

5/91

وزارة الجامعات

Ministère aux Universités

المدسة الوطنية للعلوم التطبيقية

BIBLIOTHEQUE — المكتبة

Ecole Nationale Polytechnique

26x

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT Genie de l'environnement

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

HYDROLYSE ENZYMATIQUE des REJETS

SOLIDES D'ABATTOIRS

Proposé par :

M<sup>eme</sup> Boussaïd

Etudié par :

A. Guiraa  
M. Guehdouni

Dirigé par :

Mr N. Mameri  
M<sup>eme</sup> Boussaïd

PROMOTION juin 1991

وزارة الجامعات

Ministère aux Universités

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT Genie de l'environnement

## PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

HYDROLYSE ENZYMATIQUE des REJETS  
SOLIDES D'ABATTOIRS

Proposé par :

M<sup>eme</sup> Boussaid

Etudié par :

A. Guiraa

M. Guehdouni

Dirigé par :

Mr N. Mameri

M<sup>eme</sup> Boussaid

PROMOTION juin 1991

# HYDROLYSE ENZYMATIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

## DES REJETS D'ABATTOIRS



المصوات : المحضم الازرقى لبقايا الهدايح الصلبة  
عائلي : يستهدف علمنا هذا جمع ومعالجة البقايا الصلبة  
للهدايح على طريقه عملية هضم ايزيمي ، ومن هنا الحصول  
على مركب نهائي صاف لإستعمارة الأغذية =

Titre: Hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs

Resumé: Notre travail consiste à récupérer et à valoriser les  
rejets solides d'abattoirs par digestion enzymatique et obtenir  
ainsi un produit final utilisé comme additif alimentaire.

SUBJECT: Enzymatic hydrolisis of solid waste products of  
abattoirs.

OBJECT: our work consists in recovering and valorising the  
solid waste products of abattoirs by enzym's digestion so in  
ordre to obtain a final product use as alimentary additive.



REMERCIEMENTS :

Nous remercions Monsieur Mameri et Madame Boussaid pour avoir bien voulu accepter être nos promoteurs, qu'ils trouvent ici nos gratitudeles les plus profondes. Nos remerciements vont aussi vers Madame Mameri qui a été pour nous une aide précieuse.

Nous remercions également:

Le jury M<sup>eme</sup> Kellou présidente.

M<sup>elle</sup> Haddoud

M<sup>eme</sup> Mameri.

Mr Mameri.

M<sup>me</sup> Boussaid.

qui a eu l'amabilité de juger notre soutenance.

Enfin nous exprimons nos reconnaissances à ceux qui ont été les précurseurs de notre volonté.

# SOMMAIRE

SOMMAIRE

I INTRODUCTION GENERALE	4
II - PARTIE THEORIQUE.	5
II.1. Introduction.	5
II.2. Avantages dûs à la récupération des sous-produits d'abattoirs.	9
II.2.1. Amélioration de l'hygiène.	9
II.2.2. Amélioration de la santé et de la productivité du bétail.	10
II.2.3. Considérations économiques.	11
II.2.4. Sources de nouveaux emplois.	11
II.2.5. Augmentation des rendements agricoles.	11
II.3. Fabrication de la farine de viande pour l'alimentation du bétail.	12
II.4. Etudes antérieures.	15
II.5. ETUDE BIOCHIMIQUE:	17
II.5.1. Propriétés générales des protéines.	17
II.5.1.1. Définition.	17
II.5.1.2. Structure générale.	17
II.5.1.3. Agents dénaturants.	17
II.5.1.3.1. Agents physiques.	18
II.5.1.3.2. Agents chimiques.	18
II.5.1.4. •Propriétés physico - chimiques des protéines	18
II.5.2. Les enzymes.	21
II.5.2.1. Définition.	21
II.5.2.2. Historique	21



11.5.2.3. Classification des enzymes.	21
11.5.2.4. Propriétés principales des enzymes.	24
11.5.2.5. Cinétique enzymatique.	24
11.5.2.6. Les effecteurs de la réaction enzymatique.	27
11.6. ETUDE MICRIBIOLOGIQUE.	32
11.6.1. Introduction.	32
11.6.2. Identification de la flore.	32
11.6.2.1. L'étude quantitative.	32
11.6.2.2. L'étude morphologique.	35
11.6.2.3. Tests biochimiques.	36
III. PARTIE EXPERIMENTALE.	37
III.1 Etude biochimique.	37
III.1.1. Introduction.	37
III.1.2. Préparation de la pepsine brute.	38
III.1.3. Détermination des conditions optimales d'activité de la pepsine préparée.	39
III.1.3.1. Détermination du pH optimal d'activité.	39
III.1.3.2. Détermination de la température optimale d'activité.	39
III.1.3.3. Etude de la cinétique d'hydrolyse des rejets solides d'abattoirs par la solution brute de pepsine.	40
III.1.4. Essai de l'activité de la pepsine	

<i>préparée à différents pH.</i>	41
<i>III.1.5. Essai de l'activité de la pepsine brute et commerciale à différentes températures.</i>	42
<i>III.1.6. Dosage des protéines.</i>	43
<i>III.1.7. Mode opératoire de la cinétique d'hydrolyse des rejets solides d'abattoirs.</i>	45
<i>III.2. Etude microbiologique.</i>	47
<i>III.2.1. Matériel du laboratoire.</i>	47
<i>III.2.2. Milieux de culture.</i>	47
<i>III.2.3. Méthodes d'évaluation de la flore.</i>	48
<i>III.2.4. Dilution à partir de la solution mère.</i>	52
<i>III.2.5. Recherche de la flore totale.</i>	52
<i>III.2.6. Recherche des coliformes et des escherichia-coli.</i>	53
<i>III.2.7. Recherche des streptocoques.</i>	55
<i>III.2.8. Recherche des staphylocoques.</i>	57
<i>III.2.9. Recherche des sulfitoréducteurs.</i>	58
<i>III.2.10. Recherche des salmonelles.</i>	60
<i>IV. RESULTATS EXPERIMENTAUX.</i>	62
<i>IV.1. Etude biochimique.</i>	62
<i>IV.2. Etude microbiologique.</i>	66
<i>V. CONCLUSION GENERALE.</i>	90

# **INTRODUCTION GENERALE**



## 1. INTRODUCTION GENERALE.

La concentration industrielle, qui résulte de la suppression de tueries particulières et de la disparition des petits abattoirs, ainsi que le développement important de l'industrie de la viande conduisent à une augmentation importante mais locale des quantités de résidus solides et liquides rejetés par les abattoirs.

Par ailleurs le développement de nouvelles normes en matière d'hygiène entraîne des consommations accrues en eaux et produits de lavage.

Ainsi donc, au vu des caractéristiques et volumes de rejets, les abattoirs sont une source importante de pollution presque exclusivement d'origine organique.

Cette situation nous a conduit à réaliser une étude de faisabilité du procédé de digestion enzymatique traitant les matières organiques solides facilement récupérables au sein de l'abattoir.

En effet, ce procédé offre l'avantage d'être compatible à la fois avec la lutte contre la pollution et la valorisation de l'ensemble de ces déchets en vue de les injecter dans l'alimentation animale. D'où un impact économique et écologique important.

## II. PARTIE THEORIQUE

### II.1. INTRODUCTION:

Il est regrettable que dans la plupart des pays encore peu développés l'on continue à utiliser les méthodes d'abattage traditionnelles, avec comme résultat la perte de toute une série de sous produits précieux .

L'idée préconçue que la production de sous-produits utilisables demande des machines coûteuses une main d'oeuvre hautement qualifiée et des laboratoires spécialisés crée une situation plutôt paradoxale : les pays où les protéines et les sels minéraux pour la consommation humaine et animale, de même que dans les sols, manquent le plus sont ceux qui utilisent le moins leur propres source. comme exemple on peut citer l'habitude que l'on a dans les pays peu développés de jeter les déchets d'abattoirs tout en important des protéines; de jeter du sang tout en important de la farine du sang; de jeter les os tout en important de la farine d'os(1). Du point de vue économique et hygiénique il est essentiel d'utiliser toutes les matières premières se trouvant dans les animaux abattus pour les transformer en toute une série de sous produits de valeur. Telle est la tâche qui s'impose aux rejets d'abattoirs.

Les abats et les déchets qui se prêtent à la production de sous produits varient beaucoup en qualité et en quantité; non seulement d'un continent à l'autre, mais également d'un pays à l'autre et même à l'intérieur d'une région donnée. le terme sous-produits n'a pas un sens précis. selon (1) les termes "déchets de boucherie" et "sous-produits" désignent toutes les parties ou parcelles des animaux abattus qui ne font pas partie de la carcasse habillée.

Les organes comme les rognons, la cervelle, le foie, le coeur, la langue, la queue, les tripes, l'oesophage et le thymus sont appelés sous-produits comestibles. Les animaux morts à l'abattoir avant d'être abattus ou ceux saisis par



l'inspection sanitaire de même que les parties saisies font partie des sous-produits non comestibles. Les oreilles, le museau, les dents, les foetus, la vessie, les déchets d'écharnage et les rognures. Les sabots, les cornes, les poiles, les soies et les fanons entrent également dans la catégorie de sous-produits non comestibles.

La séparation entre produits comestibles et non comestibles dépend du pouvoir d'achat des consommateurs, de leurs habitudes alimentaires, de leur religion et de leur tradition.

Certains organes doivent être parfois considérés comme comestibles et parfois comme non comestibles; parmi ceux-ci il faut citer l'utérus, la rate, les testicules, les poumons et le sang.

selon DE.FAVER (2), on entend généralement par "déchets d'abattoir" les déchets produits par suite des opérations d'abattage et d'exploitation de l'abattoir.

Les déchets d'abattoir sont grossièrement représentés par la différence entre le poids de l'animal sur pied et son poids en carcasse.

Et vue l'importance de ses sous-produits, en France J.C. Frenzt (3) a établi un tableau qui donne une présentation de ces différents sous-produits ainsi que leur poids et le pourcentage de chaque composant par rapport au total des éléments du 5<sup>eme</sup> quartier.



Tableau N°1 : Présentation et importance des éléments  
du 5<sup>eme</sup> quartier (3)

		Poids Kg		% du 5 <sup>eme</sup> quartier			
		veau(3)	G.B(4)	veau	G.B		
5 <sup>eme</sup> quart. -ier	Les Abats roug. -es 23% Veau 25% GB	foie	3,25	6 - 8	6	4	
		coeur	0,92	2 - 3	1,7	2	
		rate	0,4	0,7	0,75	0,4-0,6	
		poumons	2,3	4	4,2	3,8	
		tête	} 8,3	4 - 5*	} 15,4	3,7	
		langue				4	3,7
		cervelle				0,5	0,4
		rognons	-	0,7	-	0,4-0,6	
		ris(1)	0,73	-	1,4	-	
		Les Abats blan- -cs 23% Veau 20-23% G.B	estomac	4	15-20	7,9	10-14
	intestin (2)		6,2	8-10	14,4	5-7,5	
	pieds		3,6	12	6,8	7,6	
	museau		-	2	-	1,5	
	mamelle		-	-	-	-	
	cuir		11	30-45	20,3	20-27	
suifs	-		5-18	-	5-11		
Les issues  54% veau 52-55% GB	gras de	-	-	-	-		
	rognons	-	5-12	-	5-7,5		
	sang	8,7**	12-15	16,2	8-11		
	glandes, caillette	-	-	-	-		
	cornes, onglons	-	-	-	-		

(1) N'entrent pas dans le 5<sup>eme</sup> quartier.

Chez le veau: vendus sur la carcasse.

(2) Avec contenu chez le veau.

(3) 100 Kg de carcasse.

(4) 360 Kg de carcasse.

\* : joues déssosies.

\* \* : Avec pertes non définies.



## II.2 - AVANTAGES DUS A LA RECUPERATION DES SOUS-PRODUITS D'ABATTOIR:

### II.2.1 - AMELIORATION DE L'HYGIENE:

Les déchets, les organes saisis et en fait tout les abats non utilisés; attirent les mouches, les rats, les chiens érrants et différents insectes ; ce qui rend les lieux insalubres et crée un danger d'epidemies .

Il est nécessaire donc de se débarasser de ces déchets d'une façon hygiénique car ils risquent de boucher les égouts et les fosses et se décomposent rapidement.produisants non seulement des odeurs nauséabands, mais constituent également un terrain de culture idéal pour les microbes provoquants la putrification de la viande.

La viande débitée dans les abattoirs, ne possédant pas d'installation spéciale pour la récupération des sous-produits non seulement se conserve moins bien, mais peut servir de véhicules à différents agents vecteurs de maladies.

Si l'on enterre ou si l'on brûle les déchets non comestibles, on perd entièrement tous les sous-produits récupérables en principe et si cette opération n'est pas faite très soigneusement on risque de ne pas éliminer toute source de contagion sans aucun doute, il est préférable de produire des produits stérilisés et concentrés convenant pour l'alimentation des animaux. pour cela il est nécessaire tout d'abord de diminuer suffisamment le contenu en eau du produit pour que la multiplication bactérienne soit inhibée.

La stérilisation du produit pendant le traitement est également indispensable, les microbes pathogènes se trouvant dans les matières traités pourraient si non infecter les animaux nourris avec ce prodiut .

La création d'une installation de traitement de sous-produits contribue à améliorer l'hygiene de l'abattoir, car elle donne la possibilité d'eliminer rapidement les produits putrisibles.



## II.2.2.- AMELIORATION DE LA SANTE ET DE LA PRODUCTIVITE DU BETAIL:

La farine de viande donne non seulement des protéines extrêmement utiles mais également des vitamines B12 (1) élément essentiel pour la croissance des êtres vivants. Les protéines provenant de la viande compensent d'une manière efficace le manque d'acides aminés de l'herbe et des grains.

Les aliments comme la farine de viande et la farine de sang ne contenant pratiquement pas d'éléments fibreux sont appelés "aliments concentrés", leur addition aux rations journalières n'augmentent pratiquement pas le volume de celle-ci.

Les aliments concentrés à base de protéines animales utilisés en pisciculture permettent d'augmenter d'une façon sensible le rendement en poisson des réservoirs et des étangs.

Le rendement en protéines animales des étangs exploités d'une façon rationnelle peut dépasser de beaucoup à l'hectare celui des champs cultivés.

Les graisses de qualité inférieure impropre à la consommation humaine, ajoutées à l'alimentation de la volaille, non seulement permettent "d'éviter l'état poussé" de cette dernière, mais améliorent l'assimilation des autres éléments nutritifs grâce à leur rôle de "combustible" et grâce à leur pouvoir calorifique.

La question se pose de savoir s'il est préférable de produire des aliments pour les animaux ou de fabriquer des engrais, c'est la rapidité des manipulations et l'état de fraîcheur des matières utilisées qui forment la différence essentielle entre les deux productions.

Le sang et la viande se décomposent très rapidement et les farines produites à partir des matières de base déjà avariées sont évidemment peu appréciées des animaux et ne peuvent servir que d'engrais.

Elles ne conviennent pour l'alimentation des animaux, car lors de la décomposition une grande partie des protéines est

transformée, le produit ne conservant qu'une faible valeur nutritive .

L'utilisation de la farine de viande non stérilisée pour l'alimentation des animaux présente des dangers et cette farine ne doit être employée que comme engrais .

les engrais d'origine animale étant concurrencés sur le marché par les engrais synthétiques comme l'urée et les superphosphates sont d'un rapport nettement moindre que les aliments pour le bétail produits à partir des mêmes matières de base (1).

Il est donc absolument indispensable de prendre les mesures sanitaires nécessaires pour que tous les abats de boucherie puissent être transformés en produits pouvant servir à l'alimentation des animaux.

#### II.2.3. CONSIDERATIONS ECONOMIQUES:

la récupération des sous-produits peut influencer le prix de la viande et le prix payé à l'éleveur pour son bétail suivant le cas le revenu obtenu de la récupération des sous-produits peut servir à diminuer le prix de la viande payé par le consommateur ou à augmenter le prix payé à l'éleveur pour ses bêtes.

#### II.2.4. SOURCES DE NOUVEAUX EMPLOIS:

La destruction pure et simple des abats impropres à la consommation ne demande que très peu de main d'oeuvre. la transformation de ces abats en sous produits divers provoque la création de nouveaux emplois et de nouveaux métiers, non seulement dans les usines de traitement, mais également dans les industries de transformation utilisant ces sous-produits.

#### II.2.5. AUGMENTATION DES RENDEMENTS AGRICOLES :

L'azote, le calcium et le phosphore contenus dans les déchets d'abattoirs peuvent être transformés en engrais ce qui permet



d'augmenter le rendement des champs ,des potages et des plantations,le compost obtenu à partir des déchets d'abattoirs et des litières peut contribuer à augmenter les récoltes ; le méthane produit à partir des mêmes déchets peut servir à chauffer et réfrigérer les abattoirs

### 11.3. FABRICATION DE LA FARINE DE VIANDE POUR L'ALIMENTATION DU BETAIL:

le nom "farine de viande" s'applique aux produits obtenus à partir des tissus animaux.

ces produits ne contiennent pas plus de 10% d'acide phosphorique c'est à dire 4,4% de phosphore et au moins 55% de protéines ( les sabots, les cornes, les poils,le sang, le contenu intestinal ou stomacal ne doivent pas être utilisés dans cette fabrication ). la composition de cette farine varie avec la composition des tissus animaux dont elle provient qui à son tour ( c'est à dire la composition des tissus animaux ) varie non seulement suivant les animaux mais suivant les parties de l'animal dont elle provient ( comestibles ou non ). voir tableaux ( 2,3 ).

Tableau 1: Composition moyenne des viandes (1)

	Eau %	Graisse %	Proteines %	Cendres %
veau gras	70,6	11,3	17,0	01,1
boeuf gras	55,3	29,4	14,5	00,83
boeuf demi-gras	64,4	17,2	17,5	00,9
boeuf maigre	73,7	05,3	19,83	01,2
mouton très gras	46,0	43,2	10,2	00,6
mouton gras	54,0	33,6	11,7	00,7
mouton demi-gras	65,2	19,5	14,5	00,83
mouton maigre	72,83	09,0	17,1	01,1

Tableau 2: Composition moyenne des abats comestibles (1)

	Eau %	Graisse %	Proteines %	Cendres %
Poumons	79,7	03,2	16,4	01,6
Rognons	77,4	04,83	16,6	01,2
Tripes	79,5	10,0	10,0	00,5
Cervelles	80,6	09,3	08,83	01,1



Le schéma général de la production de la farine de viande à partir des sous-produits d'abattage peut être décrit de la façon suivante(4): la matière brute est broyée et coupée dans un broyeur puis elle passe dans un cuiseur pour le traitement thermique de cuisson et de stérilisation .

grâce au traitement thermique, on obtient la rupture des cellules lipidiques qui contiennent la graisse qui, de cette façon, se dégage et se sépare des autres composants. A la sortie du cuiseur , on recueille la matière dans un réservoir intermédiaire, puis on la transvase dans un réservoir décanteur pour séparer la partie solide , qui se dépose sur le fond des résidus liquides. La composante liquide comprend la graisse en surface et une partie qui est recirculée par le réservoir intermédiaire placé à la sortie du cuiseur , tandis que la graisse est envoyée à la phase finale de purification. la partie solide est envoyée au déshydrateur rotatif équipé d'interstice rechauffée, ou en air chaud d'ou sort la farine de viande.

#### II.4. ETUDES ANTERIEURES :

Différentes équipes de recherche et groupes d'industriels se sont intéressés de près à la valorisation des rejets d'abattoirs ( a, b, c, d, e ..... etc).

les quantités de rejets et leur charge polluante ont poussé les autorités de différents pays à imposer aux exploitants d'abattoirs de valoriser les matières premières appelées à tort " sous-produits ", à titre d'exemple :

Le sang : dans ce cadre différentes études ont été entamées, des techniques de pointe ont été mise à contribution pour lutter contre le gaspillage d'éléments nutritifs ( en particulier les protéines ) contenues dans ce rejet.

D'autres équipes de recherche se sont intéressées à la valorisation des rejets du 5<sup>ème</sup> quartier et / ou l'objectif était d'extraire l'Héparine par l'hydrolyse enzymatique et d'autre part d'extraire les acides aminés résultant de cette hydrolyse .

Des techniques de pointe telles l'Electrodialyse, UF, Echange d'ions avec résine ont été mises à contribution . certaines techniques se sont avérées peu adéquate à ce type de rejets très chargés . à titre d'exemple :

L'utilisation de résine échangeuse d'ions ou résine adsorbante n'a pas donné de résultats satisfaisants . L'Electrodialyse et la Cristallisation successive donnent des résultats relativement intéressants mais où les solutions ayant subits ces process nécessitent encore un traitement (f)

L'objectif assigné à ce projet est d'effectuer une hydrolyse enzymatique des rejets solides et/ou préalablement tous les tests microbiologiques et biochimiques seront réalisés afin de nous assurer de la qualité de ces rejets .



vue la cherté des enzymes commerciales , l'hydrolyse sera effectuée grace a une enzyme préparée à partir d'estomac de mouton.

