

2/96

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المكتبة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT DE GENIE ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS
SOLIDES D'ABATTOIRS

Proposé par :

Dr N.ABDI

Etudié par :

Amel Aouissi

Dirigé par :

Dr N.ABDI

PROMOTION

JUIN 1996

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE ECIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT DE GENIE ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS
SOLIDES D'ABATTOIRS

Proposé par :

Dr N.ABDI

Etudié par :

Amel Aouissi

Dirigé par :

Dr N.ABDI

PROMOTION

JUIN 1996

ملخص :

الهدف من هذا المشروع هو إسترجاع الأحماض الأمينية الموجودة في البروتينات عن طريق الإماهة الأنزيمية.

Résumé :

L'étude présentée dans ce mémoire, consiste en la récupération des acides aminés par hydrolyse enzymatique des protéines contenues dans les déchets solides d'abattoirs.

Abstract :

This study consists to recover amino-acides with enzymatic hydrolysis of proteins incomes from solid wastes products of abattoirs.

DEDICACES

A mes très chers parents

A Abderrahmane

A mes frères et soeurs

A ma belle mère

A ma cousine Malika

A Tous mes amis(es)

*Je dédie ce modeste travail en témoignage de mon
affection et mon amour.*

REMERCIEMENTS



Je profite de cette occasion, pour exprimer mes plus vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail, en particulier :

Mme Abdi ma promotrice, pour sa disponibilité et son aide précieuse

Mme Mameri pour son aide prodiguée tout au long de l'étude.

Melle Mokrane Hind post graduante à l'ENP pour m'avoir fait bénéficier de son savoir et m'avoir apporté aide, soutien et encouragements.

Mrs Lounici et Ghrib pour l'aide qu'ils m'ont apporté.

Je remercie les membres du jury :

- M^{lle} Zoghlech Président du jury
- Mr Abderrmed Examineur
- Melle Mokrane invité
- Mme Abdi Promotrice
- Mr Mameri Examineur

Je tiens à remercier aussi tous les étudiants de ma promotion.

De très profonds remerciements sont réservés à Mr Boumaout Abderrahmane qui ma le plus aidé jusqu'à la dernière seconde de préparation de ce mémoire.

SOMMAIRE

	Pages
Introduction	
A- Recherche bibliographique :	
I)- Etudes biochimique	2
I)-1- Les acides aminés	2
I)-1-1- Définition	2
I)-1-2- Absorbance des acides aminés dans le domaine U.V	3
I)-2- Les protéines	3
I)-2-1- Définition	3
I)-2-2- Structure des protéines	3
1)- Structure primaire	3
2)- Structure secondaire	3
3)- Structure tertiaire	4
4)- Structure quaternaire	4
I)-3- Les enzymes :	4
I)-3-1- Définition	4
I)-3-2- Structure	4
I)-3-3- Classification des enzymes	4
I)-4- Cinétique enzymatique à un seul substrat	7
I)-4-1- Théorie de Michaelis-Menten	8
I)-4-1-1- Activité de l'enzyme « V_{max} »	9
I)-4-1-2- Constante de Michaelis « K_m »	9
I)-4-1-3- Méthodes de détermination de K_m et V_{max}	9
I)-4-2- Variation de $P = f(t)$	11
I)-4-3- Variation de $V = f([E])$	11
I)-4-4- Influence des facteurs physique et physico-chimiques sur la cinétique enzymatique	12

I)-4-4-1- La température	12
I)-4-4-2- Action du pH	13
I)-4-4-3- Effecteurs d'enzymes : Les inhibiteurs	14
II)- Les rejets d'abattoirs	18
II)-1- Situation des abattoirs en Algérie	18
II)-2- Principaux procédés de <i>Traitements des rejets d'abattoirs</i>	
II)-2-1- Viandes et abats	19
II)-2-2- OS	21
II)-2-3- Sang	21
II)-3- Composition des rejets d'abattoirs après traitements	22
III)- Etudes Antérieures	23

B- Etude expérimentale :

I)- Détermination des conditions optimales d'activité de la pepsine commerciale	24
I)-1- Préparation des solutions de pepsine	24
I)-2- Détermination du pH optimal d'activité	24
I)-2-1- Mode opératoire	24
I)-2-2- Méthode d'analyse	25
I)-2-3- Résultats expérimentaux et interprétation	25
I)-3- Détermination de la température optimale d'activité de pepsine commerciale	27
I)-3-1- Mode opératoire	27
I)-3-2- Méthode d'analyse	27
I)-3-3- Résultats expérimentaux et interprétations	27
II)- Hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs	29
II)-1- Matériels	29
II)-2- Mode opératoire	29
II)-3- Méthode d'analyse	31
II)-4- Résultats expérimentaux et interprétation	31

III)- Etude de la cinétique enzymatique	34
III)-1- Matériels	34
III)-2- Méthodes d'analyse	34
III)-3- Résultats expérimentaux et interprétation	34
- Conclusion	41
- Bibliographie	

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les industries des viandes jouent un rôle important dans l'alimentation humaine. Actuellement, la production mondiale de viande s'élève à 120 millions de tonnes par an.

Cependant, cette production est loin d'être consacrée entièrement à l'alimentation humaine, des millions de tonnes/an de sous-produits d'abattage sont aussi produits.

Ces déchets d'abattoirs sont de nature organique pouvant être putréfiés et constituer ainsi un siège de prolifération de germes pathogènes et un abri aux animaux indésirables qui y trouvent leur nourriture et qui sont vecteurs de nombreuses maladies : les chiens peuvent transmettre la rage et le typhus, l'urine de ces derniers peut transmettre l'hépatite virale, les rats peuvent apporter la typhoïde, la salmonellose et la peste, les mouches peuvent causer le choléra et le trachome sans compter les liquides et les gaz nauséabonds entraînés par les processus de fermentation.

Indépendamment de ces nuisances qu'entraînent de tels rejets, on peut montrer une perte considérable des protéines animales et de divers autres produits valorisables. Ainsi tous les acides aminés obtenus par hydrolyse partielle du collagène contenu dans les OS, sont utilisés dans plusieurs industries, on peut citer à titre d'exemple : photographie, pharmacie, industries du papier..... Aussi, la peau de veau traitée est utilisée dans le domaine médicale: compresses antihémorragiques, poudres à usage chirurgical, pommades cicatrisantes. Sans oublier toutes les farines des sous-produits d'abattage destinées à l'alimentation animales.

Une meilleure valorisation de ces sous-produits pourrait cependant contribuer à la lutte contre la malnutrition dans certains pays du tiers monde. [13]

Même si l'utilisation des déchets d'abattoirs connaît déjà de multiples débouchés, cela n'empêche en rien la poursuite de l'effort de recherche dans le domaine de la valorisation de ces sous-produits, car ils présentent incontestablement beaucoup de potentialités encore inexploitées.

C'est d'ailleurs ^{un peu} dans ce cadre que vient s'inscrire notre travail, qui consiste en fait en une approche globale d'un procédé de valorisation des rejets solides d'abattoirs. Ce procédé est basé sur la récupération des acides aminés contenus dans les protéines, par une hydrolyse enzymatique.

RECHERCHE

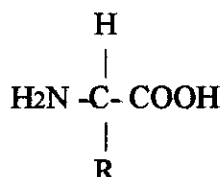
BIBLIOGRAPHIQUE

I- ETUDE BIOCHIMIQUE

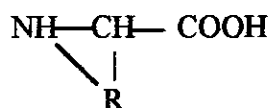
I-1 Les Acides Aminés

I-1-1- Définition :

L'hydrolyse chimique ou enzymatique des protéines, conduit à la formation d'acides aminés libres de structure générale :

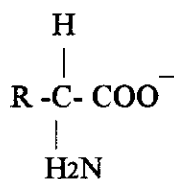


à l'exception de la proline qui est un acide aminé

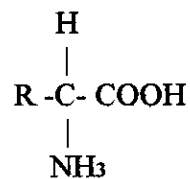


Les acides aminés ont donc en commun une fonction aminé primaire (sauf la proline) et une fonction carboxyle, portées l'une et l'autre par le carbone central. Cet atome de carbone est substitué par 4 éléments différents, sauf lorsque $\text{R} = \text{H}$, et est, par conséquent, asymétrique. La différence entre les acides aminés issus des protéine résulte des variations de R. Le nombre d'acides aminés d'origine protéique est égale à 20.

Les acides aminés possèdent à la fois des propriétés acide et basique, ce sont des composés amphotères.



en milieu basique



en milieu acide

Le pH pour le quel les 2 dissociations sont égales est appelé point isoélectrique et noté pH_i . A ce pH il se forme un uion mixte ou Zwitterion : $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{COO}$, de charge globale nulle.



I)-1-2- Absorbance des acides aminés dans le domaine UV :

Les acides aminés absorbent la lumière ultraviolette lointaine ($n < 190 \text{ nm}$) qui est une zone d'accès expérimentale difficile.

cependant, certains d'entre eux absorbent également dans l'ultraviolet moyen (entre 200 et 300 nm), ce sont les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalamine); ainsi que l'histidine et la méthionine. La région la plus utilisée est celle qui s'étend de 240 à 300 nm. L'absorption varie avec la longueur d'onde n .

I-2 Les Protéines

I-2-1- Définition :

Les protéines sont des enchaînements d'acides aminés dont les groupes - aminé et carboxyle sont seuls engagés dans la chaîne polypeptidique. La diversité infinie des protéines provient du nombre d'acides aminés accolés l'un après l'autre et de l'ordre de leur enchaînement. C'est un édifice compact de structure définie. Le rôle biologique d'une molécule de protéine est étroitement dépendant de cette organisation [1].

I-2-2- Structure

1- Structure primaire :

Cette structure indique la composition ainsi que le mode d'agencement des acides aminés dans la protéine.

2- Structure secondaire :

Deux type d'organisations sont observés :

a) La structure en feuillet B :

elle est caractérisée par une extension maximale des chaînes polypeptidiques, compte tenu des angles de liaisons entre les différents atomes constituant ces chaînes.

b) La structure en hélice :

Elle est caractérisée par un enroulement hélicoïdale de la chaîne polypeptidique à raison de 3.6 aminoacides par tour d'hélice.

3- Structure tertiaire :

Les chaînes polypeptidiques peuvent adopter une configuration plus compacte dans l'espace. Ce repliement est régi par des interactions entre chaînes latérales d'acides aminés, notamment entre deux motifs cystéine, format ainsi des liaisons bisulfures.

4- Structure quaternaire :

Les protéines les plus complexes résultent de l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques ayant leur structure propre, l'association plurimoléculaire étant stabilisée par des liaisons généralement faibles, les sous unités pouvant être identiques entre elles ou différentes.

I-3- Les Enzymes

I-3-1- Définitions :

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique complexe. Ces molécules protéiques catalysent les innombrables réactions du métabolisme chez les êtres vivants. Elles possèdent des groupements fonctionnels aux niveaux desquels s'effectuent la transformation et le transfert des substances.

I-3-2- Structure :

La nature des enzymes n'est connue que depuis peu de temps. C'est en 1922 qu'on a établi que les enzymes étaient des protéines. Elles sont divisées en deux catégories :

- * enzymes entièrement protéiques
- * enzymes formées de deux parties : une partie protéique appelée apoenzyme et une partie non protéique appelée coenzyme.

Les enzymes sont des protéines globulaires, le repli de la chaîne en pelote détermine le site actif.

I-3-3- Classification des enzymes :

Chaque enzyme est responsable d'une réaction donnée. Du point de vue terminologique, leur nom se termine en général par le suffixe « ase ». Généralement, les enzymes portent le nom du produit sur lequel elles agissent et le nom de la réaction dans laquelle elles interviennent, exp : lactico-deshydrogénase, agit en deshydrogénisant l'acide lactique.

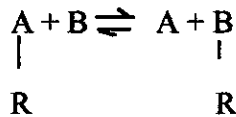
Une classification a été proposée par la commission des enzymes de l'U.I.B [union internationale de Biochimie] en 1961. Cette classification comporte six classe principales, selon la nature des réactions : [2]

1- Les oxydoréductases :

Elles catalysent les réactions d'oxydoréduction. L'oxydation correspond à une perte d'un ou plusieurs électrons. Exp : glucose oxydase.

2- Les transférases :

Dans ces réactions, un groupe fonctionnel se déplace d'une molécule à une autre :



3- Les hydrolases :

Catalysent les réactions d'hydrolyse avec fixation d'une molécule d'H₂O. La liaison libéré peut être située entre 2 Carbones ou entre un atome de Carbone et d'Azote

4- Les lyases :

Catalysent les réactions permettant le déplacement d'un groupement sur le substrat avec apparition d'une double liaison.

5- Les isomérases :

Catalysent le réarrangement intramoléculaire. Exp : les racemases.

