

François KOUADIO KOUAKOU



ifremer

Attendrissement enzymatique de chair de mollusques

41826
~~64377~~
664.95

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE

RENNES

D.A.A - HALIEUTIQUE

Option

TECHNOLOGIE DE TRANSFORMATION DES PRODUITS

Attendrissement enzymatique de chair de mollusques

par KOUADIO KOUAKOU FRANCOIS

DRV/VP

Attestation de traitement de la thèse

RESUME

Deux espèces de mollusques marins ont été étudiées. La caractéristique très particulière de la chair de ces deux coquillages en l'occurrence sa fermeté nous a amenés à analyser le comportement du muscle du pied, la partie la plus ferme, en fonction de la chaleur et à déterminer les différentes températures de dénaturation des protéines constitutives majeures. Cette fermeté rend les muscles difficiles à mastiquer si bien qu'elle constitue un frein à la consommation. Ces coquillages présentent des proportions assez voisines de protéines myofibrillaires et conjonctives, toutes deux responsables de la texture des viandes. Cette composition similaire a déterminé le choix d'une préparation enzymatique, la protéase V100, capable d'agir à la fois sur les deux types de protéines. Les essais de production de conserves à partir de ces coquillages ont donné des résultats satisfaisants pour Buccinum undatum (bulot). Avec Glycymeris glycymeris (amande de mer) deux situations ont été distinguées. Chez les individus de taille moyenne ou comportant peu de viscères, un attendrissement satisfaisant de la chair a été observé sur les conserves. En revanche, des difficultés liées à l'importance des viscères chez les individus en période de maturation sexuelle n'ont pu être surmontées.

Mots clés : Glycymeris glycymeris, Buccinum undatum, texture, attendrissement, enzyme

SUMMARY

Two types of marine molluscs were studied. The highly individual characteristics of the flesh of these two shellfish, in this case its firmness, led us to analyse the behaviour of the foot muscle, the firmest part, as a function of heat and to the determination of the different temperatures at which the denaturation of the main constituent proteins occurs. This firmness makes the muscles difficult to chew to such an extent that they have acted as a break to consumption.

These shellfish have very similar proportions of myofibrillar and connective proteins, both of which are responsible for the texture of meat. This similarity of composition determined the choice of an enzymatic preparation (protease V100) capable of acting simultaneously on both these types of proteins. The canning production tests using these shellfish gave satisfactory results for Buccinum undatum (whelk).

With Glycymeris glycymeris (Dog Cockle), two distinct cases were revealed. In medium-sized specimens or those with few intestines, satisfactory tenderizing of the flesh was observed in the canned product. However, the difficulties relating to the size of the intestines in specimens in periods of sexual maturation could not be overcome.

Key words : Glycymeris glycymeris, Buccinum undatum, texture, tenderizing, enzyme.

REMERCIEMENTS

Je remercie Mr H. DURAND, Chef du département U.V.P pour m'avoir fait confiance en m'accueillant au sein de son équipe pour la réalisation de ce travail. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance.

J'adresse également ma très grande reconnaissance et mes remerciements sincères à Mr J.L. VALLET, Chef du Laboratoire de technologie de traitement des produits pour l'encadrement et les précieux conseils qu'il m'a prodigués.

Que Madame J. CORNET et Mr C. KNOCKAERT trouvent ici l'expression de ma gratitude pour leur grande sollicitude tout au long de ce stage.

Je remercie très sincèrement toute la sympathique et enthousiaste équipe du département U.V.P.

Enfin, mes remerciements s'adressent aussi à toute personne qui sans être nommément désignée a contribué à faciliter le déroulement de ce stage et à rendre agréable mon séjour au sein de l'IFREMER.

SOMMAIRE

	Pages
Présentation de l'IFREMER	i
Introduction	1
Systématique des espèces étudiées	3
I. COMPOSITION BIOCHIMIQUE	4
I.1 - Dosage de l'eau	
I.2 - Détermination de la quantité de cendres	
I.3 - Dosage des matières grasses	
I.4 - Dosage des sucres totaux	
I.5 - Dosage des protéines	
I.5.1 - Dosage de l'azote total	
I.5.2 - Dosage de l'azote non protéique	
I.5.3 - Dosage des acides aminés totaux	
I.5.4 - Dosage des acides aminés libres	
I.6 - Résultats et discussions	8
II - LES PROTEINES DU MUSCLE	14
II.1 - Généralités	
II.2 - Rôles des protéines	
II.3 - Les protéines du muscle	15
II.3.1 - Les protéines extracellulaires	
II.3.1.1 - Le collagène	
II.3.1.2 - L'élastine	
II.3.2 - Les protéines intracellulaires	
II.3.2.1 - Les protéines sarcoplasmiques	
II.3.2.2 - Les protéines myofibrillaires	
II.3.3 - Dosage des différentes fractions protéiques du muscle	19
II.3.3.1 - Principe	
II.3.3.2 - Matériels et réactifs	
II.3.3.3 - Protocole	
II.3.4 - Résultats et discussions	23

III - COMPORTEMENT DU MUSCLE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE	24
III.1 - Etude de la fermeté du muscle en fonction de la température	
III.1.1 - Principe et méthode	
III.2 - Etude des différentes températures de dénaturation des protéines du muscle	
III.2.1 - Matériels	
III.2.2 - Principe et méthode	
III.3 - Résultats et discussions	27
IV - ENZYMES ET ATTENDRISEMENT DU MUSCLE	32
IV.1 - Généralités	
IV.2 - Caractéristiques de la papaïne	
IV.3 - Choix de la papaïne comme agent d'attendrissement	
IV.4 - Utilisations de la papaïne dans l'alimentation	
IV.5 - Attendrissement de la chair des mollusques par la protéase V100	34
IV.5.1 - Principe	
IV.5.2 - Expériences	
IV.5.3 - Procédé du traitement de la chair	
IV.6 - Résultats et discussions	35
V - ANALYSE SENSORIELLE	38
V.1 - Test de dégustation	
V.2 - Résultats et discussions	
VI - ESSAI DE FABRICATION DE CONSERVES	41
VI.1 - Définition	
VI.2 - Fabrication de conserves	
VI.3 - Résultats et discussions	44
VII - CONCLUSION	47
ANNEXES	52

PRESENTATION DE L'IFREMER

L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) est né de la fusion de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (I.S.T.P.M.) et du Centre National pour l'Exploitation des Océans (C.N.E.X.O.). Le siège est à Paris. L'IFREMER est un établissement à caractère industriel et commercial et est placé sous la double tutelle du Ministère de la Recherche et de la Technologie et du Secrétariat d'Etat à la Mer.

Sa mission est de conduire et de promouvoir des recherches fondamentales et appliquées, et des activités de développement technologique et industriel destinées à :

- * connaître, évaluer et mettre en valeur les ressources des océans et à rationaliser leur exploitation,
- * améliorer la connaissance et les méthodes de protection et de mise en valeur de l'environnement marin,
- * favoriser le développement socio-économique du monde maritime.

L'établissement dispose de 5 centres implantés à Brest, Boulogne-sur-Mer, Nantes, Tahiti et Toulon auxquels sont rattachées différentes stations.

Il fonctionne avec trois grandes directions :

* La Direction des Ressources Vivantes (D.R.V.) s'occupe du contrôle et du suivi des ressources halieutiques et aquacoles, de leurs utilisations et de leur valorisation. Elle se charge également d'élaborer et de mettre en oeuvre des stratégies de développement et d'aménagement des pêcheries et cultures marines.

* La Direction de l'Ingénierie et de la Technologie (D.I.T.) qui couvre les domaines tels que les technologies des pêches, la technologie navale, les ouvrages en mer, les interventions sous-marines....

* La Direction de l'Environnement et des Recherches Océaniques (D.E.R.O.) chargée de l'environnement littoral, géosciences marines, océanographie physique....

Chaque Direction comporte plusieurs départements.

Le cadre de ce stage a été le département Utilisation-Valorisation des Produits (U.V.P.) placé sous la direction des ressources vivantes. Le département a pour mission de concevoir et de mener à bien :

- * Les recherches amont portant sur la transformation des produits de la pêche et des cultures marines depuis leur production jusqu'à l'état de produit fini et le développement de nouvelles techniques de valorisations et d'optimisation des espèces peu ou pas exploitées.

- * La conduite de projets de faisabilité technique et économique en collaboration avec le secteur professionnel.

- * Le soutien scientifique et l'appui technique à la profession et à l'administration.

INTRODUCTION

Dans l'optique de diversifier les activités de pêche, l'IFREMER a lancé un programme de recherches sur les côtes françaises. Les études ont permis de mettre en évidence l'existence de stocks importants de petits bivalves sur les côtes Normandie-Bretagne et Manche-Ouest. Parmi ces bivalves, l'amane de mer, avec plus de 600 000 tonnes exploitables occupe une place de choix. Cette révélation arrive à un moment très opportun. En effet, la praire qui pendant plus de 20 ans a constitué le pilier de la pêche aux bivalves dans la région connaît aujourd'hui un déclin au niveau des stocks exploitables et un redressement n'est pas envisageable à court terme. Cet épuisement des stocks de praire est du aux effets conjugués d'un effort de pêche prononcé et d'une absence de recrutement notable depuis plusieurs années (notes IFREMER).

La pêche au buccin, gastéropode appelé aussi bulot, tend à attirer quelques équipages mais la saturation actuelle du marché et le fait que le stock soit déjà sur exploité dans la zone Est du golfe Normand breton ne plaide pas en faveur d'un accroissement de l'effort. Un transfert de l'effort de pêche semble s'imposer et l'espoir le plus sérieux de maintenir la flotille coquillière moderne de ce bassin réside dans la possibilité d'exploiter ces petits bivalves.

Ces efforts de redynamisation de la pêche aux coquillages resteraient vains si en aval, la commercialisation et la consommation des produits récoltés ne sont pas assurées. En effet, la fermeté de la chair de l'amande de mer fait que ce mollusque est peu apprécié par les consommateurs. Cette fermeté est un phénomène naturel permanent qui résulte de la structure du muscle et n'est donc pas due à une évolution post mortem comme c'est le cas pour le poisson ou pour la viande. Cette même difficulté se rencontre chez le buccin.

L'attendrissement de la chair de ces coquillages par des moyens technologiques appropriés pourrait entraîner un regain d'intérêt chez les consommateurs et donc favoriser une extension de la production.

L'objet du stage qui a donné lieu au présent rapport est d'attendrir la chair de l'amande de mer et celle du buccin par des moyens enzymatiques. Dans un premier temps nous allons étudier certaines caractéristiques biochimiques des deux mollusques entre autres leur composition biochimique, et leur valeur nutritionnelle, la nature des protéines du tissu musculaire ainsi que leurs proportions relatives. Nous allons également nous intéresser au comportement des muscles en fonction de la chaleur au cours d'un traitement thermique sans action enzymatique préalable. Enfin, des essais d'application technologique du procédé d'attendrissement seront envisagés en vue de son intégration dans une unité de production de conserves.

SYSTEMATIQUE DE L'AMANDE DE MER ET DU BUCCIN

Amande de mer

Mollusque bivalve lamellibranche
Ordre des filibranches
Super famille des Arcoïdea
Famille des Glycymeridea
Genre Glycymeris
Espèce Glycymeris glycymeris Linné, 1767

Noms vernaculaires : Amande (en Charentes)
Amande du large (à Arcachon)
Voveau (à Marseille)
Amande de mer (en Bretagne)
Clovisse rouge (à Alger)

L'amande de mer possède une coquille constituée de deux valves symétriques. La coquille est pratiquement ronde.

Buccin

Mollusque gastéropode prosobranche
Ordre des monotocardes
Sous ordre des néogastropodes
Super famille des Buccinoïdea
Famille des Buccinidés
Genre Buccinum
Espèce Buccinum undatum, Linné 1758

Noms vernaculaires : buccin - bulot
Le bulot a une coquille de forme conique mais asymétrique.

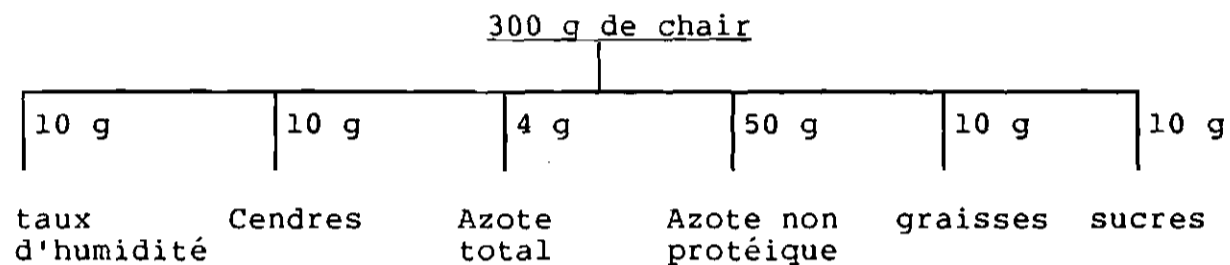
Dans le texte qui va suivre nous désignerons l'amande de mer et le buccin respectivement par amande et bulot.

I - COMPOSITION BIOCHIMIQUE

L'analyse de la composition biochimique des 2 mollusques s'est limitée à la détermination quantitative de l'eau qu'ils contiennent, des protéines et acides aminés totaux, des sucres et des matières grasses.

Schématiquement l'analyse se présente comme suit :

Après décoquillage du produit frais, 300 g de chair sont broyés et homogénéisés au mixer



Les différents dosages ont été répétés 10 fois et une moyenne a été établie.

Dans la littérature nous n'avons pas rencontré de données sur la composition de ces deux mollusques, ce qui laisse supposer que très peu d'études les concernant ont été faites.

I.1 - Dosage de l'eau

Matériels :

- Une balance de précision (SARTORIUS de précision 0,001g)
- Une étuve réglée à 105°C

Méthode

Dans une capsule, on pèse environ 10 g de chair fraîche broyée. L'échantillon est placé à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. On pèse à nouveau l'extrait sec.

La différence de poids représente la quantité d'eau évaporée.

Le taux d'humidité exprimé en pourcentage de la matière fraîche est :

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{\text{Poids frais} - \text{Poids sec}}{\text{Poids frais}} \times 100$$

I.2 - Détermination de la quantité de cendres

Matériels

- Un four (MEMMERT)
- Un creuset en porcelaine
- Une balance de précision (SARTORIUS de précision : 0,001g)

Méthode

On pèse environ 10g de matière fraîche. L'échantillon est ensuite placé au four à 600°C pendant environ 24 heures. Les cendres obtenues, de couleur blanche, sont pesées. La quantité de cendres est exprimée en pourcentage de la matière fraîche.

I.3 - Dosage des matières grasses

Matériels

- Une unité d'extraction SOXTEC SYSTEM HT2 1045 de la firme TECATOR
- Une balance de précision
- Du coton
- Des billes de verre
- Des pots en aluminium
- Une bague aimantée
- De l'hexane

Méthode

Le dosage des graisses est réalisé suivant la méthode de Soxhlet par extraction par un solvant organique (hexane).

Les graisses sont solubilisées par le solvant, l'hexane, qui les transfère progressivement dans un pot servant de réservoir. A la fin de l'extraction, le solvant est évaporé

pour ne laisser que la matière grasse. On détermine la quantité de graisses par pesée et on l'exprime en pourcentage de la matière fraîche.

I.4 - Dosage des sucres totaux

Le matériel, les produits, les techniques opératoires et la méthode de calcul sont présentés en annexe. Ici nous donnerons uniquement le principe du dosage.

