



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES

Thèse de doctorat en Sciences de la Vie
Spécialité: BIOCHIMIE (Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et à la Nutrition)

**VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DES CO-PRODUITS DE
CREVETTE : UTILISATION DE LA PROTEOLYSE
ENZYMATIQUE POUR DES APPLICATIONS AVICOLES A
MADAGASCAR**

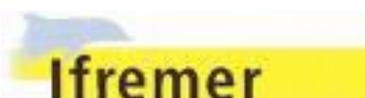
Présentée et soutenue publiquement par

Zo RANDRIAMAHATODY
Maître ès Sciences

Le 12 janvier 2011

Devant le jury composé de:

- Président** : Professeur Blandine ANDRIANARISOA, Université d'Antananarivo
Directeurs de thèse : Professeur Louissette RAZANAMPARANY, Université d'Antananarivo
: Professeur Nathalie BOURGOUGNON, Université de Bretagne Sud
: Professeur Jean-Pascal BERGE, IFREMER de Nantes
Rapporteur externe : Professeur Panja RAMANOELINA, Ecole Supérieure des Sciences
Agronomiques d'Antananarivo
Rapporteur interne : Professeur Laurence RALAMBORANTO, Université d'Antananarivo
Examineurs : Professeur Charlotte RALISON, Université d'Antananarivo
: Professeur Abel ANDRIANTSIMAHAVANDY, Université d'Antananarivo





UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES

Thèse de doctorat en Sciences de la Vie
Spécialité: BIOCHIMIE (Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et à la Nutrition)

**VALORISATION BIOTECHNOLOGIQUE DES CO-PRODUITS DE
CREVETTE : UTILISATION DE LA PROTEOLYSE
ENZYMATIQUE POUR DES APPLICATIONS AVICOLES A
MADAGASCAR**

Présentée et soutenue publiquement par

Zo RANDRIAMAHATODY
Maître ès Sciences

Le 12 janvier 2011

Devant le jury composé de:

- Président** : Professeur Blandine ANDRIANARISOA, Université d'Antananarivo
Directeurs de thèse : Professeur Louissette RAZANAMPARANY, Université d'Antananarivo
: Professeur Nathalie BOURGOUGNON, Université de Bretagne Sud
: Professeur Jean-Pascal BERGE, IFREMER de Nantes
Rapporteur externe : Professeur Panja RAMANOELINA, Ecole Supérieure des Sciences
Agronomiques d'Antananarivo
Rapporteur interne : Professeur Laurence RALAMBORANTO, Université d'Antananarivo
Examineurs : Professeur Charlotte RALISON, Université d'Antananarivo
: Professeur Abel ANDRIANTSIMAHAVANDY, Université d'Antananarivo



Ce travail a été réalisé au :

- Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et à la Nutrition (LABASAN), Université d'Antananarivo, Ankatso
- Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marine (LSTBM), Institut Française de Recherche et de l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Nantes
- Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), Université de Bretagne Sud, Vannes
- Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, Université de Bretagne Occidentale, Quimper

Ce travail a fait l'objet d'un article sous presse intitulé : « Proteolysis of shrimp by-products (*Penaeus monodon*) from Madagascar ». L'article a été accepté au Journal « CyTA-Journal of Food » le 10 Août 2010.

En premier lieu, je tiens à remercier l'Agence Universitaire pour la Francophonie (AUF) pour avoir financé la bourse de thèse ayant permis la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à:

Madame Louissette RAZANAMPARANY, professeure à l'Université d'Antananarivo, pour la direction de ce travail, pour sa patience et ses précieux conseils, mais surtout pour sa confiance. Les collaborations avec l'Université de Bretagne Sud et l'Institut Française pour la Recherche et l'Exploitation de la Mer (IFREMER) ont été possibles grâce à elle.

Madame Nathalie BOURGOUGNON, professeure à l'Université de Bretagne Sud, pour la co-direction de cette thèse, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et encouragements dans la réalisation de ce travail.

Monsieur Jean-Pascal BERGE, directeur de recherche à IFREMER, pour m'avoir acceptée dans son équipe de recherche et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, pour ses conseils inestimables et son encadrement scientifique au cours de ce travail, malgré ses différentes responsabilités.

Je tiens à présenter mes vifs remerciements à:

Madame Blandine ANDRIANARISOA, professeure à l'Université d'Antananarivo, qui malgré ses multiples responsabilités, a bien voulu accepté de présider le jury de ce travail.

Madame Laurence RALAMBORANTO, professeure à l'Université d'Antananarivo, et à Monsieur Panja RAMANOELINA professeur à l'Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques (ESSA), Université d'Antananarivo, qui me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement d'avoir accepté de corriger, d'évaluer ce travail, de m'avoir fait part de leurs temps et de remarques pertinentes pour accomplir ce manuscrit.

Madame Charlotte RALISON, professeure à l'Université d'Antananarivo et Monsieur Abel ANDRIANTSIMAHAVANDY, professeur à l'Université d'Antananarivo, qui ont bien voulu se rendre disponible pour examiner ce travail.

Madame Doll RAKOTO, chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de l'Université d'Antananarivo, et à Monsieur Victor JEANNODA, responsable de la formation doctorale du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, d'avoir donné l'autorisation de soutenir cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à:

Monsieur Jérôme POUTOT, Monsieur Ralison ANDRIAMANDRANTO, Monsieur Edmond RAZAFIMAHENINA, Monsieur Lucien RAMAROSON, Monsieur Andrianabelina RAKOTOBE, Monsieur Didier LE TETOUR, pour leur aimable collaboration et pour nous avoir fourni les co-produits de crevette pour cette étude.

Toutes les personnes du centre IFREMER de Nantes pour leur accueil et leur sympathie; Monsieur Jean-Luc VALLET, ancien directeur du Département STAM, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de l'IFREMER, Madame Françoise LEROY, directeur de recherche à l'IFREMER, de m'avoir initiée et aidée pour la partie microbiologique; Claire DONNAY-MORENO, Jean Paul GOUYGOU, Christine CHOPIN pour leur aide dans les manipulations et leur sympathie; Sylvie HUREL pour sa disponibilité et son aide avec la bibliographie, Régis BARON, Véronique VERREZ, Laetitia KOLYPCZUK, Sandrine BRUZAC; Isabelle ADAM et Christine DUFFAUD pour leur aide au cours ce travail.

Monsieur Yannick FLEURY, maître de conférences à l'Université Occidentale de Quimper, pour sa collaboration pour les tests microbiologiques au LUBEM, Quimper.

Toutes les personnes du LBCM pour leur aide et sympathie au cours de ce travail.

Toutes les personnes du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de l'Université d'Antananarivo pour leur aide et sympathie au cours de ce travail.

Je remercie particulièrement:

Raul PEREZ GALVEZ et Thi Mi Huong NGUYEN pour leur soutien et leur amitié au cours de ce travail.

Tous les doctorants du Département STAM du centre IFREMER de Nantes, Emna SOUFI-KECHAOU, Karine LE ROUX, Christelle KOUAKOU, Papa Abdoulaye FALL pour leur soutien et leur sympathie pendant ces années.

Un grand merci à à toute ma famille pour m'avoir soutenue pendant la réalisation de ce travail, à ma mère pour sa contribution aux tests sur les poulets et pour m'avoir supportée pendant les moments difficiles, à Lanto et Fred pour avoir relu avec patience ce manuscrit.

Sommaire

LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABREVIATIONS	XIV
INTRODUCTION GENERALE	1
1. CONTEXTE DE L'ETUDE	1
2. OBJECTIFS DE L'ETUDE	2
CHAPITRE 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. LES CREVETTES DANS LE MONDE.....	4
1.1. Production	4
1.2. Les différentes espèces de crevette.....	5
1.3. Les crevettes pénéides	5
1.3.1. Les crevettes d'aquaculture	8
1.3.2. Les crevettes de pêche	10
1.4. Les crevettes à Madagascar	11
1.4.1. La pêche crevettière.....	12
1.4.1.1. La pêche industrielle.....	12
1.4.1.2. La pêche artisanale.....	12
1.4.1.3. La pêche traditionnelle.....	14
1.4.2. L'aquaculture.....	14
1.4.3. Transformation et commercialisation des crevettes.....	14
2. LES CO-PRODUITS DE CREVETTE ET DE POISSON.....	15
2.1. Définition	15
2.2. Différentes voies de valorisation des co-produits.....	16
2.2.1. Farine et huile	16
2.2.2. Hydrolysats.....	17
2.2.2.1. Poissons	18
2.2.2.2. Crevettes	21
2.2.3. Produits à haute valeur ajoutée	23
2.2.3.1. Chitine et chitosan	24
2.2.3.2. Astaxanthine	25
2.2.3.3. Peptides.....	27
2.2.3.3.1. Nutrition animale	27
2.2.3.3.2. Nutrition humaine	28
2.2.3.3.3. Bioactivité	28
2.2.3.3.4. Support de milieu de culture microbienne	29
2.2.3.4. Substances aromatiques	30
2.2.3.5. Glucosamine	30

2.2.3.6. Phosphatase alcaline	30
2.2.3.7. Eléments minéraux et vitamines	31
2.2.3.8. Huile riche en $\omega 3$ et $\omega 6$	33
2.2.4. Autres produits à haute valeur ajoutée.....	34
2.2.4.1. Collagène	34
2.2.4.2. Gélatine.....	35
2.2.4.3. Co enzyme Q10	35
2.2.5 Précautions	35
2.2.6. Utilisation non alimentaire : fertiliseur.....	36
3. GENERALITES SUR L'AVICULTURE	37
3.1. Alimentation avicole	37
3.1.1. Les besoins en énergie	37
3.1.2. Les besoins en matières azotées	38
3.1.3. Les besoins en matières grasses et acides gras essentiels	38
3.1.4. Les besoins en vitamines	39
3.1.5. Les besoins en minéraux.....	39
3.1.6. Les besoins en eau	40
3.1.7. Quelques recommandations pour l'alimentation avicole.....	40
3.2. Aviculture à Madagascar	42
3.2.1. Alimentation	42
3.2.2. Santé	42
3.2.3. Productivité	42
3.3. Co-produits de la mer et aviculture	43
4. MICROORGANISMES ET ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	43
4.1. Les microorganismes pathogènes aquacoles	43
4.2. Les microorganismes alimentaires	44
4.3. Les peptides à activité antimicrobienne (PAMs).....	44
4.3.1. Les PAMs d'origine marine	49
4.3.2. Les PAMs des crustacés	52
4.3.3. Les Post-peptides.....	54
4.4. Mécanisme d'action des PAMs.....	56
CHAPITRE 2. HYDROLYSES ENZYMATIQUES : CRIBLAGE DES DIFFERENTES ENZYMES	58
1. INTRODUCTION.....	58
2. MATERIELS ET METHODES	60
2.1. Matériel biologique	60
2.1.1. Co-produits de crevette : origine et collecte	60
2.1.2. Homogénéisation et conservation des co-produits	61
2.2. Matériel enzymatique.....	61
2.2.1. Pepsine (EC. 3.4.23.1).....	61
2.2.2. Novozym 37020	61
2.2.3. Protex 6L (EC 3.4.23.62).....	61
2.2.4. Delvolase (EC. 3.4.21.14)	61
2.3. Hydrolyses de longue durée	62
2.3.1. Principe.....	62
2.3.2. Déroulement de l'hydrolyse	62

2.3.3. Calcul du degré d'hydrolyse	63
2.3.4. Arrêt de l'hydrolyse	64
2.3.5. Traitement des hydrolysats	64
2.3.5.1. Centrifugation	64
2.3.5.2. Lyophilisation	64
2.4. Hydrolyses croisées	64
2.4.1. Principe	64
2.4.2. Déroulement de l'hydrolyse	65
2.5. Analyses biochimiques	66
2.5.1. Dosage de la teneur en eau	67
2.5.1.1. Principe	67
2.5.1.2. Manipulation	67
2.5.1.3. Calcul	67
2.5.2. Analyses des protéines	67
2.5.2.1. Dosage de la teneur en protéines totales	67
2.5.2.1.1. Principe	67
2.5.2.1.2. Manipulation	67
2.5.2.1.3. Calcul	68
2.5.2.2. Détermination du profil en acides aminés	68
2.5.2.2.1. Principe	68
2.5.2.2.2. Manipulation	68
2.5.2.3. Détermination du profil moléculaire	69
2.5.2.3.1. Principe	69
2.5.2.3.2. Manipulation	69
2.5.3. Analyses des lipides	69
2.5.3.1. Extraction des lipides par la méthode de Folch	69
2.5.3.1.1. Principe	69
2.5.3.1.2. Manipulation	70
2.5.3.1.3. Calcul	70
2.5.3.2. Conservation des extraits lipidiques	70
2.5.3.2.1. Principe	70
2.5.3.2.2. Manipulation	70
2.5.3.3. Détermination du profil en acides gras	72
2.5.3.3.1. Principe	72
2.5.3.3.2. Préparation des dérivés	72
2.5.3.3.3. Injection	72
2.5.3.4. Détermination de la teneur en phospholipides	73
2.5.3.4.1. Principe	73
2.5.3.4.2. Manipulation	73
2.5.3.4.3. Calcul :	73
2.5.4. Analyses des matières minérales	73
2.5.4.1. Dosage de la teneur en cendres	73
2.5.4.1.1. Principe	73
2.5.4.1.2. Manipulation	73
2.5.4.1.3. Calcul	74
2.5.4.2. Dosage du calcium, magnésium, potassium et sodium	74
2.5.4.2.1. Préparation de la solution à analyser	74
2.5.4.2.2. Dosage des éléments minéraux	74
2.5.4.3. Dosage colorimétrique du phosphore	75
2.6. Analyses statistiques	75
3. RESULTATS	75

3.1. Composition des têtes de crevette d'élevage et sauvage	75
3.1.1. Teneur en eau	76
3.1.2. Analyses des protéines.....	77
3.1.2.1. Protéines totales	77
3.1.2.2. Composition en acides aminés	77
3.1.3. Analyses des lipides	78
3.1.3.1. Lipides totaux	78
3.1.3.2. Composition en acides gras	78
3.1.3.3. Teneur en phospholipides	80
3.1.4. Matières minérales.....	80
3.1.4.1. Teneur en cendres brutes	80
3.1.4.2. Teneur en éléments minéraux	80
3.2. Hydrolyses enzymatiques.....	81
3.2.1. Hydrolyses de longue durée	81
3.2.1.1. Cinétique des hydrolyses	81
3.2.1.2. Solubilisation de la matière lors des hydrolyses	82
3.2.1.3. Composition des différentes fractions d'hydrolyse.....	83
3.2.1.4. Solubilisation des protéines	84
3.2.1.4.1. Protéines totales	84
3.2.1.4.2. Profil moléculaire.....	84
3.2.1.4.3. Composition en acides aminés	85
3.2.1.4. Solubilisation des lipides	87
3.2.1.4.1. Lipides totaux.....	87
3.2.1.4.2. Phospholipides	87
3.2.1.4.3. Acides gras.....	88
3.3.2. Hydrolyses croisées	89
3.3.2.1. Solubilisation de la matière.....	90
3.3.2.2. Composition des différentes fractions issues des hydrolyses.....	91
3.3.2.3. Solubilisation des protéines	93
3.3.2.3.1. Protéines totales	93
3.3.2.3.2. Profil moléculaire.....	93
3.3.2.3.3. Composition en acides aminés	95
3.3.2.4. Solubilisation des lipides	96
3.3.2.4.1. Lipides totaux.....	96
3.3.2.4.2. Composition en phospholipides	97
4. DISCUSSION	98
4.1. Composition biochimique des co-produits de crevette d'élevage et sauvage.....	98
4.2. Hydrolyses enzymatiques.....	100
4.2.1. Hydrolyses de longue durée	100
4.2.1.1. Cinétique de l'hydrolyse	100
4.2.1.2. Solubilisation de la matière.....	101
4.2.1.3. Composition des différentes fractions obtenues lors des hydrolyses	101
4.2.1.4. Solubilisation des protéines	104
4.2.1.4.1. Protéines totales	104
4.2.1.4.2. Composition en acides aminés	105
4.2.1.4.3. Profils moléculaires.....	108
4.2.1.5. Solubilisation des lipides	109
4.2.1.5.1. Lipides totaux.....	109
4.2.1.5.2. Profil en acides gras et teneurs en phospholipides	109
4.2.2. Hydrolyses croisées	111

5. CONCLUSION	113
CHAPITRE 3 : HYDROLYSE PEPSIQUE : OPTIMISATION ET VALORISATION DES DIFFERENTES FRACTIONS.....	116
1. INTRODUCTION.....	116
2. MATERIELS ET METHODES	117
2.1. Matériels biologiques	117
2.2. Optimisation des hydrolyses pepsiques.....	117
2.2.1. Hydrolyse avec contrôle de pH.....	117
2.2.2. Hydrolyse sans contrôle de pH.....	118
2.2.3. Inactivation de la Pepsine	118
2.2.4. Traitements post-hydrolyses	118
2.2.4.1. Centrifugation	118
2.2.4.2. Lavage des fractions insolubles	118
2.2.4.3. Lyophilisation	118
2.2.5. Analyses biochimiques	119
2.2.6. Dosage des protéines dans les résidus de lavage	119
2.2.6.1. Principe.....	119
2.2.6.2. Manipulation.....	119
2.3. Etude de l'efficacité nutritionnelle des différentes fractions de têtes de crevette d'élevage en aviculture traditionnelle malgache	120
2.3.1. Matériel d'élevage	120
2.3.2. Aliments	120
2.3.2.1. Dérivés de têtes de crevette.....	120
2.3.2.2. Formulation des rations expérimentales	121
2.3.3. Milieu d'étude	122
2.3.4. Déroulement de l'expérience.....	122
2.3.4.1. Constitution des lots.....	122
2.3.4.2. Suivi de la croissance.....	123
2.3.4.3. Mesure de la consommation alimentaire	123
2.3.5. Estimation des performances zootechniques	123
2.4. Détection d'activité antimicrobienne	124
2.4.1. Souches testées	124
2.4.2. Tests sur souches de microorganismes alimentaires.....	125
2.4.2.1. Pré culture.....	125
2.4.2.2. Préparation des peptides	125
2.4.2.3. Stérilisation du mélange.....	125
2.4.2.4. Dépôt dans la plaque.....	125
2.4.3. Tests sur les souches de microorganismes pathogènes aquacoles	126
2.4.3.1. Tests en milieu liquide.....	126
2.4.3.2. Extraction en phase solide	126
2.4.3.3. SDS-PAGE et Gel recouvert.....	126
3. RESULTATS.....	127
3.1. Hydrolyses pepsiques des têtes de crevette	127
3.1.1. Cinétique des hydrolyses	127
3.1.2. Solubilisation de la matière	128
3.1.3. Composition des différentes fractions	129
3.1.4. Solubilisation des protéines	131

3.1.4.1. Protéines totales	131
3.1.4.2. Profils moléculaires	132
3.1.4.3. Profils en acides aminés.....	134
3.1.5. Solubilisation des lipides	136
3.2. Etude de l'efficacité nutritionnelle de différentes fractions de têtes de crevette d'élevage en aviculture.....	137
3.2.1. Rendements des hydrolyses	137
3.2.2. Composition des différentes rations expérimentales	138
3.2.3. Performances zootechniques des poulets	140
3.3. Activité antimicrobienne des hydrolysats de têtes de crevette	142
3.3.1. Tests sur des souches microbiennes alimentaires	142
3.3.2.2. Extraction en phase solide	143
3.3.2.3. SDS-PAGE et Gel recouvert	143
4. DISCUSSION	143
4.1. Optimisation des hydrolyses de têtes de crevette avec la Pepsine.....	143
4.1.1. Cinétique des hydrolyses	143
4.1.2. Solubilisation de la matière	144
4.1.3. Composition des différentes fractions	144
4.1.4. Solubilisation des protéines	147
4.1.4.1. Protéines totales	147
4.1.4.2. Profils en acides aminés.....	148
4.1.4.3. Profils moléculaires	149
4.1.5. Solubilisation des lipides	149
4.2. Amélioration de l'aviculture traditionnelle malgache	150
4.2.1. Composition des différentes rations	150
4.2.2. Performances zootechniques des poulets.....	151
4.2.2.1. Rations isoprotéiques	151
4.2.2.2. Rations à proportion constante de dérivés de têtes de crevette	152
4.3 Activités antimicrobiennes	153
5. CONCLUSION	156
CONCLUSION GENERALE	158
PERSPECTIVES.....	161
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	162

LISTE DES FIGURES	Page
Figure 1: Production mondiale de crevettes depuis l'année 1976.....	4
Figure 2 : <i>Penaeus monodon</i> (vue dorsale).....	6
Figure 3 : <i>Penaeus monodon</i> (vue latérale).....	6
Figure 4: Cycle biologique des crevettes pénéides (Source : Rafalimanana, 2003)	7
Figure 5: Bassins d'écloserie de crevette.	9
Figure 6 : Bassins de grossissement de crevette à Madagascar.	10
Figure 7 : Exploitation crevettière à Madagascar (Source : Chaboud, 2002)	13
Figure 8 : Proportion des différentes voies de valorisation des co-produits d'origine marine. (Origine : Andrieux, 2004)	16
Figure 9 : Déacétylation de la chitine en chitosan.	24
Figure 10 : Structure chimique de l'astaxanthine.....	26
Figure 11: Structure du glucosamine	30
Figure 12 : Schéma réactionnel de la libération de proton H ⁺ lors de l'hydrolyse enzymatique à pH>6,5.	62
Figure 13 : Hydrolyses enzymatiques de co-produits de crevette d'élevage.	59
Figure 14 : Les différentes parties de la crevette.	60
Figure 15 : Têtes de crevette sauvage.	60
Figure 16 : Têtes de crevette d'élevage.....	60
Figure 17 : Hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage.....	66
Figure 18 : Extraction des lipides par la méthode de Folch.	71
Figure 19 : Réaction de méthylation des acides gras.	72
Figure 20 : Distribution des protéines, lipides et cendres dans les têtes de crevette d'élevage et sauvage en pourcentage du poids sec.	76
Figure 21 : Cinétiques d'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage avec différentes enzymes.	81
Figure 22 : Solubilisation de la matière lors des hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage et sans hydrolyse enzymatique (matière brute).	82
Figure 23 : Distribution des protéines dans les 2 phases lors de différentes hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage.	84
Figure 24 : Chromatogrammes des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus après 22 heures d'hydrolyse enzymatique.	85
Figure 25 : Distribution des lipides dans les 2 phases lors de différentes hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage.	87
Figure 26 : Teneur en phospholipides des différentes phases lors des hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage, en g/100g de poids sec.....	88
Figure 27 : Schéma du déroulement des hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage. .	90
Figure 28 : Distribution de la matière dans les fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'aquaculture.	91
Figure 29 : Distribution des protéines dans les fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage.	93
Figure 30 : Chromatogrammes des hydrolysats obtenus avec la combinaison de Novozym 37020/Protex 6L et Novozym 37020/Delvolase.....	94
Figure 31 : Chromatogrammes des hydrolysats obtenus avec la combinaison de Pepsine/Protex 6L et Pepsine/Delvolase.	94
Figure 32 : Distribution des lipides dans les fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage.	97

Figure 33 : Composition en phospholipides des fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'aquaculture, en g/100g de poids sec.	97
Figure 34 : Dérivés pepsiques de têtes de crevette d'élevage utilisés pour la formulation des rations R1, R2, R3, R4, R5, R6 et R7.....	121
Figure 35 : Dérivés pepsiques de têtes de crevette d'élevage utilisés pour la formulation des rations R8, R9 et R10.....	122
Figure 36 : Cinétique des hydrolyses de 2 heures de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, avec ajustement du pH du milieu réactionnel..	127
Figure 37 : Cinétique des hydrolyses de 2 heures de têtes de crevettes d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, sans ajustement du pH du milieu réactionnel. .	128
Figure 38 : Distribution de la matière après 2 heures d'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, en utilisant différentes conditions d'hydrolyse et différentes méthodes d'inactivation de l'enzyme.	129
Figure 39 : Distribution des protéines après 2 heures d'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, en utilisant différentes conditions d'hydrolyse et différentes méthodes d'inactivation de l'enzyme.	132
Figure 40 : Profil moléculaire des hydrolysats de têtes de crevette sauvage obtenus avec la Pepsine à différentes conditions. 1 : pH libre et inactivation de l'enzyme par le pH ; 2 : pH libre et inactivation de l'enzyme par la chaleur ; 3 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par le pH ; 4 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par la chaleur.....	133
Figure 41 : Profil moléculaire des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus avec la Pepsine à différentes conditions. 5 : pH libre et inactivation de l'enzyme par le pH ; 6 : pH libre et inactivation de l'enzyme par la chaleur ; 7 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par le pH ; 8 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par la chaleur.....	133
Figure 42 : Distribution des lipides après 2 heures d'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, en utilisant différentes conditions d'hydrolyse et différentes méthodes d'inactivation de l'enzyme.	137

	Page
LISTE DES TABLEAUX	
Tableau 1: Production mondiale de crevettes d'aquaculture par espèces en 2005.	9
Tableau 2: Capture mondiale de crevettes (en tonnes) par espèce. (Source : FAO, 2008).....	11
Tableau 3 : Répartition des espèces de crevettes capturées par secteur de pêche. (Source : Gillett, 2008).....	12
Tableau 4 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de co-produits de poissons.....	19
Tableau 5 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de co-produits de crevette et de crustacés. ..	22
Tableau 6: Les différents produits à haute valeur ajoutée issus de co-produits de crevette et leur utilisation.	23
Tableau 7 : Bioactivité de peptides isolés des co-produits de la mer.....	29
Tableau 8 : Apports recommandés de protéines, acides aminés et minéraux pour le poulet (non sexé ou mâle) au delà de 3 semaines en % du régime. (Source : Blum, 1984)40	40
Tableau 9 : Apports recommandés de protéines, acides aminés et minéraux pour le poulet (femelle) au delà de 3 semaines en % du régime. (Source : Blum, 1984).....	41
Tableau 10 : Apports recommandés en oligo-éléments chez le poulet. (Source : Blum, 1984)	41
Tableau 11 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens en hélice α , de vertébrés et d'invertébrés. (Source : Defer, 2009)	45
Tableau 12 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 1 pont disulfure. (Source : Defer, 2009)....	46
Tableau 13 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 2 ponts disulfure. (Source : Defer, 2009)..	47
Tableau 14 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 3/4 ponts disulfure. (Source : Defer, 2009)47	47
Tableau 15 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens d'invertébrés et de vertébrés riches en certains acides aminés. (Source : Defer, 2009).....	48
Tableau 16 : PAMs à structure linéaire en hélice α , isolés des poissons. (Source : Fleury <i>et al.</i> , 2008).....	50
Tableau 17 : PAMs cycliques riches en cystéine isolés des poissons: Hepsidines. (Source : Fleury <i>et al.</i> , 2008).....	51
Tableau 18: Pénaeidines isolées chez différentes espèces de crevette. (Fleury <i>et al.</i> , 2008) ...	53
Tableau 19: Post-peptides antimicrobiens isolés chez des espèces aquatiques. (Source : Fleury <i>et al.</i> , 2008).....	55
Tableau 20 : Composition des têtes de crevette d'élevage et sauvage en g/ 100 g de matières brutes.....	76
Tableau 21 : Profil en acides aminés des matières brutes, en mg/g du poids sec.	78
Tableau 22 : Profil en acides gras des matières premières, en pourcentage par rapport aux lipides totaux.....	79
Tableau 23 : Teneur en phospholipides des matières premières, en pourcentage par rapport aux lipides totaux.....	80
Tableau 24 : Composition en quelques éléments minéraux (Ca, Na, Mg, K, P) des têtes de crevette, en g/100g du poids sec.	81
Tableau 25 : Composition des différentes fractions de têtes de crevettes d'élevage après 22h de protéolyse avec des enzymes commerciales, en g/100g de poids sec.....	83
Tableau 26 : Distribution (en %) des poids moléculaires des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus après 22 heures d'hydrolyse enzymatique.	85

Tableau 27 : Profil en acides aminés de la matière brute et des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus après 22 heures d'hydrolyse enzymatique, en mg/g de poids sec.	86
Tableau 28 : Profil en acides gras des différentes phases lors d'hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage.	89
Tableau 29 : Rendement des hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage à base de poids sec.	91
Tableau 30 : Composition des différentes fractions de têtes de crevette d'élevage issues d'hydrolyses croisées, en g/100g de poids sec.	92
Tableau 31 : Distribution (en %) des poids moléculaires des hydrolysats de têtes de crevette obtenus lors d'hydrolyses croisées.	95
Tableau 32 : Profil en acides aminés des hydrolysats de têtes de crevette obtenus lors d'hydrolyses croisées, en mg/g du poids sec.	96
Tableau 33 : Composition des co-produits de crevette en poids sec.	98
Tableau 34 : Composition des matières premières utilisées dans la ration des poulets, en g/100g de matière brute. (Source : Blum, 1984)	120
Tableau 35: Composition des compléments minéraux et vitaminiques BETAVIT.	121
Tableau 36 : Nombre de poulets par lot de ration expérimentale.	122
Tableau 37 : Microorganismes alimentaires testés pour l'activité antimicrobienne d'hydrolysats de têtes de crevette.	124
Tableau 38 : Microorganismes pathogènes aquacoles testés pour l'activité antimicrobienne des hydrolysats de tête de crevette.	124
Tableau 39 : Composition des différentes fractions obtenues lors des hydrolyses pepsiques de têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage, en g /100g de poids sec.	130
Tableau 40 : Distribution (en %) des protéines des surnageants issus des hydrolyses de têtes de crevette sauvage et de têtes de crevette d'élevage, selon leur poids moléculaire.	134
Tableau 41 : Profil en acides aminés des hydrolysats de têtes de crevette obtenus lors d'hydrolyses de 2 heures avec la Pepsine, en mg/g du poids sec.	136
Tableau 42 : Rendement des différentes hydrolyses pepsiques de têtes de crevette d'élevage menées pour la production de différentes fractions lyophilisées.	138
Tableau 43 : Composition des rations expérimentales à densité constante de protéines, quantités en g/kg de farine.	139
Tableau 44 : Composition des rations expérimentales lors d'incorporation d'une quantité constante de dérivés de têtes de crevette, en g/kg de farine.	140
Tableau 45 : Performances zootechniques des poulets nourris avec des rations enrichies en dérivés de têtes de crevette d'élevage, à densité protéique constante.	141
Tableau 46 : Performances zootechniques des poulets nourris avec différentes rations enrichies en dérivés de têtes de crevette avec un taux d'incorporation identique.	141
Tableau 47 : Hydrolysats de têtes de crevette testés sur les microorganismes alimentaires.	142
Tableau 48 : Activités antimicrobiennes détectées dans les hydrolysats de têtes de crevette.	142

LISTE DES ABREVIATIONS

AAE	Acides Aminés Essentiels
AANE	Acides Aminés Non Essentiels
CAJ	Consommation Alimentaire Journalière
CMV	Compléments Minéraux et Vitaminiques
cv	Chevaux
Da	Dalton
DH	Degré d'Hydrolyse
DNFB	DiNitroFluoroBenzène
E/S	Ration Enzyme/Substrat
FAO	Food and Agriculture Organization
GMQ	Gain Moyen Quotidien
IC	Indice de Consommation
kDa	KiloDalton
OPA	O-PhthaldiAldehyde
PER	Protein Efficiency Ratio (Coefficient d'Efficacité protéique)
TNBS	Acide TriNitroBenzène Sulfonique

INTRODUCTION GENERALE

1. CONTEXTE DE L'ETUDE

Avec une production totale de 6 millions de tonnes en 2006, la crevette constitue le produit le plus valorisé sur le marché mondial des produits de la mer, pêche et aquaculture confondues (FAO, 2009). Destinée en sa totalité à l'alimentation humaine, la partie comestible représente près de 60% du poids de la crevette entière. Une grande partie de la production fait alors l'objet d'une transformation industrielle telle que l'étêtage et le décorticage. Cette transformation génère des co-produits (têtes, carapaces et queues) dont le devenir pose des problèmes aux industriels. La majeure partie est rejetée, soit directement dans l'environnement, ce qui présente des risques pour la pollution et la santé ; soit par incinération sans récupération de chaleur (Archer, 2007). A Madagascar, les co-produits suivent 4 voies principales : le rejet direct, l'incinération, l'utilisation en agriculture comme engrais après compostage et l'utilisation en alimentation animale après séchage et éventuellement broyage. De plus, l'élimination des co-produits compte pour une partie non négligeable du coût de revient des entreprises.

Cependant, ces déchets renferment plusieurs substances méritant d'être valorisées : On peut citer entre autres protéines, lipides, chitine, astaxanthine et éléments minéraux... (Heu *et al.*, 2003). La valorisation des co-produits permettrait, en plus du respect de l'environnement, de maximiser le profit des entreprises. Elle consiste à les transformer de façon à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la production d'autres produits. Compte tenu de la nature des substances qu'ils renferment, ils peuvent être utilisés pour la nutrition humaine et animale, la nutraceutique et la pharmaceutique, la cosmétique...

Par la présence de protéines dans les co-produits de crevette, ces derniers représentent une potentielle source d'acides aminés essentiels nécessaires pour le bon déroulement de l'organisme vivant, et de peptides à activités biologiques. Leur valorisation constitue une voie intéressante pour l'amélioration de la nutrition, directement par leur utilisation en alimentation humaine, ou indirectement par l'alimentation animale.

Effectivement, la malnutrition constitue un problème de taille dans le monde. Elle est caractérisée, entre autres, par la malnutrition protéino-énergétique dans les pays en développement, où les protéines d'origine animale font défaut dans l'alimentation. Dans ces pays, l'aviculture traditionnelle constitue une activité domestique largement pratiquée. Dans cette pratique, les poulets sont élevés en liberté et puisent leur nourriture dans les milieux environnants, avec une supplémentation généralement pauvre en protéines. Une amélioration

de l'alimentation en aviculture traditionnelle pourrait améliorer la production avicole dans ce secteur, augmentant ainsi la quantité de protéines disponible pour les familles rurales.

D'autre part, les co-produits de crevette peuvent engendrer des substances antimicrobiennes qui sont attrayantes, entre autres, pour la conservation des aliments, et pour l'amélioration de l'aquaculture en prévenant les maladies infectieuses.

Actuellement, une petite partie des co-produits de crevette est transformée. Ces transformations consistent principalement à la conversion en farine pour l'alimentation animale et à l'extraction de la chitine. Cependant, une étude a montré que la qualité des protéines de ces co-produits est inférieure à celle de la farine de poisson utilisée en alimentation animale (Fanimmo *et al.*, 2000). Pour l'extraction de la chitine, la méthode utilisée requiert l'utilisation d'acide et de base pour solubiliser les protéines et le carbonate de sodium, ce qui conduit à la génération d'effluents de nature polluante, et à l'impossibilité de récupérer les autres substances susceptibles d'être valorisées, notamment les protéines qui sont présentes en quantité non négligeable dans ces co-produits. Les recherches sont alors orientées vers des techniques plus douces permettant l'extraction de plusieurs types de substances en même temps, ou du moins respectant ou améliorant la nature des autres substances présentes dans les co-produits.

Parmi les récents procédés, la protéolyse contrôlée par l'addition d'enzymes exogènes présente des avantages dans la récupération des protéines et l'amélioration de leurs fonctions, tout en offrant la possibilité d'extraction des autres substances telles que la chitine et l'astaxanthine (Babu *et al.*, 2008; Lee, 1999). En vue de promouvoir la nutrition, le laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et à la Nutrition (LABASAN) s'intéresse à la valorisation de différentes ressources alimentaires disponibles à Madagascar. C'est dans ce cadre que s'insère notre étude intitulée : « Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette: Utilisation de la protéolyse enzymatique pour des applications avicoles à Madagascar. ».

2. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de cette étude est de valoriser les co-produits de crevette de Madagascar par protéolyse enzymatique. Ce travail s'organisera en 3 chapitres :

Le premier chapitre fait l'état de la revue bibliographique concernant la situation mondiale de la pêche crevettière et de la crevetticulture dans le monde. Une attention particulière sera portée sur les crevettes pénéides et l'exploitation crevettière à Madagascar.

Nous présenterons ensuite les différentes voies de valorisation des co-produits de crevette et de poisson. Enfin, l'aviculture et l'activité antimicrobienne seront également abordées dans ce chapitre, étant les domaines d'application qui vont être étudiées lors de ce travail.

Le deuxième chapitre présente les expériences effectuées sur des hydrolyses enzymatiques de longue durée de têtes de crevette, afin d'étudier leur comportement vis à vis de différentes enzymes commerciales. Dans un premier temps, la composition des têtes de crevette sauvage et d'élevage est déterminée. Les hydrolyses enzymatiques sont effectuées seulement sur les têtes de crevette d'élevage, admettant que le comportement des enzymes est identique pour les 2 catégories de têtes de crevette. Sachant que les conditions de pH extrême sont favorables pour l'extraction de substances contenues dans les tissus durs comme l'exosquelette de crevette, quatre enzymes commerciales fonctionnant à pH extrême sont choisies pour cette étude. La Pepsine et la Novozym 37020 sont ainsi optées pour leur activité à pH acide ; la Protex 6L et la Delvolase sont utilisées en raison de leur fonctionnalité en milieu basique. Plusieurs paramètres seront étudiés : la cinétique de l'hydrolyse, la solubilité des protéines, la composition des fractions issues de l'hydrolyse,... Ces expériences permettront de choisir l'enzyme qui convient le mieux pour valoriser les têtes de crevette.

Le troisième chapitre consiste à l'optimisation de l'hydrolyse de têtes de crevette sauvage et de crevette d'élevage avec la Pepsine, et à la recherche de la valorisation des fractions obtenues. L'étude de la conduite de l'hydrolyse sera principalement mise en exergue. Pour valoriser au maximum les têtes de crevette, la possibilité d'extraction de la chitine dans la phase insoluble sera analysée dans ce chapitre ainsi que l'application sur l'amélioration de l'aviculture traditionnelle malgache par incorporation des fractions d'hydrolysats de têtes de crevette d'élevage comme source de protéines dans différentes rations de poulets. Enfin, l'identification d'activités antimicrobiennes de différentes fractions obtenues lors des hydrolyses sera réalisée. Les tests seront effectués d'une part sur des microorganismes pathogènes aquacoles et d'autre part sur des microorganismes alimentaires.

CHAPITRE 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES CREVETTES DANS LE MONDE

1.1. Production

La production de crevettes représente 6 millions de tonnes en 2006, soit environ 5% des 110 millions de tonnes de production mondiale de poissons (FAO, 2009). La crevette ne figure pas parmi les dix catégories de poisson les plus engendrées. Cependant, c'est le produit marin le plus valorisé sur le marché mondial avec une contribution de 16% en valeur. La Chine est le premier producteur de crevettes dans le monde en assurant 41,6% de la production totale, suivie de loin par l'Indonésie et l'Inde avec 8,6% et 8,3%. La Chine est également le premier exportateur, suivie par le Viêt-Nam et la Thaïlande (Gillett, 2008).

Le volume de la capture mondiale de crevettes est passé d'environ 2 millions de tonnes en 1990 à près de 3,6 millions de tonnes en 2006. La production issue de l'aquaculture de crevettes ne cesse également de se développer : elle représente 40% de la production totale en 2004 (Figure 1).

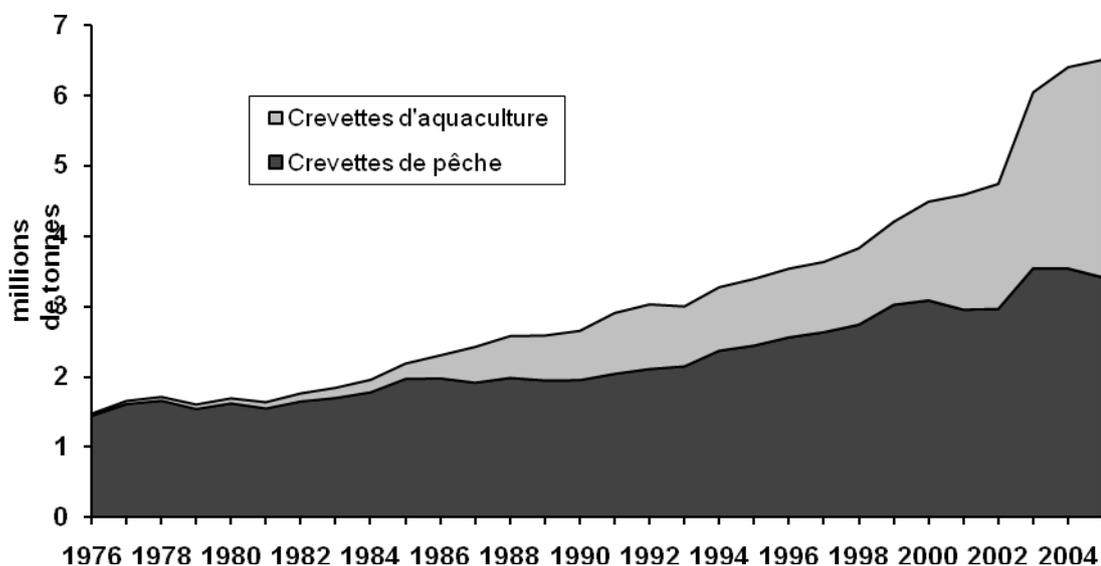


Figure 1: Production mondiale de crevettes depuis l'année 1976.

La contribution malgache à la production crevette mondiale est modeste, mais de haute qualité. Elle est estimée à 13 000 tonnes en 2006 dont 51% représentés par les crevettes d'aquaculture. La crevette a une place importante dans l'économie malgache : elle constitue 73% de l'exportation des produits halieutiques en volume, qui correspond à 85% en valeur. Par ailleurs, la production crevette a fourni 8 795 emplois en 2006, dont 5 670 en aquaculture (Mission Economique de Tananarive, 2008). Il existe différents sites d'aquaculture principalement situés dans la zone Ouest du pays. On peut citer 7 fermes industrielles opérationnelles actuellement : l'Aquaculture de Mahajamba (AQUALAMA I) et l'Aquaculture de Crevettes de Besalampy (ACB ou AQUALMA II) dont UNIMA Madagascar constitue le principal actionnaire, l'Aquaculture de Menabe (AQUAMEN), la Société Malgache d'Aquaculture (SOMAQUA), l'Aquaculture des Mascareignes (AQUAMAS), l'Aquaculture Biologique (AQUABIO) et Les Gambas d'Ankarana (LGA) dont l'OSO Madagascar est le principal actionnaire.

1.2. Les différentes espèces de crevette

Les crevettes appartiennent à la super-classe des crustacés, ordre des décapodes. Les décapodes contiennent toutes les espèces comestibles de crustacés (crevettes, homards, langoustes, langoustines, crabes...) (Rafalimanana, 2003). Le terme de crevette/camaron rassemble différents groupes :

- Les crevettes Caridea qui incluent les crevettes grises (*Crangon crangon*) et les crevettes nordiques (*Pandalus borealis*).
- Les Palaemonidae qui sont soit d'eau de mer comme les crevettes roses (*Palaemon serratus*), soit d'eau douce comme les camarons d'eau douce (*Macrobrachium rosenbergii*).
- Les crevettes pénéides

Il existe plus de 1500 espèces de crevettes répandues dans les mers tempérées et tropicales. Environ 300 espèces présentent un intérêt économique et environ 100 espèces sont retrouvées dans le secteur de la pêche. En 2006, 83% de la capture de crevettes sont représentés par seulement 6 espèces (Gillett, 2008).

1.3. Les crevettes pénéides

Ce groupe de crevettes réunit de nombreuses espèces marines des régions tropicales et subtropicales. Il englobe 2 super-familles : Penaeoidea et Sergestoidea.

Les crevettes péneïdes côtières appartiennent à la famille des Penaeidae. Elles sont classées de la manière suivante :

Embranchement : Arthropoda

Super-classe : Crustacea (Pennant, 1777)

Classe : Malacostraca (Latreille, 1806)

Ordre : Decapoda (Latreille, 1803)

Sous-ordre : Dendrobranchiata (Bate, 1888)

Super-Famille : Penaeoidea (Rafinesque-Schmaltz, 1815)

Famille : Penaeidae (Rafinesque-Schmaltz, 1815)

Les crevettes péneïdes côtières réunissent environ 40 espèces réparties dans 10 genres. Le genre *Penaeus* (Fabricius, 1798) a une grande importance économique et engendre les espèces utilisées en aquaculture. La Figure 2 et la Figure 3 représentent des photographies de l'espèce *Penaeus monodon* élevée dans la côte Ouest de Madagascar.



Figure 2 : *Penaeus monodon* (vue dorsale)



Figure 3 : *Penaeus monodon* (vue latérale)

Les crevettes pénéides sont omnivores. Le mâle et la femelle sont représentés par 2 individus différents. Les femelles sont de plus grande taille que les mâles. Leur cycle de vie est résumé dans la Figure 4 : Les œufs éclosent au bout de 22 heures et se développent en passant par le nauplius, le protozoé et le mysis qui se nourrissent d'algues et de zooplancton. Les post-larves migrent ensuite dans les estuaires ou pénètrent dans la côte pour se développer en juvéniles. A ce stade, les crevettes quittent le milieu estuarien pour rejoindre la zone intertidale. Elles sont appelées subadultes lorsque les organes sexuels extérieurs sont formés. Lorsqu'elles atteignent environ 10 cm, les crevettes retournent en mer. Elles se reproduisent dans un habitat marin et les femelles pondent de 50 000 à 1 million d'œufs (Gillett, 2008; Rafalimanana, 2003).

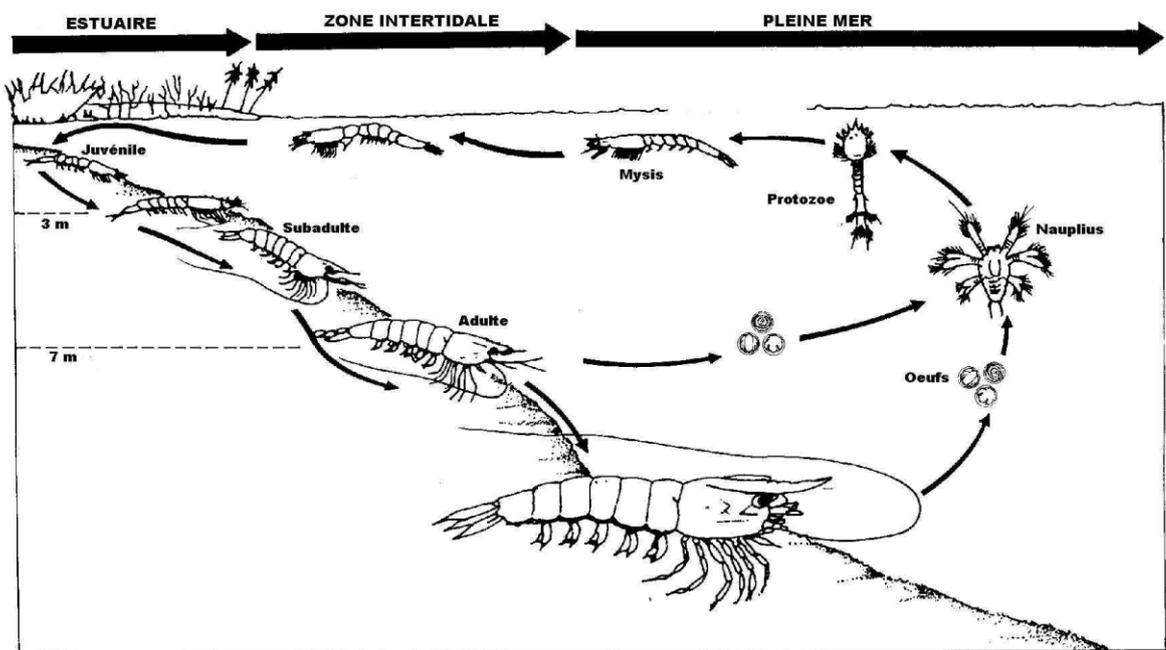


Figure 4: Cycle biologique des crevettes pénéides (Source : Rafalimanana, 2003)

Les crevettes pénéides tropicales ont une croissance rapide. Leur cycle de vie est environ 18 à 24 mois et leur maturité sexuelle est atteinte à partir de 6 à 12 mois. La survie des larves est affectée par la température, la pluviosité et les tempêtes tandis que les jeunes crevettes sont sensibles à la salinité (Gillett, 2008). Cependant, les crevettes pénéides possèdent une grande adaptabilité à des conditions de milieu très diverses. Ils sont alors aptes à l'élevage et engendrent les espèces utilisées en aquaculture.

1.3.1. Les crevettes d'aquaculture

Seulement quelques espèces de *Penaeus* se prêtent à l'élevage. Les autres espèces ne sont pas élevées à cause de leur petite taille, de leur arrêt de croissance lorsque la population est trop dense, ou de leur sensibilité élevée aux maladies telles que les maladies de la tête jaune, tâches blanches, le syndrome de Taura ou la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse qui sont les plus courantes chez les crevettes ([www.mer.gov.pf/5117-Les différentes espèces-html](http://www.mer.gov.pf/5117-Les_différentes_espèces-html)).

Penaeus vannamei ou crevette à pattes blanches est originaire des côtes Pacifique et représente 95% de la production de crevette en Amérique latine. *Penaeus monodon* ou crevette géante tigrée se trouve à l'état sauvage dans l'océan Indien et dans le Pacifique, elle est élevée en Asie et à Madagascar. Ces 2 espèces sont les plus élevées dans le monde en représentant 87% de la production aquacole de crevettes (Tableau 1). Elles peuvent atteindre respectivement 23cm et 36cm de longueur au stade adulte.