Les différentes recherches qui se sont intéressés à la valorisation des rejets d'abattoirs :

a - Regener J (1983)

Décoloration enzymatique du cruor d'abattoir, procédé et application du produit .

Riva N0 193 - p.29 35. Novembre (1983).

b - Nakamurat - Numatam - Kobayashi R - (1985)

Application of enzymatic hydrolysate of red blood cell to media materials for bacteria .

Japanese journal of zootechnical science 56(11) \_  
november 1985.

c - Hald - Christensen V (1978)

Decolourization of slaughter blood by partial enzymatic hydrolysis .

24<sup>ème</sup> congrés européen des chercheurs en viande  
Kulmbach proceedings \_ H5 : 3 (tome 3)

d - Gaymay DJ (1984)

Valorisation du sang en alimentation animale .

Thèse Doctorat vétérinaire Toulouse .

e - stiebig A - Wirthf (1986)

Plasma sanguin - Influence des anticoagulants sur la composition et le rendement du plasma.

Fleischwirtschaft - N0 6 - 1986 - p. 1004 - 1009.

f - texte Anonyme .

## II.5. ETUDE BIOCHIMIQUE:

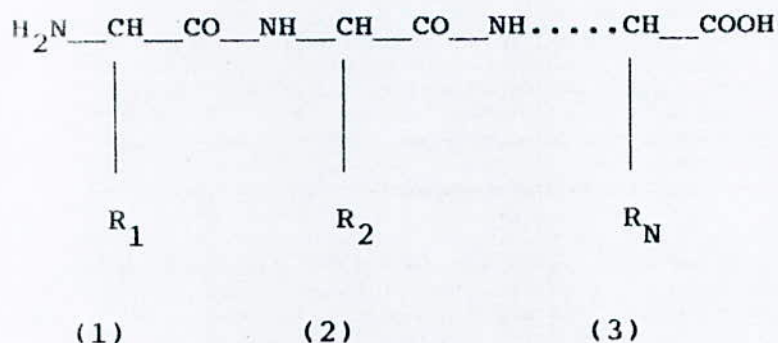
### II.5.1. PROPRIETES GENERALES DES PROTEINES:

#### II.5.1.1. DEFINITION:

Les protéines sont des macromolécules de polymères d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides que l'on appelle liaisons peptidiques .

#### II.5.1.2. STRUCTURE GENERALE:

La structure peptidique linéaire dans sa forme la plus fréquente possède à une extrémité un groupement  $\alpha$ -aminé libre dit N-terminal qui figure par convention à gauche de la molécule et à l'autre extrémité , un groupement carboxylique dit C-terminal (5).



(1) : Groupement N-terminal

(2) : liaison peptidique

(3) : Groupement C-terminal

#### II.5.1.3. AGENTS DENATURANTS:

##### II.5.1.3.1. AGENTS PHYSIQUES :

a- La chaleur:

La chaleur est très souvent impliquée dans les phénomènes de dénaturation des protéines . l'intensité du déplaieement de la protéine peut être considérable .

exemple : serum albumine native a une forme élliptique avec un rapport = longueur/largeur = 3 . ce rapport atteint 55 après dénaturation thermique . (7).

la chaleur provoque chez les protéines plusieurs modifications dont les plus importantes sont : (8).



- Baisse de sensibilité
- Rupture des liaisons covalentes des ponts disulfures S--S
- formation de nouvelles liaisons covalentes intra ou intercellulaires, Ces altérations peuvent modifier les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines.

b- Le froid:

Le froid est beaucoup plus un traitement physique de conservation, mais il peut être responsable de dénaturation et d'inactivation des molécules lorsqu'il est rompu fréquemment ou lorsque la vitesse de congélation est lente (7).

c- Pression hydrostatique:

Elle peut avoir un effet dénaturant pour des valeurs supérieures à 50 Kpa.(7)

II.5.1.3.2 AGENTS CHIMIQUES:

Le pH du milieu dans lequel se trouve les protéines influence le processus de dénaturation. La plupart des protéines sont stables dans une zone donnée de pH. soumises à des valeurs de pH très élevées ou très basses, elles sont souvent dénaturées (précipitation) il en résulte de fortes repulsions électrostatiques qui favorisent le replaiement de la molécule

II.5.1.4. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES:

L'étude des propriétés des protéines permet de comprendre leur comportement et leurs mécanismes d'action

\* SOLUBILITE DES PROTEINES:

La solubilité des protéines dans l'eau et dans les solvants organiques dépend de leur composition et de leur structure, mais peut être modifiée sous l'influence de divers facteurs qu'il est important de connaître lorsqu'on désire par exemple extraire et purifier une protéine à partir d'un milieu biologique complexe.

a- Influence du pH: (9)

La solubilité des protéines passe par un maximum pour un pH déterminé. variable pour chaque protéine c'est le point isoélectrique, valeur du pH pour laquelle une protéine est globalement neutre (figure 1 )

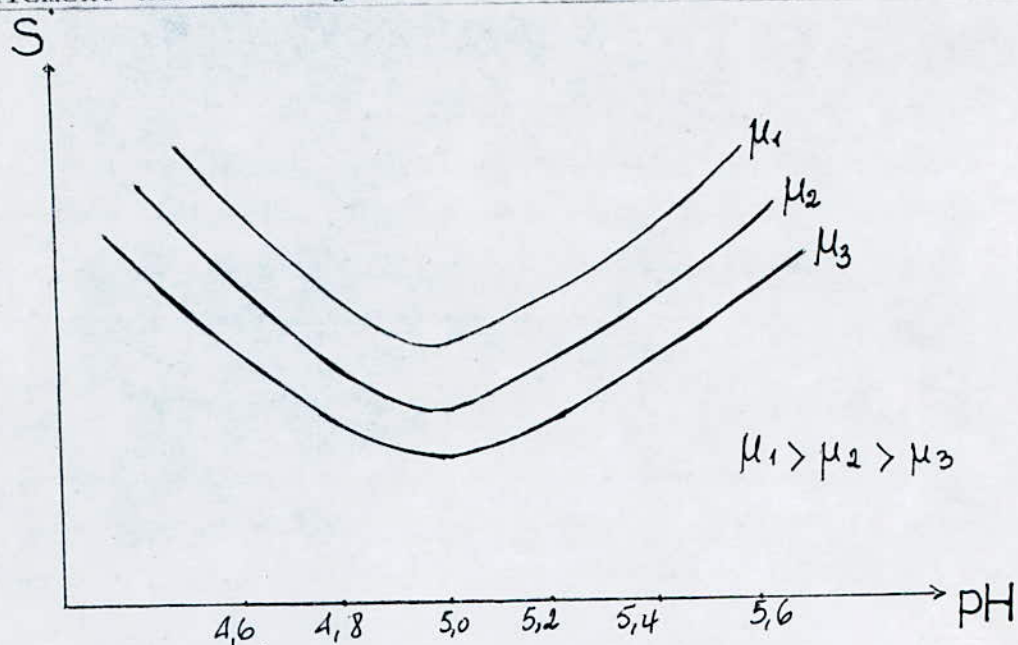


figure 1 : variation de la solubilité en fonction du pH.

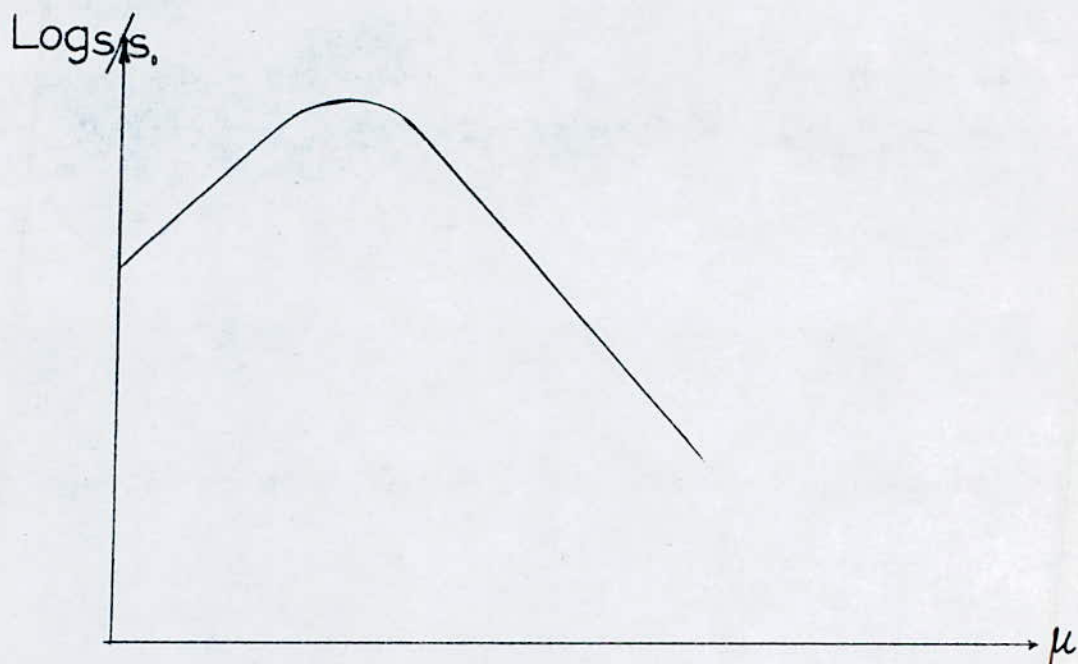


figure 2 : variation de la solubilité en fonction de la force ionique

b- Influence de la force ionique: (9)

L'effet des sels neutres sur la solubilité des protéines dépend de la force ionique de la solution (figure1 et figure2) selon:

$$\mu = 1/2 \sum C_i \cdot r_i^2$$

où  $C_i$ : la concentration de l'ion  $i$  (en molarité)

$r_i$ : la valence.

La force ionique de la solution agit, par l'intermédiaire du potentiel électrocinétique sur la charge et la conformation (taille et forme des protéines)

c- Influence de la température:

La température modifie la solubilité des protéines et peut les dénaturer. En effet dans la plupart des cas, la solubilité des protéines augmente légèrement quand la température s'élève. Toutefois, cette élévation favorise leur suivie en général de précipitation.



## II.5.2. LES ENZYMES:

### II.5.2.1. DEFINITION:

les enzymes sont des substances protéiques spécialisées dans la catalyse des réactions biochimiques. certaines sont uniquement constituées d'une protéine tandis que d'autres sont composés d'une partie protéique (l'apoenzyme) et d'une partie non protéique ( le coenzyme ou cofacteur) qui est dans ce cas responsable de l'activité catalytique.(7).

### II.5.2.2. HISTORIQUE:

c'est en 1835 que l'on a découvert que l'hydrolyse de l'amidon était catalysée par la diastase du malte. en 1860 pasteur mit en évidence le fait que les réactions de fermentation sont catalysées par des enzymes. en 1898 Buckness réussit à extraire l'enzyme responsable de la fermentation alcoolique. en 1926 on a réussi à isoler, extraire et cristalliser l'uréase de la fève.

### II.5.2.3. CLASSIFICATION DES ENZYMES:

Le nombre des enzymes repertoriées augmente régulièrement d'année en année, on évaluait ce nombre à 1300 en 1969. La liste publiée en 1972 par l'Union Internationale de Biochimie (U.I.B) comporte 1770 enzymes. actuellement elles sont au nombre de 3000 enzymes différents.

Chaque enzyme est responsable d'une réaction donnée. Une classification a été proposée par la commission des enzymes de l'U.I.B en 1961. Cette classification comporte six classes principales. selon la nature des réactions comme le montre le tableau 4.

Tableau 4 : Classification des enzymes. (7)

Enzymes	Réactions catalysées	Commentaires
Oxydo-réductases	Réaction d'oxydo-réduction (transfert d'électron d'un substrat à un autre)	Réaction endothermique qui nécessitent des cofacteurs enzymes intracellulaire
Transférases	Transfert intermoléculaire de radicaux fonctionnels.	Réactions exothermiques, groupements méthyl, amino glycosyl.. transfert enzymes pouvant être extracellulaires.
Hydrolases	Réactions d'hydrolyse (1)	Réactions exothermiques intervenant en solutions aqueuses très largement utilisées dans l'industrie
Lyases	Addition sur les doubles liaisons (2)	Groupements carboxyles, amino ou hydroxyles.
Isomérases	Réactions d'isomérisation (réarrangement structural interne)	Réactions exothermiques peuvent intervenir en solution libre, enzymes intramoléculaires.
Ligases (synthétases)	Formation de liaison avec utilisation d'A.T.P (pour couplage avec une réaction d'hydrolyse)	Réactions endothermiques qui nécessitent des cofacteurs (A.T.P) enzymes intracellulaires.

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

(2) Ou rupture d'un enchainement mais sans intervention d'eau (avec réarrangement).



en plus de ses classes il y'a la classe des 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 la réaction/activité enzymatique soit une droite. la cinétique d'hydrolyse étant compliquée par l'apparition de peptides plus solubles ou plus ou moins suseptibles à l'action protéolytique.

exemple de peptidase et de protéase:

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 de la pression. La pepsine est l'enzyme préparée et utilisée lors de cette étude.



#### II.5.2.4. LES PROPRIETES PRINCIPALES DES ENZYMES :

les enzymes sont des catalyseurs ,ils respectent strictement les lois de la catalyse .

a- L'enzyme ne figure pas quantitativement parmi les produits de la réaction, elle n'est donc pas consommée par celui-ci et chaque molécule d'enzyme peut théoriquement provoquer la transformation d'un nombre illimité de molécules de substrat .

b- elle ne modifie pas la nature de la réaction, ni son équilibre, ni son bilan thermodynamique .

c- l'enzyme modifie, en accélérant, la vitesse de la réaction. cette accélération peut atteindre 100 milliards de fois la vitesse de la réaction spontanée.

d- Activité catalytique des enzymes:

Il n'est généralement pas possible de doser directement les enzymes dans les milieux biologiques , on détermine donc la quantité d'une manière indirecte en mesurant leur activité catalytique (ou enzymatique). C'est la vitesse de réaction qui exprime l'activité catalytique d'une enzyme . Cette vitesse de réaction reflète le nombre de molécules d'enzymes activées contenues dans l'échantillon . Différentes unités ont été proposées dans le passé pour exprimer l'activité catalytique . elles continuent à être utilisées dans le domaine de l'agroalimentaire. il est nécessaire de mesurer les activités catalytiques des enzymes dans les conditions afin de pouvoir comparer les résultats fournis par différentes méthodes de dosage.

#### II.5.2.5. CINETIQUE ENZYMATIQUE:

Toute la cinétique enzymatique consiste à mettre en présence, dans un milieu approprié généralement aqueux, une certaine quantité d'enzyme et une autre de substrat, et assurer aussi rapidement que possible le mélange homogène, puis mesurer à l'aide d'une méthode analytique convenable la quantité de produit formée au cours du temps, tout en assurant pendant cette période la constance des autres paramètres tels que la température, le pH ... Le résultat de

ce mélange se traduit par l'établissement d'un contact étroit entre l'enzyme et le substrat.

L'édifice transitoire formé lors du contact est nommé: complexe enzyme-substrat ou complexe de MICHAELIS et la zone privilégiée de fixation de l'enzyme: est le centre actif ou le site actif.

a- Vitesse de réaction en fonction du temps:

La première propriété d'une enzyme est d'augmenter la vitesse d'une réaction biochimique. La mesure de cette vitesse est un élément essentiel de l'étude cinétique de la réaction enzymatique.

$$V = dp/dt = -ds/dt$$

ds: la quantité de substrat disparue pendant le temps dt

dp: la quantité de produit de la réaction apparue pendant ce même temps

La vitesse initiale de la réaction est mesurée à l'aide de la tangente à l'origine de la courbe  $p = f(t)$  comme le montre la figure

$$dp/dt = k \text{ donc } p = kt \quad \text{ini}$$

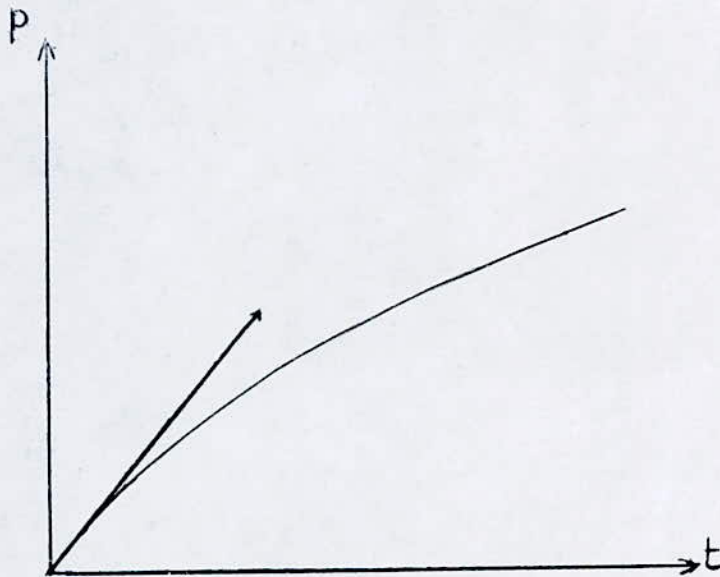


fig 3 : formation du produit de la réaction en fonction du temps.



b- Vitesse de la réaction en fonction de la concentration du substrat:

le premier temps de de la catalyse enzymatique consiste en une fixation du substrat sur l'enzyme ( hypothese de MICHAELIS-MENTEN )(10).



il existe donc un site de fixation sur la moleculle proteique le complexe enzyme\_substrat se dissocie , avec liberation du produit de la reaction p et regeneration de l'enzyme .



dans le plus frequant d'une reaction enzymatique l'equilibre de la reaction est très fortement déplacé vers la droite

.en appliquant la loi d'action des masses a (1) et (2)

$$V1 = K1[E][S]$$

$$V2 = K2[ES]$$

$$V3 = K3[ES]$$

La vitesse de disparition du substrat est égale a la vitesse d'apparition des produits de la reaction. -

$$ds/dt = dp/dt$$

$$V1 - V2 = V3$$

$$d'ou K1[E][S] - K2[ES] = K3[ES] [E][S] / [ES] \\ = K2 + K3 / K1 = KM \quad (3)$$

La constante KM est la constante de dissociation du complexe enzyme\_substrat c'est la constante de MICHAELIS

Equation de MICHAELIS MENTEN :

si ET est la concentration totale de l'enzyme ( libre et combinée )dans le milieux et [E] la concentration molaire en enzyme libre :

$$[E] = [ET] - [ES] \quad (4)$$

La relation (3) devient :

$$KM = ([ET] - [ES]) [S] / [ES] = [ET][S] / [ES] - [S]$$

$$KM + [S] = [ET][S] / [ES] ;$$

$$[ES] = [ET][S] / KM + [S] \quad (5)$$

Or, la vitesse de la reaction enzymatique est égale a V3

$$V = V3 = K3[ES] \quad (6)$$

en remplaçant [ES] par sa valeur exprimée par (5)

$$v = K3 [ET][S] / KM + [S] \quad (7)$$

la vitesse de la reaction dépend donc de :

- La concentration en enzyme total.
- La concentration en substrat.
- La constante de MICHAELIS.

cette vitesse sera maximale ( $V_{max}$ ) lorsque tout l'enzyme sera combiné c'est à dire  $[ES] = [ET]$ .

.la vitesse exprimée par (6) devient alors :

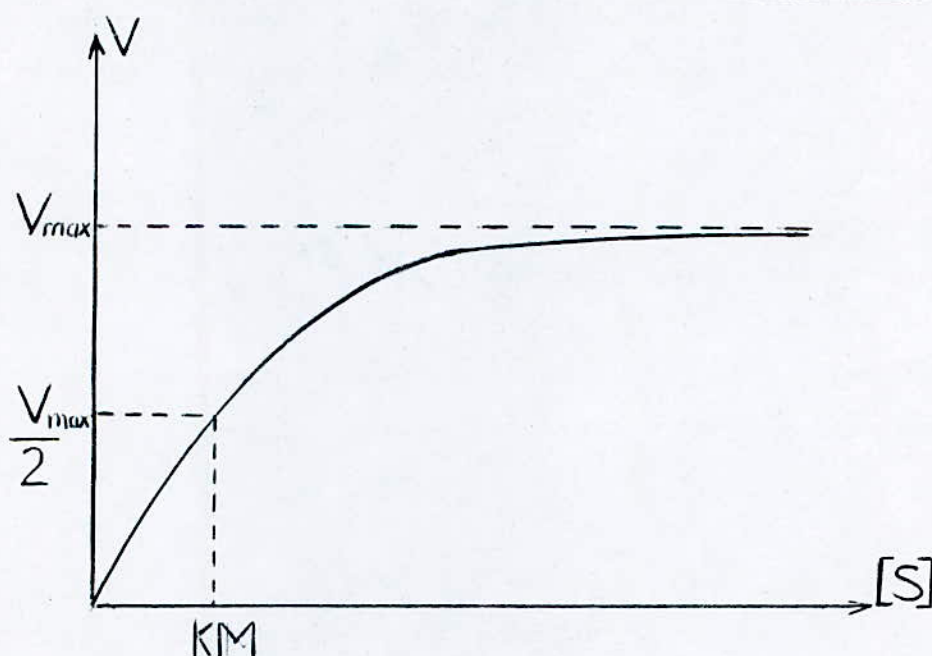
$$V_{max} = K_3[ET]$$

en remplaçant  $K_3[ET]$  de l'équation (7) par  $V_{max}$  :

$$V = V_{max} [S] / K_M + [S] \quad (8)$$

c'est l'équation de MICHAELIS - MENTEN .