Le dosage des sucres totaux s'effectue en deux étapes (sur une prise d'essai de 10 g environ) :

* Une étape d'hydrolyse à chaud en présence d'acide sulfurique, au cours de laquelle les polysaccharides (glycogène) sont transformés en sucres réducteurs (glucose).

* Une étape de dosage proprement dit au cours de laquelle l'oxyde de cuivre provenant de la réduction du $\text{Cu}(\text{OH})_2$ par les sucres précédemment hydrolysés est titré sous forme de sel de cuivre par une solution d'EDTA (acide éthylène diamino tétracétique) appelée complexon III.

La teneur en sucres totaux est exprimée en pourcentage par rapport à la matière fraîche.

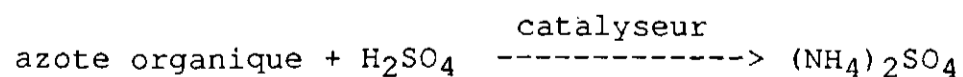
I.5 - Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué par l'intermédiaire de l'azote suivant la méthode de Kjeldahl. Cette méthode est admise comme méthode de référence dans le domaine alimentaire. Elle permet de doser différentes formes d'azote dont l'azote total et l'azote non protéique.

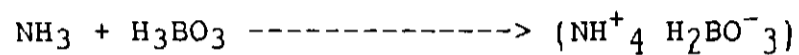
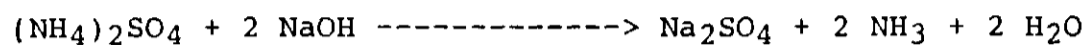
Tout comme précédemment nous exposerons la méthode de dosage. Les techniques et le matériel utilisés ainsi que les calculs sont présentés en annexe.

I.5.1 - Dosage de l'azote total

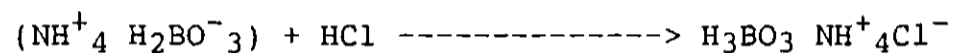
La prise d'essai (4 g environ) est minéralisée en présence d'acide sulfurique et de catalyseur pendant 90 à 120 minutes.



Le minéralisat est ensuite distillé en présence de soude. Le sulfate d'ammonium est alors transformé en ammoniac gazeux qui est entraîné par la vapeur d'eau et piégé dans de l'acide borique.



La solution d'acide borique est enfin tiré par de l'acide chlorhydrique.



I.5.2 - Dosage de l'azote non protéique (NPN)

L'azote non protéique est dosé de la même manière que l'azote total mais avec une élimination préalable des protéines par précipitation à l'acide trichloroacétique suivie d'une filtration. C'est sur le filtrat que s'effectue l'opération de minéralisation.

La différence entre l'azote total et l'azote non protéique constitue l'azote protéique. La quantité de protéine est obtenue en multipliant la quantité d'azote protéique par 6,25 (6,25 provient du fait que la protéine est supposée contenir 16 % d'azote P/P). Elle est exprimée en pourcentage par rapport à la matière fraîche.

I.5.3 - Dosage des acides aminés totaux

Il s'agit de déterminer la quantité de chaque acide aminé présent dans la chair consommable afin d'évaluer la valeur nutritionnelle des protéines de chaque mollusque. Nous insisterons particulièrement sur les aminoacides essentiels (dits aussi indispensables). Le dosage a été réalisé à l'aide d'un analyseur d'acides aminés de type "chromakon 400" de la firme KONTRON.

Principe : Il consiste à couper toutes les liaisons peptidiques par hydrolyse acide (HCl6N) pendant 24 heures à 110°C sous atmosphère d'azote. Les dérivés d'acides aminés sont ensuite séparés sur une colonne chromatographique phase inverse sous

pression (50 bars). A la sortie de la colonne, ils réagissent avec la ninhydrine pour donner une réaction colorée. Un photomètre mesure l'absorption lumineuse à une longueur d'onde de 570 nm.

La colonne est une échangeuse de cations, constituée de résine DC 6A (Durrum). La résine est un copolymère de polystyrène divinylbenzène avec des fonctions acides sulfoniques.

I.5.4 - Dosage des acides aminés libres

Le dosage s'effectue de la même manière que précédemment sauf qu'il faut déprotéiniser l'échantillon, l'hydrolyse acide n'est pas nécessaire.

Dans les deux cas les techniques d'analyse sont présentées en annexe.

I.6 - Résultats et discussions

Composition chimique globale

Les quantités de protéines que renferment les coquillages ont été déterminées sur la base de leur teneur en azote, dosée suivant la méthode de Kjeldahl, multipliée par 6,25. Au vu des résultats, nous pouvons dire que l'amande et le bulot peuvent jouer un rôle très intéressant d'aliments protéiques, d'apport d'éléments minéraux compte-tenu de la quantité de cendres et à un degré moindre, d'aliment énergétique avec leur teneur en sucres non négligeable. Dans l'ensemble, le bulot comporte moins d'eau et plus d'éléments nutritifs que l'amande, il y a par exemple une teneur en sucre de 6,30 % contre 3,70 % chez l'amande. Au cours des traitements technologiques, il faudra tenir compte de cette présence relativement importante de sucres car ils peuvent être à l'origine d'un brunissement des produits.

Lorsqu'on fait une comparaison avec d'autres coquillages de même type couramment consommés en France (Tableau 2), on retrouve des valeurs qui sont sensiblement les mêmes. Signalons toutefois que la teneur en protéines dans ces coquillages a été

|||

calculée sur la base de l'azote total : ce qui pourrait conduire à une surestimation de la quantité de protéines. En effet, chez les mollusques l'azote non protéique constitue environ 20 % de l'azote total (Borgstrom 1962).

La teneur en matière grasse est très faible et nous n'avons pas pu la déterminer avec une précision acceptable (cette faible teneur en graisses présenterait l'avantage d'éviter le rancissement du produit pendant la conservation).

Il est à noter aussi que la composition chimique peut varier en fonction de l'âge de l'animal, de la période de l'année et de l'état physiologique de l'animal (Daniel 1923).

Teneur en acides aminés

Parmi les 20 acides aminés de base qui constituent les protéines, certains sont fabriqués par l'homme. D'autres le sont peu ou pas du tout, ils sont dits essentiels ou indispensables, ce sont : isoleucine, leucine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, lysine, méthionine, valine. A ce groupe s'ajoute l'histidine qui est essentiel chez l'enfant en bas âge.

	eau	cendres	protéines (N _t -NPN)x6,25	sucres	graisses
Amande	80,81	2,8	10,22	3,70	moins de 1%
Bulot	74	2,20	14,5	6,30	moins de 1%

Tableau 1 : Composition chimique globale de l'amande et du bulot (les valeurs sont exprimées en % de chair comestible)

	eau	protéines (Ntx6,25)	Graisses	sucres	cendres
Huitres	83,00	9,00	1,20	4,80	2,00
Coquille St Jacques	80,00	15,60	0,10	/	1,40
moules	83,20	9,84	1,34	/	1,70
Escargot	79,00	16,00	1,00	/	1

Tableau 2 : Constituants majeurs de quelques mollusques (valeurs exprimées en % de la partie comestible fraîche)
(Adapté de SOUCI-FACHMANN et KRAUT, 1986 3e ed.)

AA	AA totaux		AA libres	
	Exprimés en mg/g de chair broyée		Exprimés en mg/g de chair broyée	
	Amande	Bulot	Amande	Bulot
Taurine	11,43	10,90	5,53	4,60
Asp (ASN)	12,36	14,64	0,527	0,536
Thr	5,22	9,13	0,143	0,397
Ser	4,88	5,55	0,290	1,08
Glu (+Gln)	13,86	25,10	1,14	1,83
Gly	4,70	9,87	0,422	0,332
Alo	6,64	10,42	0,861	1,97
Cys	Traces	Traces	Traces	Traces
Val	5,52	7,57	0,175	0,285
Met	3,04	4,91	0,160	0,376
Ile	5,50	6,31	0,156	0,157
Lou	8,92	12,39	0,245	0,281
Tyr	3,56	4,24	0,124	0,267
Pha	4,27	5,29	0,379	0,190
Lys	11,09	18,31	0,511	0,134
His	8,74	6,09	0,336	0,183
Arg	2,30	3,51	0,100	0,313
TOTAL	112,03	154,23	11,05	12,88
(N _t -NPN) x 6,25	102,2mg/g	145 mg/g		

Tableau 3 : Quantités d'acides aminés totaux (AA totaux) et libres (AA libres) dans les 2 mollusques

L'indice chimique est défini comme étant le rapport :

$$IC = \frac{\text{mg de l'acide aminé limitant primaire par g de protéine étudiée}}{\text{mg du même acide aminé par gramme de protéine de référence}} \times 100$$

La protéine de référence est celle choisie par la FAO-OMS en 1973. La composition en acides aminés est exprimée en mg/g de protéines (Tableau 4).

En général les indices chimiques des acides aminés soufrés (Méthionine + Cystéine), de la lysine, du tryptophane et de la thréonine sont les plus attendus car ce sont ces aminoacides qui sont le plus souvent limitants dans l'alimentation humaine. Chez l'amande comme chez le bulot, tous les indices chimiques sont supérieurs à 100 sauf ceux des acides aminés soufrés qui sont respectivement 85 et 94 (proches de 100). Ce qui confirme que l'amande et le bulot sont des denrées alimentaires de bonne qualité protéique bien que les acides aminés soufrés soient limitants. Les apports totaux en acides aminés essentiels par g de protéines sont pratiquement égaux chez les deux mollusques néanmoins avec un indice chimique global de 94,3 le bulot possède une valeur nutritive supérieure à celle de l'amande.

Bien que nos résultats d'analyses des acides aminés comportent de l'histidine, nous n'avons pas pu calculer son indice chimique faute d'une valeur correspondante dans la protéine de référence. Enfin, signalons la présence de taurine qui est un aminoacide non protéogène mais qui est très présente chez de nombreux organismes marins.

Les acides aminés libres représentent 9 % des acides aminés totaux chez l'amande et 8,35 % chez le bulot.

II - LES PROTEINES DU MUSCLE

II.1 - Généralités sur les protéines

Les protéines sont des macro-molécules complexes qui peuvent constituer plus de 50 % de l'extrait sec des cellules vivantes. Elles jouent un rôle fondamental dans la structure et le fonctionnement des cellules. Ce sont des biopolymères dont l'hydrolyse complète en milieu acide, alcalin ou enzymatique libère des acides α aminés de configuration L. Pour la plupart des protéines, les acides aminés constitutifs appartiennent à un groupe restreint de vingt acides aminés différents. Ceux-ci sont liés les uns aux autres par des liaisons amides substituées appelées liaisons peptidiques. Chaque protéine peut ainsi comporter plusieurs centaines de résidus d'acides aminés.

Les protéines peuvent être classées dans deux groupes principaux :

- * les holoprotéines qui ne contiennent que des acides aminés,

- * les hétéroprotéines qui sont constituées d'acides aminés et d'autres composés non protéiques qualifiés de groupes prosthétiques.

Chaque protéine est caractérisée par son organisation tridimensionnelle. Ainsi les protéines fibreuses telles que le collagène et l'élastine sont composées de chaînes polypeptidiques assemblées le long d'un axe commun linéaire, ce qui conduit à la formation de fibres. Les protéines globulaires comme le G. actine sont pour leur part formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques enroulées sur elles-mêmes pour former dans l'espace une structure tridimensionnelle sphérique ou globulaire. Certaines possèdent à la fois les propriétés fibreuses et globulaires, c'est le cas de la F. actine et de la fibrinogène.

II.2 - Rôles des protéines

Les protéines ont une grande diversité de fonctions. Elles jouent un rôle structural (kératine, collagène, élastine...) et sont présentes dans tous les tissus notamment dans le muscle. Certaines sont dotées d'une activité biologique et jouent un rôle très actif dans les processus biologiques. Les enzymes sont les plus importantes de ce groupe. Parmi les autres protéines biologiquement actives, on peut citer les hormones qui régulent les différentes réactions métaboliques, les protéines contractiles dont l'actine et la myosine, les protéines de transport...

Toutes ces protéines sont composées des mêmes acides aminés. C'est la proportion et l'enchaînement de ces acides aminés qui sont spécifiques de chaque protéine et qui lui confèrent ses différentes propriétés.

Le déficit protéique dans l'alimentation humaine est malheureusement très grand pour certaines couches de la population mondiale et cette situation peut devenir encore plus grave dans le futur avec la croissance de la population. Afin de satisfaire cette croissance régulière de la demande en protéines, on est amené à optimiser l'utilisation des sources protéiques déjà exploitées, à en rechercher de nouvelles et à développer des technologies adaptées pour leur utilisation.

II.3 - Les protéines du muscle

Du point de vue alimentaire, il apparaît que certaines propriétés organoleptiques, la tendreté, le comportement à la cuisson ou à la conservation, la perte de suc du muscle, sont étroitement liés à la structure protéique du muscle et aux réactions biochimiques dont il est le siège (Cheftel et al, 1985).

Les protéines musculaires peuvent être réparties en deux grands groupes selon leur localisation : les protéines extracellulaires et les protéines intracellulaires.

II.3.1 - Les protéines extracellulaires

Ce sont les protéines les moins solubles du muscle. On les trouve dans le tissu conjonctif dont les constituants principaux sont le collagène et l'élastine.

II.3.1.1 - Le collagène

Le collagène est la protéine principale du tissu conjonctif. C'est une protéine fibreuse non élastique qui protège le muscle contre de trop fortes extensions. (Il joue ainsi un rôle de structure et de soutien dans l'architecture musculaire).

La sous-unité du collagène est le tropocollagène de poids moléculaire d'environ 300 000 daltons. Le tropocollagène est formé de 3 monomères polypeptidiques de structure hélicoïdale. Le collagène est caractérisé par sa structure primaire dans laquelle la séquence Gly - x - y se répète tout au long de la molécule. (x est le plus souvent un résidu de proline ou d'hydroxyproline et y un résidu d'alanine ou d'hydroxyproline). Le collagène contient environ 33 % de glycine et est très riche en proline et hydroxyproline. Plus ces 2 derniers acides aminés sont abondants, plus il est rigide et résistant. Une autre cause du durcissement du collagène est le vieillissement. En effet, au cours du vieillissement, les ponts covalents relativement labiles liant les molécules de tropocollagène entre elles sont progressivement remplacés par d'autres ponts beaucoup plus stables, ce qui engendre une augmentation de la dureté de la viande (Cheftel et al, 1985).

Au cours du chauffage en milieu humide, les fibres de collagène se retractent de 1/3 de leur longueur originale. Le collagène devient alors caoutchouteux. Ce rétrécissement est dû à l'effondrement des molécules hélicoïdales de la fibre (Gosline et Shadwick, 1983). Un chauffage prolongé à une température supérieure à 80°C provoque la gélatinisation du collagène.

Le collagène est hydrolysé par les collagénases. D'autres enzymes comme la papaine, les élastases possèdent une activité collagénolytique résiduelle.

II.3.1.2 - L'élastine

C'est le deuxième constituant du tissu conjonctif. C'est une molécule de structure complexe comprenant deux fractions : l' α et la β élastine. Elle est riche en glycine et en alanine (environ 30 %). Elle comporte également de la proline (11 %).

Lors de la cuisson dans l'eau, l'élastine gonfle, s'étire légèrement mais ne se dissout pas. Il s'agit d'une protéine fibreuse particulièrement résistante à l'action des bases, des acides et des enzymes protéolytiques.