Parmi les autres espèces élevées, on peut citer:

- *Penaeus stylirostris* ou crevette bleue qui était une espèce d'élevage très populaire dans le continent américain jusqu'à la fin des années 1980 où la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (IHHN) décima presque toute la population ([www.mer.gov.pf/5117-Les différentes espèces-html](http://www.mer.gov.pf/5117-Les_différentes_espèces-html)). Après la découverte d'espèces résistantes au virus et à la maladie de Taura, l'élevage de *Penaeus stylirostris* a pu reprendre de nouveau à partir de 1997.
- *Penaeus chinensis* ou crevette charnue est une espèce qui tolère les eaux relativement froides (16°C). Elles se trouvent le long des côtes de la Chine et la côte occidentale de Corée, et sont élevées dans ces régions.
- *Penaeus japonicus* (crevette impériale) sont produites principalement au Japon, Taïwan et en Australie.
- *Penaeus indicus* ou crevette blanche des Indes est originaire des côtes de l'océan Indien et est couramment élevée en Inde, Iran, Moyen-Orient et le long des côtes africaines.
- *Penaeus merguensis* est une espèce qui supporte l'élevage à haute densité. Elle est élevée dans les eaux littorales de l'océan Indien, depuis Oman jusqu'à l'Indonésie et l'Australie.

Quelques autres espèces de *Penaeus*, comme par exemple *Metapenaeus spp*, jouent un rôle secondaire dans l'élevage de crevettes.

Tableau 1: Production mondiale de crevettes d'aquaculture par espèces en 2005.

Espèces	Production (tonnes)
<i>Penaeus vannamei</i>	1 594 039
<i>Penaeus monodon</i>	710 806
<i>Penaeus spp.</i>	125 025
<i>Penaeus merguensis</i>	81 105
<i>Penaeus chinensis</i>	51 300
<i>Penaeus japonicus</i>	43 181
<i>Penaeus indicus</i>	31 875
<i>Metapenaeus spp.</i>	14 600
<i>Penaeus stylirostris</i>	3 170
Total	2 655 101

(Source : FAO, 2008)

L'aquaculture de crevettes se réalise en 3 étapes :

L'écloserie comprend le stade de reproduction de crevettes, de la pondaison jusqu'à leur développement en nauplius ou en post-larves. La production de nauplius dure 2 jours et celle de post-larves 12 jours. A Madagascar, les grands éleveurs possèdent leur propre écloserie et procurent des nauplius ou des post-larves à des élevages plus petits de leur région.



Figure 5: Bassins d'écloserie de crevette.

La nurserie est la partie des élevages de crevettes où les post-larves se développent en juvéniles. C'est durant cette étape que les animaux sont accoutumés aux conditions et à la salinité des étangs de grossissement. La nurserie dure 4 à 6 semaines.

Dans les bassins de *grossissement*, les crevettes sont conduites du stade juvénile jusqu'à la taille commerciale, ce qui demande 3 à 6 mois. Pour permettre un développement optimal des crevettes, les conditions de température, de pH, de salinité, d'oxygénation dans

les bassins sont contrôlés. La densité moyenne des crevettes en élevage semi-intensif est de 5 à 8 individus par m².



Figure 6 : Bassins de grossissement de crevette à Madagascar.

La plupart des élevages produisent 1 ou 2 récoltes par an ; en climat tropical, une ferme peut même atteindre 3 récoltes annuelles.

La production de crustacés provenant de l'aquaculture représente 42% de la production aquacole mondiale, dont 70% constitués par les crevettes.

1.3.2. Les crevettes de pêche

L'exploitation des crevettes péniédes côtières est une activité très ancienne. La pêche aux crevettes a été pratiquée traditionnellement dans nombreux pays (Mexique, Sénégal, Côte d'Ivoire, Bénin, Madagascar, Inde,...). C'est à partir des années cinquante que l'exploitation de la pêche industrielle s'est accrue et elle se développe rapidement en Amérique latine, en Afrique, dans l'océan Indien et en Océanie.

Le Tableau 2 montre la répartition de la capture mondiale des crevettes par espèces depuis 1965 jusqu'en 2005. D'après ce tableau, les crevettes péniédes représentent en moyenne 40% du total des prises. Les crevettes nordiques (Pandalidae) prennent également une part importante (13%).

Tableau 2: Capture mondiale de crevettes (en tonnes) par espèce. (Source : FAO, 2008)

Nom scientifique	1965	1975	1985	1995	2005
<i>Acetes japonicus</i>	104 000	13 524	222 608	406 495	664 716
Aristeidae				2 551	3 174
<i>Crangon crangon</i>	52 200	35 902	27 328	30 761	44 852
<i>Heterocarpus reedii</i>	5 900	7 934	2 949	10 620	3 880
<i>Metapenaeus spp.</i>	10 927	30 410	36 690	51 536	63 211
<i>Natantia</i>	239 028	524 096	629 327	542 552	887 688
<i>Nematopalaemon hastatus</i>					11700
<i>Pandalus borealis</i>	25 503	63 557	235 587	275 601	376 908
<i>Pandalus spp. Pandalopsis spp.</i>	7 927	6 085	8 486	12 919	10 412
<i>Parapenaeus longirostris</i>	12 700	18 099	39 896	15 833	19 938
<i>Penaeus aztecus</i>	57 250	44 736	70 852	57 126	44 692
<i>Penaeus brasiliensis</i>	100	774	8 006	6 565	9 390
<i>Penaeus chinensis</i>		34 297	33 191	44 449	106 329
<i>Penaeus dodarum</i>	11 048	18 955	15 512	11 121	7 720
<i>Penaeus kerathurus</i>	1 000	3 505	2 879	4 880	6 655
<i>Penaeus merguensis</i>	22 400	39 269	39 023	71 150	83 392
<i>Penaeus monodon</i>	9 981	12 940	12 195	207 097	218 027
<i>Penaeus notialis</i>	1 900	6 744	6 896	21 484	14 648
<i>Penaeus setiferus</i>	32 141	26 802	44 573	39 959	50 253
<i>Penaeus spp.</i>	194 009	261 450	277 565	296 483	230 297
<i>Pleoticus muelleri</i>	300	190	9 835	6 705	7 510
Sergestidae		26 229	52 602	60 377	23 259
<i>Trachypenaeus curvirostris</i>		5 278	93 028	154 623	429 605
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	8 000	13 093	17 900	18 802	52 411
<i>Xiphopenaeus, Trachupenaeus spp.</i>	9 113	63 564	15 222	15 130	12 125
Autres	24 395	54 111	71 933	83 023	33 741
Total	829 822	1 311 544	1 974 083	2 447 842	3 416 533

1.4. Les crevettes à Madagascar

Les espèces de crevettes rencontrées sur les côtes de Madagascar appartiennent au groupe des crevettes pénéides. Une dizaine d'espèces est recensée, mais seulement 5 présentent des intérêts économiques. On distingue *Penaeus monodon* Fabricius, 1798 ; *Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844 ; *Penaeus indicus* H. Milne Edwards, 1837, *Penaeus japonicus* Bate, 1888 et *Metapenaeus monoceros* Fabricius, 1798 (Rafalimanana, 2003).

L'exploitation crevettière malgache est caractérisée par la pêche crevettière et l'aquaculture.

1.4.1. La pêche crevettière

Le potentiel de la ressource crevettière à Madagascar est estimé à 8 700 tonnes par an, dont 8 200 tonnes sur les côtes ouest (Gillett, 2008). C'est donc sur la côte Ouest de l'île que la majorité des prises est effectuée (Figure 7).

On distingue 2 catégories de pêche : la pêche en eau profonde et la pêche continentale. La production de crevettes issues de la pêche en eau profonde a varié de 100 à 150 tonnes par an. Depuis l'année 2005, cette activité a cessé pour cause d'usures des matériels et de diminution des ressources en eau profonde. Par contre, les pêches côtières sont beaucoup plus développées. Elles sont caractérisées par 3 types d'activité : la pêche industrielle, la pêche artisanale et la pêche traditionnelle (Gillett, 2008).

1.4.1.1. La pêche industrielle

La pêche industrielle de crevette a commencé à Madagascar depuis l'année 1967 sur la côte nord-ouest et dans la région de Morondava (Figure 7). Actuellement, elle est réalisée avec 9 armements et 53 navires (Mission Economique de Tananarive, 2008). La pêche industrielle est pratiquée à partir de 7 m à 25 m de profondeur et les espèces capturées sont constituées en majorité de *Penaeus indicus* (67%) et *Metapenaeus monoceros* (24%). La crevette géante tigrée (*Penaeus. monodon*) ne se retrouve pas dans les captures industrielles (Tableau 3).

1.4.1.2. La pêche artisanale

La pêche artisanale est caractérisée par l'emploi de petites embarcations motorisées de 10 m de longueur, ayant une puissance motrice n'excédant pas 50 cv. On compte 16 embarcations tout le long de la côte Ouest. La capture artisanale englobe 5 espèces, à forte dominance de *Penaeus indicus* (97%) (Tableau 3).

Tableau 3 : Répartition des espèces de crevettes capturées par secteur de pêche. (Source : Gillett, 2008)

Secteur de pêche crevettière	<i>P. indicus</i> (%)	<i>M. monoceros</i> (%)	<i>P. monodon</i> (%)	Autres (%)
Industriel	67	24	-	9
Artisanal	97	1	1,7	0,3
Traditionnel	99	-	1	-

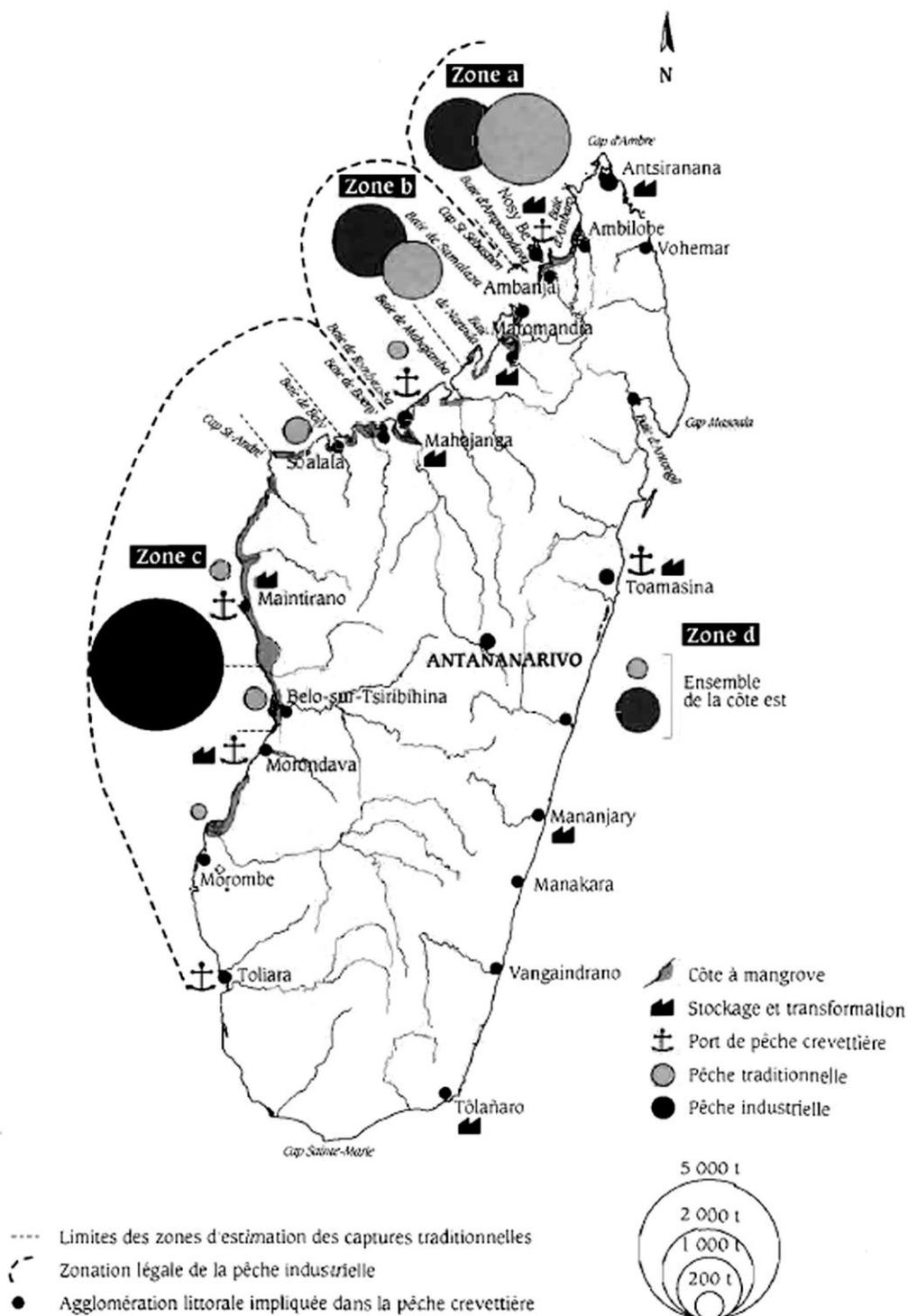


Figure 7: Exploitation crevettière à Madagascar (Source : Chaboud, 2002)

1.4.1.3. La pêche traditionnelle

La pêche traditionnelle est celle pratiquée par des pêcheurs, individuellement ou en association, à pied ou utilisant différents types d'embarcations non motorisées. Les techniques de capture sont variées, avec des filets divers, à la palangrotte, aux casiers, aux tuelles moustiquaires, au harpon ou même à main nue. Plus de 30 000 pêcheurs répartis sur la côte ouest et la côte est participent à cette activité (Mission Economique de Tananarive, 2008).

Les captures traditionnelles de crevettes sont destinées en totalité pour la consommation locale. Elles sont constituées principalement de *Penaeus indicus* (99%), et *Penaeus monodon* représente le reste des captures (Tableau 3).

1.4.2. L'aquaculture

Madagascar possède un potentiel intéressant pour l'élevage de crevettes avec un espace disponible de 11 938 hectares. En 2003, seulement 4 982 hectares, soit 41,7% sont exploités (Gillett, 2008). L'aquaculture de crevette s'est développée depuis 1992 et on distingue 7 fermes aquacoles industrielles implantées dans les zones ouest et nord-ouest, créant 5 670 emplois à temps plein en 2006. L'aquaculture est effectuée essentiellement avec *Penaeus monodon*. Les crevettes issues de l'aquaculture malgache sont dotées des certifications ISO, Label rouge ou label Biologique (Mission Economique de Tananarive, 2008).

4.1.3. Transformation et commercialisation des crevettes

Depuis l'année 2004, la production de crevettes a baissé considérablement à Madagascar. De 2004 à 2006, elle a chuté de 19%. Cette baisse est due à la diminution de la ressource crevetteuse causée par les mauvaises pratiques de la pêche traditionnelle : non respect du repos et utilisation de matériels censurés (filets de moustiquaire) (Mission Economique de Tananarive, 2008), conduisant à la disparition de plus en plus des réserves estuariennes. Depuis 2005, l'aquaculture connaît également une crise majeure. En raison de la baisse de la productivité, de problèmes pathologiques, une augmentation des charges liée à la hausse du prix du carburant et des matières premières alimentaires, et la concurrence sur le marché face aux crevettes d'élevage asiatiques, l'aquaculture est globalement déficitaire (Mission Economique de Tananarive, 2008).

Les 6 600 tonnes en 2006 de la production aquacole de crevettes sont destinées en totalité à l'exportation. Pour les captures, l'exportation absorbe environ 98% de la production (Mission Economique de Tananarive, 2008). Les crevettes sont exportées sous forme de

crevettes entières, crevettes étêtées et crevettes décortiquées. Celles issues de la pêche artisanale et de la pêche traditionnelle sont pour la grande majorité étêtées et décortiquées. Par contre, l'exportation industrielle est constituée par 66% de crevettes entières et 29% de crevettes étêtées (Gillett, 2008).

L'Union Européenne est le premier importateur des crevettes de Madagascar, avec une grande part de crevettes entières. Les produits étêtés sont destinés pour le Japon (12% de l'exportation). Une petite part de la production est importée par les îles voisines (La Réunion et l'île Maurice) et par quelques autres pays asiatiques. Depuis janvier 2007, Madagascar est certifiée pour l'exportation de crevettes sauvages aux Etats-Unis (Gillett, 2008).

2. LES CO-PRODUITS DE CREVETTE ET DE POISSON

2.1. Définition

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Ils sont issus de la transformation des poissons pour la consommation humaine et sont constitués des têtes, des viscères, de la chute de parage (filetage), de la peau, de l'écaille, des arêtes et des queues de poissons. Pour les crevettes, ils engendrent les têtes, la carapace et la queue. Les co-produits marins constituent 30 à 60% des produits entiers et leur valorisation a attiré depuis plusieurs années l'attention des industriels pour un souci de rentabilité économique et de développement durable. En effet, ces matières renferment de nombreuses molécules valorisables notamment des protéines (Ibrahim *et al.*, 1999 ; Heu *et al.*, 2003), lipides (Dumay *et al.*, 2006 ; Dumay, 2006), minéraux, vitamines (Heu *et al.*, 2003), ainsi que d'autres composés bioactifs (Kim *et al.*, 2008), bénéfiques à la santé humaine et animale. La Figure 8 présente les principales voies de valorisation des co-produits de la mer.

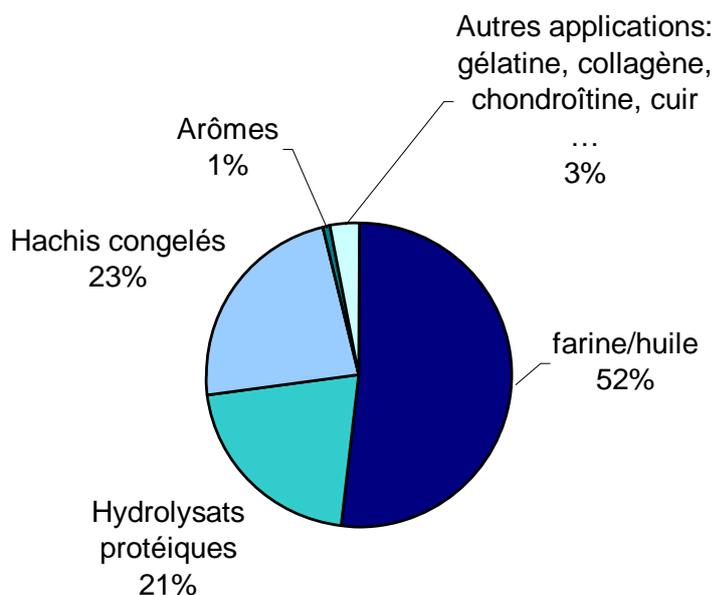


Figure 8 : Proportion des différentes voies de valorisation des co-produits d'origine marine. (Andrieux, 2004)

2.2. Différentes voies de valorisation des co-produits

La valorisation des co-produits conduit à des produits dérivés qui sont utilisés comme matière première ou ingrédient dans d'autres domaines tels que l'agriculture, l'alimentation humaine et animale, la nutraceutique et pharmaceutique, la cosmétique, le médical... A partir d'un même type de co-produit, il est possible d'obtenir différents produits dérivés : farine, huile, hydrolysats... (Dumay, 2006).

2.2.1. Farine et huile

En 2006, la production mondiale est estimée à 6 millions de tonnes pour la farine et 896 000 tonnes pour l'huile de poissons. Ces produits sont utilisés pour la plus grande part à l'alimentation animale. Une proportion de 56% de la production de farine et 87% d'huile est destinée à l'aquaculture (FAO, 2009).

D'une manière générale, les farines et les huiles de poissons sont préparées à partir d'espèces de peu de valeur (anchois, sardine, hareng,...), mais en raison de la diminution de

quantités disponibles de telles espèces, les entreprises se tournent vers d'autres sources de matières premières telles que les co-produits (Johnson, 2002). Toutes les parties peuvent être utilisées sans distinction. Des études ont montré que les farines issues de co-produits de poisson sont aussi efficaces que celles issues de poissons entiers pour l'élevage de crevettes (Sudaryono *et al.*, 1996) de morue (Tibbets *et al.*, 2006) et de tambour rouge (Li *et al.*, 2004). Le large panel de composition de farine de poissons offert par la diversité des espèces permet aussi d'établir différents mélanges pour optimiser la croissance des animaux. La substitution de farine de co-produits de thon avec de la farine de crabe dans l'alimentation de crevette *Litopenaeus vannamei* a été étudiée par exemple (Goytortua-Bores *et al.*, 2006).

La production industrielle de farine à partir de co-produits de crevette requiert un traitement thermique pour éliminer l'eau et les matières grasses, suivi de broyage (Archer et Russell, 2007).

Du fait de leur contenance en pigments caroténoïdes, la farine de co-produits de crevette présente un intérêt particulier dans l'élevage de Salmonidés (saumon et truite) pour la coloration de la chair (Archer et Russell, 2007; Johnson, 2002). Une étude a été effectuée également sur l'utilisation de farine de têtes de crevettes dans l'alimentation de dorade, montrant leur bonne digestibilité (Laining *et al.*, 2003). En élevage porcin, les co-produits de crevette sont moins digestes que les co-produits de poisson (Fanimio *et al.*, 2004; Fanimio *et al.*, 2006) ; cependant, la disponibilité de la lysine est intéressante (Fanimio *et al.*, 2006). En alimentation avicole, des études montrent l'efficacité nutritionnelle des co-produits de crevette sur des poules pondeuses (Gernat, 2001) et des poussins (Rosenfeld *et al.*, 1997). Cependant, certains auteurs ne recommandent pas l'utilisation de la farine de co-produits de crevette en alimentation avicole (Oduguwa *et al.*, 2004). Dans tous les cas, la qualité des protéines de farine de co-produits de crevette est inférieure à celle de poisson, mais un enrichissement en méthionine et en lysine améliore cette qualité (Fanimio *et al.*, 2000).

2.2.2. Hydrolysats

Les hydrolysats sont l'aboutissement de la digestion partielle des protéines par hydrolyse protéolytique. Ils ont alors généralement une bonne digestibilité et une haute qualité nutritive. Les hydrolysats sont produits sous l'action des enzymes endogènes des poissons ou des co-produits (autolysats), ou par addition d'enzymes exogènes (hétérolysats) (Dumay, 2006).

2.2.2.1. Poissons

La production d'autolysats de poissons ou de co-produits de poisson fait participer les enzymes initialement existantes dans les matières premières, notamment les enzymes dans les viscères et les enzymes musculaires. Les autolysats sont produits par fermentation qui est une technique utilisée depuis des siècles pour la conservation des poissons. Elle est réalisée en ajoutant du sucre ou du sel pour prévenir la prolifération microbienne. Les autolysats sont généralement liquides, riches en acides aminés libres et en petits peptides (APRIA, 1979). Ils sont utilisés aussi bien en alimentation humaine qu'animale (Lian *et al.*, 2005).

En alimentation humaine, les sauces de poisson très courantes dans les pays asiatiques sont des autolysats de poissons. Elles sont obtenues par fermentation très salée qui peut conduire à la production d'histamine bien connue pour être néfaste pour la santé (Tsai *et al.*, 2006). Il est alors nécessaire de contrôler les autolyses par la température, le pH... L'utilisation des co-produits dans ce domaine se développe de plus en plus (Archer et Russel, 2007). En alimentation animale, la pâte de poissons fermentée est très nutritive et employée en général comme complément protéique pour les volailles, les porcs et l'aquaculture (Johnson, 2002).

En ce qui concerne les hétérolysats, ils sont obtenus par addition d'enzymes de différentes origines (végétale, animale, bactérienne...) aux co-produits. Les enzymes industrielles sont obtenues par purification ou par culture de bactéries, de champignons ou de levures. L'hydrolyse enzymatique de co-produits de poisson conduit à la génération et la libération de produits qui possèdent des intérêts nutritionnels, fonctionnels ou biologiques... Le Tableau 4 présente les différentes protéases utilisées, la nature des matières premières et l'utilisation des hydrolysats.

Tableau 4 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de co-produits de poissons.

Enzyme	Substrat	Température (°C)	pH	Utilisation	Références
Origine végétale					
Papaine	Viscères de morue	37-80	5-9	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005; Aspmo <i>et al.</i> , 2005 Je <i>et al.</i> , 2007 Dumay, 2006
	Arêtes de thon			Intérêt nutritionnel	
	Têtes et viscères de sardine			Libération des lipides	
Bromélaïne	Viscères de morue	20- 65	5-8	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005; Aspmo <i>et al.</i> , 2005
Origine animale					
Pepsine	Arêtes de colin	37-45	2-4	Bioactivité	Je <i>et al.</i> , 2004 Je <i>et al.</i> , 2005 Je <i>et al.</i> , 2007 Liaset <i>et al.</i> , 2000
	Arêtes de hoki			Bioactivité	
	Arêtes de thon			Bioactivité	
	Arêtes de saumon et morue			Intérêt nutritionnel	
Trypsine	Arêtes de thon	37-50	7,5-8	Bioactivité	Je <i>et al.</i> , 2007
Chymotrypsine	Arêtes de thon	37	8	Bioactivité	Je <i>et al.</i> , 2007
Origine bactérienne et fongique					
Alcalase	Arêtes de saumon et morue	35-70	6-10,4	Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2000 Aspmo <i>et al.</i> , 2005; Aspmo <i>et al.</i> , 2005 Benjakul et Morrissey, 1997 Gbogouri <i>et al.</i> , 2004 Guérard <i>et al.</i> , 2001 Je <i>et al.</i> , 2007 Kechaou <i>et al.</i> , 2009 Picot <i>et al.</i> , 2006 Sathivel <i>et al.</i> , 2003 Dumay, 2006 Slizyte <i>et al.</i> , 2005 Dumay <i>et al.</i> , 2006 Kristinsson et Rasco, 2000 Ovissipour, 2009
	Viscères de morue			Source azotée	
	Têtes, peau, viscères, squelette de merlan			Source azotée	
	Co-produits de saumon			Intérêt nutritionnel	
	Co-produits de thon			Source azotée	
	Squelette de thon			Bioactivité	
	Viscères de seiches et sardine			Intérêt nutritionnel	
	Os, peau de poisson			Bioactivité	
	Têtes et gonades de hareng			Intérêt nutritionnel	
	Têtes et viscères de sardine			Libération des lipides	
	Viscères de morue			Libération de lipides, sources de protéines	
	Viscères de sardine			Libération des lipides	
	Chair de saumon			Intérêt nutritionnel	
	Viscères d'estragon			Intérêt nutritionnel	

Tableau 4 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de co-produits de poissons. (Suite)

Enzyme	Substrat	Température (°C)	pH	Utilisation	Références
Origine bactérienne et fongique					
Protamex	Viscères de morue	35-57	5,5-8	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005; Aspmo <i>et al.</i> , 2005
	Viscères de seiches et sardine			Intérêt nutritionnel	Kechaou <i>et al.</i> , 2009
	Squelette de saumon			Source de protéines	Liaset <i>et al.</i> , 2002
	Squelette de saumon			Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2003
	Os, peau de poissons			Bioactivité	Picot <i>et al.</i> , 2006
	Viscères de sardine			Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> , 2006
	Viscères de morue			Libération des lipides	Dauksas <i>et al.</i> , 2005
	Têtes et viscères de sardine			Libération des lipides	Dumay, 2006
	Têtes, viscères et queue de thon			Intérêt nutritionnel	Nguyen, 2009
	Arêtes de morue			Bioactivité	Slizyte <i>et al.</i> , 2009
	Flavourzyme			Squelette de colin	40- 60
Viscères de morue		Libération des lipides	Dauksas <i>et al.</i> , 2005		
Viscères de seiches et sardine		Intérêt nutritionnel	Kechaou <i>et al.</i> , 2009		
Viscères de sardine		Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> , 2006		
Co-produits de morue		Intérêt nutritionnel	Slizyte <i>et al.</i> , 2005		
Chair de saumon		Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco, 2000		
Têtes et viscères de sardine		Libération des lipides	Dumay, 2006		
Neutrase	Viscères de morue	45-55	5-8	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005; Aspmo <i>et al.</i> , 2005
	Têtes, peau, viscères, squelette de merlan			Source azotée	Benjakul et Morrissey, 1997
	Squelette de thon			Bioactivité	Je <i>et al.</i> , 2007
	Co-produits de morue			Intérêt nutritionnel	Slizyte <i>et al.</i> , 2005
	Arêtes de saumon et morue			Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2000
Savorase	Chair de colin	50	6,8	Intérêt nutritionnel	Imm et Lee, 1999
Kojizyme	Arêtes de saumon et morue	46 -55	5,5- 5,9	Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2000
Umamizyme	Estomac de thon	45-50	7-8	Source azotée	Guérard <i>et al.</i> , 2002
Lecitase	Viscères de morue	50	6,5-8,5	Intérêt nutritionnel	Slizyte <i>et al.</i> , 2005
Corolase	Chair de saumon	40-50	7,5-8	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco, 2000
Actinidine	Viscères de morue	15- 40	4-7	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005; Aspmo <i>et al.</i> , 2005

2.2.2.2. Crevettes

Pour les co-produits de crevette, les autolysats sont également aptes pour l'utilisation en alimentation humaine et animale (Bueno-Solano *et al.*, 2009). Ainsi, les sauces produites par autolyse présentent une qualité élevée avec 35% d'acides aminés de plus que les sauces de poissons commerciales (Kim *et al.*, 2003). L'autolysat de têtes de crevette, de fait de sa teneur élevée en protéines et en acides aminés libres, peut être utilisé comme additif dans les aliments pour améliorer leur valeur nutritionnelle (Cao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009). Des études ont montré également des fonctions antioxydantes d'autolysats de co-produits de crevette (Peralta *et al.*, 2008) et leur capacité à améliorer la tendreté de la viande (Kim *et al.*, 2005). En alimentation animale, la pâte de crevette fermentée est utilisée comme complément protéique pour l'alimentation animale (Johnson, 2002).

En vue de valoriser les co-produits de crevettes, l'hydrolyse par addition d'enzyme exogène a été étudiée. Les hétérolysats trouvent leur application en alimentation, nutraceutique, pharmaceutique. Les différentes enzymes utilisées ainsi que l'intérêt et l'utilisation des hétérolysats sont indiqués dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de co-produits de crevette et de crustacés.

Enzyme	Substrat	Température (°C)	pH	Utilisation	Références
Origine végétale					
Papaine	Têtes de crevette	55	6,2	Extraction de pigments	Babu <i>et al.</i> , 2008
Origine animale					
Pepsine	Têtes de crevette	37-45	2-4	Extraction de pigments	Babu <i>et al.</i> , 2008
Trypsine	Têtes de crevette	37-50	7,5-8	Extraction de pigments	Babu <i>et al.</i> , 2008
	Co-produits de crevette			Bioactivité	Sumaya-Martinez, 2004
Origine bactérienne et fongique					
Biopraxe SP	Co-produits de crevette	50	9	Bioactivité	Sumaya-Martinez, 2004
Alcalase	Têtes et carapaces de crevettes	35-70	6-10,4	Intérêt nutritionnel	Gildberg et Stenberg, 2001
	Co-produits de crevette			Intérêt nutritionnel	Guérard <i>et al.</i> , 2007
	Têtes de crevette			Bioactivité	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003
	Co-produits de crevette			Intérêt nutritionnel	Synowiecki et Al-Khateeb, 2000
	Co-produits de crevette			Bioactivité	Sumaya-Martinez, 2004
Umamizyme	Co-produits de crevette	50	8	Bioactivité	Sumaya-Martinez, 2004
Protéase de <i>Bacillus subtilis</i>	Têtes de crevette	60	8	Rétention d'eau	Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2005;
					Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006a;
					Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006b
Protéase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Têtes de crevette	60	6	Rétention d'eau	Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2005;
					Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006a;
					Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006b
Proleather FG-F	Co-produits de crevette	55	9	Bioactivité	Sumaya-Martinez, 2004
Corolase	Co-produits de crevette	50	8	Bioactivité	Sumaya-Martinez, 2004

2.2.3. Produits à haute valeur ajoutée

De par le contenu en composés aux caractéristiques précises, les co-produits de crevette peuvent servir à la production de produits de haute valeur marchande. Ces produits dérivés trouvent leur application essentiellement en diététique, nutraceutique, pharmaceutique et en cosmétique (Johnson, 2002). Les principaux produits à haute valeur ajoutée pouvant être engendrés par les co-produits de crevette, ainsi que leur intérêt et leur domaine d'utilisation sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6: Les différents produits à haute valeur ajoutée issus de co-produits de crevette et leur utilisation.

Produits	Intérêt	Domaine d'utilisation
Chitine et chitosan	Bioactivité Rétention d'eau Chélation de métaux	Agroalimentaire Nutraceutique Pharmaceutique Cosmétique Agriculture Traitement des eaux
Astaxanthine	Bioactivité Pigmentation	Alimentation animale Alimentation humaine Nutraceutique
Peptides	Bioactivité Digestibilité élevée	Alimentation humaine Alimentation animale Nutraceutique Milieu de culture microbienne
Substances aromatiques	Aromatisant naturel	Agroalimentaire
Glucosamine	Nutrition	Diététique
Phosphatase alcaline	Enzymatique	Biotechnologie
Eléments minéraux	Nutrition	Agroalimentaire
Huile riche en $\omega 3$ et $\omega 6$	Nutrition Bioactivité	Agroalimentaire Nutraceutique

2.2.3.1. Chitine et chitosan

La chitine est le biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. Elle est formée par des résidus de N-acétyl-D-glucosamine liés par des liaisons β -(1-4) (Figure 8). La chitine est un composant structural des exosquelettes de crustacés, mollusques et arthropodes. Elle est aussi rencontrée dans la structure de la membrane cytoplasmique de certains champignons et algues (Di Mario *et al.*, 2008). La chitine constitue environ 14 à 35% des carapaces de crustacés qui contiennent pour le reste des protéines et carbonate de calcium. Les sources de chitine les plus exploitées commercialement sont constituées par les carapaces et les co-produits de crabe, de crevette, de homard, de krill, d’huitre et de calmar (Rasmussen et Morrissey, 2008).

La chitine est insoluble dans l’eau. Elle peut être partiellement déacétylée pour donner le chitosan qui se solubilise dans l’eau à pH légèrement acide. La déacétylation de la chitine en chitosan est montrée sur la Figure 9. Le degré de déacétylation de la chitine dépend de la température et du pH (Weska *et al.*, 2007).

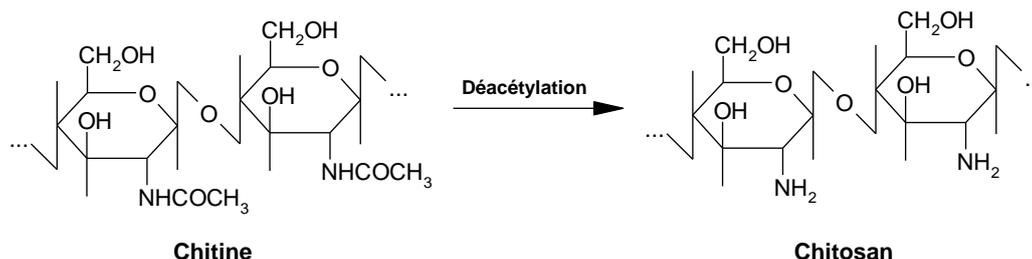


Figure 9 : Déacétylation de la chitine en chitosan.

Le chitosan possède un degré d’acétylation qui varie de 5 à 30% avec un poids moléculaire entre 100 000 à 1 000 000 Da. Il peut se présenter sous forme amorphe, semi-cristalline ou cristalline. Le chitosan peut former des liaisons avec des molécules chargées négativement comme les acides gras, les acides biliaires, les phospholipides, les protéines, les polysaccharides tels que les carraghénanes, les pectines et les alginates.... Il possède aussi des activités biologiques, notamment des activités antimicrobienne (Du *et al.*, 2009), anti-inflammatoire, antioxydante (Ngo *et al.*, 2009), antitumorale (Wang *et al.*, 2008b), immunomodulatrice (Lee *et al.*, 2008), anti-ulcère (Rasmussen et Morrissey, 2008) ou encore anti-hypertensive (Kim *et al.*, 2008b). Le degré d’acétylation du chitosan a un rôle crucial dans sa bioactivité : plus il est acétylé, moins il possède une bioactivité (Kim *et al.*, 2008b). Le

chitosan est également utilisé pour guérir les maladies rénales, et enfin, ils ont les mêmes propriétés diététiques que les fibres alimentaires solubles d'origine végétale (Rasmussen et Morrissey, 2008).

Par conséquent, le chitosan a plusieurs applications commerciales. Dans l'industrie alimentaire, il peut être utilisé comme bioadhésif (Dutta *et al.*, 2009), additif alimentaire (Gibert et Rakshit, 2005). Il est aussi utilisé pour le traitement des eaux (Bhatnagar et Sillanpaa, 2009), dans l'agriculture (Han *et al.*, 2008), comme base cosmétique (Morganti et Morganti, 2008), dans le secteur pharmaceutique et nutraceutique (Kumar *et al.*, 2004). Une étude récente a montré leur utilisation en microbiologie pour produire la chitinase et le chitosanase (Wang *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008a).

Pour la production industrielle, la chitine est extraite des co-produits de crustacés par traitement avec de l'acide et de la base pour déminéraliser et déprotéiniser les carapaces. La poudre de chitine obtenue est ensuite traitée avec une solution alcaline pour provoquer la déacétylation et produire du chitosan. Annuellement, 80 000 tonnes de chitine sont produits industriellement à partir des co-produits de crustacés. Une étude a montré que l'utilisation de l'ultrason améliore l'extraction chimique de la chitine (Kjartansson *et al.*, 2006).

Des recherches sont effectuées pour une extraction plus douce de la chitine. L'utilisation des techniques douces permet de récupérer d'autres composants d'intérêts des co-produits, tout en gardant leur fonction. La fermentation s'avère alors intéressante (Rao *et al.*, 2000 ; Synowiecki et Al-Khateeb, 2000; Gildberg et Stenberg, 2001 ; Cira *et al.*, 2002; Healy *et al.*, 2003; Beaney *et al.*, 2005; Rao et Stevens, 2005; Bhaskar *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2009), ainsi que la combinaison de la fermentation avec l'hydrolyse enzymatique (Jo *et al.*, 2008). L'hydrolyse enzymatique peut être aussi utilisée pour l'étape de déprotéinisation (Gildberg et Stenberg, 2001). Pour la conversion de la chitine, l'hydrolyse avec la Pepsine est efficace pour la production de chitobiose (Ilankovan *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Astaxanthine

L'astaxanthine est un pigment de la classe des xanthopylles dont la structure chimique est représentée dans la Figure 10. Il s'agit d'un dérivé oxygéné des caroténoïdes. Il est présent dans la chair de poissons de la famille des Salmonidés, notamment le saumon et la truite, et dans les crustacés tels que les crabes et les crevettes. L'astaxanthine se trouve lié avec des acides gras ou des protéines (Olaizola, 2008).

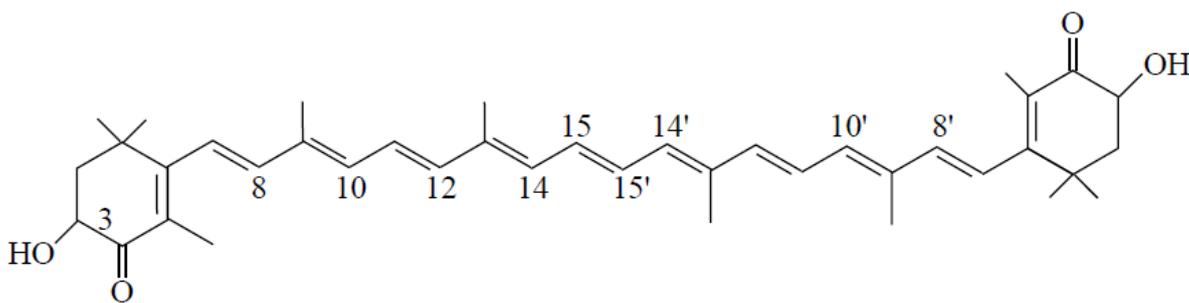


Figure 10 : Structure chimique de l'astaxanthine.

L'astaxanthine est présente dans les co-produits de crustacés à raison de 50 à 200mg/kg. Il constitue 63,5% et 92,2% des pigments caroténoïdes de co-produits de quelques espèces de crevettes péneïdes, respectivement sous forme native et avec les formes mono et di-esters lipidiques (Sachindra *et al.*, 2005).

L'astaxanthine est le pigment le plus commercialisé dans l'élevage de poisson, notamment le saumon, pour sa bonne coloration. Des études récentes ont montré des effets positifs de l'astaxanthine sur la fertilité, la qualité des œufs et la survie des poissons. En aviculture, son utilisation améliore la croissance et la résistance des poulets face à certaines infections bactériennes (Olaizola, 2008). En alimentation humaine et dans le domaine de la nutraceutique, l'astaxanthine présente le grand intérêt de posséder différentes activités biologiques telles des activités anti-inflammatoire, immuno-modulatrice, anticancéreuse et des actions photoprotectrices. Il prévient aussi la survenue de maladies cardiovasculaire et neurodégénérative. Son activité anti-oxydante est très intéressante : elle est 500 fois plus puissante que celle de la vitamine E (Olaizola, 2008). Une étude a démontré l'effet antidépresseur des caroténoïdes de crevettes sur des rats de laboratoire, lié probablement à leur caractère antioxydant (De Souza Bezerra *et al.*, 2005).

L'astaxanthine peut être extrait pendant la production de la chitine et du chitosan, mais la majeure partie de la production d'astaxanthine est actuellement issue de la synthèse chimique (Hoischen *et al.*, 1998 ; Archer et Russell, 2007). Dans le souci de préserver sa structure et de récupérer les autres composés présents dans les co-produits de crustacés, plusieurs études sont effectuées pour l'extraction de l'astaxanthine. Parmi les techniques les plus courantes, la fermentation s'avère être une technique prometteuse (Bhaskar *et al.*, 2007; Sachindra *et al.*, 2007 ; Armenta et Guerrero-Legarreta, 2009; Pacheco *et al.*, 2009) ainsi que l'hydrolyse enzymatique (Lee *et al.*, 1999 ; Babu *et al.*, 2008). L'extraction des caroténoïdes par hydrolyse enzymatique semble efficace pour des applications à

destination de l'alimentation humaine du fait de l'abondance en acides aminés libres et en astaxanthine dans l'hydrolysats ; à l'inverse, la fermentation lactique paraît plus intéressante pour le secteur de l'alimentation animale par la richesse et la concentration de pigments caroténoïdes (Cremades *et al.*, 2003). La combinaison de la fermentation, l'extraction avec le solvant et l'hydrolyse enzymatique permet d'obtenir de l'astaxanthine pur à partir de tête de crevette *Penaeus* (Armenta-Lopez *et al.*, 2002). Des études sur l'extraction avec des huiles végétales ont été également menées (Handayani *et al.*, 2008) : l'huile de tournesol à chaud est efficace pour l'extraction d'astaxanthine dans les co-produits de crevette (Sachindra et Mahendrakar, 2005). Enfin, concernant les solvants organiques, l'utilisation du mélange isopropanol/hexane prouve son efficacité avec une récupération de 60% de l'astaxanthine dans l'hexane (Sachindra *et al.*, 2006).

2.2.3.3. Peptides

Les peptides sont générés lors de l'hydrolyse enzymatique des protéines. L'avantage de l'hydrolyse enzymatique est la possibilité de la contrôler et ainsi de produire des peptides en fonction de leur taille ou du rôle que l'on cherche (Kristinsson et Rasco, 2000). Les peptides présentent plusieurs intérêts : en plus de leur digestibilité élevée par rapport aux protéines, ils peuvent présenter des propriétés fonctionnelles utiles en alimentation, ainsi que des propriétés biologiques intéressantes en nutraceutique.

2.2.3.3.1. Nutrition animale

Par rapport aux protéines, les peptides présentent un intérêt particulier dans la nutrition animale à cause de leur digestibilité plus élevée (Heu et al, 2003). Plusieurs études sur l'efficacité de l'utilisation d'hydrolysats de poisson et de crevette en nutrition animale ont été effectuées. Pour les ruminants, une étude comparative de l'utilisation de co-produits de crevette non traités et d'ensilage de co-produits de crevette a été effectuée *in vitro*. Il a été démontré ainsi que la digestibilité est plus élevée dans l'ensilage de co-produits de crevette (Evers et Carroll, 1998). En aquaculture, l'utilisation d'hydrolysats de co-produits de poisson a prouvé son efficacité sur la croissance des poissons (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002; Refstie *et al.*, 2004). Il a été démontré également que l'hydrolysats de co-produits de crevette peut remplacer la farine de poisson pour l'élevage de tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus (Oliveira Cavalheiro *et al.*, 2007). Enfin, la production de peptides à activité antioxydante associée à la présence d'astaxanthine dans les autolysats de crevette présente un intérêt particulier en aquaculture (Sachindra et Bhaskar, 2008). En effet, en plus de la pigmentation

obtenue avec l'astaxanthine, la génération de peptides à activité antioxydative conduit à une meilleure conservation des aliments en inhibant l'oxydation des nutriments, plus particulièrement des lipides et des acides gras.

2.2.3.3.2. Nutrition humaine

Les peptides présentent un intérêt particulier en alimentation humaine dû au fait qu'ils présentent des propriétés fonctionnelles, qui leur permettent de jouer un rôle dans les caractères organoleptiques des aliments ou dans leur durée de conservation. Une des raisons principales justifiant d'effectuer des hydrolyses enzymatiques sur les co-produits d'origine marine est la recherche de peptides avec des propriétés fonctionnelles. Ainsi, à titre d'exemple, l'hydrolysate de co-produits de hareng présente une propriété de solubilité, de liaison avec les lipides et d'émulsifiant (Sathivel *et al.*, 2003) ; l'hydrolysate de hareng entier présente des propriétés émulsifiant et moussant (Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999) ; une capacité de rétention d'eau a été observée dans l'hydrolysate de têtes de crevette (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005, Ruttanapornvareesakul, 2006a ; Ruttanapornvareesakul, 2006b).

Les peptides présentent aussi une digestibilité élevée et, de fait, leur valeur nutritionnelle est importante. Cependant, pour l'application en alimentation humaine, l'amertume des peptides générés au cours de l'hydrolyse enzymatique constitue une contrainte (Korhonen *et al.*, 1998; Saha et Hayashi, 2001). Cette amertume est due à la présence d'acides aminés hydrophobes générés au cours de l'hydrolyse. Pour enlever l'amertume, des techniques telles que les traitements avec du carbone actif, l'extraction avec de l'alcool ou la chromatographie et hydrolyse avec des Alcalase et Neutralse sont utilisés (Saha et Hayashi, 2001).

Les hydrolysats possèdent enfin des acides aminés libres pouvant servir d'exhausteur de saveur. Il a été rapporté que les co-produits de crevette sont de potentielles sources d'aromatant naturel du fait de leur composition en acides aminés tels que l'acide glutamique, l'acide aspartique, la glycine et l'alanine (Heu *et al.*, 2003 ; Cao *et al.*, 2008).

2.2.3.3.3. Bioactivité

Le Tableau 7 présente quelques exemples de bioactivité de peptides obtenus lors de manipulations biotechnologiques de poissons et de crustacés.

Tableau 7 : Bioactivité de peptides isolés des co-produits de la mer.

Bioactivité	Origine	Références
Antioxydative	Sole	Kim <i>et al.</i> , 2008a; Jun <i>et al.</i> , 2004
	Crevette	Faithong <i>et al.</i> , 2010; He <i>et al.</i> , 2006; He <i>et al.</i> , 2007; He <i>et al.</i> , 2008
	Morue	Jeon <i>et al.</i> , 1999
	Krill	Faithong <i>et al.</i> , 2010
	Saumon	Nakajima <i>et al.</i> , 2009
	Colin	Nakajima <i>et al.</i> , 2009
	Merlan	Nakajima <i>et al.</i> , 2009
	Hoki	Je <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2007
	Thon	Je <i>et al.</i> , 2007
Antihypertensive (inhibition de la conversion de l'angiotensine I)	Sole	Kim <i>et al.</i> , 2008a
	Crevette	He <i>et al.</i> , 2006; He <i>et al.</i> , 2008
	Morue	Jeon <i>et al.</i> , 1999
	Saumon	Nakajima <i>et al.</i> , 2009
	Merlan	Nakajima <i>et al.</i> , 2009
	Colin	Je <i>et al.</i> , 2004; Nakajima <i>et al.</i> , 2009
Accélération de l'absorption du calcium	Hoki	Kim <i>et al.</i> , 2007
	Hoki	Jung <i>et al.</i> , 2005; Jung et Kim, 2007
Sécrétagogue	Merlan	Cudennec <i>et al.</i> , 2008
	Morue	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003; Slizyte <i>et al.</i> , 2009
	Crevette	Cudennec <i>et al.</i> , 2008; Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003
Antiradicalaire	Crevette	Guérard <i>et al.</i> , 2007
Antiprolifératrice	Morue	Picot <i>et al.</i> , 2006
	Crabe	Picot <i>et al.</i> , 2006
	Saumon	Picot <i>et al.</i> , 2006

Les peptides présentent un intérêt dans le domaine nutraceutique et pharmaceutique par leur activité biologique. Des activités anticancéreuse, anti-hypertensive, antimicrobienne, sécrétagogue, immunostimulante...ont été identifiées dans des peptides d'origine marine (Aneiros et Garateix, 2004). Ces peptides bioactifs peuvent être natifs dans les organismes (Hartmann et Meisel, 2007, Fleury *et al.*, 2008) ou produits au cours de l'hydrolyse enzymatique (Jeon *et al.*, 1999 ; Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003 ; Je *et al.*, 2004 ; Jun *et al.*, 2004 ; Jung *et al.*, 2005 ; He *et al.*, 2006 ; Picot *et al.*, 2006 ; Guérard *et al.*, 2007 ; He *et al.*, 2007; Je *et al.*, 2007 ; Jung et Kim, 2007 ; Cudennec *et al.*, 2008 ; He *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2008a ; Nakajima *et al.*, 2009 ; Slizyte *et al.*, 2009) ou de la fermentation (Faithong *et al.*, 2010).