L'expression graphique :



#### II.5.2.6. LES EFFECTEURS DE LA REACTION ENZYMATIQUE :

a-La température:

la vitesse de la reaction croit avec la temperature ( Loi d'ARRHENUS ) jusqu'a une valeur optimale au dela, il y'a inactivation de l'enzyme et la vitesse de la reaction décroît jusqu'a une valeur nulle ( figure 4 )



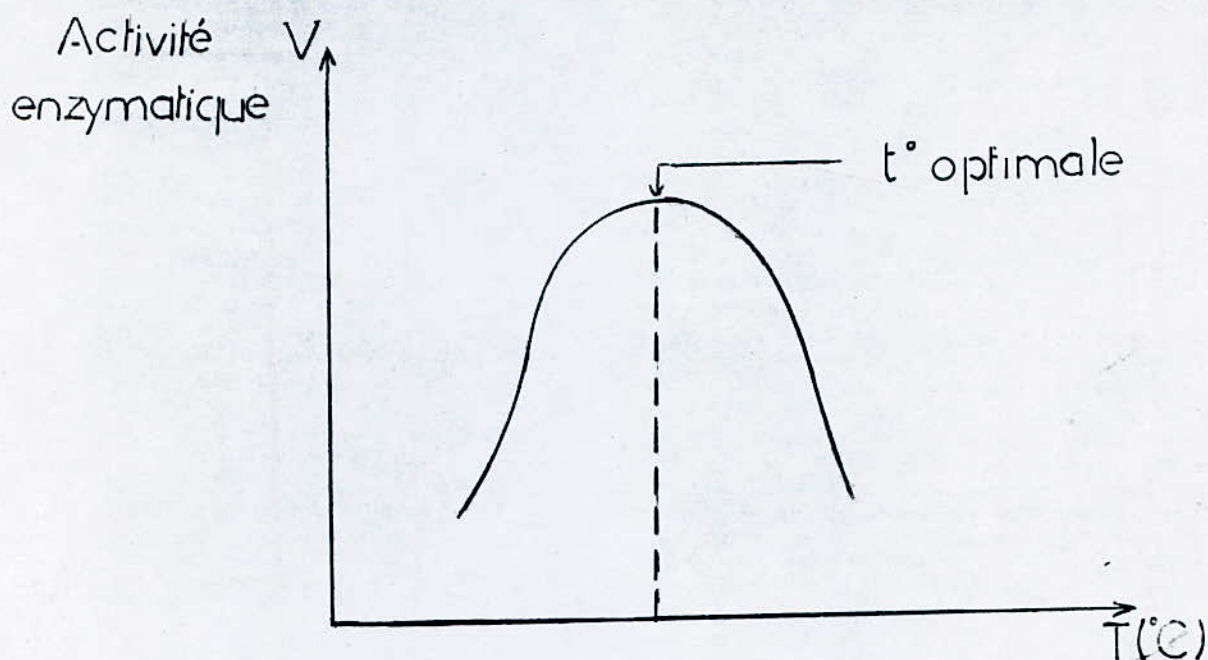


Figure N°4 : Evolution de l'activité enzymatique en fonction de la température

b-Le pH: La vitesse de la réaction est également fonction du pH. La courbe de pH a une activité voisine de la courbe de température (figure 5).

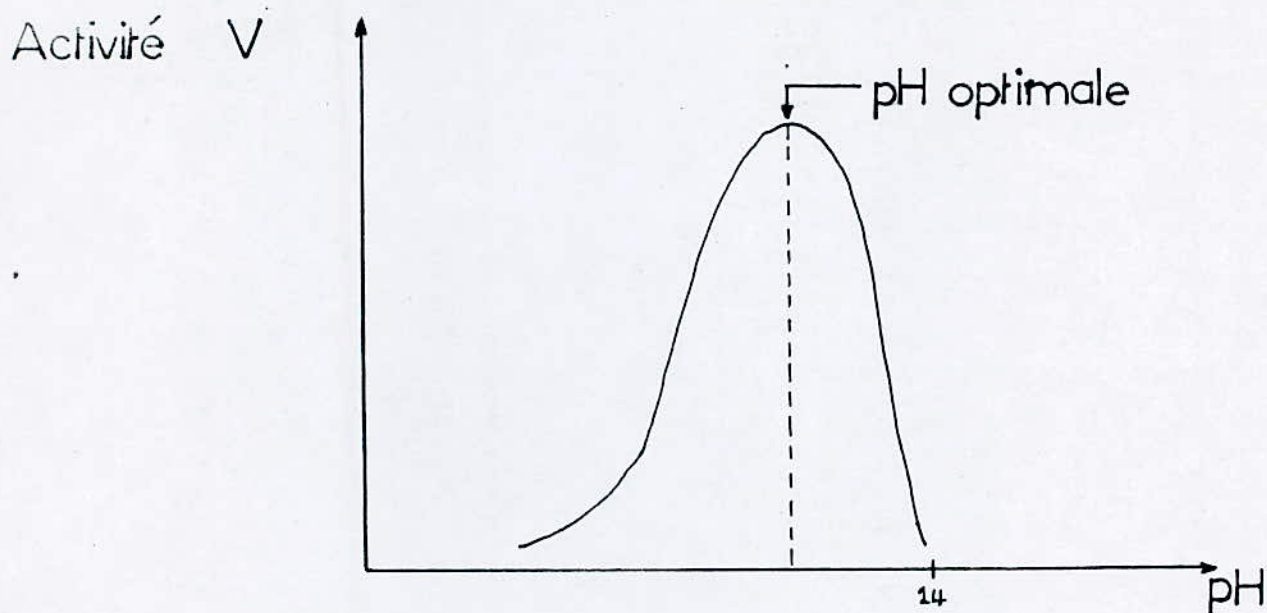


Figure 5 : évolution de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH .

Pour une enzyme donnée il y'a une action maximale qui définit le pH optimum. l'enzyme ne fonctionne que dans les limites données qui sont plus ou moins étroites

c- Agents chimiques activateurs:

Mg<sup>++</sup> pour les phosphatases.

Mn<sup>++</sup> pour les peptidases, etc ...

d- Les Inhibiteurs de la réaction enzymatique:

Ne sont envisagés ici que les inhibiteurs réversibles , qui ne dénaturent pas définitivement l'enzyme. Ils sont de deux types :

Les Inhibiteurs compétitifs:

Ce sont des composés qui présentent une certaine analogie structurale avec le substrat spécifique de l'enzyme . ils sont capables d'occuper le centre catalytique de l'enzyme à la place du substrat .



Les Inhibiteurs non compétitifs:

Ces inhibiteurs se fixent sur l'enzyme ou même sur le complexe enzyme - substrat, sans que la concentration en substrat puisse intervenir pour le déplacer, dans les cas extrêmes , il y'a modification à la fois de V<sub>max</sub> et de K<sub>M</sub>.

CAS PARTICULIER: Inhibition par excès de substrat:

soit la réaction enzymatique:



on a  $[E_L].[S] / [ES] = K_M$

$$[E_L] = [ES].K_M / [S].$$

Supposons qu'une deuxième molécule de substrat puisse



fixer sur le complexe ES et le rendre inactif: cette molécule se fixe sur un site différent du site catalytique que nous appellerons site inhibiteur. Cette molécule se comporte comme un inhibiteur:



$$[ES][S] / [ESS] = KI; \quad [ESS] = [ES].[S] / KI$$

\* Equation de conservation:

$$[E_T] = [E_L] + [ES] + [ESS] = [ES] (1 + KM / [S] + [S] / KI).$$

\* Equation de vitesse:

$$v_i / V_{max} = [ES] / [E_T].$$

$$v_i = \frac{V_{max}}{1 + KM / [S] + [S] / KI}$$

$$1 / v_i = 1 / V_{max} ( 1 + KM / [S] + [S] / KI )$$

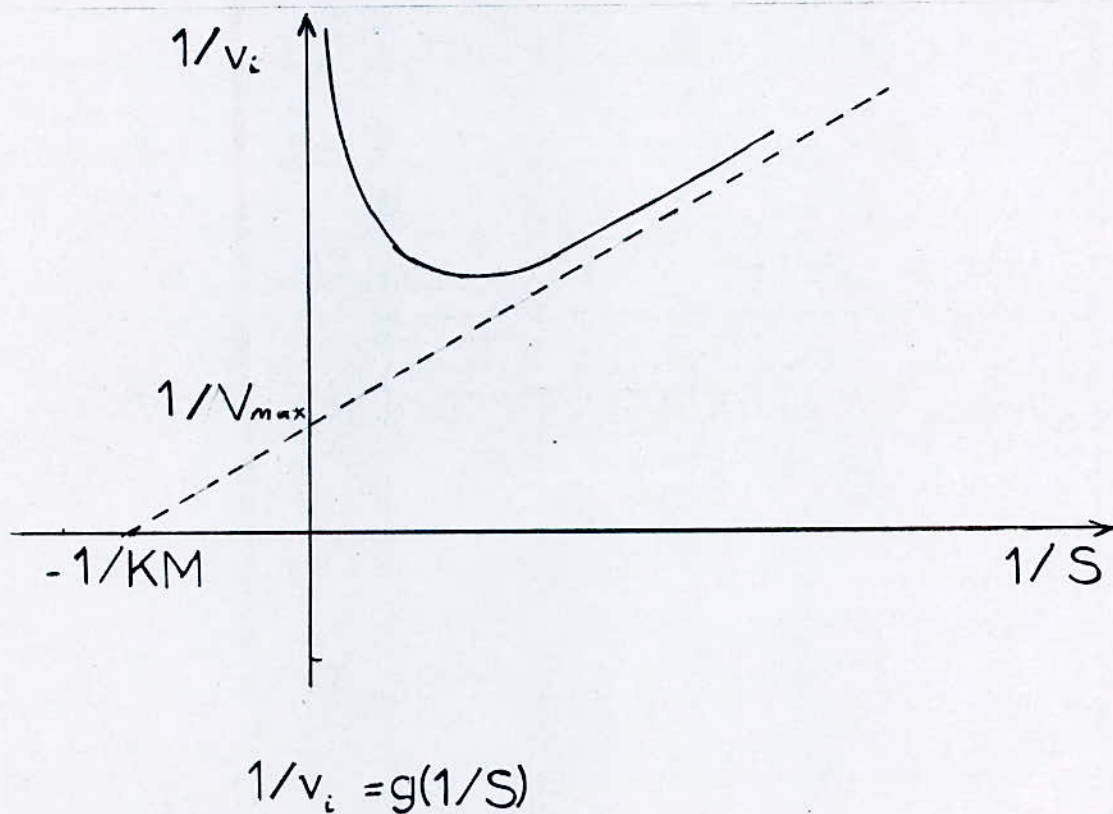
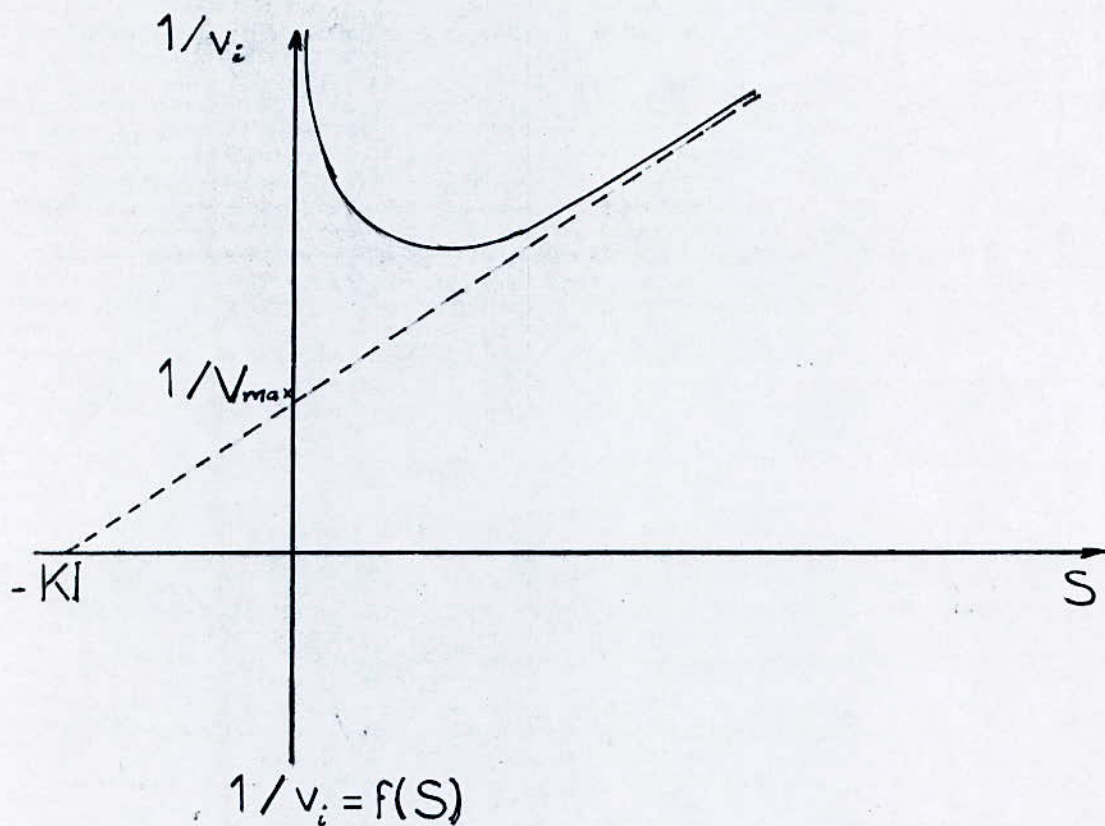
Quand on porte  $1 / v_i$  en fonction de  $1 / [S]$ , on obtient une hyperbole, dont l'asymptote oblique, de pente  $KM / V_{max}$ , coupe l'axe des  $1 / [S]$  en un point d'abscisse  $- 1 / KM$ .

Quand on porte  $1 / v_i$  en fonction de  $[S]$ , on obtient une hyperbole dont l'asymptote oblique, de pente  $1 / V_{max} KI$  coupe l'axe des  $[S]$  en un point d'abscisse  $- KI$ .

Dans les deux cas,  $v_i$  passe par un maximum pour

$$[S] = ( KM.KI )^{1 / 2} \quad (23)$$

Les représentations des deux fonctions  $1/v_i = f(S)$  et  $1/v_i = g(1/S)$  sont les suivantes:





## II.6. ETUDE MICROBIOLOGIQUE:

### II.6.1. INTRODUCTION:

Etant donné que les protéines résultants des rejets sont destinées à enrichir l'alimentation animale, il est donc nécessaire d'effectuer certaines analyses microbiologiques.

### II.6.2. IDENTIFICATION DE LA FLORE:

Le contrôle microbiologique de tout produit consiste en plusieurs études, on distingue essentiellement:

- une étude quantitative .
- une étude morphologique, qui comprend une étude macroscopique et une étude microscopique .
- une étude biochimique.

#### II.6.2.1. L'étude quantitative:

L'évaluation du nombre de bactéries présentes dans un produit a un intérêt considérable. Toute étude quantitative est précédée, en général d'une dilution du produit à étudier.

Il existe plusieurs techniques de numération bactérienne: comptage direct et comptage indirect permettant le comptage des bactéries mortes et vivantes .

Les techniques permettant la numération des bactéries vivantes (ou flore viable) sont :

- Numération en milieu solide.
- Numération en milieu liquide.

#### a - Numération en milieu solide:

on ensemence généralement deux boîtes de pétri par dilution. Le milieu gélosé liquifié à une température de 45 C est versé dans les boîtes de pétri . On dépose stérilement 1 millilitre de la suspension de la dilution la plus élevée en la dispersant en gouttes.

On étale la suspension tout en prenant le soin de marquer la dilution correspondante sur la boîte de pétri .

La température et la durée d'incubation varie selon le germe recherché. Pour interpréter les résultats on ne tient

compte que des boites contenant entre 30 et 300 colonies .le comptage des colonies se fait à l'aide d'un compteur électronique de particules .

b. Numération en milieu liquide:

On ensemence au minimum deux tubes par dilution .Lorsqu'une activité biologique se manifeste par un trouble du milieu, dépôt au fond du tube, virage du milieu initial, production de gaz, on peut dire qu'il y'a développement de germes.

Pour interpréter les résultats, on utilise la table de MAC GRADY. Cette méthode utilisant des dilutions est basée sur le fait qu'après ensemencement d'un milieu liquide, toute croissance microbienne indique la présence d'au moins un germe. Après culture, on procède à la lecture des résultats .Sont comptés positifs les tubes qui présentent une croissance et négatifs les autres.

Pour chaque série de culture issues de la même dilution on compte le nombre de tubes positifs. Soit :0, ou 2 pour deux tubes. On compose alors un nombre caractéristique. Il est formé par les chiffres correspondants à trois dilutions successives. La première dilution utilisé étant la plus concentrée ayant donné un résultat positif pour tous les tubes.

La table de MAC GRADY (pour deux tubes) nous donne, pour chaque nombre caractéristique, le nombre le plus probable (NPP) de cellules correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique (18).



Nombre caractéristique	Nombre de cellules(1g:1ml)
000	0.0
001	0.5
010	0.5
011	0.9
020	0.9
100	0.6
101	1.2
110	1.3
111	2.0
120	2.0
121	3.0
200	2.5
201	5.0
210	6.0
211	13.0
212	20.0
220	25.0
221	70.0
222	110.0

tableau No 5: table de MAC GRADY pour deux tubes (15).

exemple d'utilisation :

Si pour une série de dilution en double de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ :

$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
++	++	+-	--	--
On a 2	2	1	0	0

└──────────────────────────┘

Alors le nombre caractéristique sera de 210

La lecture du tableau donne pour 210  $\rightarrow$  6.0 qu'en le multipliant par la dernière dilution entièrement positive.

on aura ainsi un nombre de germes:

$$6.0 \cdot 10^{+2} = 600 \text{ germes/ml.}$$

Etude morphologique

L'étude morphologique comprend deux sortes d'études: Microscopique et Macroscopique.

a- Etude macroscopique:

Les colonies sont étudiées à l'oeil nu ou à la loupe binoculaire. Ceci nous permet de citer certaines de leurs caractéristiques :

- La forme générale, de profil.
- La surface.
- Les bords.
- L'opacité.
- La pigmentation des colonies.
- La consistance.
- Odeur : présente ou absente.

Lorsque la culture est un bouillon nutritif, la croissance peut se présenter sous différentes formes:

- Formation d'une pellicule : une masse de cellules flotte en surface.
- Sediment : dépôt de cellules au fond du tube.
- Turbidité plus ou moins abondante



#### b- Etude microscopique:

L'étude microscopique consiste en l'étude morphologique de la cellule bactérienne. Elle se fait sous microscope.

Il existe trois formes essentielles de bactéries :

1. Les bacilles
2. Les coques
3. Les spirilles.

Les techniques de base sont:

L'état frais qui consiste à observer les bactéries dans une gouttelette d'eau afin d'apprécier la mobilité des bactéries.

La deuxième technique consiste en une simple coloration du frottis bactérien par la fushine phénique de ziehl. On distingue aussi la coloration de gram, c'est une double coloration du frottis bactérien fixe

- le violet de gentiane (cristal violet) est déposé sur le frottis durant une minute puis rejeter le colorant sans laver.

- recouvrir la lame de Lugol (fixateur). on le jette au bout de 45 secondes

- Laver abondamment à l'eau courante.

- Décolorer à l'alcool à 90 degrés. On arrête l'opération lorsque l'alcool qui s'écoule soit incolore.

- Verser sur la lame quelques gouttes de fushine de ziehl.

Laisser agir une minute.

- Laver à l'eau courante, égoutter puis sécher.

- Observer la préparation au microscope à l'immersion grossissement (100x 10)

les bactéries qui gardent la coloration primaire (violet de gentiane) sont dites gram positives (Gr+). Celles qui sont décolorées par l'alcool et qui prennent la couleur du second colorant (fushine) sont dites gram négatives (Gr-).

#### II.6.2.3. TESTS BIOCHIMIQUES:

Les tests biochimiques permettent de constater le comportement d'un germe sur un milieu spécifique:

type respiratoire en aérobiose par voie oxydative en anaérobiose par voie de fermentation.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**



### III. PARTIE EXPERIMENTALE:

#### III.1. ETUDE BIOCHIMIQUE

Pour l'étude biochimique, on s'intéresse surtout à la préparation d'une enzyme peu coûteuse à partir de l'estomac du mouton. Une fois cette opération réalisée, nous avons suivi la cinétique d'hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs par l'enzyme préparée.