L'élastine est partiellement hydrolysée par la papaïne ou par l'élastase pancréatique.

Il existe d'autres protéines extracellulaires qui sont la connectine et la desmine. Ces 2 protéines sont solubles en milieu alcalin à pH extrême.

Chez l'amande et chez le bulot, les protéines conjonctives représentent respectivement 34,71 % et 38,5 % des protéines totales.

II.3.2 - Les protéines intracellulaires

Les protéines intracellulaires comprennent 2 grands groupes : les protéines sarcoplasmiques et les protéines myofibrillaires.

II.3.2.1 - Les protéines sarcoplasmiques

Il s'agit de protéines solubles à des pH voisins de la neutralité et à des forces ioniques inférieures à 0,1. Elles forment un ensemble hétérogène de plusieurs centaines de protéines dont les enzymes de la glycolyse et de nombreuses autres associées au métabolisme des glucides et des protéines. L'électrophorèse des protéines sarcoplasmiques est couramment utilisée pour identifier les espèces surtout chez les poissons. Les protéines sarcoplasmiques représentent environ 20 % des protéines totales chez les mollusques étudiés.

II.3.2.2 - Les protéines myofibrillaires

Ce sont des protéines solubles dans des solutions faiblement salines et à force ionique voisine de 0,5. Elles constituent environ 30 % des protéines totales chez les mollusques.

En technologie alimentaire, les protéines myofibrillaires sont responsables de la capacité de rétention d'eau, des propriétés émulsifiantes et de la tendreté des viandes (Cheftel et al, 1985).

Les protéines myofibrillaires sont constituées en général d'éléments contractiles (myosine et actine) et d'éléments régulateurs (troponines, troponyosines...).

La myosine. C'est une protéine fibrillaire constituée de 6 sous-unités : 2 sous-unités identiques de 230 000 daltons et 4 sous-unités légères de 20 000 daltons chacune. Elle est quantitativement la protéine la plus importante dans les muscles striés des animaux. Son hydrolyse ménagée par la trypsine permet de la scinder en 2 parties :

- la méromyosine lourde (PM = 350 000) qui possède une activité ATPasique et la propriété de fixer l'actine,
- la méromyosine légère.

La myosine est la protéine constitutive des filaments épais des myofibrilles. Chez la plupart des mollusques les filaments épais des muscles lisses sont formés par l'association de 2 protéines : la myosine et la paramyosine. La deuxième occupe la partie centrale du filament et est entourée par la première (Chantler, 1983).

L'actine. C'est une protéine globulaire ayant un poids moléculaire d'environ 42 000 daltons. Elle peut se polymériser pour former des filaments notamment les filaments fins. Ces filaments d'actine ont la propriété d'interagir spécifiquement avec le filament de myosine pour former le complexe actomyosine qui est la structure contractile du muscle.

Les filaments d'actine sont associés aux protéines régulatrices que sont la troponine et la tropomyosine.

II.3.3 - Dosage des différentes fractions protéiques du muscle

L'objet de ce dosage est de connaître de façon approximative les proportions relatives des différentes fractions protéiques. En effet, la fermeté de la chair est liée intimement à la teneur en collagène et en élastine qui sont tous deux des protéines conjonctives. La connaissance de la proportion de tissu conjonctif peut nous aider dans le choix des enzymes nécessaires à l'attendrissement souhaité.

Les dosages ont été effectués pour le bulot sur la partie comestible (animal entier sans la coquille et les viscères) et pour l'amande sur le pied (partie ferme qu'on cherche à attendrir).

II.3.3.1 - Principe

Le fractionnement des protéines musculaires a été réalisé en se basant sur la différence de solubilité en fonction de la force ionique du milieu. En effet, les protéines sarcoplasmiques sont solubles à faible force ionique ($\gamma = 0,05$), les protéines myofibrillaires dans une solution de KCl 0,6 M ($\gamma = 0,5$) tandis que les protéines du stroma (du tissu conjonctif) dont le collagène et l'élastine ne le sont pas.

Après l'extraction, la fraction protéique est dosée par l'intermédiaire de l'azote suivant la méthode de Kjeldahl.

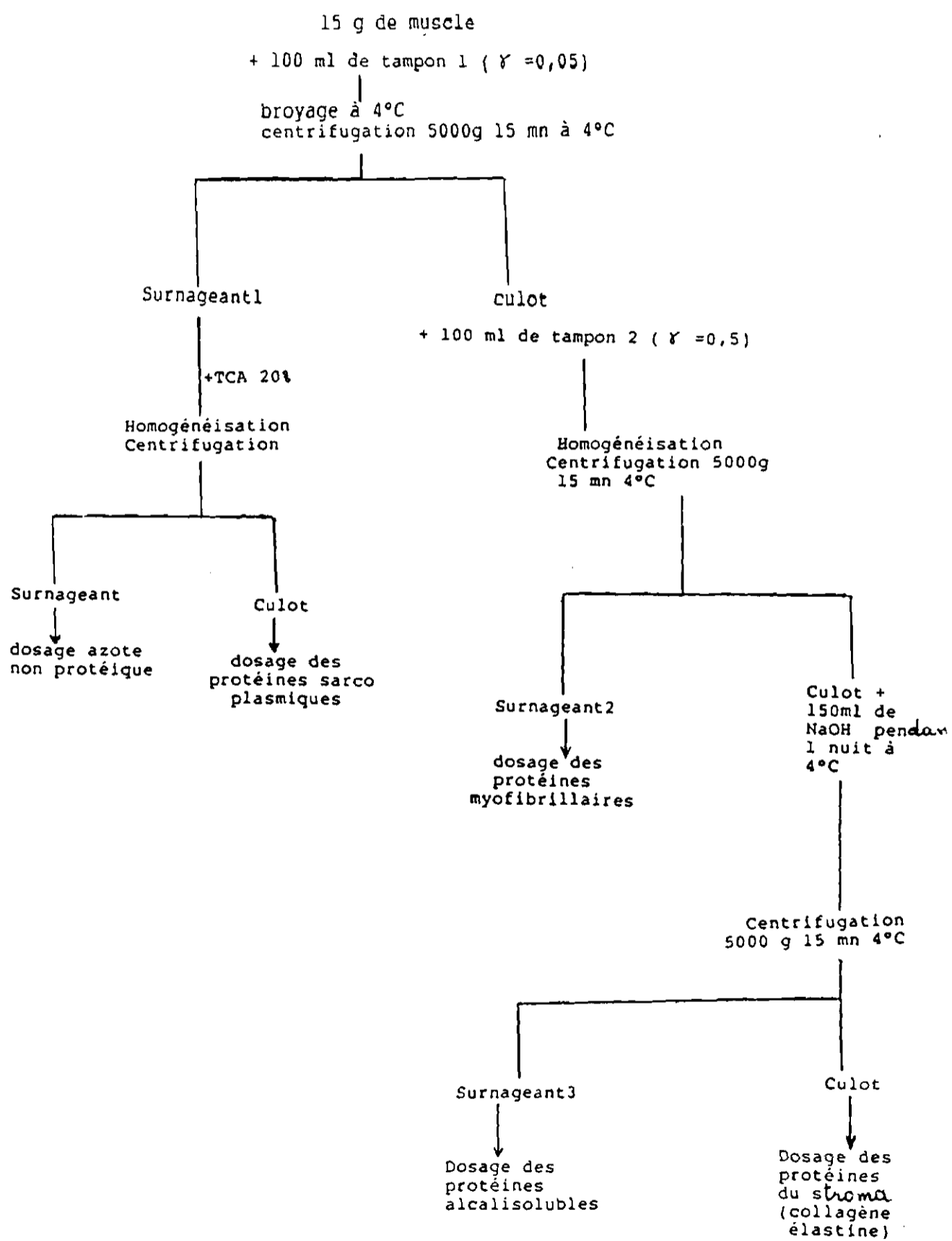
II.3.3.2 - Matériels et réactifs

- une centrifugeuse KONTRON
- un homogénéisateur ULTRA-TURAX
- un pH-mètre
- une balance SARTORIUS
- matériels de dosage de l'azote
- * solution de Na_2HPO_4 15,6 mM (1 litre)
- * solution de KH_2PO_4 3,5 mM (1 litre)
- * solution de KCl 0,6 M (500 ml)
- * solutions de dosage de l'azote
- * solution de NaOH 0,1 N (500 ml)

Protocole

L'extraction des différentes fractions protéiques est réalisée à partir du schéma suivant :

(méthode de Hashimoto, Watabe *et al*)



* Le tampon 1 est préparé en mélangeant la solution de Na_2HPO_4 et celle de KH_2PO_4 jusqu'à obtention d'une solution hybride de pH 7,5.

* Le tampon 2 est obtenu en ajoutant à la solution de KCl celle de Na_2HPO_4 et celle de KH_2PO_4 jusqu'à obtention d'une solution hybride de pH 7,2.

* Le dosage de l'azote est effectué comme indiqué au chapitre composition chimique avec du HCl 0,1N.

II.3.4 - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats du fractionnement montrent qu'on a des proportions relativement équilibrées en protéines sarcoplasmiques, myofibrillaires et conjonctives. Les alcali-solubles souvent constituées de desmine et de connectine sont peu représentées. Ces dernières sont insolubles en solution à pH voisin de la neutralité même à force ionique élevée.

Ce qui nous intéresse particulièrement, ce sont les protéines myofibrillaires et conjonctives qui sont responsables à des degrés divers, de la fermeté d'un muscle. Elles sont présentes toutes les deux en quantités assez voisines.

La méthode d'extraction peut conduire à une sous estimation des protéines myofibrillaires. En effet, selon Cheftel *et al*, 1985, une part non négligeable de ces protéines est extractible en milieu aqueux c'est-à-dire dans les mêmes conditions que les protéines sarcoplasmiques. Watanabe *et al*, 1979 rapportent que le complexe actomyosine dénaturé ne serait plus soluble dans les mêmes conditions que les protéines myofibrillaires et passerait dans la phase alcali-soluble, ce qui expliquerait aussi que les protéines alcali-solubles habituellement présentes dans les muscles en faible quantité occupent jusqu'à 10% des protéines totales. Néanmoins la quantité relativement importante de protéines conjonctives qui sont les constituants essentiels du tissu de soutien expliquerait en grande partie la fermeté du muscle des deux mollusques étudiés.

Il aurait été intéressant de parvenir à quantifier distinctement le collagène (on le dose en déterminant le taux d'hydroxyproline) et l'élastine qui sont les protéines majeures du tissu conjonctif et qui ont des comportements très différents en présence de la chaleur ou de composés chimiques. (Nous n'y sommes pas parvenus à cause d'un problème de fonctionnement du deuxième canal de l'autoanalyseur).

Dans le choix des enzymes protéolytiques à des fins d'attendrissement du muscle, il faudra tenir compte du fait que les protéines myofibrillaires et conjonctives sont présentes en quantités quasi-équivalentes et que l'essentiel de la fermeté incombe aux protéines conjonctives.

III - COMPORTEMENT DU MUSCLE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

L'objet de ce chapitre est d'observer l'évolution de la fermeté du muscle au cours d'un traitement thermique et de voir s'il existe une température de cuisson permettant d'obtenir une fermeté moins importante. Pour y parvenir, l'étude a été menée suivant deux axes :

* étude de l'évolution de la fermeté du muscle en fonction de la température de traitement,

* étude des différentes températures de dénaturation des protéines constitutives de la matière par analyse thermique différentielle.

III.1 - Etude de la fermeté de muscle en fonction de la température

Matériels

- des bulots et des amandes de taille très homogène
- un bain marie thermostaté
- un appareil de mesure de texture INSTRON

III.1.1 - Principe et méthode

Le texturomètre INSTRON permet de mesurer plusieurs types de forces caractéristiques de la texture : forces d'étirement, de compression, de cisaillement, de résistance à la pénétration... Pour nos essais nous avons choisi de mesurer la force de cisaillement car elle semble se rapprocher plus que les autres de la mastication. Les mesures ont été effectuées sur les pieds des mollusques car ce sont les organes les plus fermes.

L'appareil est muni d'une lame peu tranchante qui descend sur le pied à une vitesse régulière de 10 mm/mn. L'ordinateur qui lui est connecté enregistre toutes les 0,2 mn la force exercée par la lame sur le muscle jusqu'au cisaillement complet de celui-ci. La valeur de la force maximale appliquée dite valeur crête est celle retenue.

Des lots homogènes constitués de 20 individus chacun sont traités à différentes températures. Après refroidissement, la force de cisaillement est mesurée sur chaque individu du lot. On prend ensuite la moyenne du lot.

III.2 - Etude des différentes températures de dénaturation des protéines du muscle

III.2.1 - Matériels

- des bulots et des amandes vivants
- un ultra-turax
- un lyophilisateur CIRP CS25
- des microcapsules en inox
- une unité de calorimétrie différentielle PERKIN ELMER.

III.2.2 - Principe et méthode

Lorsque la température de dénaturation d'une protéine est atteinte, sa structure moléculaire s'effondre tout en absorbant de l'énergie. Cette absorption d'énergie peut être mesurée par un calorimètre différentiel et visualisée sur un thermogramme.

Expérience

Environ 100g de chair fraîche sont broyés à l'ultrax turax en présence d'une quantité équivalente d'eau distillée. On ajoute au broyat environ 20g de sorbitol. Le sorbitol joue un rôle de cryoprotecteur des protéines. Le mélange est transvasé dans un cristallisateur et placé au lyophilisateur. On congèle l'échantillon jusqu'à -30°C avant de lyophiliser pendant 3 jours. La température en fin de lyophilisation doit être de 18°C environ.

On enferme de petites quantités de lyophilisat (de l'ordre de quelques dizaines de milligrammes) après les avoir humectés d'eau, dans des microcapsules.

Les microcapsules sont ensuite placées dans le four du calorimètre. La température est alors augmentée progressivement

jusqu'à 120°C. Lorsque le point de dénaturation d'une protéine est atteinte, il est matérialisé sur le thermogramme par un pic d'absorption d'énergie. L'ensemble de l'unité calorimétrique est géré par ordinateur.

III.3 - Résultats et discussions

Les variations de la force de cisaillement en fonction de la température sont représentées sur la figure 2.

