

---

## Production et caractérisation de fractions protéiques à partir des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

### Production and characterization of proteins compounds from tongue sole by-products (*Cynoglossus senegalensis*)

Sylla K.S.B.<sup>1,\*</sup> ; Musabyemariya B<sup>1.</sup> ; Berge J.P.<sup>2.</sup> ; Seydi Mg<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (HIDAOA). Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar (EISMV). B.P. 5077 Dakar-Fann. Tél./ Fax: (221) 834 33 54

<sup>2</sup> IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes, France

\*: Corresponding author : Sylla K.S.B., email address : [khsylla@refer.sn](mailto:khsylla@refer.sn)

---

#### Résumé:

Les co-produits (viscères, têtes, squelette et peaux) de la sole tropicale provenant d'une entreprise de filetage-réfrigération, ont été hydrolysés avec l'enzyme Protamex®. Des degrés d'hydrolyse de 30 et 19% ont été obtenus respectivement à 40 et 50°C. Les résultats ont également montré que les protéines contenues dans ces co-produits sont totalement solubilisées par l'action de cette protéase au bout de 180 minutes d'hydrolyse.

La caractérisation biochimique a montré que ces hydrolysats sont riches en protéines (61%) et en minéraux (10%). Il ressort aussi de cette étude, que les hydrolysats contiennent des peptides de tailles moléculaires inférieures 1760Da. Enfin, ces hydrolysats ont une valeur nutritionnelle élevée pour les poulets de chairs car ils possèdent en quantité suffisante 9 acides aminés essentiels pour l'alimentation de ces volailles.

**Mots clés:** Co-produits ; hydrolyse enzymatique ; protéines

#### Abstract:

The by-products (viscera, heads, backbone and skins) of tongue sole coming from a Senegal frozen fisherie plant, were hydrolyzed with the Protamex® enzyme. Degrees of hydrolysis of 30 and 19% were obtained respectively with 40°C and 50°C. The results also showed that the proteins contained in these by-products are completely solubilized by the action of this protease at the end of 180 minutes of hydrolysis.

The biochemical characterization showed that these hydrolysates are rich in proteins (61%) and minerals (10%).

However, the hydrolysates contain peptides of lower molecular sizes 1760Da. Lastly, these hydrolysates have high nutritional value in order to set up table fowls because they have in big quantity 9 essential amino acids for the poultry feed.

**Keywords:** By-products ; enzymatic hydrolysis ; proteins

# 1. Introduction

---

Le secteur de la pêche est aujourd'hui l'un des secteurs les plus importants de la production alimentaire à l'échelle mondiale. Selon la FAO, 130 millions de tonnes de poissons sont pêchées ou élevées chaque année dans le monde et il en résulterait environ 25% de déchets (soit 32,5 millions de tonnes).

Le Sénégal, classé parmi les zones les plus poissonneuses du monde, exporte une partie de ses prises sous forme de produits transformés en Europe, au Japon et au Canada, ou sous forme de produits frais dans la sous-région. En 2007, ces exportations ont permis de générer des recettes de près de 278 milliards de FCFA, soit 11% du PIB du secteur primaire ou 2,3% du PIB total (Ndiaye P., 2005).

Parmi les espèces de poisson traitées, la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) occupe une place considérable dans les exportations vers l'Union Européenne, sous forme de filets frais ou congelés.

La sole tropicale (*Cynoglossus cynoglossus*) appartient à l'embranchement des Vertébrés, à la classe des Actinoptérygiens, à l'ordre des Pleuronectiformes (poissons-plats). Elle fait partie de l'une des 5 espèces de la famille des Cynoglossidae. C'est une espèce de 66 cm de long maximum, au corps allongé et comprimé latéralement, au dos marron (face operculée) et au ventre blanc (face aveugle).

La sole tropicale est une espèce de poisson démersale grégaire vivant à une profondeur de 10 à 110m. On la retrouve sur les fonds de sable et de boue des eaux côtières. Elle est largement

distribuée dans toutes les mers tropicales entre 45° nord- 8° sud et 19° ouest – 14° est.

La sole se nourrit principalement de crustacés, de mollusques et de crabes.

La sole donne lieu à une pêche active, aussi bien industrielle qu'artisanale, dont l'essentiel est destiné à la production de filets frais et congelés.

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production.

Elle représente 70% des exportations de produits élaborés soient 24 000 tonnes par an. Cependant, la production de ces filets de sole génère une quantité importante de co-produits (têtes, viscères, peaux, squelette) qui représente 57% du poisson.

Face à ce manque à gagner pour les industriels du secteur, cette étude a pour but d'apporter plus de valeur ajoutée à ces co-produits dont la seule voie de valorisation actuelle est la fabrication de farine de poisson destinée à l'alimentation animale.

Dans ce contexte, nous avons mis en place une étude visant à :

Faire des hydrolyses enzymatique sur les co-produits en utilisant une enzyme industrielle (Protamex®) ;

Séparer la phase soluble (huileuse et aqueuse) de la phase insoluble ;

Caractériser les fractions protéiques .

La maîtrise des conditions d'hydrolyses (température, pH, pourcentage d'eau, rapport enzyme-substrat) s'est faite à l'aide d'un bioréacteur double enveloppe. Les hydrolysats obtenus ont été centrifugés pour pouvoir séparer la phase soluble (huileuse et aqueuse) de la phase insoluble (culot). Puis, chaque phase a fait l'objet d'une caractérisation biochimique des fractions protéiques dans le but de déterminer leur teneur en acides aminés essentiels.

## 2. Matériel et méthodes

---

### I-1) Matériel

#### I-1-1) Matériel animal

Les soles qui sont utilisées pour cette étude proviennent de 02 entreprises de pêche installées au port de Dakar (Quai de pêche). Elles sont pêchées en Atlantique Centre-Est (zone FAO 34).

Les co-produits de sole utilisés dans notre étude sont les carcasses (têtes, viscères et squelettes).



Figure 1 : Soles tropicales

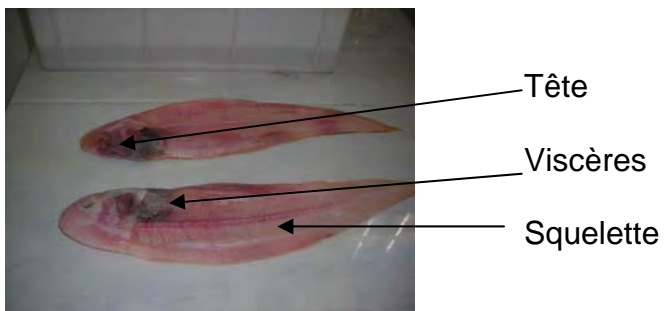


Figure 2 : Carcasses de soles tropicales

#### I-1-2) Enzyme d'hydrolyse

L'enzyme utilisée pour les hydrolyses est fabriquée par la firme Novozymes SA (Danemark). Elle a pour nom commercial Protamex®.

C'est une enzyme industrielle produite par génie génétique. C'est un complexe peptidique de la classe des hydrolases développée par *Bacillus* pour l'hydrolyse des protéines (type protéase).

Les conditions optimales de travail prévues au laboratoire sont un pH de 8 et une température de 50°C.

Elle est inactivée par chauffage à 80°C pendant 10 minutes à pH égal 8.