Préalablement, une étude permettant de fixer les conditions d'activité optimale de la pepsine préparée a été menée et/ou les paramètres pris en compte sont le pH, la température ...etc. l'activité de l'enzyme préparée, dans ce dernier cas, est mesurée sur un substrat protéique standard choisi: La Bovine Serum Albumine .

- Le premier objectif est de préparer la matière première à partir de laquelle est extrait l'enzyme.

- Le deuxième objectif est de déterminer les conditions optimales d'activité de pepsine préparée lors de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat standard .

- Le troisième objectif consiste en l'hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs, proproment dit, et/ou la cinétique de cette hydrolyse sera déterminée.

#### \* Matériel et produits chimiques:

Le matériel et produits chimiques utilisés pour mener à bien cette étude est composé comme il suit:

- Muqueuse d'estomac de mouton.

- Pepsine à l'état brut préparée par autodigestion de la muqueuse stomacale a pH acide.

La B.S.A (SIGMA CAMPAGNIE) utilisée comme substrat standard lors des expériences effectuées pour fixer les conditions optimales d'activité de la pepsine préparée .

- papier whatman NO 3.

- Acide chlorydrique (HCl) à différentes normalités :

- 0.01N utilisé pour la préparation de la solution de pepsine à l'état brut.

- 4N utilisé lors de l'ajustement du pH .

- Acide trichloroacétique (TCA): 4% et 20% pour précipiter les protéines non hydrolysées par la pepsine.

### III.1.2. PREPARATION DE LA PEPSINE BRUTE:

L'estomac du mouton issu de l'abattoir juste après avoir égorgé le mouton, est vidé de son contenu puis bien nettoyé à l'eau froide avec un morceau de verre lisse, pour éviter toute détérioration ou formation de mucus.

La muqueuse est décollée puis rapidement plongée dans de la glace. La muqueuse est ensuite hachée à l'aide d'une hache viande et congelée dans des sacs en plastiques pour toute utilisation ultérieure.

Avant de peser la quantité désirée de la muqueuse congelée, il convient de déterminer son équivalence en poids sec. La valeur de la quantité voulue est multipliée par le rapport du poids de muqueuse humide sur le poids de la muqueuse sèche.

#### EXEMPLE:

soit une masse  $m_1$  quelconque de muqueuse congelée, placée dans une cellule en porcelaine et portée à l'étuve à une température de  $105^{\circ}\text{C}$  pendant une durée de 24 heures.

La masse  $m_1$  est repesée à la sortie de l'étuve. on aura alors une masse  $m_2$  qui est inférieure à  $m_1$  et le rapport sera égal à  $m_2/m_1$ .

#### \* - Activation de la muqueuse:

Quatre quantités, égales et bien déterminées, de muqueuse congelée 50mg (ce qui équivaut à 8,82mg de muqueuse en poids sec) sont mises dans une série de 4 béchers puis chacune est mélangée avec 100ml d'HCL 0.01N.

Chaque échantillon est continuellement agité avec un agitateur magnétique et ceci pendant 6 heures. Le pH est ajusté à des valeurs de 1.0, 1.5, 1.75 et 2 durant les premières 30 minutes à l'aide d'HCL concentré (4N).



Les 4 échantillons sont mélangés en fin d'agitation à des solutions de HCL(0.01N) jusqu'à atteindre un volume final de 500 ml.

La solution de pepsine ainsi préparée à des pH différents est conservée à une température fixée à 4°C pendant une dizaine de jours à un pH compris entre 1.7 et 2.

Cette solution de pepsine préparée peut être utilisée lors de toute étude effectuée sur son activité, ceci est possible car la solution a une activité stable durant cette conservation mais tend à décroître après 10 jours (selon Ling Lin Liu et George M. Pigott (21))

Ceci est vérifié durant les expériences ultérieures.

### III.1.3.DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITE DE LA PEPSINE PREPAREE:

#### III.1.3.1.DETERMINATION DU pH OPTIMAL D'ACTIVITE DE LA PEPSINE PREPAREE:

Après la préparation de la solution de pepsine par autodigestion de la muqueuse de l'estomac du mouton en milieu acide et aux pH cités auparavant, des essais de l'activité de la pepsine sont effectués sur un substrat standard qui est la Bovine - Serum - Albumine (B.S.A) .Ces essais sont effectués durant la conservation à 4°C afin de vérifier si l'activité reste stable.

#### III.1.3.1. DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTIVITE DE LA PEPSINE PREPAREE:

250 mg de muqueuse en poids sec sont mélangés à 100ml d'HCL 0.01N (selon Ling Lin Liu et George M. Pigott (21)).

Le pH optimal trouvé précédemment est ajusté durant les 30 premières minutes de l'agitation avec de l'HCL concentré . on additionne au mélange en fin d'agitation de l'HCL 0.01N

jusqu'à atteindre un volume final de 500 ml. Une fois la solution brute préparée, on procède à des essais de l'activité de pepsine à différentes températures.

Ces essais de l'activité sont effectués sur le même substrat standard précédent c'est à dire la Bovine Serum Albumine (B.S.A).

une fois les conditions optimales de pH et de température déterminées et fixées. On procède à l'étude de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs.

### III.1.3.3. ETUDE DE LA CINÉTIQUE D'HYDROLYSE DES REJETS SOLIDES D'ABATTOIRS PAR LA SOLUTION BRUTE DE PEPSINE:

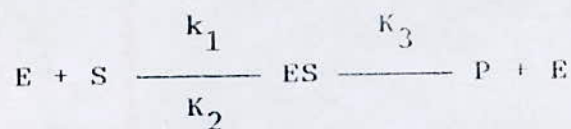
Les rejets solides d'abattoirs sont recueillis à l'état frais et broyés dans une hache viande jusqu'à l'homogénéisation .

Avant de préparer la solution de notre substrat, on détermine le poids sec équivalent du rejet broyé. C'est à dire si on veut par exemple déterminer une solution de substrat à 5%, on détermine d'abord le poids humide de notre rejet qui correspond à 5g en poids sec. ensuite on complète le poids humide trouvé avec de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml et on aura ainsi une solution à 5% de rejet.

Le processus d'hydrolyse est obtenu par la mise en contact de la solution de pepsine brute préparée avec des solutions de substrats à différentes concentrations.

On fait varier la concentration en substrat dans le but de calculer la vitesse initiale de la réaction qui est mesurée à l'aide de la tangente à l'origine de la courbe p en fonction du temps.

Ici p représente le produit formé au bout du temps t.





### III.1.4 ESSAI DE L'ACTIVITE DE LA PEPSINE PREPAREE A DIFFERENTS pH

Ces essais de l'activité de la pepsine préparée sont effectués afin de déterminer et fixer le pH optimal d'activité de la pepsine. on pourra ainsi conclure a quel pH l'activité de la pepsine reste stable durant toute la periode de conservation.

Deux essais d'activité sont effectués pour chaque pH afin d'obtenir des résultats assez exacts.

4ml de la solution de pepsine préparée sont pipettés dans une série de huit tubes numérotés. Le pH de la solution de pepsine est indiqué sur chaque tube .

1 ml d'une solution de substrat a 2.5% de B.S.A (Bovine Serum Albumine) ramenée à température optimale d'essai est ajouté à chacun des huit tubes à essai contenant les solutions pepsiques préalablement ramenées à la température optimale d'essai .

les tubes sont incubés toujours à température optimale d'essai pendant 10 mn.

6ml d'une solution de TCA (trichloroacétique) à 4% sont ajoutés à chacun des huit tubes de la série pour stopper la réaction et précipiter les protéines restantes non hydrolysées .

Après 5 a 10 mn, toutes les préparations sont filtrées à travers le papier Whatman N°3

La lecture de l'activité de la pepsine sur la B.S.A (Bovine Serum Albumine) se fait au spectrophotomètre à 280 nm par absorbance des rayons ultraviolets par les acides aminés solubles dans le TCA(trichloroacétique).

Le zéro du spectrophotomètre est fixé à l'aide de l'eau distillée.

Les résultats sont représentés graphiquement et interpréter.

### III.1.5. ESSAI DE L'ACTIVITE DE LA PEPSINE BRUTE ET COMMERCIALE A DIFFERENTES TEMPERATURES:

Pour plus d'exactitude on effectue deux essais de l'activité pour chaque température et pour chaque type de pepsine. on disposera alors d'un total de 24 tubes, étant donné que l'on choisit 10 températures différentes pour chaque type de pepsine.

4 ml de pepsine (brute et commerciale) sont pipettés dans les 20 tubes.

1ml d'une solution de substrat à 2.5% de B.S.A ( Bovine Serum Albumine ) ramenée à la température d'essai est ajouté à chacun des tubes contenant les solutions de pepsine préalablement chauffées aux températures d'essai. Les températures d'essai choisies sont: 23°C, 30°C, 35 °C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C

Les tubes sont incubés pendant 10 mn à ces différentes températures. Ensuite 6ml d'une solution de TCA (Trichloroacétique) à 4% sont ajoutés à chacun des tubes de la série pour stopper la réaction et précipiter les protéines non hydrolysées par l'enzyme.

Après 5 à 10 mn, toutes les préparations sont filtrées à travers le papier Whatman N°3.

L'activité des deux types de pepsine est estimé spectrophotométriquement à 280 nm en fixant le zéro à l'aide de l'eau distillée choisi comme étant le blanc.

Les résultats de ces activités, à différentes températures sont représentés graphiquement, interprétés et comparés afin de déduire à quelle température l'activité de la pepsine est maximale.



### III.1.6.DOSAGE DES PROTEINES:

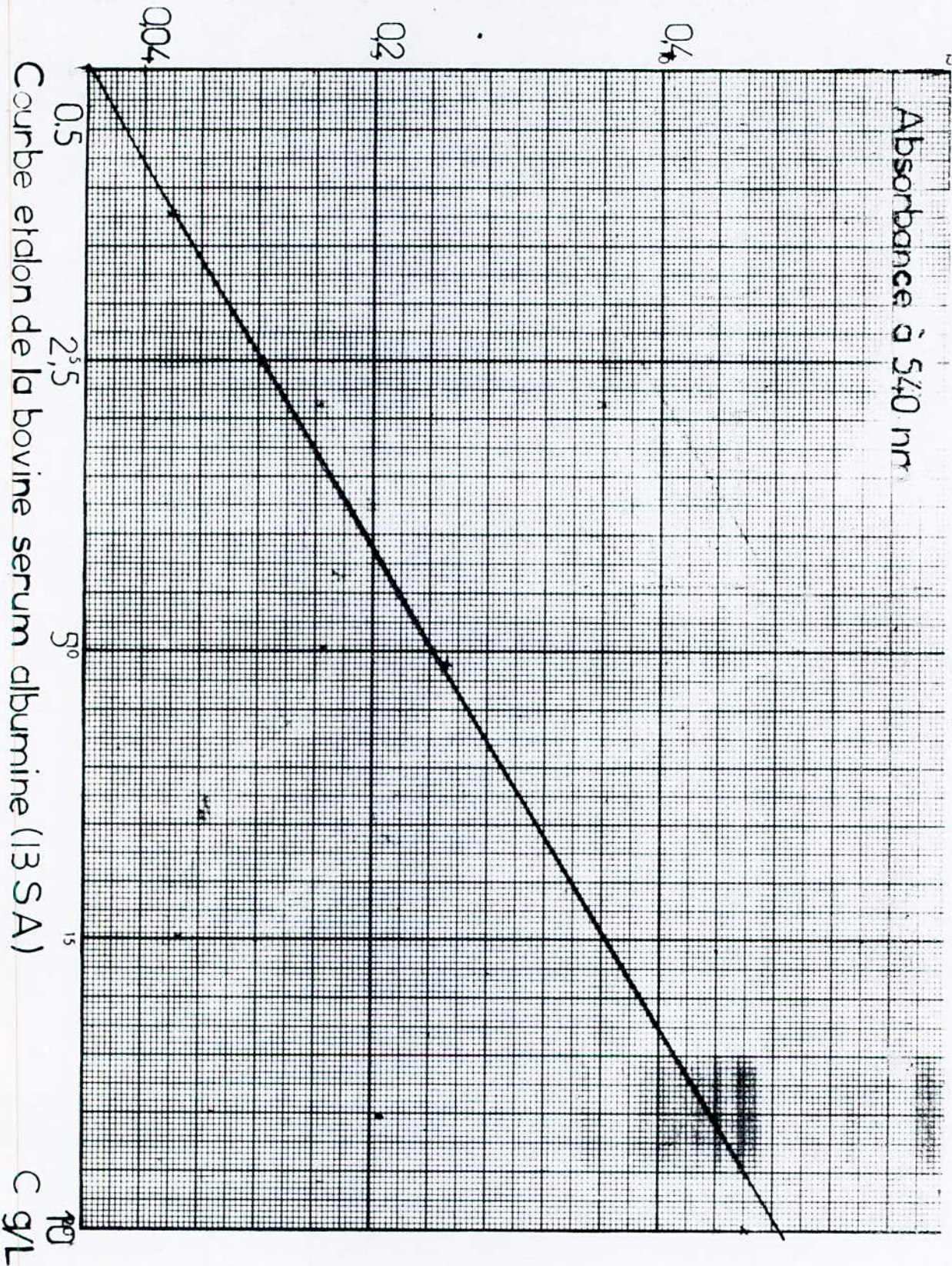
Le dosage des protéines peut se faire selon deux voies différentes: soit directement en utilisant certaines propriétés chimiques ou physiques des protéines lorsque les caractéristiques du produit permettant de les mettre en évidence, soit par le dosage de l'azote après destruction de la matière organique.

Le choix de la méthode de dosage dépendra de la nature du produit, de l'utilisation des résultats, des moyens disponibles d'analyse et du nombre d'échantillons à traiter(9).

Dans notre exposé, nous avons opté pour la méthode du biuret, c'est une méthode chimique, elle est caractérisée par le développement de la coloration pourpe du complexe des ions cuivriques avec les liaisons peptidiques en milieu alcalin.



Absorbance à 540 nm



Courbe etalon de la bovine serum albumine (BSA)

C g/L



### III.1.7. MODE OPERATOIRE DE LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DES REJETS SOLIDES D'ABATTOIRS:

On remplit une série de 4 erlenmeyers avec 50ml de solution de substrat a différentes concentrations préparés comme il a été décrit précédemment. Par la suite on place les erlenmeyers au bain marie à 30 °C pendant 10mn, temps pendant lequel on prépare 20 tubes à essai propres et secs 10 petits entonnoirs munis de filtre en papier Whattman N°3

En fin on met 5ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20% dans 10 tubes préparés. A un instant 0 choisi, on met dans l'erlenmeyer N°1 5ml de solution de pepsine à 18 mg/ml.

Avec une pipette à large pointe (écoulement rapide) en agitant bien. A 3 minutes exactement, on prélève 2ml de ce milieu homogène et on le transpose dans un tube contenant déjà 5ml d'acide trichloroacétique TCA à 20%.

De la même façon on refait un prélèvement homogène de 2ml à cet erlenmeyer au bout de : 5mn, 10mn, 15mn, 20mn, 25mn, 30mn, 1h, 2h, 3h, 4h de réaction. 30 mn après le démarrage de l'erlenmeyer N° 1 (c'est à dire la première concentration du substrat), on met 5ml de la solution d'enzyme dans l'erlenmeyer N° 2 et on refait les mêmes opérations que pour l'erlenmeyer N° 1. De même pour les erlenmeyers N° 3 et 4 (pour chaque concentration en substrat on utilise 20 tubes comme il a été décrit auparavant ).

Après chaque prélèvement de 2ml du milieu réactionnel on attend 10mn pour la coagulation des protéines, puis à l'aide des entonnoirs préparés, on filtre le contenu des 10 premiers tubes dans les autres qui sont vides .

Ensuite on additionne à 1ml de chaque filtrat 4 ml de réactif de cornall. Après conservation, du filtrat mélange au réactif de cornall, à l'obscurité et à température constante (température ambiante) pendant 30mn, on mesure alors la DO de

chaque tube à  $\lambda = 540\text{nm}$ .

Pour chaque concentration de substrat la courbe DO en fonction du temps peut être établie.

On trace la tangente à l'origine et on prend la valeur  $V_i$  pour 1mn en unité arbitraire.

Ainsi les courbes  $V_i = f(S)$  et  $1/V_i = f(1/S)$  peuvent être représentés facilement.

REMARQUE: les concentrations en protéines hydrolysées déterminées après 2h et 4h permettent d'évaluer le taux d'hydrolyse réalisée par une enzyme brute .



### III.2. ETUDE MICROBIOLOGIQUE DES DECHETS D'ABATTOIRS:

#### III.2.1 - MATERIEL DU LABORATOIRE:

Le matériel nécessaire à l'analyse microbiologique consiste en:

- un autoclave
- une étuve
- un four pasteur
- bec bunsen
- bain marie
- microscope optique
- boîtes de pétrie
- pipettes graduées stériles
- pipettes pasteur stériles
- Anse de platine à boucle et à fil droit
- tubes stériles
- éta-loirs
- béc-hers , pissettes
- pôt rempli d'eau de javel
- pour la dilution on utilise de l'eau physiologique stérile

#### III.2.2 - MILIEU DE CULTURE.

on distingue deux types essentiels: les milieux d'isolements et les milieux d'identification. Il sont choisis selon les germes recherchés et ils se présentent sous deux formes liquide et solide.

\* - milieux d'isolement

chaque germe recherché a un milieu d'isolement spécifique:

- gélose tryptone, glucose extrait de levure (TGEA) pour l'isolement de la flore totale.
- milieu Chapman pour l'isolement des staphylocoques .
- milieu Rothe pour l'isolement des streptocoques.
- milieu Eva-Litsky pour confirmer la présence des

streptocoques

- gélose viande-foie pour l'isolement des sulfito - réducteurs
- bouillon au sélénite pour l'enrichissement des salmonelles.
- gélose SS qui permet l'isolement des salmonelles.

\* - milieux d'identification.

ils permettent d'identifier les germes suivant des caractères biochimiques

- gélose au sang pour mettre en évidence la propriété hémolytique des streptocoques.

- bouillon lactose BCPL au bromocrésol pourpre avec cloche pour mettre en évidence la fermentation du lactose par les coliformes.

- milieu Simmons au citrate: recherche de la citratase

- gélose lactose glucose SH<sub>2</sub> pour identifier les caractères biochimiques des salmonelles.

- Bouillon pour la recherche de la staphylocoagulase. ce milieu permet l'identification des staphylocoques pathogènes s'il y'a production d'une staphylocoagulase par ces germes.

- Milieu urée-indole de fergusson: recherche de l'uréase et de l'indole.

- plasma citrate de lapin: test de la patogénicité des staphylocoques.

- gélatine nutritive: hydrolyse de la gélatine.

### III.2.3. METHODE D'EVALUATION DE LA FLORE:

les étapes à suivre pour l'étude bactériologique des rejets solides d'abattoirs sont les suivantes :

a- Prélèvement



1- on fait un bon choix du lieu de prélèvement pour assurer un échantillonnage adéquat.

2- Le prélèvement est effectué au voisinage d'une zone stérile (bec bensen) dans des flacons stérilisés préalablement.

3- Le transport des échantillons se fait à l'aide d'une glacière à une température de 4°C.