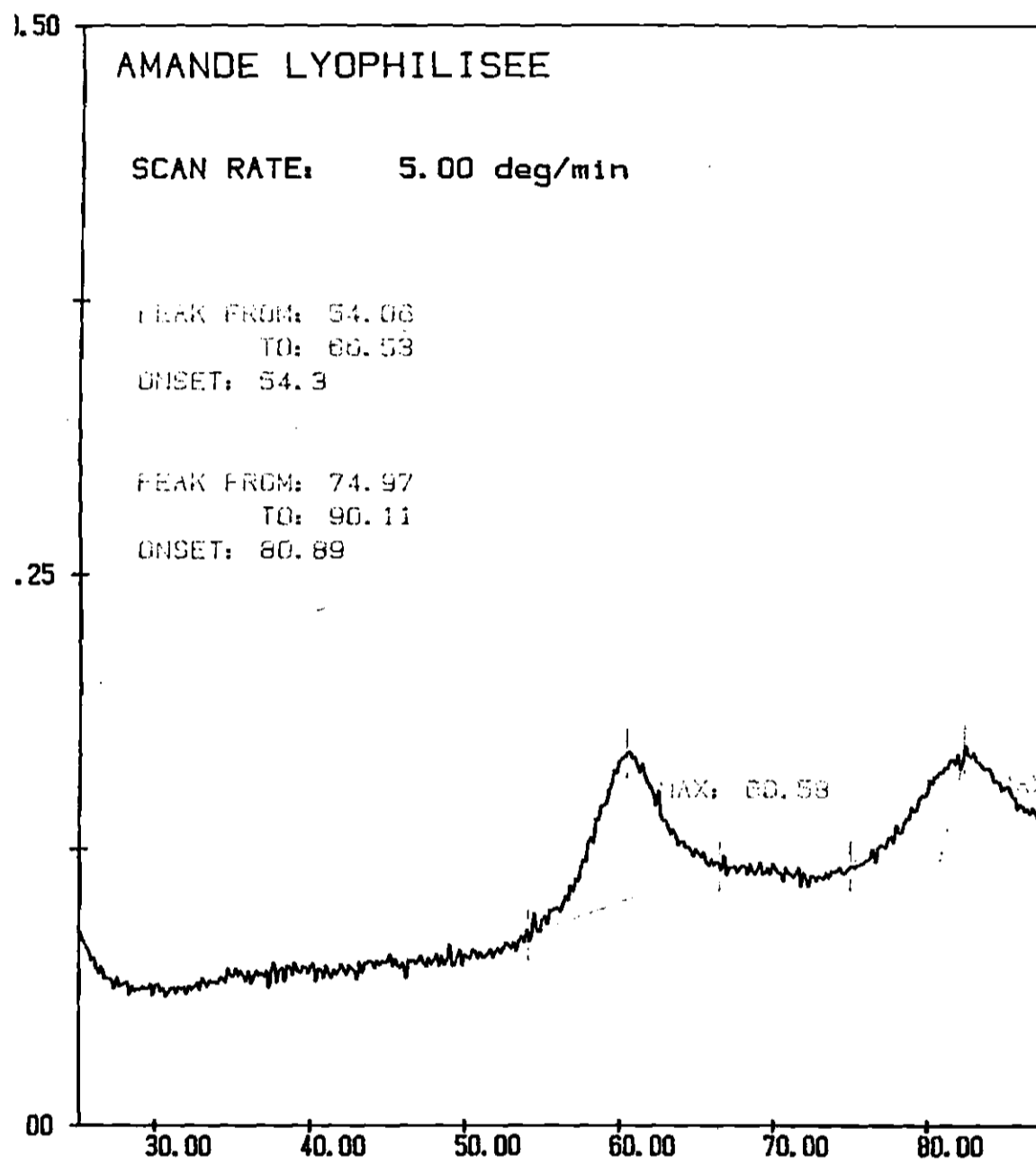
On distingue chez l'amande et chez le bulot trois zones de grandes variations des forces de cisaillement.

Selon Chang, 1976, la myosine des protéines myofibrillaires se coagule au delà de 53°C, devient insoluble et serait en partie responsable de l'augmentation de la fermeté. Cela correspondrait aux premières parties des 2 courbes respectivement de 50 à 70°C et 50 à 75°C chez l'amande et chez le bulot.

Au cours du traitement thermique, les muscles sont plus tendres à 50°C chez le bulot et à 80°C chez l'amande. Mais cette tendreté est insuffisante pour permettre une mastication facile du muscle. A partir de 50°C, la fermeté augmente progressivement jusqu'à atteindre son maximum à 70-75°C. De 75 à 80°C, il y a une diminution de la fermeté. Cette zone correspond à la phase de dénaturation, du collagène des mollusques. Un traitement thermique prolongé à des températures plus élevées conduit à sa solubilisation et à sa gélatinisation.

Lorsqu'on dépasse 80°C, alors que la fermeté continue de diminuer chez le bulot, on constate qu'elle augmente chez l'amande. Ce comportement quelque peu inhabituel observé chez l'amande pourrait s'expliquer par l'hypothèse d'une teneur en élastine relativement élevée dans le tissu conjonctif.

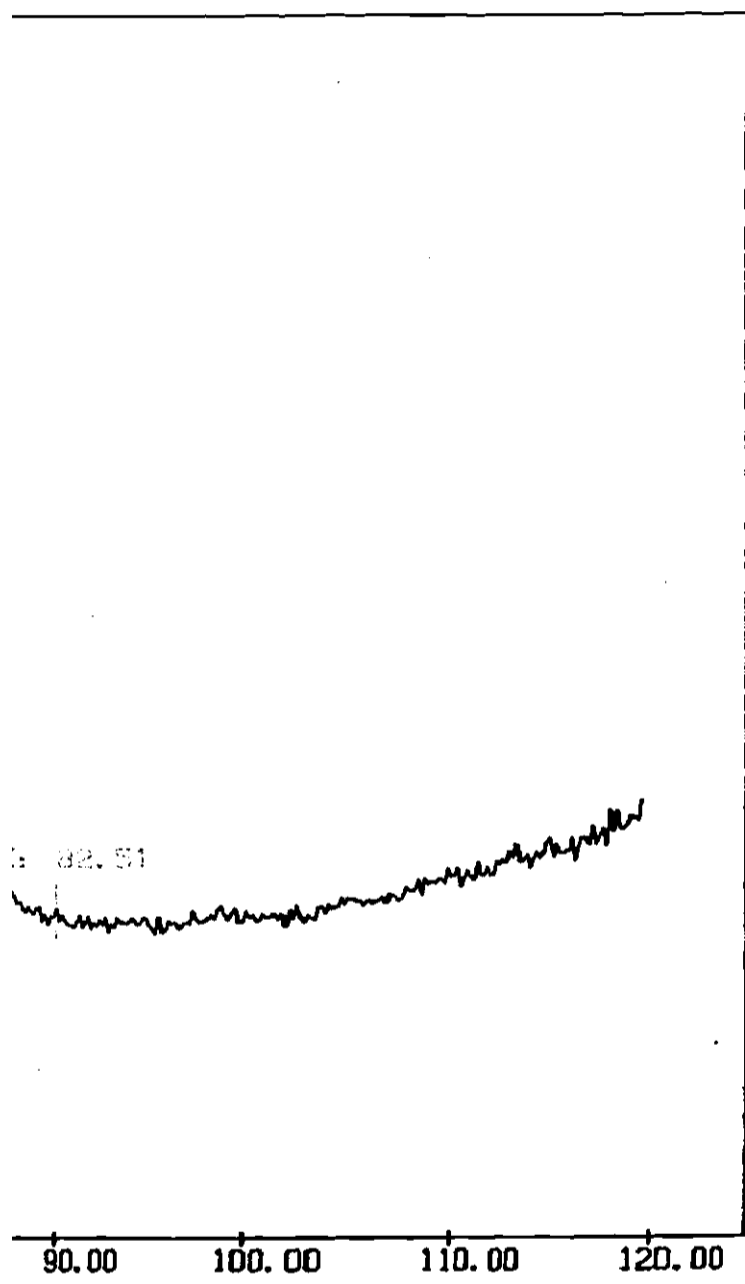
Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'au cours de la cuisson, l'élastine gonfle, s'étire légèrement sans toutefois se dissoudre Cheftel et al, 1985. Ce gonflement de l'élastine, présente en quantité importante, peut à nouveau entraîner un durcissement du muscle.



UADIO

Fig 3: Thermogramme des protéines
de l'amande

TEMPERATURE



(C)

DSC

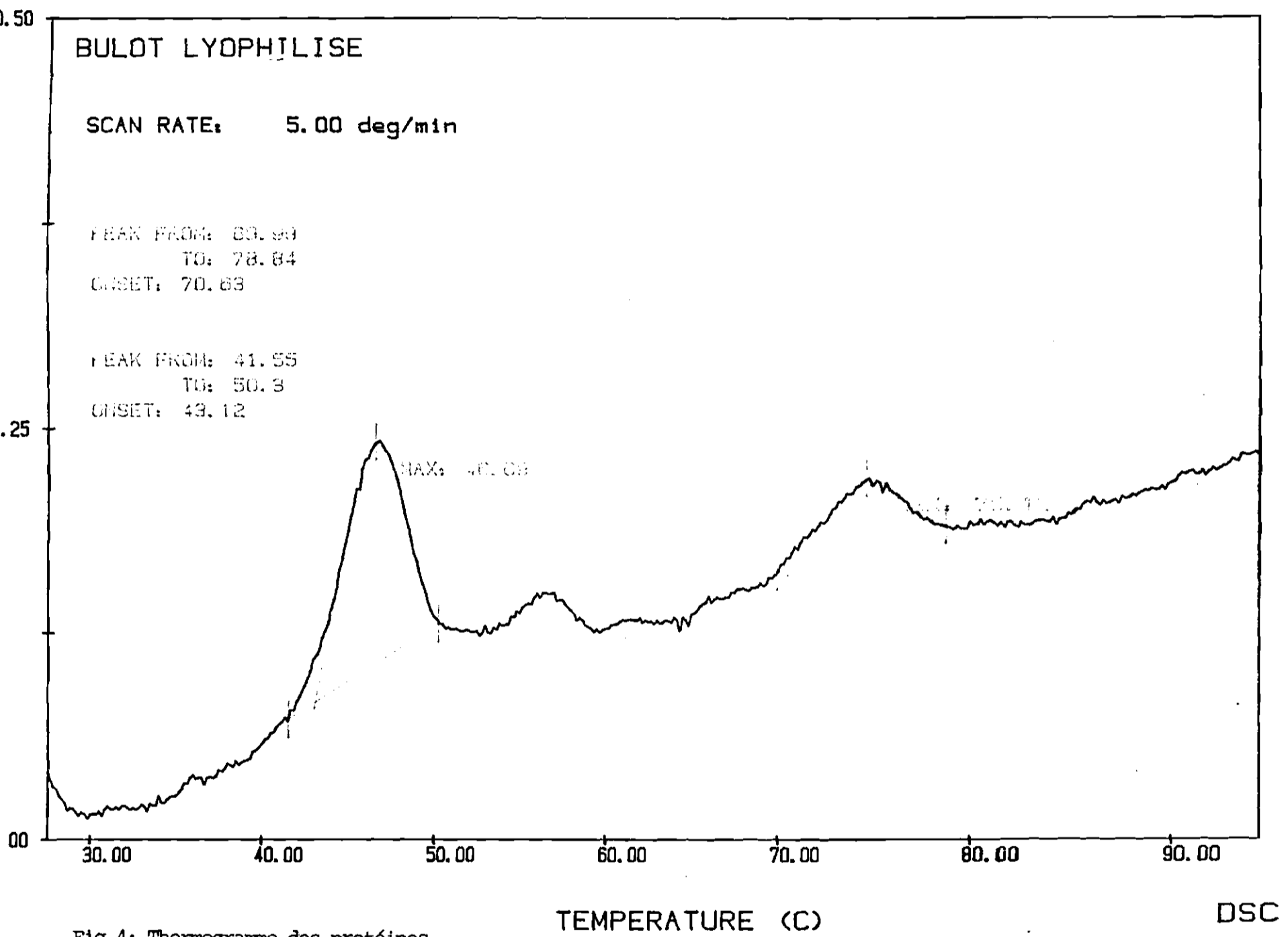


Fig 4: Thermogramme des protéines
du bulot

Parallèlement aux variations de texture, on observe une diminution de volume de l'ensemble du muscle. Cela peut s'expliquer par le fait que la dénaturation des protéines provoque à la fois le raccourcissement des fibres musculaires et l'exudation du liquide contenu dans le muscle.

Il est important de signaler que la force de cisaillement, tout comme la texture dépend de la taille et donc de l'âge du muscle. Nous avons réalisé nos mesures sur des animaux de taille moyenne. Plutôt que de regarder les forces appliquées, c'est l'allure des courbes qu'il faut considérer.

Il est à noter que les analyses thermiques différentielles confirment l'évolution des forces de cisaillement car les zones de fortes variations correspondent à quelques degrés près, aux températures de dénaturations des protéines, matérialisées sur le thermogramme par les différents pics. Notons aussi le fait que nous avons, par exemple deux pics sur le thermogramme de l'amande. Cela ne signifie pas que c'est seulement à ces deux niveaux que toutes les protéines se dénaturent. En effet, comme nous travaillons sur des microquantités (quelques dizaines de milligrammes), et que les protéines ont une faible énergie de dénaturation, celles qui sont présentes en petites quantités absorbent de l'énergie de dégradation non décelable par le calorimètre; le thermogramme ne présente, par conséquent, pas de pics aux températures correspondantes. Des protéines peuvent aussi avoir des points de dénaturation proches. Ceux-ci sont alors matérialisés par le même pic.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que le traitement thermique induit des modifications au niveau des protéines musculaires. Certaines se traduisent par une diminution de la fermeté, c'est le cas chez le bulot traité à 50°C. D'autres au contraire provoquent son augmentation, c'est le cas du traitement entre 50 et 70°C.

IV - ENZYMES ET ATTENDRISSMENT DU MUSCLE

IV.1 - Généralités

Les enzymes sont des molécules biologiques de nature protéique. En tant que telle, elles obéissent aux règles générales des protéines tant au niveau de leur constitution qu'au niveau de leur conformation. Leur particularité réside dans le fait qu'elles jouent un rôle de catalyseurs biologiques des différentes réactions biochimiques dont l'organisme est le siège. Elles agissent à des doses très faibles.

Les enzymes sont divisées en plusieurs classes selon le type de réactions qu'elles catalysent. On distingue entre autres les hydrolases dont la spécificité consiste à catalyser les réactions d'hydrolyse. Les protéases, enzymes d'hydrolyse des protéines font partie de cette classe. Elles peuvent être d'origine animale, fongique, microbienne ou végétale. Parmi ces dernières, on peut citer la papaïne qui est extraite du latex de la papaye (Carica papaya).

IV.2 - Caractéristiques de la papaïne

La papaïne est une enzyme monocaténaire constituée de 212 résidus d'acides aminés. Trois ponts dissulfures entre les résidus de cystéine en positions 22-63, 56-95 et 153-200 lui confèrent sa structure tertiaire. Le site actif est constitué par le groupement thiol (SH) libre de l'acide aminé en position 25.

Son poids moléculaire est de 23 000 daltons et son pH isoélectrique est de 8,75. Elle est activée par les composés thiols et inactivée par les agents oxydants. Elle est active en milieu réducteur. Les métaux lourds tels Zn^{+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} l'inhibent. Le maximum d'activité se situe à des pH compris entre 5 et 8 selon les substrats et à une température de 65°C. L'enzyme est totalement inhibée au-delà de 80°C. A côté de sa très large activité protéolytique, la papaïne peut hydrolyser certains esters.

IV.3 - Choix de la papaïne comme agent d'attendrissement

Nous avons vu au chapitre II que le choix de l'enzyme d'attendrissement devrait se faire en tenant compte des proportions relatives des protéines myofibrillaire et conjonctive et de leur degré d'implication dans la fermeté du muscle. Dans notre étude, nous avons ajouté un troisième critère, celui d'une enzyme disponible facilement sur le marché à un prix abordable et d'utilisation simple permettant un usage industriel à grande échelle.

Pour réaliser nos expériences nous avons choisi une préparation dénommée protéase V100 commercialisée par la société "GIST-BROCADES". La protéase V100 se présente sous forme de poudre. C'est un mélange d'enzymes comprenant en majorité de la papaïne à laquelle s'ajoutent la chymopapaïne et une lysozyme. Cette dernière ne semble pas avoir d'activité sur les protéines concernées par notre étude. La papaïne et la chymopapaïne présentent l'avantage d'être actives dans les mêmes conditions de milieu, de température et de pH. La chymopapaïne possède aussi un groupement sulfhydryl au niveau de son site actif.