6- Les ligases ou synthétases :

Catalysent les rections de synthèses qui utilisent essentiellement l'ATP comme source d'énergie.

7- Péptidases et protéases :

Cette classes 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. Exp : pepsine : elle se rencontre dans le système digestif de nombreux animaux (estomac). Son pH optimal est très bas, compris entre 1 et 2. Elle participe à l'activité de0 la présure. La pepsine est l'enzyme utilisée lors de cette étude. [3]

I-4- CINETIQUE ENZYMATIQUE A UN SEUL SUBSTRAT

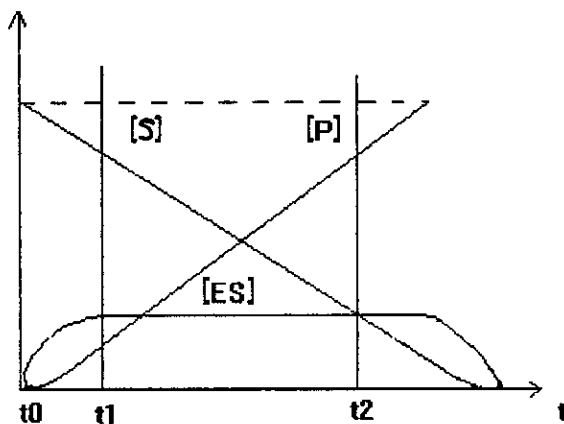
Lorsqu'une enzyme est mise en présence de son substrat, la combinaison enzyme-substrat est rapide. Cette étape initiale est appelée « Phase pré - stationnaire », sa durée est de l'ordre de la milliseconde. A la fin de cette étape, commence la phase stationnaire, pendant laquelle, l'enzyme est saturée par son substrat, et la combinaison enzyme-substrat est à concentration constante et maximale, et durant laquelle la vitesse de la réaction est constante et répond à une cinétique d'ordre nul. Cette vitesse dite initiale et caractéristique de la phase stationnaire, elle maintient sa constance de tant que le substrat est à concentration saturante de l'enzyme. Dès que la concentration diminue de manière significative la vitesse de réaction décroît et l'on entre dans la phase « post-stationnaire » (voir figure) (1).

La vitesse d'une réaction enzymatique s'exprime par la quantité de substrat (dx) métabolisée pendant l'unité de temps (dt) :

$$V = dx / dt$$

cette vitesse dépend de :

- la concentration de l'enzyme [E]
- La concentration du substrat [S]
- l'affinité de l'enzyme pour le substrat.



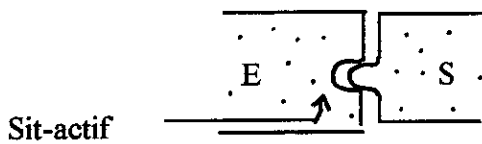
$t_0 \rightarrow t_1$ O pré - stationnaire
 $t_1 \rightarrow t_2$ O stationnaire
 $t_2 \rightarrow t$ O post - stationnaire
[ES] : concentration de la
combinaison [F.S]

fig 1 : Evolution des concentration [S],[P],[ES] en fonction du temps

I-4-1 : THEORIE DE MICHAELIS - MENTEN

La cinétique enzymatique selon Michaelis et Menten, est basée, sur 3 hypothèses qui ont été vérifiées expérimentalement :

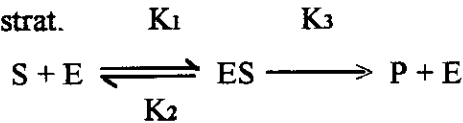
1)- L'enzyme, pour exercer son pouvoir catalytique, forme avec le substrat une combinaison transitoire, la formation d'un tel complexe résulte de l'existence d'une affinité entre l'enzyme et le substrat. Cette affinité consiste en une complémentarité structurale stéréospécifique entre le substrat et un élément de surface de l'enzyme : le sit - actif.



2)- Le complexe formé entre l'enzyme et le substrat est réversible.

3)- La vitesse de la réaction enzymatique, c'est à dire la quantité de produits formés par unité de temps, est proportionnelle à la concentration du complexe [ES].

Soit le modèle simplifié d'une réaction enzymatique à un substrat, et un complexe enzyme substrat.



E : enzyme S : substrat ES : complexe enzyme - substrat
 P : produit de la réaction enzymatique.
 K₁, K₂, K₃ : constantes de vitesse.

En se basant sur ce schéma, la vitesse de la réaction exprimée par la relation de Michaelis et Mentent est :

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

avec : V_{max} : Vitesse maximale

K_m : constante de Michaelis

Le tracé de la courbe $V = f([S])$ est représenté sur la figure 2

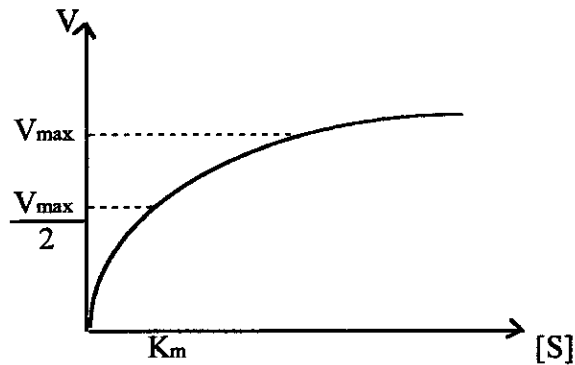


Fig 2 : Représentation de $V = f([S])$

I-4-1-1- Activité de l'enzyme « V_{max} »

C'est la vitesse initiale maximale d'une réaction enzymatique à concentration « saturante » de substrat.

$$V \longrightarrow V_{max} \text{ quand } [S] \longrightarrow$$

L'activité de l'enzyme est proportionnelle à sa concentration : mais pour une concentration d'enzyme donnée, elle varie avec la nature du substrat et dépend de la température et du pH.

I-4-1-2- Constante de Michaelis « K_m »

Dans l'équation de Michaelis, K_m est la quantité de substrat qui dans le milieu, permet à l'enzyme de procéder à la vitesse $V_{max} / 2$. Elle est en fait la constante d'affinité.

I-3-1-3- Méthodes de détermination de K_m et V_{max}

K_m et V_{max} sont extrapolées, à partir des transformations suivantes de l'équation de Michaelis :

1)- Représentation d'Eadie :

$$V = V_{max} - K_m \frac{V}{[S]} \quad [1]$$

2)- Représentation de Line Weaver et Burk :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \quad [2]$$

3)- Représentation de Woolf

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} [S] \quad [3]$$

Toute fois, la représentation le Line Weaver et Burk est la plus utilisée, car elle permet d'obtenir une linéarité apparente satisfaisante pour l'opérateur.

en effet :

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

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

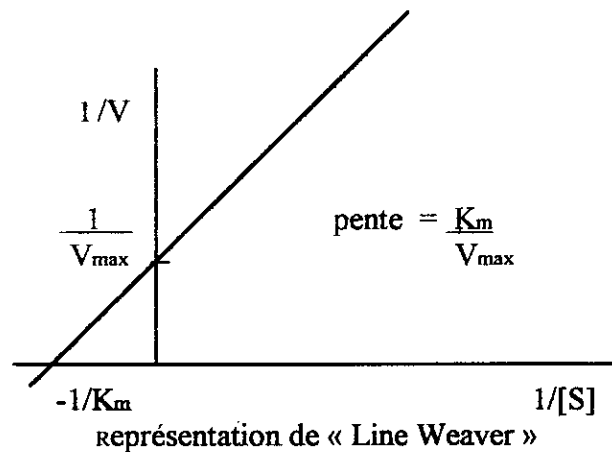
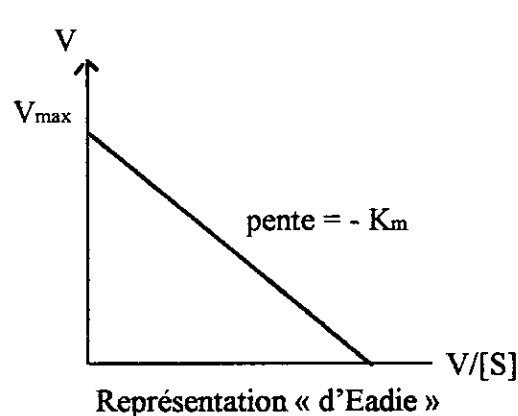
avec : $Y = \frac{1}{V}$ et $X = \frac{1}{[S]}$ [1]

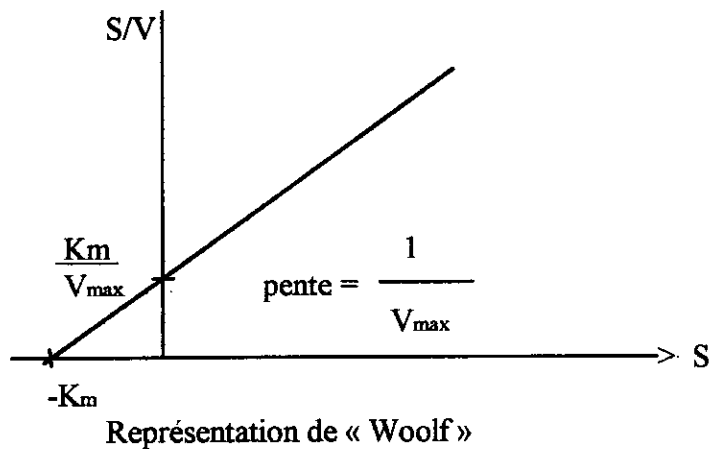
pour $\frac{1}{[S]} = 0$, nous avons $\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}}$ et pour $\frac{1}{V} = 0$

nous avons $\frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_m}$

Il devient alors aisé de déterminer graphiquement $\frac{1}{V_{\max}}$ et $\frac{1}{K_m}$

et la pente de la droite est $\frac{K_m}{V_{\max}}$





I-4-2- Variation de p = f(t)

Dans des conditions expérimentales définies : concentrations de S et de E, température et de pH, le suivi de la réaction enzymatique est possible par le dosage régulier du produit P formé, on obtient la courbe 3

Celle ci est d'abord rectiligne et les vitesses sont constantes. Ensuite, elle atteint un plateau, lorsque le substrat est totalement transformé, traduisant une diminution de la vitesse.

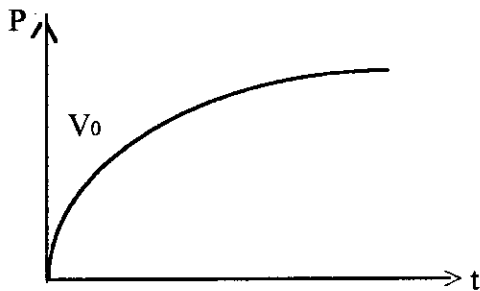


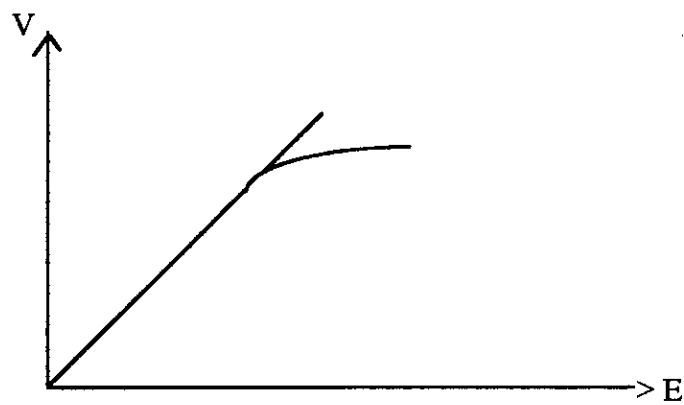
fig 3 : p = f(t)

I-4-3- 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 $E \ll S_0$. 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.

Avant toute détermination des paramètres cinétiques, il est important d'étudier les variations de la vitesse en fonction de la concentration d'enzyme celle-ci doit correspondre à la partie linéaire de la courbe $V = f(E)$, l'équation de la vitesse n'est applicable que dans ces conditions.



intervalle de concentration où s'applique l'équation de vitesse

fig 3.4 : Loi de variation de la vitesse avec la concentration d'enzyme. [5]

En présence d'un excès de substrat la proportionnalité entre la vitesse de la réaction et la concentration d'enzyme est réalisée.

I-4-4- INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

I-4-4-1- La température

La température influe fortement sur la réaction enzymatique. La vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la température selon la loi d'Arrhénius. Cette augmentation est limitée, par l'action dénaturante de la température sur la protéine enzymatique. Une température optimale existe pour la quelle la stabilité et l'activité de l'enzyme sont maximales. Elle est un compromis entre les deux phénomènes : Loi d'Arrhénius et dénaturation thermique.