#### I-1-4) Le matériel de laboratoire

Il s'agit :

-2 réacteurs double enveloppe ou batch de 2 litres couplés à un système de réfrigérant

-1 thermomètre

- 1 pH-mètre
- 1 bain marie réglée à 85°C
- 1 centrifugeuse réfrigérée
- 1 lyophilisateur
- Chromatographe de type FPLC
- 1 balance de précision
- 1 rampe de minéralisation
- 1 unité de distillation type BÜCHNER
- fioles, béchers et pipettes
- tubes Falcon 40ml
- réactifs chimiques et solvants de laboratoire

## I-2) Méthodes

### I-2-1) Hydrolyse enzymatique

. La genèse de produits d'intérêts biologiques doit être répétable et le procédé maîtrisé. Il est donc important de travailler dans les conditions précises et contrôlées de température et de pH adaptés à l'enzyme utilisée. C'est pourquoi la température et le pH sont relevés toutes les cinq minutes.

Après avoir décongelé les carcasses de sole, 500g de carcasse sont broyés à l'aide d'un Blender et ajoutés à 500ml d'eau distillée préalablement introduits dans le réacteur. Quand la température voulue est atteinte, 0,1% d'enzyme est alors ajouté à la solution. Pour cette étude nous avons réalisé des hydrolyses à 40 et 50°C pour des durées de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 et 180 minutes.

### I-2-2) Inactivation de l'enzyme

Au bout de 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 90 ; 120 ; 180mn, selon l'échantillon, l'hydrolyse est considérée comme terminée. On arrête la réaction enzymatique en plaçant l'hydrolysate dans un bain-marie à 85°C pendant 10mn pour inactiver l'enzyme. Puis, l'hydrolysate obtenu est filtré afin de séparer les arêtes. Les poids de chaque proportion (soluble et insoluble) sont déterminés par pesage.

### I-2-3) Centrifugation

L'hydrolysate est réparti dans les tubes Falcon de 40 ml, puis centrifugé à 3000tr/mn pendant 15mn à 20°C.

Ainsi, trois (3) phases sont récupérées :

la phase huileuse, contenant majoritairement les lipides.

la phase soluble, correspondant au surnageant, comportant les protéines, les peptides en solution et autres composés solubles.

la phase insoluble, correspondant au culot, contenant les protéines myofibrillaires et les fractions non solubles.

Chaque phase est pesée pour déterminer le rendement matière.

### I-2-4) Caractérisation chimique et biochimique

#### **Teneur en eau des échantillons : lyophilisation**

Les tubes Falcon contenant les hydrolysats congelés sont sortis pour séparer les trois phases. Les tubes Falcon sont percés au fond pour sortir les trois phases encore ensemble. Ensuite, on coupe à l'aide d'un scalpel à la séparation de deux phases. Ainsi on sépare correctement les trois phases obtenues après centrifugation.

Après séparation des phases, chacune est placée dans un cristallisateur préalablement taré. Le cristallisateur plein est pesé puis mis à congeler pour ensuite être lyophilisé pendant deux à trois jours (Lyophilisateur Heto-Lab équipement et Pompe vacuubrand).

La différence entre cette masse et celle du cristallisateur plein avant sa lyophilisation correspond à la perte en eau occasionnée.

### **Dosage de l'azote total**

L'azote total est dosé par la méthode de Kjeldahl (Crooke et al., 1971).

C'est une méthode qui utilise la minéralisation à l'acide sulfurique, l'ammoniac obtenu est déplacé par une solution concentrée d'hydroxyde de sodium, recueillie dans une solution d'acide borique et titrée à l'acide chlorhydrique.

### **Extraction des Lipides**

Les lipides des trois phases sont extraits selon la méthode de Folch (Folch et al. 1957).

Un mélange de solvants est utilisé afin d'extraire la totalité des lipides ; des lipides les plus polaires au moins polaires.

Puisque l'extraction est réalisée sur des échantillons secs, 4 volumes d'eau sont additionnés.

Puis, 6,66 volumes de méthanol, solvant polaire, sont ajoutés à l'échantillon lyophilisé (on réalise une extraction des lipides sur les 3 phases ; c'est-à-dire le surnageant, l'interface et le culot, et ceci en triplicata) pour une homogénéisation pendant 30 minutes ; ensuite 13,33 volumes de chloroforme, solvant apolaire, sont ajoutés et le mélange est mis sous agitation pendant 30 minutes également.

A ce stade, les lipides sont majoritairement passés en solution. Par filtration sur verre fritté, les composés solides non lipidiques et non solubilisés dans le mélange de solvant sont éliminés.

Chaque filtrat récupéré est versé dans une ampoule à décanter et on ajoute 0,2 volumes d'eau salée (0,9 % NaCl) afin de rendre le système biphasique. On place ensuite les ampoules à décanter à + 4 °C à l'abri de la lumière pendant toute une nuit.

La phase organique (phase inférieure) contient les lipides neutres (LN), les glycolipides (GL) et les phospholipides (PL) tandis que la phase aqueuse (phase supérieure) contient les gangliosides (Gg) et les autres composés solubles non lipidiques (protéines, sucres...). A l'interface se trouvent majoritairement des protéines.

La phase intéressante dans cette étude est la phase organique. Aussi, elle est récupérée dans un ballon taré, puis évaporée au rotavapor (Rotavapor Heidolph 94200 BIOLOCK Scientific – Pompe ILMVAC commercialisé par AVANTEC) puis sous azote pour éliminer toute trace de solvant ; la phase aqueuse et l'interface sont quant à elles éliminées. Après évaporation totale du solvant, le ballon est pesé et les lipides, la masse de lipides obtenue peut ainsi être déduite. Les lipides sont ensuite repris dans un volume de chloroforme selon la masse obtenue pour les conserver. Ils sont ensuite stockés à l'abri de la lumière à - 80 °C.

## Profil peptidique

Les échantillons d'acides gras méthylés sont passés en Chromatographie Phase Gazeuse (CPG) couplée à un spectromètre de masse afin de s'assurer de l'identité des acides gras. Cette étape ne peut être qu'additionnelle étant donné qu'elle ne donne que des informations qualitatives sur les échantillons. Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe Agilent (6890 series GC system) équipé d'une colonne capillaire de phase apolaire CP-SIL 5 CB (60 m de longueur, 0,39 mm de diamètre externe et 0,25µm d'épaisseur de film) avec l'hélium comme gaz vecteur. La colonne est reliée à la chambre d'injection par une pré-colonne de 5 m de longueur (0,32 mm de diamètre interne). Les injections (15 µL) sont réalisées en mode Split/Splitless avec une ouverture de la vanne à 1,5 min et une fermeture à 4,5 min. La température de l'injecteur est maintenue constante à 250°C, la pression à 1,86 bar et le flux de gaz vecteur à 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. La température du détecteur est maintenue constante à 250°C. Le chromatographe est couplé avec un spectromètre de masse (Agilent, 5973 Network) à l'impact électronique (200 eV).

## Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré de l'hydrolyse (DH) a été déterminé en mesurant la libération des groupes aminés libres en utilisant le réactif du dinitrofluorobenzène (DNFB) désigné sous le nom de Sanger-reagent (Sanger, 1949).Après centrifugation, l'hydrolysate liquide de protéine a été dilué par 200. Un millilitre de solution diluée a été ajouté à 1ml du tétraborate de sodium (2%).Après mélange, 0.25 ml de solution du dinitrofluorobenzène 2.4- (DNFB/ethanol :0.013/1, v/v) a été additionné.Les échantillons ont été chauffés 10 minutes à 600 C. Après se refroidissement, 2 ml d'acide chlorhydrique ont été ajoutés afin d'arrêter la réaction.Une courbe d'étalonnage a été établie en employant la glycine (SIGMA, France) et en lisant l'absorbance à 410 nm.Les résultats ont été exprimés en glycine équivalente.

## Composition et teneur en acides aminés

La méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été utilisée. Pour ce type de chromatographies, les échantillons sont tout d'abord hydrolysés (hydrolyse acide), puis les hydrolysats sont dérivés grâce à un kit : le kit EZ : faast®, enfin ils sont analysés en CPG.

Le kit EZ : faast® est une méthode qui consiste en une étape d'extraction sur une phase solide suivie d'une étape de dérivation et enfin d'une extraction liquide/liquide. Les acides aminés ainsi dérivés sous une forme volatile peuvent être séparés et analysés en phase gazeuse.

L'extraction sur la phase solide est faite grâce à un sorbant qui se lie aux acides aminés, tout en permettant le passage des composés interférents. Les acides aminés ainsi liés sont extrudés et dérivés avec un réactif à température ambiante dans une solution aqueuse.

Les acides aminés dérivés migrent vers une couche organique afin de subir une nouvelle séparation des composés interférents. Un aliquote de la couche organique est ensuite analysé en CPG (PHENOMENEX ; Badawy *et al*, 2008)

Le CPG utilisé un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL®. L'injecteur, qui permet d'introduire l'échantillon dans le flux de gaz vecteur, est réglé à 250°C. Le chromatographe est doté d'une colonne capillaire (phase stationnaire). Le gaz vecteur (phase mobile) utilisé est l'hélium. L'appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme chauffé à 320°C. Les composés carbonés passant dans la flamme du détecteur produisent des ions. Le courant ionique ainsi formé est amplifié via une électrode (Anthonot *et al*, 1998). La

réponse est fonction du débit massique de carbone, proportionnel au nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule détectée (Rouessac *et al*, 1994).

Chaque acide aminé de l'hydrolysats possède un temps de rétention différent sur la colonne. Le détecteur fournit pour chacun un signal sous forme de pics.

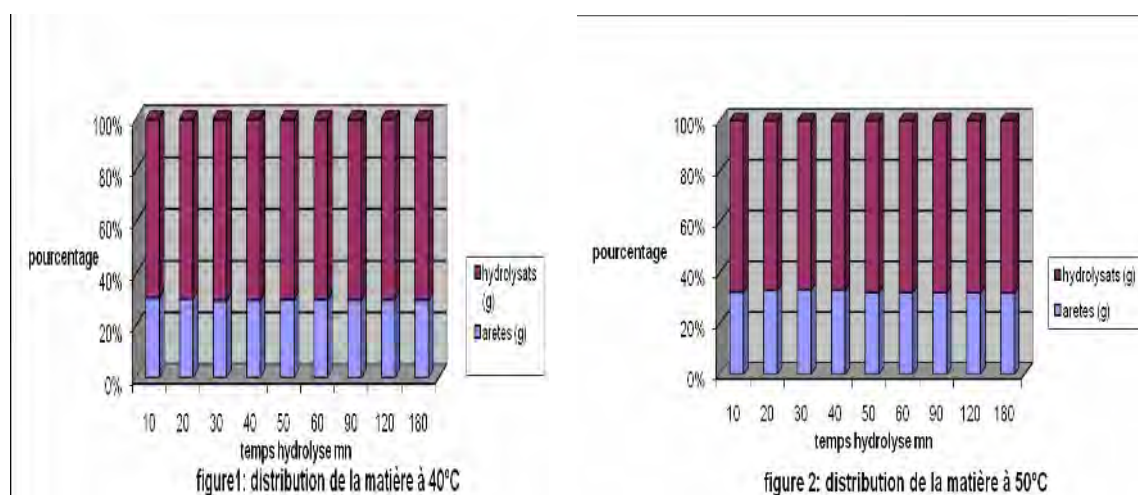
La concentration de chaque acide aminé dans l'échantillon est calculée à partir de l'aire sous la courbe de chacun d'entre eux et par référence à un standard interne.

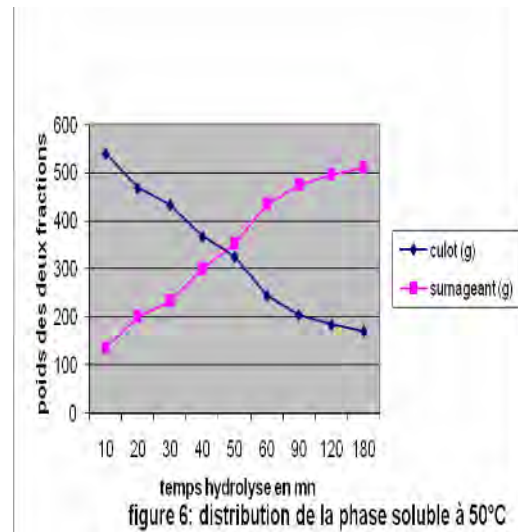
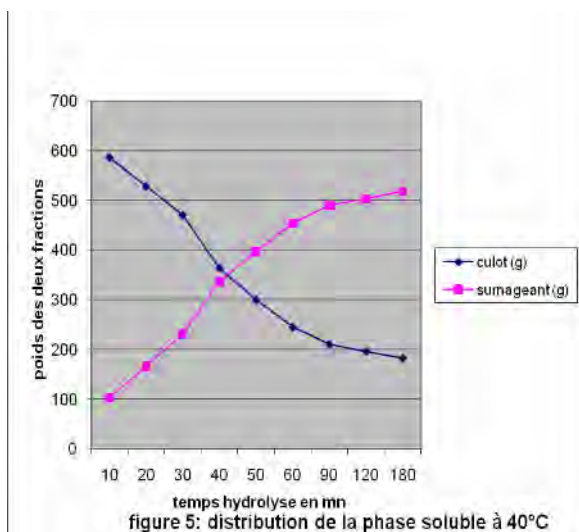
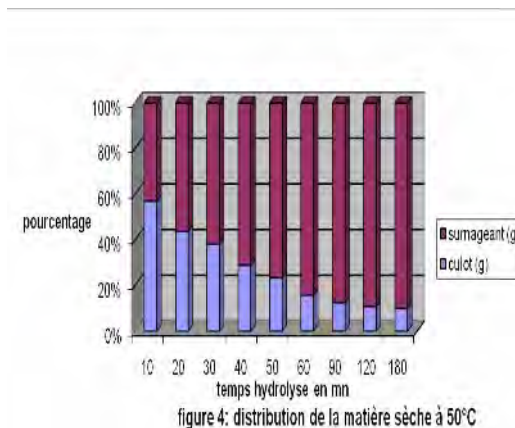
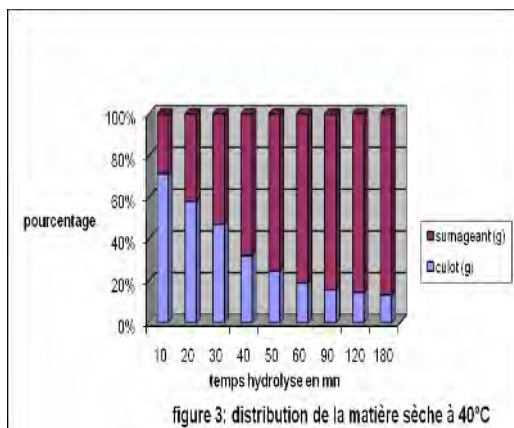
Malheureusement, l'arginine et la cystéine ne sont pas quantifiées par cette méthode car elles sont éluées de la colonne avec le « volume mort ».