4- On entame les analyses le plutôt possible après le prélèvement, au plus tard 8h. (15)

b- Préparation de la solution mère :

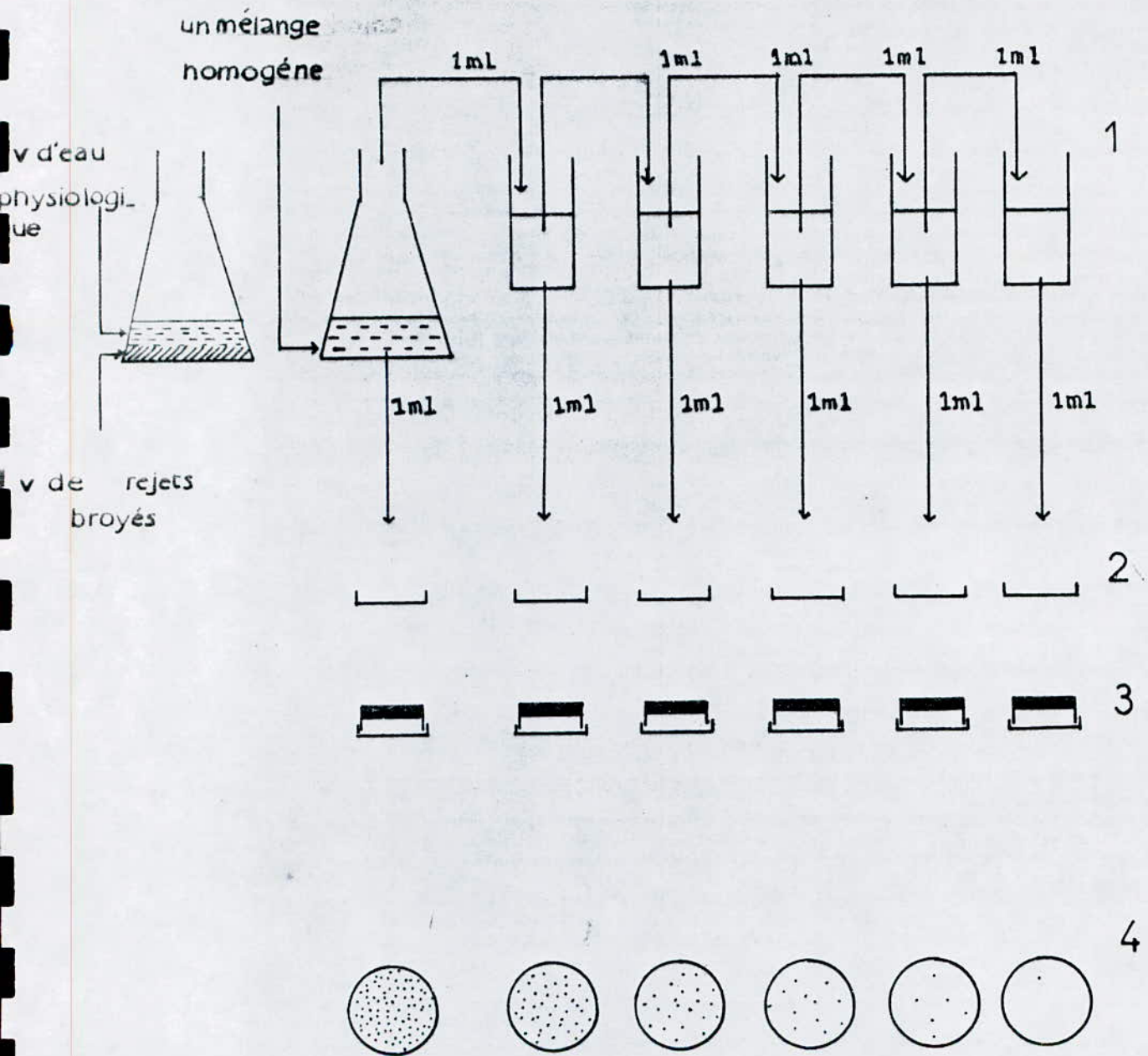
Les déchets sont broyés, dans des conditions stériles, et bien mélangés afin d'obtenir un mélange homogène. dans une éprouvette on prend un volume quelconque de ce mélange homogène (10ml) et on ajoute un volume équivalent d'eau physiologique. On obtient ainsi une solution (1/1) ou (V/V) . on mélange très bien le contenu de l'éprouvette et on reparti stérilement 9 ml d'eau physiologique dans une série de 5 tubes numérotés.

A partir du mélange contenu dans l'éprouvette, on prélève 1ml à l'aide d'une pipette graduée stérile.

Le liquide prélevé est introduit aseptiquement dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique.

on a réalisé ainsi une dilution au 1/10 ou ( $10^{-1}$ )  
L'opération sera répétée jusqu'a la dilution  $10^{-5}$  (figure 6)  
On dépose au fond des boites de pétri 1ml de chaque dilution, puis on coule la gélose en surfusion dans les boites de pétri et on homogénéise la préparation par des mouvements lents de rotation.

pour chaque dilution on utilise deux boites de pétri.



- 1\_ dilutions décimales
- 2\_ ensemencements
- 3\_ incubation
- 4\_ dénombrement

figure 6: Standarisation de la solution mère.



On incube la moitié des boites à 22°C pendant deux à trois jours et l'autre moitié à 37°C pendant 24 heures.

Une fois la durée d'incubation est fini, on choisira comme solution mère la dilution correspondant aux boites de pétri présentant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 pour réaliser les analyses ultérieures

Si on trouve tous les boites de pétri indénombrable, on refait l'opération en augmentant le volume d'eau physiologique c'est à dire on prend 1V/2V, 1V/3V ...etc, jusqu'a l'obtention de la solution mère convenable.

REMARQUE: On a choisi la flore total comme référence pour la préparation de la solution mère . Ceci parsqu'elle nous permet d'avoir un aperçu du degré de contamination des rejets solides d'abattoirs.

Plus le nombre de colonies est grand sur le milieu de culture plus il existe de contamination.

### III.2.5. DILUTION A PARTIR DE LA SOLUTION MERE:

on répartit stérilement 9ml d'eau physiologique dans une série de 5 tubes numérotés.

A partir du tube contenant la solution mère on prélève 1ml grace à une pipette graduée stérile. on introduit aseptiquement le liquide prélevé dans un tube contenant 9ml d'eau physiologique, on a ainsi une dilution de  $10^{-1}$ . On refait la même opération jusqu'a la dilution  $10^{-5}$ .

### III.2.4 - RECHERCHE DE LA FLORE TOTALE:

La recherche de la flore totale s'effectue comme il a été décrit dans la préparation de la solution mère. En utilisant directement la solution mère trouvée précédement.

### III.2.6 RECHERCHE DES COLIFORMES ET DES ESCHERICHIA-COLI:

Les caractères généraux des coliformes appartenant à la famille des entéro-bacteriaceae sont:

- Bactéries à gram négatif.
- bacilles de dimensions moyennes 0,5 sur 3micron
- immobiles ou mobiles grace à une ciliature péritriche.
- se développent aisement sur milieux ordinaires.
- Aérobie facultatifs.
- fermentent le glucose avec ou sans gaz (17)
- Ne possèdent pas d'oxydase.
- capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à une température de (35-37) ( $\pm$  0,5°C) (16)

#### a - RECHERCHE DES COLIFORMES TOTAUX:

##### MODE OPERATOIRE:

Le milieu choisi est le bouillon lactose au bromocrésol pourpre avec cloche pour détecter l'utilisation du lactose.



A partir de chaque dilution on ensemence deux tubes par 1ml.

Ces tubes sont incubés à 30 °C pendant 48 heures.

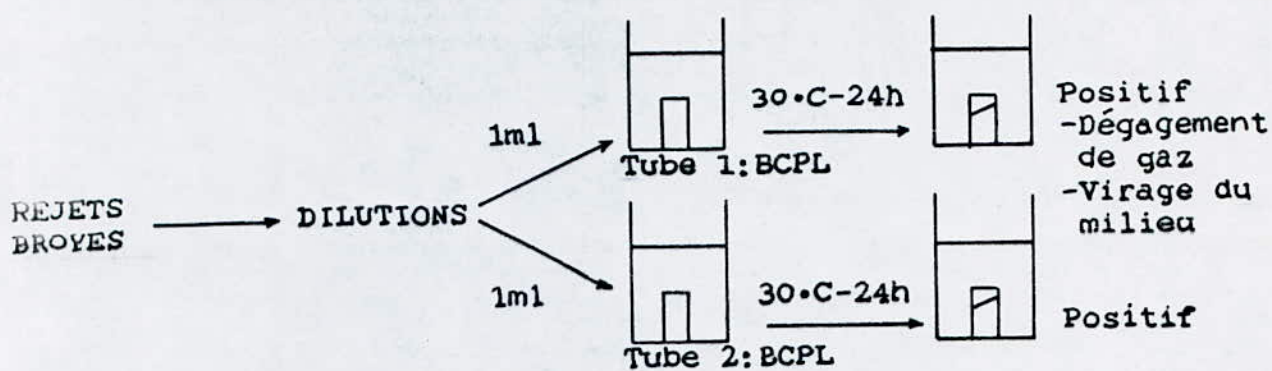
Lorsqu'on remarque un virage du milieu et un dégagement gazeux suffisant (1/10 du volume de la cloche) la réaction est positive. (19)

Le nombre de cellules bactériennes est déterminé sur la table de Mac GRADY et ceci après avoir composé le nombre caractéristique. La présence de coliformes est un indice de contamination fécale.

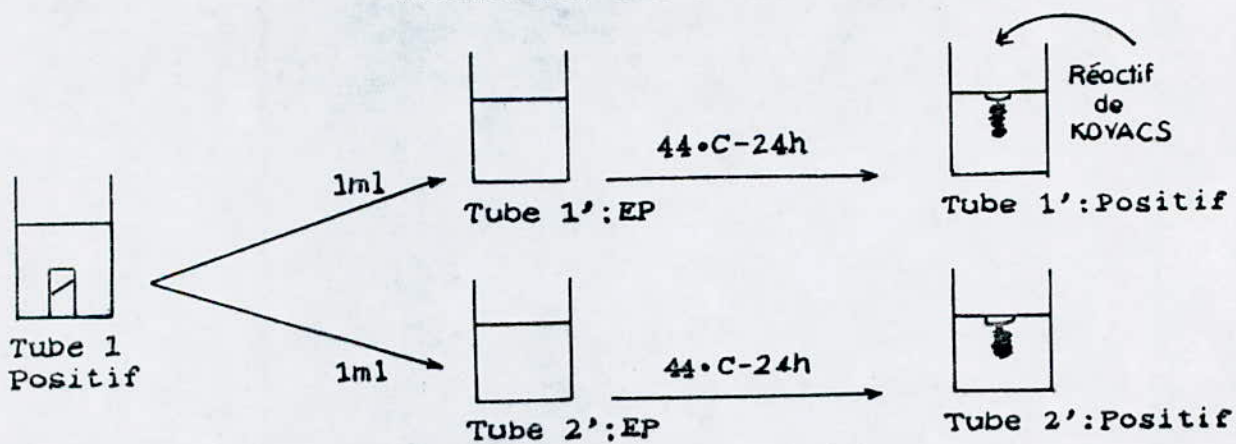
B - RECHERCHE DES ESCHERICHIA COLI (E- coli):

MODE OPERATOIRE:

Le milieu choisi est l'eau peptonée exempte d'indole. L'ensemencement se fait à partir d'un tube positif. L'incubation s'effectue à 44°C pendant 24 heures. Un trouble du milieu après incubation témoigne de la production d'indole et donc de la présence de E-coli . Des tests biochimiques sont alors effectués pour confirmation: recherche d'uréase, gélatinase, citratase.(figure 7)



Recherches des Coliformes Totaux



Recherches des E-COLI

BCPL: Bouillon lactose au bromocrésol pourpre avec cloche

Ep: Eau peptonée exempte d'indole.

figure 7: Recherche des coliformes et Esherichia-coli.



### III.2.7. RECHERCHE DES STREPTOCOQUES:

Les caractères généraux des streptocoques appartenant à la famille des streptococcacea sont:

- Coques à gram négatifs.
- Groupes en chaînette.
- anaérobies facultatifs.
- Catalase - : pas de dégagement de gaz par la culture au contact d'eau oxygénée à 10%.

#### MODE OPERATOIRE:

Deux milieux sontensemencés pour la recherche des streptocoques:

- Milieu Rothe pour déceler toute présence de streptocoques fécaux.
- Milieu Eva-Litsky pour confirmer leur présence.

Les milieux Rotheensemencés sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les tubes présentant un louche microbien sont repiqués sur le milieu Eva-Litsky pour confirmation.

Les milieux Eva-Litsky sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

La présence d'un trouble confirme la présence de streptocoques.(figure 8)

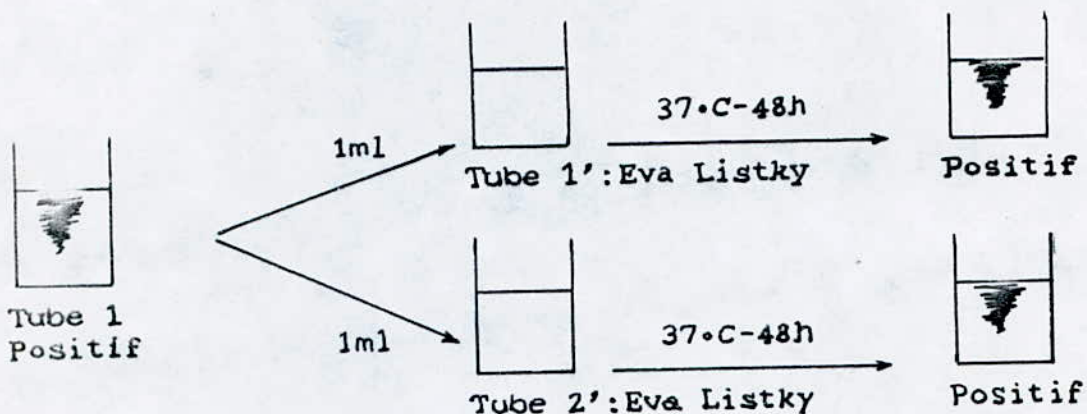
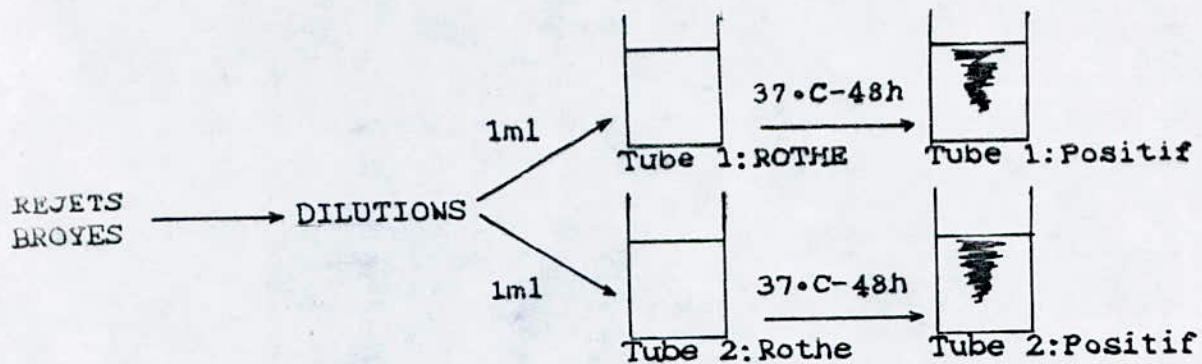
#### TEST DU POUVOIR PATHOGENE DES STREPTOCOQUES:

La gélose au sang de mouton est utilisé à cet effet.

Les boites de pétri contenant cette gélose sontensemencés à partir des tubes positifs des milieux Eva Litsky, puis incubés pendant 24 heures à 37°C.(figure 8).

les streptocoques pathogènes déterminent sur ce milieu différentes zones d'hymolyse, à savoir:

- large auréole claire d'hémolyse complète par un bord net: hémolyse  $\beta$ .
- halo étroit d'hémolyse incomplète: hémolyse  $\alpha$ .(17)



### Recherche des Streptocoques Fécaux

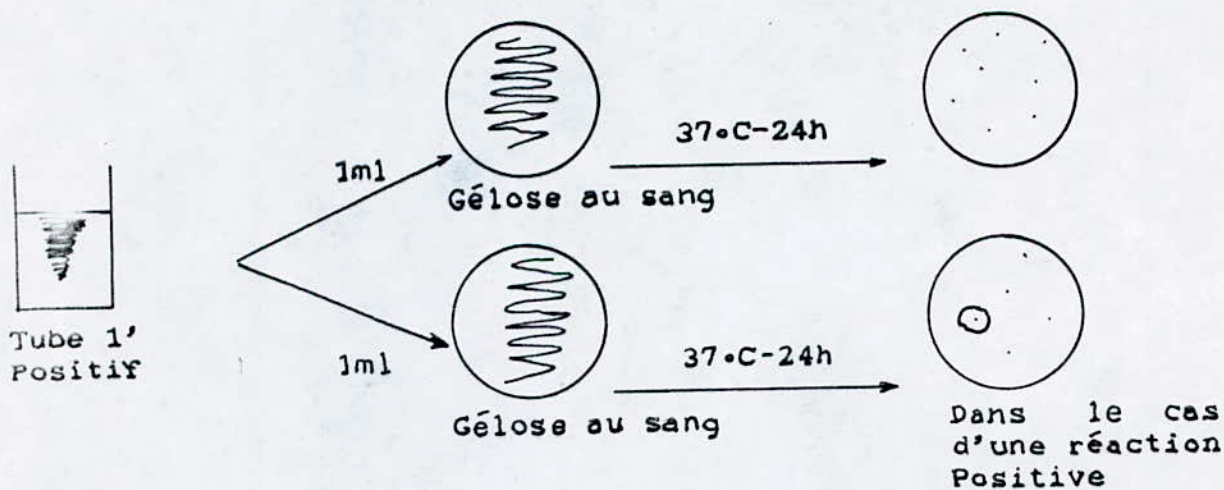


Figure 8: Recherche des streptocoques fécaux et de leur pouvoir hémolytique.



### III.2.8. RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES:

les caractères généraux du genre staphylocoque appartenant à la famille des micrococaceae sont:

- coques Gram positif
- dimension de 0.8 à 1micron de diamètre
- catalase +
- aéroanaérobies facultatifs.
- fermentent le glucose en anaérobiose. (22)

#### MODE OPERATOIRE:

La détermination des staphylocoques se fait sur un milieu spécifique: Le milieu Chapman.

Les boîtes de pétriensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. les colonies de staphylocoques s'y développent en s'entourant d'un halo clair(jaune).

Cette recherche est suivie par le test de pathogénéicité des staphylocoques.

#### TEST DU POUVOIR PATHOGENE:

Il débute par la recherche de la staphylocoagulase. les colonies suspectes sontensemencées sur bouillon spécial pour la recherche de la staphylocoagulase. les bouillons sont incubés 18 à 24 heures à 37°C.

- Dans un tube à hémolyse stérile, on mélange 0.5 ml de culture en bouillon de staphylocoques à tester et 0.5 ml de plasma citrate de lapin.

Le mélange est porté à l'étuve à 37°C. l'apparition de la coagulation est surveillée en faisant des lectures fréquentes au bout d'une demi heure, une heure, deux heures, quatre heures, et vingt quatre heures.

Les staphylocoques sont pathogènes si la coagulation apparaît pendant la période des vingtquatre heures.

### III.2.9. RECHERCHE DES SULFITOREDUCTEURS:

Parmi les sulfitoréducteurs, on a essentiellement le genre clostridium appartenant à la famille des Bacilliaceae dont les caractères généraux sont :

- bacilles Gram positif.
- anaérobies strictes.
- généralement mobiles.
- sporules. (22)
- espèces saprophytes et pathogènes. (17)
- MODE OPERATOIRE:

Le milieu choisi àensemencer est le milieu viande-foie.

Un millilitre de chaque dilution effectuée est prélevé dans un tube à hémolyse stérile et plongé dans un bain marie porté à 80°C pendant 20mn.

(Ceci permet de détruire toute forme végétative )

chaque tube est ensuite refroidi rapidement.

en parallèle on liquéfie la gélose viande-foie à 45°C.

On dépose quelques gouttes de chaque dilution au fond des boîtes de pétri et on coule la gélose viande-foie.