Sa valeur dépend de la durée, de la réaction enzymatique [5]

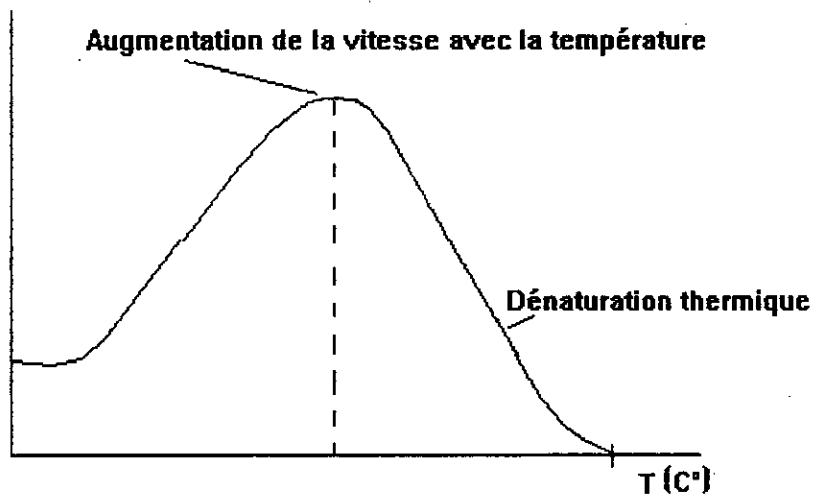


Fig 5 : Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique avec la température

1-4-4-2 : Action du pH

L'activité d'une enzyme varie avec le pH, l'étude des variations de l'activité enzymatique en fonction du pH permet de constater l'existence de deux pH limités au delà des quels l'action est nulle. Entre ces deux pH, l'activité présente un maximum à un pH bien défini dans ces conditions particulières, dit pH optimal (fig 6). La valeur du pH optimal dépend de la nature du substrat et de l'enzyme.

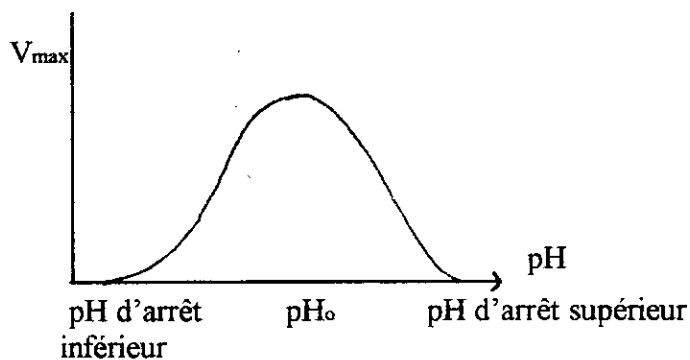


fig 3.6 : Courbe de variation de l'action d'une enzyme en fonction du pH. [8]

I-4-4-3- EFFECTEURS D'ENZYMES : les inhibiteurs

Il s'est avéré que dans des milieux complexes, des phénomènes d'inhibitions perturbent la cinétique. Les inhibiteurs sont des agents chimiques capables de diminuer la vitesse de la réaction enzymatique. Selon la nature de l'inhibiteur, on distingue différents types d'inhibitions :

a) Inhibition compétitive :

Les inhibiteurs compétitifs sont des molécules inactives, mais qui par leurs structures moléculaires sont assez sensibles pour occuper la place du substrat sur l'enzyme.

La loi de vitesse transformée selon Line Weaver et Burk est :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{[S]} \cdot \frac{k_m}{V_{max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] + \frac{1}{V_{max}}$$

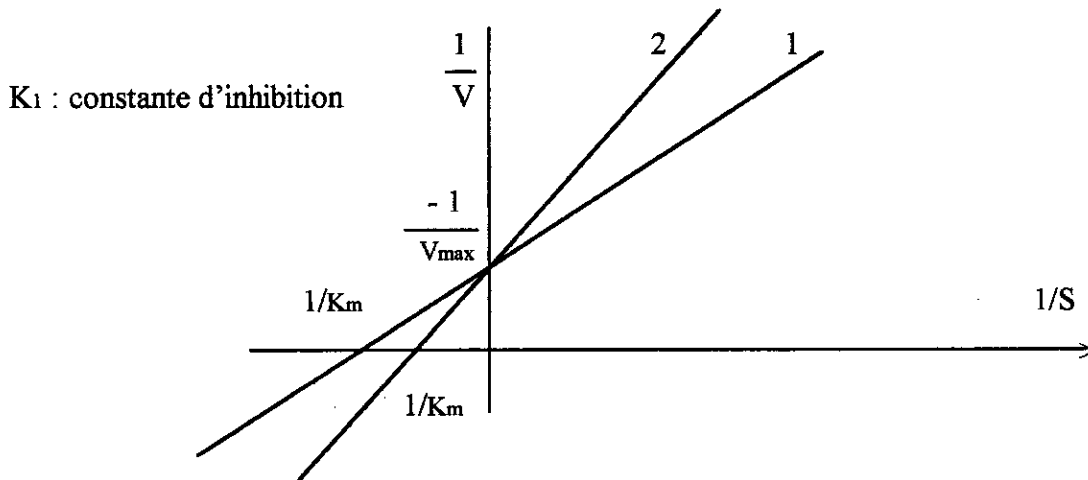


fig : 7 : Représentation selon lin Weaver et Burk d'une inhibition compétitive.

1 sans inhibition $[I] = 0$
 2 avec inhibition $[I]$

b)- Inhibition non compétitive :

Ce type d'inhibition conduit à la formation des complexes « ES » « IS », par fixation de l'inhibiteur non compétitif sur l'enzyme sans empêcher la fixation du substrat, ceci revient à dire que les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont différents.

La loi de vitesse transformée selon Line Weaver et Burk est donnée par :

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

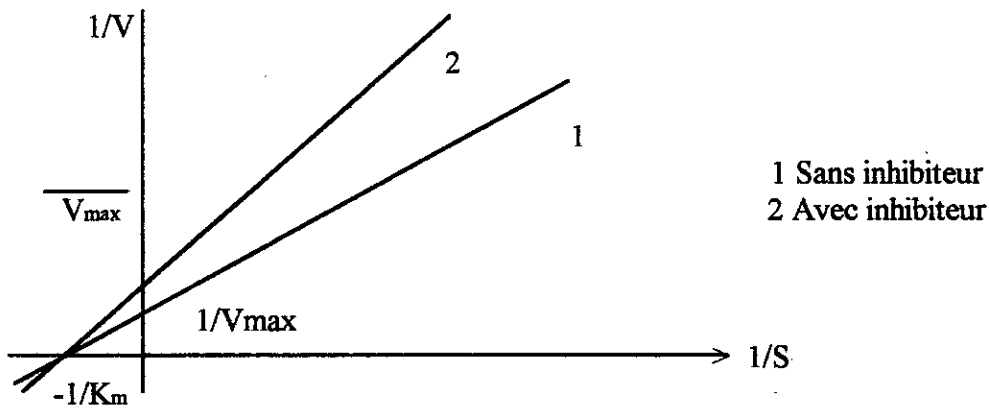


fig : 8 : Représentation selon Line Weaner et Burk d'une inhibition non compétitive

C)- Inhibition incompétitive :

L'inhibition incompétitive comporte la formation du complexe ternaire inactif « ESI ».

L'inhibiteur ne s'associe, qu'une fois le complexe ES formé.

La loi de vitesse transformée selon, Line Weaver et Burk est :

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

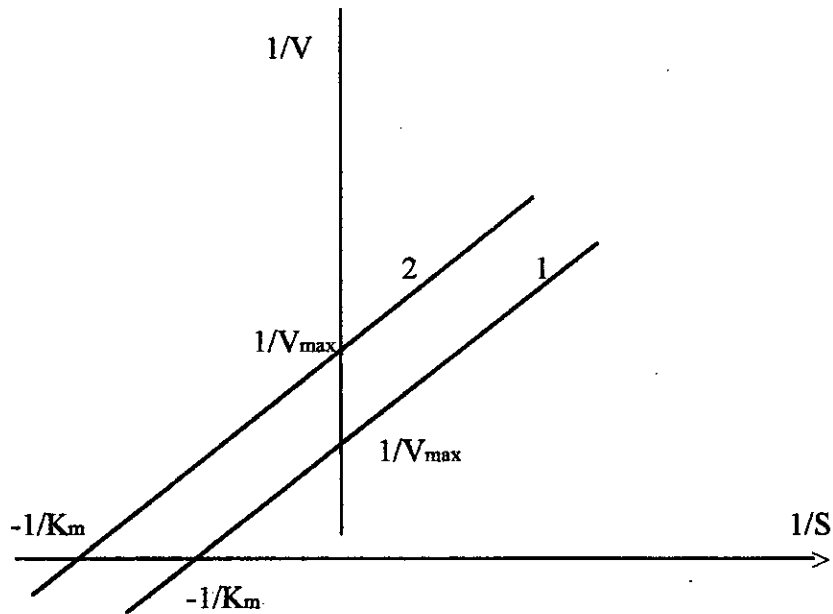
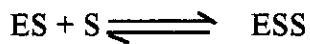


fig : 9 : Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition incompétitive

- 1 sans inhibiteur [I] = 0
- 2 avec inhibiteur [I] [9]

d)- Inhibition par le substrat :

Les phénomènes régissant le phénomène sont les suivantes :



Une deuxième molécule de substrat se fixe sur le complexe ES et le rend inactif, dans ce cas, la vitesse de la réaction enzymatique a tendance de diminuer.

Selon Line Weaver et Burk, elle est déterminée par :

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

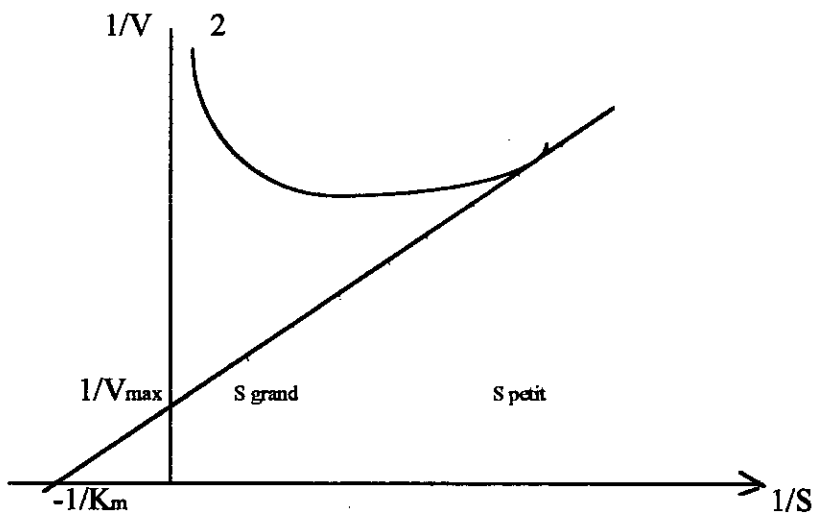


fig 10 : Représentation selon Line Weaver et Burk d'une inhibition par le substrat.
 1 sans inhibiteur $[I] = 0$
 2 avec inhibiteur $[I]$

II)- LES REJETS D'ABATTOIRS :

II-1- Situation des abattoirs en Algérie

En, Algérie, malgré les grandes ressources de protéines qu'offrent les sous-produits d'abattage, nos abattoirs continuent à rejeter dans les décharges le sang et une grande partie des déchets solides.

A présent, il n'y a que l'ORIVIC et la SONATRACH qui récupèrent une petite quantité des os et des carcasses de saisis, dans le but de fabriquer la farine de viande pour l'alimentation du bétail. L'autre partie est rejetée sans être traitée, et on continue à importer du concentré alimentaire pour les animaux.

Si cette mine de protéines n'est pas récupérée, outre la perte économique, la nature est exposée à un grand danger de pollution : 1l de sang répandu dans le milieu naturel, entraîne une pollution égale à celle causée par deux ou trois habitants par jour [10]. Lorsque le sang n'est pas récupéré, il présente environ 56 % de la pollution rejetée par les abattoirs, sachant sur tout que le sang de boeuf possède une DBO₅ comprise entre 140 et 1.67 g/l, sa composition élémentaire moyenne est exprimée dans le tableau N° 1 [10]

COMPOSANTS	%
Eau	80.5
Matières protéiques	17.8
Matières grasses	0.13
Matières minérales	0.865
Extractif non azoté	0.065

Les industries de viandes restent ainsi, la branche industrielle la plus polluante. Il est donc dans l'intérêt de l'état, de concerter avec les professionnels, les instructions techniques concernant la prévention de cette pollution, pour mettre au point des règles techniques qui doivent être appliquées, sachant qu'aucun abattoir Algérien n'est doté de normes d'hygiène ou de laboratoire.