2.2.3.3.4. Support de milieu de culture microbienne

Les peptides issus de l'hydrolyse de composés d'origine marine constituent des ingrédients pour des milieux de culture microbienne de qualité et à coût réduit. Des études ont été effectuées sur l'efficacité de leur utilisation en milieu de culture et les résultats obtenus avec l'hydrolysate de co-produits de thon sont prometteurs (Guérard *et al.*, 2001). L'utilisation

de peptones obtenues lors de l'hydrolyse enzymatique de co-produits de crevette et de crabe comme source azotée pour la culture d'*E. coli* s'avère plus efficace par rapport à une peptone commerciale. Les peptides constituent ainsi une source d'azote efficace à moindre coût pour la culture microbienne (Vieira *et al.*, 2005).

2.2.3.4. Substances aromatiques

L'extraction de substances aromatiques constitue une autre voie de valorisation des co-produits de crevette. Les substances aromatiques sont utilisées dans les plats cuisinés, soupes, sauces... Les extraits et aromatisants dérivés des produits de la mer sont très recherchés dans les pays asiatiques. Ils sont extraits par des traitements biotechnologiques comme des hydrolyses enzymatiques suivies de différentes étapes de chromatographie. Les substances obtenues se présentent sous forme de poudres ou de jus (Archer et Russell, 2007).

2.2.3.5. Glucosamine

Le glucosamine (Figure 11) est obtenu par hydrolyse de la chitine. Il a un rôle important dans la formation et la réparation du cartilage dans le corps humain. Le glucosamine est commercialisé en diététique et utilisé comme complément nutritionnel pour l'homme et les animaux domestiques (Archer et Russell, 2007).

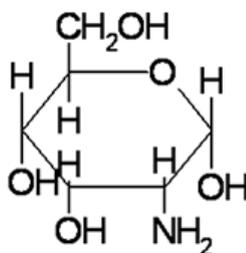


Figure 11: Structure du glucosamine

2.2.3.6. Phosphatase alcaline

Il s'agit d'une enzyme présente dans les tissus mous des carapaces de crustacés. Elle est utilisée en biologie moléculaire et en biomédecine. La phosphatase alcaline est thermosensible et son extraction comporte plusieurs étapes à température contrôlée. Beaucoup d'autres enzymes sont dérivées des carapaces de crevettes. Cependant, l'extraction à partir de ces matières est rare : les enzymes sont plutôt fabriquées par la technologie de recombinaison (Archer et Russell, 2007).

2.2.3.7. Eléments minéraux et vitamines

Les éléments minéraux et les vitamines constituent des éléments essentiels pour l'organisme du fait, entre autres, de leur participation à différentes réactions enzymatiques, leur contribution à la formation de certains tissus...

Chez les crevettes, le calcium constitue l'élément minéral principal : il entre dans la constitution de l'exosquelette.

Le calcium est un élément essentiel pour la fortification des dents et des os. Le manque de calcium est la première cause de l'ostéoporose dans le monde (Jung *et al.*, 2008). Il est aussi utilisé par le système nerveux et dans de nombreuses réactions enzymatiques comme cofacteur. La contraction des muscles et la régulation de la perméabilité des ions sodium sur les membranes cellulaires nécessitent du calcium (Jung *et al.*, 2008).

La plus grande source de calcium dans l'alimentation est constituée par les produits laitiers. Cependant, il existe des populations qui ne tolèrent pas le lactose, notamment en Asie. Ils utilisent alors des aliments riches ou enrichis en calcium pour combler leur besoin. Il existe des jus de fruits enrichis en calcium, des sels de calcium utilisés comme supplément alimentaire, sous forme de fumarate, citrate, lactate, carbonate ou gluconate de calcium (Jung *et al.*, 2008).

Dans le milieu marin, le calcium se présente sous-forme de calcite (CaCO_3) ou ion divalent (Ca^{++}). Les arêtes et les squelettes de poissons ainsi que les exosquelettes de crustacés sont des sources potentielles de calcium. Pour l'incorporer aux aliments fortifiés, le calcium doit être converti de façon à avoir une structure plus assimilable par l'organisme. Des traitements avec de l'eau chaude ou de l'acide acétique chaud ont été effectués (Jung *et al.*, 2008). Une étude a montré aussi qu'une hydrolyse avec de la Pepsine et acide acétique conduit à la dissolution des éléments minéraux et organique dans les arêtes de poissons (Jung *et al.*, 2006).

D'autres éléments minéraux sont présents dans les crevettes. Par ordre de priorité, on distingue :

- **Le phosphore** dont les crevettes constituent une excellente source. Mis à part son rôle essentiel dans la formation des os et des dents, il participe entre autres à la croissance et à la régénérescence des tissus. De plus, il aide à maintenir à la normale le pH du sang. Il est l'un des constituants des membranes cellulaires (Guest et Rapoport, 1939).

- **Le cuivre** est également présent dans les crevettes. En effet, la crevette nordique est une bonne source de cuivre, tandis que la crevette d'élevage asiatique constitue une source de cuivre. En tant que constituant de plusieurs enzymes, le cuivre est nécessaire à la formation de l'hémoglobine et du collagène (protéine servant à la structure et à la réparation des tissus) dans l'organisme. Plusieurs enzymes contenant du cuivre contribuent également à la défense du corps contre les radicaux libres.
- **Le sélénium** est un élément dont les crevettes contiennent en quantité intéressante. Le sélénium travaille de concert avec l'une des principales enzymes antioxydantes, prévenant ainsi la formation de radicaux libres dans l'organisme. Il contribue aussi à convertir les hormones thyroïdiennes dans leur forme active. Une portion de 100 g de crevettes permet de combler 70 % des besoins quotidiens de l'homme en sélénium.
- **Le magnésium** est également présent dans les crevettes. La crevette nordique est une source de magnésium. Le magnésium participe au développement osseux, à la construction des protéines, aux actions enzymatiques, à la contraction musculaire, à la santé dentaire et au fonctionnement du système immunitaire. Il joue aussi un rôle dans le métabolisme de l'énergie et dans la transmission de l'influx nerveux.
- **Le fer** est également présent dans les crevettes. Le fer sert au transport de l'oxygène nécessaire à la production d'énergie des cellules, notamment des cellules musculaires. Ce minéral est essentiel à la formation des globules rouges, ainsi qu'à la fabrication des hormones et neurotransmetteurs.
- Enfin, les crevettes sont une source de **zinc**. Le zinc participe notamment aux réactions immunitaires, à la fabrication du matériel génétique, à la perception du goût, à la cicatrisation des plaies et au développement du fœtus. Le zinc interagit également avec les hormones sexuelles et thyroïdiennes. Dans le pancréas, il participe à la synthèse (fabrication), à la mise en réserve et à la libération de l'insuline.

Parmi les vitamines, on peut citer la vitamine B12 ou cobalamine et la vitamine B13 ou niacine, qui sont rencontrées en quantité intéressante dans les crevettes.

En effet, Les crevettes sont une excellente source de **vitamine B12**. Cette vitamine aide à la fabrication de nouvelles cellules, contribue à l'entretien des cellules nerveuses, rend l'acide folique actif et participe au métabolisme de certains acides gras et acides aminés.

En ce qui concerne la **vitamine B13**, les crevettes en sont une excellente source pour la femme et une bonne source pour l'homme, les besoins en vitamine B3 de l'homme étant supérieurs à ceux de la femme. Cette vitamine participe à de nombreuses réactions métaboliques et contribue spécialement à la production d'énergie à partir des glucides, des lipides et de l'alcool ingérés. Elle joue aussi un rôle dans le processus de formation de l'ADN.

2.2.3.8. Huile riche en $\omega 3$ et $\omega 6$

Les poissons de mer constituent la source la plus importante d'acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$. Les huiles riches en acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$ sont obtenues à partir de poissons entiers, mais on utilise de plus en plus des dérivés de poissons, de mollusques et de crustacés (Johnson, 2002). Le principal intérêt nutritionnel des huiles de poissons réside dans la présence d'acides gras insaturés de la famille des $\omega 3$ et $\omega 6$.

Ces acides gras sont extraits par des étapes de filtration et de concentration et sont commercialisés sous forme de capsule comme additif alimentaire. Ils peuvent être aussi formulés directement dans les aliments pour produire des aliments fonctionnels. La fermentation et l'hydrolyse enzymatique constituent des voies possibles pour l'extraction de l'huile des co-produits de poisson (Dumay, 2006; Dumay *et al.*, 2006; Rai *et al.*, 2010).

Parmi les acides gras $\omega 3$, la crevette contient de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA), 2 acides gras polyinsaturés à chaîne longue. Il est maintenant bien démontré que les $\omega 3$ d'origine marine (EPA et DHA) contribuent à la santé cardiovasculaire et sont associés à un risque moindre de mortalité par maladie cardiovasculaire (Kris-Etherton *et al.*, 2002 ; Heidmann-Soccol *et al.*, 2005 ; León *et al.*, 2008). D'autres effets bénéfiques ont été attribués aux $\omega 3$, mais on ne dispose pas actuellement de données scientifiques suffisantes pour confirmer de tels effets. On pense ici aux liens entre les $\omega 3$ et l'atténuation des symptômes de dépression, l'amélioration de la concentration et une meilleure capacité d'apprentissage chez l'enfant.

La quantité de $\omega 3$ présente dans la crevette varie d'une espèce à l'autre. Ainsi, des analyses effectuées au Québec montrent que la crevette nordique pêchée dans l'estuaire du golfe du Saint-Laurent contient de trois à cinq fois plus d'EPA et de DHA que les crevettes d'élevage importées d'Asie (la crevette géante tigrée et la crevette à pattes blanches). Bien que la crevette nordique ne soit pas considérée comme un poisson gras au même titre que le saumon, la truite saumonée, le hareng ou la sardine, elle constitue tout de même une source d'acides gras $\omega 3$, selon les normes de Santé Canada. Une portion de 75 g de crevettes nordiques fournit 300 mg d'EPA et de DHA et comble 60 % des besoins quotidiens en ces

acides gras, tandis qu'une même portion de crevettes géantes tigrées et à pattes blanches en fournit de 60 mg à 85 mg, et comble de 12 % à 17 % des besoins. À noter qu'au Canada, il n'existe pas de recommandation nutritionnelle pour les acides gras ω 3 d'origine marine. Cependant, l'Association américaine des maladies du cœur (AHA) (Kris-Etherton *et al.*, 2002) et l'ISFFAL (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, 2004), une société scientifique qui regroupe des experts internationaux dans le domaine des lipides, ont formulé des recommandations. L'AHA recommande aux personnes en santé de consommer au moins 2 repas de poisson gras par semaine, tandis que l'ISFFAL suggère un apport d'environ 500 mg d'EPA et de DHA par jour, afin de maintenir une bonne santé cardiovasculaire.

Autre point intéressant, on retrouve 15 fois plus de ω 3 que de ω 6 dans la crevette nordique. Ce qui constitue un avantage nutritionnel en faveur de ce petit crustacé.

2.2.4. Autres produits à haute valeur ajoutée

2.2.4.1. Collagène

Le collagène est une protéine de structure de la peau et du squelette des animaux. C'est une protéine à 3 chaînes polypeptidiques pouvant être associées de différentes manières. On distingue plusieurs types de collagène selon cette combinaison : Le collagène de type I se retrouve par exemple au niveau de la peau et des tendons tandis que le collagène de type III intervient au niveau du système cardiovasculaire. Les co-produits de poisson contiennent une quantité considérable de peau, source potentielle de collagène. Du fait de sa meilleure compatibilité avec l'organisme humain, le collagène est utilisé dans les domaines médical et pharmaceutique, notamment comme adjuvant pour les médicaments. En cosmétique, le collagène est aussi recherché pour sa propriété de rétention d'eau et d'hydratation. Le collagène modifié par voie enzymatique possède des propriétés émulsifiantes et moussantes (Kim *et al.*, 2008a). Une extraction avec de l'acide lactique ou acétique, avec un traitement enzymatique est efficace pour l'extraction du collagène dans la peau de morue (Skierka et Sadowska, 2007). Les co-produits de crevette renferment également du collagène, mais leur extraction n'est pas largement étudiée.

2.2.4.2. Gélatine

La gélatine est un mélange hétérogène de protéines hydrosolubles avec un poids moléculaire élevé. Elle peut être extraite des co-produits marins par simple traitement avec de l'eau chaude, ou par traitement alcalin (Kim *et al.*, 2008a). D'autre part, elle peut être aussi dérivée du collagène par hydrolyse enzymatique. La gélatine est généralement utilisée en industrie pharmaceutique pour l'encapsulation de médicaments et en industrie alimentaire comme ingrédient pour la rétention d'eau, le rehaussement de la texture et pour augmenter la stabilité des aliments. Des études ont révélé des activités antioxydantes et antihypertensives de la gélatine extraite de poissons (Kim *et al.*, 2008a).

2.2.4.3. Co enzyme Q10

La crevette contient de la coenzyme Q10 (CoQ10), un composé ayant une structure chimique similaire à la vitamine K et qui agit comme une vitamine dans l'organisme. On lui attribue des propriétés antioxydantes (Bettinger *et al.*, 2007). Certaines données montrent que la CoQ10 permet de réduire la tension artérielle chez les gens hypertendus et qu'elle aurait un rôle préventif contre les maladies cardiovasculaires (Pepe *et al.*, 2007). Elle préviendrait aussi l'oxydation du LDL cholestérol (« mauvais cholestérol ») (Thomas *et al.*, 1999), ce dernier étant considéré comme un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Les viandes et les poissons sont les principales sources alimentaires de CoQ10. Les concentrations de CoQ10 dans le poisson varient de 0,4 mg à 6,4 mg par portion de 100 g (Mattila *et al.*, 2001). Pour obtenir un effet préventif, il faudrait consommer des doses de CoQ10 de l'ordre de 60 mg à 100 mg et plus, ce qui est presque impossible à atteindre seulement par l'alimentation. On peut toutefois atteindre ces quantités en consommant des suppléments de CoQ10. Notons que le corps produit la CoQ10 dont il a besoin.

La crevette nordique contient 0,1 mg de CoQ10 par portion de 100 g, tandis que les crevettes d'élevage (géantes tigrées et à pattes blanches) en contiennent environ 0,03 mg par portion. La crevette nordique contient donc environ trois fois plus de CoQ10 que les crevettes d'élevage. Il n'existe pas de recommandation nutritionnelle (apport quotidien recommandé) pour la CoQ10.

2.2.5 Précautions

Les crevettes sont très riches en **purines**, substances précurseurs de l'acide urique. Ainsi, les gens souffrant de la goutte doivent éviter leur consommation afin de prévenir l'apparition de crises. Chez les personnes aux prises avec cette pathologie, l'acide urique est

présent en quantité anormalement élevée dans le sang, causant l'apparition de symptômes spécifiques tels des douleurs aux articulations. Les purines contenues dans certains aliments contribuent à augmenter davantage la concentration d'acide urique dans le sang, d'où l'importance pour les gens souffrant de la goutte d'en éviter la consommation.

Parmi les **allergènes alimentaires** d'origine animale, les crustacés et les mollusques causent fréquemment des réactions allergiques chez les individus hypersensibles. La crevette contient une protéine allergène nommée tropomyosine, aussi présente dans le crabe et le homard (Reese *et al.*, 1999). Cette protéine pourrait se trouver dans d'autres fruits de mer, d'où la possibilité de réactions croisées. L'Agence canadienne d'inspection des aliments recommande aux gens allergiques à ces aliments de consulter un allergologue avant d'en introduire de nouveaux dans leur alimentation. Notons que l'allergie à un crustacé peut ultimement amener une sensibilisation à certains allergènes de l'air, comme les acariens de la poussière (Reese *et al.*, 1999). La relation inverse a aussi été observée. Les personnes allergiques aux sulfites doivent porter une attention particulière aux étiquettes des crevettes vendues en sac ou en boîte, car elles sont parfois traitées au bisulfite de sodium pour en augmenter la durée de conservation. C'est le cas entre autres de plusieurs variétés de crevettes d'élevage importées d'Asie. Sur les étiquettes, les termes Agents de sulfitage, Acide sulfureux Métabisulfite, Bisulfite de potassium, Bisulfite de sodium ou Dioxyde de soufre indiquent la présence de sulfite dans les produits.

2.2.6. Utilisation non alimentaire : fertiliseur

Une des voies non alimentaire pour la valorisation des co-produits de crevette et de poisson est la production de fertiliseur pour l'agriculture. Les carapaces de crevette et de crabe sont séchées et broyées et peuvent être directement utilisées comme engrais ou additionnées à un mélange. Elles constituent des fertiliseurs naturels et écologiques très demandés actuellement au Japon et en Corée (Archer et Russel, 2007). D'autre part, la présence de chitosan à activités antifongique, insecticide, catalyseur du développement de la plante est fortement appréciée (Han *et al.*, 2008). Les carapaces de crabe broyées ont été utilisées comme nématocide dans l'horticulture (Archer et Russel, 2007). Une étude sur l'utilisation du chitosan avec des co-produits de poisson comme engrais a également montré leur efficacité (Han *et al.*, 2008).

3. GENERALITES SUR L'AVICULTURE

La volaille constitue la ressource animale la plus importante dans le monde où le cheptel aviaire a été estimé en l'an 2006 à quelques 16 milliards de têtes, selon la FAO. La Chine est le premier producteur avec un cheptel de 4 milliards de têtes en 2006, suivie de loin par les Etats-Unis qui produisent 2 milliards, et l'Indonésie 1 milliard (FAOSTAT, 2009). La production d'œufs et de viande de volaille occupe plus de 30% de la totalité des protéines animales consommées, et cette part ne cesse de croître.

3.1. Alimentation avicole

En élevage, l'alimentation occupe une place importante car elle représente de 1/2 à 3/4 du coût de la production (Sauvant, 2005). L'alimentation de base de la volaille doit couvrir les besoins d'entretien et de production et elle doit être apportée en différentes proportions (Blum, 1984).

3.1.1. Les besoins en énergie

Le besoin en énergie chez les volailles est inversement proportionnel à la température du milieu extérieur. Il est réduit de 10% pour les poules maintenues à 30°C en comparaison avec celles qui vivent à 20°C. Inversement, le besoin augmente de 17% lorsque la température diminue de 10°C. En effet, la production d'extra-chalear consécutive à l'ingestion des aliments est accrue en climats chauds, et au-dessus de 28°C, la température abdominale augmente avec la température extérieure et avec la quantité d'aliment consommée. L'animal réduit alors sa consommation d'aliment (Hofman, 2000).

En alimentation avicole, l'énergie est exprimée de différentes façons : l'énergie digestible (ED) correspond à la différence entre l'énergie brute de l'aliment ingéré (EB) et l'énergie des fèces. L'énergie métabolisable (EM) est la différence entre l'énergie brute de l'aliment et l'énergie totale excrétée dans les fèces, l'urine et le gaz. Elle correspond à l'énergie disponible pour les besoins métaboliques de l'animal : entretien et production. L'énergie nette est obtenue par la différence entre l'énergie métabolisable et la perte de chaleur accompagnant la transformation de l'énergie métabolisable. En alimentation avicole, l'énergie métabolisable est l'expression la plus couramment utilisée.

Il est à noter que la rétention azotée chez les animaux à des stades physiologiques différents n'est pas pareille (Larbier et Leclercq, 1992). L'énergie métabolisable peut alors être corrigée pour la rétention azotée afin de permettre des comparaisons entre animaux à des

stades physiologiques différents, la correction étant de 8,22 ou 8,73 kcal/g d'azote retenu chez les oiseaux. L'énergie métabolisable peut être également corrigée par soustraction des pertes inéluctables de l'animal non liées directement à l'ingestion d'aliment, c'est l'énergie métabolisable vraie. En l'absence de mesure directe, plusieurs équations ont été établies par différents auteurs pour estimer l'énergie métabolisable d'un aliment ou d'un mélange d'aliment. L'équation de Sibbald (1980) qui suit tient compte du bilan azoté et des pertes endogènes (Blum, 1984 ; Larbier et Leclercq, 1992).

$$EM = 3951 + 54,4 MG - 88,7 CB - 40,8 CE$$

Où MG : matières grasses (en %)

CB : celluloses brutes (en %)

CE : cendres brutes (en%)

3.1.2. Les besoins en matières azotées

Les protéines constituent la majeure partie de la viande et des œufs. Les besoins en protéines sont donc importants. D'une manière générale, 180 à 240 g de protéines par kg d'aliment sont recommandés pour le poulet (Hofman, 2000).

La biosynthèse des acides aminés s'effectue avec des groupements NH₂ provenant d'autres acides aminés, de chaînes carbonées dérivés α -cétoniques provenant du métabolisme glucidique, et d'enzymes spécifiques assurant la transamination. Chez les oiseaux, seulement 2 acides aminés, la lysine et la thréonine, ne peuvent pas être synthétisés à défaut de transaminases. La glycine et la sérine jouent un rôle important dans le catabolisme des acides aminés. Le besoin des volailles en ces 2 acides aminés sont alors élevés (Blum, 1984).

La disponibilité des acides aminés dans l'alimentation des volailles dépend de facteurs extrinsèques tels que le mode d'alimentation, le niveau de consommation, les apports alimentaires, la température... Le facteur intrinsèque qui influe cette disponibilité concerne les protéines elles-mêmes. A ce titre, la lysine a une place importante du fait de son caractère strictement indispensable, sa faible concentration dans la plupart des protéines alimentaires et son groupement ϵ NH₂ susceptible de réagir avec les glucides et les lipides (Blum, 1984).

3.1.3. Les besoins en matières grasses et acides gras essentiels

L'addition de lipides au régime augmente l'ingestion d'énergie et la production. En effet, les lipides ont un meilleur rendement énergétique et la production de chaleur lors de leur ingestion est plus faible par rapport aux autres nutriments. L'augmentation de la proportion

lipidique dans la ration est utilisée pour l'élevage des poulets en pays tropicaux pour augmenter la densité énergétique de la ration (Larbier et Leclercq, 1992 ; Hofman, 2000).

L'acide linoléique a une place importante dans l'alimentation du poulet du fait de l'incapacité de l'organisme à le synthétiser (Larbier et Leclercq, 1992). Il est recommandé pour la croissance, la production et la taille des œufs ainsi que leur pourcentage d'éclosion. Les besoins varient de 0,8% à 1,2% pour les animaux en croissance et pour les poules reproductrices (Blum, 1984).

La choline, constituant des phospholipides, est recommandée dans l'alimentation des volailles. Elle intervient comme donneur de radicaux méthyles dans les réactions de transméthylation, et sa carence compromet la performance des poulets. Elle peut être synthétisée dans l'organisme, mais l'aptitude des animaux à la synthétiser est insuffisante pour couvrir les besoins (Blum, 1984 ; Larbier et Leclercq, 1992).

3.1.4. Les besoins en vitamines

Les vitamines jouent un rôle essentiel dans les systèmes enzymatiques. Les volailles ont besoin de vitamines liposolubles (A, D, E, K) et hydrosolubles (B1, B2, B6, B12, B13, acide folique, biotine, acide pantothénique) (Blum, 1984 ; Larbier et Leclercq, 1992). Cependant, les besoins en vitamine A chez le poulet augmentent avec la hausse de la température (Hofman, 2000).

Aucune vitamine n'est plus importante qu'une autre. La plus importante est celle qui risque de manquer dans un régime car elle constituerait alors un facteur limitant l'utilisation de l'ensemble de la ration (Blum, 1984).

3.1.5. Les besoins en minéraux

Les minéraux interviennent dans la constitution du squelette, de certains éléments de soutien et de la coquille des œufs.

Dans l'alimentation des volailles, le calcium et le phosphore sont de loin les plus importants. La disponibilité du calcium dans les sources biologiques telles que les coquilles de mollusques marins, les coquilles d'œufs... est généralement bonne.

Les besoins en magnésium chez les volailles sont largement couverts par les rations classiques à base de céréales et de tourteaux. L'excès de magnésium, par contre, provoquent des diarrhées et tendent à réduire l'utilisation du calcium et du phosphore (Blum, 1984 ; Larbier et Leclercq, 1992).

L'apport en sodium, potassium et chlore est raisonné de façon globale, dû au fait de leur implication dans les équilibres acido-basique et hydro-minéral des animaux. En l'absence de carence ou d'excès toxique d'un des éléments, la liaison peut être exprimée par la relation $Na + K - Cl$ qui doit être maintenue entre 230 et 300mEq/kg d'aliment (Blum, 1984).

Les oligo-éléments tels que le fer, cuivre, zinc, manganèse, cobalt, sélénium et molybdène présentent des intérêts dans l'alimentation. La supplémentation des régimes en ces oligo-éléments devient une pratique constante chez les volailles (Blum, 1984).

3.1.6. Les besoins en eau

Les besoins en eau pour la thermorégulation sont élevés en milieu tropical. L'eau permet aussi l'absorption d'éléments nutritifs et l'élimination des matières toxiques. Le manque d'eau peut provoquer une réduction de la consommation avec de graves retards de croissance et une forte baisse de la production d'œufs (Hofman, 2000).

3.1.7. Quelques recommandations pour l'alimentation avicole

Les besoins de l'animal sont fonctions de différents paramètres : son état physiologique, son état sanitaire, la température extérieure... Lors de la formulation de l'aliment, on adopte alors un certain nombre de marge de sécurité. Les recommandations tiennent compte de ces marges. Pour le poulet, quelques exemples de recommandations sont indiqués dans les Tableaux 8, 9 et 10 ci-après.

Tableau 8 : Apports recommandés de protéines, acides aminés et minéraux pour le poulet (non sexé ou mâle) au delà de 3 semaines en % du régime. (Source : Blum, 1984)

Concentration énergétique (kcal EM/kg)	2 900	3 000	3 100	3 200
Protéines brutes	18,20	18,90	19,50	20,10
Lysine	0,84	0,87	0,90	0,93
Méthionine	0,38	0,39	0,40	0,41
Acides aminés soufrés	0,69	0,71	0,73	0,75
Tryptophane	0,16	0,16	0,17	0,18
Thréonine	0,48	0,49	0,51	0,53
Glycine + sérine	1,33	1,37	1,42	1,47
Leucine	1,11	1,15	1,19	1,23
Isoleucine	0,63	0,65	0,67	0,69
Valine	0,55	0,57	0,59	0,61
Histidine	0,32	0,33	0,34	0,35
Arginine	0,86	0,89	0,92	0,95
Phénylalanine + tyrosine	1,06	1,09	1,13	1,17
Minéraux				
Calcium	0,80	0,83	0,87	0,90
Phosphore	0,60	0,61	0,62	0,64
Sodium	0,16	0,16	0,17	0,17
Chlore	0,14	0,14	0,15	0,15

Tableau 9 : Apports recommandés de protéines, acides aminés et minéraux pour le poulet (femelle) au delà de 3 semaines en % du régime. (Source : Blum, 1984)

Concentration énergétique (kcal EM/kg)	2 900	3 000	3 100
Protéines brutes	18,20	18,90	19,50
Lysine	0,74	0,77	0,80
Méthionine	0,34	0,35	0,36
Acides aminés soufrés	0,61	0,63	0,65
Tryptophane	0,14	0,15	0,15
Thréonine	0,42	0,44	0,45
Glycine + sérine	1,17	1,21	1,25
Leucine	0,98	1,02	1,05
Isoleucine	0,55	0,57	0,59
Valine	0,50	0,51	0,53
Histidine	0,29	0,29	0,30
Arginine	0,76	0,78	0,81
Phénylalanine + tyrosine	0,93	0,97	1,00
Minéraux			
Calcium	0,80	0,83	0,87
Phosphore	0,57	0,58	0,59
Sodium	0,16	0,16	0,17
Chlore	0,16	0,16	0,17

Tableau 10 : Apports recommandés en oligo-éléments chez le poulet. (Source : Blum, 1984)

Eléments minéraux	Démarrage et croissance	Finition
Oligominéraux (ppm)		
Fer	40,00	15,00
Cuivre	3,00	2,00
Zinc	40,00	20,00
Manganèse	70,00	60,00
Cobalt	0,20	0,20
Sélénium	0,10	0,10
Iode	1,00	1,00
Vitamines (UI/kg ou ppm)		
Vitamine A (UI)	10 000,00	10 000,00
Vitamine D3 (UI)	1 500,00	1 500,00
Vitamine E (ppm)	15,00	10,00
Vitamine K3 (ppm)	5,00	4,00
Thiamine (ppm)	0,50	-
Riboflavine (ppm)	4,00	4,00
Acide pantothénique (ppm)	5,00	5,00
Niacine (ppm)	25,00	15,00
Acide folique (ppm)	0,20	-
Vitamine B12 (ppm)	0,01	0,01
Chlorure de choline (ppm)	500,00	500,00

3.2. Aviculture à Madagascar

A Madagascar comme dans la plupart des pays en développement, plus de 80% du cheptel aviaire évolue dans le sous-secteur traditionnel. La poule de race locale du genre *Gallus*, élevée en liberté constitue la principale espèce exploitée (Koko *et al.*, 2004).

3.2.1. Alimentation

Dans le mode d'élevage traditionnel des poulets, les volailles se nourrissent d'elles-mêmes en puisant dans les milieux environnants leurs nourritures. Une supplémentation avec les déchets de cuisine, du riz ou de manioc, et de l'eau est attribuée. Selon une étude effectuée par Koko *et al.*, l'alimentation offerte par la nature est composée d'insectes, de vers de terre, de sauterelles et larves, de la verdure et de l'herbe, de graines, du sable (Koko *et al.*, 2002).

Dans les pays en voie de développement, la supplémentation d'aliments protéiques d'origine animale et végétale font souvent défaut dans les rations des poulets (Hofman, 2000).

3.2.2. Santé

L'aviculture est en progression rapide à Madagascar, mais elle doit surmonter des problèmes économiques (surcoût des intrants alimentaires importés, liés à la dévaluation du franc malgache) et sanitaires. On distingue 3 maladies principales qui affectent la performance des animaux en aviculture traditionnelle malgache:

- Les parasites qui provoquent la prostration avec ou sans dyspnée, la diarrhée et l'amaigrissement. D'après une étude effectuée par Koko *et al.*, le parasitisme serait la cause d'environ 38% de la mortalité chez les poussins.
- La maladie de Newcastle occupe le premier rang des maladies infectieuses. Elle est responsable de plus de 68,8% de mortalité chez les poussins et de 75% chez les adultes.
- Le choléra aviaire et la variole existent aussi, mais ils sont plus bénins que la maladie de Newcastle (Koko *et al.*, 2002).

3.2.3. Productivité

Une famille villageoise malgache possède en moyenne 11 poulets. La productivité de l'aviculture se traduit par une moyenne de 33 œufs par an et par poules. Vingt cinq pourcent des œufs sont destinés à la consommation domestique et 75% à la production de poussins, répartie sur environ 3 couvées par an, avec un taux d'éclosion de 78%. La première fonction

attribuée aux poulets est d'être une source de nourriture (50%); puis en seconde place de revenu monétaire (Koko *et al.*, 2002).

3.3. Co-produits de la mer et aviculture

Les co-produits de crevette constituent une source potentielle de protéines à moindre coût pour l'aviculture. Nombreux auteurs ont étudié la possibilité de leur utilisation en alimentation des poulets. Certains montrent l'efficacité de la farine de co-produits de crevette à proportion élevée. C'est le cas par exemple de la substitution de la farine de soja par la farine de co-produits de crevette pour le poulet (Rosenfeld *et al.*, 1997) et la poule pondeuse (Gernat, 2001). Cependant, d'autres auteurs ne recommandent pas l'utilisation de farine de co-produits de crevette comme seule source de protéines (Oduguwa *et al.*, 2004). En effet, ces auteurs ont effectué une étude sur la substitution de la farine de poisson avec la farine de co-produits de crevette dans la ration de poulets en démarrage et en finition. Il en ressortait que telle substitution n'est pas favorable pour la performance et la croissance des animaux. Ce fait a été attribué à la médiocre digestibilité par les animaux de la chitine contenue dans les co-produits de crevette.

4. MICROORGANISMES ET ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

4.1. Les microorganismes pathogènes aquacoles

En aquaculture, la maladie des poissons constitue un facteur qui influence la production et conduit à des conséquences économiques graves. En effet, très souvent, la maladie conduit à la perte massive de poissons.

De nombreuses bactéries pathogènes sont en effet à l'origine de maladies chez les poissons. Le genre *Vibrio* est, par exemple, présent dans la flore naturelle marine, et peut se retrouver dans l'intestin des animaux marins incluant les poissons. Il constitue une menace pour l'élevage de poissons en milieu marin, mais aussi pour les poissons d'eau douce nourris avec des matières premières d'origine marine. Les symptômes sont variables selon les espèces de *Vibrio*. L'espèce *Vibrio anguillarum* provoque un manque d'appétit, changement de couleur et gonflement des yeux chez les poissons; l'espèce *Vibrio alginolyticus* est naturellement présente dans les moules et provoque des infections chez les autres espèces de poissons de mer et chez l'homme (Euzéby, 2000).

L'espèce *Yersinia ruckeri* est une bactérie gram négative responsable d'infection chez les salmonidés, principalement chez les truites arc-en ciel. La maladie provoque des saignements de la bouche et des mandibules, et dans certains cas conduit directement à la mort rapide des poissons sans présenter préalablement de symptômes. La bactérie *Vagococcus salmonirum* est un microorganisme pathogène des salmonidés provoquant une perte d'appétit, un gonflement des yeux et du ventre, et conduisant dans un court délai à la mort (Euzéby, 2000).

4.2. Les microorganismes alimentaires

Les microorganismes impliqués dans l'alimentation peuvent être divisés en 2 catégories : ceux qui sont bénéfiques et ceux qui ne le sont pas.

Les microorganismes bénéfiques favorisent la valeur nutritionnelle ou les qualités organoleptiques de l'aliment. Ils sont utilisés en industrie alimentaire pour la transformation des aliments. On rencontre par exemple les bactéries lactiques comme l'espèce *Streptococcus thermophilus* utilisée pour la fabrication de yaourt et l'espèce *Lactococcus lactis* utilisée pour la fabrication de fromage. Les bactéries lactiques qui ne présentent pas de potentiel pathogène sont largement utilisées pour la fermentation des aliments tels que les produits laitiers, la choucroute, les saucisses...

Les microorganismes non bénéfiques sont ceux qui sont pathogènes. Ils peuvent également induire des effets non souhaités dans les aliments : diminution de la valeur nutritionnelle, détérioration du caractère organoleptique, production de toxines... (Bocquet, 1982).

4.3. Les peptides à activité antimicrobienne (PAMs)

Les PAMs sont des peptides natifs produits naturellement par l'organisme pour se défendre. Ils existent aussi bien dans le règne animal que végétal. Chez les organismes marins, ils peuvent être extraits pour leur potentialité de production de nouveaux antibiotiques (Haug *et al.*, 2002) et pour leur intérêt dans l'industrie alimentaire : en inhibant la prolifération de certains microorganismes, ils améliorent la conservation des aliments (Gálvez *et al.*, 2007).

En général, ce sont des peptides de petite taille possédant 6 à 50 résidus d'acides aminés et dont le poids moléculaire est compris entre 1 et 5 kDa. Due à leur faible proportion de glutamate et d'aspartate, et à la dominance de l'arginine, la lysine ou l'histidine, les PAMs sont le plus souvent cationiques avec une charge nette de +2 à +9. Ce sont des molécules amphiphiles avec 30 à 50% d'acides aminés hydrophobes (Fleury *et al.*, 2008). Actuellement,

il existe plus de 1000 PAMs d'origine différentes qui sont divisés en 4 groupes (Bulet *et al.*, 2004):

- **Les peptides cationiques à structure linéaire avec des hélices α , sans résidus de cystéine.** Ces peptides agissent contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et certains sont hémolytiques ou cytotoxiques. Ce groupe renferme plus de 300 peptides constitués d'environ 40 résidus d'acides aminés, ils sont fortement amphiphiles (Wakamatsu *et al.*, 2002). Le tableau 11 illustre quelques exemples de peptides antimicrobiens en hélice α isolés de vertébrés et d'invertébrés.

Tableau 11 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens en hélice α , de vertébrés et d'invertébrés. (Source : Defer, 2009)

	Origine	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Arthropodes	Papillon <i>Hyalophora cecropia</i> (Holak <i>et al.</i> , 1988)	Cécropine A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVA VVGQATQIAK	G ⁺ & G ⁻ , V, CC
		Abeille <i>Apis mellifera</i> (Kreil, 1973)	Méhitine	GIGA VLK VLT TGLPALISWIKRKRQQ	G ⁺ & G ⁻ , V, F, H, CC
		Mouche <i>Sarcophaga peregrina</i> (Iwai <i>et al.</i> , 1993)	Sarcotoxine IA	GWLLKIGKIKIERVGQHTRDATIQLGLIAQQAANVAATAR	G ⁺ & G ⁻
	Urocordés	Ascidie <i>Styela clava</i> (Lee <i>et al.</i> , 1997a; Zhao <i>et al.</i> , 1997)	Styéline A	GFGKAFHSVSNFAKKHKTA	G ⁺ & G ⁻
			Styéline B	GFGPAFHSVSNFAKKHKTA	
	Styéline C	GWFGKAFRSVSNFYKHKTYIHAGLSAATLL			
Styéline D	GWLRKAAKSVGKIFYKHKYYIKAAWQIGKHA				
Styéline E	GWLRKAAKSVGKIFYKHKYYIKAAWKIGKHA				
Urocordés	Ascidie <i>Styela clava</i> (Lee <i>et al.</i> , 1997b; Lee <i>et al.</i> , 2001)	Clavanine A	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF	G ⁺ & G ⁻	
		Clavanine B	VFQFLGRIIHHVGNFVHGFSHVF		
Clavanine C	VFHLLGKIIHHVGNFVYGFSHVF				
Clavanine D	AFKLLGRIIHHVGNFVYGFSHVF				
Clavanine E	LFKLLGKIIHHVGNFVYGFSHVF				
Vertébrés	Poissons	Bars <i>Morone saxatilis</i>	Moronécidine	FFHHIFRGIHV VGKTIHRLVTG	G ⁺ & G ⁻
		<i>Morone chrysops</i> (Lauth <i>et al.</i> , 2002)	Moronécidine	FFHHIFRGIHV VGKTIHKLVTG	
		Brème <i>Chrysophrys major</i> (Iijima <i>et al.</i> , 2003a)	Chrysophine-1	FFGWLIKGAIHACKAIHGLIHRRH	G ⁺ & G ⁻ , H
		Bar <i>Morone saxatilis</i> (Silphaduang & Noga, 2001)	Piscidine-1	FFHHIFRGIHV VGKTIHRLVTG	G ⁺ & G ⁻ , H
		Limande d'Amérique <i>Pleuronectes americanus</i> (Cole <i>et al.</i> , 1997)	Pleurocicine	GWGSFFKKAHV VGKHHVGAALTHYL	G ⁺ & G ⁻
Vertébrés	Amphibiens	Grenouille <i>Phyllomedusa bicolor</i> (Amiche <i>et al.</i> , 2000)	Dermatoxine	SLGSFLKGVGTTLASVGVVSDQFGKLLQAGQ	G ⁺ & G ⁻
		Xenope <i>Xenopus laevis</i> (Zaslouff, 1987)	Magainine 1	GIGKFLHSA GKF GKAFVGEIMKS	G ⁺ & G ⁻
			Magainine 2	GIGKFLHSAKFKGKAFVGEIMNS	
		Grenouille <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (Mor <i>et al.</i> , 1994) et	Dermaseptine-S1	ALWKTMLKELGTMLHAGKAAALGAAADTISQGTQ	G ⁺ & G ⁻ , V, F
		<i>Phyllomedusinae</i> sp. (Pierre <i>et al.</i> , 2000)	Phylloxine	GWMSKIASGIGTFLSGMQQ	G ⁺ & G ⁻
		Crapaud <i>Bombina variegata</i> (Csorjas & Michl, 1970)	Bombinine	GIGALSAGKALKGLAKGLAEHFAN	G ⁺ & G ⁻ , H
		Grenouille <i>Rana temporaria</i> (Simmaco <i>et al.</i> , 1996)	Temporine A	FLPLIGRVLSGIL	G ⁺
	Temporine B	LLPIVGNLLKSL			
	Temporine C	LLPILGNLLNLL			
	Temporine E	VLPIGNLLNLL			
Vertébrés	Mammifères	Homme <i>Homo sapiens</i> (Bals, 2000)	Cathélicidine LL-37	LLGDFFRK.SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	G ⁺ & G ⁻ , F
		Homme <i>Homo sapiens</i> (Raj <i>et al.</i> , 1998)	Histatine 5	DSHAKRRHGYKRFKFKHSHR.GY	G ⁺ & G ⁻ , F

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antiviral ; H : hémolytique ; CC : anti-cellules cancéreuses.

- Les peptides cycliques possédant des résidus de cystéine formant des ponts disulfure.** C'est l'oxydation de un ou plusieurs paires de résidus de cystéine qui est à l'origine de la formation des ponts disulfure. Selon le nombre de résidus cystéine impliqués dans ces ponts disulfure, on distingue la structure en feuillet β , la conformation en épingle à cheveux rigide (β –hairpin-like) ou la structure mixte hélice α et feuillet β . Le nombre de ponts disulfure varie d'un peptide à l'autre, de 1 pont jusqu'à plus de 5 ponts disulfure. Les peptides présentant un pont disulfure sont les plus petits peptides avec une structure β -hairpin-like. Le tableau 12 regroupe quelques exemples de ces peptides à 1 pont disulfure et le Tableau 13 montre des peptides antimicrobiens à 2 ponts disulfure.

Tableau 12 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 1 pont disulfure. (Source : Defer, 2009)

	Origine	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Arthropodes	Punaise <i>Podisus maculiventris</i> (Mandard <i>et al.</i> , 1998)	Thanatine	GSKKPVPIIYCNRRTGKCCRM	G ⁺ & G ⁻ , F
	Amphibiens	Grenouille verte <i>Rana esculentia</i> (Simmaco <i>et al.</i> , 1993)	Esculentine-1	GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNVQKEVGMDDVVRTGIDIA GCKIKGEC	G ⁺ & G ⁻ , F, H
		Grenouille verte <i>Rana esculentia</i> (Simmaco <i>et al.</i> , 1994)	Esculentine-1A	GIFSKLAGKKIKNLLISGLKNVQKEVGMDDVVRTGIDIA GCKIKGEC	G ⁺ & G ⁻ , H
		Grenouille japonaise <i>Rana brevipoda porso</i> (Monkawa <i>et al.</i> , 1992)	Brevinine-1	FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKKC	G ⁺ & G ⁻ , F
		Grenouille indienne <i>Rana tigrina</i> (Sai <i>et al.</i> , 2001)	Tigérinine-1	FCTMIPIRCY	G ⁺ & G ⁻
Grenouille européenne <i>Rana temporaria</i> (Goraya <i>et al.</i> , 1999)	Ranatuérine 1T	GLLSGLKKVQKHWAKNVAVSLMDSLKCKISGDC	G ⁺ & G ⁻		
Vertébrés	Mammifères	Bovin (neutrophiles) <i>Bos taurus</i> (Romeo <i>et al.</i> , 1988)	Bacténécine	RLCRIVVIRVCR	G ⁺ & G ⁻

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; H : hémolytique.

Tableau 13 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 2 ponts disulfure. (Source : Defer, 2009)

Origine	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Arthropodes	Limule <i>Tachypleus tridentatus</i> (Laederach <i>et al.</i> , 2002)	Tachyplésine I KWC [—] FRVC [—] YRGIC [—] YRRCR	G ⁺ & G ⁻ , V, CC
		Limule <i>Tachypleus tridentatus</i> (Miyata <i>et al.</i> , 1989)	Tachyplésine II RWC [—] FRVC [—] YRGIC [—] YRKCR	G ⁺ & G ⁻ ,
		Limules <i>Carcinoscorpius rotundicauda</i> et <i>Tachypleus gigas</i> (Muta <i>et al.</i> , 1990)	Tachyplésine III KWC [—] FRVC [—] YRGI [—] CYRKCR	G ⁺ & G ⁻ ,
		Limule <i>Limulus polyphemus</i> (Miyata <i>et al.</i> , 1989)	Polyphémusine I RRWC [—] FRVC [—] YRGI [—] CYRKCR	G ⁺ & G ⁻ , V
		Scorpion <i>Androctonus Australis</i> (Mandard <i>et al.</i> , 1999)	Androctonine RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY	G ⁺ & G ⁻ , F
	Araignée <i>Acanthoscurria gomesiana</i> (Silva <i>et al.</i> , 2000)	Gomésine ZCRRLCYKQRCVTYCRGR	G ⁺ & G ⁻ , V, F, H, F	
Vertébrés	Mammifères	Porc <i>Sus scrofa</i> (Kokryakov <i>et al.</i> , 1993)	Protégrine 2 RGGRLCYCRRRFCICV	G ⁺ & G ⁻ , V, F

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antiviral ; H : hémolytique ; CC : anti-cellules cancéreuses

Tableau 14 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens cycliques d'invertébrés et de vertébrés contenant 3/4 ponts disulfure. (Source : Defer, 2009)

Origine	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Arthropodes	Mouche à viande <i>Phormia terraenovae</i> (Lambert <i>et al.</i> , 1989)	Phormia Défensine A ATCDLLSGTGINHSACAHAHCLLRGNRGGYCNKGKGVCVCRN	G ⁺
		Mouche <i>Sarcophaga peregrina</i> (Yamada & Natori, 1993)	Sapécine D LTCEIDRSLCLLIICRLKGYLRA.YCSQQKVCRCVQ	G ⁺ & G ⁻ , H
		Termite <i>Pseudacanthotermes spiniger</i> (Da Silva <i>et al.</i> , 2003)	Termicine ACNEFQSCWATCQAQHSIVFRRAFCDRSDRSQCKCVFVRG	G ⁺ & G ⁻ , F
		Mouche <i>Drosophila melanogaster</i> (Landon <i>et al.</i> , 2000)	Drosomyicine DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSPSLKCWCCEGC	G ⁺ & G ⁻ , F
Poissons	Bars <i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i> (Shike <i>et al.</i> , 2002)	Hepcidine GCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF	G ⁻	
Vertébrés	Mammifères	Homme <i>Homo sapiens</i> (Hoover <i>et al.</i> , 2000)	β-Défensine 2 (HBD-2) GIGDPVTCCLKSGAICHVFVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	G ⁺ & G ⁻
		Homme <i>Homo sapiens</i> (Selsted <i>et al.</i> , 1985b)	α-Défensine (HNP-1) ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRWAFCC	G ⁻ & G ⁻ , V, F, CC
		Lapin <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Selsted <i>et al.</i> , 1985a)	α-Défensine (NP-5) VFCTCRGFLC GSGERASGSC TINGV RHTLCCRR	G ⁺ & G ⁻
		Singe <i>Macaca mulatta</i> (Tang <i>et al.</i> , 1999)	β-Défensine RTD-1 GFCPCLCRRGVCRICTR	G ⁺ & G ⁻ , V, F

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antiviral ; H : hémolytique ; CC : anti-cellules cancéreuses.

En ce qui concerne les PAMs à 3 ou 4 ponts disulfure, ils sont représentés principalement par la famille des défensines dont 70 peptides sont isolées chez les arthropodes (Bulet *et al.*, 2004). Les défensines possèdent un spectre d'activité contre les bactéries gram positives, avec une activité limitée contre les bactéries gram négatives et les champignons. Les pénaeidines identifiées chez les crustacés appartiennent également à ce groupe en présentant 3 ponts disulfures. Le Tableau 14 englobe quelques exemples de ces peptides

- Le troisième groupe est représenté par **les peptides riches en acides aminés spécifiques** tels que la proline, la glycine, l'arginine, le tryptophane, la phénylalanine et l'histidine. Ces peptides présentent une structure linéaire. Quelques exemples sont indiqués dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Caractéristiques générales de quelques peptides antimicrobiens d'invertébrés et de vertébrés riches en certains acides aminés. (Source : Defer, 2009)

	Origine	Composition	Organisme source	Peptide	Séquence	Activité
Invertébrés	Arthropodes	Riches en proline (P)	Abeille <i>Apis mellifera</i> (Casteels <i>et al.</i> , 1990)	Abaécine	YVPLPNVPQPGRRPFFTFPGQGPFNFKIKWPQGY	G ⁺ & G ⁻
			Fourmi <i>Myrmica gulosa</i> (Mackintosh <i>et al.</i> , 1998)	Formaécine 1	GRPNPVMNKPTFHPRL	G ⁻
			Papillon <i>Bombyx mori</i> (Hara & Yamakawa, 1995)	Léboécine 1	DLRFLYPRGKLPVPTFFPFNFKPIYIDMGNRY	G ⁺ & G ⁻
			Mouche <i>Drosophila melanogaster</i> (Bulet <i>et al.</i> , 1999)	Drosocécine	GKPRPYSPRFTSHPRPIRV	G ⁺ & G ⁻
	Urocordés	Riches en phénylalanine (F)	Ascide <i>Styela clava</i> (Lee <i>et al.</i> , 1997a)	Styéline A	GFGKAFHSVSNFAKKHKTA	G ⁺ & G ⁻
				Styéline B	GFGPAFHSVSNFAKKHKTA	G ⁺ & G ⁻
Vertébrés	Poissons	Riche en glycine (G)	Flétan de l'Atlantique <i>Hippoglossus hippoglossus</i> (Birkemo <i>et al.</i> , 2003)	Hipposine	SGRGKTGGKARAKAKTRSSRAGLQFFVGRVHRLLRKGN YAHRVGAGAPVYL	G ⁺ & G ⁻
	Mammifères	Riche en Proline (P)	Bovine neutrophils (Storici <i>et al.</i> , 1996)	Bacténécine 5 (bac5)	RFRPPIRPPIRPPFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPLGPPP	G ⁻
		Riche en Proline (P) et arginine (R)	Porc (Boman <i>et al.</i> , 1993)	PR-39	RRRPRPPYLPFRPPPPFPPLPFRIPPGFPPRFPFRFP	G ⁻
		Riches en tryptophane (T) et arginine (R)	bovine <i>Bos taurus</i> (Selsted <i>et al.</i> , 1992)	Indolicécine	ILPWKWPWWPWRR	G ⁺ & G ⁻ , V, F, H
			Cochons (Schibli <i>et al.</i> , 1999; Chan <i>et al.</i> , 2006)	Tritrypticécine	VRRFPWWPFLRR	G ⁺ & G ⁻ , F
Riche en histidine (H)	Homme <i>Homo sapiens</i> (Raj <i>et al.</i> , 1998)	Histatine 5	DSHAKRHHGYSKRKFHEKHHSHRGY	G ⁺ & G ⁻ , F		

Activités : G⁺ : anti-Gram⁺ ; G⁻ : anti-Gram⁻ ; F : antifongique ; V : antiviral ; H : hémolytique.

