ainsi un tort non négligeable à l'environnement. Faute d'étude sérieuse concernant ce type d'établissement, les seules informations recueillies concernant l'abattoir d'Hussein-Dey où a été faite la récolte du sang et l'abattoir d'El-Harrach, sont résumées dans le tableau n° 1.

Tableau n° 1 : Principales caractéristiques des abattoirs d'El-Harrach et de Hussein-Dey. [4]

CARACTERISTIQUES	ABATTOIR D'EL-HARRACH	ABATTOIR D'HUSSEIN-DEY
Capacité d'abattage par jour (têtes/jour).	2.000 à 5.000	8.000 à 10.000
Nombre de bêtes abattues par jour.	500 à 1200	1.000 à 4.000
Nombre de salles d'abattage.	1	2
Possibilités d'expansion.	existante	absente
Horaires de travail.	18h à 20h	18h à 20h
Jours de plus grande activité.	Mercredi et Jeudi	toute la semaine
Technique d'abattage.	méthode traditionnelle	méthode traditionnelle
Elimination des matières stercoraires et sang.	voie hydraulique	voie hydraulique
Sites récepteurs des déchets liquides.	Oued El-Harrach	réseau d'égout
Salles frigorifiques.	présentes	présentes
Traitement avant rejet.	absent	absent
Normes d'hygiène.	absentes	absentes
Laboratoire d'analyse.	absent	absent

II.2.1.3- LA RECOLTE DU SANG :

a/ QUANTITE DE SANG RECUPERE :

On admet classiquement que la quantité de sang circulant dans l'organisme est de 1/12e à 1/15e du poids vif mais la quantité totale éliminée au cours des opérations de saignée

proprement dite, reste inférieure dans les meilleures conditions à 5% du poids vif. Le volume de sang récupérable dépend donc directement du volume de sang présent dans l'animal [21]. Celui-ci est conditionné par différents facteurs.

b/ LES PRINCIPAUX FACTEURS CONDITIONNANT LA QUANTITE DE SANG RECUEILLIE :

b.1/ L'ESPECE :

Le tableau n° 2 montre que la quantité de sang recueillie est étroitement liée à l'espèce considérée, cela en considérant les deux aspects : la quantité de sang globale obtenue par animal et celle obtenue par kilogramme de carcasse.

Tableau n°2 : Quantité de sang recueillie par animal et par kg de carcasse.

ESPECE	VOLUME DE SANG PAR TETE (1)	VOLUME DE SANG /kg DE CARCASSE
Bovins	18	0,053
Veaux	4	0,040
Porcins	4	0,050
Ovins	1,5	0,081
Equins	25	0,104

b.2/ L'AGE DE L'ANIMAL :

La proportion de sang augmente avec l'âge. Ce phénomène semble être dû à l'augmentation de la proportion des viscères par rapport à la carcasse, viscères dont le degré de vascularisation est considérable. [26]

b.3/ LE POIDS DE L'ANIMAL :

Ce facteur constitue l'élément prépondérant de la quantité de sang finalement disponible. L'augmentation de la quantité de sang en fonction du poids se révèle parfaitement linéaire [26]. Cette situation se justifie par le fait que toute augmentation de la masse d'un organe est immanquablement accompagnée de développement de la vascularisation de cet organe et par suite d'une augmentation du volume vasculaire total.

c/ LES PRINCIPALES CONDITIONS D'UNE BONNE RECOLTE : [21]

Afin que le sang récolté soit bon à la valorisation, trois conditions essentielles doivent être respectées, il faut :

- que sa récolte permette bien la discrimination entre sang d'animaux sains et sang d'animaux atteints.
- que la réaction de coagulation de ce sang soit empêchée de se produire.
- qu'il n'ait pas été souillé par les régurgitations, urines et fèces de l'animal ou même seulement contaminé par contact avec sa peau (condition minimum requise pour la saignée dite hygiénique).

II.2.2- LE SANG

II.2.2.1- INTRODUCTION :

Le sang est un liquide visqueux, de couleur rouge, qui circule dans les vaisseaux, à travers tout l'organisme, où il joue des rôles essentiels et multiples (nutritif, respiratoire, dépurateur, régulateur de défense, etc...) [20].

Hors de l'organisme et spécialement au niveau des abattoirs, le sang est appelé à tort "sous-produit" de l'industrie de l'abattage des animaux de boucherie [21], au lieu de "co-produit" vu sa teneur élevée en élément nutritionnel.

II.2.2.2- COMPOSITION :

Le sang se compose d'un liquide, le plasma, dans lequel baignent des éléments figurés qui sont essentiellement les hématies ou globules rouges, les leucocytes (globules blancs) et les plaquettes sanguines. Après action d'un anticoagulant, la centrifugation permet de recueillir d'une part le plasma (60 à 65% du total), d'autre part, les éléments figurés qui constituent le Cruor (35 à 40% du total). Après coagulation à l'air on recueille un caillot et le sérum [1].

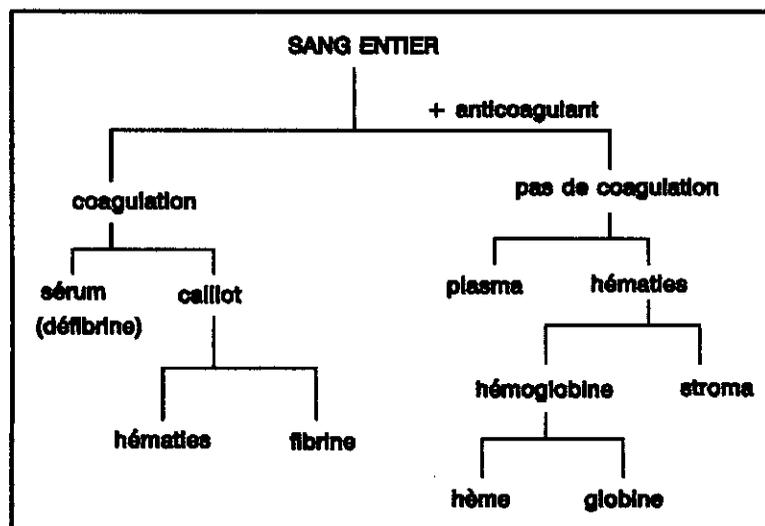


Figure n°11: Schéma de fractionnement du sang

Le sang est un liquide très riche en eau (80 à 82%) et en protéines (16 à 18%). Le tableau n° 3 résume la composition du Plasma et du Cruor bovin [1] [22].

Tableau N°3 : Composition du sang, du plasma et du cruor bovin (g/100 ml).

DENOMINATION	SANG	PLASMA	CRUOR 40 %
Eau	80 à 85	90 à 92	70 à 78
Protéines	15 à 18	6 à 8	25 à 29
Lipides	0,15	5 à 1	0,2
Glucides	0,1	0,08 à 0,12	traces
Sels minéraux	1	0,8 à 0,9	traces
Autres substances	0,55	0,2 à 0,3	traces
Matière sèche	15 à 20	8 à 10	22 à 30

Le sang contient quelques 200 types de protéines [1], dont 70 ont été isolées et purifiées. Ce sont toutes des glyco protéines sauf l'albumine et quelques protéines à activité enzymatique présents en faible proportion (lysozymes, α -amylase). Le tableau n°4 résume la composition en acides aminés indispensables de deux dérivés du sang et, pour comparaison, de la viande fraîche de boeuf [1] [2].

Tableau n°4 : Composition en acides aminés indispensables de deux dérivés du sang et, pour comparaison, de la viande fraîche de boeuf (en % des protéines) [2], [23].

ACIDES AMINES	SANG ENTIER LYOPHILISE (%)	PLASMA ATOMISE (%)	VIANDE FRAICHE DE BOEUF (%)
Lysine	9,2	9,2	8,4
Histidine	5,6	3,5	2,9
Tryptophane	1,4	1,9	1,1
Thréonine	5,2	6,3	4,0
Valine	9,1	7,0	5,7
Méthionine	1,3	1,0	2,3
Isolencine	0,9	2,9	5,9
Leucine	12,4	10,1	8,4
Phénylalanine	7,0	5,6	4,0

Du point de vue des vitamines, le sang en contient de nombreuses comme le montre le tableau n°5. [23], [1]

Tableau n°5 : Teneur en vitamines du sang de porc dans 100 ml.

VITAMINE	TENEUR/100 ML DE SANG
Acide ascorbique	2,04 mg
Caroténoïdes totaux	7,05 mg
Vitamine A	25,02 mg
Acide folique	0,66 mg
Acide nicotinique	0,47 mg
Acide pantothénique	33,15 mg
Riboflavine	2,99 mg
Vitamine B 12	1 mg
Vitamine D	108 à 135 U.I.

II.2.2.3- PARTICULARITES BIOCHIMIQUES :

Le sang est exempt de germes microbiennes lorsqu'il provient d'un animal sain. Toutefois ce sous produit demeure sensible à l'action de l'oxygène de l'air et entre facilement en putréfaction.

Le sang coagule rapidement au contact de l'air par formation à partir du fibrinogène, d'un réticulum de fibrine en serrant les éléments figurés. Le caillot ainsi formé laisse exsuder le sérum qui n'est autre que du plasma débarassé des éléments en suspension et du fibrinogène.

La conservation du sang sous forme liquide nécessite alors le blocage des mécanismes de la coagulation par inhibition d'activité ou de formation de divers facteurs coagulants ou coagulables [24].

On peut ainsi avoir recours :

- à l'action anticoagulante de certains dérivés chimiques. Quelques exemples d'anticoagulants sont cités dans le tableau n°6 [25].
- à l'agitation mécanique du milieu entraînant le défibrinage du sang.

Tableau n° 6 : Exemples d'anticoagulants.

ANTICOAGULANT	CONCENTRATION UTILE EN g/l DE SANG	MODE D'ACTION	UTILISATION
Héparine	0,2	Inhibe la formation de thrombine	Alimentation et pharmacie, prix élevé
Oxalates de sodium ou de potassium	1	Précipite l'ion calcium	Toxique, inutilisable pour l'alimentation et la pharmacie
Citrate de sodium	3	Convertie l'ion calcium en forme neutre	Variable selon les pays
E.D.T.A. (*)	2	Chélate l'ion calcium	Alimentation et pharmacie, antibactérien

* Acide Ethyl Diamine Tetra-Acétique.

II.2.3- LE PLASMA

II.2.3.1- INTRODUCTION :

Actuellement c'est le plasma qui justifie en majeure partie tous les travaux effectués sur le sang car c'est lui qui trouve la meilleure valorisation, bien qu'il représente une faible partie du potentiel protéique du sang.

II.2.3.2- COMPOSITION :

Le plasma représente 60 à 65 % du volume total du sang. Sa principale caractéristique réside dans sa richesse en protéine, il comprend environ 70 à 80 g de protéines par litre de plasma [25], il contient également en solution des substances diverses indiquées dans la figure n°12. [26].

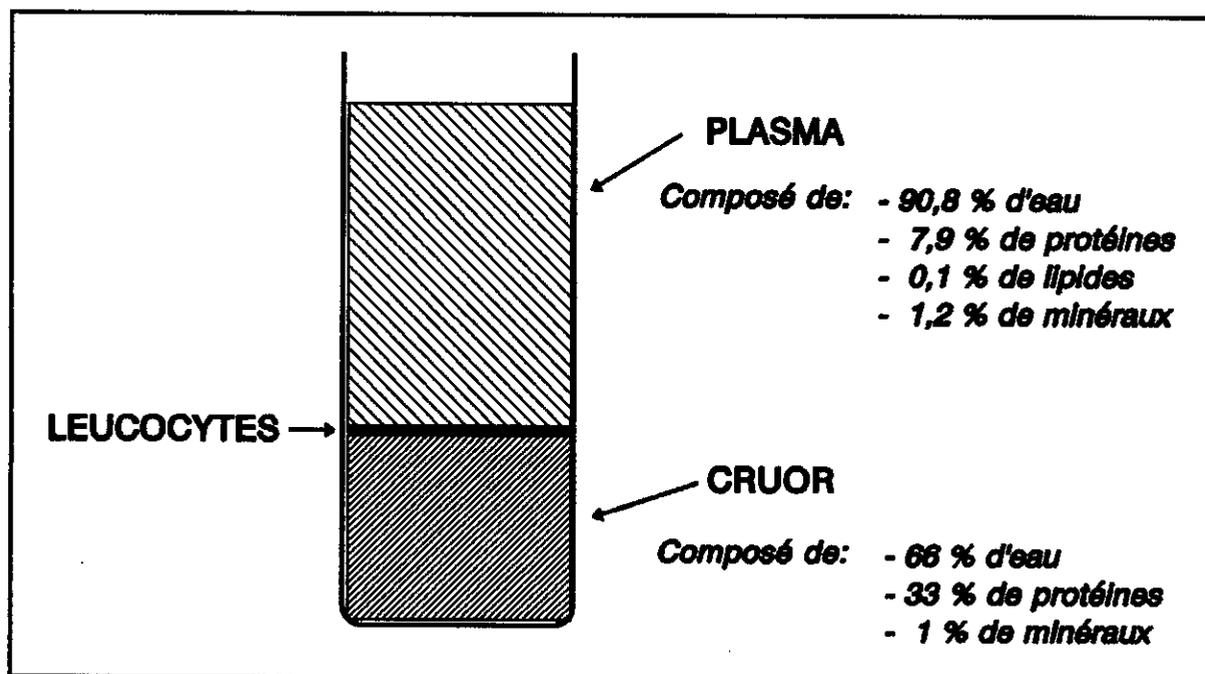


Figure n°12: Composition du plasma et du cruor.

Du point de vue de la composition protéique, le plasma est constitué d'un mélange complexe de protéines que nous citerons ci dessous .[26].

1 l de plasma	- Albumine	14,00 g
	- Lipoprotéines	11,00 g
	- Transferrine	0,30 g
	- Immunoglobines	11,00 g
	- Fibrinogène	3,00 g
	- Autres globulines	7,00 g
		<hr/>
		79,00 g

II.2.4- LE CRUOR

II.2.4.1- INTRODUCTION :

La purée globulaire ou cruor résultant de la centrifugation du sang rendu incoagulable représente la fraction ayant le plus grand potentiel. De nombreux chercheurs [19] donnent l'objectif de trouver une voie de valorisation noble du cruor en utilisant des techniques douces (absence de solvant organique, utilisation d'enzymes protéolytiques, séparation par membranes), performantes du point de vue des rendements et extrapolables au stade industriel.

II.2.4.2- COMPOSITION :

Le cruor contient environ 70 % d'eau et près de 30 % de protéines [1], constitué à 95 % de globules rouges. L'hémoglobine, qu'il contient, représente les 2/3 des protéines du sang et est responsable du pouvoir colorant rouge intense du sang. Cette coloration, rouge vermillon dans le sang frais, vire au brun sous l'effet de l'oxydation, par transformation de l'oxyhémoglobine (Fe⁺⁺) en méthémoglobine (Fe⁺⁺⁺). Cette forte coloration brune limite considérablement l'utilisation du cruor dans l'alimentation animale et humaine malgré une composition en acides aminés bien équilibrée de l'hémoglobine (tableau n°7) [2],[27].

Le cruor déshydraté a un taux d'humidité de 5% environ, [1], une densité de 1,09 [21] et sa matière sèche contient près de 98 % de protides. Sa valeur énergétique est de 324 calories pour 100 g [2].

Tableau n°7 : Composition en acides aminés de l'hémoglobine, des protéines du lait entier et de l'oeuf entier.