Les seules informations qui ont été recueillies concernant les abattoirs d'Hussein Dey et d'El Harrach, sont résumées dans le tableau N° 2 :

Tableau N° 2 : Les principales caractéristiques des abattoirs d'Hussein-Dey et d'El-Harrach

Caractéristiques	Hussein-Dey		El-Harrach	
capacité d'abattage/J	8000	10000	2000	5000
nbr de bêtes abbatues/J	1000	4000	500	1200
nbr de salle d'abattage	2		1	
quantité de sang moyenne/tête	12 l		12 l	
Kg de DBO ₅ /J	1842	1368	921	2270.4

II-2- PRINCIPAUX PROCÉDES DE TRAITEMENT DES REJETS D'ABATTOIRS

II-2-1- Viandes et abats

Les viandes et abats saisis, ainsi que les cadavres trouvés sur le territoire de l'abattoir, peuvent être traités selon trois procédés dont le choix dépend de la valeur commerciale accordée aux produits finis.

Avant tout traitement, les cadavres que la loi n'interdit pas de manipuler de la sorte, sont dépouillés et privés de leurs production cornée, ils sont alors éviscérés et le contenu des réservoirs digestif est éliminé vers d'autres secteurs d'utilisation.

1- Procédé thermique par voie humide :

Les matières premières sont introduites dans un premier appareil appelé « cuiseur » ou « extracteur » à double enveloppe de vapeur après 3 ou 4 heures, la cuisson est terminée. L'autoclave contient à ce moment de la viande et des os cuits, des graisses et du bouillon gélatineux. On procède alors à la décantation des parties liquides qui vont à un séparateur de graisses puis à un concentrateur de bouillon chauffé.

Le résidu solide sera desséché, pendant 3 à 4 heures. Par ce procédé, on obtient une graisse claire, presque inodore et de la farine de viande qu'il faut broyer.

2- Procédé thermique par voie sèche :

Ce dispositif est basé sur la cuisson des matières premières sans introduction de vapeur, la durée de cuisson est de 2.5 à 3 heures. Après séchage, la graisse est décantée et la farine de viande est récupérée sous forme d'un gâteau qu'on passe dans un broyeur.

Par voie sèche on obtient une graisse de teinte variable, difficile à clarifier, mais la farine de viande est plus sèche et renferme moins de matières grasses.

3- Procédé thermochimique :

La matière première est soumise à l'épuisement à 120-130 °C, en circuit fermé par un solvant des graisses, la durée est de 6 à 8 l'heures à la fin de l'extraction, le résident est séché dans un sécheur spécial.

La farine de viande ainsi obtenue est d'une belle teinte jaune est ne contient presque pas de graisse (3 . 4 %).

la figure N° 11, représente le procédé de fabrication de la farine de viande.

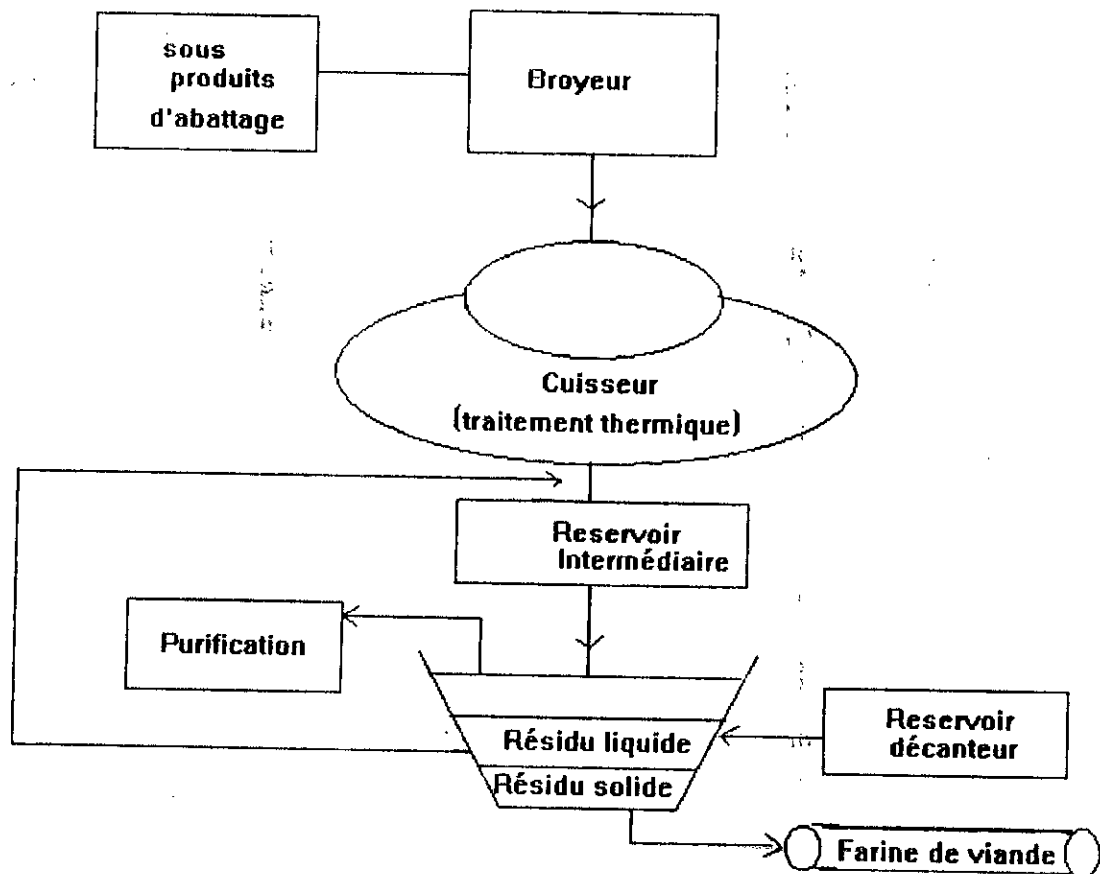


Fig N° 11 : Procédé de fabrication de la farine de viande

II-2-2- **OS** :

Les os longs à moelle susceptibles de fournir une grande quantité de graisse sont réservés à l'industrie de tabletterie, après extraction de la graisse.

Toutes les autres pièces osseuses une fois grossièrement fragmentées sont soumises soit au traitement thermique, soit à l'attaque acide pour la fabrication de gélatine.

II-2-3- **Sang** :

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

Tableau N° 3 : Procédés de traitements du sang

Type de traitement	Destination
- Déshydratation	Farine de sang pour aliments du bétail
- Atomisation	Farine de sang pour aliments du bétail
- Flocculation - centrifugation	Farine de protéine pour aliments du bétail
- Centrifugation - atomisation	Poudre de plasma pour l'alimentation humaine
- Congélation	Produits pharmaceutiques et cosmétologiques
- Traitements au laboratoire	Produits pharmaceutiques et vétérinaires

II-3- COMPOSITION DES REJETS D'ABATTOIRS APRES TRAITEMENT :

Après traitement, les déchets d'abattoirs ont une valeur nutritive appréciables. Les teneurs en matières protéiques sont très variables d'un sous-produit à un autre. On peut considérer que les pourcentages des matières protéiques sont tous trop élevés.

Le tableau N° 4 Donne la composition de quelques sous produits d'abattoirs

Tableau N° 4 : [12]

Composition	Farine de viande	farine de viande osseuse	Farine de sang
Humidité %	4.95	4.6	7.1
Matières protéiques %	46.07	33.6	82.4
Lipides %	11.01	11.8	0.52
Matières minérales %	26.74	45.8	3.05

Le tableau N° 5 montre la variation du taux des acides aminés en fonction du taux de protéines brutes contenus dans les farines de viandes.

Tableau N° 5: Teneur en acides aminés des farines de viandes selon leur taux de protéines brutes

(d'après Pritchard et Smith) [12]

Acides-aminés	Teneurs en matière protéiques brutes			
	45 %	50 %	55 %	64 %
Arginine	2.00	2.38	3.44	4.30
Histidine	1.22	1.49	1.62	1.86
Lysine	3.96	4.58	4.58	6.33
Tyrosine	1.20	1.40	1.20	1.04
Tryptophane	0.21	0.18	0.24	0.39
Phénylalanine	2.33	2.68	2.69	2.70
Cystéine	0.48	0.48	0.44	0.28
Méthionne	0.79	0.88	1.17	1.00
Thréonine	1.76	1.92	2.00	2.36
Leucine	2.15	2.50	2.92	4.00
Valine	2.49	2.00	1.78	2.24

III- ETUDES ANTERIEURS :

Au cours des 20 dernières années, les déchets d'abattoirs ont fait l'objet de plusieurs études. L'effort de recherche dans le domaine de la valorisation de ces sous-produits est poursuivi, cependant, nous pouvons citer quelques études.

* NOVO Industrie, en 1981, a été la première à mettre en oeuvre une hydrolyse enzymatique du sang animal, en utilisant comme enzyme, l'acalase 0.6 L, ils ont travaillé aux conditions opératoires suivantes : température = 55 °C, pH = 8.5 enzyme, substrat = 4 % [33].

* BRESSOLIER et PETIT ont fait une hydrolyse enzymatique du plasma sanguin en 1988, couplée à une ultra filtration. L'enzyme utilisée est l'acalase 0.6 l, ils ont travaillé aux conditions opératoires suivantes : températures = 45 °C, pH = 7.5, concentration = 0.126 g/l. Les valeurs de K_m et V_{max} trouvées sont 7.4 g/l et 0.53 g/l nim (resp).

* REGENER J; 1983 ; a fait une décoloration enzymatique du cruor sanguin d'abattoir [29]

* GUIRRA : 1991 : a fait une étude microbiologique ainsi qu'une hydrolyse enzymatique, des déchets solides d'abattoirs, l'enzyme utilisée est la pepsine brute. Il a montré que les conditions opératoires optimales sont : température = 50 °C, pH = 1 [34].

* FOUJIL A 1992 : a étudié l'hydrolyse enzymatique des déchets solides d'abattoirs, en simulant la digestion qui consiste en une hydrolyse acide avec la pepsine suivie d'une hydrolyse basique avec la pancréatine. Il a montré que la vitesse optimale de l'hydrolyse acide avait lieu à une température de 48 °C et un pH = 1, la pancréatine a donné les conditions optimales suivantes température = 50 °C, pH = 8.5

Le rendement de l'hydrolyse était assez faible 11 %, cela est dû à la technique de dosage utilisée qui n'était pas adéquate.

* KRZYSTOF SUROWKA : a étudié l'hydrolyse enzymatique, des têtes de poulets. L'enzyme utilisée est la neutrase sécrétée par bacillus subtilis. Il a montré que la vitesse optimale de l'hydrolyse, avait lieu à une température de 55 °C et un pH de 7, et que le meilleur rapport enzyme/substrat était de 0.2 % [32].

ETUDE

EXPERIMENTALE

**DETERMINATION DES
CONDITIONS OPTIMALES
D'ACTIVITE DE LA PEPSINE**

I)- DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITE DE LA PEPSINE COMMERCIALE :

Dans ce chapitre, nous nous proposons de vérifier les conditions optimales d'activité de la pepsine commerciale données par le fabricant, dans le but de bien mener l'opération d'hydrolyse et d'obtenir le meilleur rendement possible.

Pour cela, les essais d'activité se feront sur une protéine standard : la BSA (Bovin Serum Albumine).

I-1- Préparation des solutions de pepsine :

L'enzyme utilisée, est la pepsine commerciale fabriquée par les laboratoires SIGMA à partir de muqueuses d'estomac de porc.

Les solutions de pepsine sont préparées de la manière suivantes :

On pèse une quantité de pepsine commerciale voulue et on la dilue dans 100 ml d'Hcl 0.01 N. Le mélange est homogénéisé par agitation magnétique durant quelques minutes. On poursuit alors l'agitation, en ajustant le pH de la solution à la valeur voulue, à l'aide d'une solution d'Hcl concentrée.

Ces solutions seront conservées à 4 °C

I-2- Détermination du pH optimal d'activité :

Cette recherche servira d'une part à déterminer le pH optimal d'activité et d'une part, à tester la stabilité de notre enzyme à différents pH.

Pour cela, nous avons préparé 4 solutions de pepsine selon le mode opératoire précité en choisissant les pH d'activité suivant :

1/1.5/2/2.5 . Cette gamme de pH a été choisi de façon à bien encadrer la valeur du pH optimal indiqué par le fabricant, cette dernière étant égale à 2.

I-2-1- Mode opératoire : [17]

On utilise une solution de B.S.A à 2.5 % dont le pH est égal à celui de la solution d'enzyme.

On prélevé 4 ml de cette dernière dans un tube à essai, on ajoute 1 ml de BSA, parès homogénéisation, on incube pendant 10 minutes.

Une fois ce temps écoulé, on arrête la réaction à l'aide de 6 ml de T.C.A (acide trichloroacétique) à 4 % . Après 5 ou 10 minutes, le contenu du tube à essai est alors filtré à travers un papier Watmanu N° 6 . On renouvelé les tests pendant 8 ou 10 jours à température ambiante.