L'inoculum est mélangé uniformément par un mouvement lent de rotation

Après solidification une deuxième couche de gélose assez épaisse est coulée au dessus de la première couche.(figure 9)  
Deux essais sont effectués.

on a ainsi établi des conditions d'anaérobiose stricte.

on a incubé les boîtes de pétri à 37°C pendant 48 heures.

les colonies noires témoignent de la présence des clostridiums. (figure 9)



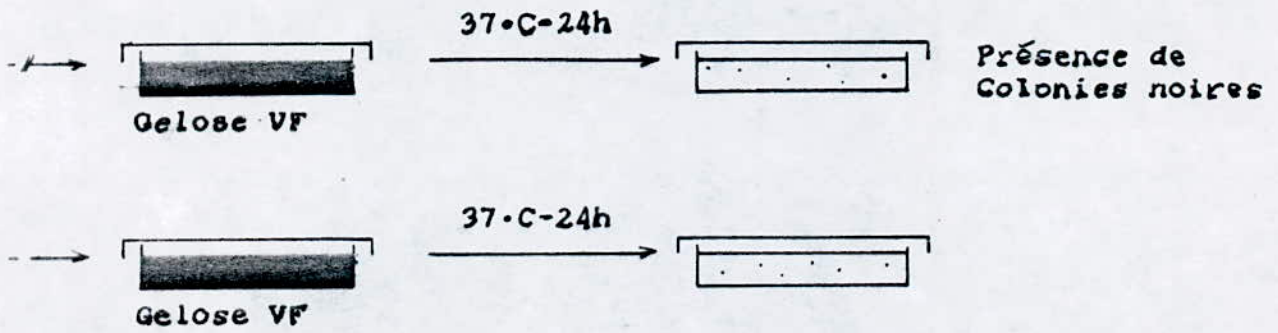
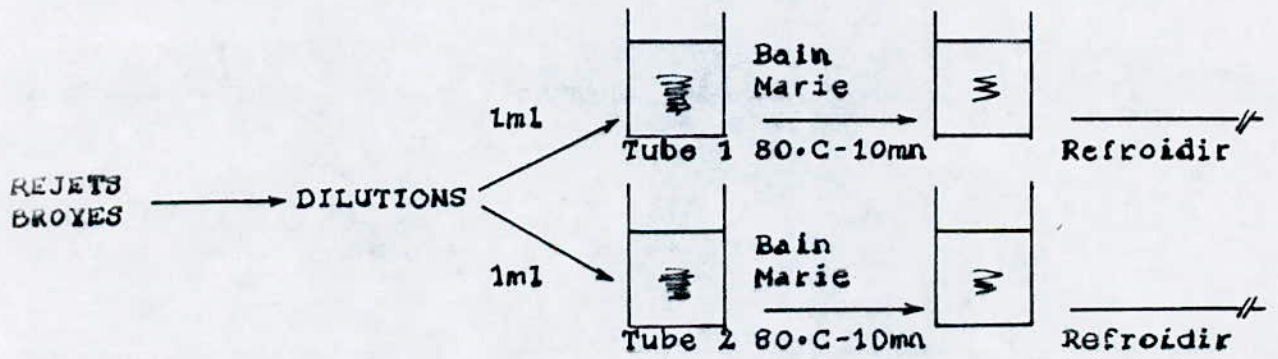


Figure 9: Recherche des Clostridium

### 111.2.10. RECHERCHE DES SALMONELLES:

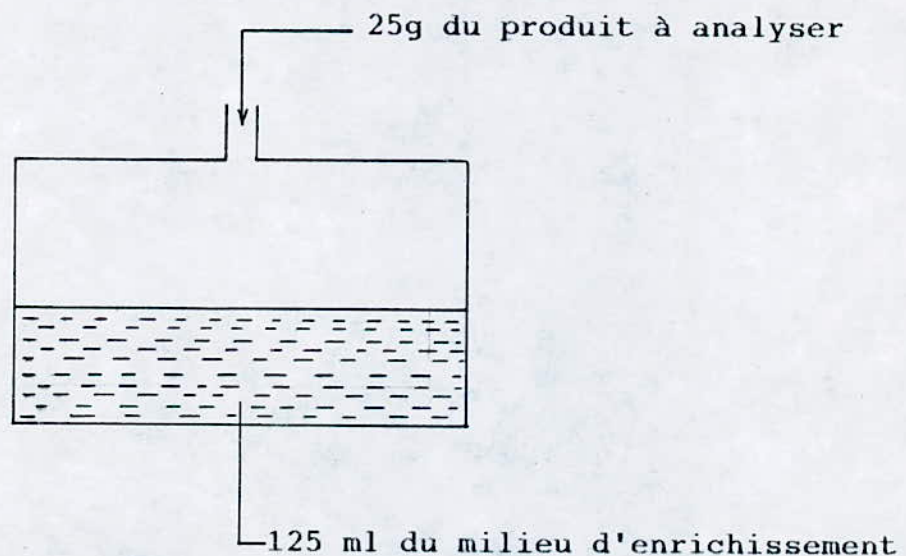
Les caractères généraux des salmonelles sont les suivants :

- Famille des Entérobacteriaceae.
- Bactéries à Gram négatif.
- Bacilles de 0.3 - 1.0  $\mu\text{m}$  sur 1.0 - 6.0  $\mu\text{m}$ . (16)
- oxydase (-).
- Généralement mobiles mais parfois immobiles.

#### MODE OPERATOIRE:

- Premier jour:

par un enrichissement sur milieu sélénite deux enrichissement sont réalisés et incubés différemment, l'un à 43°C pendant 24 heures, l'autre à 37°C pendant 24 heures.



- Deuxième jour:

La lecture obtenue sur le ou les milieux d'enrichissement fait l'objet d'un isolement à l'anse sur gélose coulée en boîte de pétri. (gélose DCLS: désoxycalate citrate lactose saccharose ou gélose SS: shigella -salmonelles). on incube 24 heures à 37°C.

Les colonies lactose - sont roses ou rouges. les colonies lactose + sont jaunes.



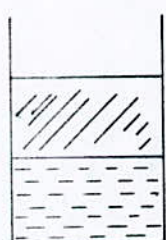
Troisième jour:

En l'absence de colonies suspectes, on procède à de nouveaux isolements à partir de l'enrichissement de 48 heures.

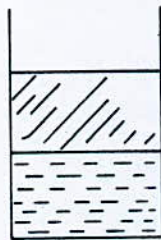
En présence de colonies rouges on procède à l'identification biochimique par repiquage (6 colonies au minimum) sur milieu gélose lactose glucose SH<sub>2</sub>: gélose coulée en tube ayant un culôt de 2 centimètre de hauteur environ prolongé par une pente. le culôt est ensemencé par piqure et la surface de la pente par stries. les tubes seront incubés à 37°C pendant 24 heures.

Quatrième jour:

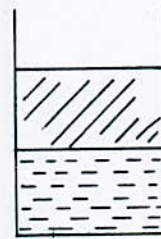
On examine ces géloses et on conserve celles qui présentent les caractères suivants:



rouge  
noir



rouge  
noir et jaune



rouge  
jaune

# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**



IV-1 ETUDE BIOCHIMIQUE:

IV.1.1 ETUDE DU pH OPTIMAL ET DE LA VARIATION DE  
L'ACTIVITE DE LA PEPSINE DURANT SA CONSERVATION:

IV.1.1.1 pH OPTIMAL DE LA PEPSINE PREPAREE:

Durant 8 jours de conservation à 4°C et sur deux échantillons les essais de l'activité des quatre solutions de pepsine préparée à pH 1, 1.5, 1.75 et 2 sont effectués et les résultats (exprimés par les valeurs moyennes des deux échantillons) sont alors reproduits sur le tableau suivant:

Tableau 6: Activité de la pepsine préparée à différents pH.

Activités des solutions de pepsine mesurées par absorbance à 280 nm				
	pH1	pH1.5	pH 1.75	pH2
SANS CONSER- -VATION	0.61	0.41	0.35	0.41
JOURS DE CO- -NSERVATION	-	-	-	-
1	0.36	0.26	0.27	0.27
2	0.27	0.20	0.30	0.16
3	0.37	0.22	0.32	0.55
4	0.36	0.16	0.10	0.18
5	0.24	0.22	0.19	0.22
6	-	-	-	-
7	0.26	0.25	0.12	0.12
8	0.23	0.26	0.15	0.16

NB: Le sixième jour était un vendredi



\*PRESENTATIONS GRAPHIQUES ET COMMENTAIRES DES RESULTATS  
OBTENUS:

\* ACTIVITE DE LA PEPSINE SANS CONSERVATION:(figure 10):

L'activité optimale est obtenue pour la solution de pepsine préparée à pH 1.

\* ACTIVITE DE LA PEPSINE PENDANT LES 8 JOURS DE CONSERVATION:

Au premier jour de conservation à 4°C (figure 11) les activités des solutions de pepsine préparées à différents pH (1, 1.5, 1.75, 2) sont égales presque au moitié de celles mesurées pour ces mêmes solutions sans conservation à 4°C. L'activité de la solution de pepsine préparée a pH 1 reste optimale.

Au deuxième jour de conservation (figure 12) l'activité de la solution de pepsine préparée à pH 1.75 est un peu plus grande que celle préparée à pH 1.

On peut dire que malgré cette petite différence l'activité optimale est obtenue pour la solution de pepsine préparée à pH 1.

Au troisième jour de conservation à 4°C (figure 13) l'activité de la pepsine préparée à pH 2 est trop grande devant celle de la pepsine préparée à pH 1. Ceci peut être dû à une erreur expérimentale.

\* Au quatrième jour de conservation à 4°C (figure 14 ) l'activité optimale est obtenue pour la solution de pepsine préparée à pH 1.

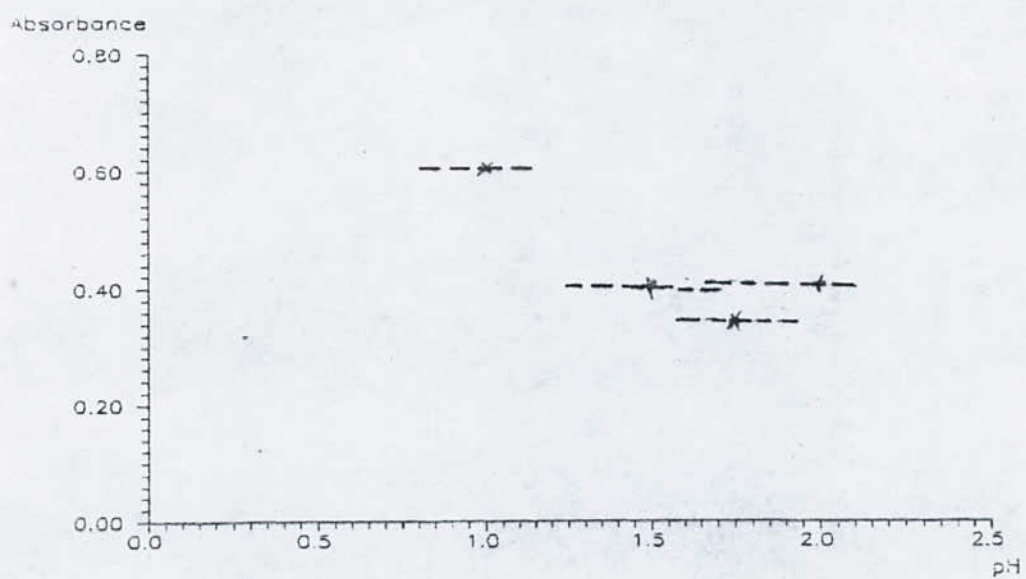


Figure 10 : activite de la pepsine sans conservation.

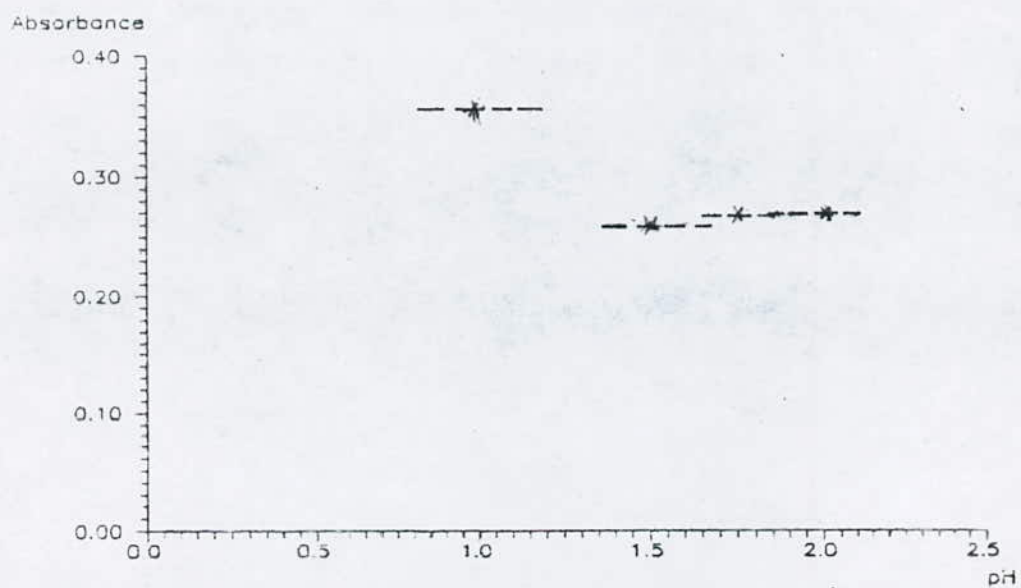


Figure 11 : activite de la pepsine au premier jour de conservation.



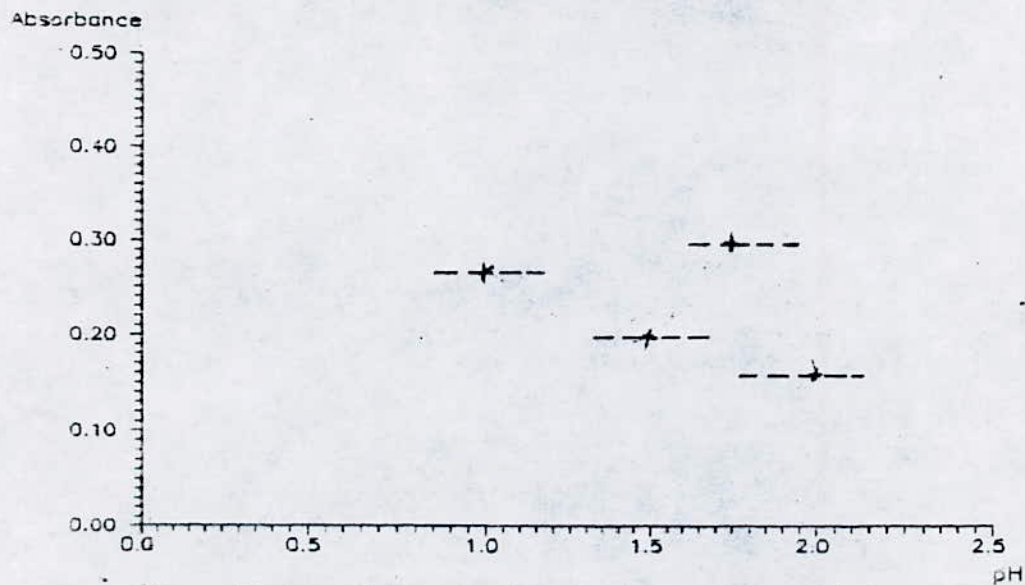


Figure 12 : activite de la pepsine au second jour de conservation.

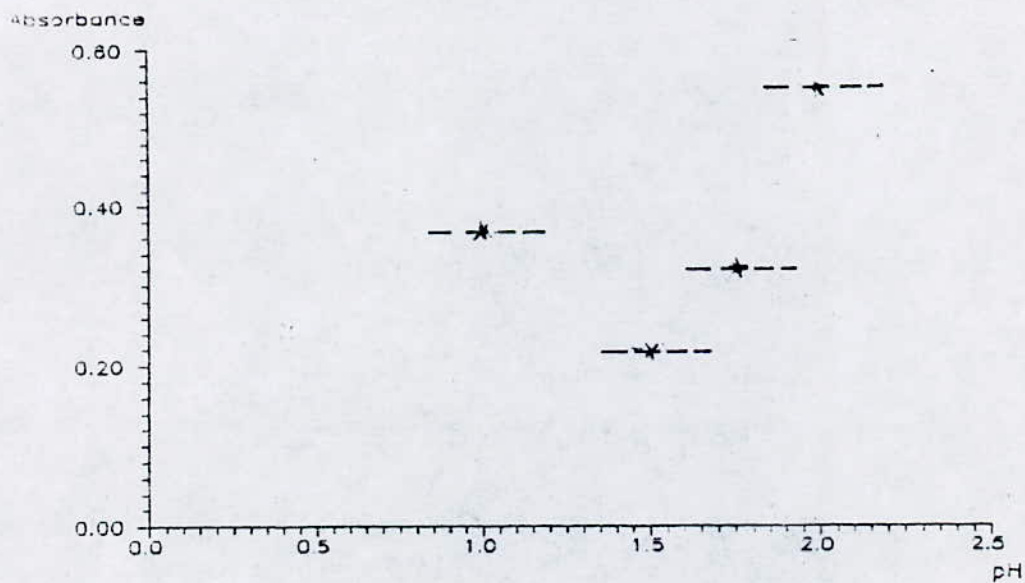


Figure 13 : activite de la pepsine au troisieme jour de conservation.

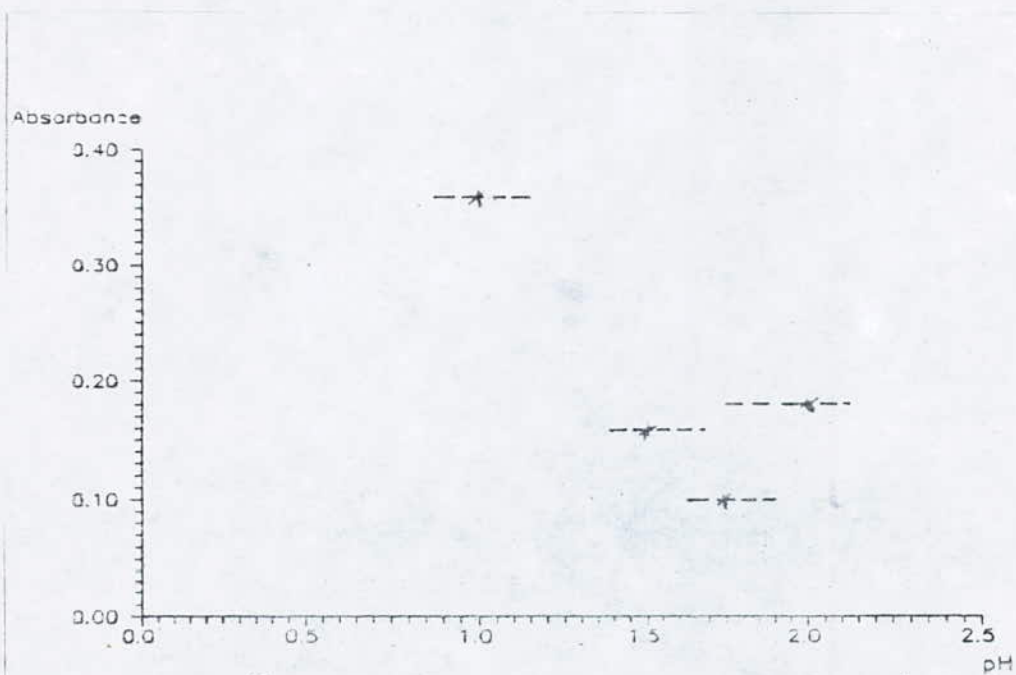


Figure 14 : activite de la pepsine au quatrieme jour de conservation.

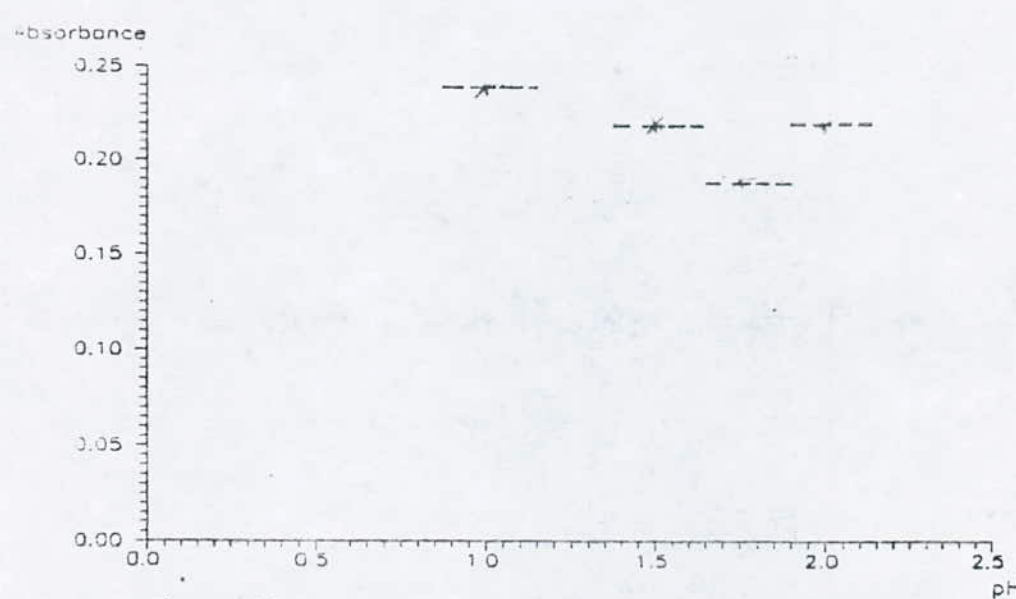


Figure 15 : activite de la pepsine au cinquieme jour de conservation.



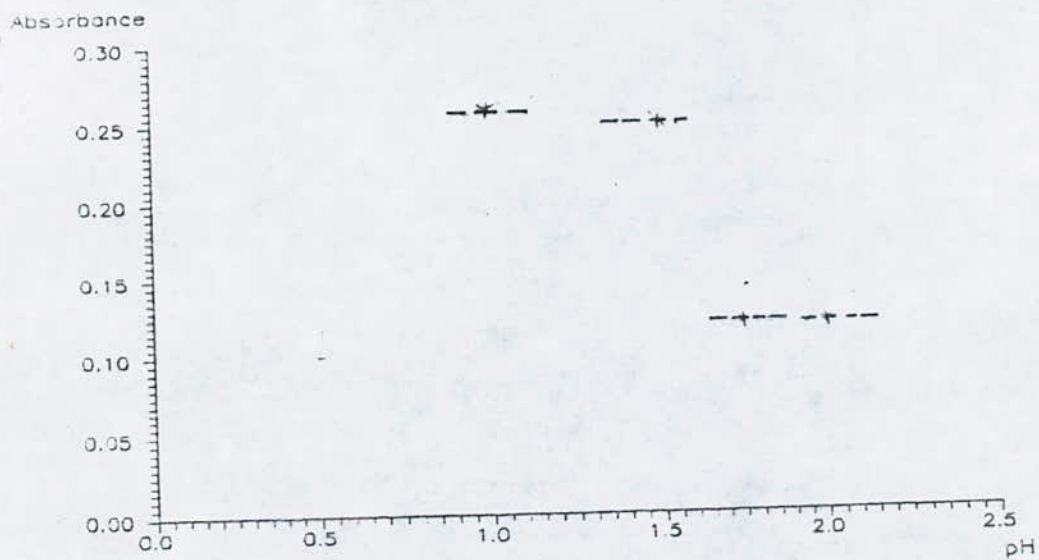


Figure 16 : activite de la pepsine au septieme jour de conservation.