AMINI-ACIDES	HEMOGLOBINE	PROTEINES DU LAIT ENTIER *	PROTEINES DE L'OEUF ENTIER **
Arginine	3,9	4,2	6,6
Histidine	8,0	2,6	2,4
Lysine	9,1	8,7	7,0
Tyrosine	2,9	6,0	4,5
Tryptophane	1,1	1,5	1,5
Phénylalanine	7,8	5,5	6,3
Cystéine	0,5 - 1,1	1,0	2,4
Méthionine	1,3	3,2	4,0
Thréonine	5,6	4,7	4,3
Sérine	5,5	4,3	8,5
Leucine	14,3	11,0	9,2
Isoleucine	0 - 2	7,5	7,7
Valine	9,0	7,0	7,2
Acide glutamique	8,1	21,5	16,0
Acide aspartique	9,8	7,0	9,0
Glycine	5,3	2,3	2,7
Alanine	9,8	2,5	7,4
Proline	4,7	7,0	8,1

* Caséine

** Ovalbumine

II.2.4.3- LES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU CRUOR ET DE SES DERIVES :

Les différentes propriétés fonctionnelles du cruor sont résumées dans le tableau n°8 [26].

Tableau n°8 : Propriétés fonctionnelles du plasma et du cruor [26].

PROPRIETES	PLASMA	CRUOR
Pouvoir colorant	-	Très Bon
Solubilité	Bonne	Bonne sous pH 6
Pouvoir gonflant	Faible	Très Bon
Pouvoir émulsifiant	Bon	Très Bon
Stabilité de l'émulsion	Bonne	Bonne sous pH 6
Pouvoir moussant	Bon	Très Bon
Pouvoir gélifiant	Très Bon	Nul

Parmi les plus importantes on cite "le pouvoir colorant du cruor".

a/ POUVOIR COLORANT DU CRUOR :

Le cruor, constitué par les éléments figurés du sang (Hématies, Leucocytes et plaquettes sanguines) présente une couleur rouge vermill lors de son obtention. Cette couleur est due à la présence en quantité importante d'oxyhémoglobine. Malheureusement, le contact avec l'oxygène de l'air provoque une oxydation transformant l'hémoglobine en méthémoglobine, de couleur brune. Cette coloration brune intense limite l'utilisation du cruor en alimentation animale et l'interdit totalement en alimentation humaine.

En conséquent, différentes méthodes ont été mises au point afin de stabiliser la couleur rouge du cruor et de la mettre ainsi à profit, en particulier en charcuterie et en industrie pharmaceutique [26].

b/ PROPRIETES FONCTIONNELLES DE L'HEMOGLOBINE :

D'après WISMER-PEDERSEN [28], l'hémoglobine présente une bonne solubilité quelque soit le pH (figure n°13). Sa température de coagulation se situe entre 47 °C et 55 °C, le temps nécessaire à la coagulation variant avec la concentration et le pH [1]. (tableaux n° 9 et 10).

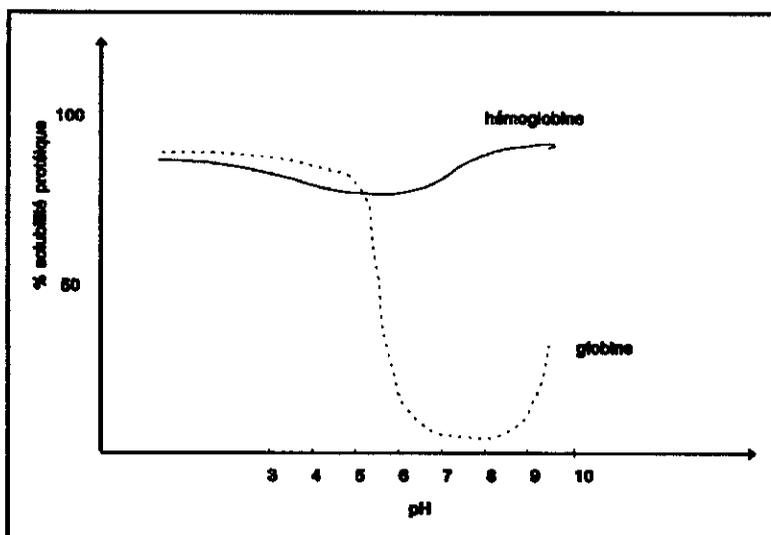


Figure n°13: Solubilité protéique de la globine et de l'hémoglobine en fonction du pH. [28]

Tableau n° 9 : Temps de coagulation de l'hémoglobine en fonction de la concentration à 55 °C. [29]

Concentration %	:	5	10	15
Temps de coagulation :		13 mn	10 mn	3 mn

Tableau n° 10 : Influence du pH sur le temps de coagulation (concentration 5 %, température 55 °C). [29]

pH :	6	7,5	10
Temps :	10 mn	8 mn	pas de coagulation

c/ PROPRIETES FONCTIONNELLES DE LA GLOBINE :

L'étude de la solubilité protéique de la globine se rapporte [22] aux travaux effectués à DIJON par DELAITRE, sur des échantillons de globine obtenue par méthode chimique ou enzymatique.

Ils ont noté d'abord que la "globine chimique" présentait un minimum de solubilité aux alentours de la neutralité (pH = 6,5 - 7), alors que la globine enzymatique ne semble pas perdre de solubilité avec le pH. Ainsi qu'une perte de solubilité liée à la concentration en NaCl, considérée comme étant le résultat net des interactions électrostatiques et hydrophobes. [22] [1]

II.2.4.4- LES DIFFERENTES VOIES DE VALORISATION DU CRUOR :

Après la centrifugation le cruor peut être congelé en pains, comme le sang, pour être utilisé dans la fabrication de boudin noir principalement ou pour son incorporation dans certains aliments pour animaux de compagnie. Le problème majeur qui freine l'utilisation de ce produit en alimentation humaine, est la coloration brune que prend le Cruor à la cuisson. [1]

~~Deux~~ solutions ont été proposés par différents auteurs :

- Masquage de la couleur.
- Décoloration du Cruor.

Ces procédés s'appliquent au Cruor brut ou à l'hémoglobine libérée par lyse des hématies.

a/ LE MASQUAGE DE LA COULEUR DU CRUOR :

Il a été particulièrement étudié par WISMER-PEDERSEN [19]. Ses travaux ont consisté à mêler de la caséine, de la matière grasse de porc, du sang et de l'eau, en proportions respectives de 6 %, 42 % et 25 %. Une émulsion est obtenue dans laquelle la fixation des molécules lipidiques sur l'hémoglobine entraîne le masquage de la couleur.

b/ LA DECOLORATION DU CRUOR :

La décoloration consiste à éliminer le pigment que constitue l'hème et à récupérer la globine. De nombreux procédés ont été décrits [2] mais aucun n'a pratiquement atteint le stade industriel. TYBOR, P.T. [27], a ainsi étudié l'action de l'acétone acidifiée. OORD et WESTDORP [30] mettent à profit l'action de l'eau oxygénée. Une troisième possibilité réside dans la réalisation d'une hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine.

L'hydrolyse enzymatique partielle de l'hémoglobine libérant le pigment, suscite actuellement de l'intérêt ; c'est pourquoi une importante société associée à un laboratoire réputé (NOVO industries et Institut de la viande de ROSKILDE) s'efforcent de développer le procédé. D'autres laboratoires et chercheurs ont travaillé également sur le sujet. [1]

D'après ANONYME, NOVO INDUSTRIE A/S, 1979 [31], ce procédé traite de l'hydrolyse du Cruor par une enzyme protéolytique, à pH basique, L'ALCALASE 0,6 L. Au cours de la réaction, le pH est maintenu à 8,5 par addition de soude et la température à 55 °C qui sont les conditions optimales d'activité de l'enzyme. Après avoir atteint un degré d'hydrolyse de 18 %, l'enzyme est inactivée par ajustement du pH à 4 et augmentation de la température. L'hydrolysate est ensuite centrifugé dans une centrifugeuse à éjection de solide (pH réglé à 4,5) afin de récupérer le surnageant peptique qui est filtré et décoloré par du charbon actif après ajustement du pH à 3. Le filtrat décoloré est concentré par osmose inverse puis atomisé.

D'après DREPPER et Coll. 1981 [1], le Cruor est traité par hydrolyse partielle acide, la protéase utilisée permet de ne pas obtenir de peptides amers. Il s'agit d'une protéase de champignon S produite par l'entreprise RÖHM de DARMSTADT. Le concentré de globules est mélangé à de l'eau (proportion 1:2). Dix minutes après le début de l'hémolyse de l'acide chlorhydrique est ajouté, amenant ainsi le pH aux alentours de 4, une protéase dont l'activité optimale se situe entre 4 et 5 est introduite. La rapidité de la protéolyse dépend de la température. A 55 °C la décoloration se fait après 5 h, alors qu'à 45 °C elle se fait

en 12 h. La partie claire est séparé par centrifugation du résidu brun (l'hème) de la solution protéique est ajusté à 7 par NaOH, ce qui donne une solution contenant 0,9 % de NaCl et 3 % de protéine brute.

Les auteurs pensent que leur produit pourrait compléter une alimentation à base de céréales (riz, maïs, millet) car la globine obtenue présente un manque d'isoleucine, arginine et thréonine.

D'après DANIELLE LECONTE, 1989. [2], 390 litres d'hémolysat ont été hydrolysés en continu par la pepsine, à pH=2 et à 40 °C, dans un réacteur de 90 litres couplés à un appareil d'ultrafiltration. Cette technique, appliquée pendant plus de 24 heures à l'échelle pilote, permet d'obtenir des hydrolysats peptiques d'hémoglobine peu colorés avec un rendement peptidique compris entre 70 et 80 % . Après décoloration par adsorption des peptides héminiques sur la magnésie lourde et dessalement des hydrolysats peptidiques par électrodialyse. Les hydrolysats ont été conditionnés sous forme de poudre. Le rendement global du procédé est de 50 % (7 - 8 Kg de poudre peptidique).

II.2.5- IMPORTANCE ECONOMIQUE GLOBALE DES PROTEINES DU SANG :

La production annuelle représente 30.000t de protéines, dont 8.200 t sont purement et simplement rejetées à l'égout. A l'image de la production mondiale, la production en protéine se révèle déficitaire dans un grand un grand nombre de pays et quasiment inexistante en Algérie. Le déficit impose l'importation des protéines dont une partie prépondérante sous forme de tourteau de soja.[26] Or, le marché des protéines se trouve sous la dépendance directe du marché des tourteaux végétaux (soja surtout, mais aussi arachide, colza, tournesol, manioc,...).

Le cours du soja est déterminé à la bourse de Chicago et le Kilogramme de protéine de celui-ci constitue l'unité de référence. Toute variation de son prix se trouve immanquablement suivie d'un ajustement des cours des autres protéines par le simple jeu de la loi de l'offre et de la demande.

En 1982, le cours moyen de Soja₄₈ a été d'environ 1,70 F/Kg soit 3,54 F par Kg de protéines, alors que le cours des farines de sang était de 2,90 F par Kg, soit 3,22 F par Kg de protéine. Les farines de sang se révèlent donc moins onéreuses que le Soja₄₈ ce qui justifie leur incorporation en alimentation animale. [26]

II.3- LES REACTEURS

Est appelé réacteur chimique ou biologique tout appareillage permettant de réaliser une réaction chimique ou biologique. C'est à dire de transformer des espèces moléculaires en d'autres espèces moléculaires.

II.3.1- INTRODUCTION :

II.3.2- CLASSIFICATION DES REACTEURS :

Le critère le plus important qui joue un rôle primordial dans la classification des réacteurs est le mode de fonctionnement de ces derniers. Ainsi, on a le choix entre un mode ^{de fonctionnement discontinu} et une opération réalisée en continu. [32]

a/ REACTEUR DISCONTINU (FERME) :

On parle de réacteur discontinu lorsqu'on charge ce dernier d'un ou plusieurs réactifs et qu'on laisse la transformation chimique se dérouler en fonction du temps. [5]

b/ REACTEUR CONTINU (OUVERT) : [32]

Par opposition au réacteur discontinu, les réacteurs continus sont qualifiés de systèmes ouverts, ils sont dotés d'une ou plusieurs entrées pour introduire les réactifs et d'une ou plusieurs sorties par lesquelles les produits de la transformation sont évacués.

Dès l'instant où l'on considère une opération continue, on est amené à définir des types d'écoulement bien caractérisés. Ces écoulements types, qui peuvent être qualifiés de modèles idéaux, sont de deux sortes :

- L'écoulement de type piston, tel que celui qui est réalisé lorsqu'on fait circuler à grande vitesse un fluide peu visqueux dans un tube.

- L'écoulement à travers un récipient parfaitement agité.

II.3.3- FORMULATION GENERALE DU BILAN DE MATIERE POUR UN REACTEUR FERME :

En tenant compte du principe de la conservation de la matière :

$$\text{Flux d'entrée} + \text{Flux de création} = \text{Flux de sortie} + \text{Flux d'accumulation} + \text{Flux de disparition}$$

(1) [15]

Nous allons effectuer le bilan de matière pour le réacteur discontinu.

Donc soit un réacteur fermé de volume V, à un instant t=0 on introduit une quantité de substrat S₀ et une quantité d'enzyme E.

	Substrat	Enzyme	Produit
t = 0 :	S ₀	E	O
t :	S	E	P

Bilan de Matière : [15]

Flux d'entrée = 0 pas d'alimentation durant la réaction.

Flux de sortie = 0 rien n'est soutiré du réacteur durant la réaction.

Flux de création = 0 pas de création de substrat.

Flux d'accumulation = V dS Représente la quantité de substrat qui n'a pas été transformée.

Flux de disparition = $v \cdot V \cdot dt$ Représente la quantité de substrat qui a été transformé.

Où v = vitesse de disparition.

En remplaçant dans l'équation (1) on obtient :

$$0 = V \cdot dS + v \cdot V \cdot dt$$

$$\rightarrow \boxed{v = -\frac{dS}{dt}} \quad [15]$$

Maintenant si on considère une cinétique Michaelienne :

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m} \quad (2)$$

$$\rightarrow v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m} = -\frac{dS}{dt}$$

Après intégration, on obtient l'équation de bilan suivante:

$$\boxed{x \cdot S_0 - K_m \cdot \ln(1-x) = v_{\max} \cdot t} \quad [15]$$

où X , S_0/K_m et $v_{\max} \cdot t/K_m$ sont des paramètres adimensionnels.

avec : $x = \frac{S_0 - S}{S_0}$ représente le taux de conversion.

Dans le cas où il y a inhibition par le substrat, on a :

$$\boxed{\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}} + \frac{1}{K_i \cdot v_{\max}} \cdot S} \quad [15]$$

L'équation de bilan, prend donc la forme suivante :

$$x \cdot S_0 - K_m \cdot \ln(1-x) + \frac{S_0^2}{2K_I} \cdot (2x - x^2) = v_{max} \cdot t \quad [15]$$

II.3.4- CONCLUSION :

D'après l'étude qui vient d'être exposée, nous pouvons conclure que le réacteur n'est pas un simple récipient où l'on met nos réactifs mais plutôt un dispositif dont le fonctionnement est régi par des lois et équations de bilan simples ou complexes selon de type de fonctionnement.

III - PARTIE EXPERIMENTALE

III.1- ETUDE EXPERIMENTALE :

III.1.1- RECOLTE ET PRETRAITEMENT DU SANG :

Environ 13 litres de sang ont été récoltés au niveau de l'abattoir d'Hussein-Dey dans des conditions très difficiles vu l'état et la position du mouton lors de la saignée ainsi que la rapidité de l'égorgeur.

C'est ainsi qu'à la saignée de l'animal, environ 1 litre de sang est recueilli dans un bidon en plastique où étaient mis préalablement 2 g d'EDTA (anticoagulant) et une pincée d'azoture de sodium (antibactérien).

Le contenu est ensuite versé dans des jerricans en plastiques de 5 litres placés dans une glacière le temps du transport, puis conservés dans un réfrigérateur à 4°C pendant quelques jours.

III.1.2- LA CENTRIFUGATION DU SANG :

La séparation par centrifugation du sang est fondée sur la différence de densité existante entre les constituants, la phase liquide ou plasma (densité environ 1,03) et les éléments figurés qui s'y trouvent en suspension ou cruor (densité environ 1,09) [21].