I-2-2- Méthode d'analyse :

Dans notre étude, nous dosons les peptides et acides aminés en ultra-violet à 280 nm. Les résultats obtenus, serviront au tracé les courbes de variation de l'absorbance en fonction du temps et ceci pour chaque pH testé. Ainsi nous pourrons déterminer le pH optimal d'activité de la pepsine et étudier la stabilité des solutions d'enzyme.

REMARQUES :

1)- Le TCA à la propriété de coaguler les protéines non hydrolysées et de solubiliser les peptides et les acides aminés [31].

2)- La longueur d'onde 280 nm est spécifique aux acides aminés aromatiques (typtophane, tyrosine, phénylalanine), ainsi qu'à l'hystidine et la méthionine. [1]

I-2-3- Résultats expérimentaux et interprétation :

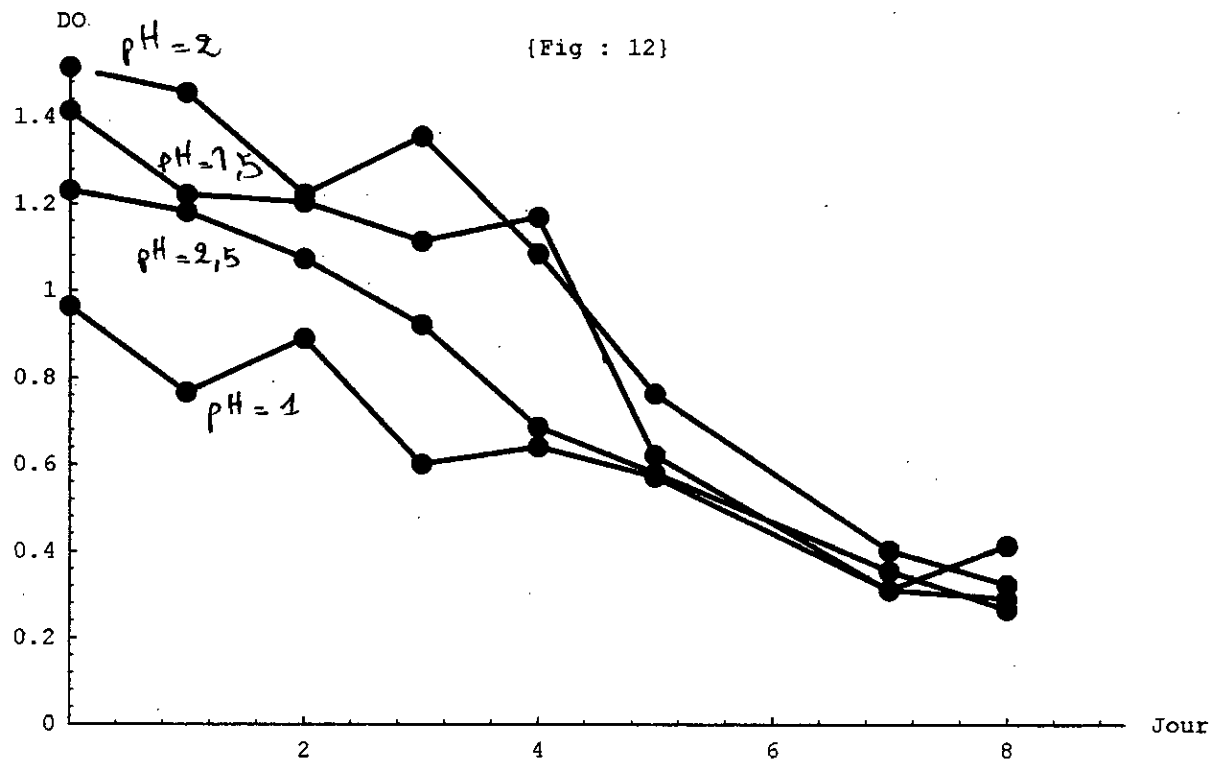
L'évolution de l'absorbance en fonction du temps pour les différents pH d'activité, est illustrée par la figure N° (12), sur laquelle, nous voyons bien que la solution d'enzyme à pH = 2, possède la meilleure absorbance pendant presque toute la durée de conservation. Nous constatons également que l'activité de l'enzyme est maximale au départ (sans conservation) pour toutes les solutions.

Cependant, les solutions d'enzymes préparées aux pH = 2.5 et 1.5, présentent des activités plus ou moins proches de celles de la solution préparée à pH = 2, comparées à celle de pH = 1 qui donne les plus basses absorbances, l'enzymes n'est peut être pas active à ce pH.

Nous remarquons aussi, que l'activité de l'enzyme reste pratiquement constante pendant les 3 premières jours, pour qu'après le 4ème, elle chute de la moitié de sa valeur initiale, et à partir du 7ème jour, l'enzyme, n'est plus active d'ailleurs, les 4 solutions présentent à peu près les mêmes activités parés ce jour.

Ainsi, nous pouvons confirmer la valeur du pH donnée par le fabriquant, qui est « pH=2 ».

Nous pouvons dire aussi, qu'une meilleur utilisation de la pepsine commerciale, serait préférable pendant les 3 premières jours.



« Évolution de la densité optique en fonction des temps »
de conservation

I-3 DETREMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTIVITE DE LA PEPSINE COMMERCIALE :

Dans cette partie, nous travaillerons avec une solution d'enzyme à pH = 2.

La gamme de température choisie est : 15,20,25,30,40,45,50,55,60,65 °C . Cette dernière a été choisie aussi large que possible, de façon à bien localiser la T° optimale. Pour cela, nous utilisons un bain-marie thermostaté pour fixer la température voulue.

La température optimale donnée par le fabricant est de 37 °C.

I-3-1 Mode opératoire :

Pour chaque température, on prend deux tubes à essai, l'un contenant 4 ml de la solution d'enzyme, l'autre contenant 1 ml de B.S.A à 2.5 % . Ces deux tubes sont plongés dans le bain-marie et lorsque les deux solutions atteignent la température souhaitée, on les mélange et on homogénéise. Après 10 minutes d'incubation, on introduit dans le tube à essai 6 ml de TCA à 4 % . et on attend 10 autres minutes. On filtre le contenu du tube à essai à travers un papier Watmann N° 6.

I-3-2 Méthode d'analyse :

La méthode d'analyse est la même que celle utilisée dans la partie précédente. Nous suivons l'évolution de la densité optique en fonction de la température, nous déterminons la température optimale d'activité de la pepsine commerciale.

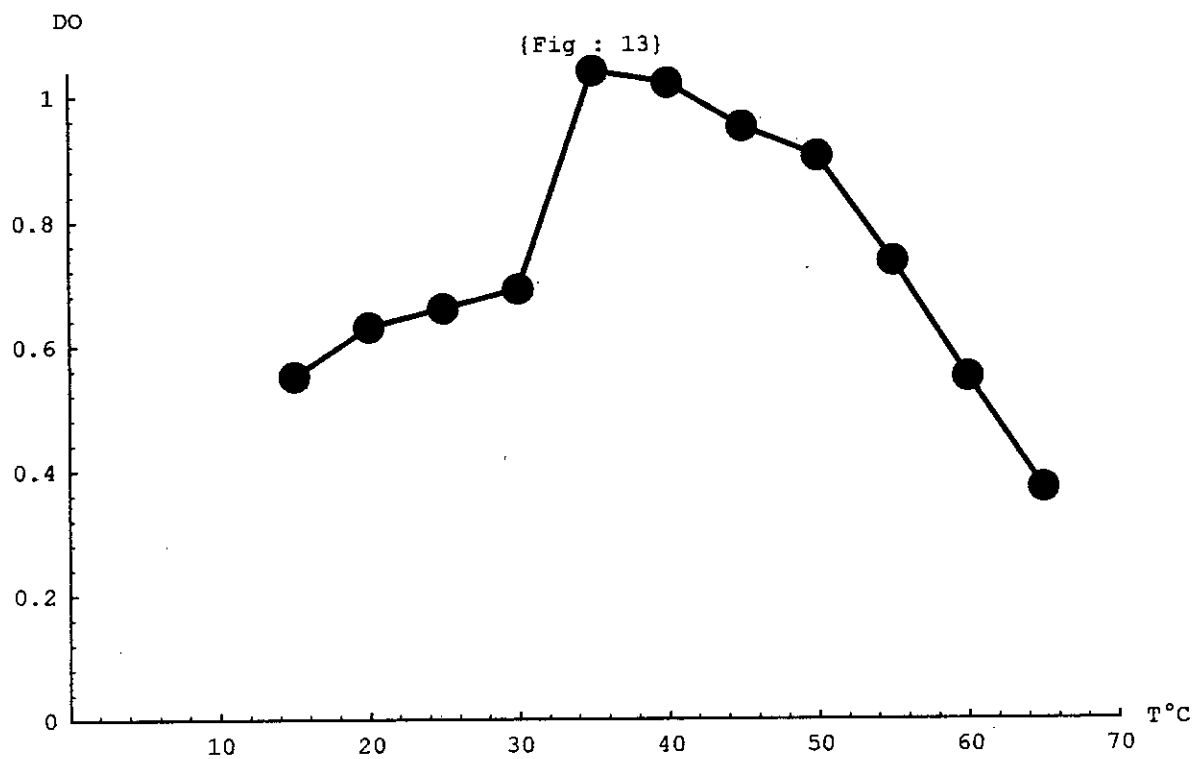
I-3-3 Résultats expérimentaux et interprétation :

La variation de l'absorbance en fonction de la température est représentée dans la figure (13).

Nous constatons que dans la gamme de température comprise entre 35 et 50 °C, l'activité enzymatique est importante et atteint son maximum à 35 °C . Entre 25 et 30 °C, son activité est moyenne, cependant à partir de 55 °C, l'activité tend à diminuer rapidement, cela est dû à la dénaturation thermique de l'enzyme.

Par ailleurs, si nous comparons notre résultats à ceux trouvés dans les études antérieures

- O.Gaouar et S.Fenour (1991) ont trouvé un domaine de température optimal
T = 30 - 60 °C.
- Ben Habiles a trouvé une T optimale = 37 °C , nos résultats concordent bien avec les travaux précédents et à la valeur indiquée par le fabricant.



“Évolution de la densité optique en fonction de la température”

pH = 2

**HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES
REJETS SOLIDES D'ABATTOIRS**

II- HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS SOLIDES D'ABATTOIRS :

dans le cadre de ce travail, nous nous proposons d'étudier l'hydrolyse enzymatique des déchets solides d'abattoirs. Nous utilisons une enzyme commerciale, la pepsine.

Notre échantillon est un rejet composé d'os et d'intestins, ces composants sont récupérés juste après avoir égorger un mouton, ensuite séchés à 70 °C pendant 24 heures; il sont alors broyés au moyen d'un broyeur et réduit à l'état de poudre.

Le broyat ainsi obtenu est conservé au congélateur. Nous travaillons aux conditions optimales de température et de pH (35 °C, 2 resp).

Dans cette partie, notre but est de déterminer la concentration minimale d'enzyme à utiliser pour obtenir le meilleur rendement d'hydrolyse.

Pour cela, nous avons choisi les concentrations suivantes en enzyme : 2.5 g/l , 5 g/l , 7.5 g/l, tout en gardant constante la concentration broyat : 35 g/l , nous avons choisi cette concentration pour être largement en excé dû

II-1 Matériels :

- Le dispositif expérimental est un réacteur fermé qui comporte :
- Un thermocouple pour pouvoir régler la température
 - Une plaque chauffante avec agitation magnétique
 - Un bain-marie
 - Un pH-mètre pour régler le pH
 - le volume réactionnel est de 200 ml.

Le bioréacteur est représenté dans la figure (14)*

II-2- Mode opératoire :

Nous préparons la solution de substrat, par incorporation de celui-ci dans = 200 ml d'eau distillée, tout en assurant une bonne agitation magnétique. Une fois les conditions opératoires fixées (températures = 35 °C , pH = 2), la quantité d'enzyme préalablement pesée est introduite rapidement dans le réacteur à un temps zéro.

Après une minute, un prélèvement de 1 ml est effectué, dans le mélange réactionnel et mis dans un tube à essai contenant 5 ml de TCA à 4 % . Après 10 minutes de réaction, le contenu du tube est filtré à travers un papier filtre N° 6.