- **Les peptides contenant des acides aminés rares modifiés** constituent le dernier groupe des PAMs. Ce groupe réunit principalement les lantibiotiques qui sont produites par des bactéries gram positives, et les microcines produites par des bactéries gram négatives (Jack et Jung, 2000 ; Gillor *et al.*, 2004 cités par Defer, 2009). Chez les lantibiotiques, on note la présence d'acides aminés peu communs tels que des résidus de configuration D, des résidus formant des ponts thioéther tel que la lanthionine (Lan), 3-méthyllanthionine (MeLan), des déhydroaminoacides comme la 2,3 DéhydroAlanine (Dha), (Z)-2,3-déhydrobutirine (Dhb). Ces résidus sont issus de modifications post-traductionnelles de peptides précurseurs codés par des gènes structuraux. Les lantibiotiques présentent des spécificités structurales : linéaires ou globulaires. Comme exemple de lantibiotiques, on peut noter la nisine qui a été découverte en 1927 et produite par *Lactococcus lactis*. C'est la plus ancienne et la plus connue des peptides antimicrobiens (Fleury *et al.*, 2008). La nisine est utilisée comme conservateur alimentaire (E 234). En ce qui concerne les microcines, on note une modification sur des résidus sérine et cystéine avec le groupement carboxyle d'un résidu glycine pour former un résidu modifié thiazole (2-aminoéthylthiazole-4-acide carboxylique) ou oxazole (2-aminoéthylloxazole-4-acide carboxylique). Ils sont généralement hydrophobes et possèdent une grande stabilité à la chaleur, au pH extrême et aux protéases (Duquesne *et al.*, 2007 cité par Defer, 2009).

4.3.1. Les PAMs d'origine marine

Plusieurs peptides à activité antimicrobienne ont été isolés des produits de la mer, aussi bien des invertébrés que des vertébrés. Chez les invertébrés, entre autres, l'existence de ces peptides a été révélée chez les bivalves et les gastropodes (Defer *et al.*, 2009). Pour les vertébrés, les PAMs identifiés sont des peptides de structure linéaire en hélice α comme les pleurocidines, les moronecidines et piscidines (Tableau 16); ainsi que des peptides cycliques riches en cystéine, notamment les hepcidines (Tableau 17).

Tableau 16 : PAMs à structure linéaire en hélice α , isolés des poissons. (Source : Fleury *et al.*, 2008)

Nom	Espèce d'origine	Organe source	Séquence	Activité	Références
Pleurocidines					
WF1	<i>Pleuronectes americanus</i>	Muqueuse de la peau	GWGSFFKKAHVGVGKAALTHYL	F, G	Cole <i>et al.</i> , 1997
WF2	<i>Pleuronectes americanus</i>	Muqueuse de la peau	GWGSFFKKAHVGVGKAALTHYLG	F, G, C	Douglas <i>et al.</i> , 2003
WFIL	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Muqueuse de la peau	GKGRWLDRIKAGGIIIGGALDHL	F, G, C	Douglas <i>et al.</i> , 2003
WFX	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Muqueuse de la peau	RSTEDIIKSISGGFLNAMNA	F, G, C	Douglas <i>et al.</i> , 2003
WFY	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Muqueuse de la peau	FLGFLFHGIRHGKAIHGMIH	F, G, C	Douglas <i>et al.</i> , 2003
WF3	<i>Pleuronectes americanus</i>	Muqueuse de la peau	FLGALIKGAIHGGRFIHGMIQNH	F, G, C	Douglas <i>et al.</i> , 2001
WF4	<i>Pleuronectes americanus</i>	Muqueuse de la peau	GWGSIFKHGRHAAKHIGHAAVNHYL	F, G, C	Douglas <i>et al.</i> , 2001
Moronecidine					
Moronecidine	<i>Morone chrysops</i>	Ouïe et peau	FFHHIFRGIVHVGKTIHKLVTG	F, G, C	Lauth <i>et al.</i> , 2002
Moronecidine	<i>Morone saxatilis</i>	Ouïe et peau	FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTG	F, G, C	Lauth <i>et al.</i> , 2002
Dicentracine	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Librairie cDNA	FFHHIFRGIVHVGKSIHKLVTG	Non déterminé	Salerno <i>et al.</i> , 2007
Piscidine					
Piscidine-1	<i>Morone saxatilis</i>	Ouïe et peau	FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTG	F, G, C	Lauth <i>et al.</i> , 2002
Piscidine-2	<i>Morone saxatilis</i>	Ouïe et peau	FFHHIFRGIVHVGKTIHKLVTG	F, G, C, V	Campagna <i>et al.</i> , 2007
Piscidine-3	<i>Morone chrysops</i> <i>Morone saxatilis</i>	Cellules de l'ouïe Peau, intestin et vaisseaux sanguins des viscères	FIHHIFRGIVHAGRSIGRFLTG	F, G	Silphaduang <i>et al.</i> , 2001

F : Firmicutes ; G : Gracillicutes ; C : Champignons ; V : Virus.

Tableau 17 : PAMs cycliques riches en cystéine isolés des poisons: Hecidines. (Source : Fleury *et al.*, 2008)

Espèce d'origine	Isolé de	Séquence	Activité
<i>Salmo salar</i>	Ouïe et peau	RFKRQIHLSLCGLCCNCCHNIGCGFCK	Gracillicutes/Champignons
<i>Ictalurus punctatus</i>	Librairie cDNA	QSHLSLCRYCCNCCKNKGCGFCCRF	Gracillicutes/Champignons
<i>Salmo salar</i>	Librairie cDNA	QSHLSLCRWCCNCCHNKGCGFCKF	Gracillicutes/Champignons
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Librairie cDNA	QSHLSLCRWCCNCCHNKGCGFCKF	Gracillicutes/Champignons
<i>Osmerus mordax</i>	Librairie cDNA	QSHLSLCRWCCNCCHNKGCGFCCRF	Gracillicutes/Champignons
<i>Seriola quinqueradiata</i>	Librairie cDNA	QSHLSMCRWCCNCCTANKGCGFCCRF	Gracillicutes/Champignons
<i>Hybrid striped bass</i>	Librairie cDNA	HSSPGGCRFCCNCCPNMSGCGVCCRF	Gracillicutes/Champignons
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Librairie cDNA	GFKCKFCCGCCRPGVCGLCRRF	Gracillicutes/Champignons
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Librairie cDNA	GFKCKFCCGCCRAGVCGLCCKF	Gracillicutes/Champignons
<i>Lateolabrax japonicus</i>	Librairie cDNA	AIKCKFCCGCTPGVCGVCCRF	Gracillicutes/Champignons

4.3.2. Les PAMs des crustacés

Chez les crustacés, les peptides à activité antimicrobienne peuvent être divisés en 3 classes : les pénaeidines, les crustines et les post-peptides obtenus après hydrolyse enzymatique de protéines natives inactives (Fleury *et al.*, 2008).

Les pénaeidines sont très cationiques et comprennent un groupement N-terminal riche en proline et un groupement C-terminal contenant 6 résidus de cystéine en 2 doublets (Gueguen *et al.*, 2006). Ils sont constitués d'environ 50 à 67 résidus d'acides aminés et possèdent un poids moléculaire de 5,5 à 6,6 kDa (Destoumieux *et al.*, 1997a). Les pénaeidines sont localisés dans les hémocytes des crevettes et à la suite d'invasion microbienne, ils sont largués dans le sang ou sur la cuticule par liaison avec la chitine (Munoz *et al.*, 2002). Les pénaeidines possèdent majoritairement des activités contre les bactéries gram-positives (Cuthbertson *et al.*, 2002; Destoumieux *et al.*, 1997), mais aussi contre les champignons (Cuthbertson *et al.*, 2002 ; Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001; Gueguen *et al.*, 2006). Quelques exemples de peptides appartenant à la classe des pénaeidines sont présentés dans le Tableau 18.

Les crustines sont également identifiées chez les crustacés. Elles ont été isolées chez les crabes, les crevettes et les homards. Elles sont volumineuses et présentent un poids moléculaire supérieur à 10 kDa avec des résidus d'acides aminés de 84 à 144. Les crustines sont considérées comme des protéines antimicrobiennes (Fleury *et al.*, 2008). Comme exemples, chez les crevettes *Litopenaeus vannamei* et *Litopenaeus setiferus*, différentes isoformes de crustine ont été identifiées : Crustine Lv1-Lv3 et crustine Ls1-Ls3 respectivement chez les 2 espèces. Ces protéines antimicrobiennes possèdent un poids moléculaire de 11,5 kDa (Bartlett *et al.*, 2002). La crustine a été également identifiée chez le homard *Homarus gamarus*, (Hauton *et al.*, 2006).

Tableau 18: Pénaeidines isolées chez différentes espèces de crevette. (Fleury et al., 2008)

Nom	Espèce source	Séquence	Références
Pénaeidines-1	<i>Penaeus vannamei</i>	YRGGYTGPIPRPPPIGRPPLRLWCACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK	Destoumieux et al., 1997b
Penaeidin-2	<i>Penaeus vannamei</i>	YRGGYTGPIPRPPPIGRPPFRPVCNACYRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVK	Destoumieux et al., 1997b
<i>Litvan</i> PEN2-1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	EAYRGGYTGPIPRPPPIGRPPFRPVCNAYCRLSVSDARNCCIKFGSCCHLVKG	Destoumieux et al., 1997b
<i>Litset</i> PEN2-1	<i>Litopenaeus setiferus</i>	GAQRGGFTGPIPRPPPHGRPPLGPICNACYRLSFSVDVRICCNFLGKCCHLVKG	Cuthbertson et al., 2002
<i>Litsty</i> PEN2-1	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	EAYRGGYTGPIPRPPPYGRPPLGPVCNHCYRLAFDPDARNCCSRFGRCCHLVKG	Munoz et al., 2004
<i>Litsch</i> PEN2-1	<i>Litopenaeus schmitti</i>	GAHRGGFTGPIPRPPPHGRPPLGPICNACYRLSFSVDVRICCNFLGKCCHLVKG	penbase
<i>Farpau</i> PEN2-1	<i>Farfantopenaeus paulensis</i>	HGYKGGYTRPFSRPPFFGGIYRFPVRPACNACYSISFSDALNCCTRFGRCCQIRKG	penbase
Penaeidin-3	<i>Penaeus vannamei</i>	VYRGGYTRPIPRPPPFVRLPFGGPIGPYNGCPVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCHVKGKYS	Destoumieux et al., 1997b
<i>Litvan</i> PEN3-1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	QVYKGGYTRPIPRPPPFVRLPFGGPIGPYNGCPVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCHVKGKYS	Destoumieux et al., 1997b
<i>Litset</i> PEN3-1	<i>Litopenaeus setiferus</i>	QGYKGPYTRPILRPYVRPWSYNVCTLSCRGITTTQARSCCTRLGRCCHVAKGYS	Cuthbertson et al., 2002
<i>Litsty</i> PEN3-1	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	GYPKGGYTPWRPFVRLPGRPFVTPIGRPWSGNVCPVSCRGITTTQARSCCSRLGRCCREAKGYS	Munoz et al., 2004
<i>Penmon</i> PEN3-1	<i>Penaeus monodon</i>	QGYQGGYTRPFRPTYPGGYHPVPVCTSCHRLSPLQARACCRQLGRCCDAKQTYG	Supungul et al., 2004
<i>Fenchi</i> PEN3-1	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	QKGGYTRPISRPPYGGYGNVCTSCHVLTTSQARSCCSRFGRCCVPRRGYS	Kang et al., 2004
<i>Pensem</i> PEN3-1	<i>Penaeus semisulcatus</i>	QVYQGGYTRPFSRPSYGGYVSRPGTVCASCPVLSSPQARSCCRQLGRCCVR	Munoz et al., 2004
Penaeidin-4	<i>Litopenaeus setiferus</i>	HSSGYTRPLRKPSRPIFIRPIGCDVGYGIPSSSTARLCCFRYGDCCHLX	Cuthbertson et al., 2005
<i>Litset</i> PEN4-1	<i>Litopenaeus setiferus</i>	HSSGYTRPLRKPSRPIFIRPIGCDVGYGIPSSSTARLCCFRYGDCCHLG	Cuthbertson et al., 2002
<i>Litvan</i> PEN4-1	<i>Litopenaeus vannamei</i>	HSSGYTRPLPKPSRPIFIRPIGCDVGYGIPSSSTARLCCFRYGDCCHRG	Cuthbertson et al., 2002
<i>Litvan</i> PEN4-2	<i>Litopenaeus vannamei</i>	YSSGYTRPLPKPSRPIFIRPIGCDVGYGIPSSSTARLCCFRYGDCCHRG	Cuthbertson et al., 2002
<i>Litsch</i> PEN4-1	<i>Litopenaeus schmitti</i>	HSSGYTRPLPKPSRPIFIRPIGCDVGYGIPSSSTARLCCFRYGDCCHLG	penbase

4.3.3. Les Post-peptides

Le clivage in vivo de protéines inactives par protéolyse peut générer des peptides antimicrobiens. Ce sont les post-peptides antimicrobiens. Dans le monde marin, plusieurs de ces molécules ont été générés chez les crustacés tels que les crevettes, les langoustes, mais aussi chez les poissons tels que le flétan, la morue, le saumon. Les post-peptides sont dérivés essentiellement des histones et de l'hémocyanine (Fleury *et al.*, 2008).

Les histones sont des protéines très cationiques et thermorésistantes entrant dans la structure de la chromatine. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont relativement immobiles par rapport aux histones H1 et H5. Parmi les post-peptides antimicrobiens dérivés des histones, on peut citer la buforine isolée de l'estomac de crapaud asiatique, la parasine I de la muqueuse intestinale de Catfish, et l'hipposine de la peau de flétan. Ces peptides sont toutes les 3 actives contre les Gracillicutes et les Firmicutes tandis que la parasine possède en plus une activité antifongique. Deux peptides ont été également isolés de l'histone H1 : Oncorhyncine I et Oncorhyncine II chez le saumon atlantique et la truite arc-en ciel. Ces 2 post-peptides possèdent des activités contre les Firmicutes et les Gracillicutes (Tableau 19).

Des post-peptides dérivés des hémocyanines ont été également rapportés dans la littérature. Les hémocyanines, contenant des protéines, sont des transporteurs d'oxygènes extracellulaires. Elles sont rencontrées dans l'hémolymphe des mollusques et des arthropodes. La protéolyse de l'hémocyanine chez les écrevisses *Pacifastacus leniusculus*, chez les crevettes *Penaeus vannamei* et *P. stylirostris* a engendré la production de post-peptides antimicrobiens. L'atacine a été isolée chez l'écrevisse. Elle possède 16 résidus et présente un large spectre d'activité antibactérienne. Par contre, le PvHct isolé chez *P. vannamei* ainsi que le PsHCt1 et PvHCt2 isolés chez *P. stylirostris* possèdent une activité exclusivement antifongique (Tableau 19).

A part l'extraction in vivo, la production de post-peptides antimicrobiens à partir des hémocyanines est également utilisée par ces organismes dans la défense immunitaire. En cas d'infection, les hémocyanines sont en effet, soit converties en phenoloxydase, une enzyme qui entre dans la défense immunitaire, soit génèrent des post-peptides antimicrobiens.

Tableau 19: Post-peptides antimicrobiens isolés chez des espèces aquatiques. (Source : Fleury *et al.*, 2008)

Nom	Producteur	Fragment de	Séquence	Activité	Références
Oncorhyncines					
Oncorhyncine-I	<i>O. mykiss</i>	Histone HI	SKGKKANKDVELARG	F	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
Oncorhyncine II	<i>O. mykiss</i>	Histone HI	KAVAAKKSPKKA.KKPATPKKJ\AKSPKKVKKPAAAAKKA AKSPKKATKAAKPKAAKPKAAKAKKAAPKKK	F,G	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
SAMP HI	<i>Salmo salar</i>	Histone HI	AEVAPAPAAAAPAKAPKKKAAAKPKKAGPS	F,G	Luders <i>et al.</i> , 2005
Buforine					
Buforine I	<i>Bufo bufo</i>	Histone H2A	AGRKGQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNV	F,G, C	Park <i>et al.</i> , 1996
Parasine					
Parasine I	<i>Ps. asotus</i>	Histone H2A	KGRKGQGGKVRAKAKTRSS	F,G, C	Park <i>et al.</i> , 1998
Hipposine					
Hipposine	<i>H. hippoglossus</i>	Histone H2A	SGRGKTGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNV AHRVGAGAPVYL	F,G	Birkemo <i>et al.</i> , 2003
Astacidines					
Astacidine 1	<i>Pf. leniusculus</i>	Hémocyanine	RKVQNQHGWKIFHH	F,G	Lee <i>et al.</i> , 2003
Astacidine 2	<i>Pf. leniusculus</i>	Hémocyanine	RPRPNYRPRPIYRP	F,G	Jiravanichpaisal <i>et al.</i> , 2007
PvHct	<i>Penaeus vannamei</i>	Hémocyanine	FEDLPNFGHIQVKVFNHGEHIIH	C	Destoumieux-Garzon <i>et al.</i> , 2001
PvHct1	<i>Penaeus stylirostris</i>	Hémocyanine	VTGDADSAVPLHENTEYNHYGSHGVYDPK	C	Destoumieux-Garzon <i>et al.</i> , 2001
PvHct2	<i>Penaeus stylirostris</i>	Hémocyanine	LWAVTDGDADSAVPLHENTEYNHYGSHGVY	C	Destoumieux-Garzon <i>et al.</i> , 2001

O. : *Oncorhynchus* ; *Ps.* : *Parasilurus* ; *H.* : *Hippoglossus* ; *Pf.* : *Pacifastacus* ; F : Firmicutes ; G : Gracillicutes ; C : Champignons.

4.4. Mécanisme d'action des PAMs

Pour exercer leur activité antimicrobienne, les PAMs agissent directement sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles et provoquent un phénomène d'osmose conduisant à la lyse de la cellule. Ils peuvent également agir par inhibition de la synthèse protéique, de la synthèse d'ADN, des activités enzymatiques ou de la perturbation dans la fonction de la paroi. Les PAMs qui sont généralement cationiques interagissent avec la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques qui contient des phospholipides amphiphiles : têtes hydrophiles extérieures et chaînes alkyles hydrophobes à l'intérieur. Notons que la membrane des cellules eucaryotes possède une charge neutre tandis que celle des bactéries gram négatives et des bactéries gram positives possède des phospholipides hydroxylés, dû à la présence de lipopolysaccharide pour les gram négatives et d'acide lopitéichoïque pour les bactéries gram positives, qui ancrent la paroi cellulaire. Les cellules fongiques possèdent également des phospholipides chargés négativement à leur paroi par la présence de phosphatidylinositol ou de (1,3)-b-D-glucanes polymérisés. L'interaction entre les PAMs et la membrane cellulaire est alors assurée par la charge nette externe des phospholipides de la membrane et la distribution des charges des peptides (Defer, 2009). Par ailleurs, des interactions ligand-récepteur avec les peptides peuvent avoir lieu pour la reconnaissance des PAMs. C'est le cas par exemple de la nisine (Daffre *et al.*, 2008 cité par Defer, 2009).

Le mécanisme d'action des PAMs se déroule en 3 étapes : La fixation initiale qui dépend de la concentration du peptide et sa capacité de s'auto-structurer, l'intégration dans la membrane et l'aboutissement à la mort cellulaire (Daffre *et al.*, 2008 cité par Defer, 2009). On distingue 4 modes d'action différents (Jenssen *et al.*, 2006 cité par Defer, 2009):

- **Le mode d'action en tapis (« carpet-like model »)** qui consiste au recouvrement de la membrane par les peptides d'une façon parallèle, les résidus hydrophobes face à la membrane. Ce qui conduit à la réorientation des résidus hydrophiles des phospholipides membranaires, puis dépoliarisation membranaire et rupture de la membrane provoquant la formation de pores et fuites des métabolites cytoplasmiques, ou rupture totale de la membrane et mort cellulaire. Ce mode d'action a été examiné avec la cécropine P1 et les dermoseptines.

- **Le mode d'action des pores en douves de tonneau (« barrel stave model »)** concerne les peptides en hélice α amphipathiques. Les surfaces hydrophobes se lient avec la partie lipidique de la membrane et les surfaces hydrophiles se tournent et pénètrent vers l'intérieur pour former un pore aqueux. Les canaux transmembranaires ainsi formés détruisent les équilibres osmotiques, conduisant à la lyse de la cellule. C'est le cas de la paradoxine, de l'alméthicine et des endotoxines.
- **Le mode d'action par formation de pores toroïdaux (« wormhole model »)** consiste à l'enfouissement des parties hydrophobes des peptides, provoquant le déplacement des têtes hydrophiles des phospholipides et la courbure de la membrane. Lorsqu'un certain ratio peptide/lipide est atteint, la tension engendrée provoque le basculement des peptides perpendiculairement à la membrane, entraînant la naissance de pores mixtes : phospholipides et peptides amphiphiles. La présence de têtes hydrophiles des phospholipides chargés négativement à l'intérieur des pores contribue à les stabiliser en limitant les phénomènes de répulsion électrostatique. C'est le cas des magainines, mélittine et nisine.
- **Le mode d'action par formation d'agrégats (« aggregate channel model »)** se traduit par le regroupement des peptides sans orientation particulière, conduisant à la formation d'agrégats de type micellaires associés aux phospholipides. Ces complexes peptide/lipide sont capables de traverser la bicouche lipidique et de conduire le peptide à l'intérieur de la cellule. Ce mode d'action est utilisé pour des cibles cytoplasmiques. C'est le cas de la polyphémusine I.

•

CHAPITRE 2. HYDROLYSES ENZYMATIQUES : CRIBLAGE DES DIFFERENTES ENZYMES

1. INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à la réalisation d'hydrolyses enzymatiques de co-produits de crevette par différentes enzymes commerciales qui fonctionnent à pH extrême (acide et basique). Ces types d'enzyme sont choisis pour cette étude car les conditions de pH extrême favorisent l'extraction de la chitine contenue dans l'exosquelette des crevettes. Elles permettent également l'inhibition de la prolifération microbienne. L'objectif de ce chapitre est de déterminer l'enzyme la mieux adaptée pour la valorisation des co-produits. Différents paramètres sont analysés :

- le temps nécessaire à l'enzyme pour hydrolyser totalement la matière première
- la solubilisation de la matière première
- l'extraction et la solubilisation des protéines
- l'extraction des lipides
- la qualité des acides aminés et des peptides dans les hydrolysats

Les hydrolyses sont effectuées seulement sur une seule catégorie de co-produits (co-produits d'élevage). L'enzyme la plus appropriée sera par la suite utilisée pour les 2 catégories de co-produits (sauvage et élevage) dans le troisième chapitre.

L'étude se déroule en 3 parties : La première consiste à la détermination de la composition des co-produits de crevette ; la deuxième et la troisième partie concernent la conduite d'hydrolyses enzymatiques. Dans un premier temps, chaque enzyme va être étudiée séparément à leurs conditions d'activité optimale pendant 22 heures. Ensuite, pour une seule hydrolyse, 2 conditions de pH vont être effectuées consécutivement avec 2 enzymes différentes. La figure 12 résume les différentes hydrolyses enzymatiques effectuées, les traitements ainsi que les analyses effectuées sur les fractions obtenues.

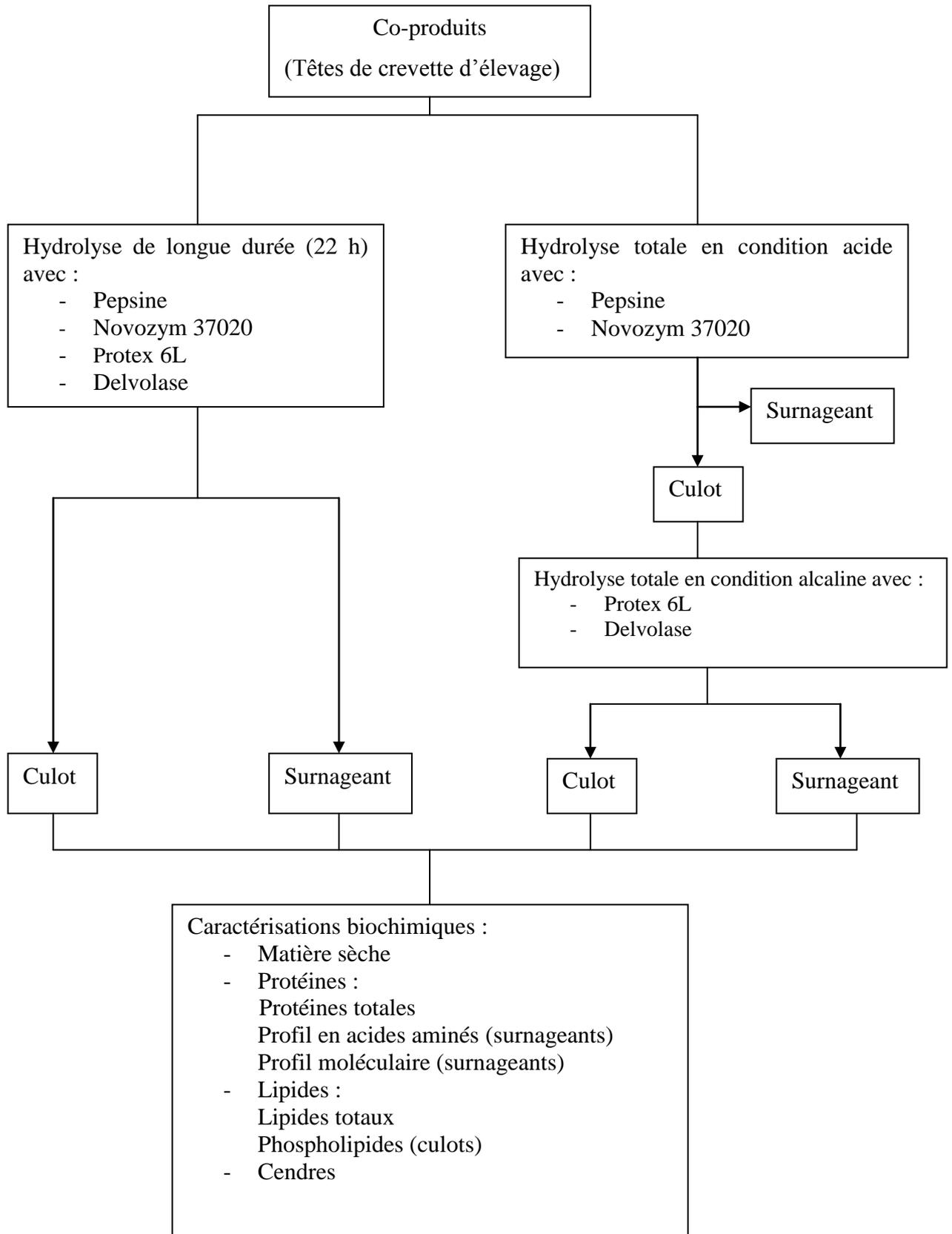


Figure 12 : Hydrolyses enzymatiques de co-produits de crevette d'élevage.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Co-produits de crevette : origine et collecte

Les co-produits de crevette utilisés lors de cette étude sont constitués principalement par les têtes (partie céphalothoracique) (Figure 13) générées lors de transformation industrielle. Ils ont été gracieusement fournis par la société UNIMA[®] Madagascar.

Deux catégories de têtes de crevette sont étudiées au cours de l'étude : des têtes de crevette sauvage pêchée dans le Nord-ouest de l'île (Figure 14) et les têtes de crevette d'élevage (*Penaeus monodon*) collectées à l'Ouest de Madagascar (Figure 15). Trois collectes ont été effectuées au cours de l'étude : en août 2005, en juillet 2007 et en juillet 2008. Dans ce chapitre, seules les têtes de crevette d'élevage sont étudiées pour les hydrolyses enzymatiques.

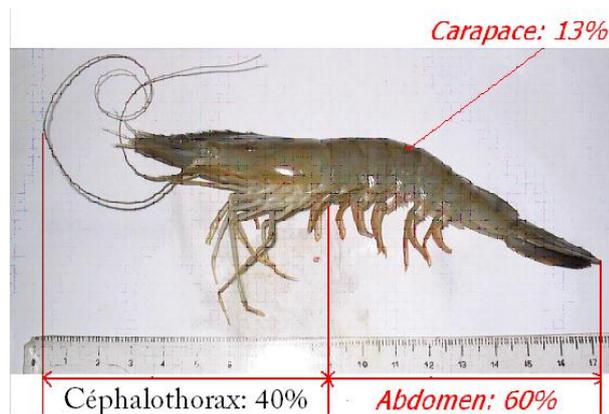


Figure 13 : Les différentes parties de la crevette.



Figure 14 : Têtes de crevette sauvage.



Figure 15 : Têtes de crevette d'élevage.

2.1.2. Homogénéisation et conservation des co-produits

Les têtes de crevettes collectées sont conservées dans des sacs en plastique par aliquote de 100 g et de 500 g. Les aliquotes sont ensuite placées à -20°C. Avant leur utilisation, elles sont décongelées puis broyées dans un blender (Waring Commercial, USA).

2.2. Matériel enzymatique

Quatre endopeptidases sont utilisées pour les hydrolyses : 2 enzymes actives en milieu acide : Pepsine et Novozym 37020 ; 2 enzymes fonctionnant en milieu alcalin : Protex 6L et Delvolase.

2.2.1. Pepsine (EC. 3.4.23.1)

La Pepsine est une endopeptidase extraite de la muqueuse gastrique porcine, fournie par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). La Pepsine fonctionne en milieu acide. Le pH exigé est de 2 et la température optimale 40°C. Le ratio enzyme/substrat est de 0,5%.

2.2.2. Novozym 37020

Novozym 37020 est une protéase active en milieu acide. Elle est issue de la fermentation par des microorganismes génétiquement modifiés. Ce produit est procuré par Novozymes (Bagsvaerd, Danemark). L'activité de la Novozym 37020 atteint son optimum à pH 3 et à 50°C avec un ratio enzyme/substrat de 0,5%.

2.2.3. Protex 6L (EC 3.4.23.62)

Protex 6L est une enzyme active en milieu basique procurée par DSM Food Specialties (New York, USA). Elle a une activité maximale à pH 9,5 et à 60°C. La quantité d'enzyme utilisée lors des hydrolyses de têtes de crevette est de 2% par rapport au substrat.

2.2.4. Delvolase (EC. 3.4.21.14)

La Delvolase est un mélange industriel d'enzymes, procuré par Genecor International (Seclin, France). Il s'agit d'une endopeptidase extraite de *Bacillus licheniformis* (Famille des Bacillaceae). Elle exige un milieu basique pour être active. Son activité est optimale à pH 10, à 60°C avec un ratio enzyme/substrat de 1%.

2.3. Hydrolyses de longue durée

2.3.1. Principe

Au cours d'une hydrolyse enzymatique, les liaisons peptidiques entre 2 acides aminés sont clivées. Cette réaction est catalysée par une enzyme et donne naissance à au moins 2 peptides. Un proton H^+ est ainsi libéré (Figure 16), conduisant à l'acidification du milieu. Le degré de dissociation des ions $R-N^+H_3$ est suffisant à pH supérieur à 6,5 (Ravallec-Plé *et al.*, 2000). Lorsque le pH est inférieur, la réaction s'inverse alors et ce sont les ions OH^- qui seront libérés.

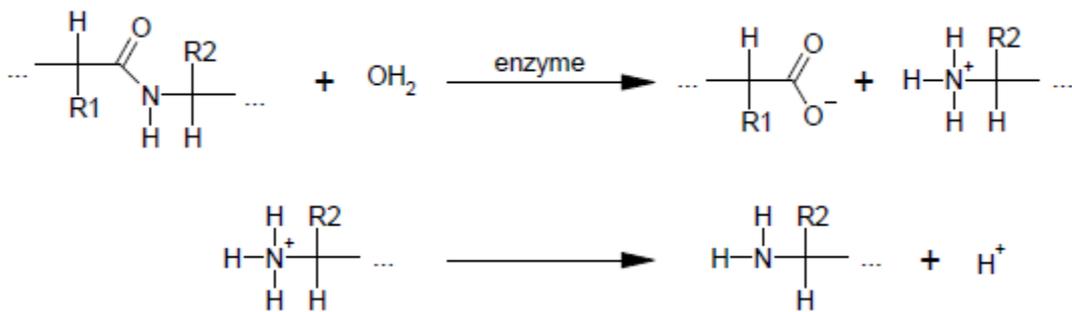


Figure 16 : Schéma réactionnel de la libération de proton H^+ lors de l'hydrolyse enzymatique à $pH > 6,5$.

Des hydrolyses enzymatiques sont effectuées afin d'identifier l'enzyme la plus efficace pour séparer les différentes substances contenues dans les têtes de crevette. Chaque hydrolyse est réalisée suivant les conditions optimales d'activité de l'enzyme. L'hydrolyse est réalisée selon le processus utilisé par Dumay (2006), Nguyen (2009) et Kechaou (2007) avec quelques modifications.

2.3.2. Déroulement de l'hydrolyse

Pour chaque hydrolyse, environ 100 g de têtes de crevette d'élevage sont utilisés. Elles sont broyées et versées dans un bioréacteur dans lequel l'hydrolyse va avoir lieu, puis diluées avec de l'eau distillée et agitées. L'ensemble est chauffé à la température optimale d'activité de l'enzyme. Ensuite, le pH est ajusté au pH d'activité optimale de l'enzyme, par addition de HCl 2N pour la Pepsine et la Novozym 37020 ; ou par addition de NaOH 2N dans le cas de la Protex 6L et la Delvolase. La somme du volume de l'eau de dilution et de celui de l'acide ou

de la soude ajouté correspond au poids du substrat, ramenant ainsi à une dilution 2 fois des têtes de crevette.

Lorsque les conditions d'activité optimale (décrites dans le § 2.2) sont atteintes, l'enzyme est ajoutée. L'activité spécifique étant différente d'une enzyme à l'autre, le ratio enzyme/substrat employé n'est pas identique pour chaque enzyme pour avoir une activité optimale. Ainsi, la quantité par rapport à la masse du substrat est de 0,5% pour la Pepsine et la Novozym 37020, 2% pour la Protex 6L et 1% pour la Delvolase. Pour chaque enzyme, l'hydrolyse dure 22 heures.

Pendant l'hydrolyse, le pH est ajusté au pH d'activité optimale de l'enzyme par addition de HCl 2N pour la Novozym 37020 et la Pepsine, par addition de soude 2N pour la Protex 6L et la Delvolase.

2.3.3. Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH) est estimée par le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques coupées (h) par rapport au nombre de liaisons peptidiques totales (h_{tot}) contenu dans les têtes de crevette. Il est obtenu par la formule :

$$\%DH = (h/h_{tot}) \times 100$$

Où h_{tot} équivaut à 8,6 meq/kg de protéines (Adler-Nissen, 1986) et h correspond au nombre de liaisons peptidiques coupées pendant l'hydrolyse enzymatique.

Selon Adler-Nissen (1977), quand le pH réactionnel est au-dessus du pKa du groupement α -NH₂, le DH est obtenu suivant l'équation :

$$\%DH = (h/h_{tot}) \times 100 = (BN_b / \alpha h_{tot}MP) \times 100$$

Où B représente la quantité de base en ml ; N_b la normalité de la base ; α le facteur de dissociation du groupement α -NH₂ et MP la masse de protéines en grammes.

Selon Zhao *et al.* (1996), quand le pH réactionnel est inférieur au pKa du groupement α -NH₂, le DH est obtenu suivant l'équation :

$$\%DH = (h/h_{tot}) \times 100 = (AN_a / (1 - \alpha) h_{tot}MP) \times 100$$

Où A désigne la quantité d'acide en ml et N_a la normalité de l'acide.

Le degré de dissociation α est estimé suivant la formule :

$$\alpha = (10^{pH - pK}) / (1 + 10^{pH - pK})$$

Le pK à différentes températures (Kelvin) est calculé selon l'Equation suivante (Steinhardt et Beychock, 1964)

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 T} \cdot 2400$$

2.3.4. Arrêt de l'hydrolyse

Après 22 heures, on arrête l'hydrolyse par inactivation de l'enzyme. Pour la Novozym 37020, la Protex 6L et la Delvolase, l'inactivation se fait par la chaleur. Pour ce faire, le bioréacteur est placé dans un bain marie de 80°C pendant 25 minutes, 85°C pendant 20 minutes et 90°C pendant 20 minutes, respectivement pour la Novozym 37020, la Protex 6L et la Delvolase. Pour l'hydrolyse en présence de Pepsine, l'arrêt de la réaction est effectué par neutralisation du milieu avec de la soude 5N.

2.3.5. Traitement des hydrolysats

2.3.5.1. Centrifugation

Après inactivation de l'enzyme et refroidissement de la préparation, cette dernière est centrifugée à 10 000 g pendant 20 minutes à 4°C dans une centrifugeuse JOUAN (France).

2.3.5.2. Lyophilisation

Le surnageant, qui constitue l'hydrolysat, d'une part, et le culot d'autre part, sont séparés dans des cristallisoirs préalablement pesés. Ensuite, ils sont congelés puis lyophilisés pendant 3 jours. Après lyophilisation, les cristallisoirs sont à nouveau pesés et les lyophilisats sont broyés au mortier et conservés à -20°C dans des flacons en plastique avant les analyses.

2.4. Hydrolyses croisées

2.4.1. Principe

Pour solubiliser au maximum les têtes de crevette, le culot obtenu avec une enzyme est encore hydrolysé avec une autre enzyme. Cette expérience consiste à faire 2 hydrolyses consécutives sur le même substrat. Le culot de la première hydrolyse en condition acide avec la Pepsine et la Novozym 37020 devient le substrat pour la deuxième hydrolyse effectuée en milieu basique avec Protex 6L et Delvolase (Figure 17).

2.4.2. Déroutement de l'hydrolyse

L'hydrolyse est effectuée sur 400g de broyat de têtes de crevette d'élevage. Elle se déroule dans un bioréacteur en présence d'agitation.

Le broyat est dilué avec de l'eau distillée, puis chauffé aux températures voulues (40°C pour la Pepsine et 50°C pour la Novozym 37020). Le pH est ensuite ajusté à 2 ou à 3 respectivement pour la Pepsine et pour la Novozym 37020, avec du HCl 2N puis l'enzyme est ajoutée à 0,5%. Le pH est ajusté à 2 au cours de l'hydrolyse par addition de HCl 2N. Cette première hydrolyse dure 2 heures. A la fin de l'hydrolyse, la Pepsine est inactivée par neutralisation du milieu avec de la soude 5N, et la Novozym 37020 par soumission à 85°C pendant 25 minutes. La préparation est centrifugée par la suite à 10 000g pendant 20 minutes. Le surnageant est lyophilisé tandis que le culot subit une deuxième hydrolyse avec la Delvolase d'une part et la Protex 6L d'autre part.

Le culot est versé dans un deuxième bioréacteur, puis dilué avec de l'eau distillée. La préparation est ensuite chauffée à la température optimale d'activité de l'enzyme utilisée puis le pH est réglé au pH optimal avec de la soude 2N. L'enzyme est ensuite ajoutée. Pendant la réaction, le pH est ajusté par ajout de soude 2N. L'hydrolyse dure 2 heures. A la fin de l'hydrolyse, l'enzyme est inactivée par la température : bain-marie à 90°C pendant 20 minutes pour la Delvolase, et 85°C pendant 20minutes pour la Protex 6L.

Les préparations obtenues sont centrifugées puis lyophilisées suivant les méthodes décrites dans le paragraphe 2.3.4.

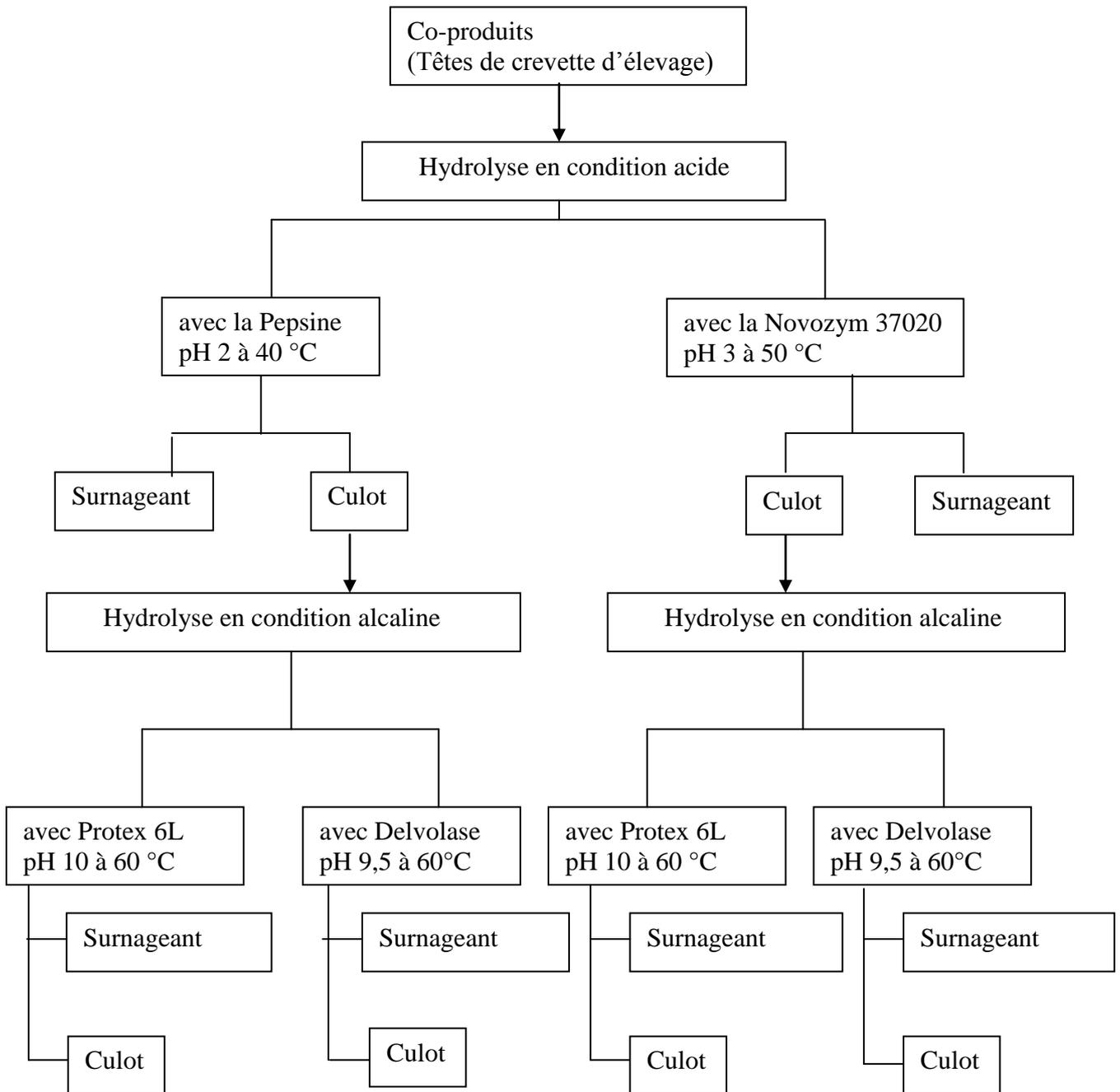


Figure 17 : Hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage.

2.5. Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques sont effectuées sur les matières premières fraîches et les fractions d'hydrolyse lyophilisées.

2.5.1. Dosage de la teneur en eau

2.5.1.1. Principe

La teneur en eau est déterminée par étuvage des échantillons à 103 °C pendant 24 heures (AOAC, 2005).

2.5.1.2. Manipulation

Une capsule vide est pesée. Puis environ 5g d'échantillons frais ou 1g d'échantillons lyophilisés sont ajoutés dans la capsule et l'ensemble est pesé à nouveau. Les capsules sont étuvées à 103°C pendant 22 heures. Ensuite, elles sont refroidies dans un dessiccateur avant d'être repesées à nouveau. Le dosage est effectué en triplicat pour chaque échantillon.

2.5.1.3. Calcul

La teneur en eau est obtenue par la formule qui suit :

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

Où M_0 est la masse en g de la capsule vide.

M_1 est la masse en g de la capsule et les échantillons avant étuvage

Et M_2 est la masse en g de la capsule et les échantillons après étuvage

2.5.2. Analyses des protéines

2.5.2.1. Dosage de la teneur en protéines totales

2.5.2.1.1. Principe

La méthode utilisée pour le dosage des protéines totales est celle de Kjeldhal (Crooke et Simpson, 1971). Il consiste à un dosage de l'azote contenu dans l'échantillon. Un facteur de conversion de 6,25 est utilisé pour obtenir la teneur en protéines.

2.5.2.1.2. Manipulation

Le dosage des protéines se déroule en 3 étapes :

- Minéralisation :

Dans un matras de minéralisation, 4g de matière fraîche ou 1g de matières sèches (lyophilisats) sont placés. Vingt ml d'acide sulfurique et une pastille Wieninger (Merck, Darmstadt, Allemagne), le catalyseur de la réaction, sont ensuite ajoutés. Les tubes sont alors

fermés hermétiquement et chauffés progressivement jusqu'à 450°C. La minéralisation est terminée lorsque le contenu des tubes devient vert limpide. Le chauffage est alors arrêté et les tubes sont laissés se refroidir.

- Distillation :

Les minéralisats refroidis sont additionnés de 20 d'eau milliQ. La distillation est réalisée sur le minéralisat ainsi préparé sur un digesteur Büchner en présence de soude en excès. Le distillat qui contient l'azote sous forme d'ammoniac est récupéré dans 20ml de solution d'acide borique 5% en présence d'indicateur coloré.

- Titration :

Le distillat est titré avec une solution d'acide chlorhydrique 1N.

2.5.2.1.3. Calcul

La teneur en azote est obtenue par la formule ci-après :

$$N\% = \frac{1,4 \times V}{M}$$

Avec N% : Teneur en azote total

V : Volume en ml de HCl 1N titrant le distillat

M : Masse en g de la prise d'essai

La teneur en protéines totales (P%) des échantillons est obtenue en utilisant le facteur de conversion 6,25. Elle s'écrit :

$$P\% = 6,25 \times N\%$$

Avec P% : Teneur en protéines totales

2.5.2.2. Détermination du profil en acides aminés

2.5.2.2.1. Principe

Le profil en acides aminés est déterminé par chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse acide totale des échantillons (Dumay, 2006; Kechaou *et al.*, 2009 ; Nguyen, 2009).

2.5.2.2.2. Manipulation

- Hydrolyse acide :

L'hydrolyse acide est effectuée sur environ 10 mg d'échantillon avec 200µl d'acide chlorhydrique 6N. Elle est effectuée dans une ampoule scellée à 110°C pendant 24 heures.

L'hydrolysats ainsi obtenu va servir de substrat à l'analyse des acides aminés totaux par chromatographie.

- Chromatographie sur phase gazeuse :

L'hydrolysats est d'abord séché sous azote, puis dilué avec de l'eau milli-Q de façon à avoir 10mg d'hydrolysats dans 2,5ml. Vingt-cinq µl de la dilution sont prélevés et préparés pour la chromatographie.

2.5.2.3. Détermination du profil moléculaire

2.5.2.3.1. Principe

Le profil moléculaire est déterminé selon la méthode de Kechaou et Nguyen utilisée pour les co-produits de poisson. Il s'agit d'une chromatographie sur gel de silice en se référant à des standards déjà enregistrés. Le poids moléculaire est identifié par rapport au temps d'élution (Kechaou *et al.*, 2009 ; Nguyen, 2009).