### 3. Résultats

#### II-1.) Bilan matière

Les figures 3, 4 montrent la libération de la matière en fonction de la durée d'hydrolyse. Plus le temps est long et plus la matière sèche est libérée.





## II-2) Caractérisation biochimique

La composition biochimique totale (sumageant et culot) est consignée dans les tableaux II et III respectivement pour les hydrolyses à 40°C et à 50°C.

**Tableau II** : Composition biochimique des hydrolysats à 40°C

Temps	MS%	Protéines%	Cendres%	Lipides%	Autres%
<b>Sans hydrolyse</b>					
<b>hydrolyse</b>	<b>15</b>	<b>55</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>16</b>



10 mn	17,35	61,00	6,10	3,70	11,20
20 mn	17,24	61,23	6,38	3,90	10,49
30 mn	17,13	61,40	6,26	4,12	10,23
40 mn	17,17	61,54	6,58	4,03	9,85
50 mn	17,30	61,26	6,83	3,96	9,95
60 mn	17,26	61,33	6,56	3,95	10,15
90 mn	17,14	61,31	6,08	4,23	10,37
120 mn	17,21	61,20	6,24	4,11	10,45
180 mn	17,20	61,09	6,77	4,52	9,62

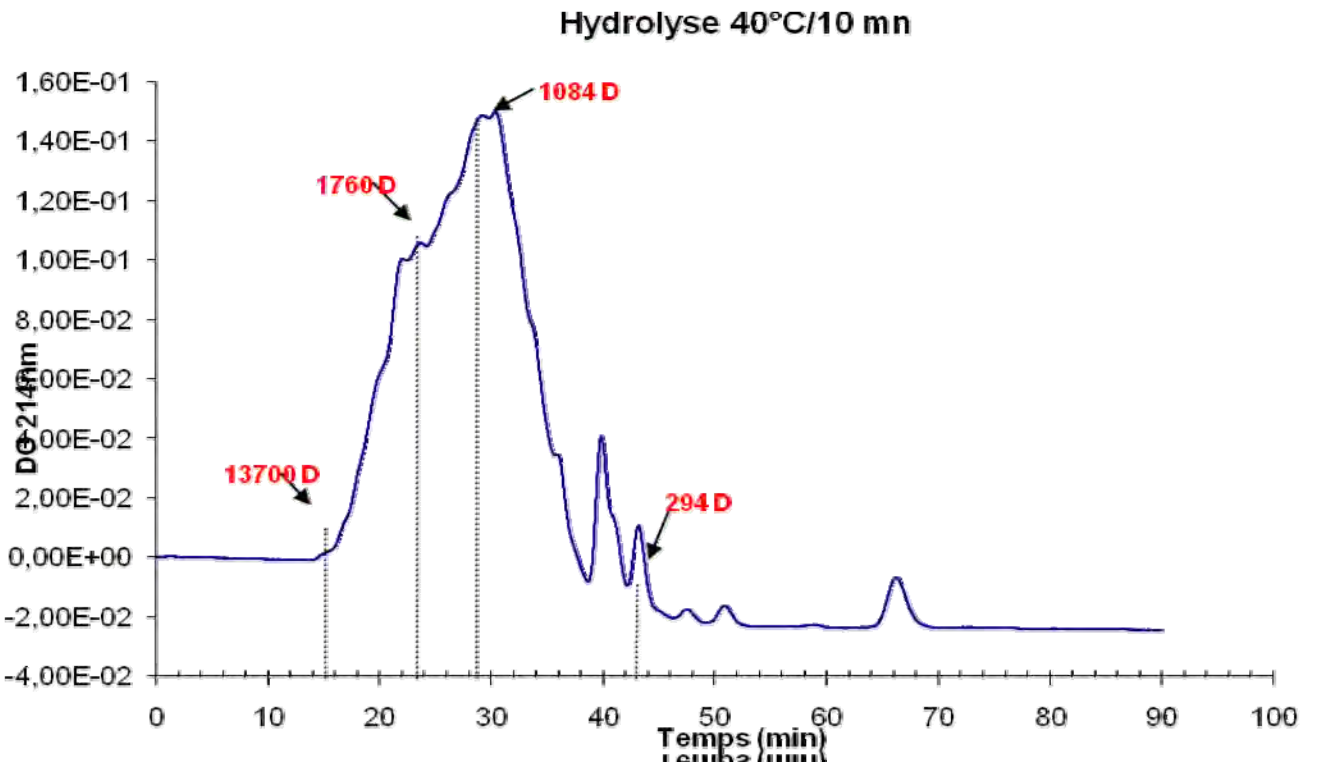
**Tableau III** : Composition biochimique des hydrolysats à 50°C

Temps	MS%	Protéines%	Cendres%	Lipides%	Autres%
<b>Sans hydrolyse</b>	<b>15</b>	<b>55</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>16</b>
10 mn	14,82	57,95	5,30	3,10	18,65
20 mn	14,96	58,05	5,33	3,01	19,61
30 mn	15,05	58,10	5,44	3,24	19,22
40 mn	15,01	58,03	5,43	3,18	19,36
50 mn	14,79	57,86	5,26	3,68	19,20
60 mn	14,78	58,05	5,23	3,55	19,16
90 mn	14,79	58,30	5,12	3,64	18,95
120 mn	14,79	58,53	5,49	3,24	18,73
180 mn	14,76	58,27	5,03	3,71	18,99