Plusieurs prélèvements sont effectués à différents temps pendant 5 heures. Un prélèvement est effectué avant d'incorporer l'enzyme. Dans le but d'évaluer la concentration initiale en peptides et acides aminés si on suppose une activité bactérienne pré excisante

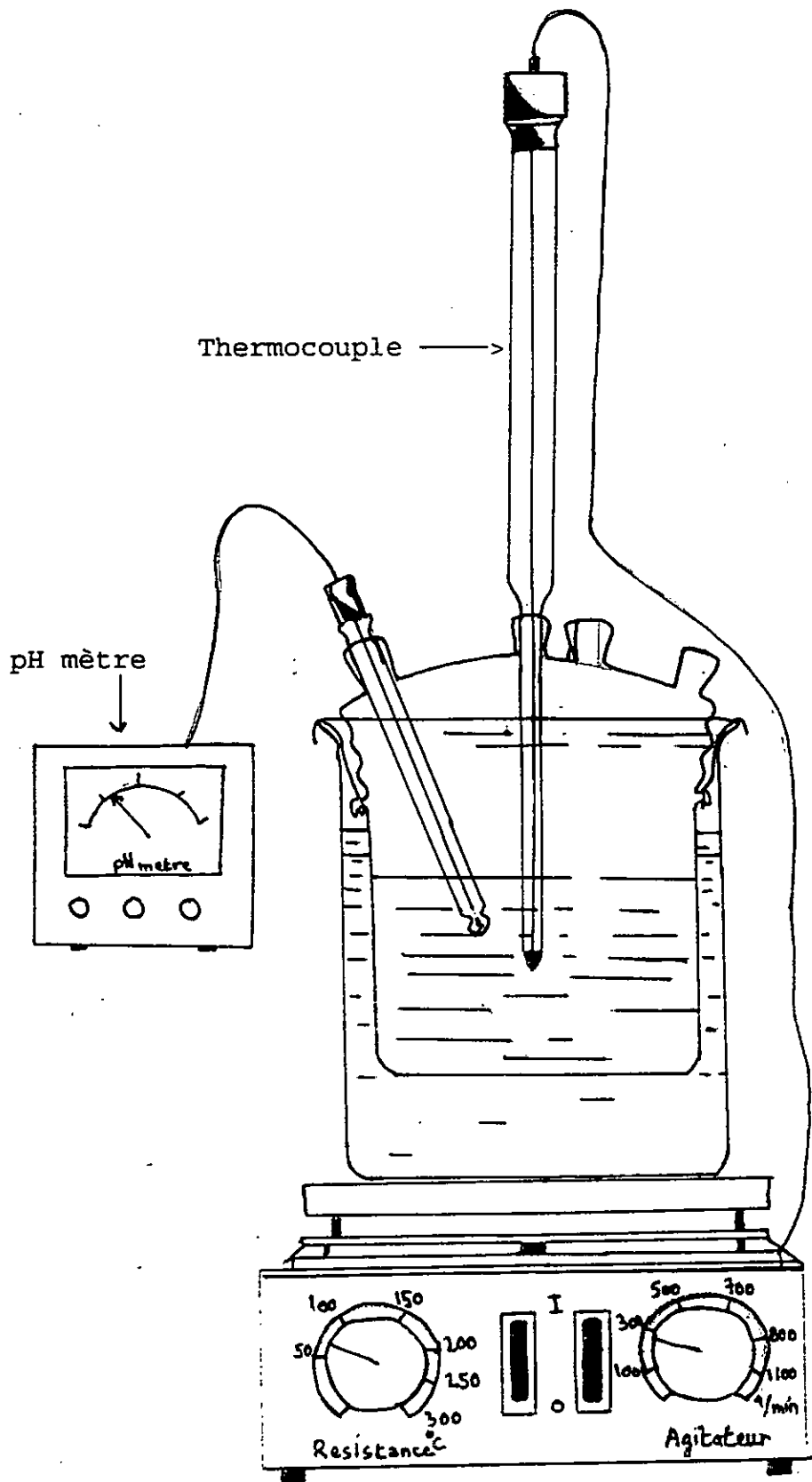


Fig N° 14* : Bioréacteur

II-3 Méthode d'analyse :

Les filtrats ainsi obtenus sont dosés à 280 nm .

Les densités optiques sont converties en concentrations au moyen d'une courbe d'étalonnage établie préalablement.

Cela nous permettra de tracer la courbe de l'évolution de la densité optique en fonction du temps, de calculer le rendement d'hydrolyse pour chaque concentration en enzyme et de déduire la concentration minimale de celui-ci.

II-4 Résultats expérimentaux et interprétation :

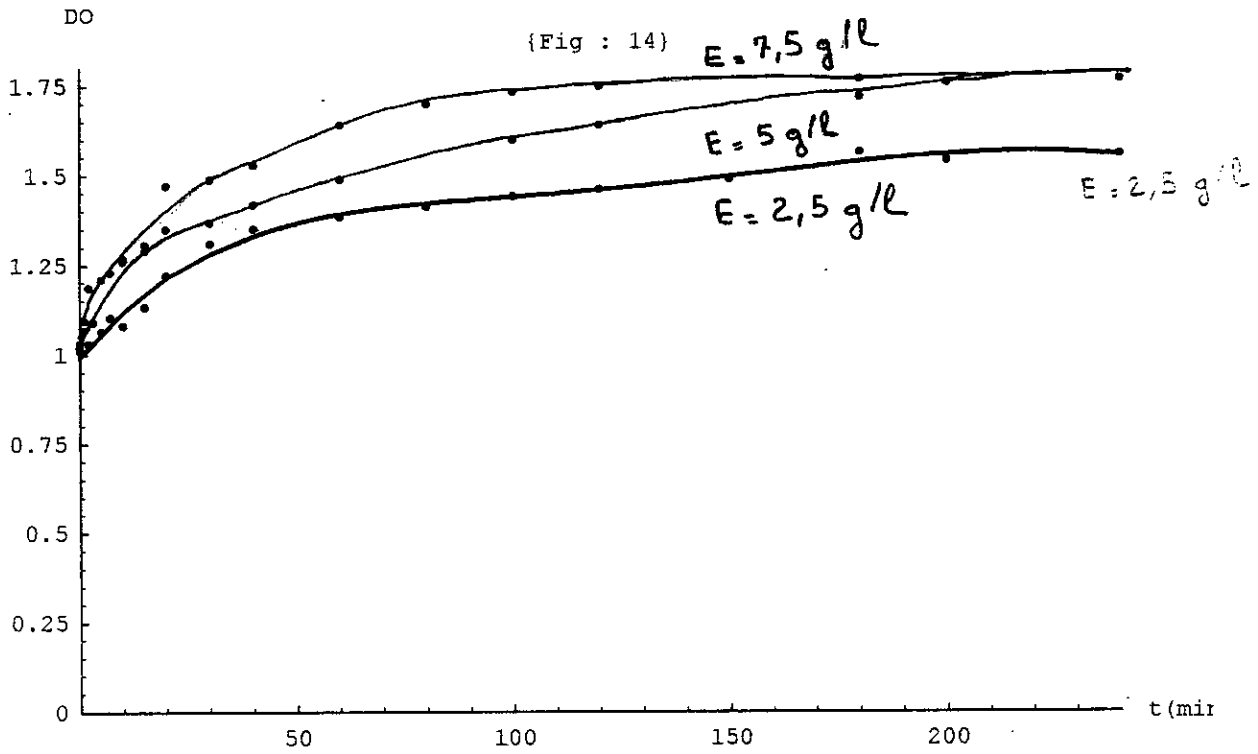
L'évolution de la densité optique en fonction du temps pour différentes concentrations en enzyme, est illustrée par la figure (14).

Comme le montre cette figure, les courbes passent par le même point, mais pas par l'origine, ce qui signifie que notre broyât a subi une attaque bactérienne, avant l'hydrolyse enzymatique.

Nous constatons aussi que ces courbes présentent une croissance pendant une certaine durée, mais, qui s'estompe graduellement pour faire place à un palier.

Les hydrolyses ne se sont pas effectuées de la même façon dans les trois cas, en effet :

- Pour la concentration en enzyme de 2.5 g/l, la réaction démarre lentement et atteint le palier au bout d'1 heure, cela est peut être dû à l'insuffisance de la quantité d'enzyme incorporée.
- Par contre, pour la concentration en enzyme de 5 g/l , la réaction démarre à une vitesse initiale importante et n'atteint le palier qu'au bout de 3 heures.
- Pour ce qui est de l'autre concentration, la vitesse initiale de la réaction est presque égale à celle d'une concentration en enzyme de 5 g/l , mais après les 10 premières minutes de la réaction, les concentrations en protéines hydrolysées obtenues à une concentration en, enzyme de 7.5 g/l sont largement supérieures à celles obtenues avec, 5 g/l . Après 3 heures d'hydrolyse, les 2 courbes se rejoignent.



« Évolution de la densité optique en fonction du temps »

$$pH = 2$$

$$T = 35 \text{ } ^\circ\text{C}$$

*** CALCUL DES RENDEMENTS D'HYDROLYSE :**

Le rendement d'hydrolyse est donné par la relation suivante :

$$R = \frac{C_f - C_o}{S_o}$$

avec : C_f : Concentration finale en protéines hydrolysées (peptides et acides aminés).

C_o : Concentration initiale en protéines hydrolysées

donc: $C_f - C_o$ = concentration en protéines hydrolysées pendant l'hydrolyse enzymatique

S_o : Concentration initiale en protéines non hydrolysées S_o est déterminée par le dosage de l'azote Kjeldahl, sachant que :

la concentration en protéines = la concentration en azote Kjeldahl x 6.25 [32]

$N = 0.0528 \implies S_o = 0.33$ g de protéines/3g de broyat et nous en déduisons la valeur de S_o pour 35 g/l de broyat : $S_o = 3.86$ g.p/l

Les rendements sont données par le tableau N° 6

Concentration en enzyme	Rendement d'hydrolyse
2.5 g/l	30 %
5 g/l	62 %
7.5 g/l	62 %

Tableau N° 6 : calculs des rendements d'hydrolyse.

D'après ce tableau, nous constatons que les rendements des deux hydrolyses effectuées aux concentrations d'enzyme 5 g/l et 7.5 g/l, sont égaux et supérieurs à celle effectuée à une concentration en enzyme de 2.5 g/l.

Nous pouvons donc conclure que :

- 1) La concentration minimale en enzyme pour obtenir le meilleur rendement d'hydrolyse est de 5g/l.
- 2) et que ce rendement est égale à 62 %

ETUDE DE LA CINÉTIQUE

ENZYMATIQUE

III- ETUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE :

Après avoir déterminé les conditions optimales d'activité de la pepsine commerciale, ainsi que sa concentration minimale pour mener à bien l'hydrolyse enzymatique, nous nous intéressons dans cette partie à l'étude de la cinétique enzymatique. Nous suivons l'évolution de la concentration des peptides et acides aminés dans le milieu réactionnel en fonction du temps, et cela à différentes concentrations en broyat : 35 g/l , 65 g/l , 95 g/l , 120 g/l , et une concentration constante en enzyme 5 g/l . Nous travaillons toujours aux conditions optimales d'activité de la pepsine.

III-1 Matériels :

Le réacteur est celui décrit dans la partie II, ainsi que le mode opératoire, à la seule différence, que nous faisons varier dans cette partie la concentration en substrat et maintenons constante la concentration en enzyme.

III-2 Méthode d'analyse :

Nous utilisons la même méthode d'analyse que précédemment.

III-3 Résultats expérimentaux et interprétation :

Les résultats expérimentaux obtenus sont représentés dans les figures N° 15,16,17,18. La vitesse initiale de chaque réaction est donnée par l'équation suivante :

$$V_i = \left(\frac{dc}{dt} \right) = \text{pente à l'origine}$$

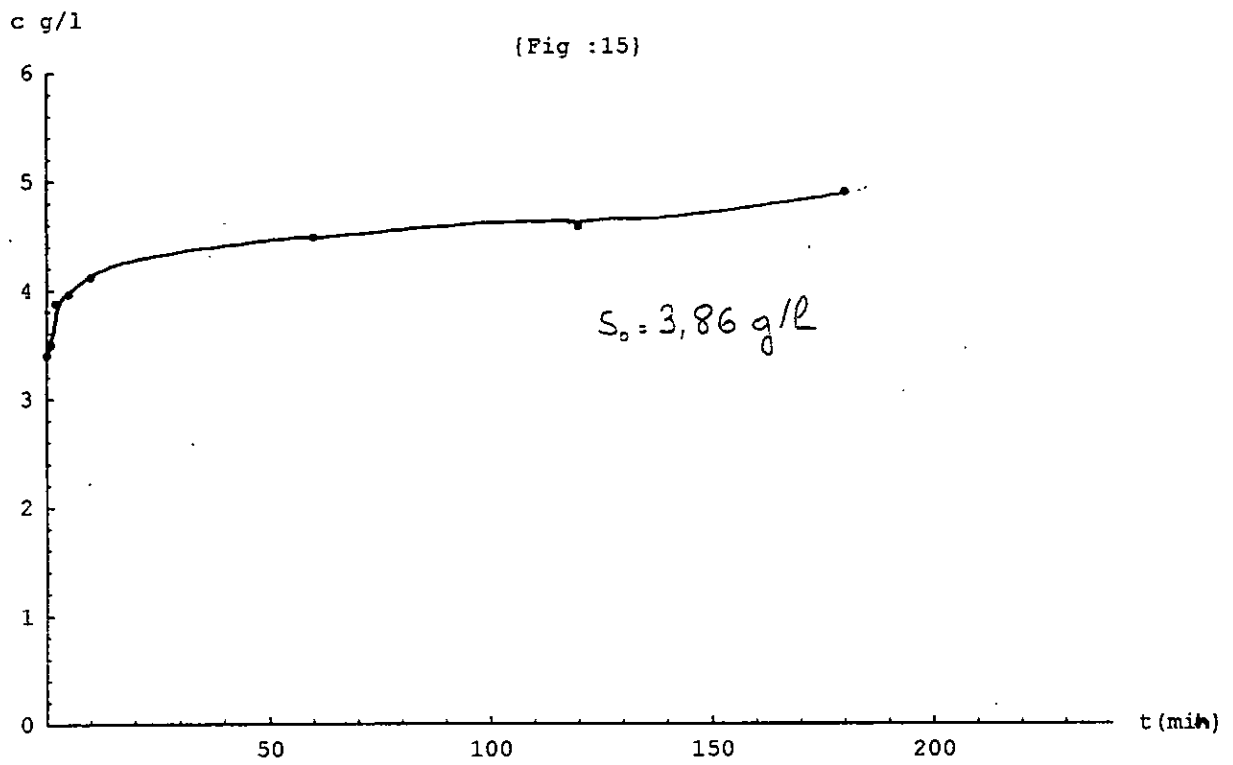
avec : C = concentration en protéines hydrolysées au temps t.