2.5.2.3.2. Manipulation

L'analyse est effectuée essentiellement sur les fractions surnageant des hydrolysats qui contiennent les peptides. Elle est déterminée par filtration sur gel. La colonne est constituée de Superdex 30 HR et possède un domaine de fractionnement allant de 100 à 7000 Da. La colonne est montée sur un système de chromatographie FPLC[®] (Fast Protein Liquid Chromatography). La colonne a été calibrée à l'aide des standards suivants: Ribonucléase (13700 Da), Aprotinine (6500 Da), Rénine (1760 Da), Vasopressine (1084 Da) et Leucine (294 Da). Cinquante µL d'échantillon ont été élués par une phase mobile constituée d'un tampon NaOH 50 mM contenant 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) avec un débit de 0,5 mL/min. Les composés sont détectés par une lecture de la densité optique à 214 nm.

2.5.3. Analyses des lipides

2.5.3.1. Extraction des lipides par la méthode de Folch

2.5.3.1.1. Principe

L'extraction des lipides est basée sur leur solubilité dans les solvants organiques. Pour la méthode de Folch, le méthanol et le chloroforme sont utilisés (Folch *et al.*, 1957).

2.5.3.1.2. Manipulation

L'extraction des lipides selon la méthode de Folch est indiquée dans la Figure 18. La prise d'essai est constituée de matière fraîche pour les matières premières et de matière sèche sous forme de lyophilisat pour les hydrolysats. La prise d'essai est mélangée avec 6,66 volumes de méthanol et agité pendant 30 minutes. Puis, 13,3 volumes de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est de nouveau laissé sous agitation magnétique pendant 30 minutes. La préparation obtenue est filtrée sous vide sur verre fritté puis le filtrat est introduit dans une ampoule à décanter. La solution est ensuite additionnée de 0,2 volume de NaCl 0,9% par rapport au volume de solvant. Le contenu de l'ampoule est agité jusqu'à complète émulsion et laissé décanté une nuit à 4°C à l'abri de la lumière. La phase inférieure organique est récupérée dans un ballon préalablement pesé. Puis, le solvant est évaporé au rotavapor. Le ballon est enfin repesé. Le dosage est effectué en triplicat pour chaque échantillon.

2.5.3.1.3. Calcul

La différence de poids entre le ballon vide et le ballon après évaporation de solvant, qui contient les résidus lipidiques, donne la quantité de lipides contenue dans la prise d'essai. La teneur en lipides est alors obtenue suivant la formule :

$$L\% = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100$$

où L% représente la teneur en matières grasses

M₂ représente le poids du ballon avec les lipides en g

M₁ est la masse du ballon vide en g

et M₀ est la masse de la prise d'essai en g

2.5.3.2. Conservation des extraits lipidiques

2.5.3.2.1. Principe

Les lipides issus de l'extraction selon la méthode de Folch sont récupérés. Ils sont alors conservés de manière à les protéger contre toute dégradation, notamment l'oxydation.

2.5.3.2.2. Manipulation

Après évaporation, les résidus de lipides dans les ballons sont récupérés avec 5ml de chloroforme pour les surnageants, et 10 ml pour les culots et les matières premières. La

solution est versée dans un flacon ambré et conservée à -20°C au congélateur. Elle constitue l'extrait lipidique.

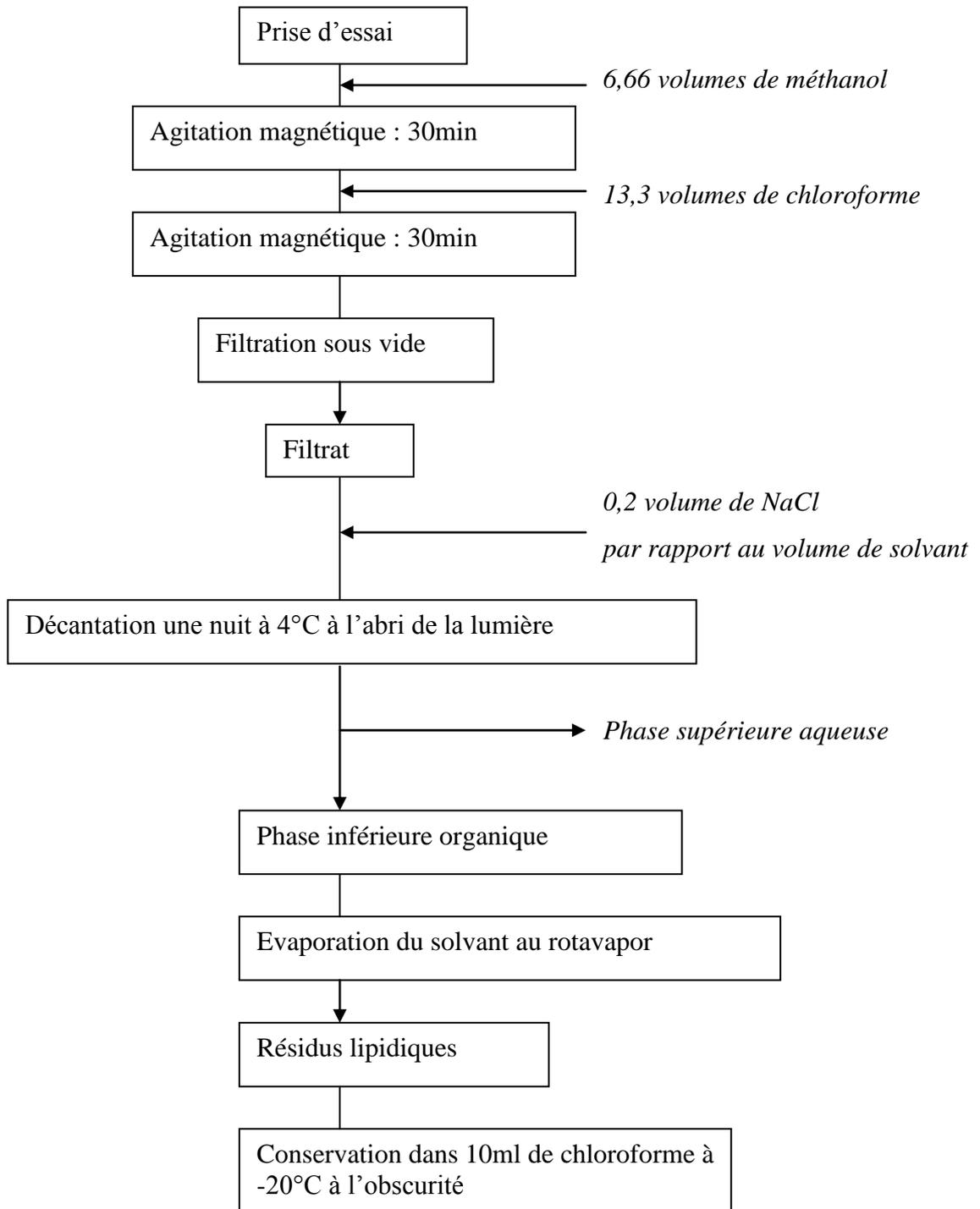


Figure 18 : Extraction des lipides par la méthode de Folch.

2.5.3.3. Détermination du profil en acides gras

2.5.3.3.1. Principe

Les acides gras sont soumis à une migration sur une longueur de 60 m dans une colonne capillaire apolaire (CPCil 15CB) de 0,22 μm de diamètre interne. La phase stationnaire est constituée de diméthylsiloxane. Les acides gras sont identifiés par comparaison à des standards (Dumay, 2006).

2.5.3.3.2. Préparation des dérivés

2.5.3.3.2.1. Principe

Pour pouvoir être analysés en chromatographie en phase gazeuse, les acides gras sont d'abord convertis en esters méthyliques qui sont volatiles. La réaction de méthylation est représentée dans la Figure 19 ci-après :

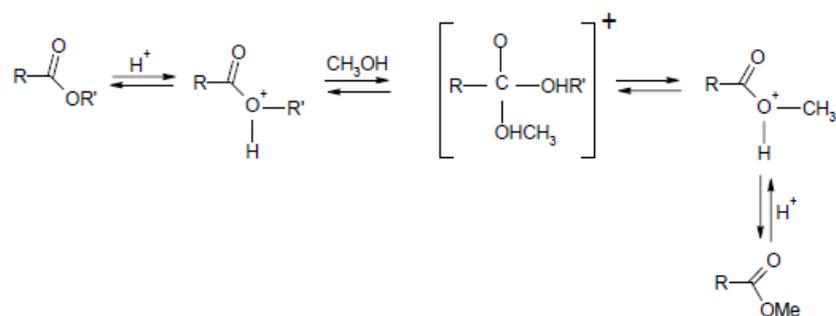


Figure 19 : Réaction de méthylation des acides gras.

2.5.3.3.2.2. Manipulation

L'analyse est effectuée sur les extraits lipidiques. Une quantité d'échantillon à méthyler contenant 300 μg de lipides est placée dans un tube. Quarante μl de C17 : 0 qui constituent le standard interne sont ajoutés. Le mélange est ensuite évaporé sous azote pour éliminer le solvant. Puis, 5ml de solution de méthanol anhydre/acide sulfurique 2% sont additionnés. Les tubes sont fermés hermétiquement avant d'être placés une nuit à 50°C. Après refroidissement, 1ml d'eau distillée est ajouté, puis 2ml d'hexane. Les tubes sont vortexés par la suite. Après décantation, la phase supérieure est récupérée.

2.5.3.3.3. Injection

Les dérivés sont introduits dans des tubes bouchés hermétiquement. Les tubes sont placés sur le plateau du chromatographe. Pour le rinçage, le premier tube contient du

dichlorométhane et le deuxième tube contient de l'hexane. Le chromatographe est piloté par un ordinateur avec le logiciel « Agilent 5973 ». Le lancement de la chromatographie se fait alors à partir de ce logiciel.

2.5.3.4. Détermination de la teneur en phospholipides

2.5.3.4.1. Principe

La méthode utilisée pour le dosage des phospholipides est une méthode colorimétrique. Elle est basée sur la formation d'un complexe coloré entre le phospholipide et le ferrothiocyanate d'ammonium (Stewart, 1980).

2.5.3.4.2. Manipulation

Une quantité d'extrait lipidique contenant 1mg de lipide est placée dans un tube brûlé. Le solvant est ensuite évaporé sous azote. Pour chaque échantillon, le dosage est effectué en triplicate. Un blanc est préparé en duplicat. Deux ml de chloroforme sont ajoutés dans chaque tube, suivis de 1 ml de réactif préparé avec du chlorure de fer et du thiocyanate d'ammonium dans de l'eau distillée. La préparation est vortexée pendant 30 secondes avant d'être centrifugée à 2000 g pendant 10 minutes. La phase chloroformique inférieure est récupérée à l'aide d'une pipette pasteur et l'absorbance est lue à 488 nm.

2.5.3.4.3. Calcul :

La teneur en phospholipides est calculée à partir d'une courbe étalon avec des quantités de phospholipides allant de 0 à 100µg.

2.5.4. Analyses des matières minérales

2.5.4.1. Dosage de la teneur en cendres

2.5.4.1.1. Principe

La teneur en cendres est déterminée par incinération de la matière organique à 550°C pendant une nuit (AOAC, 2005).

2.5.4.1.2. Manipulation

Des capsules d'incinération vides sont pesées. Environ 5g de matière fraîche ou 1g de matière sèche sont ajoutés et la masse de l'ensemble est notée. Les échantillons sont alors

soumis à une température de 550°C dans un four à moufle pendant une nuit. Après refroidissement dans un dessiccateur, les capsules contenant les cendres sont pesées à nouveau. Le dosage est réalisé en triplicat pour chaque échantillon.

2.5.4.1.3. Calcul

La teneur en cendres des échantillons est calculée suivant la formule suivante :

$$C\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

Avec C% : teneur en cendres

M₀ : masse en g de la capsule vide

M₁ : masse en g de la capsule et les échantillons avant incinération

M₂ : masse en g de la capsule avec les cendres (après incinération)

2.5.4.2. Dosage du calcium, magnésium, potassium et sodium

La spectrophotométrie d'absorption atomique est utilisée pour ce dosage. Elle est basée sur la capacité d'un élément donné d'émettre une radiation caractéristique lorsqu'on lui fournit de l'énergie. L'intensité de l'émission des raies est alors proportionnelle au nombre d'atomes en présence (Laurent, 1991).

2.5.4.2.1. Préparation de la solution à analyser

Pour chaque échantillon, 100mg de cendres obtenues par incinération sont humectés de 2 à 3ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé jusqu'à l'apparition d'une première vapeur puis quelques ml d'eau distillée sont ajoutés. La solution ainsi obtenue est filtrée et rincée plusieurs fois avec de l'eau distillée tiède puis de l'eau distillée froide pour récupérer le plus d'éléments minéraux possible. Le volume est enfin ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

2.5.4.2.2. Dosage des éléments minéraux

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution-mère de concentration connue pour chaque élément.

La solution à analyser est diluée à différentes concentrations avec de l'eau distillée en présence de lanthane 0,2%.

Les échantillons et les gammes étalons sont introduits dans un spectrophotomètre d'absorption atomique. Les raies d'absorption pour le Mg, Ca, Na et K sont respectivement 285,2nm ; 422,7nm ; 589nm et 766,5nm. Les densités optiques sont mesurées.

Une courbe étalon de la densité optique en fonction de la concentration est établie pour chaque élément.

La concentration en élément des échantillons est alors déduite en reportant leurs densités optiques à la courbe d'étalonnage convenable.

2.5.4.3. Dosage colorimétrique du phosphore

Le dosage est basé sur la réaction du phosphore avec le molybdate d'ammonium et le métavanadate d'ammonium qui fait naître de l'oxyde bleu de molybdène. L'intensité de la coloration bleue est alors proportionnelle à la quantité de phosphore dans l'échantillon à analyser (Laurent, 1991).

Une gamme étalon de phosphore avec des concentrations allant de 5 γ /ml à 50 γ /ml est préparée à partir d'une solution-mère. La solution à analyser est diluée à différentes concentrations avec de l'eau distillée. A 1ml de la solution à doser sont ajoutés 8ml d'eau distillée et 1ml de réactif préparé à partir d'une solution de molybdate d'ammonium et une solution de métavanadate d'ammonium à volume égal. La préparation est laissée se reposer pendant 30 minutes. Puis les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à 420 nm. La quantité de phosphore dans les échantillons est calculée à partir de la courbe étalon.

2.6. Analyses statistiques

Les données sont traitées sur Microsoft Excel. L'analyse de variance (ANOVA) est également effectuée à l'aide du logiciel Statgraphics Plus, version 5.1 (Manugistics Inc., USA). La méthode de Fisher (LSD) est utilisée pour leur comparaison. Les moyennes sont ainsi acceptées comme statistiquement différentes à un seuil de 95% ($p \leq 0,05$).

3. RESULTATS

3.1. Composition des têtes de crevette d'élevage et sauvage

En premier lieu, la composition biochimique des têtes de crevette utilisées au cours de cette étude est analysée. Le Tableau 20 indique la composition des têtes de crevette d'élevage et sauvage.

Tableau 20 : Composition des têtes de crevette d'élevage et sauvage en g/ 100 g de matières brutes.

Analyse (g/100g)	Origine	
	Elevage	Sauvage
Humidité	68,64	72,77
Protéines	15,45	15,64
Lipides	5,23	1,85
Cendres	5,87	6,56

La répartition des différentes substances par rapport à la matière sèche est résumée dans la Figure 20 ci-après :

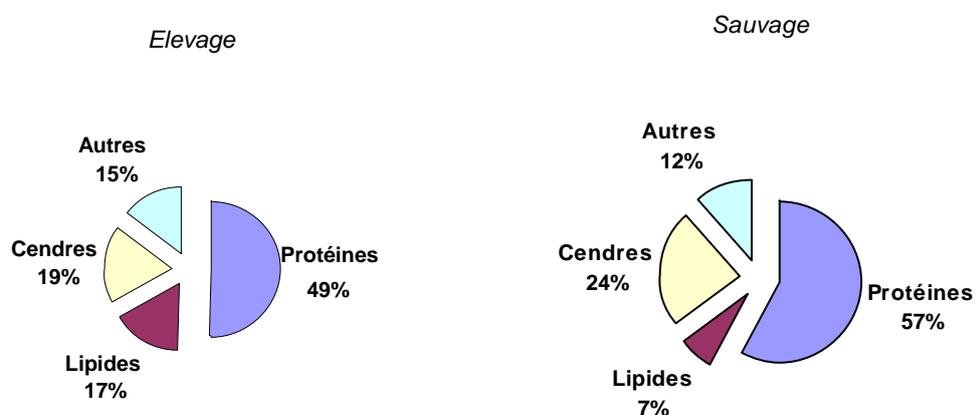


Figure 20 : Distribution des protéines, lipides et cendres dans les têtes de crevette d'élevage et sauvage en pourcentage du poids sec.

3.1.1. Teneur en eau

D'après le Tableau 20, la teneur en eau est de 68,6% et de 72,8% respectivement pour les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage. Par rapport à la matière sèche, la distribution des protéines, des lipides et des cendres dans les têtes de crevette d'élevage et d'origine sauvage est représentée dans la Figure 20. En comparant le Tableau 20 et la Figure 20, on note que la différence de la teneur en eau des têtes de crevette influe sur la quantité des autres substances par rapport au poids sec.

3.1.2. Analyses des protéines

3.1.2.1. Protéines totales

D'après la Figure 20, les protéines se trouvent être le constituant dominant pour les 2 catégories de matières premières avec $49,09 \pm 0,93\%$ pour les têtes de crevettes d'élevage et $57,45 \pm 1,29\%$ pour les têtes de crevettes sauvages par rapport au poids sec, ce qui correspond à 15,4% et 15,6% par rapport à la matière fraîche (Tableau 20).

3.1.2.2. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés en mg/g de matière sèche des têtes de crevette d'élevage et sauvage est rapportée dans le Tableau 21. Exceptée la tyrosine, les acides aminés se retrouvent en concentration supérieure dans les têtes de crevette sauvage par rapport à celles d'origine d'élevage. Les mêmes acides aminés sont retrouvés dans les 2 matières, mais on note cependant une différence sur l'ordre de la quantité des acides aminés. Pour les têtes de crevette d'élevage, le classement des acides aminés selon leur concentration décroissante s'effectue de la manière suivante :

GLU>ALA>ASP>GLY>PRO>LEU>PHE>VAL>LYS>ILE>TYR>THR>SER>HIS>MET.

Avec les têtes de crevette sauvage, l'alanine est 2 fois moins abondante que l'acide glutamique, et se retrouve après la proline ; la phénylalanine vient après l'isoleucine avec une différence moins marquée et enfin la tyrosine vient après la méthionine. L'histidine est l'acide aminé le moins présent dans les têtes de crevette sauvage. Le classement est le suivant :
GLU> ASP>GLY>PRO> ALA>LEU> VAL>LYS>ILE>PHE>THR>SER>MET>TYR>HIS.

Les pourcentages respectifs en acides aminés essentiels sont de 38,5% et 35,1% pour les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage. Le rapport acides aminés essentiels/acides aminés non essentiels est supérieur à 0,6% pour les 2 types de co-produit. Par ailleurs, la proportion d'acides aminés exhausteurs de flaveur (acide glutamique, acide aspartique, alanine et glycine) par rapport aux acides aminés totaux est d'environ 47,0% et 49,0% pour les espèces sauvages et les espèces d'élevage respectivement.

Tableau 21 : Profil en acides aminés des matières brutes, en mg/g du poids sec.

Acides aminés	Elevage	Sauvage
LEU	15,72	22,27
PHE	11,55	14,85
VAL	9,36	16,38
LYS	8,76	16,06
ILE	7,86	15,72
THR	5,95	14,28
HIS	1,55	6,20
MET	1,49	7,45
Acides aminés essentiels	62,24	113,21
GLU	24,99	52,92
ALA	21,36	23,14
ASP	21,28	33,25
GLY	18,75	28,5
PRO	17,25	24,15
TYR	7,24	7,24
SER	4,2	11,55
Acides aminés non essentiels	115,07	180,75
%AAE	35,10	38,51
AAE/AANE	0,54	0,63

ALA : Alanine ; **GLY** : Glycine; **VAL** : Valine; **LEU** : Leucine; **ILE** : Isoleucine ; **THR** : Thréonine ; **SER** : Serine ; **PRO** : Proline ; **ASP** : Acide aspartique ; **MET** : Méthionine ; **GLU** : Acide glutamique ; **PHE** : Phénylalanine ; **LYS** : Lysine ; **HIS** : Histidine ; **TYR** : Tyrosine. **AAE** : Acides Aminés Essentiels ; **AANE** : Acides Aminés Non Essentiels.

3.1.3. Analyses des lipides

3.1.3.1. Lipides totaux

D'après le Tableau 20, la teneur en lipides les têtes de crevette d'élevage est 2,5 fois supérieure à celle des têtes de crevette sauvage. Par rapport à la matière sèche, les teneurs sont de $16,64 \pm 0,17\%$ et $6,80 \pm 0,05\%$ respectivement.

3.1.3.2. Composition en acides gras

Le Tableau 22 indique le profil en acides gras des têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage. D'après ce tableau, on note une différence de composition en acides gras entre les 2 sortes de matières premières. Vingt et un acides gras sont détectés dans les têtes de crevette d'origine d'élevage tandis que 8 acides gras seulement sont identifiés dans celles d'origine sauvage. Cependant, pour les 2 origines de têtes de crevette étudiées, l'acide

palmitique est le plus abondant avec 28,5% et 29,5% des lipides totaux respectivement pour les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage.

Tableau 22 : Composition en acides gras des matières premières, en pourcentage par rapport aux lipides totaux.

Acides gras	Origine sauvage	Origine élevage
Saturés		
C14:0		1,45
C15:0		0,27
C15méthyl6		0,12
C16:0	28,51	29,48
C18:0	21,07	6,14
C20:0		0,17
C22:0		0,18
Total saturés	49,58	37,81
Mono-insaturés		
C16:1w9		1,57
C16:1w7	4,46	
C18:1w9	11,1	21,71
C18:1w7	7,61	3,89
C18:1		0,17
C20:1w12		0,96
C20:1w9		3,69
C22:1w9		2,38
C22:1w7		0,31
Total mono-insaturés	23,17	34,68
Poly-insaturés		
C18:2w6		19,63
C20:4w6	8,21	
C20:4w3		0,19
C20:5w3	12,13	2,37
C20:2w6		0,26
C22:6w3	6,91	4,84
C22:5w3		0,23
Total polyinsaturés	27,25	27,52

Les acides gras saturés constituent la majeure partie des acides gras totaux. Ils représentent 49,6% des lipides totaux pour les têtes de crevette sauvage, et 37,8% pour les têtes de crevette d'élevage. Les acides gras polyinsaturés sont à environ 27,0% des lipides totaux pour les 2 sortes de têtes de crevette. Ils sont constitués en majorité par l'acide linoléique (C18:2w6) pour les têtes de crevette d'élevage, avec 19,6% des lipides totaux, puis l'acide docosahexaénoïque ou DHA (C22:6w3) et l'acide éicosapentaénoïque ou EPA (C20:5w3). Ce dernier constitue l'acide gras polyinsaturé principal pour les têtes de crevette

sauvage, avec 12,1% des lipides totaux, suivi de l'acide arachidonique (C20:4w6) qui n'a pas été retrouvé dans les têtes de crevette d'élevage, et enfin le DHA.

3.1.3.3. Teneur en phospholipides

Les teneurs en phospholipides sont indiquées dans le Tableau 23. Par rapport aux lipides totaux, les têtes de crevette sauvage renferment 39,9% de phospholipides, tandis que les têtes de crevette d'élevage en contiennent 22,8%.

Tableau 23 : Teneur en phospholipides des matières premières, en pourcentage par rapport aux lipides totaux.

Origine	Phospholipides par rapport aux lipides totaux
Elevage	22,76%
Sauvage	39,90%

3.1.4. Matières minérales

3.1.4.1. Teneur en cendres brutes

D'après la Figure 20, les matières minérales constituent $18,66 \pm 0,08\%$ des têtes de crevette d'élevage et $24,10 \pm 0,02\%$ des têtes de crevette sauvage par rapport au poids sec. Inversement à la teneur en lipides, la teneur en matières minérales est élevée pour les têtes de crevette d'origine sauvage comparativement à celles d'origine d'élevage.

3.1.4.2. Teneur en éléments minéraux

La composition en éléments minéraux est figurée dans le Tableau 24. Le calcium est l'élément minéral principal avec 6,1% et 5,0% de la matière sèche respectivement pour les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage. Parmi les autres éléments minéraux étudiés, le sodium se trouve à 0,7 à 1,8% de la matière sèche dans les têtes de crevette d'élevage et sauvage étudiées ; le magnésium se trouve à 0,59 à 0,61%.

Du point de vue nutritionnel, les têtes de crevette s'avèrent être très intéressantes comme source de calcium.

Tableau 24 : Composition en quelques éléments minéraux (Ca, Na, Mg, K, P) des têtes de crevette, en g/100g du poids sec.

Elément	Elevage	Sauvage
Calcium	6,15	4,99
Sodium	1,8	0,7
Magnésium	0,59	0,61
Potassium	0,5	0,5
Phosphore	0,53	0,68

3.2. Hydrolyses enzymatiques

Après la caractérisation des têtes de crevette, les hydrolyses enzymatiques sont effectuées pour étudier le comportement des têtes de crevette vis-à-vis des différentes enzymes testées. Le criblage des différentes enzymes a été effectué sur les têtes de crevette d'élevage, en admettant que le comportement des enzymes vis à vis des 2 substrats est identique, la teneur en protéines et le profil en acides aminés des 2 sortes de têtes de crevette étant légèrement équivalents.

3.2.1. Hydrolyses de longue durée

3.2.1.1. Cinétique des hydrolyses

Le degré d'hydrolyse se rapporte au pourcentage de liaisons peptidiques coupées durant l'hydrolyse. Les cinétiques qui traduisent l'évolution de ce DH en fonction du temps sont résumées dans la figure 21 pour les 4 enzymes commerciales utilisées.

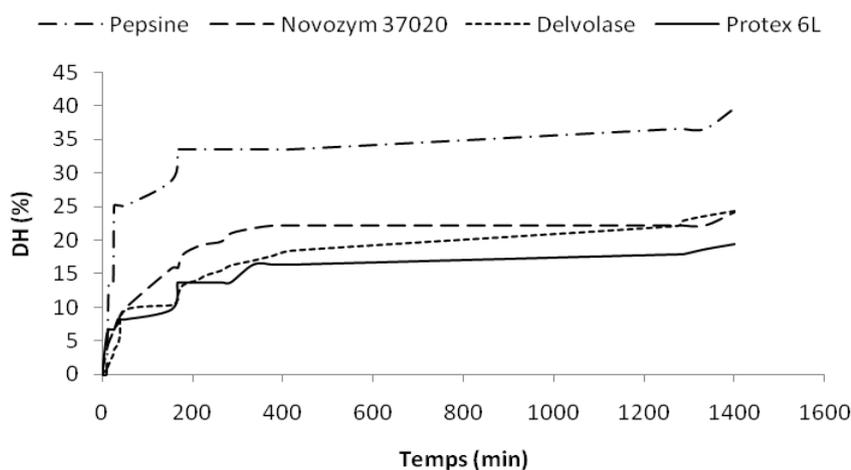


Figure 21 : Cinétiques d'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage avec différentes enzymes.

Les courbes montrent clairement 3 phases au cours de l'hydrolyse enzymatique : une phase rapide qui dure 40 minutes pour toutes les enzymes. Ensuite une phase de latence qui persiste jusqu'à 168 minutes pour la Pepsine, 320 minutes pour la Novozym 37020, 335 minutes pour la Protex 6L et 420 minutes pour la Delvolase; et un plateau qui vient après cette phase. La première phase correspond à la transformation rapide du substrat, résultant du ratio optimal enzyme/substrat, qui optimise la réaction enzymatique. La phase de latence correspond à la diminution de l'activité enzymatique suite à la réduction de la quantité de substrat. Le plateau qui survient après cette phase résulte ainsi de la conversion complète du substrat, donc de l'hydrolyse totale. L'hydrolyse enzymatique peut alors être considérée comme achevée lorsque ce plateau est atteint. La valeur maximale de DH atteinte au bout de 22 heures de têtes de crevette d'élevage est obtenue avec la Pepsine avec une valeur de 36,5%. La Novozym 37020 et la Delvolase conduisent à des valeurs similaires de DH : 22,4% et 23,6%, et l'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage avec la Protex 6L produit à un DH de 18,5%.

3.2.1.2. Solubilisation de la matière lors des hydrolyses

La solubilisation de la matière est due à la digestion des substrats par les enzymes. Pour les hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage, cette solubilisation est illustrée sur la Figure 22. Après 22 heures d'hydrolyse enzymatique, plus de la moitié de la matière se retrouve solubilisée dans la phase aqueuse. Par contre, sans hydrolyse enzymatique, seuls 31% de la matière sont solubilisés. La Pepsine et la Protex 6L sont les enzymes les plus efficaces pour cette solubilisation, tandis que la Novozym 37020 et la Delvolase solubilisent moins les têtes de crevette d'élevage.

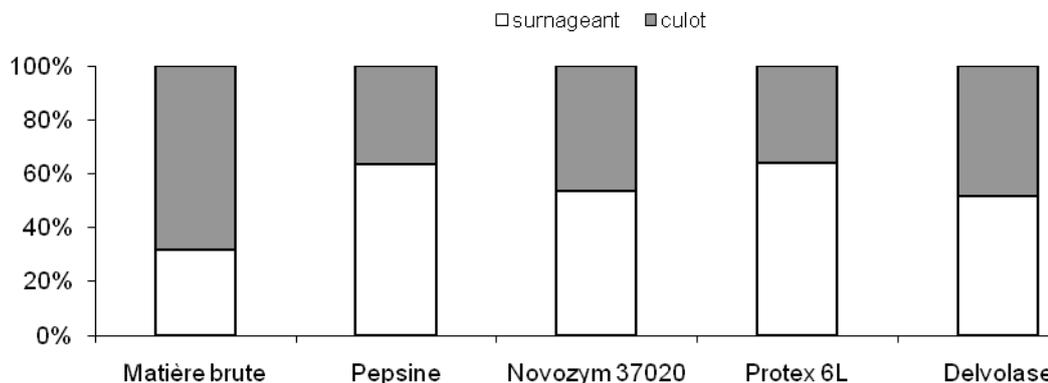


Figure 22 : Solubilisation de la matière lors des hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage et sans hydrolyse enzymatique (matière brute).

3.2.1.3. Composition des différentes fractions d'hydrolyse

Après les analyses biochimiques des protéines, des lipides et des cendres, les valeurs obtenues sont converties par rapport au poids sec et sont résumées dans le Tableau 25. Les autres substances sont obtenues par différence. Elles contiennent entre autres la chitine et ses dérivés.

D'après ce tableau, la teneur en protéines des fractions solubles (hydrolysats) varie de $48,12 \pm 1,47$ à $64,73 \pm 0,83\%$ du poids sec, respectivement avec la Pepsine et la Delvolase. La Pepsine conduit à la production de l'hydrolysats le moins riche en protéines tandis que les hydrolysats issus des enzymes actives en condition alcaline (Protex 6L et Delvolase) sont les plus concentrés en protéines avec une teneur d'environ 63,9% à 64,7% du poids sec.

En ce qui concerne les lipides, les hydrolyses de longue durée des têtes de crevette donnent naissance à des hydrolysats pauvres en lipides. Leur teneur varie de 1,2% à 3,8% du poids sec. Comme avec les protéines, la Pepsine est également l'enzyme qui génère l'hydrolysats le moins riche en lipides. En revanche, les fractions insolubles obtenues après 22 heures d'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage contiennent une quantité non négligeable de lipides : environ 24,3% à 36,2% du poids sec. C'est la Pepsine qui engendre le culot le plus riche en lipides.

Tableau 25 : Composition des différentes fractions de têtes de crevettes d'élevage après 22h de protéolyse avec des enzymes commerciales, en g/100g de poids sec.

Fractions	Enzyme	Protéines (%)	Lipides (%)	Cendres (%)	Autres substances (%)
Soluble	Pepsine	$48,12 \pm 1,57$	$1,17 \pm 0,34$	$41,10 \pm 0,46$	9,61
	Novozym 37020	$51,59 \pm 0,01$	$3,01 \pm 2,28$	$32,93 \pm 0,06$	12,47
	Protex 6L	$63,86 \pm 0,21$	$3,81 \pm 0,21$	$23,86 \pm 0,27$	8,47
	Delvolase	$64,73 \pm 0,83$	$3,57 \pm 0,02$	$28,62 \pm 0,93$	3,08
Insoluble	Pepsine	$29,57 \pm 0,29$	$36,20 \pm 0,32$	$20,31 \pm 0,12$	13,92
	Novozym 37020	$47,14 \pm 0,32$	$29,19 \pm 1,02$	$9,24 \pm 0,62$	14,44
	Protex 6L	$29,44 \pm 0,27$	$24,31 \pm 1,11$	$36,80 \pm 0,56$	9,45
	Delvolase	$29,19 \pm 0,96$	$20,82 \pm 0,94$	$30,79 \pm 0,16$	14,20

Contrairement aux lipides, les teneurs en cendres des fractions solubles sont supérieures à celles des culots lors des hydrolyses acides. Elles correspondent à 39,9% à 41,1% du poids sec respectivement pour la Novozym 37020 et la Pepsine. Par contre, avec les enzymes actives à condition alcaline, les teneurs en cendres des hydrolysats sont inférieures à

celles des culots d'hydrolyse. Les cendres constituent 23,7% à 28,6% du poids sec des hydrolysats.

3.2.1.4. Solubilisation des protéines

3.2.1.4.1. Protéines totales

Pendant l'hydrolyse enzymatique, les liaisons peptidiques sont coupées et donnent lieu à des protéines de plus courtes chaînes, des peptides ou des acides aminés libres. Cette diminution de la taille des protéines augmente leur solubilité, induisant par conséquent leur passage dans la phase soluble. Ainsi, comme pour la matière sèche, plus de la moitié des protéines contenues dans les têtes de crevette d'élevage sont solubilisées après 22 heures d'hydrolyse pour toutes les enzymes utilisées. La solubilisation des protéines est montrée dans la Figure 23. D'après cette figure, la Protex 6L et la Pepsine sont les plus efficaces avec respectivement 79% et 74% de protéines solubilisées. La Delvolase solubilise 70% des protéines et la Novozym 37020 s'avère être la moins efficace avec 55% des protéines qui passent dans la phase soluble après hydrolyse de 22 heures des têtes de crevette d'élevage.

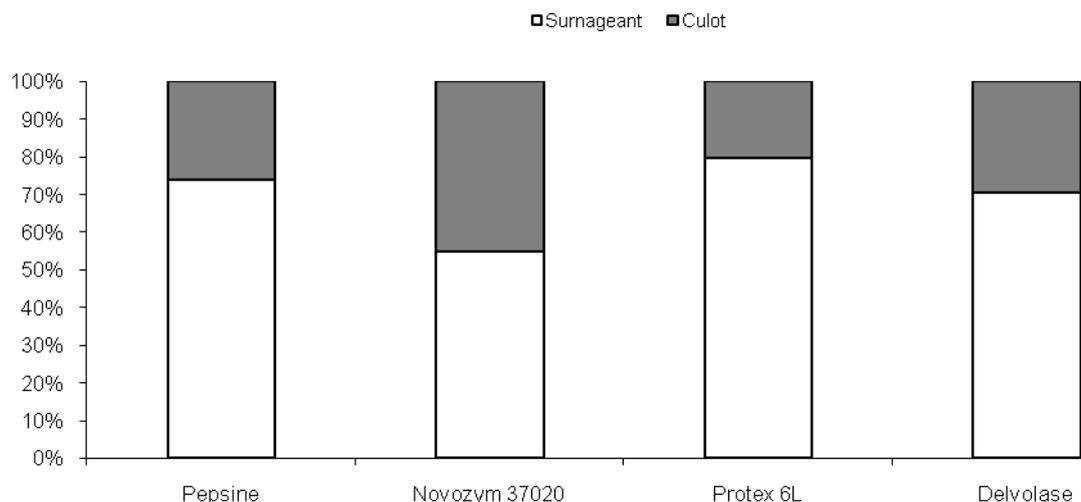


Figure 23 : Distribution des protéines dans les 2 phases lors de différentes hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage.

3.2.1.4.2. Profil moléculaire

Les différentes tailles des peptides composant les hydrolysats sont analysées. La Figure 24 représente les profils moléculaires de ces différents hydrolysats de têtes de crevette d'élevage. Quatre pics principaux sont identifiés pour les 4 hydrolysats tandis que la matière

brute ne possède qu'un seul pic principal. La proportion des peptides selon leur taille est résumée dans le Tableau 26. D'après ce tableau, on note qu'après les hydrolyses des têtes de crevette d'élevage, 38,1% à 49,6% des peptides possèdent un poids moléculaire compris entre 250 Da et 500 Da ; et 82,5% à 92,7% ont un poids moléculaire inférieur à 1 000 Da.

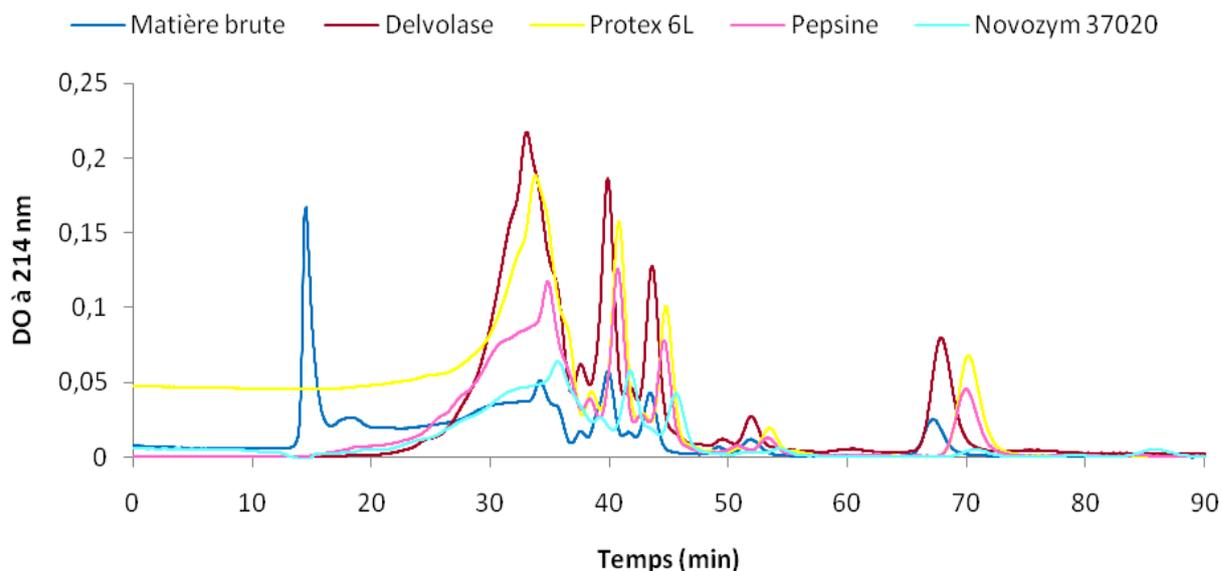


Figure 24 : Chromatogrammes des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus après 22 heures d'hydrolyse enzymatique.

Tableau 26 : Distribution (en %) des poids moléculaires des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus après 22 heures d'hydrolyse enzymatique.

Poids moléculaire	Pepsine	Novozym 37020	Protex 6L	Delvolase
>7000Da	2,13	1,31	1,07	0,03
5500Da- 7000Da	0,62	0,52	0,49	0,17
3000Da- 5500Da	1,75	1,98	1,47	0,55
2000Da-3000Da	2,31	2,18	1,59	0,83
1000Da- 2000Da	9,99	9,69	6,54	5,1
500Da-1000Da	27,63	25,55	32,95	33,41
250Da- 500Da	40,83	43,57	38,09	49,6
<250Da	4,07	14,61	17,09	9,73

3.2.1.3.3. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés constitue un paramètre pour l'évaluation de la qualité des protéines. La composition en acides aminés des hydrolysats de têtes de crevette obtenus avec différentes enzymes est résumée dans le Tableau 27. Les valeurs sont indiquées

en mg/g de poids sec. D'après ce tableau, on note une augmentation de la concentration des acides aminés suite aux hydrolyses enzymatiques, sauf pour la méthionine et l'histidine qui sont détruites lors de l'hydrolyse avec Novozym 37020 et Protex 6L respectivement. Les concentrations en alanine, phénylalanine et tyrosine diminuent suite à l'hydrolyse avec la Novozym 37020. On note également une augmentation de la proportion d'acides aminés indispensables et du rapport acides aminés indispensables/acides aminés non indispensables lors des hydrolyse enzymatique des têtes de crevette d'élevage.

Tableau 27 : Profil en acides aminés de la matière brute et des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus après 22 heures d'hydrolyse enzymatique, en mg/g de poids sec.

Acides aminés	Matière brute	Pepsine	Novozym 37020	Protex 6L	Delvolase
LEU	15,72	22,27	19,65	35,37	24,89
PHE	11,55	18,15	3,30	24,75	18,15
VAL	9,36	12,87	16,38	24,57	19,89
LYS	8,76	17,52	16,06	16,06	11,68
ILE	7,86	14,41	13,10	23,58	18,34
THR	5,95	10,71	15,47	20,23	14,28
HIS	1,55	4,65	6,20	0,00	6,20
MET	1,49	4,47	0,00	10,43	7,45
AAE	62,24	105,05	90,16	154,99	120,88
GLU	24,99	39,69	39,69	60,27	49,98
ALA	21,36	26,70	16,91	32,04	24,03
ASP	21,28	41,23	23,94	43,89	35,91
GLY	18,75	21,00	28,50	35,25	27,75
PRO	17,25	21,85	24,15	27,60	24,15
TYR	7,24	10,86	5,43	18,1	7,24
SER	4,20	4,20	9,45	16,80	13,65
AANE	115,07	165,53	148,07	233,95	182,71
%AAE	35,10	38,82	37,85	39,85	39,82
AAE/AANE	0,54	0,63	0,61	0,66	0,66

ALA : Alanine ; **GLY** : Glycine ; **VAL** : Valine ; **LEU** : Leucine ; **ILE** : Isoleucine ; **THR** : Thréonine ;
SER : Serine ; **PRO** : Proline ; **ASP** : Acide aspartique ; **MET** : Méthionine ; **GLU** : Acide
glutamique ; **PHE** : Phénylalanine ; **LYS** : Lysine ; **HIS** : Histidine ; **TYR** : Tyrosine. **AAE** Acides
Aminés Essentiels ; **AANE** : Acides Aminés Non Essentiels.

3.2.1.4. Solubilisation des lipides

3.2.1.4.1. Lipides totaux

Contrairement aux protéines, à la suite des hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette, et indépendamment de l'enzyme utilisée, les lipides sont majoritairement concentrés dans le culot. Ils sont solubilisés à environ 5% à 22% au cours de ces hydrolyses, ce qui correspond à 78% à 95% des lipides récupérés dans les culots d'hydrolyse (Figure 25).

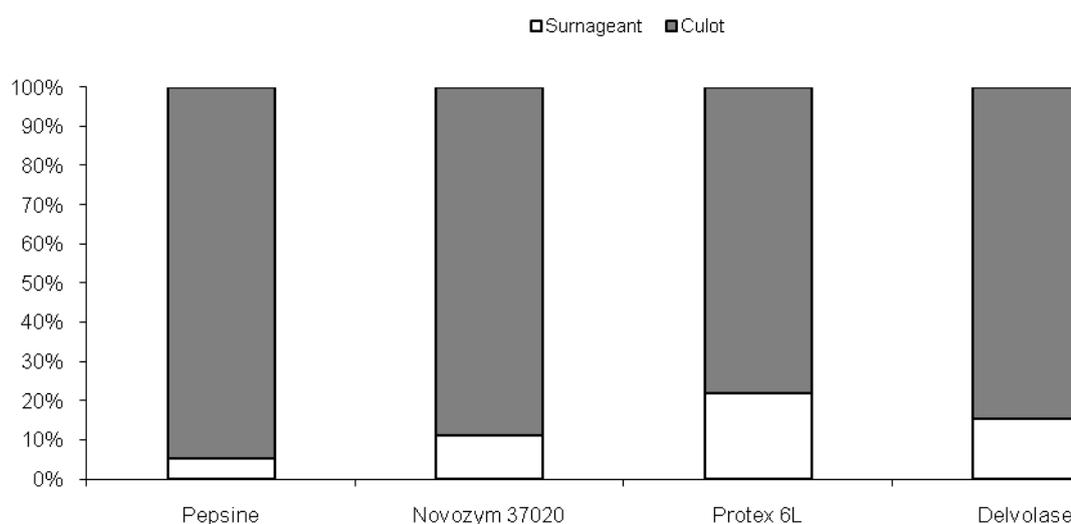


Figure 25 : Distribution des lipides dans les 2 phases lors de différentes hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage.

3.2.1.4.2. Phospholipides

Parmi les différentes classes de lipides, les phospholipides ont été analysés au cours de ce travail. Ainsi, les teneurs en phospholipides dans les différentes fractions lors des protéolyse des têtes de crevette d'élevage sont résumées dans la Figure 26. Elles varient de 0,01% à 0,86% dans la phase soluble qui constitue l'hydrolysate, et de 3,08% à 6,12% dans les culots d'hydrolyse.

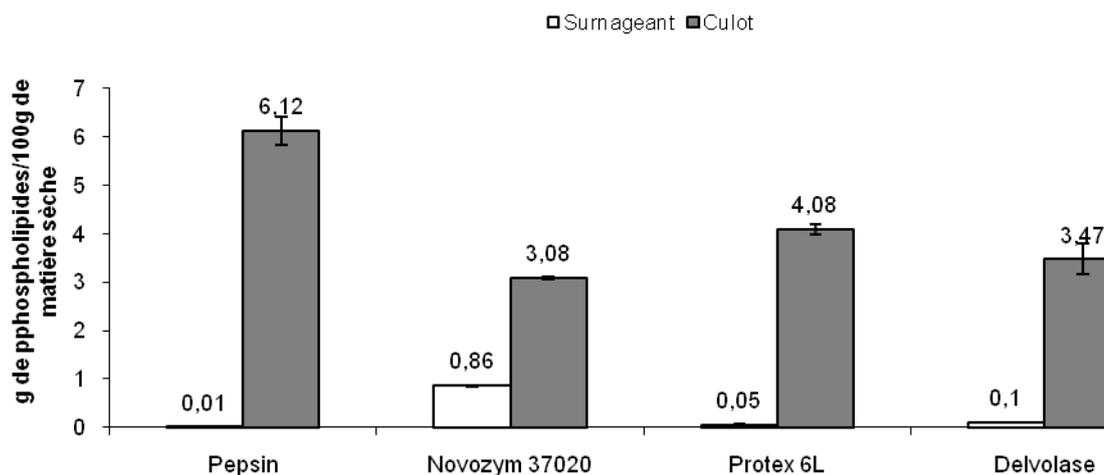


Figure 26 : Teneur en phospholipides des différentes phases lors des hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage, en g/100g de poids sec.

3.2.1.4.3. Acides gras

Comme les acides aminés constitutifs des protéines, le profil en acides gras permet d'évaluer la qualité des lipides. Le Tableau 28 montre la composition en acides gras des extraits lipidiques de différentes fractions obtenues après hydrolyses des têtes de crevette d'élevage. Ainsi, on note que les acides gras insaturés prédominent dans les 2 phases lors des hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette, à l'exception de la Delvolase qui conduit à une prédominance des acides gras mono-insaturés. Dans tous les cas, les acides gras saturés sont plus concentrés dans la phase soluble avec une proportion de 38,0% à 100% des lipides totaux. En revanche, les acides gras polyinsaturés sont présents à plus forte proportion dans les culots d'hydrolyse avec 28,8% à 36,0% des lipides totaux, contre 0,0% à 18,3% dans les surnageants.

Tableau 28 : Composition en acides gras des différentes phases lors d'hydrolyses enzymatiques de 22 heures de têtes de crevette d'élevage.

Acides gras	Pourcentage par rapport aux lipides totaux							
	Pepsine		Novozym37020		Protex 6L		Delvolase	
	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant	Culot
C14:0		1,39	2,23	1,34	1,29		1,94	
C15:0								
C15méthyl6								
C16:0	100	30,87	41,59	29,28	37,95	2,30	27,12	25,38
C18:0		4,62	17,53	5,24	8,61	5,83	8,99	4,65
C19cyclopropane						1,82		
C20:0								
C22:0					0,56			
Saturés	100	36,88	61,35	35,86	48,41	37,03	38,05	30,03
C16:1w9								
C16:1w7		1,66	1,50	1,80	1,01	1,36	3,19	
C18:1								
C18:1w9		24,41	21,23	23,05	22,58	24,69	47,02	24,48
C18:1w7		3,76	4,29	3,99	4,20	4,05	2,57	3,77
C20:1w12								
C20:1w9		3,20		3,69	0,75	3,91		3,19
C22:1w9		1,27		1,82				2,12
C22:1w7								
Mono-insaturés	0	34,30	27,02	34,35	28,54	34,01	52,78	33,56
C18:2w6		22,76	11,62	21,64	16,52	22,08	8,22	24,39
C20:2w6				0,92				
C20:4w6								
C20:4w3								
C20:5w3		1,94		2,37	1,81	2,17		3,29
C22:5w3								
C22:6w3		4,11		4,84		4,71	0,94	8,29
Polyinsaturés	0	28,81	11,62	29,77	18,33	28,96	9,16	35,97

3.3.2. Hydrolyses croisées

Dans le but de solubiliser au maximum les protéines contenues dans les têtes de crevette, des hydrolyses croisées ont été entreprises. Elles consistent à effectuer 2 hydrolyses successives sur la même matière première, le culot de la première hydrolyse servant de substrat pour la deuxième. Deux hydrolyses, en condition acide puis basique sont réalisées (Figure 27). Des analyses biochimiques sont ensuite effectuées sur le surnageant et le culot final pour étudier la solubilisation des différentes substances.