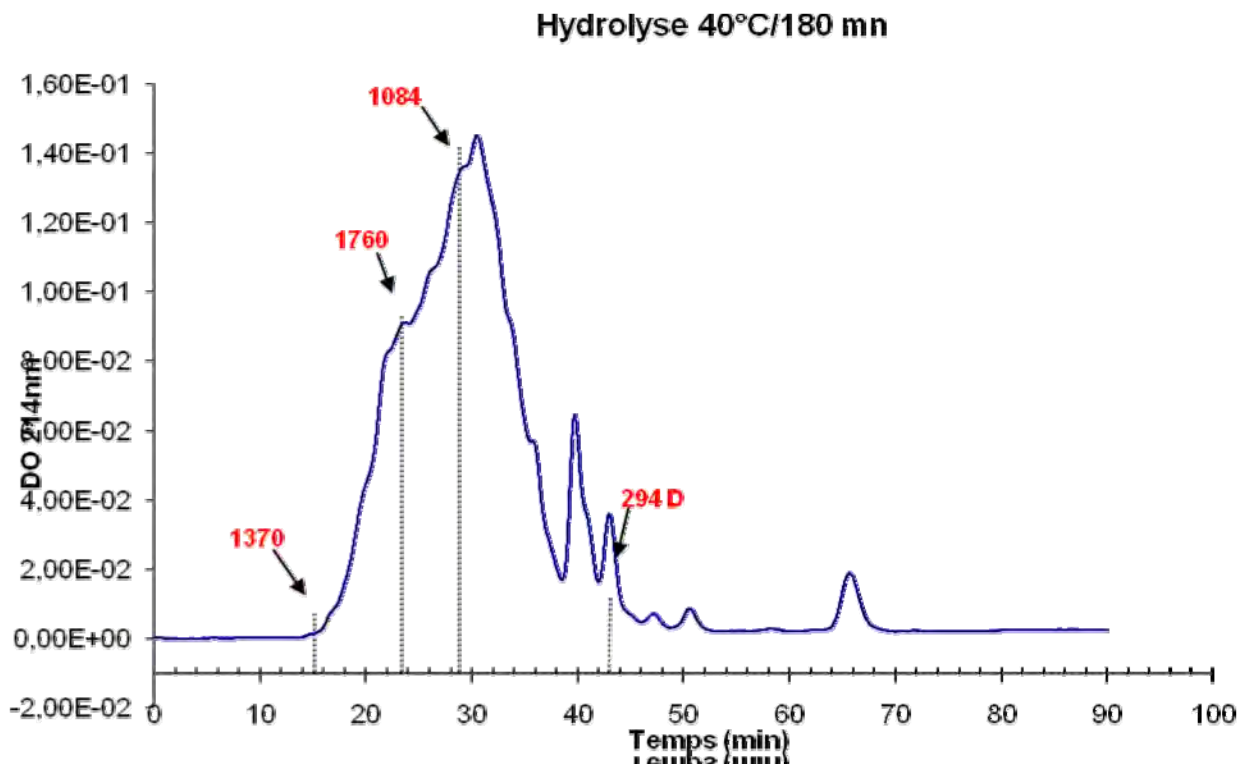
### II-3) Poids moléculaire

Les profils moléculaires ont été réalisés en début et en fin d'hydrolyse c'est à dire après 10 et 180 mn.

Ceux obtenus à partir des hydrolysats de sole tropicale à 40°C sont consignés sur les figures 7 et 8.



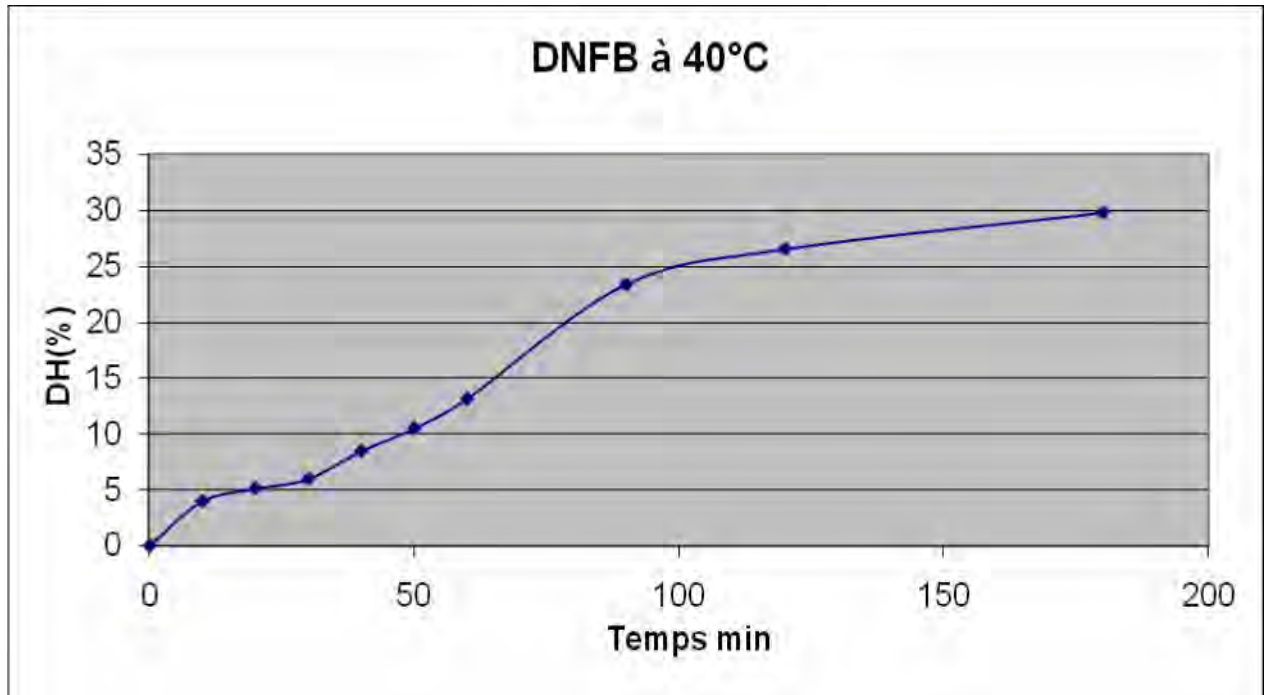
**Figure 7** : Profil moléculaire obtenu après 10mn d'hydrolyse à 40°C



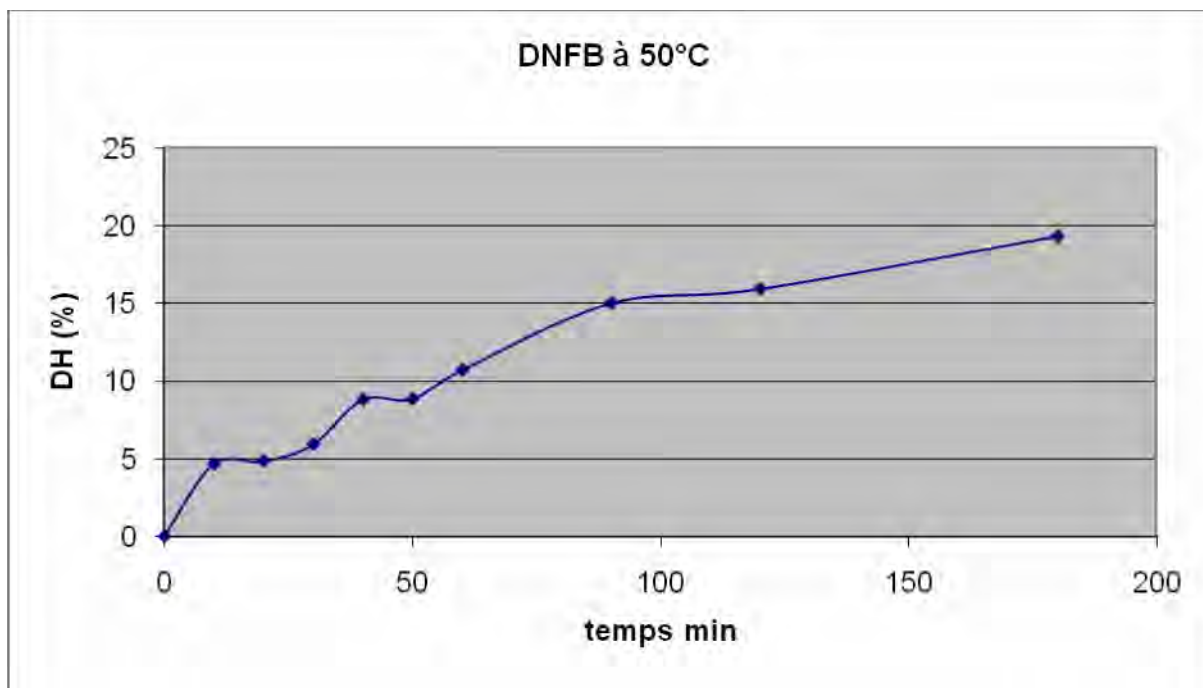
**Figure 8** : Profil moléculaire obtenu après 180 mn d'hydrolyse à 40°C

II-4) Degré d'hydrolyse (DH)

Les figures 9 et 10, montrent les courbes de degré d'hydrolyse (DH) obtenues respectivement à 40°C et à 50°C. Ce DH exprimé en pourcentage permet d'évaluer de façon globale la solubilisation de la matière en fonction de la température utilisée pour conduire les hydrolyses avec Protamex®.