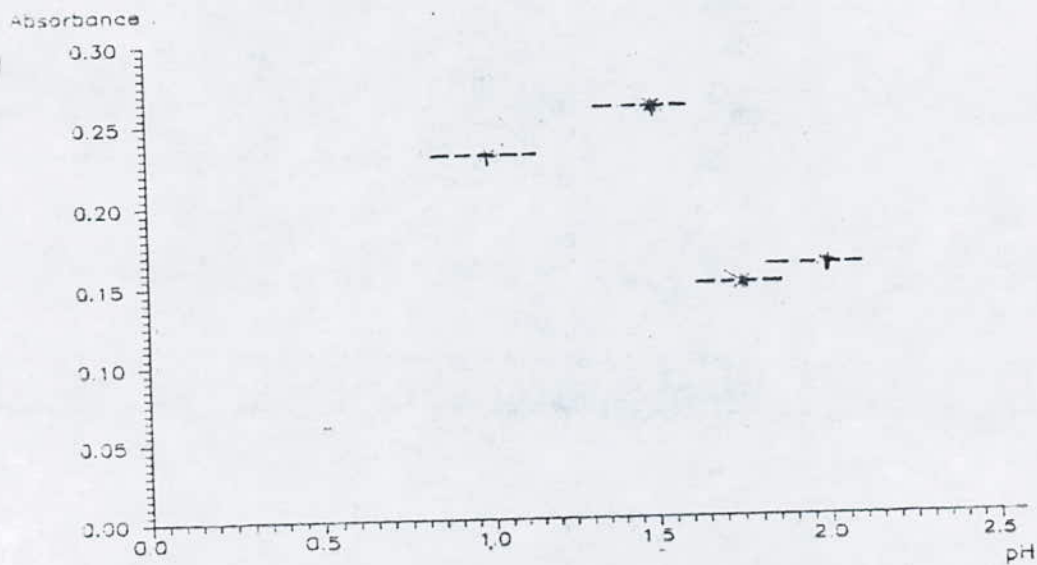


Figure 17 : activite de la pepsine au huitieme jour de conservation.

\* Au cinquième jour de conservation à 4°C (figure 15 ) l'activité de la solution de pepsine préparée à pH 1 reste dominante.

\* Au septième jour de conservation à 4°C (figure 16) l'activité de la solution de pepsine préparée à pH 1 est optimale.

\* Au huitième jour de conservation à 4°C (figure 17 ) l'activité de la solution de pepsine préparée à pH 1.5 est supérieure à l'activité de la solution de pepsine préparée à pH 1. Ce qui est anormal et peut être dû à une erreur expérimentale.

En conclusion on peut dire qu'après avoir analysé les résultats obtenus pour les 8 jours de conservation, l'activité optimale est obtenue pour la solution de pepsine préparée à pH 1.

#### IV.1.1.2 VARIATION DE L'ACTIVITE EN FONCTION DU NOMBRE DE JOURS DE CONSERVATION A 4°C:

Les absorbances des solutions à différents pH (1, 1.5, 1.75, et 2) durant les 8 jours de conservation sont représentés graphiquement sur la figure 18

- L'allure des 4 courbes correspondants aux différents pH indique que l'activité de la pepsine brute, mesurée par absorbance des rayons ultraviolets ( 280 nm ), décroît rapidement au bout du premier jour de conservation à 4°C puis reste inchangée durant les jours suivants.

On remarque aussi que durant les 8 jours de conservation la



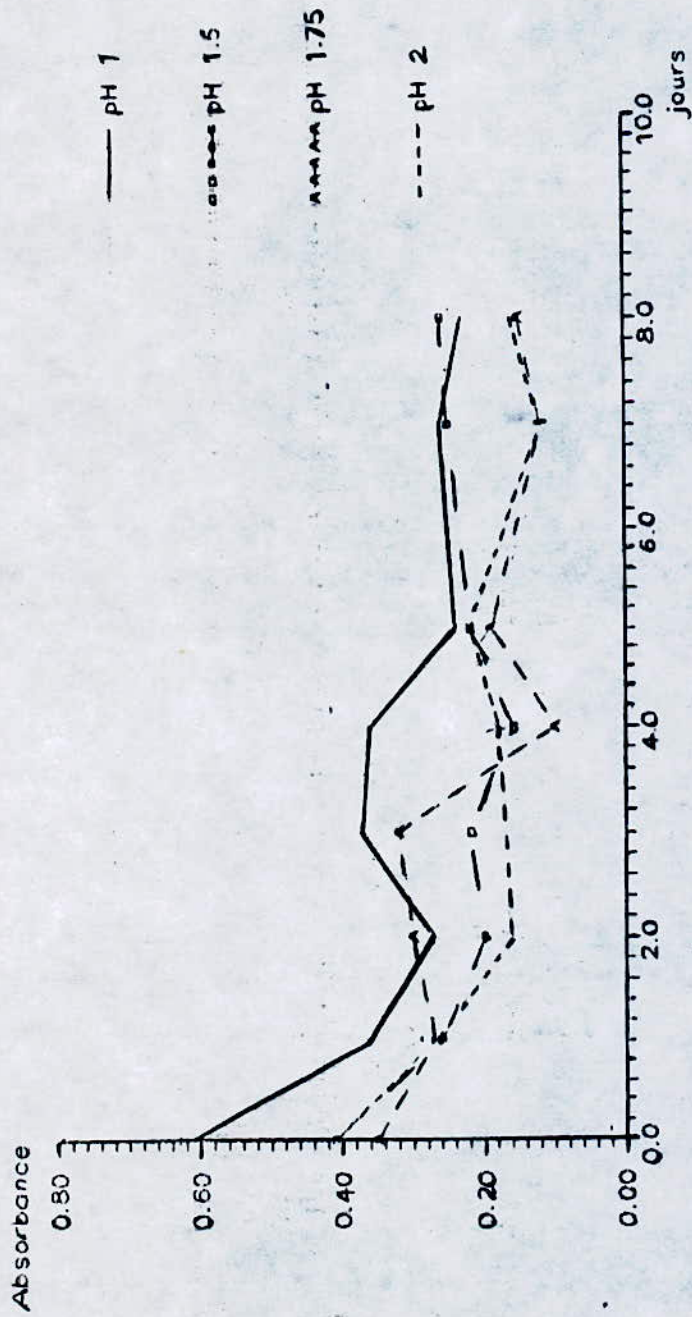


Figure 18 : variation de l'activité de la pepsine en fonction du nombre de jours de conservation.

solution préparée à pH 1 présente une activité supérieure à celles des solutions préparées à pH 1.5, 1.75 et 2.

- une exception se manifeste au troisième jour de conservation: l'absorbance à 280 nm de la solution de pepsine à pH 2 est bien supérieure à celles des autres solutions de pepsine. Ceci est probablement dû à une erreur expérimentale.

On remarque néanmoins deux autres exceptions pour la solution de pepsine préparée à pH 1.75 au deuxième jour de conservation et pour la solution de pepsine à pH 1.5 au huitième jour de conservation.

Ces deux exceptions ne seront pas prises en compte car les différences entre l'activité de la solution préparée à pH 1 et celles des autres solutions préparées à pH 1.75 et 2 correspondant au deuxième et au huitième jour de conservation respectivement sont très petites.

Enfin on peut dire que l'activité optimale est obtenue pour la solution de pepsine extraite de la muqueuse de l'estomac de mouton et préparée à pH 1. car cette activité reste supérieure à celle des autres solutions de pepsine durant les 8 jours de conservation et telle a été la conclusion de Ling Lin Liu et George.M Pigott (21). dans le cas d'une pepsine extraite de la muqueuse d'estomac du sanglier.

L'activité des différentes solutions de pepsine préparées à différents pH compris entre 1 et 2 présente une stabilité durant la conservation à 4°C.



#### IV.1.2 TEMPERATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITE DE LA PEPSINE PREPAREE:

Les résultats d'absorbance des pepsines brute et commerciale à 280 nm en fonction des températures choisies: 23°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, sont représentés graphiquement (Figure 19).

- Il s'agit alors de deux courbes qui nous permettent, d'une part, d'établir une comparaison entre l'activité des deux types de pepsines et d'autre part de déterminer la température d'activité optimale de la pepsine brute.

dans ces contextes on peut citer quelques remarques:

- L'absorbance des rayons ultraviolets par les produits solubles dans l'acide trichloroacétique du filtrat, augmente jusqu'à atteindre une valeur optimale, puis diminue avec la température pour les deux cas de pepsine.

- les courbes de l'absorbance à 280 nm en fonction des températures évoluent de la même façon pour les deux types de pepsine.

- L'écart est grand entre les valeurs de l'absorbance des rayons UV de la pepsine brute préparée et la pepsine commerciale.

En conclusion on peut dire donc que:

- La température d'activité optimale de la pepsine préparée est de 30 °C.

- La pepsine tend à être dénaturée quand la température dépasse la température optimale et augmente de plus en plus,

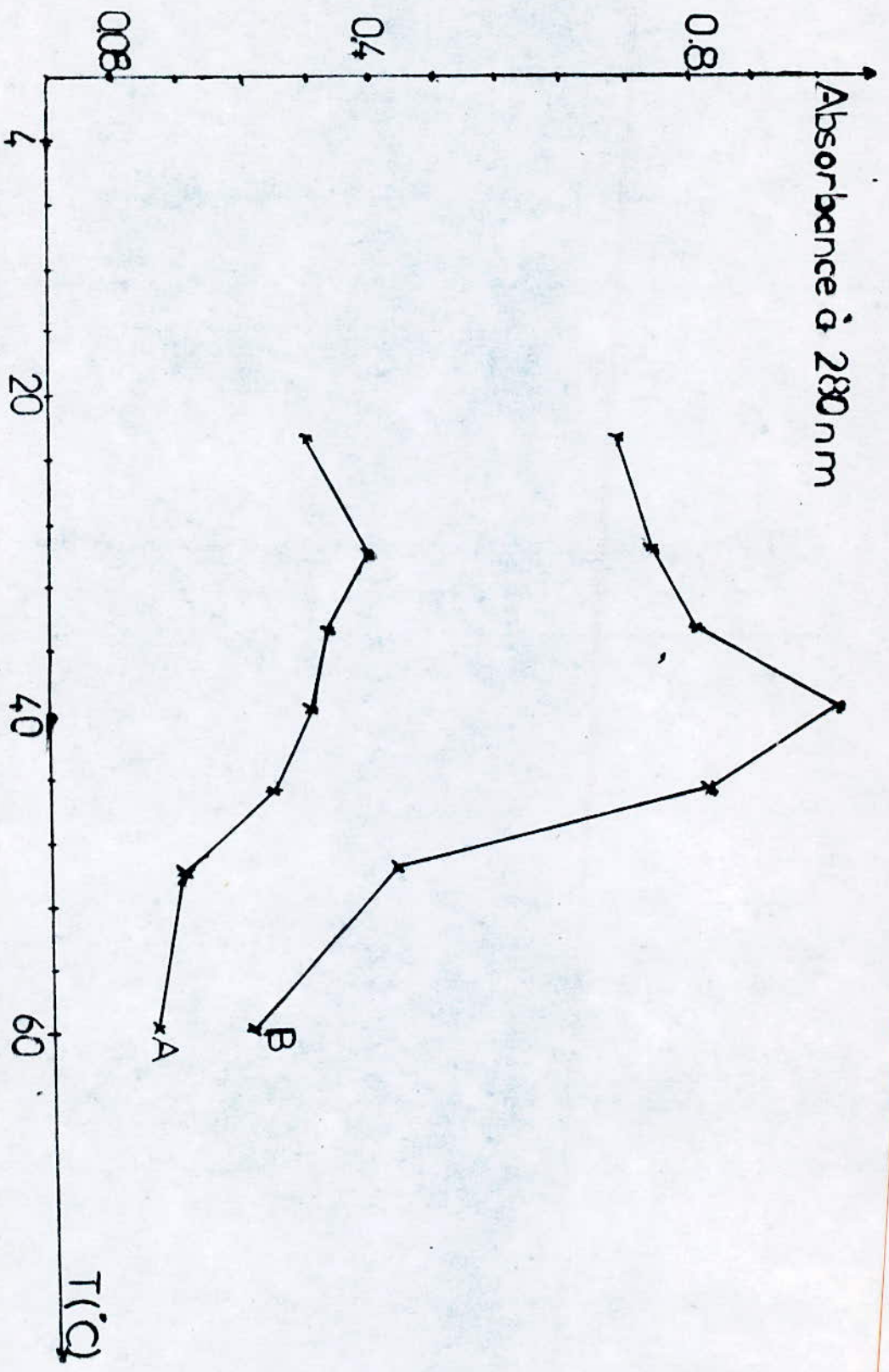


Figure 19 : Détermination de la température optimale d'activité de la pepsine brute. A: Pepsine brute. B: Pepsine commerciale



par conséquent son activité chute.

Pour la température optimale les résultats trouvés pour les deux sortes de pepsine commerciale et brute sont très différents de ceux trouvés par Ling Lin Liu et George M. Piqott (21) qui trouve que la pepsine brute et commerciale ont une grande activité à 62°C et ceci parmi les trois températures étudiées 37°C, 48°C et 62°C .

De même pour la dénaturation qui commence à 65°C pour les cas d'enzymes étudiés par Ling Lin Liu et George M. Piqott. (21)

#### IV.1.3. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS D'ABATTOIR:

##### IV.1.3.1 RESULTATS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS D'ABATTOIR:.

pour différentes concentrations en substrat (2,5 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l , 30 g/l) données en poids sec par litre de solution acide 0,01N et selon la courbe étalon, les résultats de l'hydrolyse sont les suivants :

t(mn)	D.O	p (g/l)
3	0.009	0.2
5	0.015	0.3
10	0.021	0.46
15	0.028	0.60
20	0.030	0.64
25	0	0
30	0	0
60	0	0
120	0	0
180	0	0
240	0	0

t(mn)	D.O	p (g/l)
3	0.012	0.26
5	0.021	0.45
10	0.028	0.60
15	0.028	0.60
20	0.039	0.83
25	0.044	0.95
30	0.044	0.95
60	0.049	1.06
120	0.054	1.15
180	0.057	1.22
240	0.057	1.22

Tableaux 7,8): Evolution de la quantité de p durant le temps d'hydrolyse pour les concentrations  $ISI=2,5 g/l$  et  $ISI=5 g/l$   
p: quantité de produit en protéines hydrolysées.



t (mn)	D.O	p (g/l)
3	0.012	0.26
5	0.021	0.45
10	0.037	0.8
15	0.035	0.75
20	0.039	0.83
25	0.043	0.91
30	0.044	0.95
60	0.056	1.2
120	0.054	1.15
180	0.056	1.2
240	0.057	1.22

t (mn)	D.O	p (g/l)
3	0.009	0.2
5	0.009	0.2
10	0.021	0.46
15	0.030	0.64
20	0.030	0.64
25	0.035	0.75
30	0.037	0.8
60	0.047	1.00
120	0.049	1.05
180	0.052	1.06
240	0.053	1.14

Tableaux (9,10): Evolution de la quantité de p durant le temps d'hydrolyse pour les concentrations ISI = 10g/l et ISI = 20g/l  
 p: quantité de produit en protéines hydrolysées.

t(mn)	D.O	p (g/l)
3	0.008	0.18
5	0.008	0.18
10	0.014	0.30
15	0.019	0.41
20	0.021	0.46
25	0.023	0.51
30	0.023	0.51
60	0.036	0.78
120	0.043	0.92
180	0.043	0.92
240	0.045	0.96

Tableau( 11 ):Evolution de la quantité de p durant le temps d'hydrolyse pour la concentrations ISI 30g/l  
p: quantité de produit en protéines hydrolysées.



#### IV.1.3.2 INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE:

Lorsque l'on représente graphiquement les résultats obtenus lors de l'hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoir (figure 20) on peut déduire que:

\* La quantité de protéines solubles dans le TCA augmente avec le temps.

\* La représentation graphique de la concentration en protéines solubles dans le TCA en fonction du temps suit la cinétique de MICHAELIS MENTEN quand la concentration en substrat est faible.

\* Quand la concentration en substrat dépasse une certaine valeur, l'excès de substrat provoque une inhibition de la cinétique enzymatique que l'on peut déduire mathématiquement.

#### IV.1.3.3 INTERPRETATION MATHEMATIQUE DES RESULTATS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE:

On représente graphiquement les deux fonctions  $1 / V_i = f(S)$  et  $1 / V_i = g(1 / S)$ . où  $V_i$  représente la vitesse initiale de l'hydrolyse enzymatique et S représente la concentration en substrat.

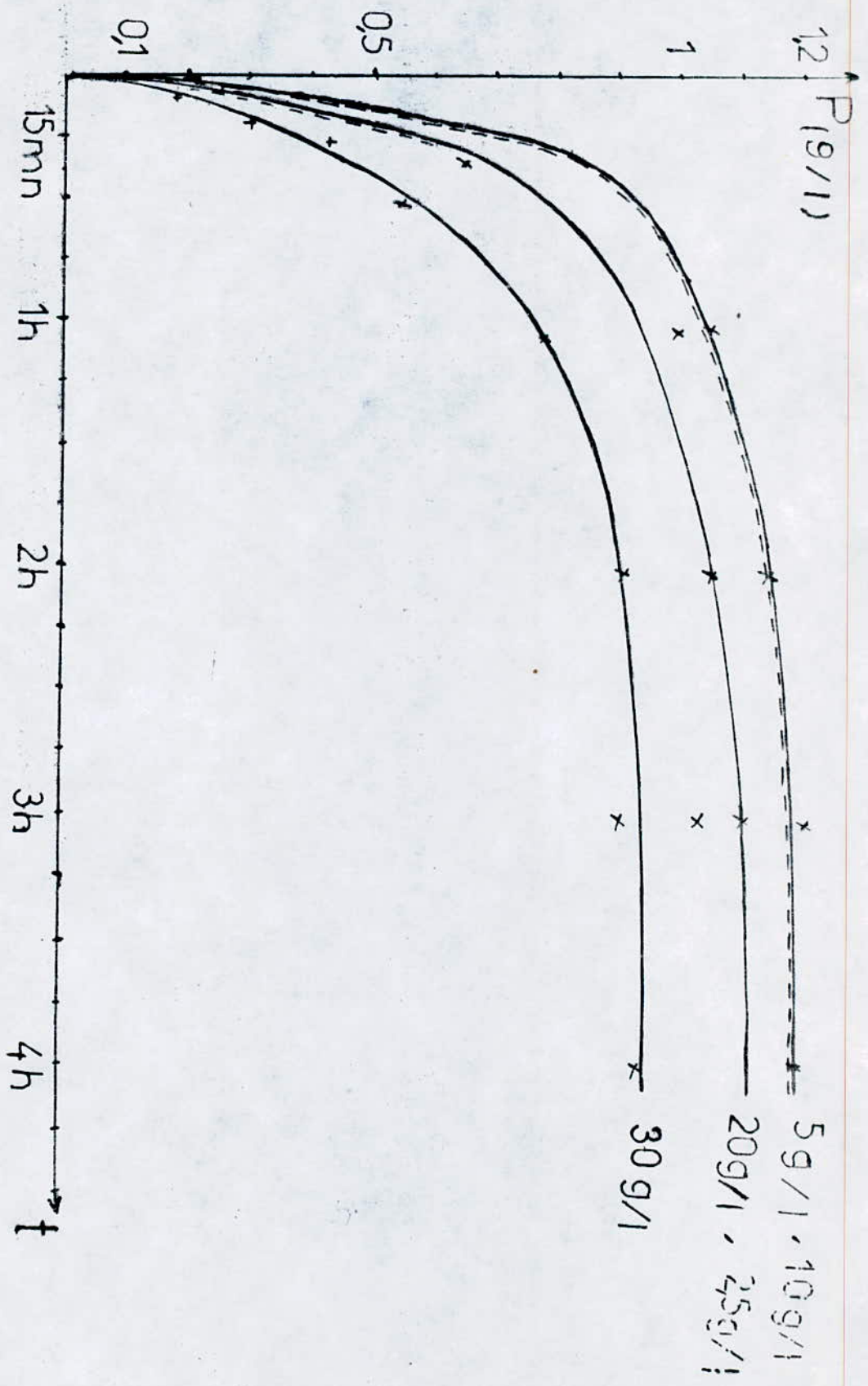


Figure 20: Détermination de concentration de proteines solubles dans le TCA durant le temps d'hydrolyse



S(g/l)	2.5	5	10	20	30
1 / S (g <sup>-1</sup> l)	0.4	0.2	0.1	0.05	0.033
V <sub>i</sub> (g l <sup>-1</sup> mn <sup>-1</sup> )	6.66	11.62	11.36	6.66	4.76
1 / V <sub>i</sub> (g <sup>-1</sup> lmn)	0.15	0.086	0.088	0.15	0.21

Les représentations graphiques des deux fonctions

$1 / V_i = f(S)$  et  $1 / V_i = g(1 / S)$  sont deux hyperboles. figure (21) et figure (22) respectivement.