Lors de notre expérience cette séparation a été effectuée dans une centrifugeuse BECKMAN Model J2.21 Centrifuge. Ses capacités maximales sont :

- Contenance 320 ml
- Vitesse 20 000 tours/minute

Dotée :

- D'un variateur de vitesse.
- D'une minuterie.
- D'un système de freinage.
- D'un système de refroidissement

MODE OPERATOIRE :

- Les tubes de la centrifugeuse sont remplis de sang d'une manière hygiénique puis déposés dans le tambour de cette dernière.
- Au cours du processus, le sang doit être gardé à une température proche de 4°C et cela en utilisant de la glace.
- Après fermeture de la porte de la centrifugeuse, nous réglons la vitesse de rotation à 10.000 tr/mn.
- Nous réglons la minuterie à 10 minutes, puis nous actionnons le bouton " MARCHE ".
- Une fois la centrifugation faite, nous retirons les tubes du tambour, nous obtenons alors deux (02) phases, l'une liquide et de couleur relativement claire représentant le plasma, et l'autre visqueuse et de couleur rouge très brun représentant le cruor.
- On vide les tubes de leur contenu en plasma et on extrait le cruor à l'aide d'une spatule dans des récipients en plastique.
- Le cruor obtenu est ensuite conservé à -18°C.

III.1.3- DETERMINATION DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU CRUOR OBTENU :

a/ DOSAGE DES PROTEINES :

Deux méthodes ont été utilisées pour le dosage des protéines :

- La méthode de dosage de l'azote total par KJELDHAL, qui consiste à détruire la matière organique par une minéralisation suivie d'une distillation puis d'un titrage (voir annexe). Cette méthode a été utilisée pour le dosage du cruor obtenu après centrifugation du sang.

- La méthode de BIURET, qui est une méthode colorimétrique utilisée pour la quantification des acides aminés et peptides obtenus par hydrolyse du cruor (voir annexe).

b/ DETERMINATION DE LA DENSITE :

La densité est déterminée à l'aide d'un pycnomètre de volume 5 ml, ce dernier est pesé à vide puis contenant du cruor. Cette variation de poids entre les deux pesées nous a permis de déterminer la densité qui est définie comme étant :

$$d = \frac{m}{v}$$

m : Différence de poids entre les deux pesées.

v : Volume du pycnomètre.

La densité est exprimée en gr/cm^3 .

c/ DETERMINATION DE LA VISCOSITE :

La viscosité cinématique est déterminée à l'aide d'un viscosimètre UBBELOHDE. Le viscosimètre représente un capillaire calibré. Nous remplissons ce dernier par du cruor et nous le laissons s'écouler le long de ce capillaire, en notant le temps nécessaire à cet écoulement. Ce dernier, pris en secondes nous servira à calculer la viscosité cinématique (voir annexe).

d/ DETERMINATION DE LA DBO₅ :

La DBO₅ a été déterminée par incubation de 22,7 ml de cruor dans un flacon contenant un réservoir de soude ou de potasse relié à un manomètre, la dépression enregistrée par ce dernier au bout du cinquième jour d'incubation nous a permis de déterminer la demande biochimique en oxygène (voir annexe).

III.1.4- DETERMINATION DES CONDITIONS OPERATOIRES D'HYDROLYSE :

Les valeurs optimales de la température et du ~~pH~~ ^{pH} varient selon le type de substrat ainsi que l'enzyme utilisée.

De ce fait, nous allons étudier l'effet de la température et du ~~pH~~ sur l'hydrolyse enzymatique du cruor avec une enzyme protéolytique "la papaïne" dont les caractéristiques seront cités par la suite.

III.1.4.1- DESCRIPTION DU BIOREACTEUR UTILISE :

Le réacteur biologique utilisé est un BIOREACTEUR TYPE SET 002M d'une capacité totale de deux litres. (Figure n°14)

Le réacteur comprend :

- La fiole.
 - La platine supérieure.
 - Un châssis support.
 - Un module électronique.
-
- L'alimentation générale du réacteur se fait avec un interrupteur à clé.
 - L'agitation est assurée à l'aide d'un moteur d'agitation et réglée à l'aide d'un variateur de vitesse pouvant balayer une gamme de vitesses allant de 100 à 1.000tr/mn.
 - Le chauffage est assuré par une baffle chauffante ref. 30 TP/02 M/B/220 V, d'une puissance maximale de 1.000 W, la température est réglée à l'aide d'un régulateur de température pouvant balayer une gamme de températures de 0 à 150 °C.
 - Le pH est réglé à l'aide d'un régulateur de pH lié simultanément à une pompe péristatique et à une électrode à gel ref. 30 ELE/PH/7162 GS, balayant une gamme de pH de 0 à 14.

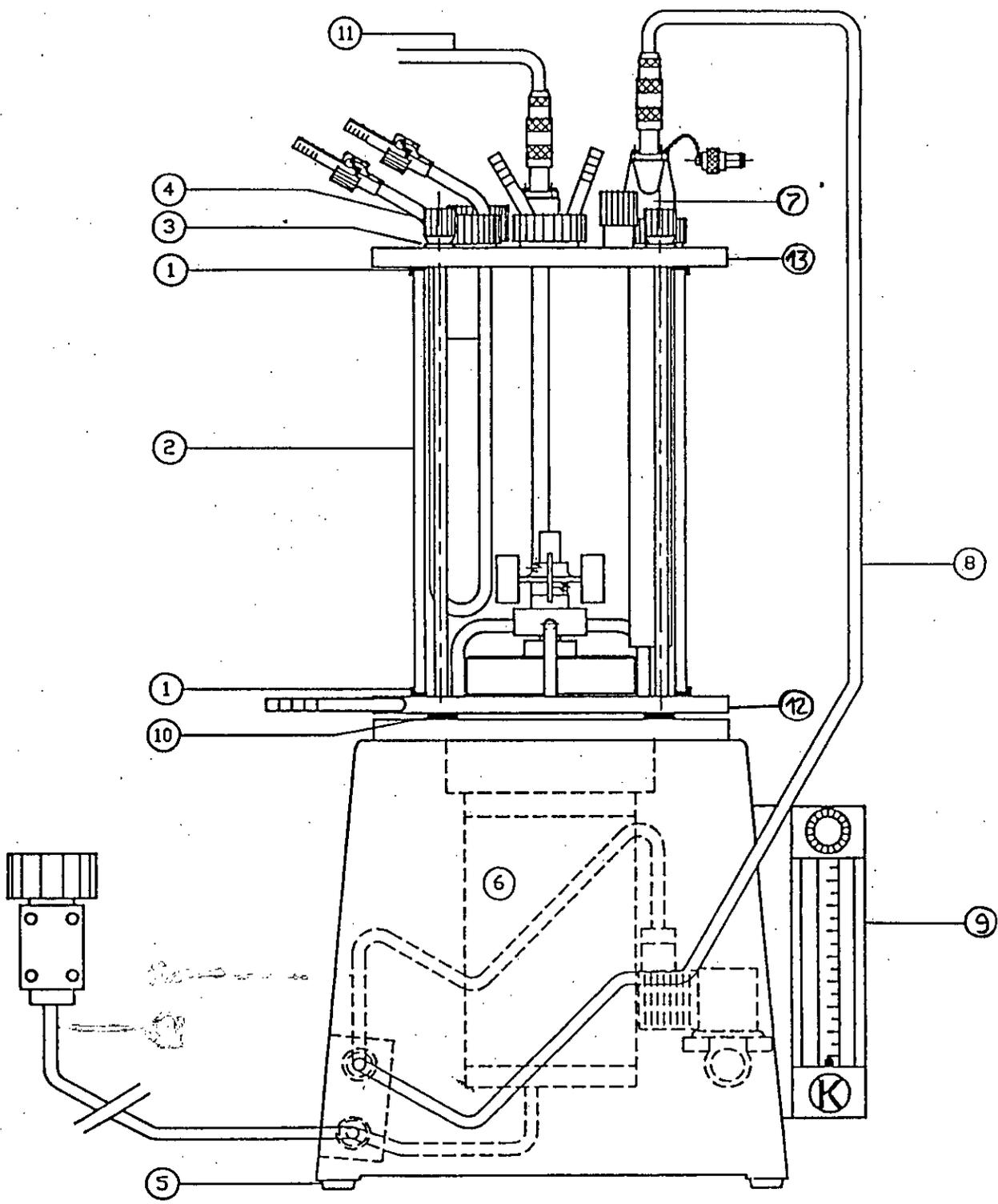


FIGURE N° 14: BIOREACTEUR

(1)	Joint silastic moulé
(2)	Virole en verre
(3)	Kit de 5 rondelles
(4)	Ecrou de platine
(5)	Joint silastic moulé
(6)	Moteur d'agitation 180 V 1.000 RPM
(7)	Baffle ronde
(8)	Cable liaison baffle
(9)	Débitmètre DK 74 250 Nl / h
(10)	Joint plat
(11)	Cable température L3M
(12)	Platine inférieure
(13)	Platine supérieure
Rep	DESIGNATION

III.1.4.2- DETERMINATION DE LA QUANTITE D'ENZYME A UTILISER LORS DE L'HYDROLYSE :

La papaïne utilisée est une enzyme commerciale des laboratoires MERCK, cette dernière possède une activité protéolytique de l'ordre de 6 000 µg de caséine hydrolysée/mg d'enzyme.mn.

En assimilant donc les protéines contenues dans le cruor à une phosphoprotéine ; la caséine, et en sachant que 23,31 % du poids du cruor est sous forme de protéine, nous pouvons déterminer pour une quantité donnée en substrat, la quantité respective en protéine et par conséquent, la quantité correspondante d'enzyme qu'il faut utiliser pour mener à terme notre hydrolyse.

EXEMPLE DE CALCUL :

Pour une concentration en cruor de 50 g/l, nous déterminons la quantité en protéines correspondante à 11,65 g/l donc sachant que :

Un mg de papaïne hydrolyse 6 mg de protéines, nous déduisons que la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser 11,67 g de protéines est de 1,68 g.

Remarque :

Au cours de nos expériences la quantité d'enzyme utilisée est en excès d'un gramme.

III.1.4.3- OPTIMISATION DE LA TEMPERATURE :

L'étude suivante consiste à suivre en fonction du poids de l'hydrolyse enzymatique du cruor par la papaïne à différentes températures.

L'évolution de la protéolyse sera évaluée par quantification d'acides aminés et de peptides solubles dans l'acide trichloroacétique (TCA) et cela par une méthode colorimétrique.

a/ CONDITIONS OPERATOIRES :

Pour pouvoir optimiser la température et voir son impact sur la protéolyse, il a été impératif de faire varier ce paramètre tout en gardant les autres paramètres tel que le pH, l'agitation, la quantité de substrat et la quantité d'enzyme constants.

Pour cela nous avons choisi quatre températures différentes, 40, 45, 55 et 60 °C. Quant aux autres paramètres nous avons choisi :

- Une concentration de 50 g/l en cruor correspondant à une concentration de 11,65 g/l en protéines, calculée comme cité précédemment.
- Un pH de 7 pour ne pas s'éloigner du pH naturel du cruor qui est de l'ordre de 7,34.
- Une vitesse d'agitation modérée de l'ordre de 200 tours/mn afin d'éviter un taux d'hydrolyse bas causé par une faible vitesse, et une oxydation forte conduisant à la formation de produits toxiques ainsi que coupure de certaines chaînes de protéines par action mécanique causés par une vitesse forte.
- Une quantité d'enzyme de 3 g calculée comme cité précédemment.

b/ MODE OPERATOIRE :

- Le cruor est dilué par ajout d'eau distillée à 50 g/l.
- Remplir le bioréacteur au 1/2 de sa capacité totale, soit 1 l de cruor dilué.

- Mettre le module électronique du bioréacteur en service, en actionnant l'interrupteur à clé " MARCHE - ARRET ". L'afficheur digital permettant la visualisation de la mesure ou consigne de la régulation choisie est ainsi allumé.
- Mettre l'agitation en marche.
- Mettre en service le régulateur de température et ajuster cette dernière à la valeur expérimentale voulue, 40°C pour la première expérience, 50, 55 puis 60 °C pour les suivantes.
- Mettre le régulateur de pH en service, puis ajuster le pH à 7 par ajout d'acide chlorhydrique 5 % à l'aide d'une pompe péristaltique.
- Après avoir fixé toutes les conditions opératoires, la quantité de papaïne préalablement pesée est introduite rapidement dans le réacteur à un temps t_0 représentant le temps initial de l'hydrolyse.
- 30 secondes après, un échantillon de 2 ml est soutiré du mélange réactionnel ; puis transvasé dans un tube contenant 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 5 % afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse.
- C'est ainsi qu'à des intervalles de temps très rapprochés en début de réaction, puis un peu plus éloignés par la suite, plusieurs prélèvements de 2 ml sont soutirés du mélange réactionnel, puis transvasés dans des tubes contenant du TCA à 5 % et cela durant 3 heures d'hydrolyse, le temps nécessaire à l'obtention du palier.
- Après 10 à 15 minutes l'ensemble est filtré à travers du papier Whatman n° 3 .
- Les acides aminés et les peptides contenus sont alors quantifiés par la méthode de Biuret.

- Pour chaque température, nous tracerons la courbe donnant l'évolution de la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps en minutes.
- Pour chaque courbe nous tracerons les tangentes à l'origine dont la pente représentera la valeur de la vitesse initiale de la réaction, ces valeurs permettront de tracer par la suite la courbe de la vitesse initiale en fonction de la température.
- Pour chaque température nous déterminerons le taux d'hydrolyse maximale qu'on tracera par la suite en fonction de la température.

III.1.4.4- OPTIMISATION DU PH :

L'étude suivante consiste à suivre en fonction du temps l'évolution de l'hydrolyse enzymatique du cruor par la papaïne à différents pH.

a/ CONDITIONS OPERATOIRES :

Pour pouvoir optimiser le pH et voir son impact sur l'hydrolyse enzymatique du cruor, il est impérative de varier ce paramètre tout en gardant les autres paramètres constants. Pour cela nous avons choisi quatre valeurs différentes du pH, nous avons hydrolysé à pH 6, 7, 8 puis à 9.

Quand aux autres paramètres, nous avons choisi :

- Une concentration de 50 g/l en cruor équivalente à 11,65g de protéine/l.
- Une température de 55°C.
- Une vitesse d'agitation modérée de 200 tours/mn.

- Une quantité d'enzyme de 3 g, quantité en excès utilisée pour hydrolyser 11,65 g de protéine, déterminée comme cité précédemment.

b/ MODE OPERATOIRE :

- Le cruor est dilué par ajout d'eau distillée à 50 g/l.
- Mettre la solution de substrat dans le réacteur.
- Mettre l'agitation en marche.
- Ajuster la température à 55°C.
- Ajuster le pH à la valeur désirée par ajout d'HCl 5 % pour les pH acides et NaOH 5 % pour les pH basiques.
- Après avoir fixé tous les paramètres opératoires, la quantité de papaïne préalablement pesée est introduite rapidement dans le réacteur à un temps initial t_0 .
- 30 secondes après, nous prélèverons 2 ml du mélange réactionnel, et nous le transvasons dans un tube contenant du TCA à 5 % .
- Par la suite, plusieurs prélèvements sont pris à des intervalles de temps fixés, très rapprochés au début de l'hydrolyse puis un peu plus éloignés et cela pendant 3 heures d'hydrolyse jusqu'à obtention du palier.
- Après 10 à 15 minutes, l'ensemble est filtré à travers du papier Whatman n° 3.
- Les acides aminés et les peptides contenus dans le filtrat sont alors quantifiés par la méthode de Biuret.
- Pour chaque pH nous traçons le graphe donnant l'évolution de la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps.

- Pour chaque pH nous déterminons graphiquement la vitesse initiale puis on trace cette dernière en fonction du pH.
- Pour chaque pH nous déterminerons le taux d'hydrolyse maximal correspondant, ces valeurs nous permettront par la suite de tracer $TH = f(pH)$.