**Figure 9** : Degré d'hydrolyse par la méthode DNFB à 40°C



**Figure 10** : Degré d'hydrolyse par la méthode DNFB à 50°C

#### II-5) Acides aminés

Le tableau V, ci-dessous, donne la quantification de chaque acide aminé pour l'ensemble des échantillons.

**Tableau V** : Quantification des acides aminés dans les hydrolysats de sole tropicale

Echantillon	Teneur en acides aminés g/100 g														
	ALA	GLY	VAL	LEU	ILE	THR	SER	PRO	ASP	MET	GLU	PHE	LYS	HIS	TYR
4.															
1	2,40	3,34	2,27	6,40	1,98	0,83	0,99	2,45	5,43	1,77	9,95	3,98	1,60	1,20	1,72
2	2,46	2,59	1,47	4,58	1,29	0,54	0,73	1,82	3,74	1,22	7,01	2,93	1,13	0,94	1,35
3	4,91	5,20	2,14	3,41	2,27	2,10	2,20	2,86	5,04	1,17	5,77	1,89	1,87	0,81	0,69
4	2,45	3,30	1,98	6,16	1,71	0,75	1,03	2,36	4,79	1,75	8,68	3,82	1,34	1,19	1,89
5	5,17	2,38	1,09	1,72	0,93	1,06	1,01	1,35	2,41	0,57	2,94	0,86	0,99	0,40	0,40
6	5,06	8,86	3,85	6,18	4,30	3,91	3,93	5,20	8,97	2,26	10,47	3,10	3,38	1,50	1,41
7	3,20	4,44	2,68	<b>9,10</b>	2,56	1,03	1,42	3,37	6,41	<b>2,44</b>	12,42	<b>5,09</b>	1,63	<b>1,79</b>	2,78
8	5,34	8,86	<b>4,20</b>	6,56	<b>4,54</b>	<b>3,94</b>	<b>3,87</b>	5,24	9,45	2,13	13,12	3,08	<b>3,70</b>	1,62	1,40
9	2,52	3,46	2,12	6,60	2,09	0,79	1,29	2,86	4,81	1,90	9,33	3,80	1,08	1,17	1,81
1'	6,53	10,68	2,56	4,72	2,37	2,61	2,43	5,79	6,21	1,58	7,01	2,30	2,33	0,97	0,87

2'	6,43	11,12	2,77	4,96	3,09	2,73	2,48	5,56	6,57	1,95	8,09	2,60	2,88	1,12	0,92
3'	6,14	9,52	2,96	5,28	3,16	2,90	2,19	4,75	6,41	2,05	8,95	2,60	2,70	1,14	1,17
4'	6,25	10,67	3,03	4,77	3,19	2,99	2,70	6,08	7,13	1,84	9,30	2,46	2,51	1,13	1,00
5'	6,05	10,33	2,85	4,97	3,23	2,84	2,41	5,61	7,05	1,93	9,44	2,57	2,79	1,08	0,99
6'	6,02	10,53	2,76	4,92	3,19	2,79	2,81	5,40	6,29	1,91	7,93	2,46	2,67	1,08	1,17
7'	5,80	8,78	3,14	4,83	3,04	2,68	2,50	4,95	6,54	1,75	8,73	2,18	2,61	1,04	0,93
8'	5,76	7,81	3,38	5,20	3,72	3,14	2,98	4,74	7,62	1,97	11,29	2,22	3,30	1,20	1,02
9'	3,14	3,06	1,04	3,98	0,19	0,25	0,50	2,38	0,92	1,06	1,43	2,37	0,75	0,69	1,66

## 5. Discussion

---

### III-1) Bilan matière :

S'agissant de la répartition des fractions solubles et insolubles au niveau des hydrolysats, nous notons une dispersion de la matière au cours du temps. En effet, plus le temps d'hydrolyse est important et plus la partie solubilisée est importante et l'effet est plus rapide en ce qui concerne les hydrolyses réalisées à 40°C. Les figures 5 et 6 indiquent cette variation observée entre le surnageant et le culot.

### III-2) Poids moléculaires :

En début d'hydrolyse, le poids moléculaire des peptides était en-dessous de 13.700 Da. Les résultats ont montré, une proportion plus importante de ces peptides de grandes tailles à 10 mn d'hydrolyse. Ces tailles sont comprises entre 1760 et 1084 Da. Par contre à 180 mn d'hydrolyse, le surnageant est composé essentiellement de peptides à faible poids moléculaire dont la distribution est plus importante comparée à ceux obtenus à 10mn. Ces résultats peuvent être corrélés à ceux obtenus par NGUYEN *et al.* (2007), sur des hydrolysats de têtes de thons. Ces auteurs ont montré qu'il existe une forte corrélation entre la dégradation des protéines et leur solubilisation pendant l'hydrolyse.

Selon BENJAKUL [3], la répartition pondérale des molécules lors de l'hydrolyse enzymatique renseigne sur les futurs domaines d'application. Il a montré à travers son étude, que le pourcentage de protéines diminue au profit de celui des peptides au cours de l'hydrolyse. Il a pu isoler des peptides bioactifs qui ont un poids moléculaire compris entre 10 000Da > PM> 200 Da à partir de coproduits de poissons.

Dans cette étude, la plupart des molécules contenues dans le surnageant sont constituées de dipeptides et de tétrapeptides avec des poids moléculaires comprises entre 1760 Da et 294 Da. Cependant, les conditions d'hydrolyse n'ont pas permis d'obtenir les mêmes quantités d'acides aminés libres (figures 7 et 8).

En ce qui concerne les hydrolyses à 50°C, la distribution des poids moléculaires entre 10 mn et 180 mn, était semblable aux essais réalisés à 40°C et la plupart des peptides ont eu un poids moléculaire en-dessous de 1084 Da. Par conséquent, aucune différence significative n'est trouvée entre les hydrolysats.

### III-3) Degré d'hydrolyse :

Les degrés d'hydrolyse obtenus à partir des deux températures ont augmenté avec l'augmentation du temps d'hydrolyse.