Nous pouvons donc, calculer $T_a V_i$ de chaque hydrolyse à partir de la tangente à l'origine de chaque courbe correspondante.

Le tableau N° 7, nous donne ses valeurs :

Tableau N° 7 : Valeurs des vitesses initiales

Concentration du broyat g/l	35	65	95	120
Concentration en substrat S_0	3.86	7.15	10.45	13.2
V_i g/l min	0.1	0.18	0.23	0.054
$1/V_i$ lmin/g	10	5.55	4.4	18.52
$1/S_0$ l/g	0.26	0.14	0.095	0.076



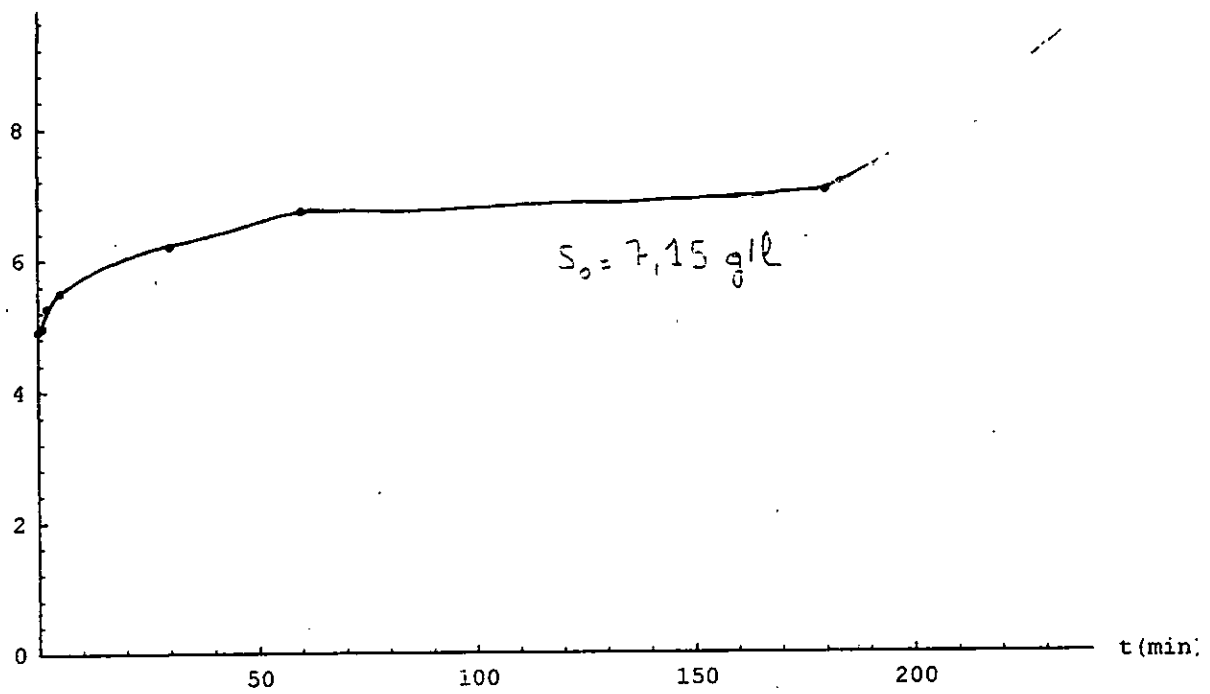
“ Évolution de la concentration des acides aminés et peptides en fonction du temps ”

$$T = 35^{\circ}\text{C}$$

$$\text{pH} = 2$$

c g/l

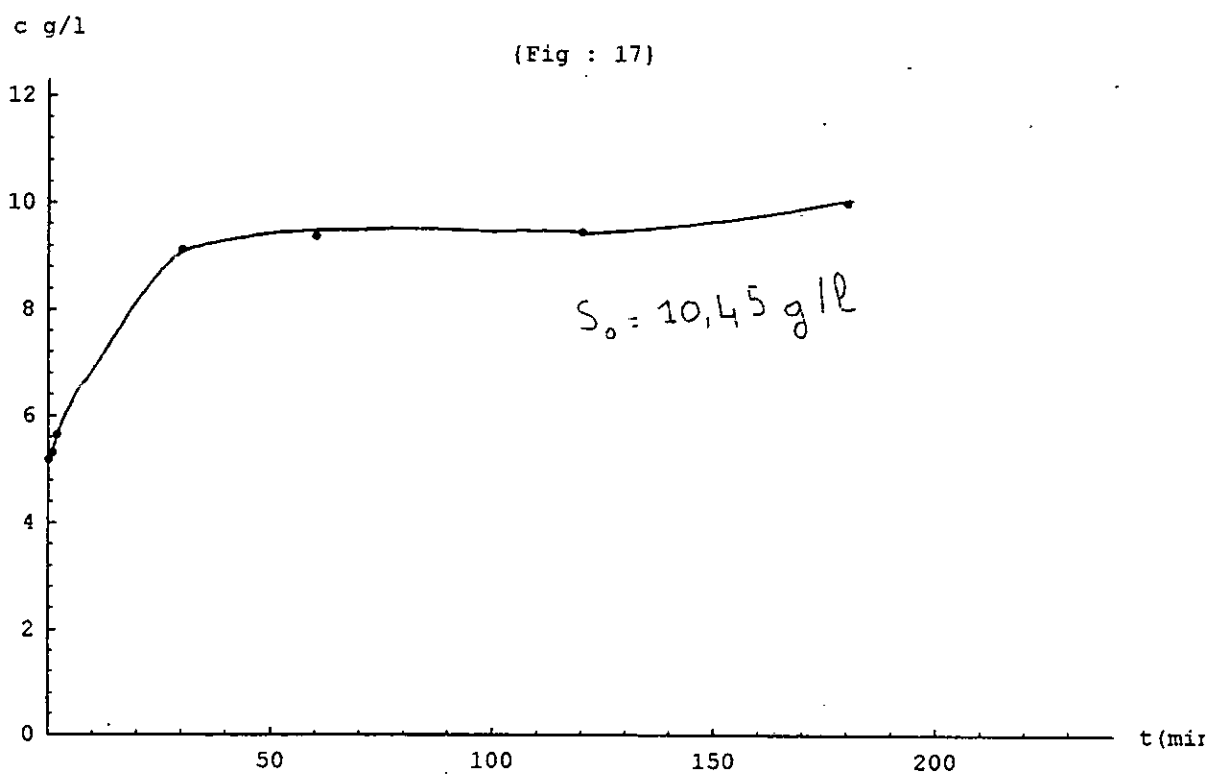
(Fig : 16)



" Évolution de la concentration des acides aminés et peptides en " fonction du temps

$T = 35^{\circ}\text{C}$

$\text{pH} = 2$



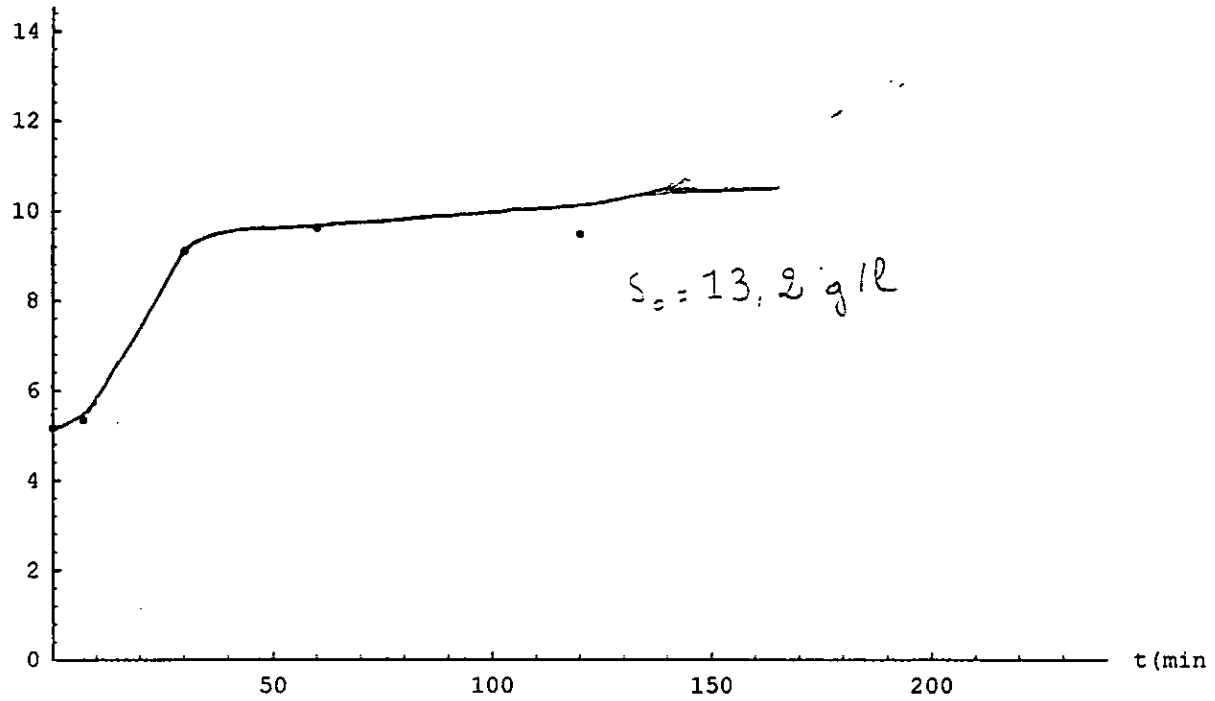
" Évolution de la concentration des acides aminés et peptides "
en fonction du temps

$$T = 35 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 2$$

c g/l

{Fig :18}



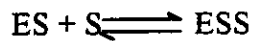
" Évolution de la concentration des acides aminés et peptides " en fonction du Temps

$$T = 35^{\circ} \text{C}$$

$$\text{pH} = 2$$

Pour mieux tirer parti de ces résultats, nous avons tracé la courbe $1/V_i = f\left(\frac{1}{S_0}\right)$ donnée dans la figure (19). L'évolution de cette courbe, prouve qu'il ya une inhibition par le substrat à la concentration en broyât de 120 g/l.

Les réactions régissant ce phénomène sont les suivantes :



E : Enzyme

P : Produit

S : Substrat

Une deuxième molécule de substrat se fixe sur le complexe ES et le rend inactif, dans ce cas, la vitesse initiale de la réaction a tendance à diminuer, d'ailleurs, c'est ce que nous avons trouvé.

La vitesse est donnée par la relation suivante :

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

C'est la représentation donnée par Line Weaver et Burk.