III.1.5- CINETIQUE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE :

L'étude expérimentale de la cinétique enzymatique consiste à suivre en fonction du temps l'évolution de l'hydrolyse enzymatique du cruor par la papaïne à différentes concentrations en protéines, durant quatre heures d'hydrolyse et cela par quantification des acides aminés et des peptides contenus dans le mélange réactionnel par méthode colorimétrique.

a/ CONDITIONS OPERATOIRES :

Pour pouvoir mener à bien notre cinétique nous avons choisi :

- Une gamme de concentrations assez large allant de 25 g/l à 400 g/l en cruor, les concentrations utilisées lors de l'expérience sont : 25, 50, 100, 200, 300 et 400 g/l en cruor, ce qui équivaut à des concentrations de : 5,83 ; 11,65 ; 23,35 ; 46,61 ; 69,93 et 93,24 g/l en protéines, calculées comme cité précédemment.
- Une température de 55 °C.
- Un pH de 8.
- Une agitation modérée de 200 tr/mn.
- Une quantité d'enzyme calculée par rapport à la quantité de protéines utilisées, comme cité précédemment.

b/ MODE OPERATOIRE :

- On prépare la solution de substrat par dilution dans de l'eau distillée.

- On remplit le réacteur d'un litre de cruor dilué.
- On met l'agitation en marche.
- On ajuste la température à 55 °C.
- On ajuste le pH à 8, par ajout de soude 1N.
- Après avoir fixé toutes les conditions opératoires, la quantité de papaïne préalablement pesée est introduite rapidement dans le réacteur, à un temps t_0 représentant le temps initial de l'hydrolyse.
- 30 secondes après, un échantillon de 2 ml est soutiré du mélange réactionnel, puis transvasé dans un tube contenant 5 ml de TCA à 5 % afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse.
- Prendre par la suite plusieurs prélèvements de 2 ml à des intervalles de temps fixés en minutes, puis les transvaser dans des tubes contenant du TCA à 5 % et cela durant quatre heures d'hydrolyse jusqu'à l'obtention du palier.
- 10 à 15 minutes après le prélèvement, le contenu du tube est filtré à travers du papier Whatman n° 3.
- Les acides aminés et les peptides contenus dans le filtrat sont alors quantifiés par la méthode de Biuret.
- A partir des résultats obtenus, nous traçons le graphe donnant l'évolution :
 - * De la concentration en protéines hydrolysées (P) en fonction du temps en minutes.
 - * De la vitesse initiale (v), déterminée comme cité précédemment en fonction de la concentration en protéines initiale (S_0).
 - * Eventuellement celle de $1/v = f(1/S_0)$,

- * Du taux d'hydrolyse maximal en fonction de la concentration en protéines initiale.
- * De la vitesse initiale en fonction de la quantité en papaïne (E).

III.2- RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATIONS :

III.2.1- LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU CRUOR OBTENU :

L'étude des caractéristiques chimiques du cruor obtenu après centrifugation du sang recueilli à l'abattoir d'Hussein Dey sont résumés dans le tableau n°11.

TABLEAU N°11 : Principales caractéristiques du cruor recueilli.

COULEUR	ROUGE TRES BRUN
pH	7,34
Densité (g/cm ³)	1,16
Viscosité cinématique à 19 °C (Cst)	60,00
DBO ₅ 5 (g d'O ₂ /l)	290,00
Concentration en protéines (g/l)	270,00

- La valeur de la densité trouvée expérimentalement se rapproche de celle citée en bibliographie, qui est de l'ordre de 1,09 [21], l'écart minime trouvé entre ces deux valeurs est dû aux erreurs de manipulation, précision de la pesée, ainsi qu'à la quantité d'eau restante dans le cruor après centrifugation.
- La valeur de la viscosité cinématique trouvée à 19 °C est assez élevée, mais s'explique du fait que le cruor est très visqueux.
- La valeur élevée de la DBO₅ trouvée, montre bien le fait que le cruor représente une charge polluante non négligeable.
- La concentration en protéines obtenue coïncide bien avec les valeurs données en bibliographie (250 à 290 g/l) [1], cette dernière nous a permis de calculer la quantité de

protéines contenue dans 100 g de cruor, qui est de l'ordre de 23,31 % .

III.2.2- DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'HYDROLYSE PAPAÏQUE DU CRUOR :

III.2.2.1- OPTIMISATION DE LA TEMPERATURE:

L'étude faite sur la température, nous a permis de faire les conclusions suivantes :

- a/ La figure n°15 montre l'évolution de la quantité de protéines hydrolysées pour les différentes températures étudiés. D'après cette dernière nous constatons que :
- Il y a formation instantané de produit c'est à dire de protéines hydrolysées dès que l'enzyme est introduite dans le réacteur.
 - La courbe présente une forme linéaire en début de réaction, c'est dans cette zone que la vitesse d'hydrolyse est maximale et est déterminée par la mesure de l'angle que fait la tangente de la courbe à l'origine.
 - La vitesse de réaction à tendance à diminuer en fonction du temps, passant par une phase de ralentissement, jusqu'à ce qu'elle atteigne un palier correspondant à une vitesse de réaction nulle, il n'y a donc plus de formation de produit.

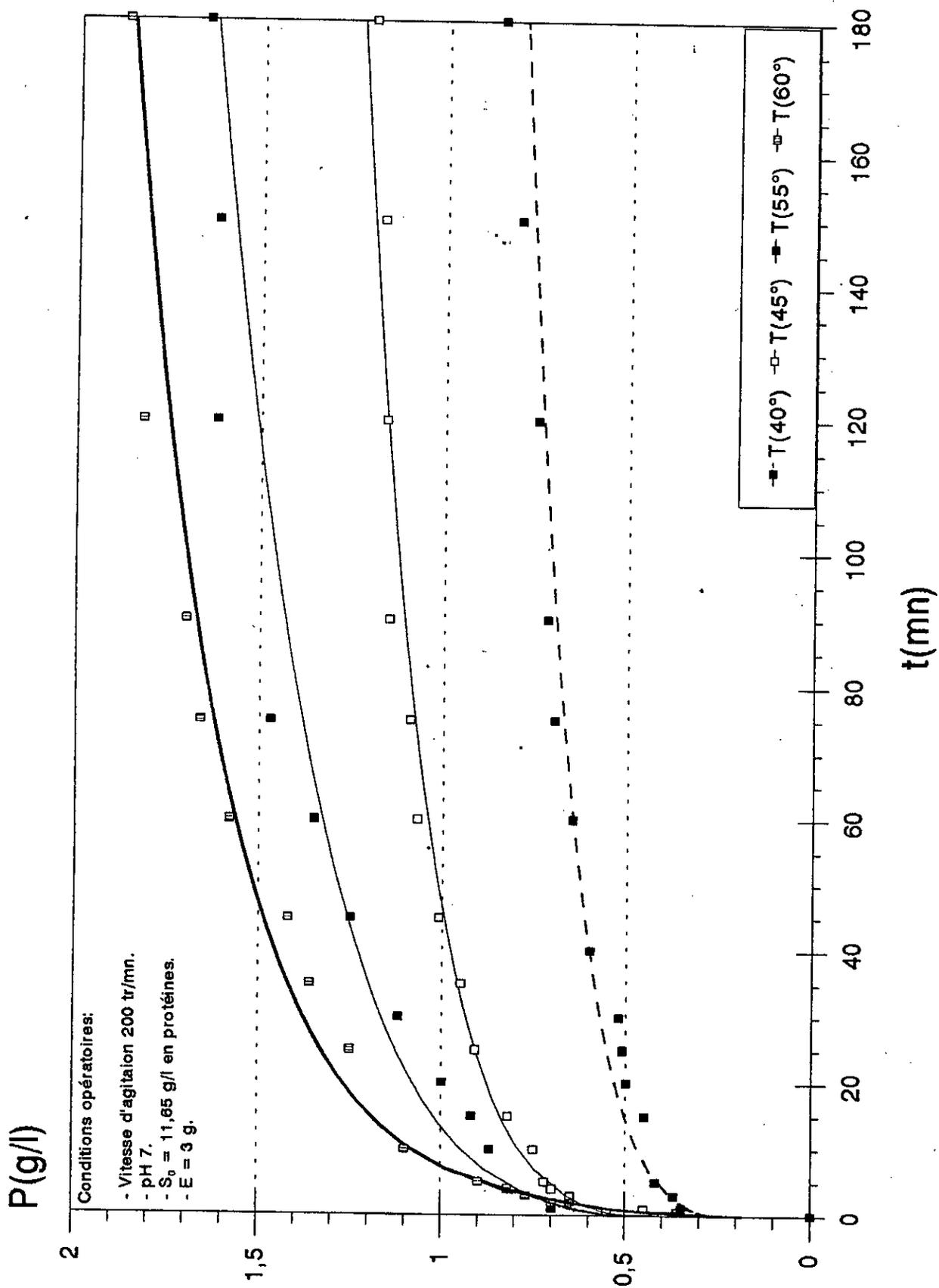


Figure N°15: INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'HYDROLYSE DES PROTEINES DU CRUOR PAR LA PAPAINE

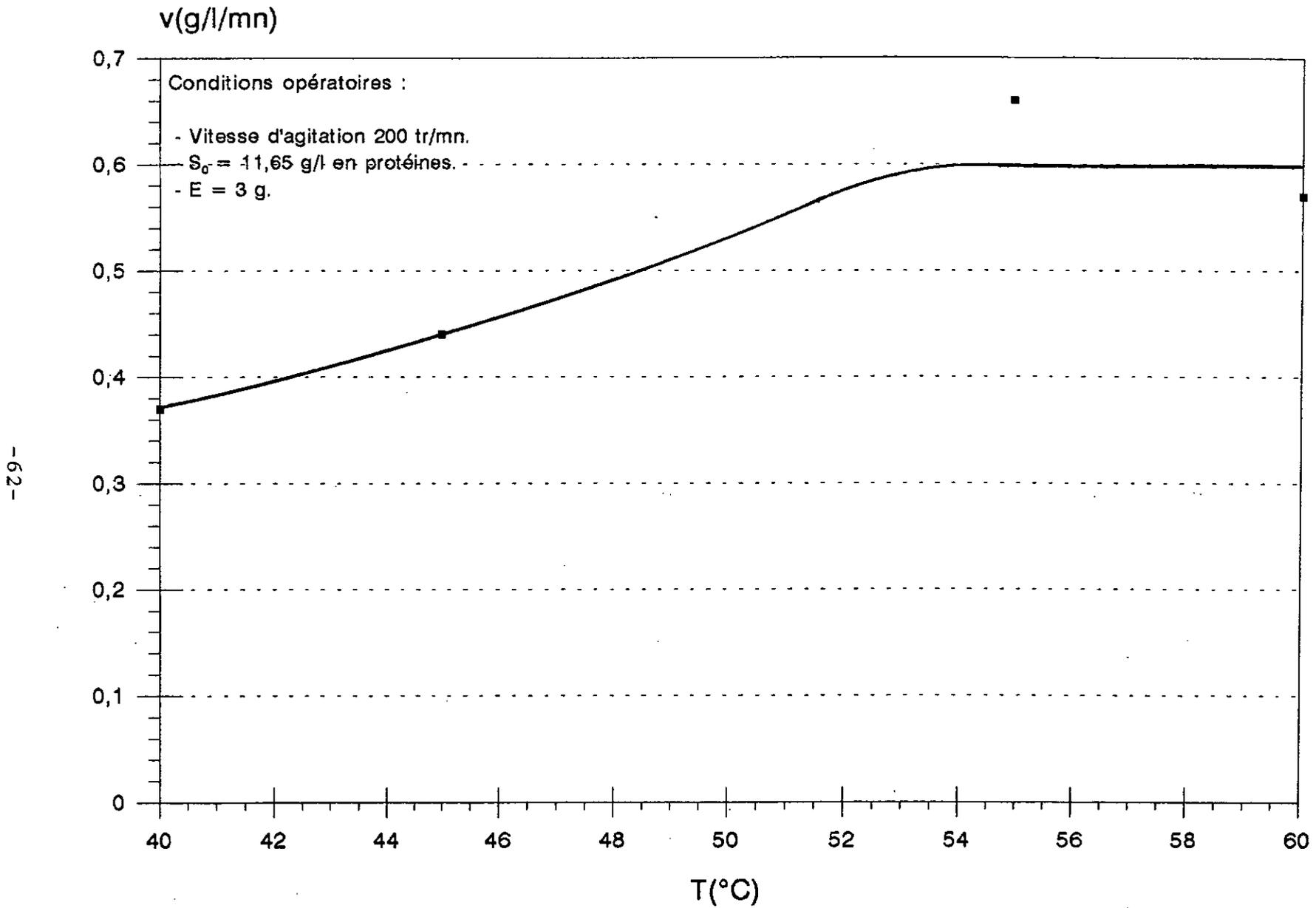


Figure N°16: EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA VITESSE INITIALE

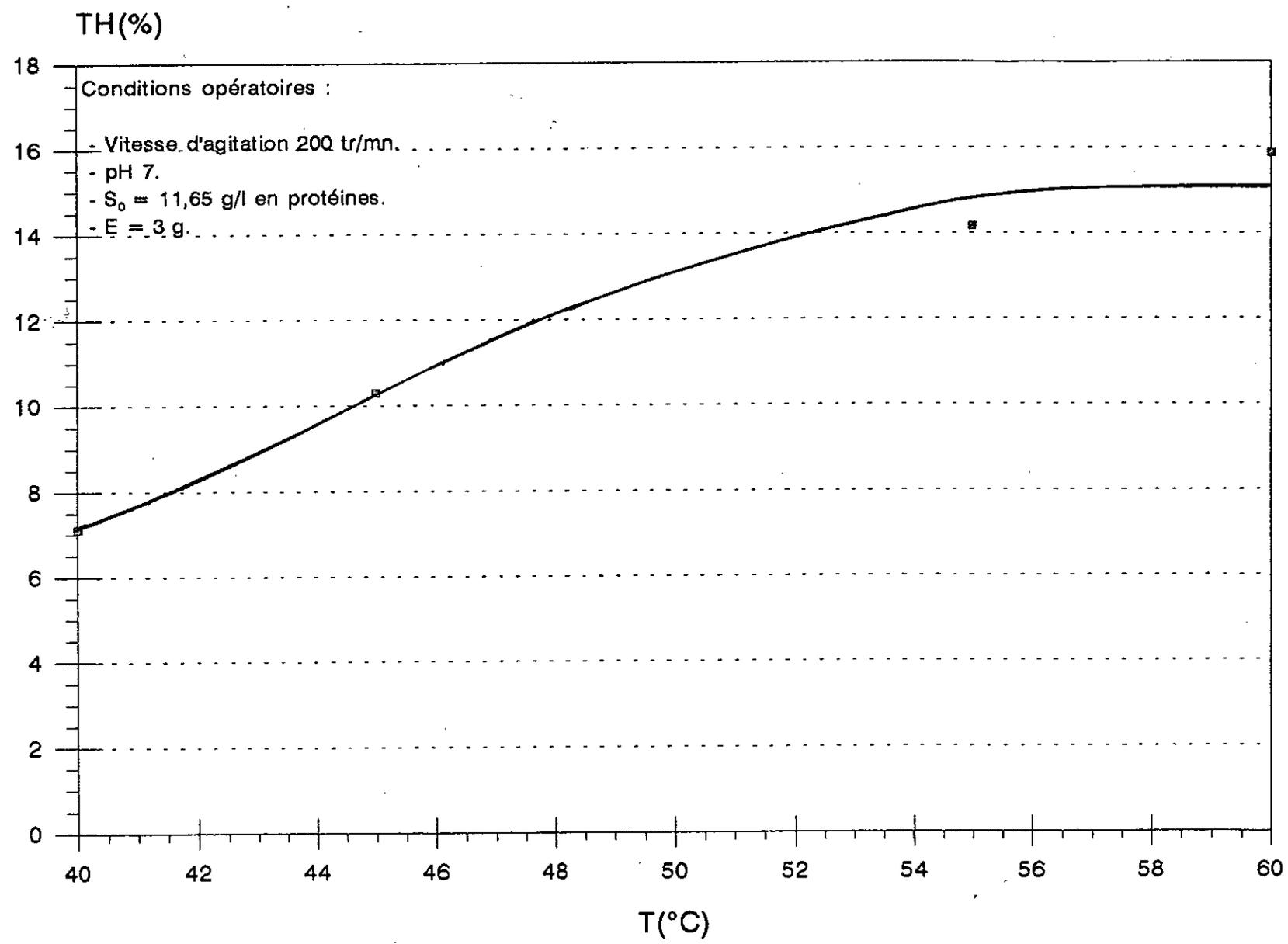


Figure N°17: EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LE TAUX D'HYDROLYSE

CONCLUSION :

D'après l'étude qui vient d'être faite, concernant l'influence de la température sur l'hydrolyse du Cruor par la papaine on peut conclure que la température optimale pour l'hydrolyse papaique des proteines du Cruor est de 55 °C ce qui est en accord avec les recommandations du fabricant de la papaine.