En effet, on a observé une montée rapide de la courbe de DH au cours de la première période d'hydrolyse c'est-à-dire de 0 à 20 mn. Ensuite, l'augmentation du DH est pratiquement constante jusqu'à 60 mn d'hydrolyse avant d'atteindre le plafond à 180 mn. A 40°C, le pourcentage de DH atteint 30% alors qu'à 50°C, le maximum obtenu est de 20%. Par ailleurs, le plateau n'a pas été atteint et une étude supplémentaire sur l'évolution du DH après 180 mn d'hydrolyse devrait être envisagée. Toutefois, ces résultats sont similaires à ceux de SATHIVEL *et al.* [17] qui ont étudié l'hydrolyse de coproduits de poisson en utilisant comme enzymes l'alcalase et la Neutrase. De cette étude, il ressort que, dans la période initiale de l'hydrolyse, un grand nombre de liaisons peptidiques sont coupées, ensuite la concentration des peptides solubles dans le réacteur augmente de manière linéaire.

La forme de ces courbes de DH est semblable à celles précédemment obtenues après hydrolyse de l'estomac de Saumon [5] (**Guérard et al., 2002**), et d'harengs [12], [16] de carcasses de Saumon [8], et de têtes de Saumon [6], [16].

Le degré d'hydrolyse à 40°C est plus élevé que celui obtenu à 50°C. Cette différence peut s'expliquer d'une part par l'action du Protamex sur le substrat, qui atteint son optimum vers 40°C d'après la notice du fabricant (**Novozymes SA**). D'autre part, cette différence peut être liée à l'efficacité du procédé d'hydrolyse. En effet, ASPMO *et al.* [1], ont montré que la quantité d'azote non protéique produite au cours de l'hydrolyse a une influence significative dans la détermination du DH par la méthode DNFB.

Par ailleurs, DUMAY *et al.* [4], en utilisant Protamex® à 0,1% pour l'hydrolyse de viscères de sardine, ont trouvé un degré d'hydrolyse de 31% après 24 heures. Ces résultats sont relativement proches de ceux que nous avons obtenus à 40°C.

### III-4) Composition et teneur en acides aminés :

La cystéine et le tryptophane n'ont été dosés dans aucun échantillon à cause de la technique d'hydrolyse acide utilisée. Cependant, la méthionine étant un précurseur de la cystéine, sa présence dans l'alimentation n'est donc pas essentielle.

L'échantillon 8 est le plus riche en acides aminés essentiels. En effet, il contient les valeurs les plus importantes pour 5 de ces acides aminés (en gras sur le tableau) (Valine, Isoleucine, Thréonine, Sérine, Lysine). Il est notamment le plus riche en lysine qui est l'acide aminé de référence pour les poulets de chair.

L'échantillon 7 est également intéressant car il contient les 4 autres acides aminés essentiels dans les quantités maximales avec notamment une teneur importante en Leucine.

Ces résultats ouvrent des pistes potentielles d'utilisation des hydrolysats de coproduits de la sole en formulation d'aliments de volailles. Les colonnes colorées sur le tableau V, sont celles des acides aminés essentiels pour le poulet de chair. Cependant, il apparaît important de combiner le concept de «protéine idéale» et les valeurs de digestibilité des acides aminés afin de prendre en compte la contrainte d'un taux de protéines minimum (l'apport protéique étant une composante essentielle de la croissance des poulets de chairs) et celle liées aux acides aminés potentiellement limitants (**Zaman et al, 2008 ; Relandeau et al, 2005**). De plus, un apport en protéines et/ou en acides aminés insuffisant ou à l'inverse trop important entraînerait une altération des performances du poulet et pourrait notamment engendrer une altération des réponses immunitaires (**Quentin et al, 2004 ; Konashi et al, 2000**).

En d'autres termes, l'utilisation du concept de «protéine idéale» consiste à simplifier l'expression des besoins protéiques. Cette protéine correspond au profil d'acides aminés

d'un aliment qui maximise les performances (**Quentin et al, 2004 ; Relandeau et al, 2005**). Différents profils de «protéine idéale» ont été publiés. Le profil présenté, dans le tableau ci dessous, a été réalisé à partir des résultats de différentes publications.

**Tableau VI** : Proposition de «protéine idéale», basée sur la digestibilité iléale standardisée des acides aminés, relativement à la lysine (**D'après Relandeau et al, 2005**)

<b>Acides aminés</b>	<b>% de Lysine</b>
Lysine	100
Valine	77
Leucine	105
Isoleucine	67
Thréonine	65
Histidine	40
Méthionine et Cystéine	105
Phénylalanine et Tyrosine	105
Arginine	105
Tryptophane	17

Chez le poulet de chair, méthionine, lysine, thréonine, tryptophane, leucine, isoleucine, valine, serine, arginine, histidine et phénylalanine sont essentiels (**Quentin et al, 2004**). Les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) sont les premiers acides aminés limitant pour cette espèce, dans les matières premières habituellement employées en alimentation animale. En effet, l'alimentation avicole est principalement constituée d'une source protéique déficiente en acides aminés soufrés. La lysine et la thréonine sont considérés comme les autres principaux acides aminés limitant (**Baker, 2006 ; Waldroup et al, 2005 ; Relandeau et al, 2005 ; Leclercq, 1998a**).

La lysine est également couramment utilisée comme acide aminé de référence. En effet, contrairement à la méthionine, elle est avant tout utilisée dans l'organisme pour le dépôt protéique et a donc des effets spécifiques sur la carcasse des poulets de chair. En effet, l'augmentation de la teneur en lysine d'un aliment entraînerait une diminution de la teneur en graisse totale de la carcasse au profit du muscle (**Relandeau et al, 2005 ; Leclercq, 1998b**). La thréonine intervient également dans le processus de dépôt protéique. Elle aurait aussi un rôle dans les mécanismes d'entretien, tels que le renouvellement du mucus intestinal et la synthèse des immunoglobulines (**Relandeau et al, 2005**). Une déficience en thréonine affecterait l'efficacité des acides aminés soufrés et de la lysine (**Kidd et al, 2004**).

Les acides aminés soufrés jouent un rôle important au niveau du métabolisme protéique. Ils sont les précurseurs de nombreuses molécules. En effet, la méthionine participe à la synthèse de la cystéine. Celle-ci est nécessaire à la synthèse du glutathion et de la taurine, composés essentiels pour la lutte contre le stress oxydant (**Métayer et al, 2008 ; Baker, 2006**). Elle intervient également dans la synthèse de la carnitine jouant un rôle majeur dans la  $\beta$ -oxydation (transport des acides gras) (**Tome et al, 2007**). Une déficience en ces acides aminés entraînerait, chez le poulet de chair, une diminution du gain de poids et de l'accrétion protéique (**Métayer et al, 2008**).

Comme énoncé ci-dessus, la teneur en acides aminés est exprimée en % de lysine pour l'alimentation des poulets de chair, puisque cet acide aminé joue un rôle majeur dans l'alimentation de cette espèce. Le tableau VII, ci dessous, donne la quantité des principaux acides aminés limitant, cités précédemment, en % de lysine.