A partir de ce graphe, nous pouvons déterminer les valeurs de V_{max} et K_m . en effet, par projection de la partie linéaire de la courbe sur l'axe des vitesses, nous obtenons la vitesse maximale de l'hydrolyse.

$$V_{max} = 0.83 \text{ g/l min}$$

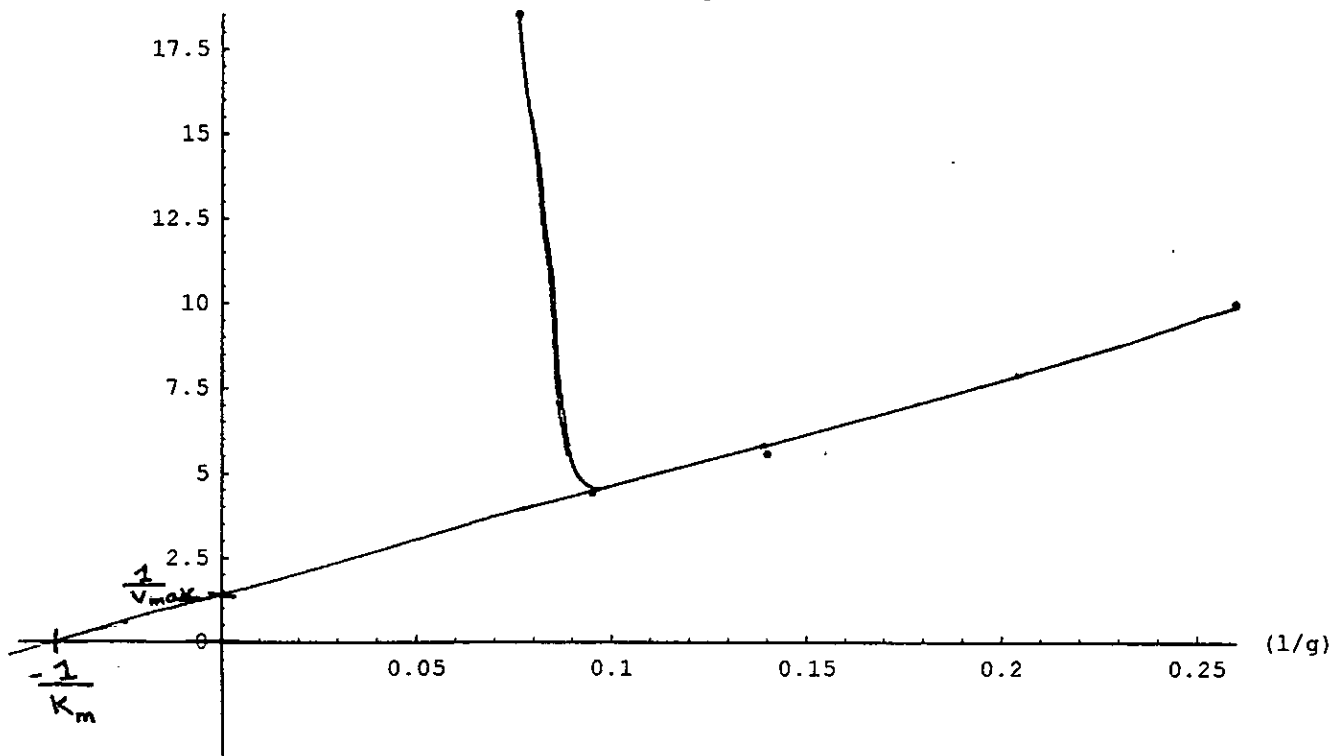
et par projection sur l'axe des concentrations, nous trouvons la valeur de K_m suivante :

$$K_m = 26.66 \text{ g/l}$$

Cependant, de part la forte valeur de K_m , il est claire que l'affinité entre la pepsine commerciale et le rejet d'abattoir est moyenne, cela est peut être dû à la présence d'autres substances contenues dans ce rejet, qui gênent l'action de l'enzyme.

i.min/g 1/V

(Fig : 19)



CONCLUSION

CONCLUSION

Notre travail a porté sur l'hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs au moyen de la pepsine commerciale.

Nous avons vérifié les conditions optimales d'activité de la pepsine. Nos résultats confirment les données de la littérature à savoir : température = 35 °C.

$$\text{pH} = 2$$

L'hydrolyse enzymatique semble se produire avec une quantité minimale d'enzyme de l'ordre de 5 g/l à une température de 35 °C et pH = 2, avec un rendement de 62 %.

Nous avons constaté une quantité non négligeable de protéines hydrolysées avant l'ajout de la pepsine que l'on peut expliquer de la façon suivante :

- présence d'une attaque bactérienne.
- nous avons utilisé du papier filtre Watmann N° 6 au lieu du N° 3. L'ouverture des pores plus grandes, pourrait faciliter le passage des protéines.

L'étude cinétique a permis de préciser l'allure michaelienne et de montrer une inhibition par le substrat à une concentration de 13.2 g/l en substrat.

La vitesse maximale de l'hydrolyse est $V_{\max} = 0.83 \text{ g/l min}$, et la concentration de Michaelis est $K_m = 26.66 \text{ g/l}$.

Par ailleurs, il semblerait que l'hydrolyse conduit à une production de peptides et acides aminés. Une analyse chromatographique serait souhaitable pour une meilleure quantification et une identification des différents produits formés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- CHAPEVILLE « Biochimie » ^{Herman} 1974.
- 2- BERNHARD; Renase (1974) « Structure et fonction des enzymes cinétique et mécanisme d'action, Masson et Cie.
- 3- J.C. COLLIN ; R Delecourt « Actualité des industries alimentaires et agro-industrielles » (INA), juin 1988.
- 4- P.LUISOT. « biochimie générale et médicale » Vol 4 1983.
- 5- C.COSTES « éléments de biochimie structurale » Edition Dunod, Université de Paris 1978.
- 6- M.S. BENHABYLES « hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonneries » thèse de magistère 1992.
- 7- D.J FIOX et P.Gray. « comparaison of alcali and steam acide pretraitement of lignocellulois matériels to increase enzymatique susceptibilité évolution under optimised preateament conditions » 1989.
- 8- C.L.AUDIGIE et G. dupont « Principes des méthodes d'analyse » édition Doin 1885
- 9- S.OUOMANE. hydrolyse enzymatique du cour par la papaine » PFF 1994.
- 10- « Valoriser la filière viande » Biotop N° 8.3ème trimestre 1988.
- 11- JEAN-BLAIN M. « les aliments d'origine animale destinés à l'homme » Vigot 1948.
- 12- F.A.O 1963. « traitement et utilisation des sous produits animaux »
- 13- Vigot 1948. « les aliments d'origine animale destinés à l'homme »
- 14- F.PERCHERON « Abrégé de biochimie générale » Masson 1980.
- 15- WEIL « biochimie générale »
- 16- FOUJIL.A « hydrolyse enzymatique des déchets solides d'abattoirs » P.F.E E.N.P 1992.
- 17- O.GAOUAR.S. FENNOUH « hydrolyse enzymatique des rejets de poissonneries et ultrafiltration de la biomasse » P.F.E ENP 1991.

- 18- SI AMMOUR LEILA « Etude microbiologique et biochimique d'un concentré de protéine obtenu par digestion enzymatique des rejets de poissonneries P.F.E E.N.P 1990.
- 19- SLIMA.Terranti « intérêt nutritionnel des farines d'abattoirs de volailles en alimentation animale
P.F.E I.N.A 1990.
- 20- M.MOULAY « incorporation des déchets d'abattoirs en alimentation de poulet de chair
P.F.E
I.N.A 1980.
- 21- PALMER « cinétique enzymatique » Ediscience 1970.
- 22- SYDNEY.A. BERNARD « structure et fonction des enzymes Ediscience 1969. Paris.
- 23- OLIVIER OUEBEC.C. Bourgeois « valorisation du sang animal » APRIA . Paris 1985.
- 24- MAMERI.D « cours de biochimie » 1995 .E.N.P
- 25- VALORI 5 « valorisation du 5ème quantité ».
- 26- L.DEFo
AVERI « Les sous-produits » conférence de Melle Defaveri à Augers 25-26/10/83
symposium international.
- 27- J.C CHEFTEL « protéines alimentaires » techniques et documentation Lavoisier 1985.
- 28- « Pourquoi et comment valoriser le 5ème quartier », fédération nationale des collectivités locales
R.T.V.A nov 1984.
- 29- REGEUR.J 1983 « décoloration enzymatique du cruor d'abattoir » procédé et application des produits Riva N° 193. P. 2935 . Nov 1983.
- 30- GAYMAY DJ « valorisation du sang animal en alimentation animale ». Thèse de Doctorat vétérinaire Toulouse.
- 31- C.KESSOUS « biochimie structurale » O.PU 1987.
- 32- International Journal of food science and technology (1992) 27,9-20.
- 33- Brevet d'intervention : NOVO Industries 1981.
- 34- A.GUIRRA « hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs » P.F.E E.N.P 1991.

ANNEXES

DOSAGES DES PROTEINES

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Le pourcentage de l'azote total se calcule par la méthode de Kjeldhal

a) Minéralisation

La prise d'essai est de 3 g , on ajoute de catalyseur puis 10 ml d' H_2SO_4 Concentré ou minéralisé par ébullition en chauffant d'abord doucement avec agitation, jusqu'à décoloration, poursuivre alors chauffage pendant 4 heures

b) Distillation

Placer l'extrémité du condenseur dans un erlenmeyer de 150 ml d'acide borique 40 % et quelques gouttes du réactif de tashiro.

Verser le contenu du matra dans le réservoir de distillation ajouter quelques gouttes de phenolphthaline.

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 filtrage

Tirer avec du H_2SO_4 (N/50) jusqu'à coloration rose mauve le pourcentage de l'azote total est calculée par la formule suivante.

$$\% \text{ d'azote total} = \frac{dV \cdot 0,25}{P_e \cdot 1000} \cdot 100$$

V = volume de H_2SO_4 (N/50) ajouté (nd).

P_e : prise d'essai (g):

D : densité de l'échantillon à doser

Le pourcentage de protéine par la formule suivante

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

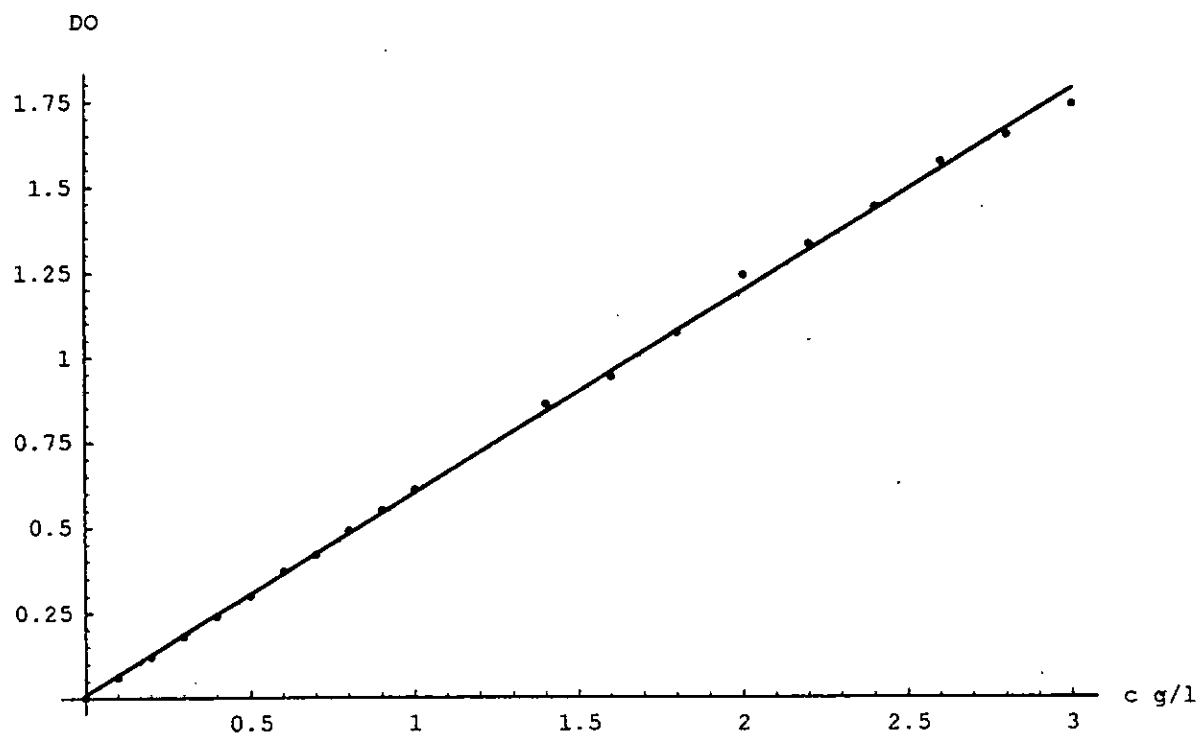
Courbe d'étalonnage :

A partir d'un sérum étalon, dans notre cas un sérum de BSA, dont le titre en protéines est connu : 10 g/L , on réalise les dilutions quantitatives suivantes à l'aide d'eau physiologique :

1/100 , 2/100 , 3/100.....30/100.

on lit la densité optique de chaque échantillon à 280 nm.

-Graphics-



Courbe d'étalonnage