III.2.2.2- OPTIMISATION DU pH :

L'influence du pH sur l'hydrolyse du Cruor, a permis de constater que :

- a/- L'allure des courbes $P=f(t)$ pour différents pH (figure n°18) est à priori identique à celles déjà vues en ~~III 221~~
- L'hydrolyse est d'autant plus importante que le pH est élevé et ce jusqu'à un pH de 8, au delà de cette valeur la quantité finale de protéines hydrolysés est constante.

- b/ L'évolution de la vitesse initiale en fonction du pH, nous a permis de constater qu'en augmentant le pH, la vitesse initiale augmente jusqu'à atteindre un optimum de 1,28 g/l à pH 7, au delà, la vitesse initiale baisse légèrement pour se stabiliser à une vitesse moyenne de 1,2 g/l.mn. (figure n°19)

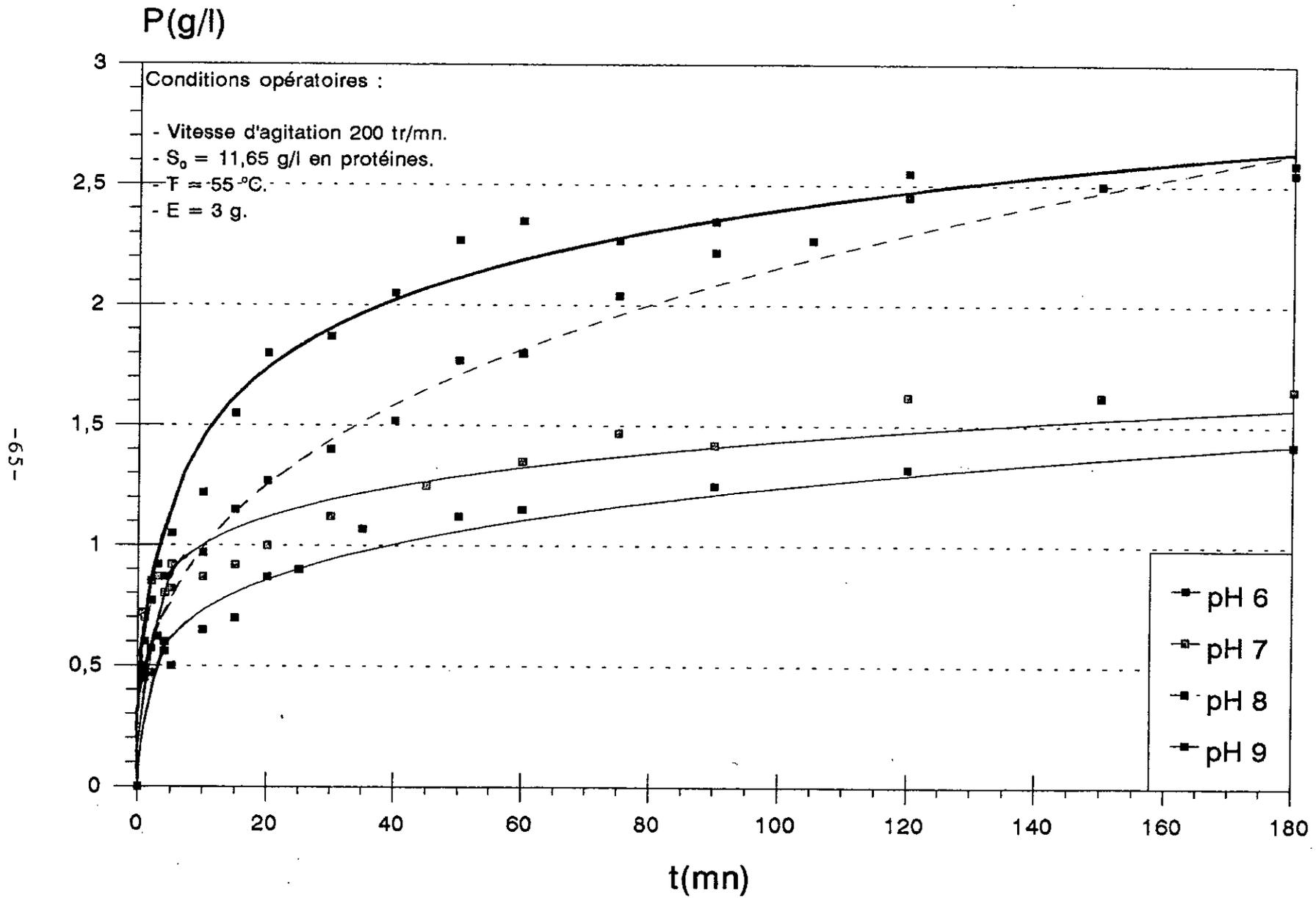


Figure N°18: INFLUENCE DU PH SUR L'HYDROLYSE DU CRUOR PAR LA PAPAINE

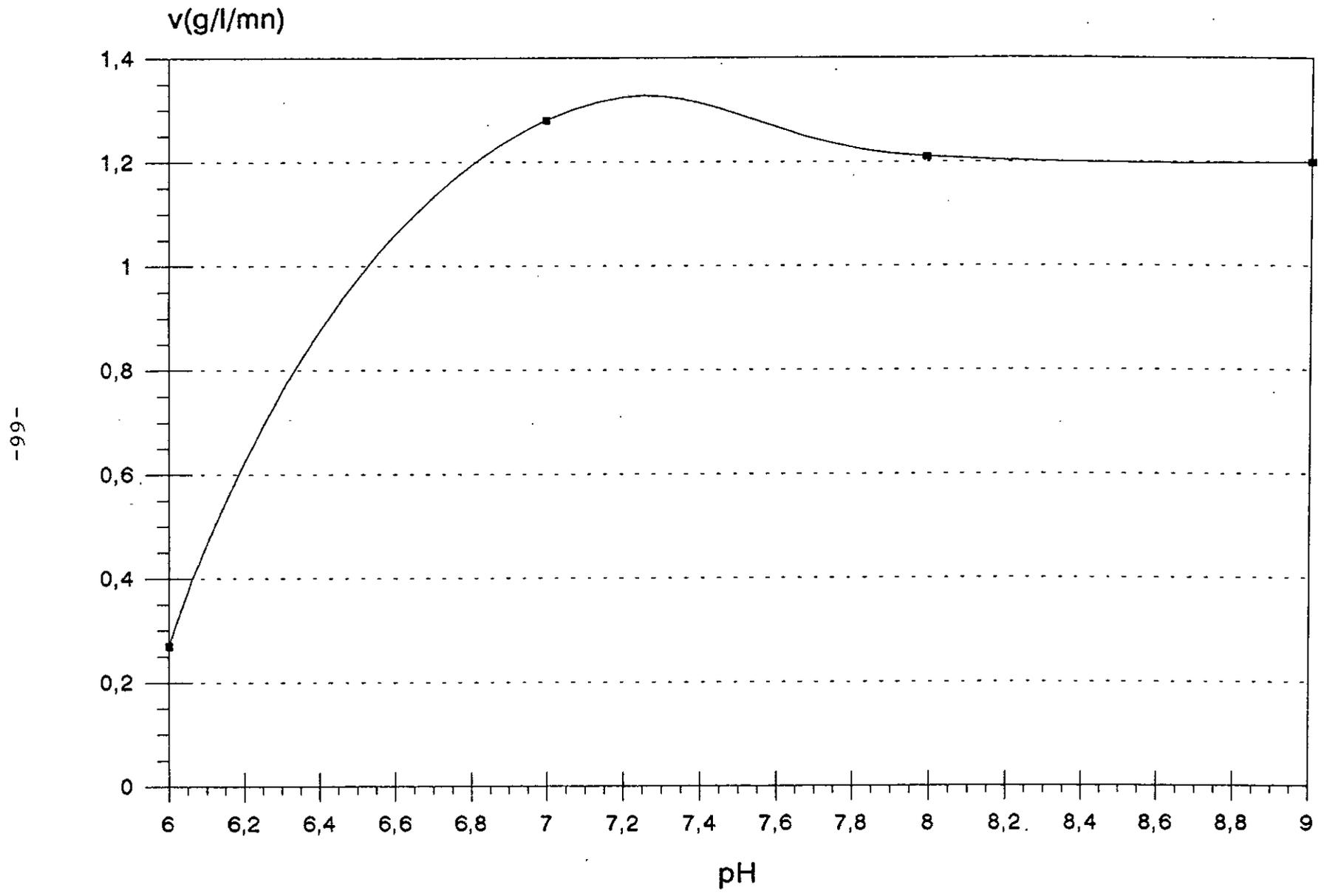


Figure N°19: EFFET DU pH SUR LA VITESSE INITIALE

c/ L'évolution du taux d'hydrolyse en fonction du pH (figure n°20) présente trois principales parties:

- Un palier à un taux d'hydrolyse moyen relativement faible de **12,2** % pour des pH compris entre 6 et 7.
- Une augmentation progressive du taux d'hydrolyse pour des pH compris entre 7 et 8.
- Puis un palier à un taux d'hydrolyse moyen relativement élevé de 21 % pour une fourchette de pH comprise entre 8 et 9.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par DELANEYL (1977) [29], qui montre qu'à 55 °C pour des pH acides, il y a coagulation au bout de quelques minutes, tandis qu'aux pH basiques, il y a absence de coagulation au bout de 120 mn.

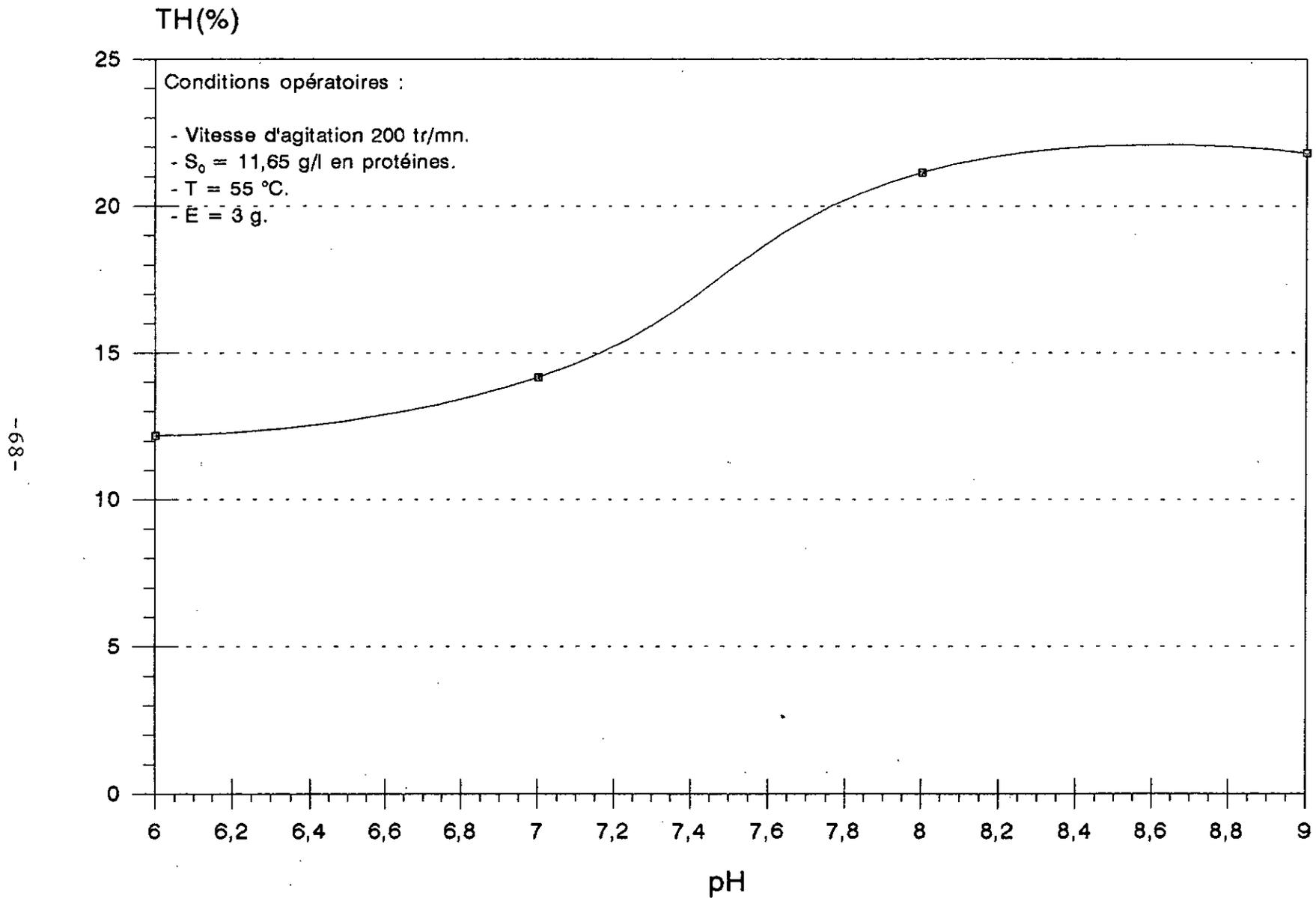


Figure N°20: EFFET DU pH SUR LE TAUX D'HYDROLYSE

CONCLUSION :

D'après l'étude qui vient d'être réalisée concernant l'influence du pH sur l'hydrolyse du Cruor par la papaine, nous pouvons conclure que le pH optimal pour l'hydrolyse papaique des protéines du Cruor est de 8. Ce qui est loin d'être en accord avec les recommandations du fabricant de la papaine qui opte pour un pH de 6. Ceci est dû vraisemblablement au fait que le fournisseur de papaine utilise la caséine comme substrat.

III.2.2.3- INFLUENCE DE LA QUANTITE DE SUBSTRAT :

L'étude faite concernant l'influence de la quantité de protéines initiales (S_0) sur l'hydrolyse papaique du Cruor, nous a permis de constater que :

- Les courbes de la figure n°21 représentant la cinétique de production ont la même allure que celles de la figure représentant $P = f(t)$ pour différentes températures.
- La quantité finale de protéines hydrolysées, croît proportionnellement en fonction de l'augmentation de la concentration initiale en Cruor et ce jusqu'à une concentration initiale de 200 g/l, au delà de cette valeur la quantité de produit final formé est de plus en plus faible ; ceci peut être expliqué par un début d'inhibition par substrat.