IV.4 - Utilisations de la papaïne dans l'alimentation

L'usage de la papaïne dans la brasserie est très connue. Elle permet la clarification des mouts lors de la fabrication de la bière. Aux Etats-Unis et en Angleterre une préparation appelée "Tona 14" à base de papaïne est utilisée dans l'industrie pour l'attendrissement de la viande.

L'attendrissement de la chair de volaille par la papaïne a été expérimenté et réussi. L'usage industriel de la papaïne n'est jusqu'à ce jour pas autorisé en France dans les produits carnés. Présentée sous forme de sel attendrisseur, l'enzyme est réservée à l'usage domestique.

IV.5 - Attendrissement de la chair des mollusques par la protéase V100

IV.5.1 - Principe

D'une façon générale, l'attendrissement de la chair des animaux par des enzymes protéolytiques consiste à hydrolyser sous leur action, les protéines qui seraient directement ou indirectement impliquées dans la fermeté des muscles.

IV.5.2 - Expériences

* Préparation de la solution tampon

Les enzymes qui composent la protéase V100 possèdent une certaine acidité. D'autre part, les produits de l'hydrolyse sont susceptibles de faire varier le pH du milieu et entraver ainsi le bon déroulement de l'action des enzymes. Pour éviter de trop grandes variations du pH, nous avons préparé une solution tampon qui constituera le milieu réactionnel.

Ce tampon est obtenu comme suit :

- dissoudre 17,8g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans un litre d'eau distillée,

- dissoudre 13,6g de KH_2PO_4 dans un litre d'eau distillée;
 Na_2HPO_4 agit en tant que base tandis que KH_2PO_4 joue le rôle d'acide.

Les deux solutions sont mélangées jusqu'à obtention du tampon à pH 6,5. Le tampon phosphate ainsi préparé est à une concentration de 0,1 M.

* Préparation de la solution enzymatique

Dans une fiole jaugée de 1 litre, placer 80g de NaCl, 20g de sucrose, 10g de glutamate de sodium et une pincée de cystéine. Les dissoudre dans environ 600 millilitres de tampon précédemment préparé.

La solution de sels est ainsi prête à recevoir l'enzyme. Il est à noter qu'une autre formule de sels a été expérimentée et a abouti au même résultat.

Il s'agit de préparer à partir du tampon une solution à 4% de NaCl et 1% de sucrose plus une pincée de cystéine.

Peser au mg près, xg de protéase V100 et transvaser quantitativement dans la fiole. Compléter le mélange par du tampon jusqu'au trait de jauge. Agiter jusqu'à dissolution totale. On obtient ainsi une solution enzymatique à x%. On peut préparer en faisant varier x, des solutions à différentes concentrations en protéase V100.

IV.5.3 - Procédé du traitement de la chair

Les mollusques décoquillés et éviscérés (pour le bulot) sont trempés dans la solution contenant l'enzyme. Une première série d'expériences a été effectuée à des concentrations de 1 et 2% en protéase V100. Pour chaque concentration on réalise une hydrolyse à froid (25°C) et une à chaud en maintenant la saumure à 60°C à l'aide d'un bain-marie thermostaté. Dans chaque cas, des échantillons sont prélevés à différents temps, 30-45-60-90 minutes de séjour dans la solution enzymatique et la texture analysée.

L'hydrolyse est arrêtée par inhibition de l'enzyme par passage dans un bain d'eau chaude à plus de 90°C pendant 45 secondes environ.

Un échantillon n'ayant pas subi d'hydrolyse mais traité dans les mêmes conditions thermiques sert de témoin.

IV.6 - Résultats et discussions

Les sels et le sucre ajoutés pendant la préparation de la solution permettent d'avoir à la fois une pression osmotique et une force ionique suffisante pour favoriser la diffusion des molécules enzymatiques à l'intérieur du muscle.

La deuxième formule de sel expérimentée permet d'avoir un produit final ayant un goût moins prononcé.

Au bout des différents temps de traitements, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6. Dans ce tableau nous ne présenterons que les résultats de l'expérience sur le bulot, ceux de l'amande seront mentionnés dans la discussion.

		Hydrolyse à froid (25°C)		Hydrolyse à chaud (60°C)	
Protéase		1 ‰	2 ‰	1 ‰	2 ‰
Temps					
30 minutes		Pas de différence de texture par rapport au témoin.	Attendrissement insuffisant	Attendrissement sensible mais insuffisant	Net attendrissement destruction du manteau par la chaleur
45 minutes		Texture encore ferme	Attendrissement sensible; destruction du manteau par la chaleur	Attendrissement satisfaisant; collant au toucher	Hydrolyse trop avancée; émiettement de la chair
60 minutes		Léger attendrissement destruction du manteau	Attendrissement très sensible destruction du manteau	Hydrolyse très prononcée provoquant un début d'émiettement de la chair	Emiettement de la chair
90 minutes		Attendrissement très sensible destruction du manteau	Attendrissement net; bonne texture en bouche; un peu collant au toucher	Emiettement de la chair	Emiettement de la chair Aspect de bouillie

Tableau 6 : Résultats de l'hydrolyse enzymatique du bulot à chaud et à froid.

Les deux méthodes d'hydrolyse conduisent à un attendrissement sensible du produit. L'hydrolyse à chaud se fait plus rapidement, ce qui permet d'avoir un gain de temps. Mais au niveau qualité du produit, elle conduit à un muscle très rétracté ayant une couleur sombre. L'hydrolyse à chaud nécessite un bain marie et une consommation d'énergie. Quant à l'hydrolyse à froid, elle est lente et de ce fait, permet une certaine souplesse au niveau du temps de contact avec l'enzyme.

Elle évite le brunissement du produit et conduit à un muscle moins rétracté de meilleure qualité visuelle. Elle peut être intégrée dans une chaîne de production sans que cela nécessite de modifications importantes.

L'hydrolyse à froid avec une concentration en protéase V100 de 2 % semble donner des résultats plus intéressants qu'avec une concentration de 1 % .

C'est pourquoi, nous l'utiliserons pour la préparation des échantillons à déguster dans le test qui va suivre.

V - ANALYSE SENSORIELLE

Au cours d'une étude sur des denrées destinées à l'alimentation humaine, il est important de faire une analyse sensorielle. En effet, si les appareils de mesures des différentes caractéristiques du produit nous donne une appréciation assez objective de la qualité, nous ne pouvons pour autant pas, à partir de ces mesures juger de l'acceptabilité du produit par le consommateur.

Dans le cas de notre étude, l'hydrolyse des protéines peut conduire à la formation de petits peptides amers qu'on ne peut apprécier par mesure physique. Il apparait donc nécessaire de procéder à une dégustation pour tenter de mieux cerner les caractéristiques organoleptiques et l'acceptabilité du produit par les éventuels consommateurs.

V.1 - Test de dégustation

Le but de ce test est de déterminer le temps optimal d'hydrolyse par une solution de protéase V100 à 2 % pour le bulot et 4 % pour l'amande, afin de voir si le traitement entraîne l'apparition d'une certaine amertume qu'on ne peut apprécier par mesure physique.

Nous avons réuni un jury composé de 29 personnes pour cette dégustation. Trois échantillons de bulot et d'amande leur ont été proposés. Nous désignerons ces échantillons par B30, B45, B60 et A45, A60, A90.

La lettre B désigne le bulot et les chiffres qui lui sont associés indiquent le temps de contact du muscle avec l'enzyme. De la même manière A désigne l'amande.

La fiche technique de la dégustation a été libellée comme suit :

NOM du dégustateur : Date : 19-9-89

Produit dégusté :

-

1. Veuillez apprécier, en bouche, la texture de ces trois échantillons et les classer en utilisant l'échelle suivante. Indiquez les numéros des échantillons en face de la (ou des) classe(s) choisie(s)

Notes	Qualités	Echantillons
1	Très dur	
2	Dur	
3	Plutôt dur	
4	Ni dur, ni tendre	
5	Plutôt tendre	
6	Tendre	
7	Très tendre	

2. Observez-vous des différences au niveau :

- * de l'aspect, si oui lesquelles ?
- * de la saveur, si oui lesquelles ?

3. Avez-vous une préférence pour un des échantillons ?

Si oui lequel et pourquoi ?

Remarque : * Il est à noter que les notes ne figuraient pas sur la feuille de dégustation pendant le test. Elles ont été mises après pour permettre une exploitation statistique des données.

* Les désignations des échantillons étaient totalement différentes de celles mentionnées plus haut et n'avaient aucune indication sur les conditions de traitement des échantillons. Ceci pour éviter toute influence sur le dégustateur.

V.2 - Résultats et discussions

Les différentes notes attribuées à chaque échantillon ont été sommées et les moyennes calculées. La comparaison de ces moyennes par l'analyse de leur variance a permis de déterminer qu'au niveau de la texture il n'y a aucune différence entre les 3 échantillons d'amande et il n'y a pas d'attendrissement satisfaisant. En revanche, chez le bulot, la tendreté des 3 échantillons est très nette. B45 et B60 sont classés au même niveau. Ils sont plus tendres que B15.

Aspect et saveur : Aucune tendance ne s'est dégagée nettement. Seules 4 personnes ont noté que B60 a un aspect pâteux.

Quant à la préférence :

3	personnes	ont	marqué	leur	préférence	pour	B60
13	"	"	"	"	"	"	B30 et B45
8	"	"	"	"	"	"	B45
5	"	"	"	"	"	"	n'ont eu aucune préférence.

Aucune personne n'a constaté une amertume.

Au vu des résultats, l'échantillon B45 recueille le plus de préférence. Rappelons que B45 est obtenu par hydrolyse enzymatique à froid pendant 45 minutes par une solution à 2 %.. Ces conditions de traitement pourraient être intéressantes pour la préparation éventuelle de produits pasteurisés.

Il est à noter que les essais avec l'amande ont lieu avec des animaux de grande taille ayant atteint la maturité sexuelle. Ils ont des viscères très développées qui polluent systématiquement la préparation enzymatique. Cela peut expliquer l'absence d'attendrissement sensible. En effet, d'autres essais pratiqués dans les mêmes conditions avec des animaux plus jeunes, ayant de faible quantité de viscères ont abouti à un net attendrissement du muscle du pied.

VI - ESSAI DE FABRICATION DE CONSERVES

Parmi les procédés de conservation des aliments, l'appertisation est l'un des plus employés. L'appertisation consiste à conditionner les aliments dans un récipient hermétiquement clos et à les soumettre à un chauffage assurant la destruction ou l'inactivation des microorganismes et des enzymes. Elle a été inventée vers 1800 par Nicolas Appert.

VI.1 - Définitions

Le décret du 10 Février 1955 donne des conserves appertisées la définition suivante : "sont considérées comme conserves, les denrées alimentaires d'origine végétale ou animale périssables dont la conservation est assurée par l'emploi combiné des deux techniques suivantes :

1. Conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux gaz et aux micro-organismes ;

2. Traitement par la chaleur. Ce traitement doit avoir pour but de détruire ou d'inhiber totalement d'une part les enzymes et d'autre part les microorganismes et leurs toxines dont la présence ou la prolifération pourraient altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à l'alimentation humaine". (Cheftel signale que le mot "effet" convient mieux à la place du mot "but" dans cette définition).

Au cours d'un traitement thermique, la cinétique de destruction des microorganismes suit une loi exponentielle qui est fonction du temps pour une température donnée.

$$N = N_0 e^{-kt}$$

N_0 = nombre de microorganismes présents au départ

N = nombre de microorganismes présents après un temps t de chauffage à la température donnée.

k = constante relative au microorganisme

Il découle de cette équation deux éléments à savoir :

* le temps de traitement est fonction du nombre de microorganismes présent au départ, d'où l'importance de l'hygiène lors de la préparation des produits avant l'appertisation.

* le traitement thermique implique deux paramètres qui sont le temps et la température.

Le couple temps-température définit le barème de stérilisation.

Dans la pratique, la détermination de ce barème se fait en tenant compte de plusieurs facteurs dont le pH du produit, sa présentation (liquide, pâteuse, granuleuse...) et le type d'emballage.

Une denrée alimentaire peut-être contaminée par plusieurs types de microbes si bien que le facteur k dans l'équation précédente peut prendre une multitude de valeurs pour un aliment donné. Pour simplifier le calcul des barèmes de stérilisation on a choisi un microorganisme de référence en l'occurrence Clostridium botulinum qui est par l'intermédiaire de la toxine qu'il secrète, le germe pathogène le plus résistant à la chaleur.

Il est important de signaler que notre objectif ici n'est pas de fixer des barèmes de stérilisation pour le bulot et l'amande. C'est plutôt de voir l'influence de l'appertisation sur le produit traité enzymatiquement et aussi d'étudier la possibilité de fabrication de conserves à partir de ces coquillages.

VI.2 - Fabrication de conserves

La première série d'essais de fabrication de conserves que nous avons réalisés peuvent se schématiser comme suit :

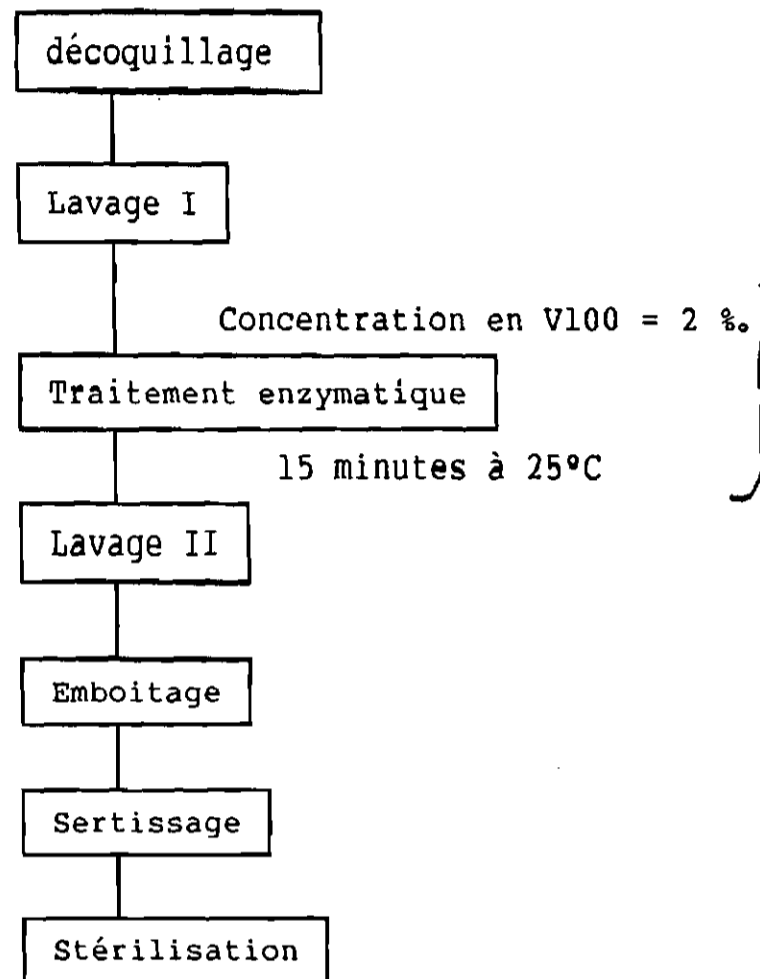


Fig 5 : Premier procédé de fabrication de conserves de bulot et d'amande

Le décoquillage du bulot s'est fait manuellement en brisant la coquille et en séparant la chair des viscères. Chez l'amande les deux valves sont ouvertes par choc thermique en les trempant pendant environ 2 minutes dans de l'eau bouillante. Il est par la suite très facile d'extraire l'animal de sa coquille. Signalons qu'il existe des machines pour le décoquillage des gastéropodes. Les séparations chair-coquille se font sur des tamis vibrants.