**Tableau VII** : Comparaison de la teneur en acides aminés des échantillons de sole et d'un profil de «protéine idéale»

	3,30	102,38	433,00%	112,67	95,04	59,52	98,11	36,32
<b>8'</b>	3,30	102,38	433,00%	112,67	95,04	59,52	98,11	36,32
<b>9'</b>	0,75	138,43	578,71	25,64	33,99	<b>MET, 60</b>	<b>PRO, 28</b>	91,96
<b>«protéine idéale»</b>	<b>LYS</b>	<b>VAL</b>	<b>LEU</b>	<b>ILE</b>	<b>THR</b>	<b>CYS)</b>	<b>TYR</b>	<b>HIS</b>
	100	400,18	530,21	124,15	56,59	110,55	350,48	74,05
<b>2</b>	1,13	129,56	484,97	113,82	47,79	107,64	378,48	83,43
<b>3</b>	1,87	114,55	420,10	121,80	112,55	62,73	138,17	43,50
<b>4</b>	1,34	148,05	516,33	127,27	55,71	130,49	426,23	88,95
<b>5</b>	0,99	109,92	433,41	94,33	107,21	58,01	127,63	40,13
<b>6</b>	3,38	113,88	412,60	127,21	115,83	66,80	133,34	44,33
<b>7</b>	1,63	164,21	508,50	156,69	63,22	149,39	480,90	109,51
<b>8</b>	3,70	113,29	405,34	122,63	106,30	57,61	120,99	43,70
<b>9</b>	1,08	195,21	564,84	192,76	73,25	175,51	517,81	107,82
<b>1'</b>	2,33	109,71	487,69	101,58	111,92	67,60	135,69	41,42
<b>2'</b>	2,88	96,07	441,70	107,01	94,54	67,64	122,18	38,97
<b>3'</b>	2,70	109,72	464,23	116,88	107,59	75,91	139,38	42,10
<b>4'</b>	2,51	120,61	424,02	127,25	118,99	73,43	138,20	44,85
<b>5'</b>	2,79	102,23	462,16	115,86	101,83	69,38	127,91	38,60
<b>6'</b>	2,67	103,35	454,62	119,58	104,53	71,49	136,11	40,58
<b>7'</b>	2,61	120,15	463,17	116,25	102,56	66,97	119,26	39,88



Comme nous l'avons signalé, la cystéine n'a été dosée dans aucun échantillon. La teneur en acides aminés soufrés est également faible. En effet, pour la plupart des échantillons, le % de lysine est inférieur à celui de la « protéine idéale ». Pour ces acides aminés, seuls les échantillons 1, 2, 4, 7 et 9' sont intéressants. Ce point doit être pris en compte puisque les acides aminés soufrés sont les premiers acides aminés limitants pour les poulets de chair. Comme le montre le tableau des résultats, la teneur des échantillons en thréonine semble intéressante. En effet, la « protéine idéale » contient 65% de la lysine en thréonine. Or, plus ce ratio est grand, plus la croissance des poulets de chair serait optimisée. Une forte teneur en thréonine favoriserait l'utilisation de la lysine pour le dépôt protéique. De plus, le besoin en thréonine serait augmenté dans certaines situations physiologiques notamment pour les poulets en phase de finition (**Relandeau et al, 2005**).

Si l'on associe ces données, les échantillons 7 et 8 semblent être les plus appropriés pour l'alimentation du poulet de chair. Une association des deux serait d'ailleurs plus intéressante. En effet, cela permettrait de regrouper les teneurs maximales en acides aminés essentiels et d'apporter des ratios Thréonine/Lysine et Methionine/Lysine adéquats et supérieurs à ceux de la « protéine idéale ». Ainsi, une supplémentation avec les deux échantillons 7 et 8, correspondant respectivement à 90 min et 120 min d'hydrolyse enzymatique à 40°C, pourrait permettre d'optimiser la croissance des poulets de chair et favoriser le dépôt protéique, afin d'atteindre des performances à la fois techniques et économiques.

## Conclusion

---

Cette étude a montré que les protéines contenues dans les coproduits de la sole tropicale peuvent être solubilisées par hydrolyse enzymatique en utilisant Protamex®. Les résultats ont indiqués que les hydrolysats représentent une source importante de protéines (80%) et de minéraux (10%). Cependant, la taille des peptides et le degré d'hydrolyse sont optimisés à 40°C. A coté de cela, il a été noté que ces hydrolysats étaient riches en acides aminés essentiels (9 au total). Enfin, cette étude a montré qu'une piste potentielle d'utilisation de ces hydrolysats serait à travers l'alimentation des poulets de chairs.

## Bibliographie

---

Aspmo SI, Horn SJ, Eijsink VGH, 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*; (40), 1957-1966.

Baker D.H., 2006. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids, *The Journal of Nutrition*, (136), 1670S-1675S.

Benjakul S, Morrissey MT, 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; (45), 3423-3430.

Dumay J, Donnay-Moreno C, Barnathan G, Jaouen P, Bergé JP, 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*; 1-6.

Guérard F, Dufossé L, De La Broise D, Binet A, 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; (11), 1051-1059.

Hoylen NT, Merritt JH, 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science; 59(1):76-79.

Huong N, Donnay-Moreno C, Bergé JP, 2007. Enzymatic hydrolysis of tuna by-products by using Protamex protease. Proceeding WEFTA Annual Meeting; Espain.1-6

Kristinsson HG, Rasco BA, 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. Journal Agricultural and Food Chemistry; (48), 657-666.

Kidd M.T., Corzo A., Hoehler D., Kerr B. J., Barber S. J., Branton S. L, 2004. Threonine Needs of Broiler Chickens with Different Growth Rates, Poultry Science, (83), 1368-1375.

Konashi S., Takahashi K., Akiba Y., 2000. Effects of dietary essential amino acid deficiencies on immunological variables in broiler chickens, British Journal of Nutrition, (83), 449-456.

Leclercq B., 1998. Le besoin en thréonine des volailles de chair, INRA Production Animale, 11 (4) : 263-272.

Liceaga-Gesualdo AM, Li-Chan ECY, 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). Journal of food science; 64(6):1000-1004.

Métayer S., Seiliez I., Collin A., Duchêne S., Mercier Y., Geraert P-A., Tesseraud S., 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status, Journal of Nutritional Biochemistry, (19), 207-215.

Quentin M., Bouvarel I., Bastianelli D., Picard M., 2004. Quels « besoins » du poulet de chair en acides aminés essentiels ? Une analyse critique de leur détermination et de quelques outils pratiques de modélisation, INRA Production Animale, 17 (1), 19-34.

Relandeau C. & Le Bellego L., 2005. Besoin en acides aminés du poulet de chair : revue sur la Lysine, la Thréonine et les autres acides aminés, Ajinomoto Animal Nutrition, (27), 1-36.

Sathivel S, Bechtel PJ, Babbitt J, Smiley S, Crapo C, Reppond KD, Prinyawiwatkul W., 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. Journal of Food Science; (68), 2196-2200.

Sathivel S, Smiley S, Prinyawiwatkul W, Bechtel PJ, 2005. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. Journal of food science;70(6):401-406.

Slizyte R, Dauksas E, Falch E, Storro I, Rustad T., 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Process Biochemistry; (40)1415-1424

Tomé D., Bos C., 2007. Lysine Requirement through the Human Life Cycle, The Journal of Nutrition, 6th Amino Acid Assessment Workshop : 1642S-1645S.

Zaman Q.U., Mushtaq T., Nawaz H., Mirza M.A., Mahmood S., Ahmad T., Babar M.E., Mushtaq M.M.H., 2008. Effect of varying dietary energy and protein on broiler performance in hot climate, Animal Feed Science and Technology.