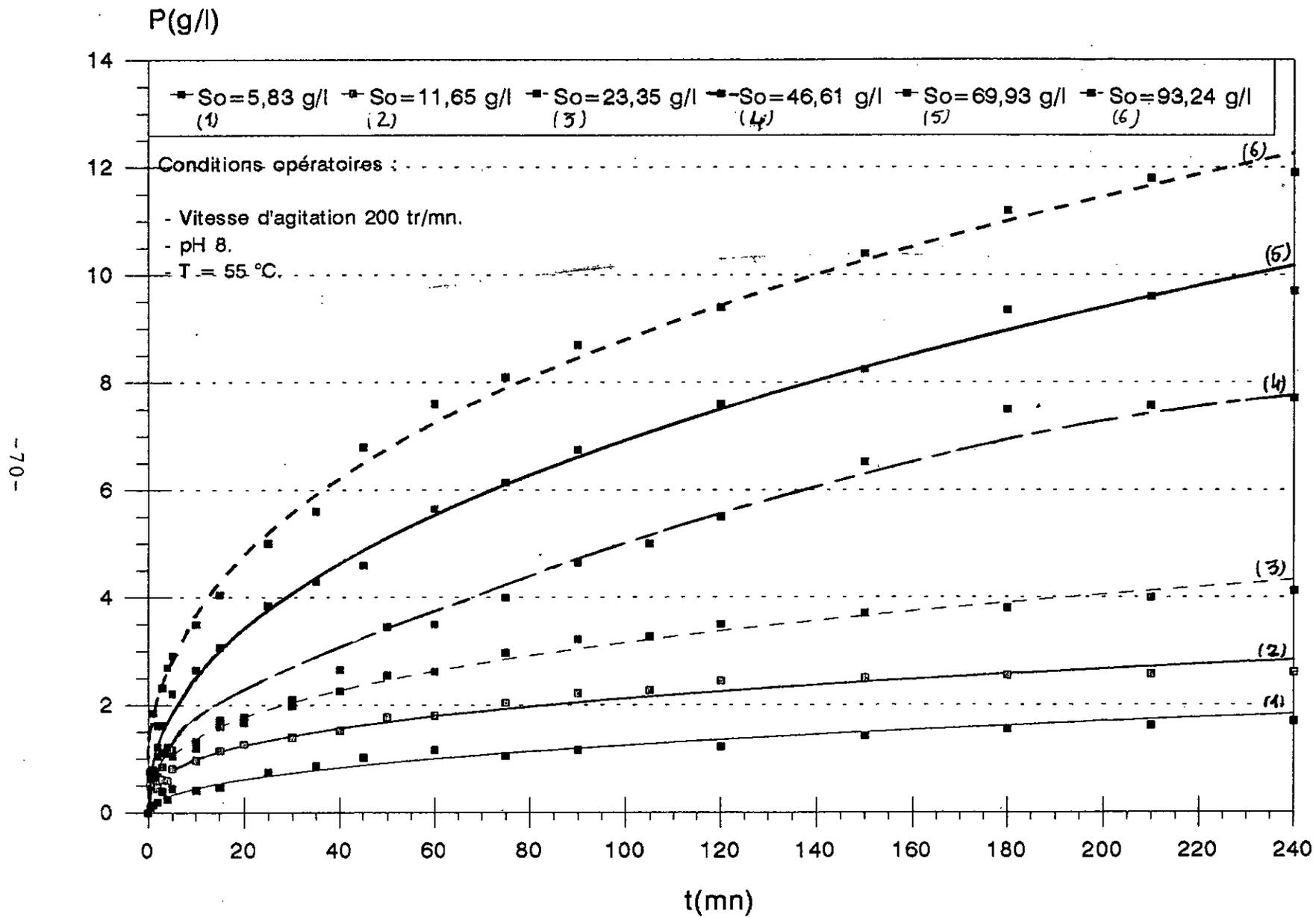


Figure N°21: CINETIQUE D'HYDROLYSE DES PROTEINES DU CRUOR PAR LA PAPAINE

III.2.3- CINETIQUE D'HYDROLYSE :

III.2.3.1- DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES K_m et v_{max} :

A partir des courbes $P=f(t)$ (figure n°21), nous avons tracé les variations des vitesses initiales en fonction de la concentration en substrats initiales S_0 , représentés dans la figure n°22.

La courbe représentant la vitesse initiale en fonction du temps est une sigmoïde rappelant l'allure du graphe de Michaelis MENTEN [5], d'où nous pouvons appliquer la loi :

$$v = v_{max} \cdot \left(\frac{S}{S+K_m} \right).$$

La linéarisation de Lineweaver et Burk [5] représentant $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{S_0}\right)$ (figure n°23) a donné une droite permettant de

calculer les constantes cinétiques K_m et v_{max} par extrapolation graphique.

$$K_m = 170 \text{ g/l}$$

$$v_{max} = 4,46 \text{ g/l.mn}$$

La valeur de K_m est importante par rapport à celles rencontrées dans la bibliographie. Comparée à celle trouvée lors de l'hydrolyse des rejets de poissonnerie par la papaine [18], qui est égale à 454,5 g/l, nous pouvons conclure que la papaine présente plus d'affinité pour le Cruor que pour le poisson. Par contre la vitesse maximale d'hydrolyse du poisson par la papaine ($v_{max}=35,4 \text{ g/l.mn}$), est supérieure à celle de l'hydrolyse du Cruor.

III.2.3.2- CALCUL DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME :

L'évolution de la vitesse initiale en fonction de la quantité d'enzyme totale introduite dans le réacteur est illustrée dans la figure n°24. On remarque que $V=f(E)$ est une droite passant par l'origine.

L'équation de variation de la vitesse en fonction de la quantité totale d'enzyme sera donc :

$$V = A.[ET]$$

où A est l'activité de la papaine en utilisant comme substrat le cruor.

La droite nous donne une valeur de :

$$A = 0,11 \text{ g de proteine hydrolysé/l.mn.g d'enzymes}$$

Comparée à l'activité donnée par le fabricant et utilisée pendant toutes les expériences, qui est de 6 g de Caseine hydrolysé/l.mn.g d'enzyme, nous pouvons conclure que la quantité d'enzyme utilisée est environ 54 fois plus faible que celle nécessaire à l'hydrolyse totale du cruor.

III.2.3.3- INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PROTEINES SUR LA QUANTITE FINALE DE PROTEINES HYDROLYSEES :

La courbe représentant la quantité finale de protéines hydrolysée (P_f) en fonction de la concentration initiale (figure n°25) montre qu'au delà d'une concentration de 46,61 g/l de substrat initial nous obtenons une droite dont l'équation est :

$$P_f = C^{te} \cdot S_0$$

$$C^{te} = 12 \%$$

La constante trouvée représente le rapport P_f/S_0 qui est le taux d'hydrolyse.

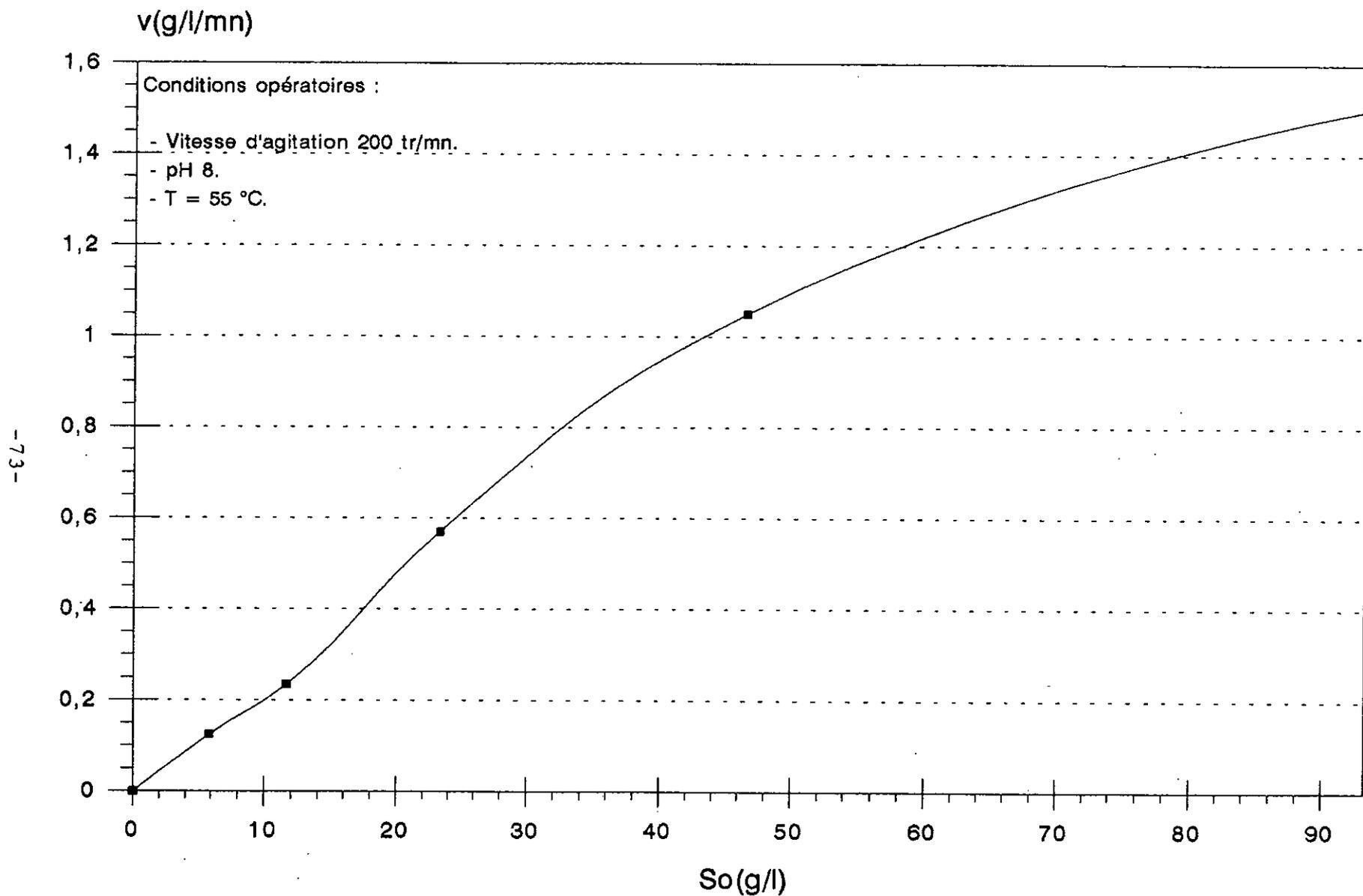


Figure N°22: REPRESENTATION DE LA VITESSE INITIALE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PROTEINES

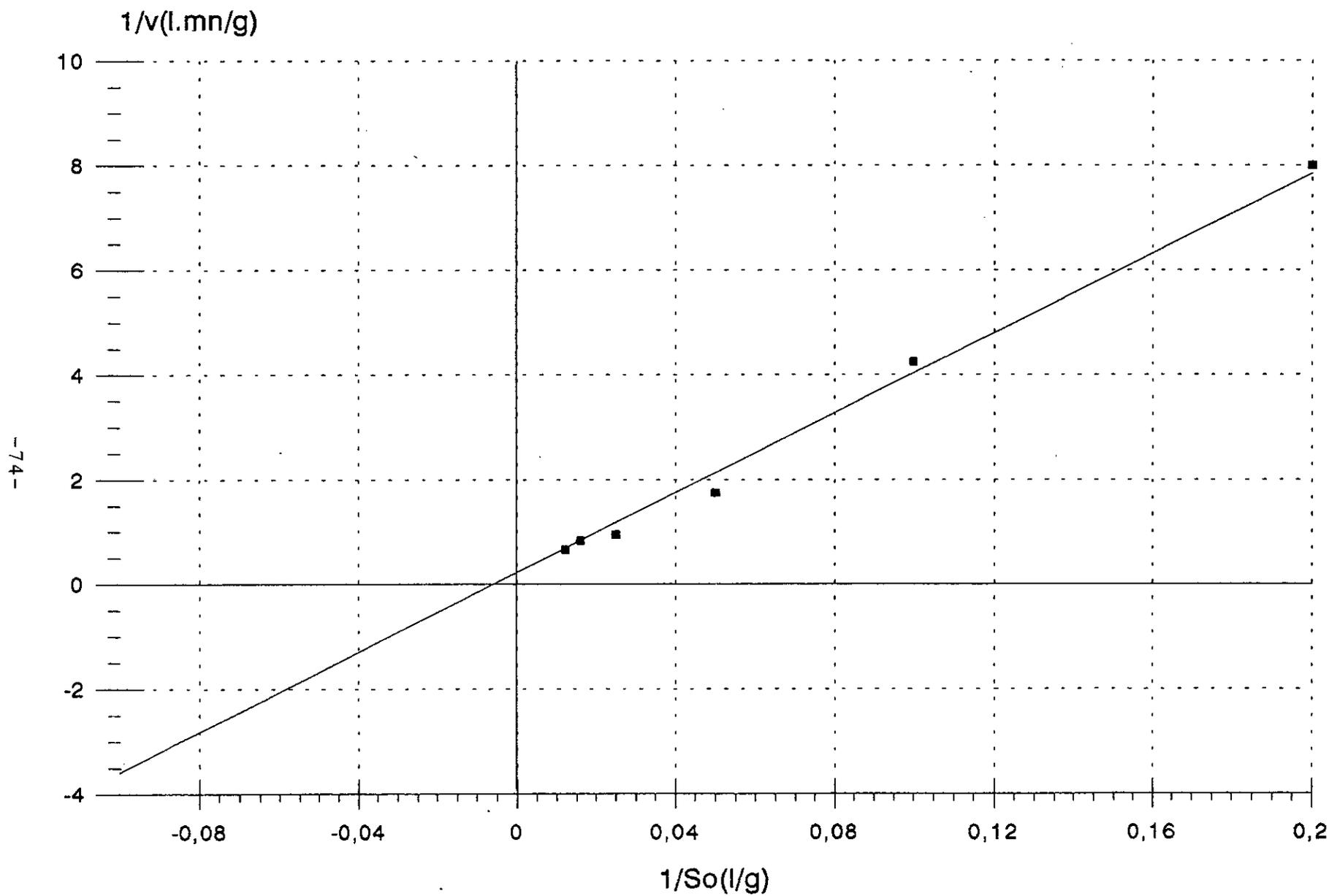


Figure N°23: REPRESENTATION DE LINEWEAR - BURK: $1/v = f(1/S_0)$

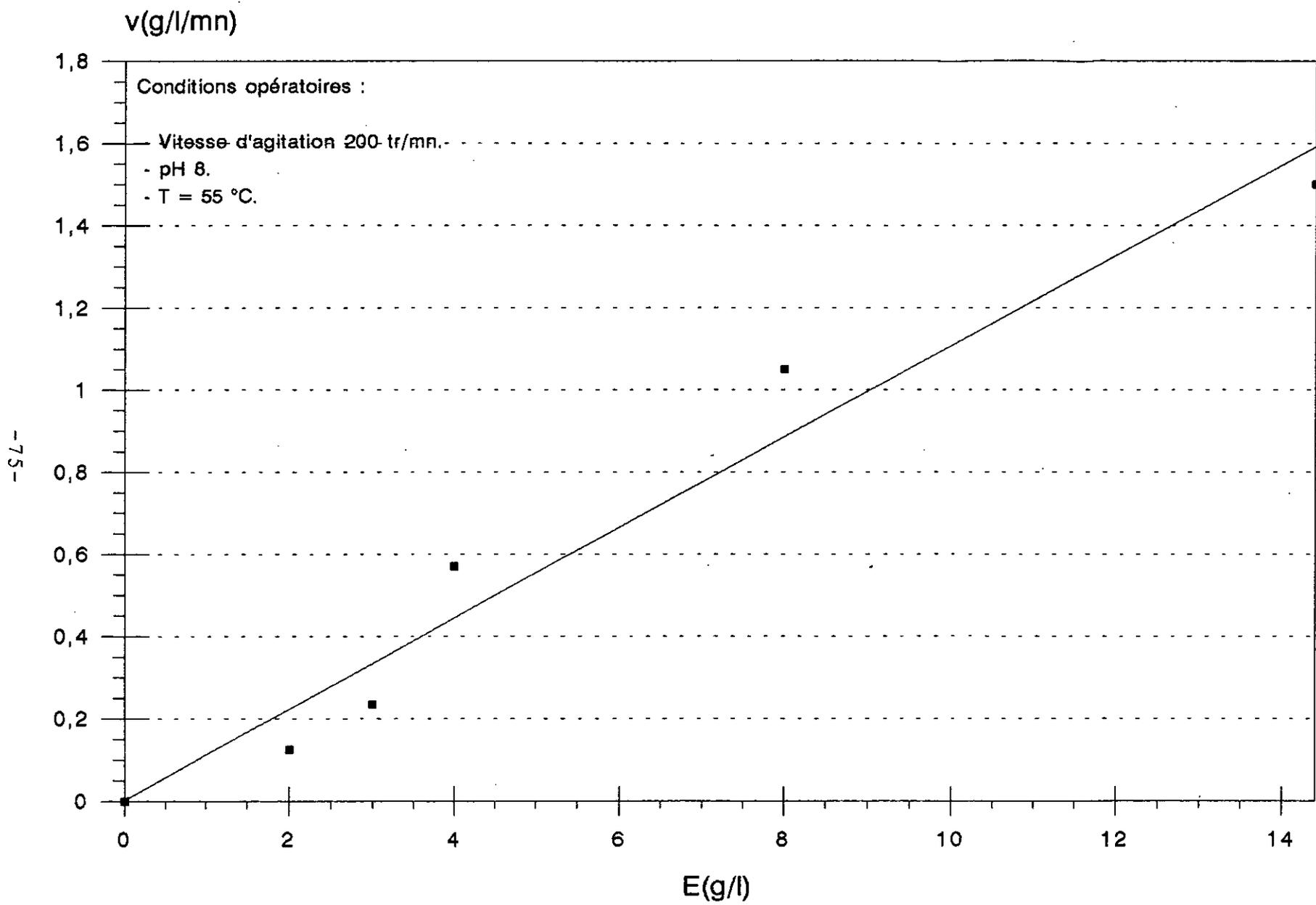


Figure N°24: REPRESENTATION DE LA VITESSE INITIALE EN FONCTION DE LA MASSE EN PAPAIN (E)