Le lavage II a pour but d'éliminer une partie du sel, du sucre et de l'enzyme. Ce qui permet de réduire le goût salé ou sucré et l'odeur caractéristique de la papaye que prend le produit.

Avant le sertissage, la chair est recouverte par une solution de NaCl à 3 %.

Le sertissage consiste à fermer hermétiquement la boîte contenant la chair. Il est réalisé à l'aide d'une sertisseuse manuelle.

La stérilisation a été effectuée avec un simulateur de stérilisation HYDROLOCK. L'action de l'enzyme attendrissante est arrêtée au cours de cette opération.

VI.3 - Résultats et discussions

La stérilisation a été effectuée à 120°C pendant 20 minutes. Le produit obtenu présente les caractéristiques suivantes (pour le bulot) :

- muscles rétractés
- chair tendre
- coloration sombre par rapport au produit de départ
- présence de gelées blanches

La rétraction du muscle a été vue au chapitre III.

La tendreté de la chair résulte de l'action de l'enzyme complétée par celle de la chaleur.

La coloration brune ou sombre est due au brunissement non enzymatique (BNE). Le BNE désigne un ensemble de réactions aboutissant dans les aliments à la formation de pigments bruns ou noirs et souvent aussi à des modifications de l'odeur et de la saveur. On l'appelle aussi réaction de Maillard ou de caramélisation. Il résulte de la condensation entre la fonction carbonyle de certains composés dont les sucres réducteurs et les groupements aminés libres. Il est accéléré par la chaleur. La quantité relativement importante de NPN (25 %) peut suggérer la présence d'acides aminés et de petits peptides libres. Ces éléments à NH₂ libre se combinent aux sucres, présents eux aussi en quantité non négligeable dans les coquillages, pour conduire à la formation de ces pigments bruns. Signalons qu'en plus des NPN dosés, l'action de l'enzyme provoque la libération d'autres groupement NH₂ provenant de l'hydrolyse des protéines, lesquels groupements peuvent intervenir dans le processus du BNE. Néanmoins, cette coloration n'est pas accentuée au point de constituer un frein à la consommation.

D'ailleurs, les personnes à qui nous avons présenté le produit final ont bien apprécié la conserve de bulot.

Un autre inconvénient du BNE est l'abaissement de la disponibilité nutritionnelle de la lysine ainsi qu'une baisse de la solubilité et de la digestibilité des protéines par création de liaisons avec certains composés carbonylés. On observe également des pertes de valeur nutritionnelle lorsque l'acide ascorbique ou la vitamine K participent à ces réactions.

On a observé aussi la présence de gelées blanchâtres provenant de la décomposition du manteau du bulot. Quant à l'amande nous n'avons pas pu trouver de solution au problème posé par les viscères.

Nous avons procédé à une deuxième expérience avec pour objectif d'éliminer les gelées blanchâtres. Pour ce faire, nous avons ajouté au premier procédé une autre opération qui consiste à stopper l'action de l'enzyme par un traitement thermique avant la mise en boîte. De cette façon, le manteau est décomposé et la gelée qui en résulte est éliminée par le lavage II. Finalement, le procédé qu'on pourrait retenir se schématise de la façon suivante :

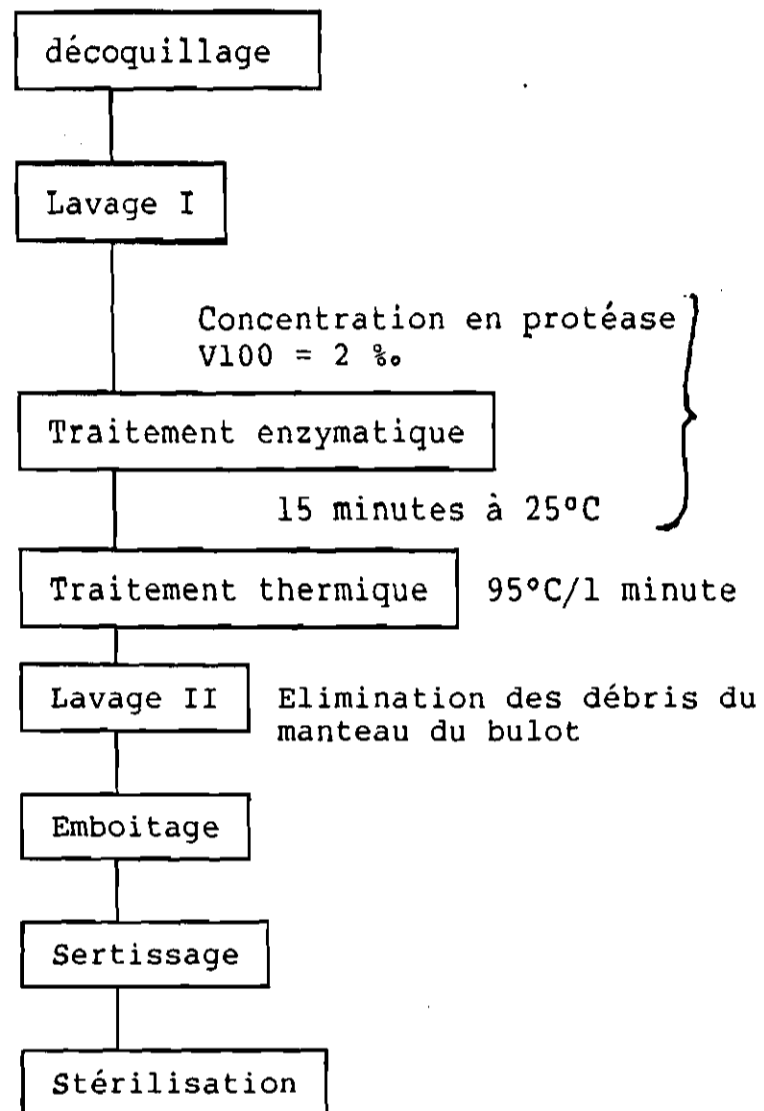


Fig 6 : Procédé de fabrication de conserves de bulot

Pour la production de conserves d'amande à partir d'animaux comportant relativement peu de viscères, c'est le procédé indiqué à la figure 5 qu'il faut utiliser. Suivant ce procédé le manteau et la masse viscérale sont maintenus en place après appertisation et le muscle est très attendri.

VII - CONCLUSION

Cette étude bien que très modeste peut contribuer dans une certaine mesure à l'utilisation plus importante de nouvelles sources protéiques jusque là connues mais sous exploitées. De part leur teneur assez importante en acides aminés essentiels et leur faible teneur en matières grasses, l'amande et le bulot viennent compléter la liste des produits alimentaires d'origine marine dans une civilisation où les graisses animales sont de plus en plus considérées comme néfastes dans l'alimentation des Hommes.

Notre étude nous a permis de montrer qu'en dehors des muscles d'animaux à sang chaud, il est possible de réaliser des modifications de texture sur ceux des mollusques marins. L'hydrolyse des protéines constitutives par des enzymes appropriées permet d'arriver à cette fin.

Nous avons constaté une décomposition très rapide du muscle après la mort du bulot. Ce qui suggère l'existence d'activités enzymatiques intenses. On pourra dans une étude prochaine chercher à activer ces enzymes pour provoquer in vivo l'attendrissement du muscle par protéolyse ou alors les isoler et ensuite les appliquer.

Les qualités organoleptiques entre autre la texture ont été appréciées par un jury de dégustation. Les préférences se sont portées essentiellement sur le bulot traité pendant 45 minutes à 25°C par une saumure contenant 2 % de protéase V100. Les membres du jury n'ont constaté aucune amertume. Chez l'amande, l'importance de viscères chez les individus en période de maturation sexuelle constitue un inconvénient majeur auquel nous n'avons pas pu apporter de solution. Il est donc souhaitable qu'une production industrielle éventuelle tienne compte de la taille et du cycle sexuel des individus à transformer.

Les résultats obtenus dans les essais de fabrication de conserves sont satisfaisants avec le bulot et l'amande en dehors de la période de maturation sexuelle.

Le procédé d'attendrissement étant assez simple, on peut envisager son intégration dans un système industriel déjà existant en vue de diversifier la production. Dans l'état actuel du stock, une extension de la pêche au bulot ne semble pas envisageable et l'amande n'est pas encore prisée chez les consommateurs, par conséquent il n'est pas souhaitable d'installer une unité industrielle se basant uniquement sur la fabrication de conserves de bulot et d'amande et qui soit rentable.

La réglementation française jusqu'à ce jour n'autorise pas l'utilisation de la protéase V100, en particulier de la papaïne, dans le traitement des produits carnés. Il est donc souhaitable, même si les études sur ces coquillages doivent se poursuivre, d'élaborer à partir de nos résultats, un dossier de demande d'autorisation en vue de l'application de cette enzyme dans les procédés technologiques industriels. Cela pourrait bien être un moyen d'accroître la consommation de ces deux mollusques.

BIBLIOGRAPHIE

BENDALL J.R., 1967. The plastin content of various muscle of beef animal. J. Sci. Food. Agri. 18 553

BIRCH G.G., BLAKE BROUGH N., PARKER K.J., 1981. Enzymes and food processing.

BOREL J.P., RANDOUX A. et al, 1987. Biochimie dynamique.

CARANTINO S., 1989. Peu d'enzymes mais beaucoup d'idées. Agro industries N°46.

CARSLAW H.S. and JAEGER J.C., 1958. Conduction of heat in solids.

CASSENS R.G., 1977. Muscle biochemistry : the importance of myofiber type. Food Technol. 31 (4), 76-81.

CHEFTEL H. et THOMAS G., 1963. Principes et méthodes pour l'établissement des barèmes de stérilisation des conserves alimentaires.

CHEFTEL J.C. et CHEFTEL H., 1977. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments Vol. 1 et 2

CHEFTEL J.C., CUQ J.L., LORIENT D., 1985. Protéines alimentaires.

CLEARY E.G. and CLIFF W.J., 1978. The substructure of elastine. Exp. Mol. Pathol. 28, 227-246

COVER S., RITCHEY J.J., HOSTETLER, 1962. Tenderness of beef. The connective tissue component of tenderness. J. Food Sci. 27. 469.

DUNAJSKI E., 1979. Texture of fish muscle. Journal of texture studies 10 301-318

DUTSON T.R., 1981. Meat proteolysis. 329-335

GRZIMEK B., FONTAINE M., 1970. Le monde animal. Mollusques et échinodermes. Vol. III

GUSTAVSON K.H., 1955. The fonction of hydroxyproline in collagen. Nature 175, 70-74

GUSTAVSON K.H., 1956. The Chemistry and reactivity of collagen. Academie press New-York

HARRINGTON W.F., VON HIPPEL P.H., 1961. The structure of collagen and gelatin. Adv. Protein chem 16. 1-138

HASHIMOTO, WATABE et al, 1979. Muscle protein composition of sardine and mackarel. Bull. Japan soc. sci. Fish 45 (11) 1435-1436.

IFREMER, 1986. Une ressource exploitable en région Bretagne-Basse Normandie. Les petits bivalves : palourdes roses, amandes, spisules.

KIMURA S., TANAKA H., 1983. Characterization of tuban shell, muscle collagen. Comprising three identical α 1 chain. Bull Japan soc. sci. fish 49-229.

KUBOTA M., KIMURA S., 1975. The distribution of collagen in fish Hikakov kagaku 21:80.

LOCKER R.H., 1960. Degree of muscular contraction as a factor in tenderness of beef. Food res. 25, 304-307.

LONCIN M., 1976. Génie Industriel alimentaire.

MARCH B.B. and LEET N.G., 1966. Studies in meat tenderness III. The effect of cold shortening on tenderness. J. Food Sci. 31, 450-459.

RIGBY B.J., 1971. The thermal stability of collagen : it's significance in biology and physiology. Chemical dynamics.

ROLAN T.L., DAVIS G.W., SEIDMAN S.C., 1988. Effect of blade tenderization and proteolytic enzymes on restructured steaks from beef bullock chucks. J. Food Sci., 53 (4) 1062-1110.

ROZIER J. et JOUVE J.L., 1978. Le collagène, ses problèmes dans l'industrie carnée. Ind. Alim. Agric. Avril 371-386.

SAINCLIVIER M., 1983. L'industrie alimentaire halieutique. Vol I.

SOUCI, FACHMAN, KRAUT, 1986. Food composition and nutritional table.

SOUDAN F., 1965. La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques.

Symposium international, Versailles, Mai 1982. Utilisation des enzymes en technologie alimentaire.

TANAKASHI T., TANAKA T., 1961. On meat of the top shell. Bull. Tokai Reg. Fish res. Lab. 30. 85.

TARRANT P.V., 1981. Muscle proteins in meat technology. 261-291

WILBUR K.M., HOCHACHAKA P.W., 1983. The mollusca. Vol. 1.

WILBUR K.M., YONGE C.M., 1964. Physiology of mollusca. Vol. 1

YOSHIHIRO O., WATANABE et al, 1985. Heat induced tendering of turban shell (*Batillus cornutus*) muscle. J. Food sci. 50.

A N N E X E S

DOSAGES DES SUCRES TOTAUX

Matériels :

- Homogénéisateur
- Balance de précision (au mg près)
- Trompe à vide
- Coton cardé
- Autoclave
- fiole à filtration sous vide
- Verrerie courante de laboratoire
- Bec benzène
- Ballon filtre
- papier filtre (wathman n°1202-18)
- Réfrigérant
- Billes de verre

Produits :

- . H₂SO₄ (normale)
- . Lessive de soude
- . Ferro-cyanure de potassium
- . Acétate de zinc

- . Sulfate cuivrique/complexon III dans un ballon jaugé de 1 litre:
 - sulfate de cuivre 5H₂O RP : 25 g dissous dans 100 ml d'eau.
 - complexon III EDTA : 37,22 g dissous dans 250 ml d'eau.
 - carbonate de sodium 10H₂O : 286g dissous dans 300 ml d'eau compléter à 1 litre avec de l'eau.
- . Solution d'ammoniaque N : 7,5 ml d'ammoniaque RP compléter à 100ml.
 - . Acide nitrique concentré (ou normal).
 - . Murexide.
- . Solution de complexon III 0,02 M : 7,44g d'EDTA pour 1 litre d'eau.

Hydrolyse

- Peser au mg près, 10g d'échantillon homogène et l'introduire dans un erlenmeyer (Pirex).
- Ajouter 100ml de solution d'acide sulfurique normale; boucher avec du coton cardé et recouvrir d'une feuille de papier aluminium maintenue par un bracelet de caoutchouc.
- Hydrolyser pendant 20 minutes à l'autoclave à 115-120°C.
- Laisser refroidir.
- Neutraliser avec la lessive de soude.
- Revenir à un pH légèrement acide avec une goutte d'H₂SO₄.
- Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 200 ml.
- Ajouter :
 - . 2ml de solution de ferrocyanure de potassium et agiter.
 - . Ajuster à 200 ml.
 - . Ajouter 2 ml de solution d'acétate de zinc, agiter.
- Laisser reposer environ 10 minutes.
- Filtrer sur papier filtre plissé (wathman N°=1202-185).
Le dosage se fera sur le filtrat.