L'équation mathématique proposée pour cette cinétique est celle qui correspond à une inhibition par excès de substrat. soit donc:

$$V_i = \frac{V_{\max}}{1 + KM / [S] + [S] / KI}$$

ou  $1 / V_i = 1 / V_{\max} (1 + KM / [S] + [S] / KI)$

Détermination des constantes V<sub>max</sub>, KM et KI:

\* sachant que l'asymptote oblique, à la courbe de la fonction  $1 / V_i = g(1 / S)$ , de pente  $KM / V_{\max}$  coupe l'axe des  $1 / V_i$

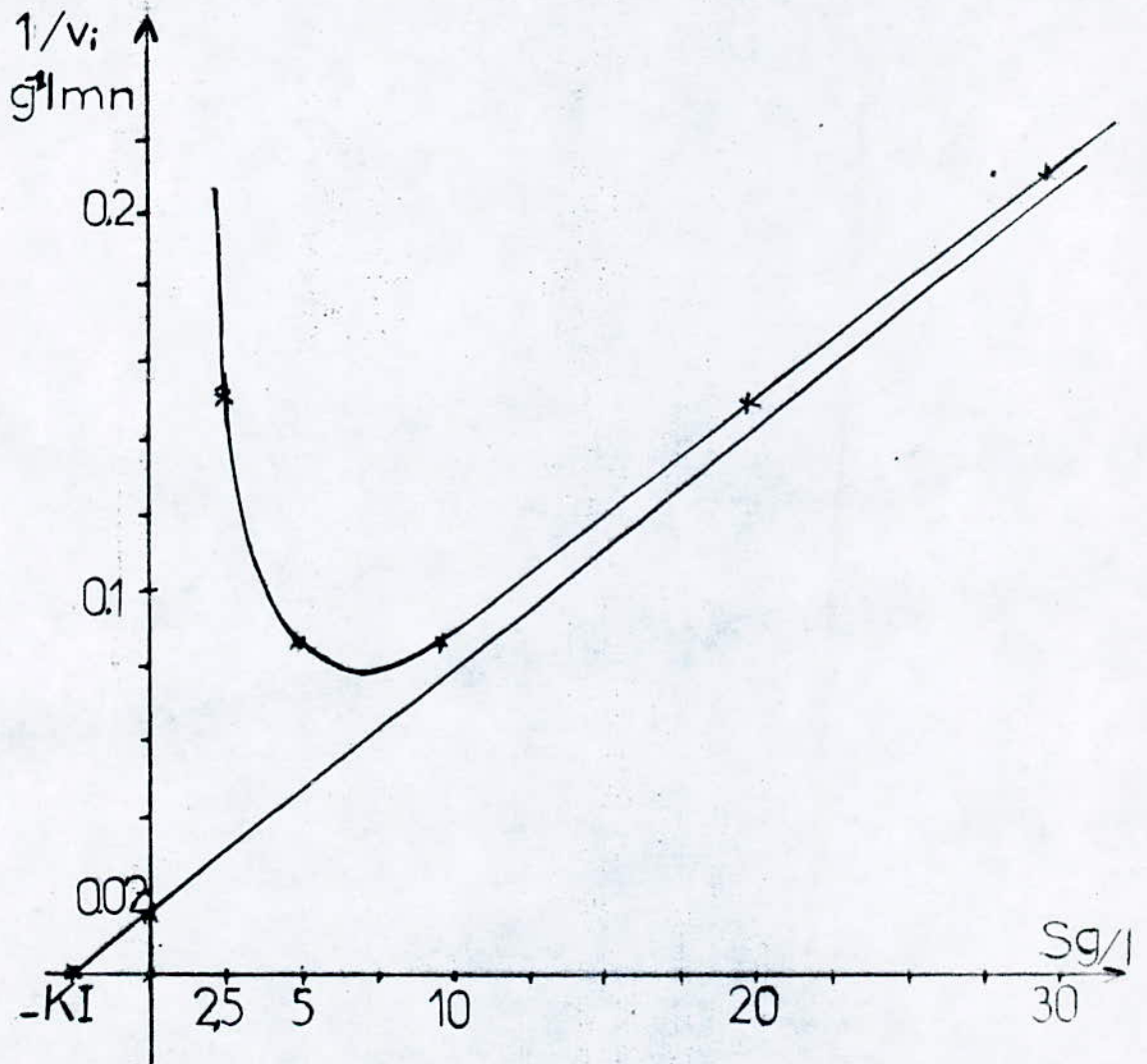


Figure 21: Représentation graphique de  $1/v_i$  en fonction des concentrations des différents substrats  
 $v$ : vitesse initiale de la réaction



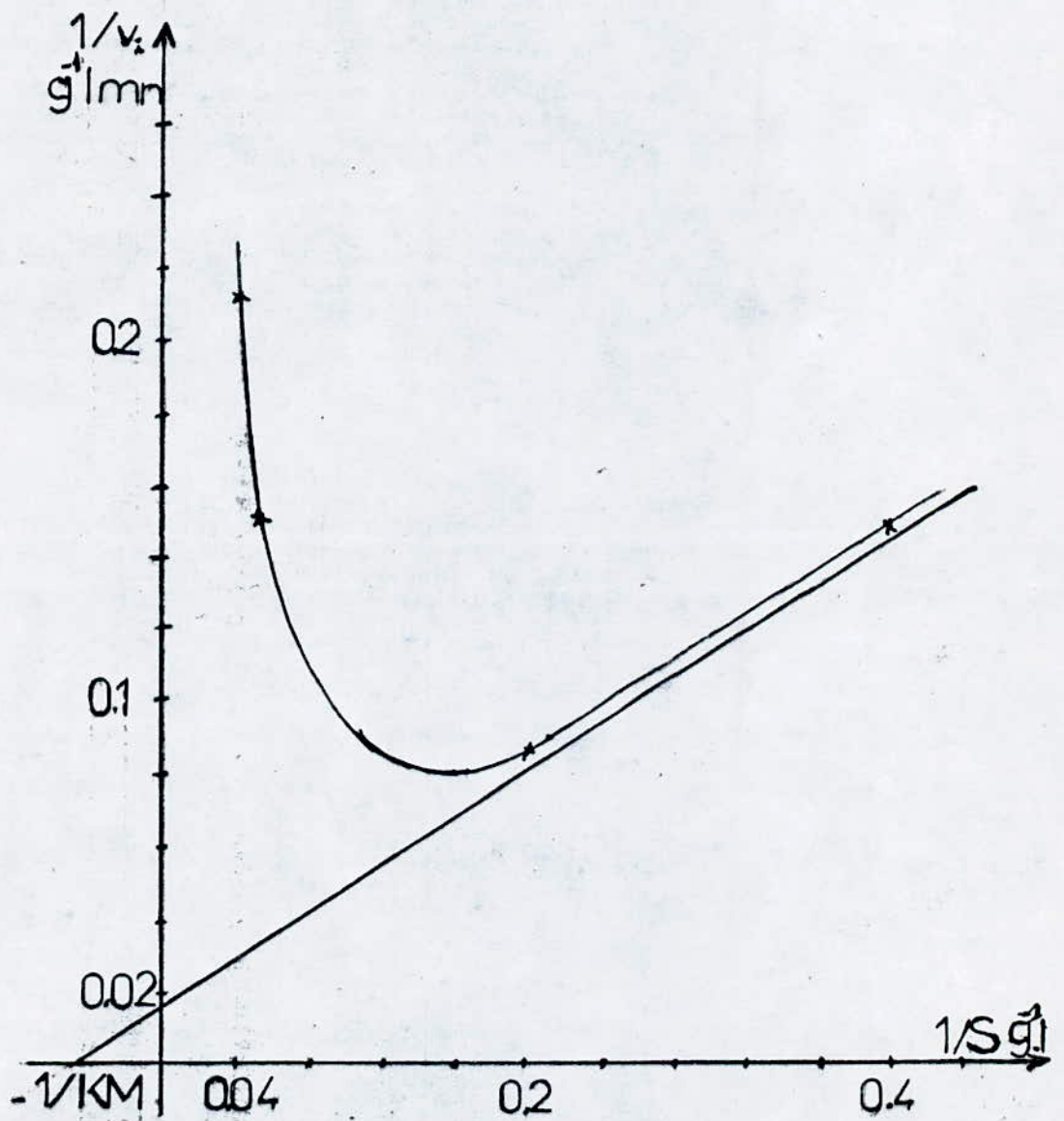


Figure 22: Représentation graphique de  $1/v_i$  en fonction de  $1/S_i$ .  
 $S_i$ : Différentes concentrations en substrat.

au point d'ordonnée  $1 / V_{\max} = 0.02 \cdot 0.7$  et l'axe des  $1 / S$

au point d'abscisse  $- 1 / KM = - 1.4 \cdot 0.04$

d'où  $V_{\max} = 71.4 \text{ g / l}$  et  $KM = 17.85 \text{ g / l}$ .

et sachant que l'asymptote oblique, à la courbe de la fonction  $1 / V_i = f(1 / S)$ , de pente  $1 / V_{\max} KI$  coupe l'axe des  $S$  au point d'abscisse  $- KI = - 1.1 \cdot 2.5 = - 2.75$ .

d'où  $KI = 2.75 \text{ g / l}$ .

L'équation de vitesse s'écrit donc:

$$1 / V_i = 1 / 71.4 (1 + 17.85 / [S] + [S] / 2.75).$$

$$1 / V_i = 0.014 (1 + 17.85 / [S] + 0.36 [S]).$$

$S$  optimal qui correspond au maximum des  $V_i$  est donné par

$$S = (KI \cdot KM)^{1/2}$$

$$S = (2.75 \cdot 17.85)^{1/2} = 7 \text{ g / l}.$$

$$S = 7 \text{ g / l}$$

en poids sec.

D'où pour 7 ml de solution (32 g de rejet humide complétée à 100 ml d'eau) on ajoute 43 ml d'acide 0.01 N et donc à 1 volume de rejet on doit compléter par 7 autres volumes d'acide pour avoir la meilleure activité.

Pour le rendement d'hydrolyse on peut le calculer pour la concentration de 5 g / l puisque c'est la concentration qui



donne un bon rendement au cours du temps dans les cas déjà  
mis en évidence (2.5 g / l, 5 g / l, 10 g / l, 20 g / l,  
30 g / l).

Après 4 heures d'hydrolyse la concentration en protéines  
hydrolysées est de 1.22 g / l, (figure 20)

Ce qui correspond à un pourcentage en protéines de :

$$1.22 \cdot 100 / 5 = 24.4 \quad \text{du poids sec.}$$

On peut dire donc que l'étude de l'enzyme préparée au  
laboratoire à partir de la muqueuse stomacale du mouton et  
utilisée lors de l'hydrolyse enzymatique des rejets solides  
d'abattoir a permis de fixer ses conditions optimales  
d'activité:

- Le pH optimal est 1.
- La température optimale est égale à 30 °C.
- Elle reste stable durant sa conservation à 4°C pendant 8  
jours.
- Les représentations graphiques des deux fonctions  
 $1 / V_i = f(S)$  et  $1 / V_i = g(1 / S)$  sont deux hyperboles.
- l'équation de vitesse est:

$$1 / V_i = 0.014 \left( 1 + 17.85 / [S] + 0.36 [S] \right).$$

- Il y'a une inhibition de l'hydrolyse par excès de substrat.
- La concentration en substrat donnant le meilleur rendement  
au cours du temps est 7 g / l ( en poids sec).
- Le rendement de l'hydrolyse pour une concentration de

5 g / l est de 1.22 g / l de protéines soit 24.4 du poids sec du déchet.



## IV.2. ETUDE MICROBIOLOGIQUE:

### IV.2.1. DETERMINATION DE LA SOLUTION MERE:

- Après la dilution de notre rejet on a trouvé pour la dilution 1V / 9V un nombre de colonies en boites de pétri égale à :

220            pour            37°C

et 150            pour            22°C

- puisque le nombre de colonies trouvés se situe entre 30 et 300, donc on peut considérer comme solution mère cette dilution.

- Les dilutions inférieures à 1V / 9V sont trouvées tous indénombrables et cela peut être expliqué par l'importance de la contamination microbienne du rejet recueilli à l'abattoir, contamination due à plusieurs facteurs: milieu environant, objet de travail, personnel, souillures diverses.

#### REMARQUE:

L'analyse microbiologique du rejet étudié a été faite sur deux échantillons.

Le premier échantillon a été prélevé le 18 / 05 / 1991

Et le deuxième le 08 / 06 / 1991 à 7 heure du matin (pour les deux échantillons).

### IV.2.2. RECHERCHE DES GERMES TOTAUX:

La dilution  $10^{-1}$  a permis de trouver un nombre de colonies compris entre 30 et 300. La moyenne des germes trouvés par millilitre dans le cas des deux échantillons est donnée par:

1°/ - Echantillon N°1:

\* à 22°C            on a trouvé 840 germes / ml.

\* à 37°C            on a trouvé 1300 germes / ml.

2°/ - Echantillon N°2:

\* à 22°C            on a trouvé 400 germes / ml.

\* à 37°C            on a trouvé 1300 germes / ml.

La lecture de ces résultats montre que les deux échantillons donnent presque les mêmes nombre de germes.

#### IV.2.3. RECHERCHE DES COLIFORMES ET ESCHERICHIA-COLI:

##### a - Recherche des coliformes totaux:

Après incubation à 30°C pendant 48 heures on obtient les résultats suivants:

\* Pour l'échantillon 1 on trouve 25 germes par gramme.

\* Et pour l'échantillon 2, il y'a 60 germes par gramme.

On observe un grand nombre de coliformes notamment dans l'échantillon 2.

les coliformes étant des indices de contamination, ils témoignent de l'état sanitaire mais surtout hygiénique des animaux.

##### b - RECHERCHE D'ESCHERICHIA-COLI:

Après incubation à 44°C pendant 24 heures on obtient les résultats suivants:

\* échantillon 1: on ne trouve pas de germes.

\* échantillon 2: même résultat.

- L'ensemencement sur l'eau peptonée exempte d'indole s'est révélé négatif: donc absence d'Eschérichia-coli



#### IV.2.4. RECHERCHE DES STREPTOCOQUES:

Le milieu ROTHE après incubation est d'aspect trouble.

On a dénombré grâce à la table de Mac-Grady:

.6000 germes / g pour l'échantillon 1.

.2500 germes / g pour l'échantillon 2.

Il y'a confirmation de la présence des streptocoques sur milieu Eva-Litsky.

Ce dernier est totalement flou après ensemencement et incubation.

On a dénombré dans ce cas (en utilisant la table de Mac-Grady)

\* 6000 germes / g pour l'échantillon 1.

\* 250 germes / g pour l'échantillon 2.

Le test de pathogénicité des streptocoques s'est révélé négatif. Il y'a absence de zones d'hémolyse sur les différentes boîtes de pétri. donc les streptocoques ne sont pas pathogènes.

#### IV.2.5 RECHERCHE DES STAPHYLOCOQUES:

Après une incubation de 24 heures à 37°C, il n y'a aucun développement de staphylocoques dans le cas des deux échantillons. Donc ceci nous permet de dire qu'il y'a absence de staphylocoques dans les rejets solides d'abattoirs.

#### IV.2.6 RECHERCHE DE CLOSTRIDIUM:

En ensemencant sur gélose viande-foie pour la recherche des clostridium et après incubation à 37°C pendant 24 heures on obtient les résultats suivants:

Pour l'échantillon 1 : absence de germes.

Pour l'échantillon 2 : même résultat.

#### IV.2.7 Recherche des salmonelles:

Cette manipulation n'a pas pu être faite car l'institut Pasteur a refusé de nous procurer le milieu d'enrichissement des Salmonelles.

#### IV.2.8 CONCLUSION:

Les tests de pathogénéicité des streptocoques et des staphylocoques ont été négatifs.

L'absence des Eschérichia-coli fait des rejets d'abattoirs un produit acceptable sur le plan bactériologique.

Cependant, la présence des coliformes en grand nombre risque de détériorer ce produit.



# **CONCLUSION GENERALE**

## V. CONCLUSION GENERALE:

Notre but était d'extraire, par hydrolyse enzymatique, des acides aminés à partir des rejets solides d'abattoirs utilisés en tant qu'ingrédients dans l'alimentation animale .

L'hydrolyse enzymatique des rejets solides d'abattoirs a permis de calculer la concentration optimale en substrat pour laquelle on a le meilleur rendement d'hydrolyse et qui est de sept (07) grammes par litre .

La cinétique de cette hydrolyse enzymatique est inhibée par excès de substrat à partir de [S] optimal .

En effet, on a pu déterminer la quantité de protéines hydrolysées pour une concentration de réaction initiale en substrat égale à cinq (05) grammes par litre ( en poids sec) après quatre heures de réaction . Cette valeur est égale à 1.22 grammes par litre , soit 24.4 pour cent du poids sec total.

L'enzyme utilisée lors du processus d'hydrolyse a été extraite à partir de la muqueuse stomacale de mouton et ceci pour des raisons économiques .

La solution d'enzyme préparée à pH 1 est celle qui présente la meilleure activité .

La température optimale d'activité de celle-ci est de 30°C. L'activité de la pepsine brute reste stable durant 8 jours de conservation à 4°C .

D'un point de vue bactériologique , le travail consiste en la mesure du degré de contamination du rejet et et ce, par



la recherche de la flore totale ,des coliformes ,des streptocoques ,des staphylocoques et des clostridium.

De plus , les analyses microbiologiques du rejet révèle un degré de pathogénicité nul, ce qui nous permet encore de l'utiliser comme ingrédient.

Pour améliorer ce travail une centrifugation du rejet est nécessaire, ainsi qu'une optimisation de certains paramètres :

- \* le temps de préparation de l'enzyme ;
- \* la concentration en enzyme.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

- 1- Anonyme. Traitement et utilisation des sous-produits animaux, FAO, 1963.
- 2- L.Defaveri. "Les sous-produits", Texte de la conférence de Mademoiselle L.Defaveri, donnée à Angers, les 25 et 26 Octobre 1983 au symposium internationale.
- 3- J.C.Frentz. Sécurité, Protection de l'environnement, Prévention des nuisances: Industrie du lait, de la viande, du froid alimentaire. Conférence du colloque de Poitiers, 17 et 18 Octobre 1984.
- 4- Abdelnacer Bensaola. Les sous-produits de l'abattage et leur utilisation dans l'alimentation du bétail, Techniques et sciences, N°6, 1991, page: 17-19.
- 5- C.Audigie. Biochimie structurale, Ed. DOIN, 1976.
- 6- E.H.Relveld, J.C.Cherman, G.Herve. Que sais-je ?, N°746, 1980.
- 7- J.C.Cheftel, J.L Cuq, D.Lorient. Protéines alimentaires, Ed Technique et documentation Lavoisier, 1985.
- 8- F.Percheron, R.Perles, M.J.Foglietti. Abrégé de biochimie générale, Tome 1, Ed.Masson, 1981.
- 9- Dendene Kamel.Projet de fin d'étude, Génie de l'environnement Optimisation du procédé d'ultrafiltration pour la récupération des protéines des eaux de lavage de poisson, Dirigé par Mr N. Mameri et Mr A.Chergui, 1990.
- 10- M.Débatisse. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 2, Ed Technique et

documentation Lavoisier, 1981.

11- Revue de l'actualité chimique, page 12, Editée par la société chimique de France et la société de chimie industrielle, Mars 1984.

12- L.Siamour, mémoire de fin d'étude, Institut de biologie. Etude microbiologique et biochimique des rejets solides de poissoneries, déposé par Mr N.Mameri et M<sup>me</sup> D.Mameri, 1989.

13- Cours de biochimie de 4<sup>eme</sup> année donné par M<sup>me</sup> Mameri au département du Génie de l'environnement, 1989 - 1990.

14- Cours de médecine "Biochimie", O.P.U, 1983.

15- J. Guiraud, P. Galzy, L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, Ed. L'usine nouvelle, Collection Génie alimentaire, 1980.

16-C.M. Bourgeois, J.F.Mesle, J.Zucca. Microbiologie alimentaire, Ed. Technique et documentation Lavoisier, 1981.

17- H.Cassagne. Milieux de culture, Ed. Doin, 1973.

18- C.M.Bourgeois, J.V. Levau. Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, contrôle microbiologique, Volume 3, Ed. Technique et documentation Lavoisier, 1981.

19- J.L. Bourdon, N. Marchal. Techniques bactériologiques, Ed. Doin, 1973.

20- Méthodes de référence AFNOR 1981.

21- Ling Lin Liu et G.M.Pigott. preparation and use of inexpensive crude pepsin for enzyme hydrolysis of fish,



Journal of food science, Volume 46, 1981.

22- Bruno-Houlier. Récolte et traitements du sang des abattoirs, description des procédés, Ed. Cemagref.Clermont Ferrand, 1988.

23- J.Delaunay, Biochimie, Travaux dirigés, Ed. Hermann collection, 1979.