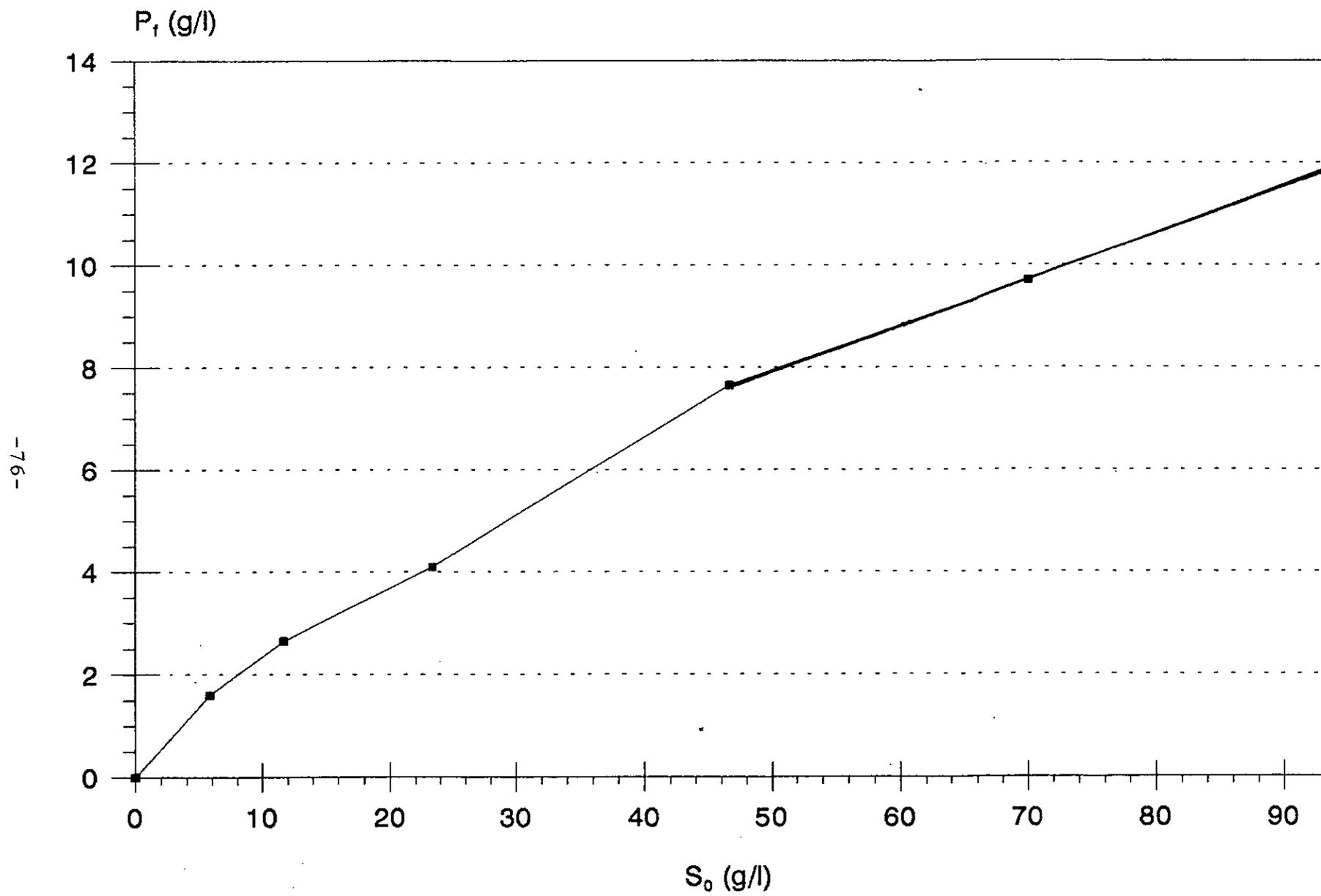


Figure N°25 : REPRESENTATION DE LA QUANTITE DE PROTEINES HYDROLYSEES FINALE (P_f) EN FONCTION S_0

III.2.3.4- EVOLUTION DU TAUX D'HYDROLYSE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PROTEINE :

La figure n°26 montre l'évolution du taux d'hydrolyse en fonction de la concentration initiale (S_0). Cette dernière nous a permis de constater que :

- Le taux d'hydrolyse diminue avec l'augmentation de S_0 jusqu'à atteindre une valeur d'environ 13 % à ~~46~~ 46 g/l de concentration initiale en protéine. Au delà de cette valeur le taux d'hydrolyse reste constant quelque soit l'augmentation de S_0 , ceci est en accord avec le résultat obtenu en 3°.

CONCLUSION :

L'étude concernant la cinétique enzymatique du Cruor, nous permet de caractériser les paramètres cinétiques d'hydrolyse du Cruor par la papaine à savoir :

- Une activité moléculaire :

$A = 0,11$ g de protéine hydrolysée / l.mn.g d'enzyme.

- Une constante d'affinité : $K_m = 170$ g/l.

- Une vitesse maximale : $V_{max} = 4,46$ g/l.mn.

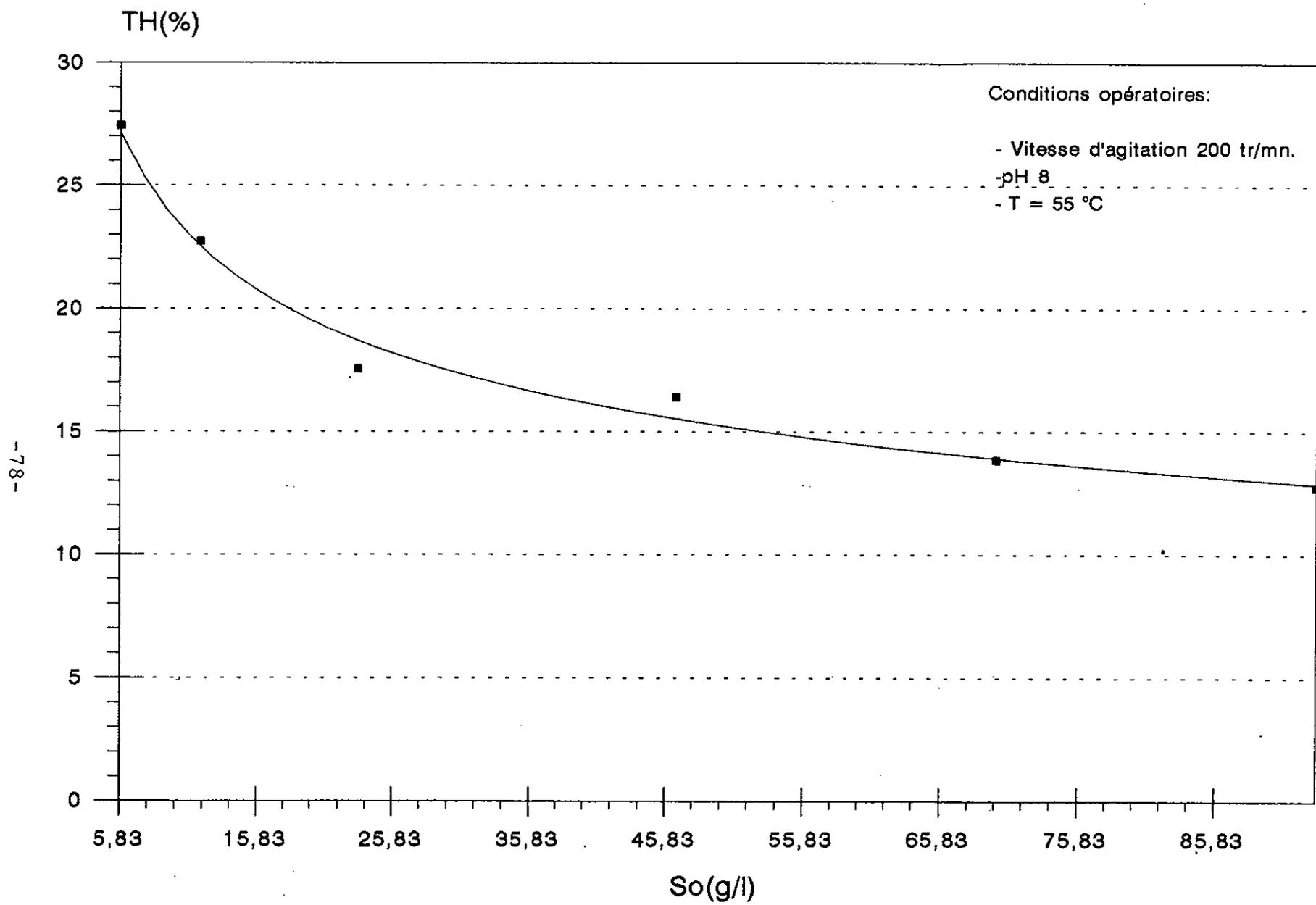


Figure N°26: INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE EN PROTEINES SUR LE TAUX D'HYDROLYSE

III.2.4- ETUDE DU REACTEUR :

Le bilan de substrat qui a été établi dans la partie théorique pour le réacteur fermé, a permis d'établir l'équation n°2

$$\frac{v_{\max} \cdot t}{K_m} = \left(\frac{X \cdot S_0}{K_m} \right) - \ln(1-X)$$

En utilisant les constantes cinétiques expérimentales obtenues, l'équation n°2 devient :

$$\left(\frac{4,46}{170} \right) \cdot t = \left(\frac{X \cdot S_0}{170} \right) - \ln(1-X)$$

d'où : $0,026 \cdot t = \left(\frac{X \cdot S_0}{170} \right) - \ln(1-X)$ (n°3)

Les courbes (figure n°27) représentant $\frac{K_m \cdot t}{v_{\max}}$ en fonction du ^{de Conversion} taux d'hydrolyse (X) pour différentes valeurs de $\frac{S_0}{K_m}$, sont

identiques. Cela s'explique par le fait que K_m étant élevée par rapport à S_0 , $\frac{X \cdot S_0}{K_m}$ devient négligeable devant $\ln(1-X)$;

l'équation n°3 se simplifie donc à : $0,026 \cdot t = -\ln(1-X)$ et ne dépend plus de S_0 .

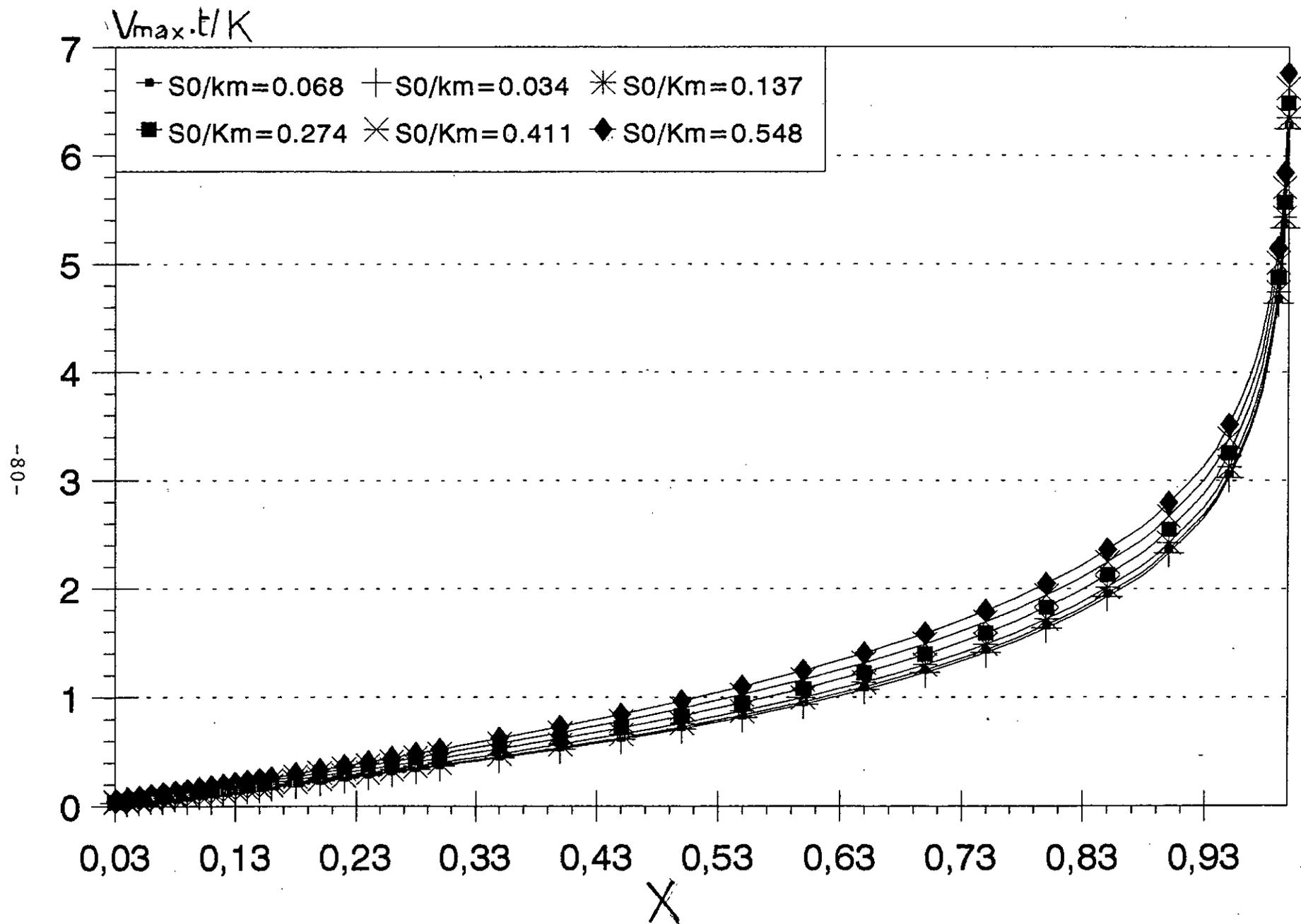


Figure N°27: REPRESENTATION DE $V_{\max} \cdot t / K_m$ EN FONCTION DU TAUX DE CONVERSION X

IV - CONCLUSION

IV- CONCLUSION

Notre travail à porté essentiellement sur l'hydrolyse enzymatique du cruor, obtenu après centrifugation du sang d'abattoir, à l'aide d'une enzyme végétale : la papaïne.