Dosage

- 1 - Introduire dans un ballon filtre 2 ml du filtrat + 20ml de la solution cuivrique/complexon. Ajouter une bille de verre et mettre en place le réfrigérant.
 - 2 - Porter à ébullition douce pendant 10 mnutes. Au cours de l'ébullition la surface du mélange doit rester bleutée.
- Cas particulier : Si la teneur en sucres est très élevée, le précipité sera important et probablement incomplet (surnageant décoloré, toute la solution cuivrique est utilisée). Recommencer alors avec une prise d'essai plus faible.

3 - Arrêter l'ébullition en versant 25 ml d'eau par le réfrigérant. Finir le refroidissement sous l'eau courante.

4 - Recueillir le précipiter en filtrant sous vide et rincer abondamment.

5 - Changer de fiole à vide (très propre) et redissoudre avec quelques gouttes d'acide nitrique concentré. Attendre quelques minutes puis rincer abondamment le ballon filtre.

6 - Neutraliser avec 25 ml d'ammoniaque 1N. Ajouter 2 pincées de murexide. (coloration bleutée ---> jaune-orangée).

7 - Titrer avec le complexon EDTA 0,02 M jusqu'à virage au violet.

Soit K=ml de complexon III 0,02 M versé.

Le résultat en mg de glucose est obtenu par l'intermédiaire du tableau de conversion suivant.

Kml de Complexon	mg de glucose
2,5	$0,736K+0,24$
5,0	$0,756K+0,14$
10,0	$0,783K-0,11$
15,0	$0,803K-0,42$
20,0	$0,822K-0,80$
25,0	$0,838K-1,20$
30,0	$0,901K-3,07$
35,0	$0,946K-4,66$
40,0	

NB : Les équations de conversion sont valables sur des intervalles donnés.

Exemple : Au cours d'un dosage effectué à partir de 10,4621g de chair de bulot on a versé 8,55ml de complexon III. L'équation à utiliser est : $0,756K + 0,14$ car $5 < 8,55 < 10$. Quantité de glucose contenu dans la prise d'essai est :

$$(0,756 \times 8,55) + 0,14 = 6,60 \text{ mg dans 2ml.}$$

Dans les 200ml de préparation on a :

$$\frac{6,60 \times 200}{2} = 660 \text{ mg de glucose}$$

Exprimé en pourcentage : $\frac{660 \times 100}{1000 \times 10,4621g} = 6,308 \%$

PREPARATION ET ANALYSE DES ACIDES AMINES

Préparation des échantillons :

Acides aminés totaux.

Les acides aminés sont dosés après hydrolyse acide par l'acide chlorhydrique 6N.

- environ 50 mg de l'échantillon sont pesés dans une ampoule à sceller.

- 10ml HCL 6N sont alors rajoutés.

- après un bullage à l'azote l'ampoule est scellée.

- l'hydrolyse est conduite pendant 24 H dans un four à 110°C.

- l'échantillon est ensuite dilué et ramené à PH 2.2 avec un tampon de dilution (produit PIERCE), tampon au citrate de sodium 0.2 N Na+.

100 µl de cet échantillon sont injectés pour analyse.

Acides aminés libres.

- 200 à 250 mg d'échantillon sont broyés et mélangés dans de l'acide sulfosalicylique à 3%.

- Après déprotéinisation l'extrait est centrifugé pendant 30 minutes à 6000 tours/minutes. La température durant la centrifugation étant de 4°C.

- Le surnageant est recueilli et ramené à pH 2.2 puis dilué avec le tampon citrate de dilution avant d'être injecté pour analyse.

Remarque : Au cours de la préparation des échantillons un étalon interne la norleucine est ajoutée.

Analyse des échantillons.

Appareillage : le laboratoire est équipé d'un autoanalyseur d'acides aminés chromakon 400 (KONTRON), comprenant :

- 2 pompes hkps à piston haute pression.
- un passeur d'échantillon à 8 boucles de 100 µl.
- le système fonctionne en hydrolysats; 3 tampons citrate de sodium permettent d'éluer les acides aminés.

Tampon A : 0.18 N Na+ pH 3.2

Tampon B : 0.3 N Na+ pH 4.1

Tampon C : 1.6 N Na+ pH 4.7

Régénération NaOH 0.2 N.

Débit des tampons 20ml/h

Pression 50 bars.

Colonne résine DC 6A (durrum). 350 mm x 4 mm.

Détection : Ninhydrine 570 nm.

DOSAGES DES ACIDES AMINES

Acides aminés totaux

La teneur totale en chacun des acides aminés est donnée par la formule :

$$\frac{S_e}{S_s} \times \frac{Nor_s}{Nor_e} \times 10 \times 10 \times 20 \times 10 \times \frac{1}{P \cdot 10^{-3}} \times 10^{-9} \times PM = \text{g/g de matières telle quelle}$$

nanomoles ml dilution Volume total

$$\frac{S_s}{S_s} \times \frac{Nor_s}{Nor_e} \times \frac{20}{P} \cdot 10^{-3} \times PM = \text{g/g}$$

$\frac{S_s}{S_s} \times \frac{Nor_s}{Nor_e} \times \frac{20}{P} \times PM = \text{mg/g}$	mg d'acide aminé/g de matière.
--	--------------------------------

P = quantité (mg) de matière utilisée au départ

S_e = surface du pic dans le chromatogramme de l'échantillon

S_s = surface du pic dans le chromatogramme du standard

Nor_s = surface du pic de la norleucine dans le standard

Nor_e = surface du pic de la norleucine dans l'échantillon

PM = poids moléculaire de l'acide aminé considéré

Acides aminés libres.

La teneur en chaque acide aminé libre est donné par :

$$\frac{S_s}{S_s} \times \frac{Nor_s}{Nor_e} \times 10 \times 5 \times 10 \times 5 \times \frac{1}{P10^{-3}} \times 10^{-9} \times PM$$

$\frac{S_e}{S_s}$	\times	$\frac{Nor_s}{Nor_e}$	\times	$\frac{25}{P}$	\times	10^{-1}	\times	$PM =$	mg d'acide aminé/g de matière.
-------------------	----------	-----------------------	----------	----------------	----------	-----------	----------	--------	-----------------------------------

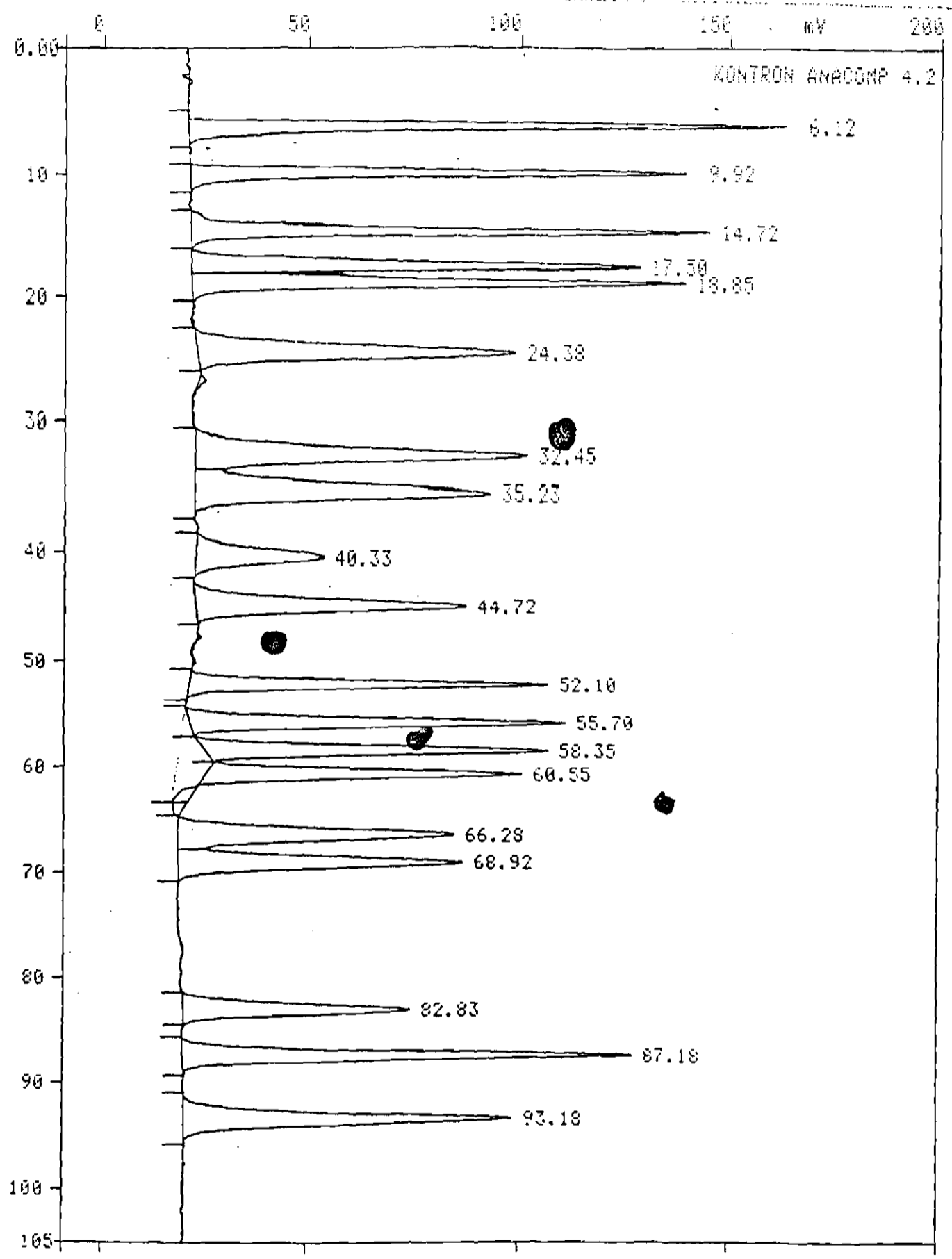


Fig A1 :chromatogramme standard .

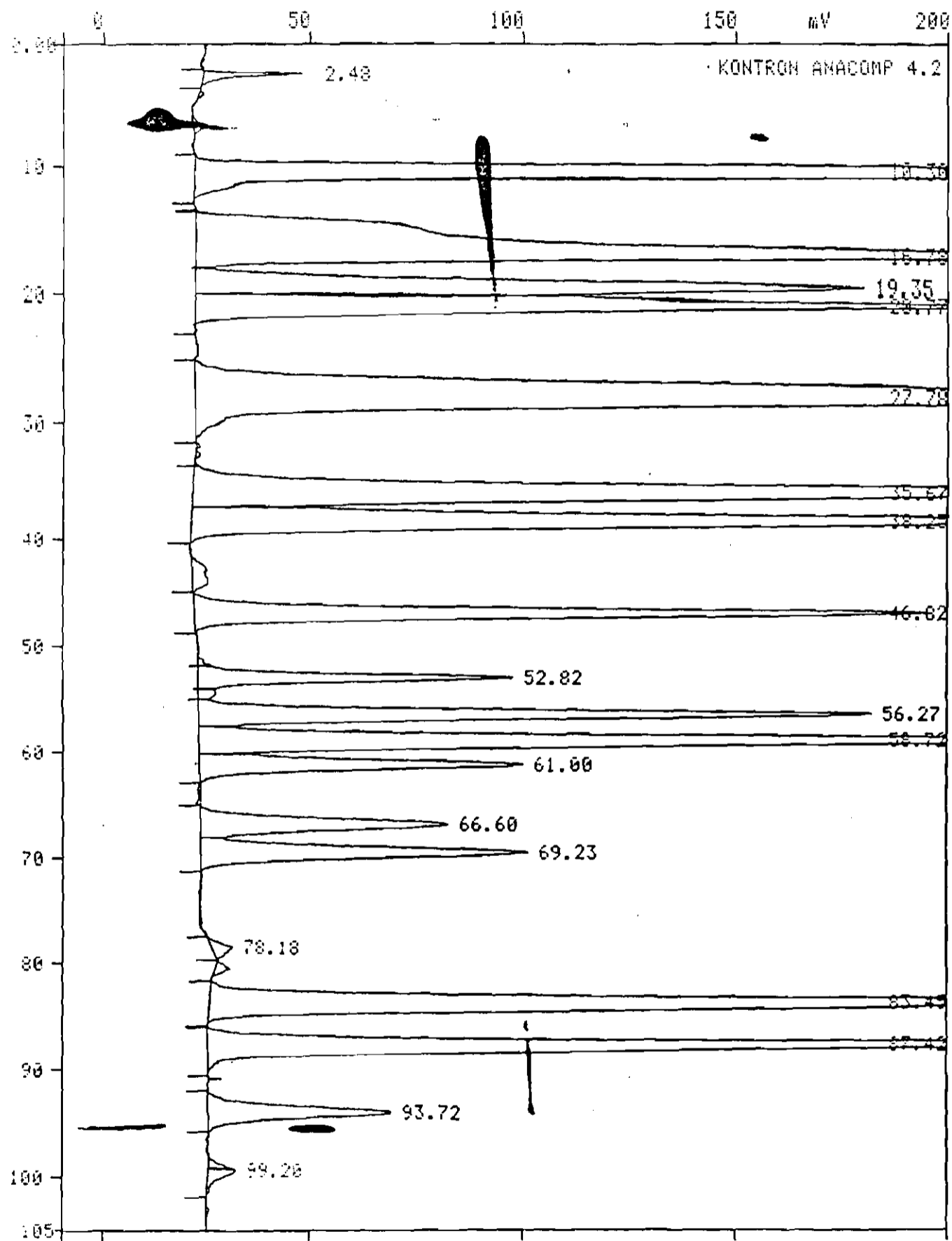


Fig A2 : chromatogramme des acides aminés totaux de l'amande .