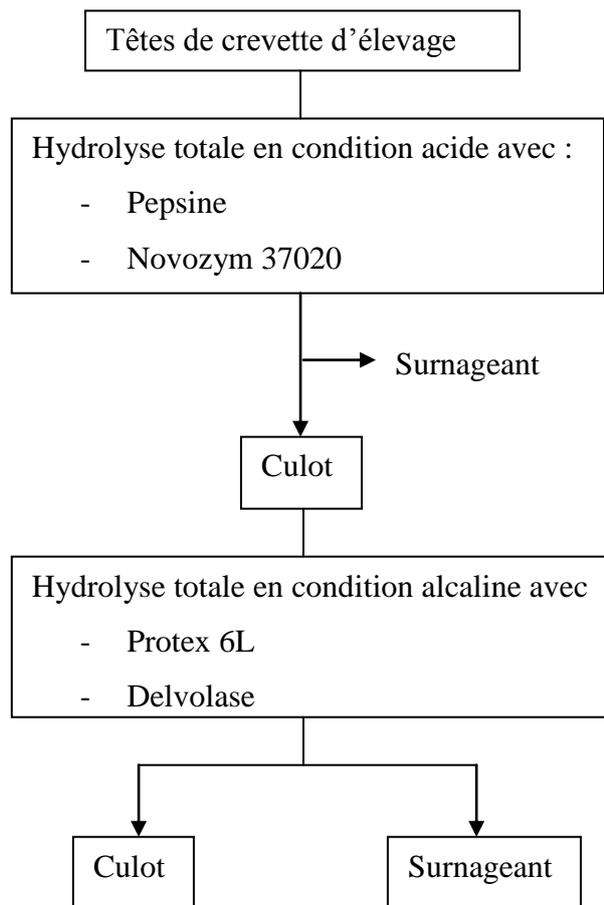


Figure 27 : Schéma du déroulement des hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage.

3.3.2.1. Solubilisation de la matière

La Figure 28 représente la distribution de la matière lors de la deuxième phase des hydrolyses croisées : culot de la première hydrolyse issue de la première enzyme, hydrolysé avec la deuxième enzyme. Cette figure montre que la solubilisation de la matière est sensiblement équivalente à celle obtenue sans hydrolyse enzymatique. En effet, moins de 40% de la matière passe dans le surnageant dans tous les cas. Le croisement avec la Novozym 37020 conduit à la solubilisation la plus élevée.

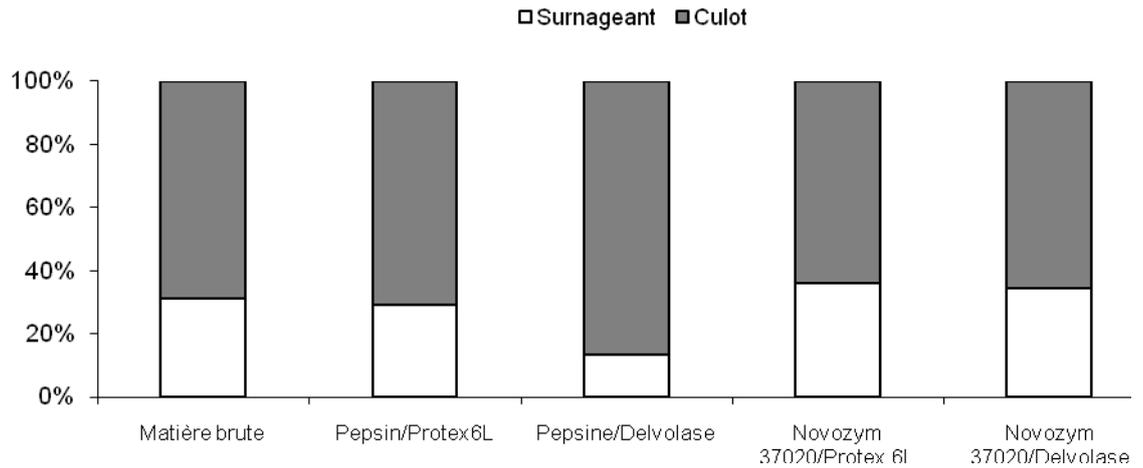


Figure 28 : Distribution de la matière dans les fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'aquaculture.

Le rendement des hydrolyses croisées à base de poids sec est consigné dans le Tableau 29. Les rendements obtenus lors des couplages avec la Pepsine sont de loin très faibles par rapport à ceux obtenus avec couplages de la Novozym 37020. Ceux obtenus suite aux couplages avec la Protex 6L sont supérieurs par rapport aux couplages de la Delvolase.

Tableau 29 : Rendement des hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage à base de poids sec.

Enzymes	Rendement (%)
Pepsine/Delvolase	5,86
Pepsine/Protex 6L	7,12
Novozym 37020/Delvolase	12,94
Novozym 37020/Protex 6L	26,49

3.3.2.2. Composition des différentes fractions issues des hydrolyses

La composition des différentes fractions obtenues après les hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage est résumée dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Composition des différentes fractions de têtes de crevette d'élevage issues d'hydrolyses croisées, en g/100g de poids sec.

Fractions	Enzymes	Protéines (%)	Lipides (%)	Cendres (%)	Autres (%)
	Pepsine	47,67 ± 0,68	0,85 ± 0,28	43,26 ± 0,09	8,22
	Pepsine/ Delvolase	44,06 ± 1,26	2,11 ± 1,41	37,89 ± 0,51	15,94
	Pepsine/ Protex 6L	48,08 ± 0,07	0,75 ± 0,14	38,68 ± 0,26	12,49
	Novozym 37020	46,90 ± 0,59	5,32 ± 0,33	28,03 ± 0,49	19,75
	Novozym 37020/ Delvolase	51,44 ± 0,06	0,70 ± 0,36	36,06 ± 0,76	11,80
Soluble	Novozym 37020/ Protex 6L	51,01 ± 0,98	0,83 ± 0,01	36,97 ± 1,39	11,19
	Pepsine/ Delvolase	21,60 ± 0,70	24,45 ± 1,70	21,64 ± 0,51	32,30
	Pepsine/ Protex 6L	21,64 ± 0,00	23,16 ± 0,04	27,59 ± 0,37	27,61
	Novozym 37020/ Delvolase	34,58 ± 0,01	20,50 ± 0,55	21,89 ± 0,37	23,03
Insoluble	Novozym 37020/ Protex 6L	33,41 ± 1,10	28,70 ± 1,23	25,72 ± 0,37	12,18

D'après ce tableau, la concentration en protéines dans les différents hydrolysats obtenus varie de 44,1% à 51,4% du poids sec. Les hydrolysats obtenus avec les couplages de la Novozym 37020 contiennent plus de protéines par rapport à ceux issus des couplages pepsiques. Comparativement au surnageant obtenu par la Novozym 37020 seule, les teneurs en protéines sont nettement plus élevées après ses couplages avec la Delvolase et la Protex 6L. Pour la Pepsine, on note seulement une légère augmentation lors du couplage avec la Protex 6L. Par contre, par rapport aux hydrolyses de longue durée conduites à pH alcalin, les teneurs en protéines sont faibles suite aux hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage.

Comme avec les hydrolyses de longue durée des têtes de crevette, une forte concentration de lipides dans les fractions insolubles est examinée lors des hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage. Les teneurs varient de 20,5% à 28,7% de la matière sèche. Les hydrolysats sont pauvres en lipides avec une teneur variant de 0,7% à 2,1% de la matière sèche. Les hydrolysats les plus pauvres en lipides sont produits par les couplages de la Novozym 37020.

En ce qui concerne les cendres, les hydrolysats obtenus par hydrolyses croisées présentent des teneurs légèrement moins importantes que ceux issus des hydrolyses de longue durée. Elles sont comprises entre 36,1% à 38,7% de la matière sèche.

3.3.2.3. Solubilisation des protéines

La solubilisation des protéines suite aux hydrolyses croisées des têtes de crevette est étudiée par la solubilisation des protéines totales, le profil moléculaire et le profil en acides aminés des hydrolysats.

3.3.2.3.1. Protéines totales

La distribution des protéines totales dans le surnageant et le culot lors de la deuxième phase des hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage est indiquée dans la Figure 29. Moins de 50% des protéines passent en solution pour toutes les hydrolyses. Les couplages avec la Novozym 37020 présentent les meilleures solubilisations avec 44% et 46% des protéines passées en solution respectivement pour le croisement avec la Delvolase et la Protex 6L.

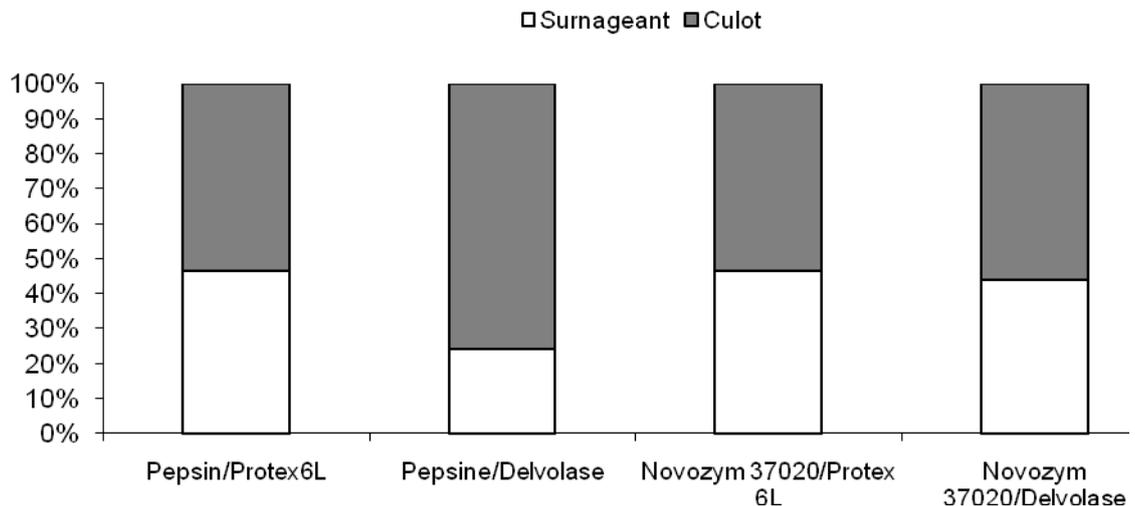


Figure 29 : Distribution des protéines dans les fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage.

3.3.2.3.2. Profil moléculaire

Les profils moléculaires des hydrolysats sont figurés dans les Figures 30 et 31. Ces figures mettent en évidence une transformation du profil lors de la deuxième hydrolyse en milieu basique pour les couplages de la Novozym 37020 avec d'autres enzymes. Pour les couplages avec la Pepsine, les profils moléculaires sont similaires pour les surnageants de la Pepsine seule et ceux obtenus après l'intervention de la Delvolase et de la Protex 6L.

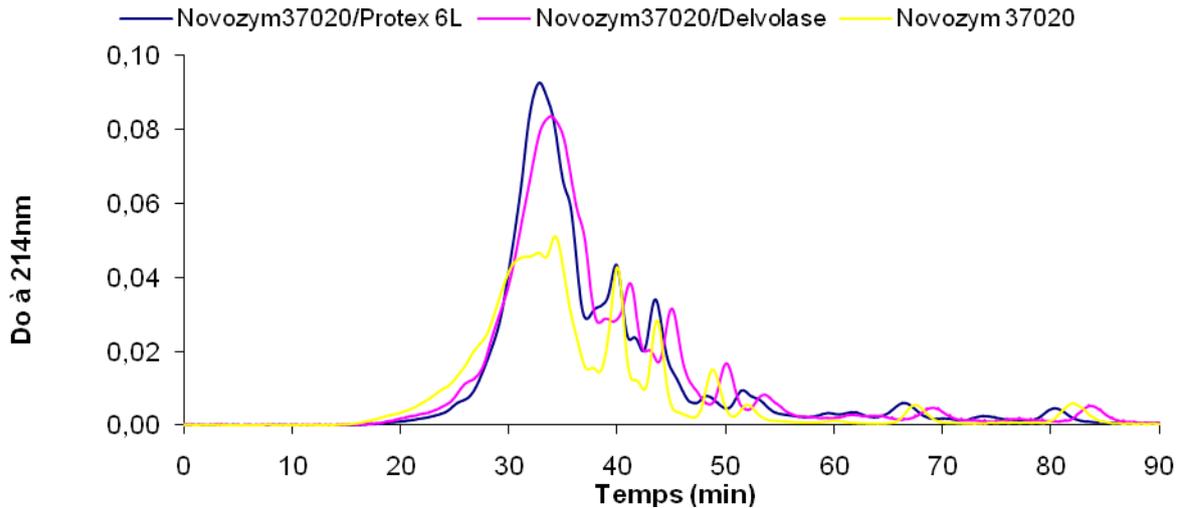


Figure 30 : Chromatogrammes des hydrolysats obtenus avec la combinaison de Novozym 37020/Protex 6L et Novozym 37020/Delvolase.

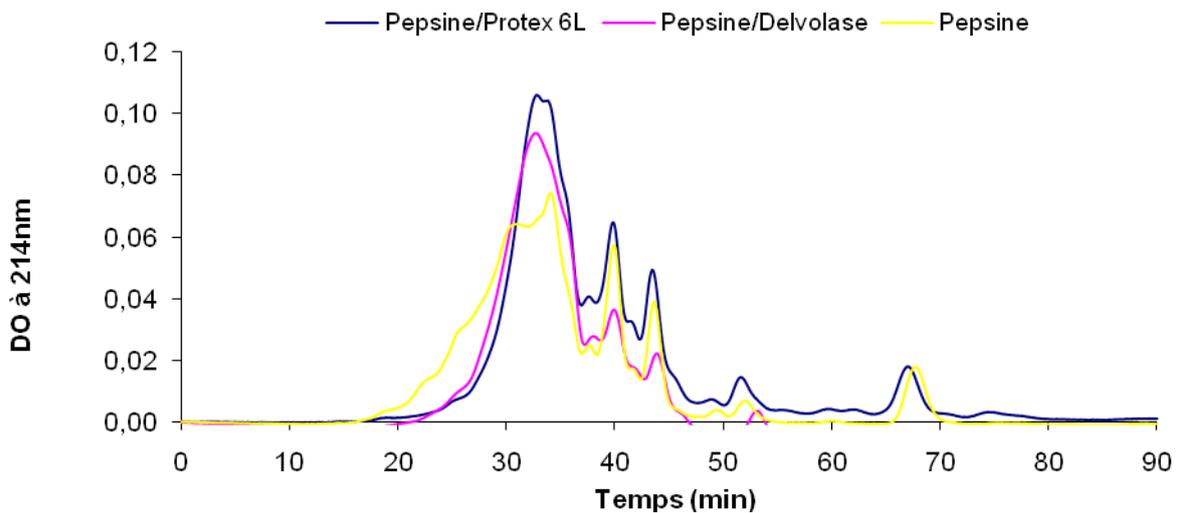


Figure 31 : Chromatogrammes des hydrolysats obtenus avec la combinaison de Pepsine/Protex 6L et Pepsine/Delvolase.

Le Tableau 31 montre la distribution des peptides des hydrolysats selon leurs poids moléculaires. Ainsi, 37,1% à 49,8% des peptides ont un poids compris entre 250 Da et 500 Da et 86% à 93% possèdent un poids moléculaire inférieur à 1000 Da. Comme pour la distribution de la matière sèche et des protéines totales, *ce sont les couplages de Novozym 37020 avec d'autres enzymes qui conduisent à la production d'hydrolysats avec plus de peptides à faible poids moléculaire.*

Tableau 31 : Distribution (en %) des poids moléculaires des hydrolysats de têtes de crevette obtenus lors d'hydrolyses croisées.

Poids moléculaire	1	2	3	4
>7000Da	0,79	0,48	0,49	0,25
5500Da- 7000Da	0,18	0,31	0,29	0,18
3000Da- 5500Da	0,54	1,18	0,88	0,58
2000Da-3000Da	0,75	1,64	1,26	0,88
1000Da- 2000Da	4,23	9,62	6,69	6,01
500Da-1000Da	27,22	40,71	32,29	37,92
250Da- 500Da	49,78	37,06	39,93	38,47
<250Da	16,08	8,42	17,6	15,24

1 : Pepsine/Protex 6L ; **2** : Pepsine/Delvolase; **3**: Novozym 37020/Protex 6L;
4: Novozym 37020/Delvolase.

3.3.2.3.3. Composition en acides aminés

En ce qui concerne la concentration en acides aminés dans les hydrolysats, les valeurs obtenues en mg/100g de matière sèche sont indiquées dans le Tableau 32. Par rapport aux hydrolyses de longue durée, la proportion d'acides aminés essentiels est améliorée dans la phase soluble lors des hydrolyses croisées.

On note également qu'aucun acide aminé n'a été détruit lors des hydrolyses croisées. Seule la concentration en tyrosine a diminuée lors du couplage Pepsine/Delvolase.

Tableau 32 : Profil en acides aminés des hydrolysats de têtes de crevette obtenus lors d'hydrolyses croisées, en mg/g du poids sec.

Acides aminés	Matière brute	Novozym 37020/		Pepsine/	
		Protex 6L	Delvolase	Protex 6L	Delvolase
LEU	15,72	35,37	26,20	24,89	23,58
PHE	11,55	28,05	21,45	16,50	18,15
VAL	9,36	30,42	22,23	19,89	19,89
LYS	8,76	17,52	11,68	11,68	5,84
ILE	7,86	28,82	19,65	17,03	18,34
THR	5,95	22,61	14,28	16,66	13,09
HIS	1,55	12,40	7,75	7,75	3,10
MET	1,49	10,43	7,45	7,45	4,47
AAE	62,24	185,62	130,69	121,85	106,46
GLU	24,99	70,56	54,39	38,22	35,28
ALA	21,36	32,93	24,03	24,03	20,47
ASP	21,28	61,18	43,89	34,58	33,25
GLY	18,75	38,25	27,00	29,25	27,00
PRO	17,25	33,35	24,15	25,30	21,85
TYR	7,24	9,05	7,24	9,05	5,43
SER	4,20	19,95	14,70	13,65	14,70
AANE	115,07	265,27	195,4	174,08	157,98
%AAE	35,10	41,17	40,08	41,18	40,26
AAE/AANE	0,54	0,70	0,67	0,70	0,67

ALA : Alanine ; **GLY** : Glycine ; **VAL** : Valine ; **LEU** : Leucine ; **ILE** : Isoleucine ; **THR** : Thréonine ;

SER : Serine ; **PRO** : Proline ; **ASP** : Acide aspartique ; **MET** : Méthionine ; **GLU** : Acide glutamique ; **PHE** : Phénylalanine ; **LYS** : Lysine ; **HIS** : Histidine ; **TYR** : Tyrosine. **AAE** Acides Aminés Essentiels ; **AANE** : Acides Aminés Non Essentiels.

3.3.2.4. Solubilisation des lipides

3.3.2.4.1. Lipides totaux

La distribution des lipides lors de la deuxième phase des hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage est présentée dans la Figure 32. D'après la figure, moins de 1% des lipides totaux se retrouve dans la phase soluble après hydrolyses enzymatiques. Les enzymes utilisées lors de la présente étude pour l'hydrolyse de têtes de crevette n'entraînent pas alors la solubilisation des lipides aussi bien en hydrolyse de 22 heures qu'en hydrolyse croisée.

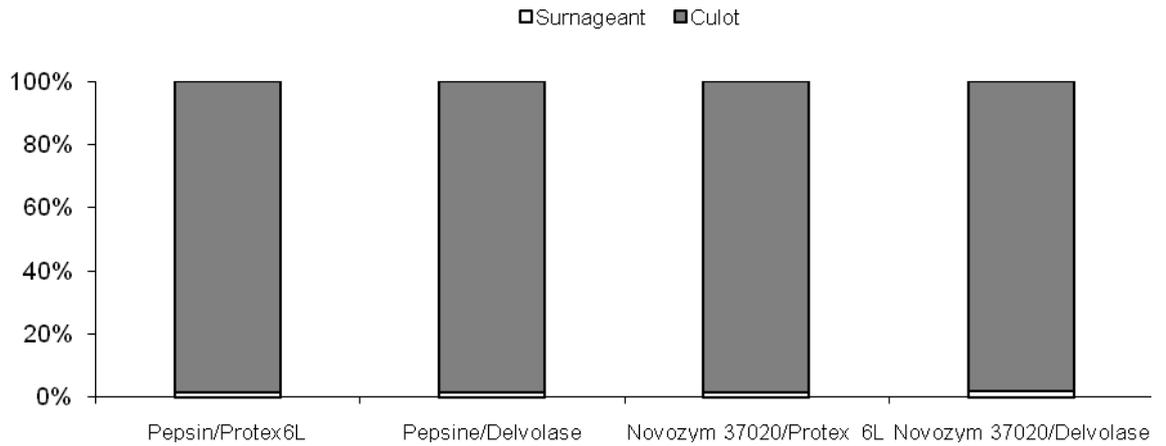


Figure 32 : Distribution des lipides dans les fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage.

3.3.2.4.2. *Composition en phospholipides*

La Figure 33 engendre les teneurs en phospholipides des différentes fractions finales obtenues lors des hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage. Ainsi, par rapport aux hydrolyses enzymatiques de 22 heures, les teneurs en phospholipides dans les différentes fractions sont plus importantes. Elles sont comprises entre 4,0% et 5,2% de la matière sèche pour les surnageants et de 2,2% et 12,9% dans les culots.

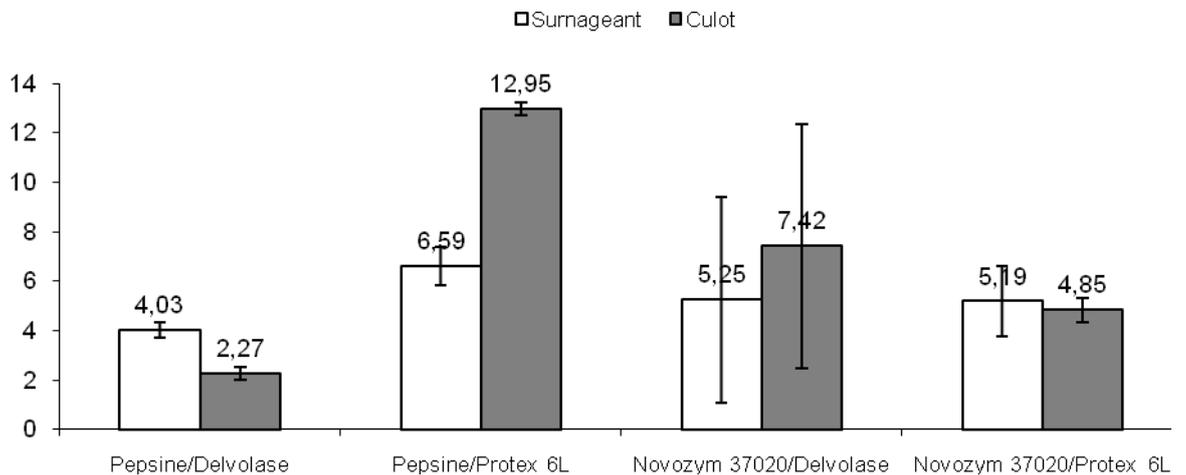


Figure 33 : Composition en phospholipides des fractions finales d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'aquaculture, en g/100g de poids sec.

4. DISCUSSION

4.1. Composition biochimique des co-produits de crevette d'élevage et sauvage

L'étude de la composition des co-produits de crevette en vue de leur valorisation a été largement rapportée dans la littérature. Ainsi, ils sont composés essentiellement de protéines, de lipides, de chitine, de pigments, de calcium et de vitamines (Heu *et al.*, 2003), mais aussi d'éléments minéraux tels que le phosphore, potassium, magnésium, sodium, zinc, fer, cuivre et manganèse (Coward-Kelly *et al.*, 2006).

Le tableau 33 résume les proportions de lipides, protéines et cendres de divers co-produits de crevette dans la littérature.

Tableau 33 : Composition des co-produits de crevette par rapport au poids sec

Partie	Espèce	Protéines	Lipides	Cendres	Chitine	Références
Têtes, carapaces et queues	<i>Pandalus borealis</i>	44,20	2,8	39,00		Heu <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pandalus borealis</i>	43,13	25,2	26,00		Simpson et Haard, 1985
	<i>Penaeus braziliensis et Penaeus subtilis</i>	51,90	3,17	33,00		Sumaya-Martinez, 2004
	ND	43,97	2,99	15,63	9,82	Fanimo <i>et al.</i> , 2000
	ND	28,6	3,2	19,1		Rao et Stevens, 2005
Têtes et carapaces	<i>Penaeus spp.</i>	47,60	7,10	16,60		Ibrahim <i>et al.</i> , 1999
	<i>Penaeus borealis</i>	74,00	0,40	26,90		Gildberg et Stenberg, 2001
Têtes	<i>Penaeus monodon</i> (élevage)	59,56	7,39	26,09	10,87	Babu <i>et al.</i> , 2008
	<i>Penaeus monodon</i> (sauvage)	34,66	3,68	27,91	8,9	Babu <i>et al.</i> , 2008
	<i>Penaeus indicus</i>	46,59	5,68	26,89	9,47	Babu <i>et al.</i> , 2008
	<i>Penaeus monoceros</i>	46,28	6,2	41,74	7,02	Babu <i>et al.</i> , 2008
	<i>Pandalus eous</i>	55,17	18,9	20,58		Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2005
	<i>Penaeus monodon</i>	61,7	4,62	23,68		Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2005
	<i>Metapenaeus endeavouri</i>	62,24	3,17	30,74		Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2005
	<i>Macrobrachium</i>	41,93	10,02	15,17		Fagbenro <i>et al.</i> ; 1996
	<i>Penaeus spp</i>	45,40			13,10	Cira <i>et al.</i> 2002
Carapaces	<i>Penaeus indicus</i>	64,1	18,00	17,12		Coward-Kelly <i>et al.</i> , 2006
	ND	34,6		28,1	22,6	Ferrer <i>et al.</i> , 1996
	<i>Pandalus borealis</i>	41,9	5,2	34,2		Shahidi <i>et al.</i> , 1991
	<i>Crangon crangon</i>	40,6	9,9	27,5	17,8	Synowiecki et Al-Khateeb, 2000
	<i>Nephrops norvegicus</i>	23,5	1,3	61,8	13,3	Beaney <i>et al.</i> , 2005

ND : Non déterminée

Dans tous les cas, les protéines constituent le principal composant des co-produits avec une proportion de 34,7% à 64,1% du poids sec pour les têtes et 23,5% à 41,9% pour les carapaces. Ces protéines sont effectivement présentes dans les tissus conjonctifs, dans le muscle résiduel lié aux carapaces, dans les complexes protéiques avec la chitine et l'astaxanthine (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003). On note également des teneurs importantes en matières minérales, variant de 20,6% à 41,8% de la matière sèche dans les têtes ; et pouvant aller jusqu'à 61,8% dans les carapaces. Les lipides sont présents à raison de 0,4% à 25,2%.

D'une vue générale, la composition des têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage de Madagascar est en accord avec celles rapportées dans la littérature. Entre les 2 types de têtes de crevette étudiées cependant, des différences sont marquées sur la teneur en eau, la teneur en lipides et le profil en acides gras. Ces différences sont dues à la diversité entre l'alimentation (Calado *et al.*, 2005), mais également aux diversités entre les espèces et les environnements, qui ont été attribuées à la différence de la composition en eau et en lipides lors de précédentes études de composition de poissons et de crevette (Karakoltsidis *et al.*, 1995; Luzia *et al.*, 2003; Falch *et al.*, 2006; Sampaio *et al.*, 2006). Dans la présente étude, les crevettes d'élevage sont constituées principalement d'une seule espèce *Penaeus monodon*, élevées en bassins, avec un environnement et une alimentation contrôlés de façon à obtenir une croissance maximale. Par contre, les crevettes sauvages obtenues par la pêche sont composées de plusieurs espèces de *Penaeus* qui se trouvent directement dans la mer avec une alimentation non contrôlée.

Le nombre et la nature des acides aminés identifiés dans les 2 sortes de têtes de crevette sont identiques. Cependant, leurs concentrations présentent une différence selon le type de co-produit. Mise à part la tyrosine présente en quantité équivalente dans les 2 matières étudiées, les autres acides aminés sont de quantité supérieure dans les têtes de crevette sauvage. Cette différence pourrait être due à la différence de la teneur en eau dans les 2 matrices étudiées, et par la différence génétique entre des espèces de crevette.

Compte tenue de la similarité de la quantité de protéines dans les 2 catégories de têtes de crevette étudiées, le criblage des différentes protéases commerciales est effectué sur un seul type de têtes de crevette : têtes de crevette d'élevage.

4.2. Hydrolyses enzymatiques

Les hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage ont été conduites de 2 façons : hydrolyse monoenzymatique de longue durée et hydrolyse croisée avec utilisation consécutive de 2 enzymes différentes.

4.2.1. Hydrolyses de longue durée

Quatre enzymes commerciales (Pepsine, Novozym 37020, Protex 6L et Delvolase) ont été testées sur les têtes de crevette d'élevage pour une hydrolyse de 22 heures à leurs conditions optimales d'activité.

4.2.1.1. Cinétique de l'hydrolyse

La cinétique des hydrolyses est évaluée en fonction du degré d'hydrolyse, proportionnel au nombre de liaisons peptidiques coupées pendant la réaction. Ainsi, après 22 heures d'hydrolyse, les degrés d'hydrolyse sont de 36,5% ; 22,4% ; 18,6% et 23,6% respectivement pour la Pepsine, la Novozym 37020, la Protex 6L et la Delvolase. Par rapport aux autres enzymes, la Pepsine est de loin celle qui est la plus efficace pour couper les liaisons peptidiques.

Une hydrolyse enzymatique de co-produits de crevette *Crangon crangon* a été effectuée avec l'Alcalase à 55°C, pH 8,5. Au bout de 4 heures de réaction, le degré d'hydrolyse évalué selon la méthode au pH-stat a atteint une valeur de 30% (Synowiecki et Al-Khateeb, 2000). Cette valeur est similaire à celle obtenue avec la Pepsine pour la présente étude. En effet, au bout de 4 heures de protéolyse en présence de Pepsine, le DH atteint par les têtes de crevette est d'environ 33%. Une hydrolyse de 24 heures avec des têtes de sardine en présence de Protamex à 50°C et pH 8 (Dumay, 2006) a conduit à un DH de 20%, équivalent à celui trouvé dans la présente étude avec la Protex 6L. Du point de vue de la durée de l'hydrolyse, le plateau qui correspond à l'hydrolyse totale du substrat est atteint avec la Pepsine après 168 minutes, avec la Novozym 37020 après 320 minutes, avec la Protex 6L après 335 minutes et avec la Delvolase après 420 minutes de réaction. Il en ressort donc que la Pepsine s'avère être l'enzyme la plus efficace du point de vue protéolyse des têtes de crevette d'élevage et en terme de temps d'hydrolyse. Cependant, toutes les liaisons peptidiques ne sont pas coupées totalement lors de l'hydrolyse avec la Pepsine. Ceci pourrait s'expliquer, entre autres, par l'inaccessibilité de certaines liaisons à cause de la liaison des protéines avec des substances telles que la chitine, l'astaxanthine ou les lipides.

4.2.1.2. Solubilisation de la matière

D'après la répartition de la matière avant et après hydrolyse, on constate que les hydrolyses enzymatiques réalisées sur les têtes de crevette permettent de solubiliser la matière : 31% de la matière sèche sont localisés dans le surnageant sans hydrolyse alors que plus de la moitié s'y retrouvent après hydrolyse enzymatique. La solubilisation de la matière et la récupération des protéines dans la fraction soluble constituent un des intérêts des hydrolyses enzymatiques. Plusieurs études ont été publiées dans ce sens pour maximiser cette solubilisation (Kristinsson et Rasco, 2000; Liaset *et al.*, 2002; Liaset *et al.*, 2003; Sathivel *et al.*, 2003). Notons que l'acide ou la base ajouté pendant l'hydrolyse influe également sur la quantité de matière sèche retrouvée dans le surnageant.

Dans la présente étude, la Protex 6L et la Pepsine sont les enzymes les plus efficaces pour cette solubilisation. Pourtant, les fractions insolubles demeurent importantes avec plus de 35% de matière sèche. Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence de carapaces, tissus durs difficilement hydrolysables. Cette fraction insoluble a pourtant son intérêt dans l'extraction de la chitine et la production de chitosan (Gildberg et Stenberg, 2001). En effet, lors de la protéolyse, la chitine reste insolubilisée et peut être alors récupérée dans la phase insoluble. Après hydrolyse avec l'Alcalase et filtration de têtes de crevette *Pandalus borealis*, Gildberg et Stenberg ont pu récupérer les peptides et l'astaxanthine dans le filtrat. La phase insoluble a servi ensuite pour l'extraction de la chitine par méthode chimique. La qualité du chitosan dérivé de la chitine obtenue n'est pas affectée par l'action de l'enzyme.

4.2.1.3. Composition des différentes fractions obtenues lors des hydrolyses

Les résultats obtenus sur la composition des différentes fractions obtenues après hydrolyses des têtes de crevette d'élevage ont montré une teneur élevée en protéines et en cendres dans les surnageants, et une teneur élevée en lipides dans les phases insolubles.

Les teneurs en protéines dans les phases solubles obtenues avec les hydrolyses en condition acide (48,1% et 51,6%) sont faibles par rapport à celles effectuées en condition alcaline (63,9% et 64,7%). Ce résultat est dû à la proportion élevée de cendres présentes dans les surnageants, notamment lors de l'hydrolyse avec la Pepsine (41,1%), diminuant ainsi la proportion de protéines. Les teneurs en protéines obtenues suite aux hydrolyses enzymatiques à condition acide des têtes de crevette sont similaires à celles rapportées lors d'ensilage et de fermentation de co-produits et de têtes de crevette qui sont bien connues d'être effectués en condition de milieu acide. En effet, une fermentation lactique avec des co-produits de crevette *Penaeus* spp. en provenance du Mexique a conduit à la production d'hydrolysats à 49,6% de

protéines par rapport au poids sec (Bueno-Solano *et al.*, 2009). La fermentation a été effectuée pendant 36 heures à 30°C en présence de 10% de sucre de canne et de 5% d'inoculum commercial, avec un pH de départ de 6,5. Une étude sur l'ensilage de têtes de crevette en provenance du Brésil pendant 22 heures en présence de 17% d'acide acétique a conduit également à une teneur en protéines similaire (49,4%), et a prouvé leur efficacité lors de leur utilisation en alimentation du tilapia *Oreochromis niloticus* (Oliveira Cavalheiro *et al.*, 2007). Notons que les hydrolysats de co-produits de crevette possèdent une teneur en protéines supérieure à celle de la matière initiale, aussi bien dans la littérature que dans la présente étude. Comparées aux résultats obtenus avec des hydrolysats de co-produits de crevette du genre *Macrobachium*, les teneurs en protéines des phases solubles de têtes de crevette d'élevage *Penaeus monodon* de Madagascar sont plus élevées. Cela est valable pour un ensilage de têtes de crevette du Nigeria *Macrobachium vollenhovenii* en présence de 15% de molasse et 5% d'inoculum, qui conduit à un hydrolysats avec une teneur en protéines de 41,8% de la matière sèche (Fagbenro et Bello-Olusoji, 1997). Egalement, l'hydrolyse enzymatique de queue de crevette *M. amazonicum* d'origine brésilienne avec de l'hépatopancréase a conduit à la production d'hydrolysats à 40,1% de protéines par rapport à la matière sèche (Vieira *et al.*, 2005).

En ce qui concerne la concentration protéique des phases solubles obtenues sous condition alcaline, les résultats sont similaires aux 64,3% de la matière sèche obtenus par Synowiecki et Al-Khateeb sur des hydrolysats de carapaces déminéralisées de crevette *Crangon crangon*. Dans cette étude, les carapaces ont été soumises à une déminéralisation avec 10% d'acide chlorhydrique à 20°C pendant 30 minutes, avant d'être hydrolysées avec l'Alcalase à 55°C et à pH 8,5 (Synowiecki et Al-Khateeb, 2000).

Il existe cependant des hydrolysats de têtes de crevette ayant des teneurs en protéines plus élevées. C'est le cas de l'hydrolysats de têtes de crevette préparé avec l'Alcalase (Gildberg et Stenberg, 2001) et avec des protéases de *Bacillus subtilis* et *Aspergillus oryzae* (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005). Les teneurs en protéines sont respectivement de 86,0% et de 89,8% à 91,0%. Ces différences de solubilisation des protéines pourraient être attribuées à la nature exacte des co-produits, leur origine géographique, la saisonnalité des co-produits de crevette et aux méthodes utilisées. Les hydrolysats de poissons et de co-produits de poisson ont été également étudiés dans la littérature dans le but de promouvoir la nutrition humaine et animale. Ainsi, certains de ces hydrolysats présentent des teneurs en protéines similaires à celles obtenues avec les têtes de crevette d'élevage étudiées dans le présent travail. C'est le

cas par exemple de l'hydrolysate de tilapia *Oreochromis mossambicus*, obtenu avec l'Alcalase à pH 8 et 55°C pendant 5h, avec une teneur en protéines de 49,6% de la matière sèche (Abdul-Hamid *et al.*, 2002). L'hydrolyse pepsique de squelette de hoki pendant 48 heures en présence d'acide acétique a induit à la concentration des protéines dans l'hydrolysate obtenu, à raison de 63,9% par rapport au poids sec (Jung et Kim, 2007), ce qui est similaire à celle obtenue lors d'hydrolyses de têtes de crevette d'élevage malgache en condition alcaline.

Les hydrolyses enzymatiques effectuées sur les têtes de crevette d'élevage produisent des hydrolysats très pauvres en lipides (1,1 à 3,6% du poids sec). La production d'hydrolysats de co-produits de crevette pauvres en lipides (inférieur à 1,5% du poids sec) est rapportée dans la littérature (Gildberg et Stenberg, 2001; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2006a). D'autres hydrolysats de co-produits de poisson de mer présentent également une teneur en lipides faible. On peut citer les co-produits de colin (Imm et Lee, 1999), de hareng (Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999; Sathivel *et al.*, 2003), de capelin (Shahidi *et al.*, 1995) et de hoki (Jung et Kim, 2007). Cependant, des hydrolyses effectuées sur des co-produits de poisson gras, thon et sardine notamment, ont contribué à la solubilisation des lipides qui se sont retrouvés dans le surnageant (Bald *et al.*, 2004; Dumay *et al.*, 2006).

Les teneurs en cendres des hydrolysats obtenus en condition acide (32,9% à 41,1% du poids sec) sont similaires à celles reportées par Jung et Kim lors de l'hydrolyse pepsique de hoki de la Corée avec 35,4% de la matière sèche (Jung et Kim, 2007). Les valeurs obtenues par hydrolyses en milieu alcalin sont comparables à celles trouvées par Thiansilakul *et al.* (24,6%) sur des hydrolysats de carangue et par Gbogouri *et al.* (22,3%) sur des hydrolysats de co-produits de saumon (Gbogouri *et al.*, 2004; Thiansilakul *et al.*, 2007).

Les teneurs en matières minérales des hydrolysats issus d'hydrolyses en condition acide sont supérieures à celles des hydrolysats obtenus en condition alcaline. Cette différence pourrait être due en partie par la solubilisation de la matière inorganique au cours de l'hydrolyse enzymatique à condition acide. En effet, l'acidité favorise la solubilité des sels de calcium impliqués dans la structure des exosquelettes de crevette (Jung et Kim, 2007). De tels phénomènes ont été observés au cours de la fermentation de co-produits de crevette du Mexique et de la Thaïlande ayant pour but d'extraire la chitine par déminéralisation et déprotéinisation (Cira *et al.*, 2002; Rao and Stevens, 2005). L'addition d'acide et de base pendant l'hydrolyse pourrait être aussi à l'origine de la teneur en cendres élevée dans les hydrolysats (Thiansilakul *et al.*, 2007). Par ailleurs, des hydrolyses ont été effectuées par Nguyen sur les têtes, les viscères et les queues de thon avec Protamex à un pH initial de 6,4 et

sans ajustement du pH par addition d'acide ni de base. Après 12 heures d'hydrolyse, une diminution des teneurs en cendres dans les hydrolysats a été observée dans tous les cas (Nguyen, 2009). Ceci soutient le fait que l'addition d'acide ou de base durant l'hydrolyse est à l'origine de l'augmentation de la teneur en cendres dans les hydrolysats.

La solubilisation de la matière minérale lors des hydrolyses enzymatiques entraîne d'une part l'obtention d'hydrolysat riche en matières minérales donc moins concentré en protéines. La teneur élevée en protéines dans les hydrolysats est rapportée être une contrainte pour l'utilisation de ces hydrolysats (Shahidi *et al.*, 1995 ; Slyzite *et al.*, 2005 ; Picot *et al.*, 2006). D'un autre point de vue, le passage en solution du calcium de l'exosquelette des têtes de crevette permet de les récupérer dans la phase soluble. Afin d'investir d'autres sources de calcium dans l'alimentation humaine, une hydrolyse pepsique a été menée sur des squelettes de hoki *Johnius belengerii* par Jung et Kim. Les hydrolyses de 48 heures à pH 2,2 ont ainsi permis la solubilisation du calcium, associé à des peptides dans le surnageant. Les hydrolysats ainsi obtenus constituent une bonne source de calcium pouvant être introduits dans les aliments fortifiés pour la population qui ne tolère pas le lactose, étant donné qu'en alimentation humaine, la source de calcium est constituée principalement par le lait et les produits laitiers (Jung et Kim, 2007). De telles applications paraissent intéressantes pour les hydrolysats obtenus lors du présent travail. La déminéralisation de l'exosquelette a également un intérêt pour l'extraction de la chitine.

4.2.1 4. Solubilisation des protéines

La solubilisation des protéines pendant la protéolyse se manifeste par la proportion de protéines totales passées en solution et la diminution de leur taille, ainsi qu'au changement du profil en acides aminés.

4.2.1.4.1. Protéines totales

Les résultats montrent que les protéines constituent la majeure partie de la phase soluble après hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage. La Protex 6L est l'enzyme la plus efficace pour cette solubilisation avec 79% de protéines retrouvées dans le surnageant, suivie par la Pepsine (74%) et la Delvolase (70%). Il a été rapporté dans la littérature que la protéolyse des co-produits de crevette est plus efficace à des pH élevés (Rao *et al.*, 2000 ; Bhaskar *et al.*, 2007). Ici, la Pepsine fait exception en contribuant à une solubilisation similaire à celle obtenue en condition alcaline. Par rapport au nombre de liaisons peptidiques coupées cependant, cette solubilisation est faible. Rappelons que la

Pepsine est l'enzyme la plus efficace pour le clivage des liaisons. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les liaisons peptidiques coupées ne permettent pas aux protéines d'atteindre le poids moléculaire pour se solubiliser. Lors d'hydrolyses enzymatiques de co-produits de thon, le même phénomène a été attribué par Nguyen par la coupure de liaisons peptidiques sur les peptides déjà solubilisés (Nguyen, 2009).

4.2.1.4.2. Composition en acides aminés

Comme attendu, la concentration en acides aminés augmente considérablement à la suite des hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage. La condition alcaline est plus favorable à cette concentration avec une augmentation moyenne de 250% pour chaque acide aminé avec la Protex 6L et de 215% avec la Delvolase. Cependant, lors de l'hydrolyse avec la Protex 6L, l'histidine est détruite. L'histidine a, pourtant, une grande importance dans la valeur nutritionnelle des protéines car elle appartient à la classe des acides aminés indispensables (Dupin *et al.*, 1992). La Novozym 37020 conduit également à la destruction de la méthionine, ainsi que la diminution de la concentration de l'alanine, de la phénylalanine et de la tyrosine dans l'hydrolysate. Plusieurs réactions chimiques peuvent être à l'origine de destruction d'acides aminés. Les acides aminés basiques subissent une désamination à pH supérieur à 9,5. Cette réaction pourrait être à l'origine de la destruction de l'histidine lors de l'hydrolyse avec la Protex 6L. Notons que la méthionine et la phénylalanine sont des acides aminés essentiels. Leur destruction diminue la qualité nutritionnelle des protéines des têtes de crevette d'élevage. L'utilisation de la Novozym 37020 et de la Protex 6L à longue durée n'est pas alors favorable pour améliorer la qualité des protéines des têtes de crevette d'élevage étudiées.

L'acide glutamique est l'acide aminé présent en quantité la plus importante dans les hydrolysats. Ce résultat est similaire à ceux obtenus par certains auteurs sur les hydrolysats de têtes de crevette du genre *Penaeus* et *Pandalus* de Thaïlande (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2006a). Lors de ces études, les hydrolyses ont été effectuées pendant 2 heures à 60°C avec des enzymes extraites de *Bacillus subtilis* et *Aspergillus oryzae* à pH 8 et pH 6 respectivement. Il en ressortait alors que l'acide glutamique constitue l'acide aminé principal des hydrolysats de têtes de crevette *Penaeus monodon* avec une concentration de 11,8% de la matière sèche, suivi par l'acide aspartique avec 8,5% de la matière sèche (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005). Cette prédominance de l'acide glutamique et de l'acide aspartique est aussi rapportée par Armenta et Guerrero-Legarreta sur des extraits de caroténo-protéines de co-produits de

crevette *Penaeus vannamei* provenant du Mexique. Leurs concentrations représentent respectivement 0,14% et 0,13% des extraits. Ces extraits de caroténoïdes ont été obtenus après 48 heures de fermentation lactique à 30°C des co-produits avec une souche *Pediococcus pentosaceus*, suivie de lavage avec un système de solvant organique, centrifugation et lyophilisation. Les caroténoïdes ont subi ensuite une hydrolyse enzymatique de 22 heures à 40°C en présence de Savinase et de Lipolase avant l'évaluation de l'astaxanthine, les protéines solubles ainsi que les acides aminés libérés (Armenta et Guerrero-Legarreta, 2009). Par contre, Bueno-Solano *et al.* ont rapporté la prédominance de la tyrosine lors de la fermentation effectuée sur des têtes de crevettes *Penaeus* spp en provenance du Mexique (Bueno-Solano *et al.*, 2009). La fermentation a été effectuée avec 5% d'inoculum commercial et en présence de 15% de sucre de canne à 30°C pendant 36 heures. La tyrosine s'est avérée être l'acide aminé prédominant lors de cette étude (0,7% de la matière sèche), suivie de loin par l'acide glutamique, l'alanine et l'acide aspartique (0,38%, 0,36% et 0,34% respectivement). Ces différences de profil en acides aminés pourraient être attribuées à la différence des espèces de crevette étudiée, à la différence des conditions environnementales ainsi qu'à la différence des méthodes utilisées.

En ce qui concerne les acides aminés essentiels, mis à part le tryptophane qui n'a pas pu être quantifié à cause de sa destruction pendant l'hydrolyse acide, et la cystéine qui est semi-essentielle, tous les acides aminés essentiels sont présents dans les têtes de crevette étudiées. Suite aux hydrolyses enzymatiques de longue durée des têtes de crevette d'élevage, la proportion des acides aminés essentiels est améliorée. Initialement, de 35,1%, elle est devenue 37,8% à 39,8% des acides aminés totaux. De même, le rapport acides aminés essentiels/acides aminés non essentiels est passé de 0,54 à plus de 0,6 après hydrolyses de longue durée des têtes de crevette. Une référence de 40% d'acides aminés essentiels, et de 0,6 de rapport acides aminés essentiels/ non essentiels a été établie par la FAO pour qualifier les protéines (Cao *et al.*, 2008). Les profils en acides aminés des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage de Madagascar présentent des valeurs similaires, leur offrant ainsi une qualité nutritionnelle intéressante.

La présence d'acides aminés essentiels en quantité importante dans les hydrolysats de crevette n'est pas nouvelle. L'hydrolysat de co-produits de crevette *Pandalus borealis* possède une bonne valeur nutritionnelle du fait de leur composition intéressante en acides aminés essentiels (Gildberg et Stenberg, 2001). Synowiecki et Al-Khateeb ont également rapporté l'intérêt en alimentation de l'hydrolysat de co-produits de crevette *Crangon crangon*

obtenu avec l'Alcalase, par leur composition en acides aminés essentiels (Synowiecki et Al-Khateeb, 2000). Enfin, l'hydrolysate obtenu après fermentation lactique de têtes de crevette *Penaeus spp* a montré une teneur intéressante en méthionine et en lysine à raison de 1,9% et 7,4%, qui constituent des acides aminés limitants chez les végétaux. L'utilisation de ces co-produits présente alors un grand intérêt dans l'élevage de tilapia *Oreochromis niloticus* (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002).

Les hydrolyses de longue durée de têtes de crevette d'élevage ont considérablement amélioré la teneur en lysine dans la phase soluble. L'amélioration la plus importante est obtenue avec la Pepsine par le doublement de la teneur après hydrolyse. Cette amélioration est d'une importance pour la nutrition humaine et animale. En effet, la lysine constitue un facteur limitant de la qualité des protéines généralement dans les céréales et les produits d'origine végétale. La lysine possède un rôle essentiel dans le développement de l'organisme et c'est également un précurseur de la carnitine qui est indispensable à la conversion des acides gras en énergie, ainsi qu'à la régulation du taux de cholestérol (Morris *et al.*, 2005).