L'étude de l'hydrolyse du cruor bovin nous a permis de dégager les conclusions suivantes :

- La température et le pH optimaux, sont respectivement de 55 °C et 8.
La valeur du pH trouvée est loin de celle préconisée par le fabricant qui a utilisé de la caséine comme substrat.
- L'activité moléculaire de la papaïne lors de l'hydrolyse du cruor et de :

$$A = 0,11 \text{ g de protéines hydrolysées/l.mn. g d'enzyme.}$$

- La constante d'affinité : $K_m = 170 \text{ g/l}$
- Une vitesse maximale : $v_{\max} = 4,46 \text{ g/l.mn.}$

Le travail qui vient d'être effectué n'est qu'un vif aperçu sur l'hydrolyse enzymatique du cruor, qui est un substrat très complexe et mal exploité.

En tout état de cause, pour le moment, et probablement encore pour une longue période, la valorisation du sang ne pourra s'effectuer dans le cadre d'un schéma général, néanmoins, nous recommandons vivement à nos chercheurs et laboratoires de se pencher sur les différents procédés de valorisation du cruor et plus principalement sur le procédé d'hydrolyse et l'implantation de cette technique dans nos milieux industriels.

ANNEXE

ANNEXE

DOSAGE DES PROTEINES :

Dosage de l'azote total :

Le pourcentage de l'azote total se calcul par la méthode KJELDAHL.

a) Minéralisation :

la prise d'essai est de 2 g, on ajoute 0,3 g de catalyseur puis 10 ml d' H_2SO_4 concentré, on minéralise par ébullition en chauffant d'abord doucement, avec agitation, jusqu'à décoloration poursuivre alors le chauffage pendant 2 heures.

b) Distillation :

- Placer l'extrémité du condenseur dans un erlenmeyer de 150 ml d'acide borique 4 % et quelques gouttes du réactif de tashiro.
- Verser le contenu du matra dans le réservoir du distillateur, ajouter quelques gouttes de phénophtaleine.
- Ouvrir le robinet puis rincer le réservoir.
- Ajouter 23 ml de lessive de soude (15 N) rincer en prenant soin de ne jamais mettre en contact l'atmosphère avec l'intérieur et surveiller la présence de liquide dans le siphon.
- Ouvrir le robinet de vapeur et distiller pendant 5 mn.
- Enlever l'erlenmeyer et rincer l'extrémité du réfrigérant.

c) Le titrage :

- Titrer avec H_2SO_4 (N/50) jusqu'à coloration rose mauve.

Le pourcentage de l'azote total est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'azote total} = (d.V.0,28)/(P_e.1000).100$$

V : volume de H_2SO_4 (N/50) ajouté (ml)

P_e : prise d'essai (g)

d : densité de l'échantillon à doser

Le pourcentage de protéine se déduit de la formule suivante :

$$\% \text{ de protéine} = \% \text{ d'azote total} . 6,25$$

2 - Dosage colorimétrique par la méthode au Biuret :

Le principe de cette méthode est le suivant :

En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements $-CO-NH-$ ou $-CO-NH_2$ voisins forment avec les ions cuivriques (Cu^{++}) un complexe bleu-violet.

L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques, et donc proportionnelle à la concentration d'une protéine. Toute fois cette concentration ne doit pas excéder 5 g/l

Mode opératoire:

1 - Tracé de la courbe d'étalonnage :

La solution étalon doit être de composition voisine à celle de solution à doser ; c'est pourquoi on utilisera comme solution étalon la BSA (Bovine Sérum Albumine).

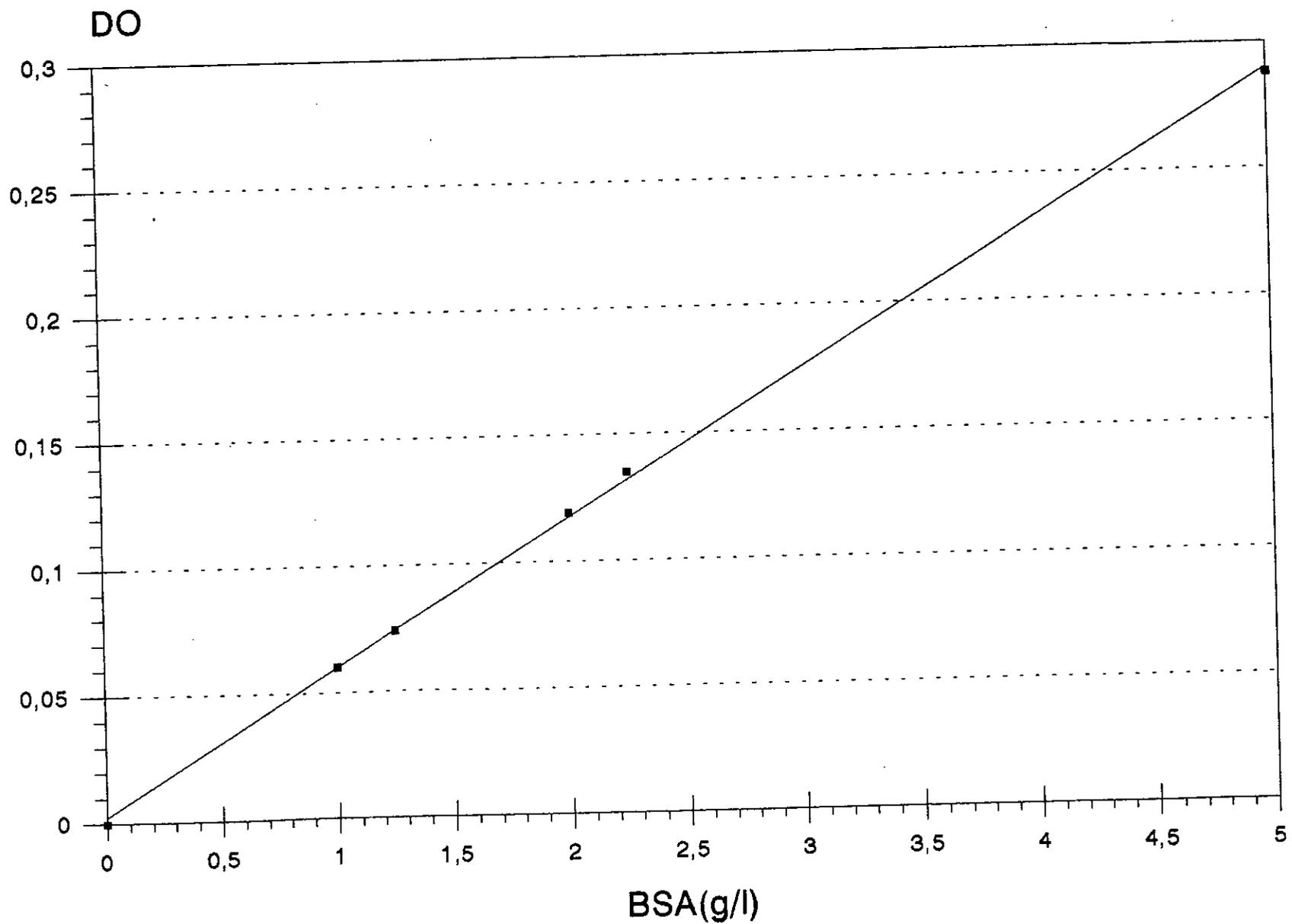


Figure N°28: COURBE D'ETALONNAGE POUR LA METHODE DE BIURET

A partir d'une solution de BSA (100g/l) on prépare les dilutions suivantes : 1/100, 1/80, 1/50, 1/40 et 1/20 correspondant aux concentrations respectives 1 ; 1,25 ; 2 ; 2,5 et 5 g/l. De chaque dilution on prélève 1 ml, auquel on rajoute 4 ml de réactif de Cornall et on agite immédiatement et vigoureusement, on laisse au repos à l'obscurité pendant 30 minutes puis on lit les densités optiques à 540 nm contre un témoin blanc. Le témoin est préparé à partir d'1 ml d'eau distillée et de 4 ml de réactif de Cornall. La figure n°28 illustre les résultats obtenus.

2 - Préparation du réactif de Cornall :

Réactif :	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	1,50 g
	Na, K tartrate	6,0 g
	Eau	500 ml

Ajouter en agitant : NaOH à 10 % 300 ml compléter à 1 litre.

Conserver en flacon paraffiné ou en plastique à l'obscurité.

3 - Dosage de l'échantillon :

On prélève 1 ml de l'échantillon et on opère comme précédemment (voir 1°). Après l'obtention de la densité optique de ce dernier on la projette sur la courbe d'étalonnage et on en déduit la teneur en concentration de notre échantillon. Si la densité optique de notre échantillon est en dehors de l'intervalle de la densité optique relative à la courbe d'étalonnage, on doit diluer notre échantillon et procéder de la même manière tout en multipliant la concentration obtenue par le facteur de dilution.

Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO₅) :

La DBO₅ est la quantité d'oxygène exprimée en mg d'O₂/l nécessaire à la dégradation d'un volume d'échantillon et cela en l'incubant dans un flacon contenant un réservoir de soude ou de potasse, durant 5 jours à 20°C et à l'obscurité. L'absorption du

CO₂ par la soude produit une dépression enregistrée par un manomètre. C'est cette variation corrigée par un facteur lié au volume d'échantillon qui permet de calculer la DBO₅ à l'aide de l'expression suivante :

$$DBO_5 = h.F$$

h : Hauteur correspondant au volume de l'échantillon.

F : Facteur correspondant au volume d'échantillon.

Détermination de la Viscosité :

La méthode de mesure de la viscosité cinématique consiste à mesurer le temps mis par un volume déterminé de liquide pour s'écouler, dans les conditions normalisées par un capillaire calibré appelé Viscosimètre Ubbelohde à température fixée. La viscosité cinématique est calculée à partir du temps d'écoulement par la formule :

$$\text{Viscosité cinématique (en Cst)} = c.t$$

c : Constante du viscosimètre qui dépend de la taille du capillaire du viscosimètre utilisé.

t : temps d'écoulement en seconde.

La Viscosité cinématique s'exprime dans le système SI en m²/s.

On préfère souvent utiliser le mm²/s qui correspond à l'unité la plus connue de viscosité cinématique : Centistoke (Abréviation est Cst).

GLOSSAIRE

BSA (Bovine serum albumine) : est une protéine standard de structure moléculaire sphérique, d'une grande pureté (98 à 99 %), soluble dans l'eau et contenant 1,3 % d'eau et 15,9 % d'azote.
[18]

CHELATE : Composé dans lequel un atome est pris "en pince" entre les atomes électonégatifs liés à un radical organique.[4]

CASEINE : Matière albuminoïde du lait obtenue par dissociation, après égouttage et lavage, de la caillebotte (masse de lait caillé) provenant de la coagulation du lait totalement écrémé.[18]

HEMOGLOBINE : Hétéroprotéine constituée d'une protéine ou globine et d'un groupement appelé hème contenant du fer. Constituant principale des globules rouges, elle assure le transport de l'oxygène des poumons vers les cellules des tissus.[4]

BIBLIOGRAPHIE

- [01] QUEBRIAC O. (1985). Valorisation du sang.
- [02] LECONTE D. (1987). Contribution à l'étude de la valorisation du cruor des abattoirs : Application de l'ultrafiltration à la préparation d'hydrolysats peptidiques à partir de l'hémoglobine bovine.
- [03] FODIL A. (1992). Hydrolyse enzymatique des déchets solides d'abattoirs.
- [04] NEGAZ Y. (1993). Optimisation de l'ultrafiltration du plasma sanguin d'abattoirs. Projet de fin d'étude (E.N.P.).
- [05] SCRIBAN R. (1984). Biotechnologie.
- [06] AUDIGRE Cl. (1985). Principes des méthodes d'analyse biochimiques : Analyse enzymatique. p. 156.
- [07] Hydrolyse enzymatique des déchets de poissonnerie (1989/1990). Projet de fin d'étude - Institut de Biologie - Tiz Ouzou.
- [08] COLLIN J.C. ; DELCOURT R. (1988). Actualité des industries alimentaires et agro-alimentaire (I.A.A.), à propos des méthodes d'analyse des enzymes applicables aux préparations enzymatiques industrielles.
- [09] PELMONT J. (1989). "Les enzymes" - Presse Universitaire de Grenoble.
- [10] Les enzymes : production et utilisation industrielle. (1982)
- [11] FIK M. ; SOROWRA C.K. (1984). Préparation and properties of protein con concentrate from boiler chicken reads. (Journal of science of food and agriculture).
- [12] BAWA A.S. ; ORR H.L. ; USBORNE W.R. (1985). Effect of ante mortem palain injection on the tenderness of spent white leghorn hens. (Journal of food science and technology).

- [13] CHIOUCR Y.Y. ; BEUCHAT L.R. ; PHILLIPS R.D. (1985). Functional and physical property characterization of peant milk proteins partrally hydrolysed by immobilized papaïn in a continuous reactor (Journal of agricultur and food chemistry).
- [14] REVUE : Biofutur. (1969). Structure et fonction des enzymes.
- [15] Cours de biochimie . (1993)
- [16] COSTES C. (1978). Elements de biochimie structurale. (Ed. DUNOD, Université Paris).
- [17] HARMANN. (1974). Biochimie.
- [18] AMROUCHE W.L. (1993). Utilisation de réacteurs discontinus enzymatiques combinée à l'utilisation lors du traitement d'un rejet solide de poissonnerie. (E.N.P.).
- [19] ABDI N. (1982). Elimination biologique des nitrates à l'aide des protéines du sang. Projet de fin d'étude.
- [20] ROBERT P. (1978). Dictionnaire de la langue française : "Le petit Robert".
- [21] HOULIER B. (1988). Récolte et traitement du sang des abattoirs - Description des procédés.
- [22] DELAITRE. (1983). Contribution à l'étude de la valorisation du sang bovin : Propriétés fonctionnelles des protéines plasmatiques et du cruor. Thèse 3° cycle ENSBANA Dijon. p.160. (C.D.I.U.P.A. n°194495).
- [23] FRENTZ J. ; PERBON P. (1971). Le sang et ses utilisations en charcuterie. Euroviande, n°64, p.p. 31-38. (C.D.I.U.P.A. n°31316).
- [24] TESSIER J.P. ; LOUVEAU V. (1978). Concentration du sang de boeuf defibriné ou additionné d'anticoagulants, du sérum et du plasma par ultrafiltration ou osmose inverse.

- [25] CHENNET Y. ; ICHALLAMENE N. (1992). Optimisation de l'ultrafiltration du plasma sanguin d'abattoirs. Projet de fin d'étude. Université des sciences et de la technologie Houari Boumediène, Institut des sciences et de nature.
- [26] DEHALLMONT R. ; GUSTAVE P. Problèmes posées par la valorisation du sang d'abattoir. Thèse doctorat vétérinaire.
- [27] TYBOR P.T. ; DICC C.N. ; LANDMANN W.A. (1973). Effects of decolorization and lactose incorporation of the emulsification capacity of spray dried blood protein concentrates - J. Food 38, 4-6.
- [28] WISMER-PEDERSEN J. (1979). Utilization of animal blood in meat products. Food technology, 33. n°8, p.p. 76-80. (C.D.I.U.P.A. n°134685).
- [29] DELANEY R. (1977). Protein concentrates from slaughter animal blood - Preparation and purification of red blood cell concentrates - Journal of food technology. 12 n°4, p.p. 339-354. (C.D.I.U.P.A. n°83/10).
- [30] OORD A.H.V.D ; WESTDORP J.J. (1979). Decoloration of slaughterhouse blood by treatment with hydrogen peroxide. Proc - 25th. European Meeting of Meat Reaserch Workers, Budapest, p.p. 10-7.
- [31] ANONYME NOVO INDUSTRIE A/S. (1979). Procédé de production d'une matière à base de sang pour produit alimentaire et matière ainsi produite. Brevet d'invention n°79 02940, du 05/02/1979, déposé en France.
- [32] TRAMBOUZE P. ; VAN LANDE GHEM H. ; WAUQUIER J.P. (1984). Les réacteurs chimiques : Conception / calcul / mise en oeuvre.
- [33] REVUE : Biofutur. (Nov.1987). Structure et fonction des protéines.