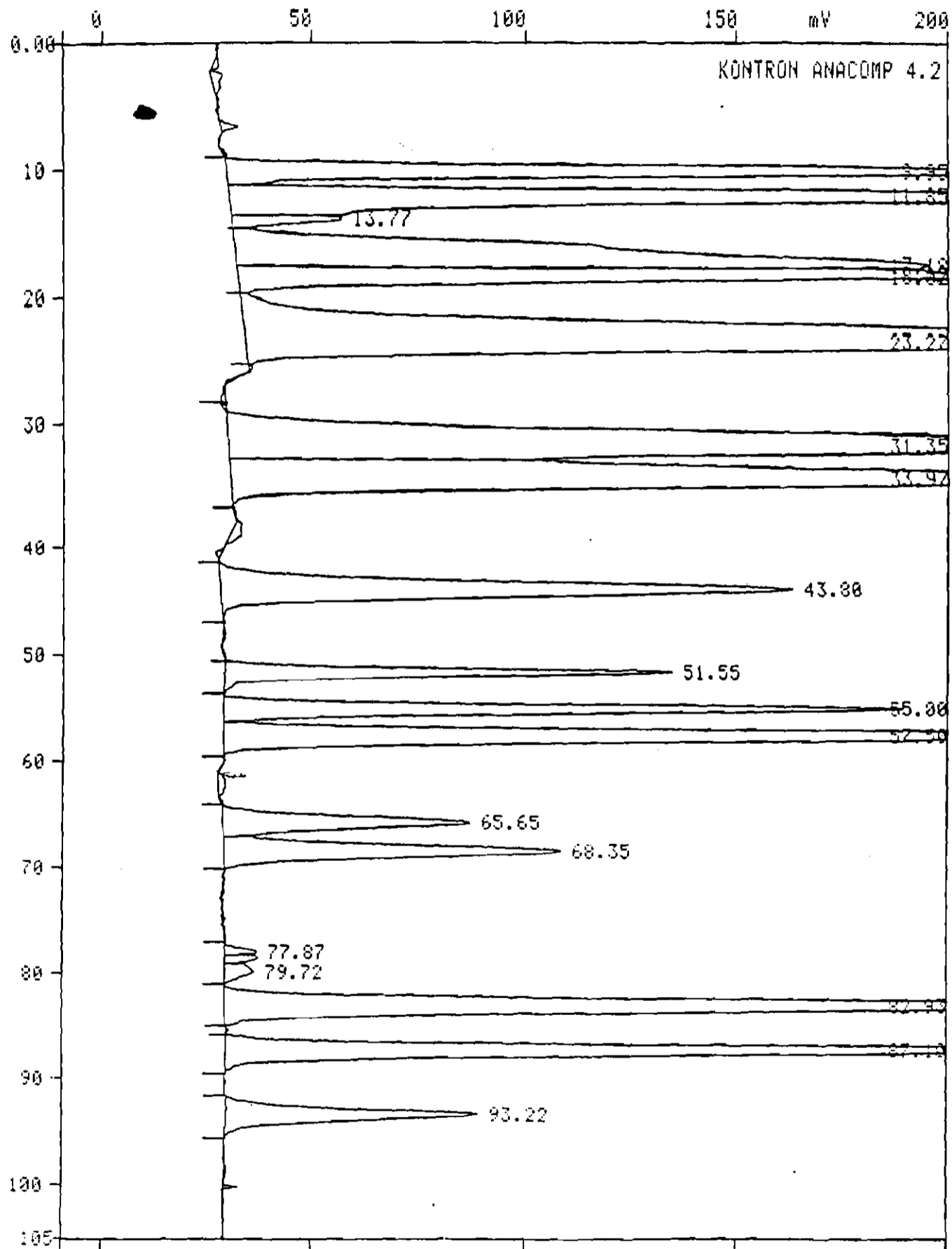


Fig A3 : chromatogramme des acides aminés totaux du bulot .

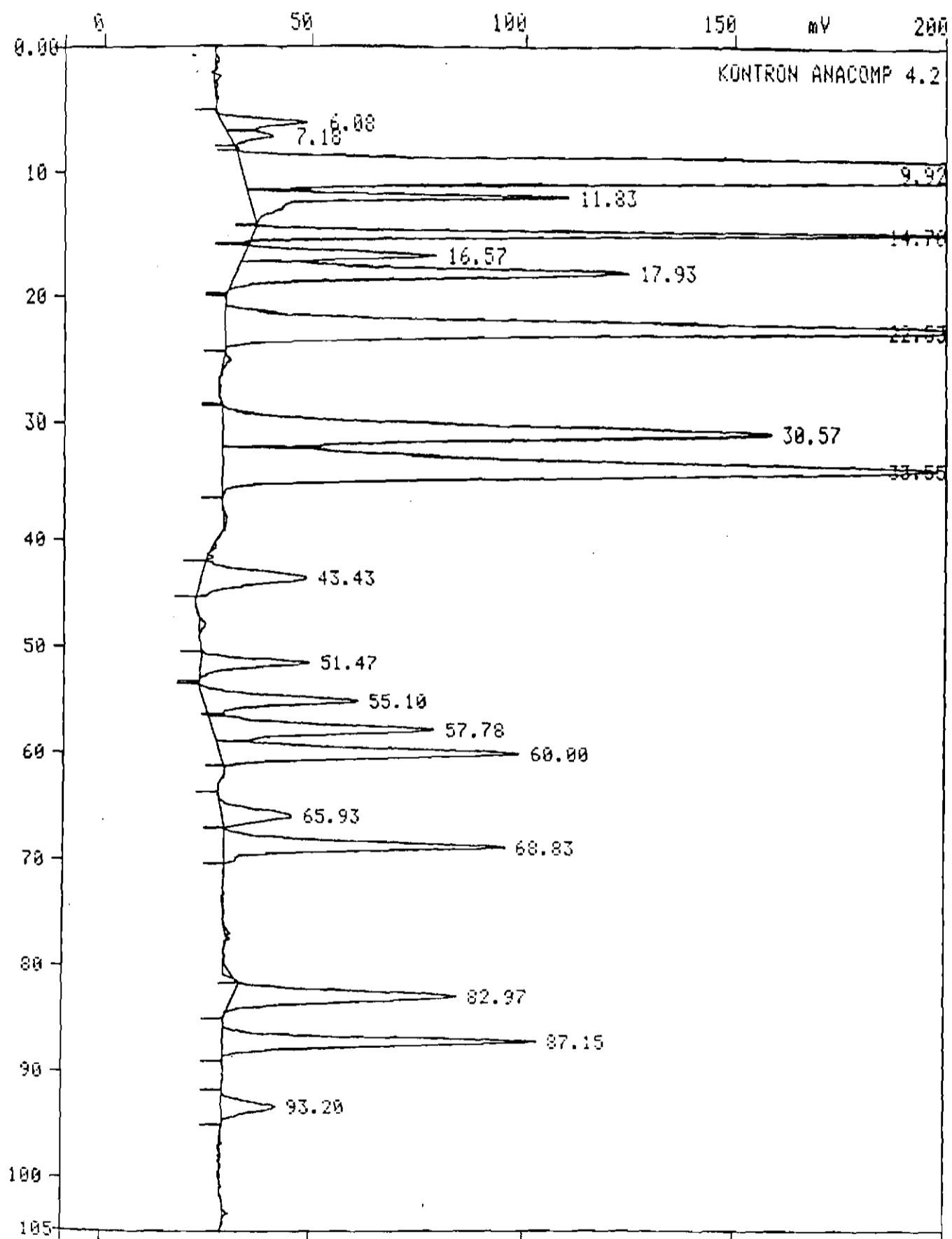


Fig A4 : chromatogramme des acides aminés libres de l'amande.

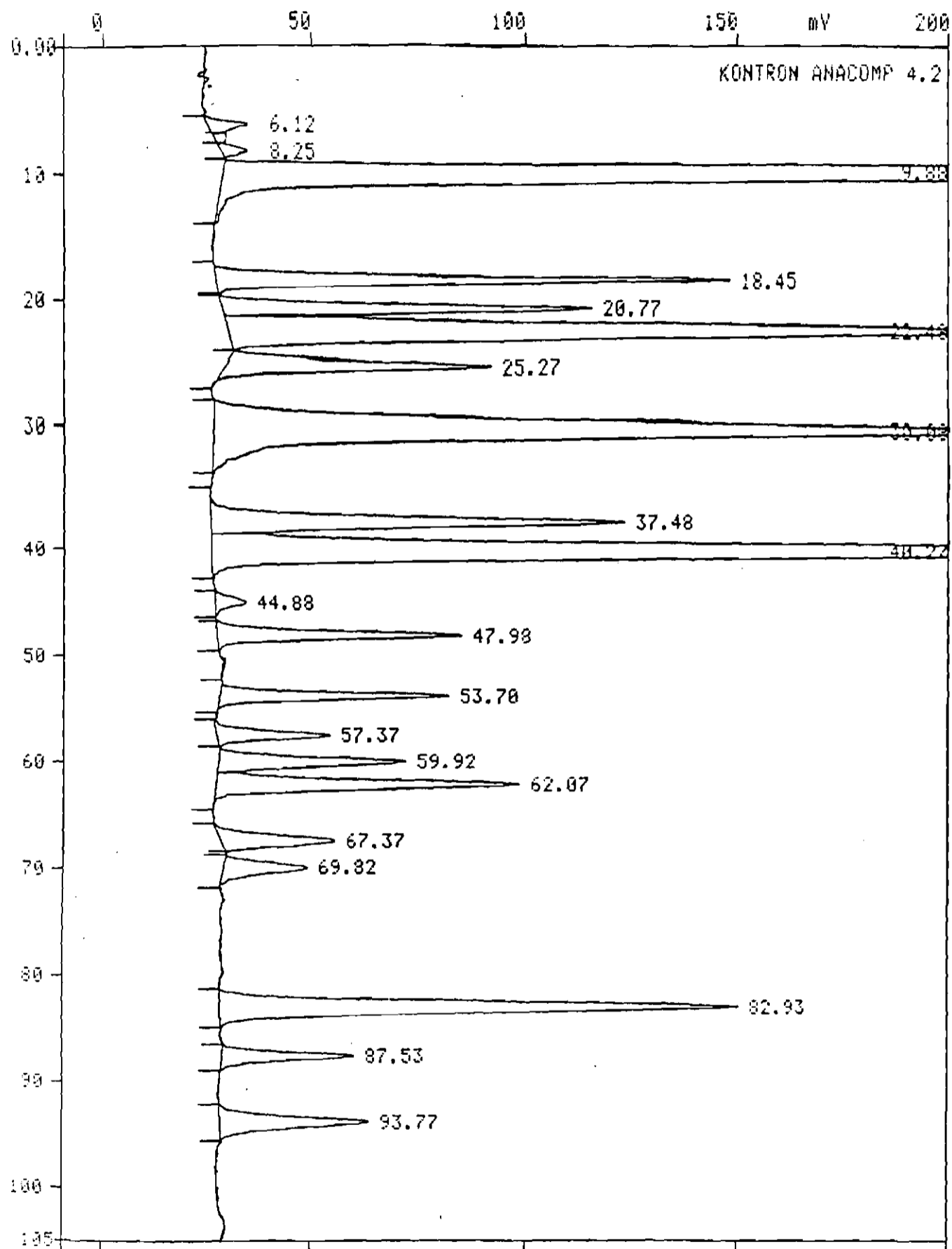


Fig A5 : chromatogramme des acides aminés libres du bulot .

DOSAGES DES PROTEINES

Matériels :

- Balance de précisions
- tubes à minéraliser (matras 300cc)
- bloc chauffant (minéralisateur tecator)
- hotte
- unité de distillation (KJELTEC system)
- burette automatique.

Préparation de la solution d'acide borique.

- 10 g d'acide borique RP cristallisé + 200 ml d'éthanol 95 % + 700 ml d'H₂O distillé + 10 ml d'indicateur coloré (3,3 ml de vert de bromocresol 0,1 % + 6,6 ml de rouge de méthyle à 0,1 % tous deux dans de l'alcool).

Ajuster à pH 5.

Compléter avec de l'eau distillée à 1000 ml.

- Autres produits :

HCl 1 N

HCl 0,1 N

Acide trichloroacétique TCA : 20 %

H₂SO₄ RP (d = 1,83)

Catalyseur (Merck)

Lessive de soude RP (d = 1,33)

1 - Azote totale (N_t)

- Prise d'essai : peser avec précision 4 g d'échantillon.

- Techniques : introduire la prise d'essai dans le matras, y ajouter une pastille de catalyseur et 20 ml d'H₂SO₄, minéraliser 1,5 à 2 heures, distiller en présence de soude. Les vapeurs sont recueillies dans un erlenmeyer contenant 20 ml de la solution d'acide borique. Titrer avec du HCl 1N jusqu'à retour stable à la coloration rouge de l'acide borique, soit x ml d'HCl versé.

$$\text{L'azote total } N_t = \frac{X \times 1N \times 14}{1000 \times 4} \times 100 = \% N_t \text{ par rapport à la matière telle quelle}$$

2 - Azote non protéique (NPN)

- prise d'essai : 50 g

- techniques : bien homogénéiser les 50g de matière avec 100 ml d'eau distillée. Ajouter 50 ml de TCA 20 %. Mélanger à grande vitesse à l'aide du mixer pour mieux précipiter les protéines.

Filtrer sur du papier (wathman N° 1202-185)

Pipeter 20 ml de filtrat et mettre dans un tube à minéraliser.

Minéraliser comme précédemment (avec environ 10ml d'H₂SO₄).

Distiller comme précédemment ;

Titrer avec du HCl 0,1 N.

Soit Y ml de HCl 0,1 N versé.

$$\text{L'azote non protéique NPN} = \frac{Y \times 0,1N \times 14 (50+100+54,8)}{1000 \times 20 \times 1,03 \times 50} \times 100 = \% \text{ NPN}$$

Par rapport à la matière telle quelle.

54,8 = masse de 50 ml de TCA 20 %.

1,03 = densité du filtrat.

La quantité de protéines totales est : $(N_t - \text{NPN}) \times 6,25 = \% \text{ de protéines par rapport à la matière telle quelle.}$

Fractionnement protéique - Calculs :

Protéines sarcoplasmiques. (PS)

V₁ = Volume de HCl 0,1 N versé pour le dosage de l'azote avant addition de TCA 20 % (précipite les protéines).

V₂ = Volume de HCl 0,1 N versé pour le dosage de l'azote après élimination des protéines sarcoplasmiques.

20 = ml surnageant minéralisé.

$$P.S = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,1 \times 14 \times S_1}{20} \times 6,25 = \text{mg de P.S}$$

* Protéines myofibrillaires (P.M)

V = volume de HCl 0,1 N

$$P.M = \frac{V \times 0,1 \times 14 \times S_2}{20} \times 6,25 = \text{mg de P.M}$$

* Protéines alcali solubles (P.A.S)

V = volume de HCl 0,1 N.

$$P.A.S = \frac{V \times 0,1 \times 14 \times S_3}{20} \times 6,25 = \text{mg de P.A.S}$$

* Protéines de stroma (P.C)

V = volume de HCl 1 N

$$P.C = V \times 14 \times 6,25 = \text{mg de P.C.}$$

Chaque fraction protéique est ensuite exprimée en pourcentage de l'ensemble des 4 fractions.

Les bivalves entrent dans les plats cuisinés-surgelés, soit comme garniture, soit comme élément principale. Ces dernières productions sont destinées plutôt à un marché haut de gamme. la croissance du marché national des plats surgelés (et parmi eux des préparations à base de produits de la mer) permet de penser qu'une partie de la production de coquillages pourrait être absorbée ainsi (substitution de la palourde farcie à la praire farcie). La dimension de ce marché ne devrait pourtant pas excéder à moyen terme 5 à 10 000 tonnes de poids vif compte tenu de la faible évolution au cours des dernières années, de la structure très stable des approvisionnements nationaux (tableau 3) et de celle des importations, marquée par une hausse sensible à partir de 1981 (tableau 9).

	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Amandes					918	816	758	755	779	686
Coques	3573	3083	4195	7401	6984	5183	4557	5069	4369	2425
Palourdes	860	640	435	396	797	754	716	750	847	1370
Praires	5196	4439	4436	4170	3857	4329	4443	3511	2986	2598
Divers (hors CSJ et péton- cles)	939	1513	1994	1368	876	2411	3027	3351	1461	1381
TOTAL	10568	9675	10960	13335	13432	13493	13501	13436	10442	8460

Tableau 7 : Structure de la production française par espèce (en t)
(Source CCPM)

	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Congelés	184	220	73	78	101	163	239	434	1540	2174
Autres	1427	1351	1665	2087	1951	2178	2622	2662	3125	3627
Prépara- tions ou conserves (1)	4203	4810	5850	5165	6519	6622	6508	6877	7435	7541
TOTAL	5814	6381	7588	7730	8571	8963	9369	10023	12100	13342

Tableau 8 : Structure des importations de mollusques et coquillages
(hors huîtres, moules, Coquilles St-Jacques et Céphalopodes) produits
(Source CCPM)

(1) Ces chiffres incluent probablement une quantité non négligeable de chair de moule.