L'acide glutamique (Heu *et al.*, 2003), l'acide aspartique, l'alanine et la glycine (Jung Nim *et al.*, 2002) constituent des acides aminés exhausteurs de saveur. Leur proportion n'est pas améliorée lors des hydrolyses de longue durée des têtes de crevette d'élevage. Cependant, ils sont présents en quantité importante dans les hydrolysats (44% à 47% des acides aminés totaux), augmentant encore l'intérêt de ces hydrolysats en nutrition. Ces teneurs sont similaires aux 46,5% retrouvés par Cao *et al.* après autolyse de co-produits de crevette. Ces auteurs ont proposé leur utilisation comme additif alimentaire en nutrition humaine à cause de cette proportion élevée (Cao *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009). Les acides aminés exhausteurs de saveur existent également dans d'autres hydrolysats de co-produits de crevette. Ainsi, lors d'une étude sur l'utilisation de sauce de co-produits de crevette *Trachypena curvirostris* obtenu après fermentation, il a été rapporté que l'acide glutamique et l'acide aspartique sont responsables du goût, l'augmentation de leur composition après fermentation a alors influencé fortement le goût de la sauce obtenue (Kim *et al.*, 2003). L'hydrolyse effectuée par Ruttanapornvareesakul *et al.* sur les têtes de crevette *Penaeus spp*, a montré également leur intérêt nutritionnel en alimentation humaine et animale dû au fait de la présence en quantité importante de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'alanine (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005).

4.2.1.4.3. Profils moléculaires

En ce qui concerne la taille des peptides, les profils moléculaires des hydrolysats de têtes de crevette et de la matière brute montrent la diminution de la taille des peptides lors des hydrolyses effectuées. Ce fait confirme clairement la coupure de liaisons peptidiques pendant l'hydrolyse. L'intérêt nutritionnel des peptides de petite taille repose sur leur meilleure digestibilité (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002 ; He *et al.*, 2006). En effet, une étude sur le remplacement de farine de poissons par des têtes de crevette *Penaeus* spp fermentées dans l'alimentation de tilapia a montré une meilleure performance sur le gain de poids et la conversion alimentaire avec une substitution de 15%. La fermentation a été conduite pendant 2 jours à 30°C en présence de 10% de sucre et 5% d'inoculum *Lactobacillus* spp. Les meilleures performances obtenues sont attribuées à la concentration en acides aminés, mais aussi à la meilleure absorption des têtes de crevette fermentées qui possèdent un poids moléculaire compris entre 0,23 à 27 kDa (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002). Une hydrolyse enzymatique de crevette *Acetes chinensis* avec des protéases extraites de *Bacillus* spp. SM 98011 pendant 5 heures à 50°C et pH 7 a produit également des peptides de petite taille (40,8% des peptides possèdent un poids moléculaire inférieur à 3 kDa). Ces peptides présentent un intérêt, entre autre, dans leur facilité d'absorption intestinale. Ils présentent également des activités anti-hypertensive et antioxydante (He *et al.*, 2006). La bioactivité constitue effectivement un autre intérêt de la production de peptides de petite taille. Par ailleurs, de nombreux peptides de petite taille et d'origine marine ont été identifiés, présentant des activités biologiques. C'est le cas par exemple des hydrolysats de têtes de crevette *Penaeus aztecus* et de muscle de morue présentant des activités sécrétagogues après fractionnement par HPLC. Le peptide identifié possède un poids moléculaire de 1 000 kDa après une hydrolyse avec Alcalase à 40°C à pH 8 et pendant 2 heures (Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003). Un hydrolysat pepsique de squelette de colin a également montré des activités anti-hypertensives après 8 heures d'hydrolyse à 37°C et pH 2, suivie d'ultrafiltration. Le peptide actif a été isolé et présente un poids moléculaire inférieur à 1 kDa (Je *et al.*, 2004). Enfin, une activité antioxydante a été identifiée dans les hydrolysats de squelette de thon après 8 heures d'hydrolyse avec différentes enzymes (Pepsine, Chymotrypsine, Trypsine, Alcalase, Neutrase, Papaïne). Il ressortait de cette étude que l'hydrolysat obtenu avec la pepsine présente l'activité la plus élevée avec un peptide de 1 519 Da (Je *et al.*, 2007). L'hydrolyse enzymatique des têtes de crevette effectuée au cours de la présente étude pourrait être alors

une voie possible pour la production d'hydrolysats avec des intérêts nutritionnel et biologique, les peptides produits ayant majoritairement un poids moléculaire inférieur à 2 000 Da.

4.2.1.5. Solubilisation des lipides

4.2.1.5.1. Lipides totaux

Après les hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage, les lipides ne sont pas solubilisés et restent dans les culots d'hydrolyse. L'hydrolyse en milieu acide est plus efficace pour concentrer les lipides dans le culot. La Pepsine s'avère être l'enzyme la plus efficace avec une extraction de 95% des lipides dans le culot après 22 heures d'hydrolyse.

Par conséquent seulement 5 à 12% des lipides sont retrouvés dans les phases solubles. Comme il s'agit ici de protéolyse enzymatique, cette faible solubilisation des lipides n'est pas surprenant à la fin de l'hydrolyse. Ce même phénomène a été observé au cours de l'hydrolyse de co-produits de thon (têtes, viscères et queue), où 2 à 20% seulement des lipides ont été récupérés dans la phase soluble après hydrolyse de 12 heures avec Protamex (Nguyen, 2009). Toutefois, dans certains cas, il a été rapporté que la protéolyse entraîne une solubilisation des lipides, due à la rupture des tissus (Kechaou *et al.*, 2009). Des hydrolyses menées sur des têtes et viscères de sardine ont permis ainsi la solubilisation d'au moins 60% des lipides (Dumay, 2006). Ce qui n'est pas le cas pour les têtes de crevette d'origine de Madagascar. Ces résultats montrent que l'extraction des lipides par hydrolyse enzymatique dépend des matières premières et des enzymes utilisées.

4.2.1.5.2. Profil en acides gras et teneurs en phospholipides

En ce qui concerne les acides gras, les hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage provoquent la destruction de certains d'entre eux. En effet, sur 21 acides gras présents dans la matière brute, seulement 1 à 12 acides gras sont retrouvés dans les différentes fractions. D'une vue générale, les acides gras saturés dominent dans les têtes de crevette de Madagascar et les différentes fractions obtenues lors des hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage, avec une prédominance de l'acide palmitique. Ceci est en accord avec l'étude effectuée sur des crevettes péneïdes sauvages d'origine brésilienne (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*) où l'importance de l'acide palmitique dans ces crevettes, à raison de 82 à 139mg/100g de crevettes a été également observée (Bragagnolo et Rodriguez-Amaya, 2001).

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont les plus intéressants du point de vue nutritionnel se retrouvent pour la plupart insolubilisés lors des hydrolyses enzymatiques des têtes de crevette d'élevage. Cependant, par rapport à la matière première, leur proportion n'est pas améliorée suite aux hydrolyses avec la Pepsine, la Novozym 37020 et la Protex 6L. Seule l'hydrolyse avec la Delvolase conduit à une augmentation de leur concentration dans la fraction culot avec une proportion initiale de 27,5% qui passe à 36,0% des acides gras totaux après hydrolyse. L'acide linoléique est le plus affecté par l'augmentation de la concentration. L'EPA et le DHA restent à des concentrations similaires à celle de la matière première. L'augmentation des AGPI dans l'huile de têtes de crevette a été également rapportée par Guillou *et al.* suite à l'ensilage de têtes de crevette. Contrairement à la présente étude, l'EPA et le DHA ont été les plus concernés par cette augmentation de concentration (Guillou *et al.*, 1995).

Par rapport aux autres co-produits de crevette rapportés dans la littérature, les teneurs en EPA et DHA des co-produits de crevette et de leurs fractions d'hydrolyse étudiée dans la présente étude sont faibles. Heu *et al.* ont rapporté en effet une teneur de 8,9% et 10,7% d'EPA dans les co-produits de *Pandalus borealis* et *Trachypena curvirostris*, et de 10,7% et 10,9% de DHA respectivement (Heu *et al.*, 2003). Guillou *et al.* ont rapporté également une teneur de 10,1% d'EPA et 8,5% de DHA dans l'huile de co-produits de crevette nordique (Guillou *et al.*, 1995).

Concernant les phospholipides, ils sont concentrés également dans la phase insoluble des hydrolysats contenant la quasi-totalité des lipides après hydrolyse enzymatique. Contrairement aux hydrolyses de co-produits de thon suite à lesquelles les phospholipides se retrouvent aussi bien dans la phase soluble qu'insoluble (Nguyen, 2009), les hydrolyses de têtes de crevette effectuées au cours de la présente étude semblent concentrer cette classe de lipides dans la phase insoluble, ce qui est alors intéressant pour la possibilité de récupération des phospholipides. En effet, les phospholipides présentent un intérêt particulier en alimentation par leur propriété émulsifiante, elles sont ainsi utilisées comme ingrédients entre autres en pâtisserie, chocolaterie, ainsi que dans différents plats cuisinés (Schneider, 2001). Les phospholipides constituent également la classe de lipides qui présentent le plus d'activité biologique. Selon les études menées sur l'hydrolyse de têtes et viscères de sardine, l'extraction des phospholipides est possible dans la phase soluble, vu que la majeure partie des lipides ont été solubilisés durant les hydrolyse avec Protamex, Alcalase et Flavourzyme (Dumay, 2006).

En guise de conclusion, toutes enzymes confondues, les hydrolyses enzymatiques de 22 heures des têtes de crevette d'élevage s'avèrent être intéressantes du point de vue séparation des différentes substances et de l'amélioration de la qualité des protéines. En effet, les protéines se retrouvent solubilisées pour la majorité dans la phase aqueuse tandis que les lipides et les carapaces résiduelles qui renferment la chitine sont concentrés dans la phase solide à la fin des hydrolyses. La valeur nutritionnelle des protéines de la phase aqueuse est améliorée par l'augmentation de la concentration des acides aminés comparativement à la matière brute, et des peptides de courtes chaînes pouvant avoir des activités biologiques et fonctionnelles se retrouvent aussi dans cette phase.

Une différence est notée en fonction de la condition d'hydrolyse : Le milieu alcalin favorise la solubilisation des protéines, la concentration des acides aminés et la génération de peptides de petite taille. Le milieu acide conduit à la production d'hydrolysats très riches en matières minérales qui pourraient provenir en partie de la déminéralisation de l'exosquelette de crevette. Cette déminéralisation partielle favorise l'extraction de la chitine par la suite. La Pepsine fait cependant exception car elle conduit à une solubilisation élevée des protéines tout en favorisant la déminéralisation de l'exosquelette.

Les culots d'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage obtenus suite aux hydrolyses de longue durée contiennent encore des protéines à raison de 29,2% à 47,1% du poids sec. Il est bien connu que chaque enzyme possède une activité spécifique sur la nature des liaisons peptidiques coupées. Pour optimiser l'extraction des protéines, des hydrolyses croisées entre les enzymes sont alors effectuées sur les têtes de crevette d'élevage.

4.2.2. Hydrolyses croisées

Les hydrolyses croisées consistent à utiliser 2 enzymes consécutivement pour l'hydrolyse des têtes de crevette. Une enzyme agissant à condition acide a été utilisée en premier lieu. Ensuite le culot généré lors de cette hydrolyse est rehydrolysé en milieu alcalin. Le surnageant et le culot de la deuxième hydrolyse sont caractérisés par la suite.

Ainsi, les rendements des hydrolyses couplées avec la Novozym 37020 (12,9% à 26,5%) sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec la Pepsine couplée avec d'autres enzymes (5,9% à 7,1%). Par rapport aux hydrolyses de 22 heures, ces rendements finaux sont largement plus faibles. Lors des hydrolyses de longue durée, la Novozym 37020 s'avère être l'enzyme la moins efficace pour la solubilisation de la matière. Le rendement élevé lors de son couplage avec une autre enzyme est alors dû au fait que son culot contient encore une quantité non négligeable de matières qui sont solubilisées lors de la deuxième hydrolyse.

Inversement, le faible rendement des hydrolyses couplées de la Pepsine est causé par la faible teneur en matière dans le culot pepsique.

La solubilisation de la matière lors de la deuxième phase des hydrolyses croisées est équivalente à celle obtenue sans hydrolyse enzymatique. Ce résultat suggère l'hydrolyse enzymatique sur la matière déjà soluble, n'affectant plus ainsi leur solubilisation, mais plutôt la taille des particules déjà solubilisées. A ce jour et selon nos connaissances, aucune étude portant sur la conduite d'hydrolyse par croisement d'enzymes n'a été publiée. Cependant, l'utilisation simultanée de 2 ou plusieurs enzymes a été effectuée sur les têtes et viscères de sardine. Il ressortait de cette étude que comparativement aux hydrolyses monoenzymatiques effectuées avec les mêmes enzymes sur les mêmes substrats, la répartition de la matière dans les différentes phases obtenues après hydrolyse n'est pas améliorée par l'utilisation d'enzymes multiples, (Dumay, 2006). Ce résultat est confirmé pour l'utilisation consécutive d'enzymes avec la présente étude sur les têtes de crevette d'élevage.

Comme on est en présence de protéolyse enzymatique, la faible solubilisation de la matière s'exprime par la faible solubilisation des protéines. Dans la littérature, des hydrolyses multienzymatiques ont été effectuées en vue de solubiliser au mieux les protéines. C'est le cas par exemple de l'utilisation simultanée de 4 enzymes (Savinase, Alcalase, Neutrase, Esperase) sur des extraits de caroténoprotéines issues de la fermentation de co-produits de crevette. Lors de cette étude, l'utilisation de mélange d'enzymes s'est avérée favorable pour la solubilisation des protéines contenues dans les extraits de caroténoprotéines comparativement à la conduite d'hydrolyse avec une enzyme seule notamment la Savinase en 24 heures (Armenta-Lopez *et al.*, 2002). Une étude a été effectuée également sur la combinaison de protéase et de lipase en vue de purifier l'astaxanthine contenu dans les extraits de caroténoprotéines de co-produits de crevette. Cette étude a montré l'efficacité de l'utilisation des 2 enzymes sur la solubilisation des protéines comparée à l'utilisation de protéase seule (Armenta, 2009). Ces résultats sont en contradiction avec ceux du présent travail concernant les têtes de crevette d'élevage. Notons que certaines enzymes utilisées lors de ces études sont des enzymes spécifiques pour le clivage des liaisons lipoprotéiques (Savinase) et des lipases. Dans notre travail par contre, seules des protéases sont utilisées. La différence dans la solubilisation des protéines dans notre travail comparativement à ces études pourrait être attribuée à la technique utilisée, ainsi que la différence entre les enzymes et le substrat. Il pourrait être intéressant effectivement de faire une combinaison de protéase et de lipase pour l'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage

afin de solubiliser au mieux les protéines, notamment celles qui sont impliquées dans des complexes lipoprotéiques.

Concernant la composition des différentes fractions obtenues lors des hydrolyses croisées des têtes de crevette d'élevage, les teneurs en protéines des surnageants des hydrolyses croisées sont équivalentes à celle obtenue par hydrolyse en condition acide pendant 22 heures. Il en est de même pour les teneurs en cendres dans les fractions surnageants et culots. Par contre, les teneurs en lipides des différentes fractions de têtes de crevette issues d'hydrolyses croisées sont légèrement inférieures à celles obtenues par hydrolyses de longue durée.

L'intérêt du couplage d'enzymes pour l'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage réside essentiellement dans le profil moléculaire, le profil en acides aminés et les teneurs en phospholipides. En effet, par rapport aux hydrolyses de longue durée, la proportion des peptides avec un poids moléculaire supérieur à 1 000 Da sont considérablement réduits. Ceci confirme le fait que l'enzyme agit sur les protéines déjà solubles, la solubilisation des protéines étant faible. Une meilleure amélioration de la qualité nutritionnelle des protéines par la proportion acides aminés essentiels/acides aminés non essentiels est également obtenue lors d'hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage comparativement aux hydrolyses de longue durée. De plus, aucun acide aminé n'a été détruit lors des hydrolyses croisées. La conduite d'hydrolyse croisée à courte durée empêcherait alors la destruction des acides aminés des têtes de crevette d'élevage de Madagascar. Les couplages avec Novozym 37020 sont les plus favorables pour ces effets. Cependant, le rendement des hydrolyses croisées est faible par rapport aux hydrolyses de 22 heures. Ceci est surtout marqué avec les couplages avec la Pepsine, ce qui s'explique par l'hydrolyse presque totale des têtes de crevette d'élevage au cours de la première phase des hydrolyses croisées avec la Pepsine.

5. CONCLUSION

Les compositions des têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage de Madagascar sont en accord avec celles rapportées dans la littérature, avec une prédominance de protéines. La protéolyse enzymatique constitue alors une voie intéressante pour leur valorisation.

Ainsi, l'hydrolyse enzymatique de têtes de crevette d'élevage avec différentes protéases commerciales permet la solubilisation de la matière, notamment des protéines. Cette

technique conduit à la génération de peptides de petite taille : 82% à 93% des peptides contenus dans les hydrolysats possèdent un poids moléculaire inférieur à 1 000 Da. Ces peptides présentent des intérêts nutritionnels du fait de leur digestibilité élevée, ils peuvent être aussi à l'origine d'activité biologique. La protéolyse des têtes de crevette d'élevage permet également l'augmentation de la concentration des acides aminés, améliorant ainsi le goût et la qualité des protéines. La conduite d'hydrolyse enzymatique sur les co-produits de crevette et de poisson est largement rapportée dans la littérature, en vue d'utilisation en alimentation humaine, en alimentation animale et pour la recherche de substances possédant des activités biologiques.

D'autre part, les hydrolyses avec les enzymes commerciales utilisées ont permis la concentration des lipides dans la phase insoluble, produisant ainsi des hydrolysats pauvres en lipides et offrant la possibilité de leur extraction dans le culot. La production de tels hydrolysats à partir de co-produits de crevette et de poissons maigres est citée dans la littérature.

Selon le pH utilisé au cours de l'hydrolyse, la solubilisation et la concentration des substances sont différentes. Ainsi, l'alcalinité favorise la solubilisation des protéines et la concentration des acides aminés, tandis que l'acidité conduit à la production d'hydrolysats riches en matières minérales, ce qui est causé en partie, par la solubilisation du carbonate de calcium impliqué dans la structure de l'exosquelette de crevette avec la chitine. La Pepsine fait exception pourtant car elle provoque une solubilité des protéines équivalente à celle obtenue en condition alcaline, en plus de sa capacité de déminéraliser l'exosquelette. La Pepsine est effectivement utilisée pour l'hydrolyse de co-produits de poisson possédant des tissus durs tels que les arêtes de poissons (Liaset *et al.*, 2000 ; Je *et al.*, 2004 ; Je *et al.*, 2005 ; Je *et al.*, 2007). Elle s'avère être efficace pour la décalcification de l'exosquelette de crevette (Jung et Kim, 2007).

Le croisement des 2 conditions ne permet pas d'avoir une solubilisation améliorée de la matière, spécialement avec la Pepsine. Lors des hydrolyses croisées, la Pepsine est utilisée en premier lieu pendant 2 heures. La faible solubilisation de la matière lors de l'hydrolyse du culot pepsique avec la deuxième enzyme suggère alors une hydrolyse presque totale avec la Pepsine. De légères améliorations du profil en acides aminés et du profil moléculaire des hydrolysats ont été produites au cours des hydrolyses croisées de têtes de crevette d'élevage. Pour les protéines, les lipides et les cendres, leur distribution dans la phase soluble et la phase insoluble n'est pas améliorée lors des couplages d'enzymes par rapport aux hydrolyses

monoenzymatiques de longue durée. Cette inefficacité de l'utilisation de plusieurs enzymes pour la solubilisation de la matière par hydrolyse multienzymatique a été également rapportée par Dumay lors de l'hydrolyse enzymatique de co-produits de sardine (Dumay, 2006).

Pour ces différentes raisons, la Pepsine est adoptée pour la valorisation des têtes de crevette pour la suite du travail.

CHAPITRE 3 : HYDROLYSE PEPSIQUE : OPTIMISATION ET VALORISATION DES DIFFERENTES FRACTIONS

1. INTRODUCTION

Le chapitre précédent a permis de cribler les différentes enzymes utilisées au cours de cette étude. Il en ressortait que la Pepsine est l'enzyme la plus appropriée pour l'hydrolyse des têtes de crevette de Madagascar en terme de protéolyse, durée de l'hydrolyse, solubilisation des protéines et déminéralisation de l'exosquelette.

Pour la suite de l'étude, la Pepsine est alors adoptée pour valoriser les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage, en tenant compte des résultats obtenus lors du chapitre précédent. Les hydrolyses sont conduites pendant 2 heures, au bout desquelles la presque totalité des têtes de crevette est hydrolysée avec la Pepsine. Pour maximiser la concentration des protéines dans les hydrolysats et minimiser leur concentration en matières minérales, différentes conditions d'hydrolyse (ajustement du pH ou non), ainsi que 2 méthodes d'inactivation de l'enzyme vont être comparées. L'extractibilité de la chitine sera également étudiée au cours de ce chapitre.

La séparation des culots d'hydrolyse par lavage est effectuée lors de ce chapitre pour fractionner les protéines encore présentes dans les culots et les carapaces. Trois fractions sont ainsi obtenues : le surnageant, l'eau de lavage et le résidu de lavage. Les fractions obtenues lors de ces hydrolyses vont être valorisées par l'application en aviculture traditionnelle et par l'identification d'activité antimicrobienne.

L'aviculture traditionnelle constitue une activité domestique secondaire, mais très courante dans les familles traditionnelles malgaches. L'alimentation des poulets dans cette pratique est pauvre en protéines. Les fractions d'hydrolyse de têtes de crevette constituent une bonne source de protéines de haute qualité, pouvant améliorer l'aviculture et améliorer ainsi la production. La deuxième partie de ce chapitre concerne l'efficacité de l'utilisation des têtes de crevette d'élevage et leurs fractions pepsiques, dans l'aviculture traditionnelle malgache. Pour ce faire, une incorporation des différentes fractions d'hydrolysats de co-produits de crevette dans l'alimentation des poulets est effectuée, et les performances des poulets sont étudiées par la suite.

Parallèlement, l'évaluation de l'activité antimicrobienne des surnageants obtenus lors de cette étude est réalisée sur des microorganismes pathogènes aquacoles et sur des microorganismes présents dans les aliments.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels biologiques

Le criblage des différentes enzymes effectué sur les têtes de crevette d'élevage a permis de mettre en évidence que la Pepsine est l'enzyme la plus appropriée pour l'hydrolyse de ces co-produits. Ce résultat va être appliqué sur les 2 catégories de têtes de crevette qui existent à Madagascar : têtes de crevette d'élevage et têtes de crevette sauvage.

L'enzyme utilisée au cours de ce chapitre est donc la Pepsine fournie par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). Il s'agit d'une endopeptidase extraite de la muqueuse gastrique porcine. Elle porte le numéro enzymatique EC. 3.4.23.1.

2.2. Optimisation des hydrolyses pepsiques

Les hydrolyses pepsiques des 2 sortes de têtes de crevette sont réalisées de 2 manières : Une première expérience est réalisée pendant laquelle le pH est maintenu à 2 pendant l'hydrolyse ; une deuxième expérience est menée pendant laquelle le pH n'est pas ajusté au cours de l'hydrolyse.

2.2.1. Hydrolyse avec contrôle de pH

L'hydrolyse se déroule dans un bioréacteur à double membrane d'une capacité de 200ml. Les têtes de crevette broyées sont diluées avec de l'eau distillée. Elles sont ensuite chauffées à 40°C puis le pH est ajusté à 2 avec du HCl 2N. 0,5% de Pepsine est ensuite ajouté. La somme du volume d'eau distillée de dilution et du volume d'acide chlorhydrique correspond au poids des têtes de crevette utilisées. L'hydrolyse dure 2 heures, pendant lesquelles le milieu réactionnel est constamment agité et le pH est ajusté à 2 avec de l'HCl 2N.

Le degré d'hydrolyse est estimé en fonction de la quantité d'acide ajouté qui est proportionnel au nombre de liaisons peptidiques coupées. Elle est obtenue de la même manière que les hydrolyses effectuées dans le chapitre précédent.

2.2.2. Hydrolyse sans contrôle de pH

L'hydrolyse est effectuée sur les têtes de crevette broyées au blender et diluées avec de l'eau distillée dans un bioréacteur. La préparation est agitée puis la température est réglée à 40°C. Le pH est par la suite ajusté à 2 par addition de HCl 2N. Lorsque les conditions de température et de pH sont atteintes, 0,5% de Pepsine est ajoutée. L'hydrolyse commence à ce moment et elle dure 2 heures en présence d'agitation permanente. Pendant l'hydrolyse, le pH du milieu augmente librement sans être ajusté à pH 2 d'activité optimale de la Pepsine.

2.2.3. Inactivation de la Pepsine

Pour les 2 sortes d'hydrolyse et pour les 2 types de têtes de crevette, 2 sortes d'inactivation de la Pepsine sont effectuées à la fin de chaque hydrolyse : la chaleur et la neutralisation du pH.

Ainsi, après arrêt de l'agitation et du chauffage, la préparation est divisée en 2 lots. Pour le premier lot, de la soude 5N est ajoutée jusqu'à ce que le pH atteigne la neutralité. Pour le deuxième lot, l'enzyme est inactivée en plaçant la préparation au bain marie à 85°C pendant 20 minutes. Pour chaque hydrolyse, on obtient ainsi 2 sortes d'hydrolysats selon l'inactivation de l'enzyme.

2.2.4. Traitements post-hydrolyses

2.2.4.1. Centrifugation

Chaque préparation est refroidie à température ambiante puis centrifugée dans une centrifugeuse JOUAN (France) à 10 000 g pendant 20 minutes et à 4°C, comme effectué lors des hydrolyses de longue durée.

2.2.4.2. Lavage des fractions insolubles

Le culot d'hydrolyse est soumis à un lavage à l'eau distillée avec une proportion de 1/2 ; P/V. La préparation est ensuite agitée pendant 20 minutes puis filtrée sur toile. L'opération est renouvelée jusqu'à ce que l'eau de lavage, obtenu lors de la filtration, soit limpide. L'opération a été ainsi renouvelée 4 fois pour obtenir ce résultat.

2.2.4.3. Lyophilisation

Les 3 fractions obtenues : surnageant, eau de lavage et résidus de lavage sont lyophilisées pendant 3 jours. Les lyophilisats font ensuite l'objet d'analyses biochimiques.

2.2.5. Analyses biochimiques

Les teneurs en eau, en cendre et en lipides totaux de toutes les fractions sont déterminées respectivement par étuvage, incinération et selon la méthode de Folch. Le profil moléculaire et le profil en acides aminés des surnageants sont déterminés suivant les mêmes méthodes utilisées dans le premier chapitre de ce travail. La teneur en protéines totales des surnageants et des eaux de lavage est dosée selon la méthode de KJELDHAL. Par contre, lors des protéolyses, l'exosquelette qui contient la chitine reste insoluble et donc concentrée dans les résidus de carapaces. La chitine contient 7% d'azote (Rao et Stevens, 2005). Aussi, l'estimation des protéines totales contenues dans les résidus de carapaces ne pourra pas être effectuée par dosage de l'azote selon la méthode de KJELDHAL.

2.2.6. Dosage des protéines dans les résidus de lavage

2.2.6.1. Principe

Pour doser les protéines dans les résidus de lavage, une extraction en milieu alcalin est d'abord effectuée. Un dosage colorimétrique des extraits protéiques selon la méthode de Folin Lowry est ensuite réalisé (Lowry *et al.*, 1951 cité par Dumay, 2006).

2.2.6.2. Manipulation

- Extraction des protéines :

Les protéines sont extraites avec de la soude 5N, avec une proportion de 1/25 ; P/V, à partir des résidus lyophilisés. La préparation est placée dans un bain-marie de 70°C pendant 1 heure avant d'être centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant ainsi obtenu constitue l'extrait dont la teneur en protéines va être analysée par la suite.

- Dosage des protéines :

Le dosage est effectué avec un kit fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution de Sérum Albumine Bovine (SAB) à 2 mg/ml., de façon à obtenir 1 ml de solution qui contient 0 à 500 µg de SAB. Les échantillons à analyser sont dilués 20 fois et 1 ml est mis dans un tube à essai. Le dosage est effectué en triplicat pour chaque échantillon. Il consiste à ajouter 1ml de réactif de Lowry dans chaque tube, suivi d'une agitation et 20 minutes d'incubation à température ambiante. 0,5 ml de réactif de Folin Ciocalteu est ensuite versé dans chaque tube, et la coloration est laissée se développer pendant 30 minutes. La densité optique est finalement lue à 750 nm.

La teneur en protéine est calculée à partir de la courbe étalon obtenue.

2.3. Etude de l'efficacité nutritionnelle des différentes fractions de têtes de crevette d'élevage en aviculture traditionnelle malgache

Pour cette étude, seules les fractions issues de têtes de crevette d'élevage sont utilisées.

2.3.1. Matériel d'élevage

Soixante deux poulets indigènes malgaches du genre *Gallus* âgés de 60±3 jours sont utilisés, pesant 435 à 500g. L'étude s'effectue sur les animaux préalablement vaccinés contre la maladie de Newcastle (injection musculaire de 0,5ml de vaccins/sujet), contre le choléra et la variole. Les animaux sont également déparasités des coccidies avec du chlorhydrate d'amprolium à 0,6 g/l de boisson pendant 3 jours.

2.3.2. Aliments

La ration est à base de son de maïs et de son de riz dont les compositions sont indiquées dans le Tableau 34. Ces 2 matières premières constituent les principales sources d'énergie. Les différents dérivés d'hydrolyse pepsique de têtes de crevette d'élevage sont ensuite incorporés pour fournir les protéines.

Tableau 34 : Composition des matières premières utilisées dans la ration des poulets, en g/100g de matière brute. (Source : Blum, 1984)

Matière première	Matière sèche	Matière grasse	Cellulose brute	Protéines brutes	Lysine	Méthionine	Cendres brutes
Son de maïs	89,00	6,30	9,00	10,10	0,27	0,15	2,69
Son de riz	90,00	13,80	11,60	12,80	0,56	0,22	10,70

2.3.2.1. Dérivés de têtes de crevette

D'une part, les têtes de crevette d'élevage sont hydrolysées avec la Pepsine pendant 2 heures, le pH étant maintenu à 2 pendant l'hydrolyse. Deux méthodes d'inactivation sont effectuées : inactivation par le pH et inactivation par la chaleur. Pour chaque méthode d'inactivation utilisée, 3 dérivés sont séparés : le surnageant, le culot filtré (dépourvu de résidus de carapace) et le tout non séparé (surnageant, culot, carapace).

D'autre part, une hydrolyse pepsique à pH libre est effectuée sur les têtes de crevette d'élevage. L'enzyme est inactivée par neutralisation du milieu. Les fractions rassemblant le surnageant et l'eau de lavage du culot issues de cette hydrolyse constituent d'autres dérivés à utiliser pour les tests sur les poulets.

2.3.2.2. Formulation des rations expérimentales

Deux méthodes de formulation sont utilisées pour la préparation des rations expérimentales : la première est réalisée de façon à avoir différentes rations à teneurs égales de protéines ; la deuxième formulation consiste à incorporer la même proportion de dérivés de têtes de crevette dans la ration sans se soucier de la valeur nutritionnelle finale des rations obtenues.

Pour la première formulation, 7 rations expérimentales sont confectionnées : R1, R2, R3, R4, R5, R6 et R7 correspondant aux dérivés de têtes de crevette obtenus par hydrolyse pepsique à pH contrôlé. La nature des dérivés de têtes de crevette correspondant à chaque ration est présentée dans la Figure 34. Chaque ration contient 64,8% de son de maïs, du son de riz, du dérivé de têtes de crevette et 2% de compléments minéraux et vitaminiques BETAVIT (Madagascar) dont la composition est montrée dans le Tableau 35. Les rations sont établies de façon à contenir la même quantité de protéines, en équilibrant la proportion de dérivés de têtes de crevette et celle de son de riz.

Tableau 35: Composition des compléments minéraux et vitaminiques BETAVIT

Eléments minéraux	Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Ca, P
Vitamines	A, D3, E, C, B1, B2, B6, K3, PP
Acides aminés	Méthionine, lysine

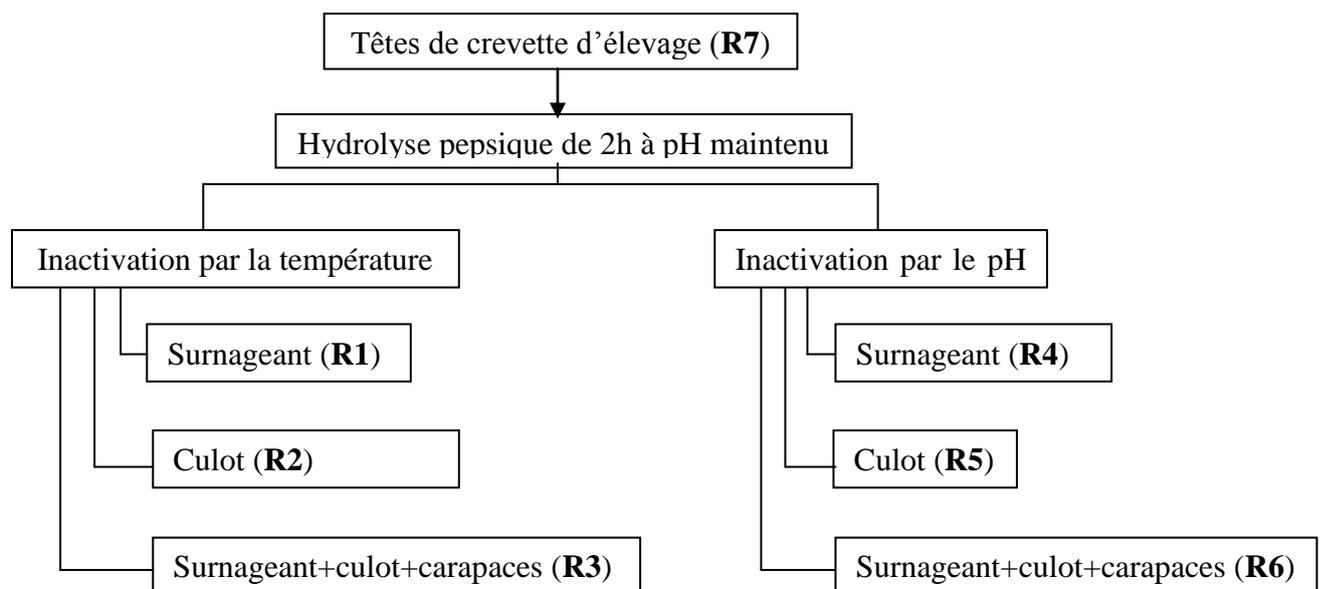


Figure 34 : Dérivés pepsiques de têtes de crevette d'élevage utilisés pour la formulation des rations R1, R2, R3, R4, R5, R6 et R7.

Pour la deuxième formulation, 3 rations à base de son de maïs et de son de riz sont préparées avec 5% de dérivés de crevette, 75% de son de maïs et 20% de son de riz. Chaque ration diffère selon la nature du dérivé de têtes de crevette utilisé. Les rations sont nommées R8, R9 et R10. Leurs dérivés de crevette correspondant sont indiqués dans la Figure 35.

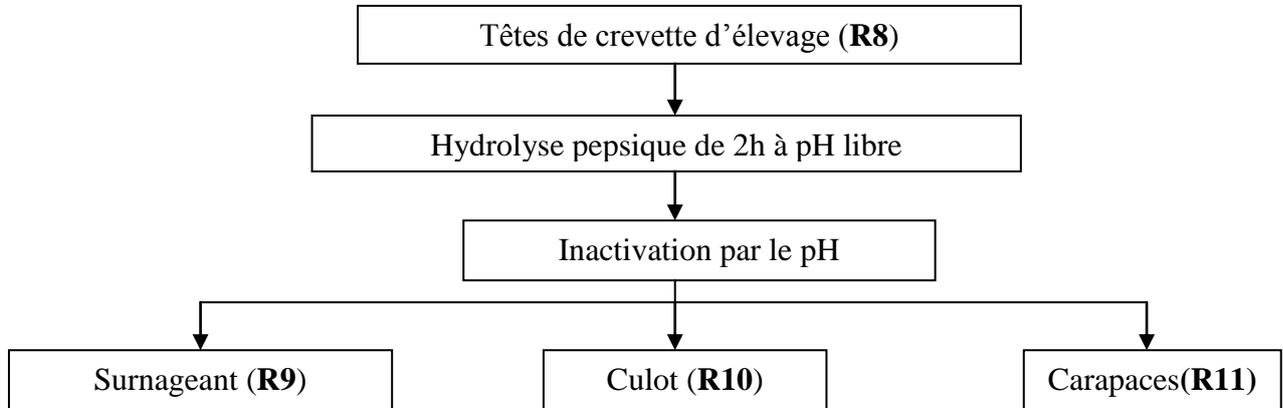


Figure 35 : Dérivés pepsiques de têtes de crevette d'élevage utilisés pour la formulation des rations R8, R9 et R10.

2.3.3. Milieu d'étude

L'étude se déroule dans un local en bois de 75 cm de hauteur, 60 cm de largeur et 1 m de longueur pour chaque lot. La température est relevée quotidiennement, l'élevage se déroule avec un cycle d'obscurité de 12 heures par jour.

2.3.4. Déroulement de l'expérience

2.3.4.1. Constitution des lots

Les poulets sont triés pour former 11 lots. Chaque lot reçoit respectivement la ration R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9 et R10. Un dernier lot sert de témoin élevé selon la mode traditionnelle malgache : les poulets ne sont pas claustrés pendant la journée et dépendent des espaces environnantes pour puiser leur nourriture.

Compte tenu de la rivalité naturelle entre les poulets utilisés qui ne sont pas de la même couvée, il était inapplicable de former des lots de même effectif. Ainsi, le nombre d'animaux pour chaque lot expérimental est résumé dans le Tableau 35.

Tableau 36 : Nombre de poulets par lot de ration expérimentale.

Ration	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Témoins
Nombre d'animaux	7	4	7	4	9	7	8	4	3	3	6

2.3.4.2. Suivi de la croissance

Le poids initial de chaque poulet est noté. Puis, au cours de l'étude, les poulets sont pesés individuellement tous les 3 jours à la même heure pour suivre leur croissance en poids.

2.3.4.3. Mesure de la consommation alimentaire

Chaque lot d'animaux est nourri *ad libitum* avec leur ration expérimentale correspondante. Les quantités distribuées sont notées ainsi que les restes d'aliments à la fin de la journée.

2.3.5. Estimation des performances zootechniques

Différents paramètres sont calculés pour suivre la croissance des poulets ainsi que l'efficacité des différentes rations (Rosenfeld *et al.*, 1997):

Gain moyen quotidien (GMQ)

$$\text{GMQ} = \frac{\text{Gain de poids au bout de X jours}}{X}$$

Consommation alimentaire journalière (CAJ)

$$\text{CAJ} = \frac{\text{Aliment distribué/X jours (g)} - \text{Aliment refusé/X}}{X}$$

Indice de Consommation (IC)

$$\text{IC} = \frac{\text{Aliment consommé pendant une période(g)}}{\text{Gain de poids durant la même période}}$$

Coefficient d'Efficacité Protéique (PER)

$$\text{PER} = \frac{\text{Gain de poids (g)}}{\text{Protéines ingérées}}$$

2.4. Détection d'activité antimicrobienne

Les surnageants issus d'hydrolyse enzymatique de têtes de crevette renferment des peptides de petite taille susceptibles de posséder des activités biologiques. La recherche d'activité antimicrobienne dans les hydrolysats de têtes de crevette est alors choisie pour leur valorisation biologique et leur possibilité d'application en industrie agroalimentaire et en aquaculture.

2.4.1. Souches testées

Les souches testées pour l'activité antimicrobienne des hydrolysats peuvent être divisées en 2 catégories : les microorganismes alimentaires et les microorganismes pathogènes aquacoles. Les microorganismes alimentaires utilisés sont résumés dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Microorganismes alimentaires testés pour l'activité antimicrobienne d'hydrolysats de têtes de crevette.

Collection	Souches	Caractère
EU2185	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Gram ⁻
EU2183	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Gram ⁻
EU2196	<i>Serratia liquefaciens</i>	Gram ⁻
EU2206	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Gram ⁺
EU 2162	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram ⁺
RF173	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram ⁺
RF187	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Gram ⁻
RF184	<i>Vibrio cholerae</i>	Gram ⁻

Les microorganismes pathogènes aquacoles utilisés sont indiqués dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Microorganismes pathogènes aquacoles testés pour l'activité antimicrobienne des hydrolysats de tête de crevette.

Collection	Souches	Caractère
18 -96	<i>Vagococcus salmonirum</i>	Gram ⁺
NCBIM 829	<i>Listonella anguillarum</i>	Gram ⁻
CIP 103 360	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Gram ⁻
ATCC 29 473	<i>Yersinia ruckeri</i>	Gram ⁻

Les substances témoins de croissance et de stérilité sont constituées d'eau stérileensemencée dans le même milieu de culture que les souches.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne est réalisée sur différents hydrolysats de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage obtenus par les hydrolyses menées au cours de ce travail. Dans un premier temps, des tests en milieu liquide sont effectués sur les différentes souches citées.

2.4.2. Tests sur souches de microorganismes alimentaires

Les tests sur des microorganismes alimentaires sont effectués en milieu liquide.

2.4.2.1. Pré culture

Cent µl des aliquotes congelés contenant les souches sontensemencés dans du bouillon butyl p-hydroxybenzoate (BHB) auquel est ajouté 2,5% NaCl. Le tout est incubé à 20°C pendant 5 jours. Ensuite, 100µl de cette première pré culture sont inoculés dans du BHB +2,5% NaCl et portés à incubation à 20°C pendant 31 heures.

2.4.2.2. Préparation des peptides

Environ 111 mg de chaque hydrolysatsont mélangés avec 10 ml du milieu de culture (BHB + 2.5% NaCl) dans des tubes. La dissolution des peptides est aidée en vortexant quelques secondes.

Le pH de chaque préparation (hydrolysats + BHB + 2.5% NaCl) est ajusté au moyen d'un pH mètre au pH du milieu (BHB + 2.5% NaCl) qui correspond à 6,43 avec une marge de +/- 0,02. Pour ce faire les tubes sont transvasés dans de petits béchers. Le pH initial de chaque tube est mesuré et ajusté soit avec du NaOH 1N ou 0,1N, ou du HCl 1N selon le pH de départ.

2.4.2.3. Stérilisation du mélange

La stérilisation se fait par filtration sous hotte à flux laminaire avec un filtre à 0,45µ. La totalité du contenu de chaque tube est filtré dans un tube stérile.

2.4.2.4. Dépôt dans la plaque

Deux cent quatre vingt dix sept µl de chaque mélange (peptides+ BHB) sont déposés dans les puits. Ensuite dans chaque puitsont inoculés 33µl de souches de la deuxième culture diluées au 1/10, sauf pour la souche 1 qui avait faiblement poussé (donc inoculée sans dilution préalable). Les plaques ainsi remplies sont placées dans le bioscreen C mis en route selon le programme ci contre :

Milieu de culture	: BHB + 2,5%
Volume cuvette	: 330µl

Volume(BHB+hydrolysats)	: 297
Volume inoculum	: 33 μ l
Longueur d'onde	: 600nm
Température d'incubation	: 20°C
Durée de préchauffage	: non
Durée de l'expérience	: 5 jours
Intervalle entre les mesures	: 30 min
Intensité de l'agitation	: médium
Moment de l'agitation	: Pré
Durée de l'agitation	: 10s

2.4.3. Tests sur les souches de microorganismes pathogènes aquacoles

Les tests sur les microorganismes pathogènes aquacoles ont été effectués au LUBEM (Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne) à Quimper. Ils comprennent des tests en milieu liquide, une extraction en phase solide, un SDS-PAGE et Gel recouvert.

2.4.3.1. Tests en milieu liquide

Les tests en milieu liquide sur les microorganismes pathogènes aquacoles sont effectués à 10⁵ UFC.mL⁻¹. Une souche de *Bacillus megaterium* est également testée.

2.4.3.2. Extraction en phase solide

L'hydrolysat de têtes de crevette d'élevage avec ajustage du pH et lors de l'inactivation de la Pepsine par la température, est fractionné par chromatographie sur colonne. Ainsi, environ 500 mg d'échantillon sont déposés sur colonne C18. L'élution est réalisée par 2 paliers d'acétonitrile (ACN) : 10 % ACN et 80% ACN, à 0.1% TFA. Les éluats sont lyophilisés puis solubilisé dans de l'eau milliQ. Les fractions obtenues sont ensuite testées en milieu liquide contre un panel de 8 souches bactériennes cibles à 10⁵ UFC.mL⁻¹.

2.4.3.3. SDS-PAGE et Gel recouvert

Les différents éluats sont ensuite analysés par la méthode des gels recouverts. Cette méthode permet non seulement de détecter une activité antibactérienne, mais également d'estimer la masse moléculaire du ou des composés actifs.

Après migration sur gel de polyacrylamide à 16,5%, fixation et lavage, une gélose ensemencée avec la souche cible est coulée sur le gel d'électrophorèse. Après incubation à

température optimale de croissance, la présence d'un composé actif est révélée par un halo d'inhibition de croissance. Sa masse moléculaire peut être alors estimée.

Cette méthode est employée pour les fractions 10% et 80% de l'hydrolysat. La souche cible employée est *Bacillus megaterium*.

3. RESULTATS

3.1. Hydrolyses pepsiques des têtes de crevette

3.1.1. Cinétique des hydrolyses

Les têtes de crevette d'élevage et sauvage ont été soumises à des hydrolyses avec la Pepsine pendant 2 heures, d'une part sans ajustement du pH du milieu réactionnel, et d'autre part avec ajustement du pH du milieu à 2.

Les courbes de cinétique des hydrolyses réalisées avec ajustement du pH sont illustrées dans la Figure 36 pour les 2 catégories de têtes de crevette. La cinétique est légèrement différente pour les 2 matières premières à partir de 40 minutes d'hydrolyse. En effet, l'hydrolyse des têtes de crevette sauvage commence à atteindre un plateau après ce temps. Au bout de 2 heures d'hydrolyse, un plateau est atteint avec les têtes de crevette sauvage tandis que les têtes de crevette d'élevage sont encore en phase de latence c'est à dire que l'hydrolyse continue encore.

Le DH atteint au bout de 2 heures est de 30,8% pour les têtes de crevette d'élevage et de 24,0% pour les têtes de crevette sauvage.

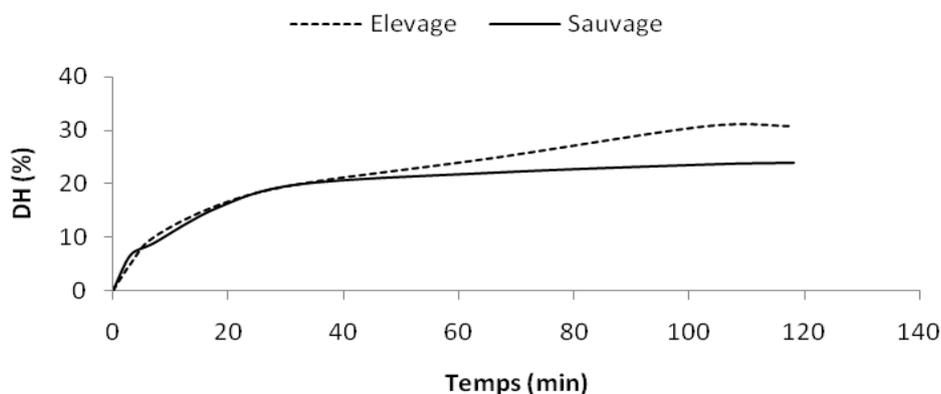


Figure 36 : Cinétique des hydrolyses de 2 heures de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, avec ajustement du pH du milieu réactionnel.

La Figure 37 montre les courbes de cinétique d'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage avec la Pepsine à pH libre. La courbe est réalisée par l'évolution du pH en fonction de la durée de l'hydrolyse, le DH ne pouvant pas être estimé vu que le milieu réactionnel n'est pas ajusté par addition d'acide. Le changement du pH du milieu réactionnel étant proportionnel à la protéolyse, la courbe traduit l'évolution des hydrolyses des têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage. La phase rapide de l'hydrolyse est moins marquée pour les têtes de crevette d'élevage et elles subissent encore une hydrolyse au bout de 2 heures que dure l'hydrolyse. Par contre, l'hydrolyse des têtes de crevette sauvage est achevée au bout de 2 heures d'hydrolyse, se traduisant par un plateau. A terme des 2 heures d'hydrolyse, le pH évolue de 1,56 unité pour les têtes de crevette d'élevage tandis que l'évolution est de 1,20 unité pour les têtes de crevette sauvage.

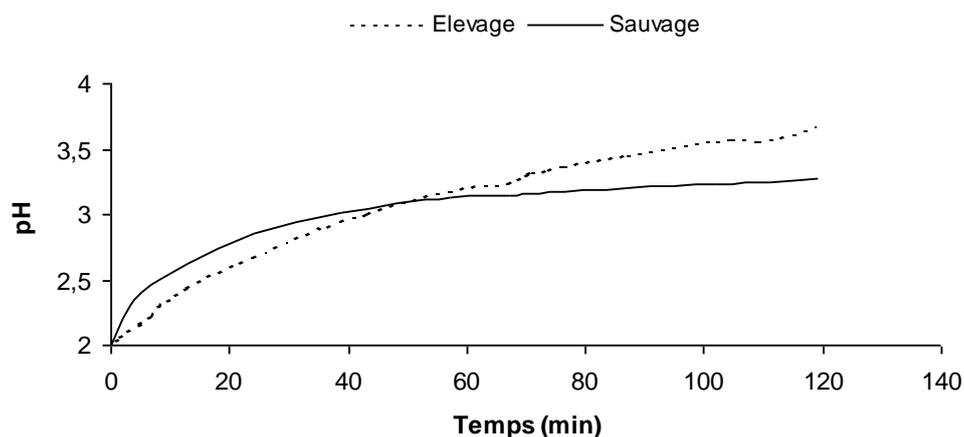


Figure 37 : Cinétique des hydrolyses de 2 heures de têtes de crevettes d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, sans ajustement du pH du milieu réactionnel.

3.1.2. Solubilisation de la matière

Trois fractions sont séparées après les différentes hydrolyses pepsiques de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage, et pour chaque méthode d'inactivation de l'enzyme (pH ou chaleur). Ainsi, on distingue le surnageant qui est obtenu par centrifugation ; l'eau de lavage du culot d'hydrolyse, et le résidu de lavage renfermant les carapaces. La distribution de la matière dans ces trois fractions est résumée dans la Figure 38 pour les 2 catégories de têtes de crevette. D'après cette figure, on note que lors des hydrolyses de têtes de crevette sauvage, la matière sèche se retrouve solubilisée pour la majorité dans les surnageants qui contiennent 68% à 71% de la matière initialement présente dans les têtes de

crevette. La solubilisation de la matière avec les têtes de crevette d'élevage est moins importante avec 39% à 61% retrouvés dans les surnageants. La différence de solubilisation entre les différentes conditions d'hydrolyse est plus marquée avec les têtes de crevette d'élevage (22%), par rapport aux têtes de crevette sauvage (3%). Entre les eaux de lavage et les carapaces, la matière sèche se concentre dans les eaux de lavage à l'exception des hydrolyses de têtes de crevette d'élevage conduites à pH libre lors desquelles les carapaces contiennent plus de matière sèche par rapport aux eaux de lavage (31% à 32% et 18% à 29% respectivement).

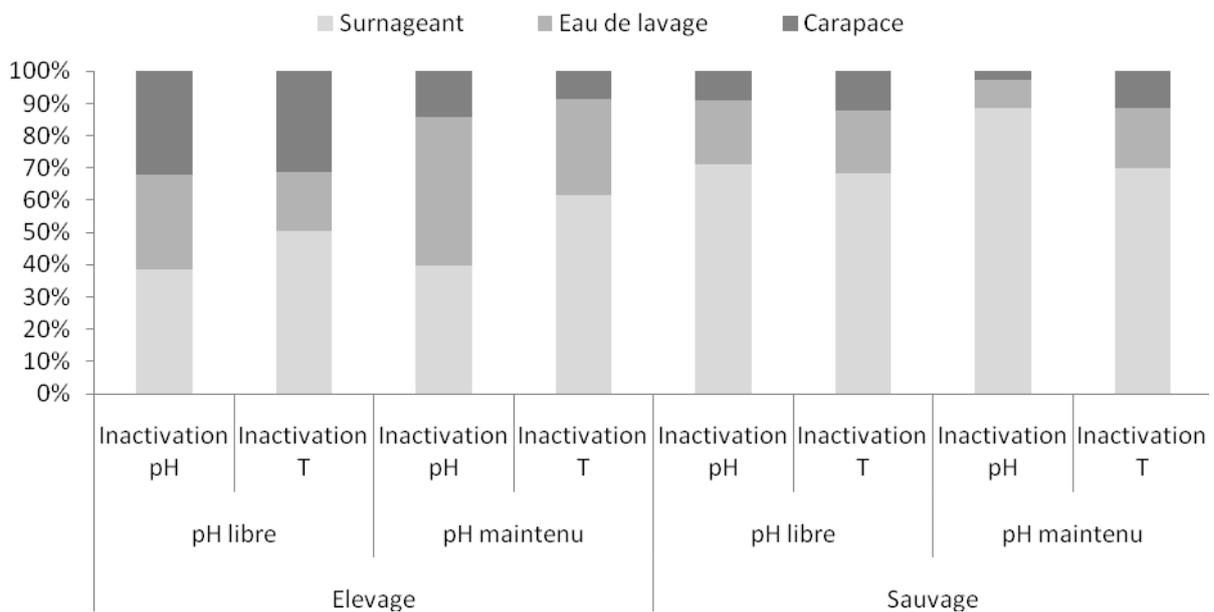


Figure 38 : Distribution de la matière après 2 heures d'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, en utilisant différentes conditions d'hydrolyse et différentes méthodes d'inactivation de l'enzyme.

3.1.3. Composition des différentes fractions

La composition des différentes fractions obtenues lors des hydrolyses pepsiques de têtes de crevette, selon différentes conditions de pH et d'inactivation de l'enzyme est présentée dans le Tableau 39.

Tableau 39 : Composition des différentes fractions obtenues lors des hydrolyses peptiques de têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage, en g /100g de poids sec.

Origine	Hydrolyse	Inactivation de l'enzyme	Fraction	Protéines (%)	Lipides (%)	Cendres (%)
Elevage	pH libre	pH	Surnageant	48,85 ± 2,59	2,90 ± 2,55	36,93 ± 0,12
			Eau de lavage	41,65 ± 0,10	27,84 ± 1,33	23,45 ± 1,22
			Carapace	14,55 ± 0,84	14,33 ± 0,46	8,49 ± 1,08
		Température	Surnageant	51,77 ± 0,53	3,19 ± 0,19	28,85 ± 2,49
			Eau de lavage	49,79 ± 2,07	14,06 ± 5,33	25,36 ± 2,13
			Carapace	12,16 ± 0,79	31,11 ± 0,90	5,02 ± 3,24
	pH maintenu	pH	Surnageant	51,76 ± 0,07	1,52 ± 0,42	33,82 ± 1,64
			Eau de lavage	44,49 ± 0,66	31,34 ± 0,74	16,87 ± 0,05
			Carapace	5,54 ± 0,91	22,28 ± 0,77	5,66 ± 0,98
		Température	Surnageant	53,79 ± 0,81	5,96 ± 0,58	39,61 ± 0,11
			Eau de lavage	37,69 ± 1,47	44,65 ± 1,59	11,63 ± 1,77
			Carapace	10,76 ± 0,72	10,01 ± 0,32	4,28 ± 0,50
Sauvage	pH libre	pH	Surnageant	59,19 ± 0,44	0,71 ± 0,17	27,41 ± 0,67
			Eau de lavage	43,30 ± 0,21	24,60 ± 0,78	28,15 ± 0,19
			Carapace	10,62 ± 0,66	1,32 ± 0,07	14,66 ± 1,14
		Température	Surnageant	56,83 ± 0,52	2,40 ± 0,15	31,52 ± 0,19
			Eau de lavage	51,54 ± 0,41	18,18 ± 1,08	22,21 ± 0,09
			Carapace	9,40 ± 1,01	1,07 ± 0,05	19,05 ± 0,42
	pH maintenu	pH	Surnageant	50,30 ± 1,11	1,31 ± 0,52	45,68 ± 0,83
			Eau de lavage	35,93 ± 2,02	21,48 ± 1,15	35,00 ± 0,28
			Carapace	7,25 ± 0,51	3,61 ± 1,18	2,36 ± 0,12
		Température	Surnageant	58,86 ± 0,10	0,98 ± 0,41	26,57 ± 0,87
			Eau de lavage	38,41 ± 7,09	31,41 ± 1,13	20,79 ± 0,86
			Carapace	5,03 ± 0,76	4,25 ± 0,12	0,77 ± 0,31

D'après ce tableau, les teneurs en protéines des hydrolysats varient de 48,8% à 53,8% de la matière sèche pour les têtes de crevettes d'élevage, et de 50,3% à 59,2% de la matière sèche pour les têtes de crevette sauvage. En général, les surnageants issus de l'espèce sauvage contiennent plus de protéines par rapport à ceux de l'espèce d'aquaculture. On note aussi des teneurs en protéines plus élevées des hydrolysats lorsque l'hydrolyse est conduite à pH contrôlé. Dans tous les cas, les résidus de lavage ont une teneur faible en protéines, ces teneurs varient de 5,5% à 14,5% pour les espèces d'élevage, et 5,0% à 10,6% pour les espèces sauvages.

Par rapport à la matière première, la teneur en lipides des surnageants diminue considérablement pour toutes les conditions d'hydrolyse des têtes de crevette étudiées. Ces teneurs sont de 1,6% à 6,0% et 0,7% à 2,4% de la matière sèche respectivement pour les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage. En règle générale, les résidus de lavage (« carapaces ») constituent les fractions les plus riches en lipides après les hydrolyses des têtes

de crevettes, avec des teneurs variant de 14,1% à 44,6% pour les têtes de crevette d'élevage, et de 1,2% à 31,4% pour celles de crevette sauvage. Les lipides contenus dans les résidus de lavage lors des hydrolyses pepsiques sont considérablement différents pour les têtes de crevettes d'élevage (10,0% à 31,1% de la matière sèche) et les têtes de crevette sauvage (1,1% à 4,2% de la matière sèche).

Des 3 fractions obtenues lors des hydrolyses des 2 catégories de têtes de crevettes, le surnageant est la fraction la plus riche en cendres. Ses teneurs sont respectivement de 26,6% à 45,7% et 28,8% à 38,6% de la matière sèche pour les surnageants issus de têtes de crevette sauvage et de têtes de crevette d'élevage. Les hydrolyses des 2 types de têtes de crevette conduisent à la production de résidus de lavage à faible teneur en cendres (0,8% à 19,0% avec les têtes de crevette sauvage et 4,3% à 8,5% avec les têtes de crevette d'élevage).

3.1.4. Solubilisation des protéines

3.1.4.1. Protéines totales

Les distributions des protéines après hydrolyses des têtes de crevette avec la Pepsine à différentes conditions, sont indiquées dans la Figure 39. Ainsi, plus de 50% des protéines passent dans les hydrolysats. On note une meilleure solubilisation avec les têtes de crevette d'origine sauvage : 77% à 93% des protéines se retrouvent dans les hydrolysats, tandis que la distribution est de 52% à 72% pour les têtes de crevette d'élevage. On observe aussi une meilleure solubilisation des protéines quand le pH est maintenu durant l'hydrolyse.

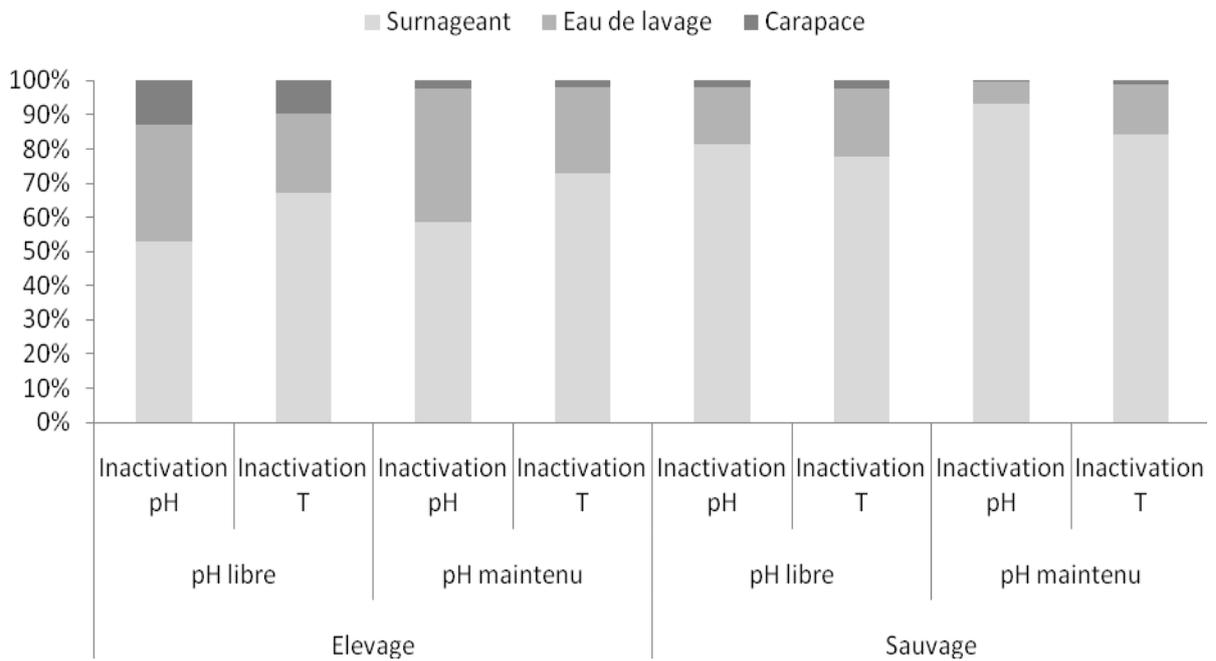


Figure 39 : Distribution des protéines après 2 heures d’hydrolyse de têtes de crevette d’élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, en utilisant différentes conditions d’hydrolyse et différentes méthodes d’inactivation de l’enzyme.

3.1.4.2. Profils moléculaires

Le profil moléculaire des différents surnageants obtenus lors des hydrolyses pepsiques des têtes de crevette sauvage est indiqué dans la Figure 40. On note 3 pics principaux pour chaque échantillon. Les profils sont similaires pour tous les hydrolysats.

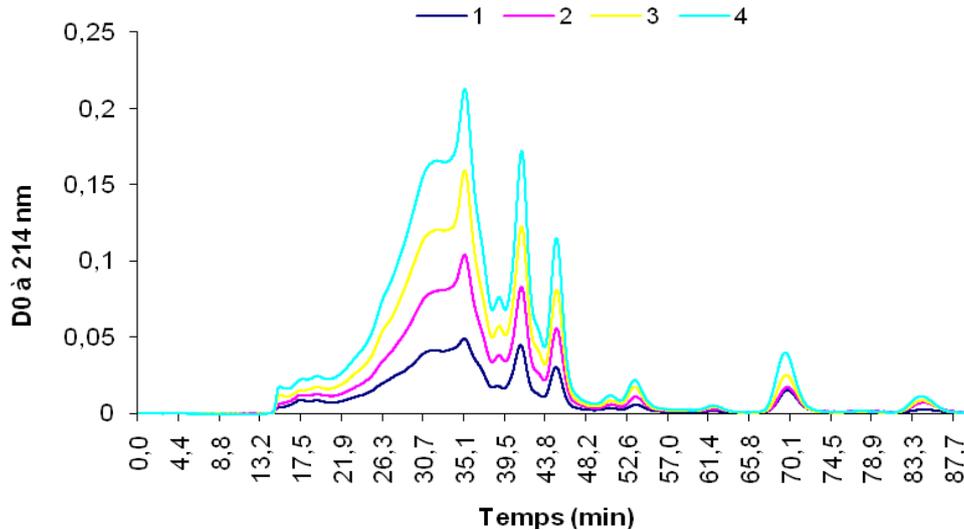


Figure 40 : Profil moléculaire des hydrolysats de têtes de crevette sauvage obtenus avec la Pepsine à différentes conditions. 1 : pH libre et inactivation de l'enzyme par le pH ; 2 : pH libre et inactivation de l'enzyme par la chaleur ; 3 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par le pH ; 4 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par la chaleur.

La Figure 41 montre les profils moléculaires des surnageants de têtes de crevette d'élevage obtenus lors des hydrolyses pepsiques. Comme les têtes de crevette sauvage, 3 pics principaux sont identifiés, les profils étant similaires pour tous les échantillons.

Entre les 2 catégories de têtes de crevette, l'allure des pics présente de légères différences.

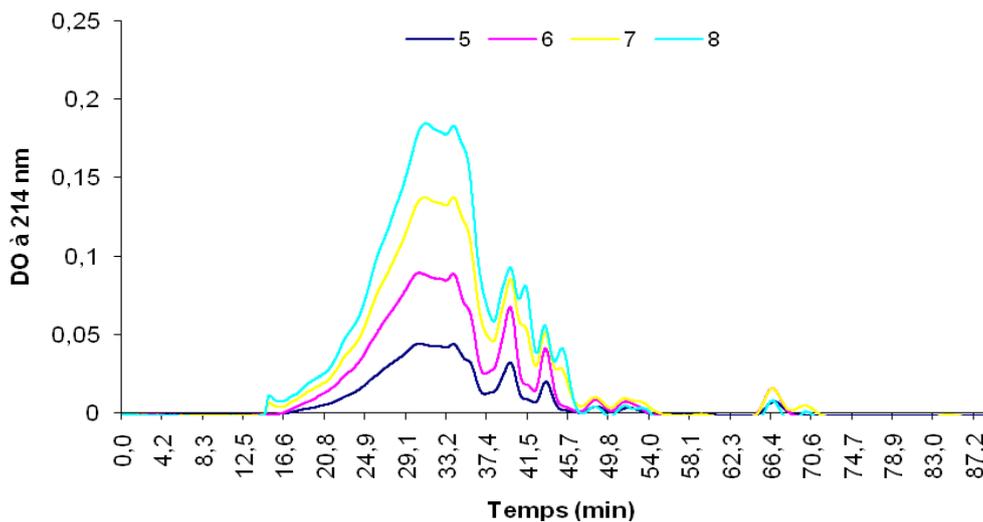


Figure 41 : Profil moléculaire des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus avec la Pepsine à différentes conditions. 5 : pH libre et inactivation de l'enzyme par le pH ; 6 : pH libre et inactivation de l'enzyme par la chaleur ; 7 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par le pH ; 8 : pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par la chaleur.

La distribution des protéines contenues dans les hydrolysats de têtes de crevette sauvage et de têtes de crevette d'élevage est résumée dans le Tableau 40. Dans tous les cas, la majorité des protéines possède un poids moléculaire inférieur à 1 000 Da, avec des proportions variant de 68,3% à 73,1% pour les têtes de crevette d'élevage, et de 76,1% à 80,8% pour les têtes de crevette sauvage. Les peptides ayant des poids moléculaires inférieurs à 500 Da représentent 37,7% à 42,9% des protéines totales des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage, et 48,6% à 52,2% de celles des hydrolysats de têtes de crevette sauvage.

Tableau 40 : Distribution (en %) des protéines des surnageants issus des hydrolyses de têtes de crevette sauvage et de têtes de crevette d'élevage, selon leur poids moléculaire.

Poids moléculaire	1	2	3	4	5	6	7	8
>7000Da	6,00	2,99	3,69	4,93	2,70	3,80	4,47	4,96
5500Da- 7000Da	1,00	0,78	0,88	0,91	1,20	1,50	1,14	1,30
3000Da- 5500Da	2,70	1,97	2,61	2,57	3,90	4,30	3,38	3,76
2000Da-3000Da	2,80	2,28	2,96	2,76	4,50	4,60	3,65	4,00
1000Da- 2000Da	10,80	10,58	12,59	11,20	17,00	16,60	13,54	14,92
500Da-1000Da	25,10	28,57	27,99	26,42	32,30	30,50	30,2	31,81
250Da- 500Da	35,20	40,77	39,70	37,23	29,90	28,80	34,59	31,47
<250Da	15,80	11,46	8,89	13,31	7,80	9,00	8,29	7,02

Hydrolysats : **1** : crevette sauvage, condition de pH libre et inactivation de l'enzyme par le pH ; **2** : crevette sauvage, condition de pH libre et inactivation de l'enzyme par la chaleur ; **3** : crevette sauvage, condition de pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par le pH ; **4** : crevette sauvage, condition de pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par la chaleur ; **5** : crevette d'élevage, condition de pH libre et inactivation de l'enzyme par le pH ; **6** : crevette d'élevage, condition de pH libre et inactivation de l'enzyme par la chaleur ; **7** : crevette d'élevage, condition de pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par le pH ; **8** : crevette d'élevage, condition de pH contrôlé et inactivation de l'enzyme par la chaleur.

3.1.4.3. Profils en acides aminés

Les profils en acides aminés des différents hydrolysats de têtes de crevette sont indiqués dans le Tableau 41. Comme dans les matières brutes et les hydrolysats obtenus dans le chapitre précédent avec d'autres enzymes et en d'autres conditions, l'acide glutamique

constitue l'acide aminé principal des hydrolysats de tête de crevette. Si l'acide glutamique, l'acide aspartique et la glycine représentent les 3 acides aminés principaux de tous les hydrolysats avec des teneurs en mg/g de matière sèche, de 45,6 à 101,5 ; 34,6 à 67,8 et 34,5 à 55,0 respectivement ; la méthionine, l'histidine et la tyrosine constituent les acides aminés les moins abondants dans les différents hydrolysats. En effet, la méthionine est présente à raison de 4,5 mg à 13,4 mg/g de matière sèche, l'histidine à 4,6 mg/g à 10,8 mg/g et la tyrosine à 4,2 mg/g à 14,5 mg/g de matière sèche. Notons que l'acide aminé limitant varie entre la méthionine et l'histidine pour les différents hydrolysats. Une augmentation importante de la concentration de chaque acide aminé est observée pour tous les hydrolysats de têtes de crevette d'élevage. Par contre, on note des diminutions de la concentration en histidine, acide glutamique et proline pour les têtes de crevette sauvage. Ces diminutions surviennent suite à l'hydrolyse à pH maintenu et inactivation de la Pepsine par le pH.

Les acides aminés essentiels sont présents à raison de 36% à 41% des acides aminés totaux. Les hydrolysats issus des têtes de crevette sauvage possèdent un pourcentage d'acides aminés essentiels plus élevé que ceux obtenus à partir de têtes de crevette d'élevage. Il en est de même pour le rapport acides aminés essentiels/ acides aminés non essentiels.

Tableau 41 : Profil en acides aminés des hydrolysats de têtes de crevette obtenus lors d'hydrolyses de 2 heures avec la Pepsine, en mg/g du poids sec

Acides aminés	Matière brute		1		2		3		4	
	Sauvage	Élevage								
LEU	22,27	15,72	36,68	41,92	34,06	35,37	24,89	31,44	35,37	31,44
PHE	14,85	11,55	21,45	26,40	21,45	23,10	16,50	18,15	23,10	21,45
VAL	16,38	9,36	28,08	31,59	24,57	24,57	18,72	24,57	25,74	24,57
LYS	16,06	8,76	20,44	21,90	21,90	18,98	11,68	20,44	23,36	16,06
ILE	15,72	7,86	24,89	26,20	22,27	20,96	17,03	20,96	23,58	22,27
THR	14,28	5,95	23,80	24,99	21,42	21,42	17,85	22,61	23,80	20,23
HIS	6,20	1,55	10,85	10,85	7,75	7,75	4,65	10,85	10,85	9,30
MET	7,45	1,49	7,45	13,41	10,43	10,43	7,45	4,47	8,94	8,94
AAE	113,21	62,24	173,64	197,26	163,85	162,58	118,77	153,49	174,74	154,26
GLU	52,92	24,99	63,21	101,43	64,68	85,26	45,57	63,21	69,09	66,15
ALA	23,14	21,36	34,71	42,72	34,71	34,71	25,81	28,48	32,93	28,48
ASP	33,25	21,28	46,55	67,83	42,56	57,19	34,58	47,88	38,57	51,87
GLY	28,5	18,75	45,00	55,50	46,50	46,50	34,5	38,25	41,25	36,00
PRO	24,15	17,25	37,95	49,45	25,3	37,95	19,55	34,50	36,80	33,35
TYR	7,24	7,24	12,67	10,86	10,86	10,86	7,24	12,67	14,48	10,86
SER	11,55	4,2	17,85	22,05	15,75	16,8	14,70	17,85	19,95	17,85
AANE	180,75	115,07	257,94	349,84	240,36	289,27	181,95	242,84	253,07	244,56
%AAE	38,51	35,10	40,23	36,06	40,54	35,98	39,50	38,73	40,85	38,68
AAE/AANE	0,63	0,54	0,67	0,56	0,68	0,56	0,65	0,63	0,69	0,63

Conditions d'hydrolyse : 1 : pH libre, inactivation par le pH ; 2 : pH libre, inactivation par la chaleur ; 3 : pH maintenu, inactivation par le pH ; 4 : pH maintenu, inactivation par la chaleur. **Acides aminés :** ALA : Alanine ; GLY : Glycine ; VAL : Valine ; LEU : Leucine ; ILE : Isoleucine ; THR : Thréonine ; SER : Serine ; PRO : Proline ; ASP : Acide aspartique ; MET : Méthionine ; GLU : Acide glutamique ; PHE : Phénylalanine ; LYS : Lysine ; HIS : Histidine ; TYR : Tyrosine. **AAE** Acides Aminés Essentiels ; **AANE** : Acides Aminés Non Essentiels.

3.1.5. Solubilisation des lipides

La Figure 42 indique les distributions des lipides dans les trois phases obtenues lors des hydrolyses de têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage avec la Pepsine. Les lipides se trouvent concentrés dans les fractions insolubles (eaux de lavage et résidus de lavage) lors des hydrolyses. Seuls 4% à 20% et 9% à 37% des lipides totaux sont solubilisés et se retrouvent dans les hydrolysats respectivement pour les têtes de crevettes d'élevage et les têtes de crevette sauvage.

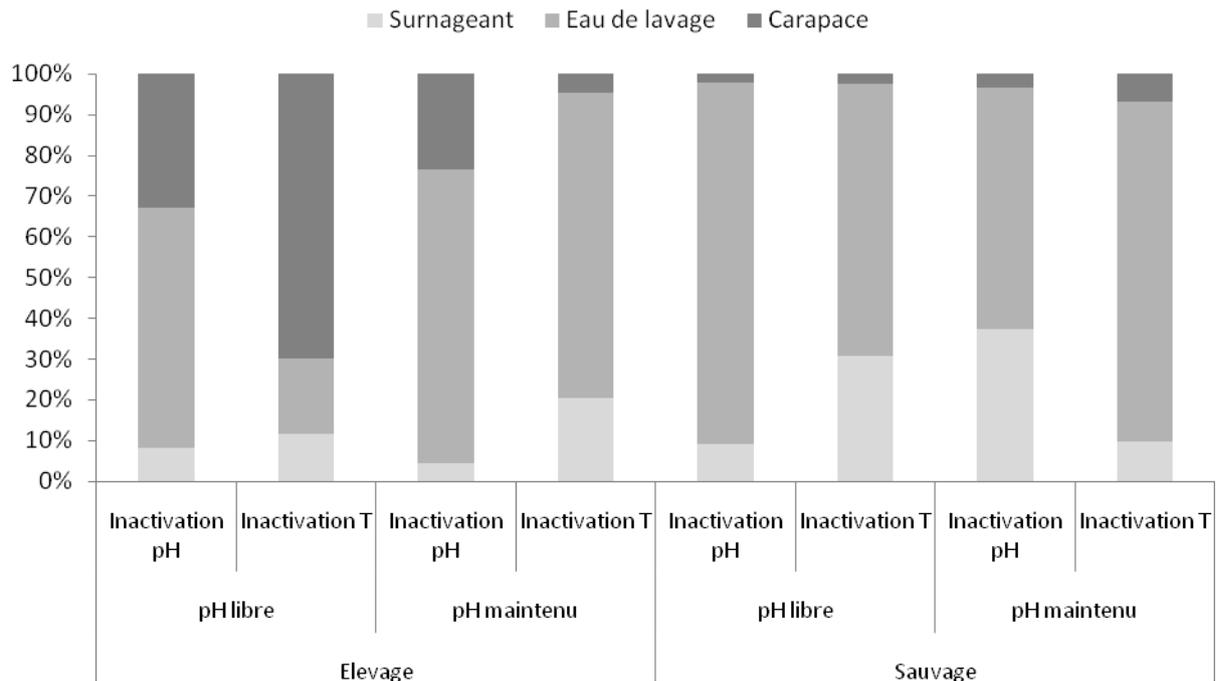


Figure 42 : Distribution des lipides après 2 heures d'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, en utilisant différentes conditions d'hydrolyse et différentes méthodes d'inactivation de l'enzyme.

3.2. Etude de l'efficacité nutritionnelle de différentes fractions de têtes de crevette d'élevage en aviculture

Pour valoriser les différentes fractions de têtes de crevette obtenues par hydrolyses avec la Pepsine, une recherche d'application en alimentation avicole est effectuée. Ainsi, des fractions issues de têtes de crevette d'élevage sont utilisées. Les têtes de crevette d'élevage sont choisies à cause de leur disponibilité plus élevée par rapport aux têtes de crevette sauvage.

Dans un premier temps, plusieurs hydrolyses sont effectuées avec la Pepsine.

3.2.1. Rendements des hydrolyses

Les différents rendements de production des fractions utilisées en alimentation avicole sont résumés dans le Tableau 42. Les rendements sont équivalents pour la production des différentes fractions excepté l'eau de lavage produit à pH contrôlé avec inactivation de la Pepsine par la chaleur.

Tableau 42 : Rendement des différentes hydrolyses pepsiques de têtes de crevette d'élevage menées pour la production de différentes fractions lyophilisées.

Inactivation de la Pepsine	Fractions	Rendement
pH	Surnageant	6,74
	Eau de lavage	6,64
	Mélange	6,34
Température	Surnageant	6,61
	Eau de lavage	4,69
	Mélange	6,08

Les fractions ainsi obtenues sont ensuite utilisées dans la formulation des rations pour le test sur les poulets.

3.2.2. Composition des différentes rations expérimentales

Les rations expérimentales sont formulées de 2 manières : la première qui consiste à incorporer une quantité de dérivés de crevette dans différentes rations de manière à ce que les rations possèdent la même densité protéique; une autre manière constante qui consiste à incorporer la même quantité de dérivé de crevette dans les rations.

Le Tableau 43 montre les compositions des différentes rations confectionnées de façon à obtenir une densité protéique constante. Ainsi, une combinaison de son de riz et de fractions de têtes de crevette d'élevage à différentes proportions est effectuée. Pour la production de 1 kg de farine, 142,5 g à 195,0 g de dérivés de têtes de crevette d'élevage sont nécessaires.

Tableau 43 : Composition des rations expérimentales à densité constante de protéines, quantités en g/kg de farine.

Composants	Rations						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Son de maïs (g/kg)	648,00	648,00	648,00	648,00	648,00	648,00	648,00
son de riz (g/kg)	207,50	155,00	185,00	180,00	165,00	190,00	155,00
Dérivés de crevette (g/kg)	142,50	195,00	165,00	170,00	185,00	160,00	195,00
CMV (g/kg)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Composition analytique							
Protéines (g/kg)	179,99	180,26	179,71	180,83	180,01	180,69	180,02
Lipides (g/kg)	77,45	119,09	91,91	69,87	111,15	88,96	95,70
EM (kcal/kg)	3107,32	3533,84	4451,00	3163,35	3408,40	3362,21	3349,52

CMV : Compléments Minéraux et Vitaminiques. **Dérivés de crevette d'élevage incorporés (issus d'hydrolyses pepsiques à pH maintenu)** : **R1** : Surnageant, inactivation de la pepsine par la température ; **R2** : Culot, inactivation de la pepsine par la température ; **R3** : Surnageant, culot et carapace, inactivation de la pepsine par la température ; **R4** : Surnageant, inactivation de la pepsine par le pH ; **R5** : Culot, inactivation de la pepsine par le pH ; **R6** : Surnageant, culot et carapace, inactivation de la pepsine par le pH, **R7** : Têtes de crevette d'élevage brutes.

L'incorporation de quantité constante de dérivés de têtes de crevette dans différentes rations de poulets est réalisée avec la matière brute ainsi que le surnageant et l'eau de lavage générés par hydrolyse pepsique des têtes de crevette d'élevage à pH maintenu. Les différentes proportions de matières premières utilisées, ainsi que les compositions biochimiques des rations sont figurées dans le Tableau 44. Ainsi, la densité protéique varie de 123,56 g/kg à 127,23 g/kg de farine. L'incorporation du surnageant conduit à la production de la ration possédant la densité protéique la plus élevée.

Tableau 44 : Composition des rations expérimentales lors d'incorporation d'une quantité constante de dérivés de têtes de crevette, en g/kg de farine.

Composants	Rations		
	R8 (Matière brute)	R9 (Surnageant)	R10 (Eau de lavage)
Son de maïs (g/kg)	748,00	748,00	748,00
Son de riz (g/kg)	200,00	200,00	200,00
Dérivés de crevette (g/kg)	50,00	50,00	50,00
CMV(g/kg)	2,00	2,00	2,00
Composition analytique			
Protéines (g/kg)	125,90	127,23	123,56
Lipides (g/kg)	83,17	75,61	90,52
EM (kcal/kg)	3280,83	3217,99	3325,71

3.2.3. Performances zootechniques des poulets

Les différents paramètres étudiés pour évaluer les performances zootechniques des poulets nourris avec les rations expérimentales sont résumés dans le Tableau 45 pour la formulation à densité protéique constante.

D'après ce tableau, il ressort que la supplémentation de l'alimentation des poulets élevés selon le mode traditionnel malgache avec des dérivés de têtes de crevette d'élevage améliore leur gain de poids. En effet, comparé aux témoins qui sont élevés selon le mode traditionnel, le gain de poids quotidien des animaux augmente lorsqu'ils sont nourris avec les rations expérimentales contenant des dérivés de têtes de crevette. La ration R4 produit le gain de poids le plus grand parmi les rations étudiées, suivie de près par la ration R6. Ces 2 rations sont constituées par le surnageant et le mélange obtenus par hydrolyse à la suite de laquelle la pepsine a été inactivée par le pH. Pour l'inactivation par la température, c'est la ration confectionnée avec l'eau de lavage qui conduit au meilleur gain de poids chez les poulets. En ce qui concerne la consommation, on note que la ration obtenue avec les têtes de crevette non hydrolysées présente la meilleure consommation par les poulets. Par contre, son indice de consommation qui traduit l'utilisation par les animaux est le plus élevé de toutes les rations expérimentées. Pour les 2 types d'inactivation de la Pepsine, les rations composées avec le mélange présentent l'indice de consommation le moins élevé, suivies de celles obtenues avec les surnageants et enfin les rations confectionnées avec les eaux de lavage possèdent des indices de consommation inférieurs à celles obtenues avec les 2 autres dérivés de têtes de crevette.

Tableau 45 : Performances zootechniques des poulets nourris avec des rations enrichies en dérivés de têtes de crevette d'élevage, à densité protéique constante.

Rations	GMQ (g)	CAJ (g)	IC	PER
R1	11,44±1,16	36,12	3,16±0,32	1,76±0,18
R2	16,35±1,46	68,85	4,21±0,37	1,32±0,12
R3	12,07±2,04	28,93	2,40±0,42	2,31±0,39
R4	20,01±4,26	88,84	4,44±0,74	0,57±0,27
R5	11,87±3,06	56,03	4,72±1,74	1,18±0,30
R6	18,03±4,51	50,18	2,78±0,78	1,99±0,50
R7	13,76±3,77	97,50	7,09±3,85	0,78±0,28
Témoins	7,86±4,94			

GMQ : Gain Moyen Quotidien ; **CAJ** : Consommation Alimentaire Journalière ; **IC** : Indice de Consommation ; **PER** : Coefficient d'efficacité protéique ; **R1-7** : Rations expérimentales.

Le Tableau 46 résume les performances zootechniques des poulets obtenus lors de la supplémentation de leur alimentation avec 5% de différents dérivés de têtes de crevette. Le gain moyen quotidien le plus élevé est obtenu avec la ration R9 qui contient le surnageant. Cette ration possède également l'indice de consommation la moins importante, traduisant sa meilleure digestibilité.

Tableau 46 : Performances zootechniques des poulets nourris avec différentes rations enrichies en dérivés de têtes de crevette avec un taux d'incorporation identique.

Rations	GMQ (g)	CAJ (g)	IC
R8	9,59	68,75	7,17
R9	13,36	58,33	4,37
R10	9,05	83,33	9,21
Témoins	7,86		

GMQ : Gain Moyen Quotidien ; **CAJ** : Consommation Alimentaire Journalière ; **IC** : Indice de Consommation ; **R8-10** : Rations expérimentales.

3.3. Activité antimicrobienne des hydrolysats de têtes de crevette

3.3.1. Tests sur des souches microbiennes alimentaires

Différents hydrolysats de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage sont criblés pour des activités antimicrobiennes. Le Tableau 47 présente les conditions d'obtention de ces différents hydrolysats testés. Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des hydrolysats, effectués sur les souches microbiennes alimentaires sont résumés dans le Tableau 48.

Tableau 47 : Hydrolysats de têtes de crevette testés sur les microorganismes alimentaires.

Echantillon	Origine	Enzyme	Conditions d'hydrolyse				
			Durée	pH	Température	Inactivation	
H1	Elevage	Pepsine	24h	2	40°C	Thermique	
H2		Novozym 37020	24h	3	50°C		
H3		Delvolase	24h	10	60°C		
H4		Pepsine/Protex 6L	2h/2h	2/9,5	40/60°C		
H5		Pepsine/Delvolase	2h/2h	2 10	40/60°C		
H6		Novozym 37020/Protex 6L	2h/2h	3/9,5	50/60°C		
H7		Novozym 37020/Delvolase	2h/2h	3 10	50/60°C		
H8		Sauvage	Pepsine	2h	2 libre	40°C	Thermique
H9					2		pH
H10					2 libre		Thermique
H11		Sauvage	Pepsine	2h	2	40°C	pH
H12					2 libre		pH
H13					2		pH

Tableau 48 : Activités antimicrobiennes détectées dans les hydrolysats de têtes de crevette.

Hydrolysats	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
H1				(--)	(--)	(--)		
H2								
H3	(--)							
H4					(--)			
H5								
H6								
H7								
H8								
H9								
H10				(--)	(--)			
H11	(++)			(--)	(--)			
H12								
H13			(--)	(--)	(--)	(--)		

(--) inhibition forte (-/+) inhibition faible (++) croissance

Souches: **S1** : *Shewanella putrefaciens*; **S2** : *Photobacterium phosphoreum*; **S3** : *Serratia liquefaciens*; **S4** : *Brochothrix thermosphacta*; **S5** : *Listeria monocytogenes* ; **S6** : *Staphylococcus aureus* ; **S7** : *Salmonella thyphimurium* ; **S8** : *Vibrio cholerae*.

Ainsi, on note des activités inhibitrices des hydrolysats de têtes de crevettes aussi bien sur des souches de bactéries gram négatives (*Shewanella putrefaciens*) que des souches de bactéries gram positives (*Brochothrix thermosphacta*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*).

3.3.2. Tests sur les souches de microorganismes pathogènes aquacoles

3.3.2.1. Tests en milieu liquide

Concernant les tests en milieu liquide effectués sur les microorganismes pathogènes aquacoles, l'hydrolysat obtenu avec les têtes de crevette d'élevage pendant 2 heures à pH maintenu, avec la Pepsine inactivée par la température, présente des activités antimicrobiennes intéressantes. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) en terme de facteur de dilution est de 32 pour *Vagococcus salmonirum*, 16 pour *Vibrio alginolyticus* et 8 pour *Yersinia ruckeri*, *Listonella anguillarum* et *Bacillus megaterium*. Cette fraction est alors soumise à une chromatographie sur colonne C18.

3.3.2.2. Extraction en phase solide

L'élution de l'hydrolysat sur colonne C18 est effectuée avec de l'acétonitrile 10% et 80%. Les 2 éluats sont retestés en milieu liquide sur 8 panels de souches bactériennes. Les activités sont ainsi retrouvées dans l'éluat à 10%. Une inhibition à une dilution minimale de 10 fois est ainsi retrouvée avec *Vibrio alginolyticus* et *Bacillus megaterium*.

3.3.2.3. SDS-PAGE et Gel recouvert

Le microorganisme testé sur Gel recouvert est constitué par la souche *Bacillus megaterium*. Une petite zone d'inhibition de croissance est observée avec la fraction 10% acétonitrile de l'hydrolysat. La masse molaire du composé actif est estimée à 2 à 3 Da.

4. DISCUSSION

4.1. Optimisation des hydrolyses de têtes de crevette avec la Pepsine

4.1.1. Cinétique des hydrolyses

Le degré d'hydrolyse correspondant au pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées a été calculé en fonction de la quantité d'acide ou de base ajouté au milieu réactionnel pour maintenir le pH. Dans ce chapitre, des expériences ont été pourtant effectuées sans que le pH du milieu soit ajusté en ajoutant de la base. Le degré d'hydrolyse n'a pas pu alors être

calculé dans ces cas. La cinétique est donc réalisée en fonction de l'évolution du pH qui est aussi bien proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques coupées.

Ainsi, en comparant les courbes de cinétique, on note une différence entre les allures des courbes selon que le pH est contrôlé ou non. La phase rapide est en effet moins marquée lorsque le pH n'est pas contrôlé et on note une phase de latence plus longue. Ceci traduit que l'activité de l'enzyme est ralentie en dehors du pH 2. En ce qui concerne les degrés d'hydrolyse des expériences conduites à pH maintenu, il a atteint environ 30,1% au bout de 2 heures avec les têtes de crevette d'élevage. D'après l'hydrolyse pepsique de longue durée réalisée précédemment, le DH atteint 36,5% au bout de 22 heures. Une différence de 6% de DH est observée. Ceci traduit qu'une faible protéolyse a lieu après 2 heures d'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage. Cependant cette protéolyse n'est pas importante car l'augmentation de degré d'hydrolyse est de 6% pendant les prochaines 20 heures.

4.1.2. Solubilisation de la matière

La solubilisation de la matière dans le surnageant après 2 heures d'hydrolyse avec la Pepsine est favorisée par le contrôle du pH pendant les hydrolyses. Comparée à la solubilisation lors de l'hydrolyse pepsique de 22 heures de têtes de crevette d'élevage, elle est faible. Un écart d'environ 2% à 23% est observé. En effet, l'augmentation de la matière sèche dans le surnageant suite aux hydrolyses à pH contrôlé est causée d'une part par la solubilisation de la matière et d'autre part par l'addition d'acide qui s'ajoute à la matière. Il est alors normal que l'hydrolyse de 22 heures conduit à une solubilisation plus élevée de la matière par rapport à une hydrolyse de 2 heures, étant donné qu'une faible protéolyse s'est encore produite pendant les 20 prochaines heures. L'incubation des têtes de crevette en milieu acide pendant ce temps favorise également la déminéralisation de l'exosquelette, augmentant ainsi la quantité de la matière solubilisée.

4.1.3. Composition des différentes fractions

Par rapport à l'hydrolyse de longue durée (22 heures), les teneurs en protéines des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenus après 2 heures d'hydrolyse avec la Pepsine sont élevées. En effet, cette concentration des protéines dans les surnageants est due à la teneur en cendres plus faible générée au cours des hydrolyses de 2 heures. La diminution du temps d'hydrolyse pepsique des têtes de crevette de Madagascar est alors favorable pour l'obtention d'hydrolysats plus concentrés en protéines.

Pour les 2 sortes de têtes de crevette, la teneur en protéines est plus élevée dans les surnageants quand le pH est contrôlé pendant l'hydrolyse. Ce résultat est dû au fait que l'enzyme a toujours été à son pH optimum d'activité (pH 2), d'où une meilleure solubilisation des protéines. Par contre, la méthode d'inactivation de l'enzyme ne semble pas influencer la teneur en protéines dans les surnageants. Pour les résidus de lavage (carapace), les teneurs en protéines sont similaires à celles rapportées par d'autres auteurs dans les résidus de fermentation de têtes de crevettes pour l'extraction de la chitine.

En effet, en vue d'extraire la chitine dans les co-produits de crevette *Penaeus* spp. du Mexique, une fermentation en présence de *Lactobacillus* spp. et de glucose a été effectuée pendant 90 jours à 30°C, suivie de traitement avec du chloroforme/méthanol, une déminéralisation avec de l'acide chlorhydrique et une déprotéinisation avec de la soude. La teneur en protéines du sédiment de fermentation a été alors de 14,3% à 16,5% de la matière sèche (Cira *et al.*, 2002). Ces valeurs sont similaires à celles obtenues avec les fractions « carapaces » obtenues avec le présent travail sur les têtes de crevette d'élevage lors d'hydrolyse pepsique à pH libre. Notons que les carapaces obtenues dans ces conditions possèdent les teneurs les plus élevées en protéines entre toutes les carapaces de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage générées au cours des différentes hydrolyses avec la Pepsine effectuées dans le présent travail. Par contre, le traitement avec de la soude 1 M du sédiment de fermentation obtenue par Cira *et al.* a diminué considérablement la teneur en protéines des résidus et la chitine ainsi obtenue contenait moins de 2% de protéines. Cette valeur est inférieure à celle obtenue avec l'hydrolyse pepsique réalisée au cours de l'étude présente où la teneur minimum en protéines obtenues est de 5,1% de la matière sèche. Un tel traitement sur les fractions « carapaces » obtenues au cours de ce présent travail est alors intéressant pour l'obtention de chitine pure. Une autre étude de l'extraction de la chitine par fermentation de carapaces de crevette *Nephrops norvegicus* a été également effectuée en présence de sucre et d'inoculum, conduisant à la production de chitine à 11,9% de protéines (Beaney *et al.*, 2005). Cette valeur est comprise dans l'intervalle des valeurs obtenues avec les hydrolyses pepsiques de têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage conduites au cours de l'étude présente. Pour extraire la chitine des têtes et des carapaces de crevette, la fermentation est souvent utilisée. Ainsi, Rao et Stevens ont effectué cette méthode sur des têtes et des carapaces de crevette en présence de 1% d'acide acétique, de 10% d'inoculum de *Lactobacillus plantarum* 541, et de 5% de glucose (Rao et Stevens, 2005). La chitine a été ensuite séparée du sédiment de fermentation par lavage avec de l'eau distillée. La chitine ainsi

obtenue à partir de têtes de crevette contenait 20% à 22% de protéines. Ces valeurs sont supérieures à celle obtenue par hydrolyse pepsique utilisée dans la présente étude.

Du point de vue de la déprotéinisation de l'exosquelette des têtes de crevette, on peut constater alors que l'hydrolyse avec la Pepsine des têtes de crevette d'élevage et de crevette sauvage de Madagascar est comparable à la fermentation lactique utilisée par d'autres auteurs, voire plus efficace dans certains cas. Dans l'étude présente, la teneur en protéines la plus faible est obtenue avec l'hydrolyse à pH maintenu aussi bien pour les têtes de crevette d'élevage que les têtes de crevette sauvage.

Comme lors des hydrolyses de longue durée et des hydrolyses croisées, les teneurs en lipides dans les hydrolysats de têtes de crevette avec la Pepsine pendant 2 heures, selon différentes conditions de pH et d'inactivation de l'enzyme, sont faibles. Par rapport à la matière sèche, elles varient de 1,5% à 6,0% pour les têtes de crevette d'élevage, et 0,7% à 2,4% pour les têtes de crevette sauvage. Les eaux de lavages constituent les fractions les plus riches en lipides dans tous les cas et les résidus de lavage possèdent des teneurs en lipides moins élevées que celles des eaux de lavage. Ces teneurs en lipides varient de 10,01% à 31,11% de la matière sèche pour les têtes de crevette d'élevage, et de 1,07% à 4,25% pour les têtes de crevette sauvage. Un lavage complémentaire des résidus avec du solvant organique pourrait être effectué pour augmenter la pureté de ces résidus de lavage qui renferment en majorité la chitine. Ce traitement a été utilisé par *Cira et al.* pour l'extraction de la chitine après fermentation de têtes de crevette (*Cira et al.*, 2002) ainsi que *Synowiecki et Al-Katheeb* après hydrolyse de carapaces de crevettes *Crangon crangon* avec l'Alcalase (*Synowiecki et Al-Katheeb*, 2000). Les teneurs en lipides de toutes les fractions issues de tête de crevette d'élevage sont plus importantes que celles des fractions obtenues avec des têtes de crevette sauvage. Ces différences entre les 2 types de têtes de crevette sont causées par la différence de la teneur en lipides de la matière brute (les têtes de crevette d'élevage sont 2,5 fois plus riches en lipides que les têtes de crevette sauvage).

Pour les 2 types de têtes de crevettes étudiées, la teneur en cendres est plus élevée dans les surnageants des hydrolysats par rapport à celle de la matière première. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus avec les hydrolyses précédentes (hydrolyses de longue durée et hydrolyses croisées). Cette teneur élevée en cendres dans les surnageants fait diminuer leur concentration en protéines. Cependant, son intérêt réside dans la déminéralisation de l'exosquelette qui conduit à l'obtention de chitine semi-pure dans le culot.

On note la production de résidus de lavage à faible teneur en cendres lors d'hydrolyse des têtes de crevettes avec la Pepsine. Ces teneurs varient de 4,3% à 8,5% de la matière sèche pour les têtes de crevette d'élevage ; et de 0,8% à 14,7 de la matière sèche pour les têtes de crevette sauvage. Les hydrolyses réalisées à pH contrôlé sont favorables pour la production de résidus moins chargés en cendres. Cela pourrait être à cause de l'acidité maintenue qui favorise la déminéralisation. Les résultats obtenus sur la pureté des résidus sont comparables à ceux obtenus lors de fermentation de co-produits de crevettes, suite à une déminéralisation importante de l'exosquelette en milieu acide. En effet, dans le but d'extraire la chitine contenue dans les co-produits, *Cira et al.* ont obtenu 6,3% de calcium résiduel dans le sédiment de fermentation de co-produits de crevette originaire du Mexique (*Cira et al.*, 2002). 14,2 à 19,6% de matière inorganique ont été trouvés dans le sédiment de fermentation de carapaces de crevette *Nephrops norvegicus* pour l'extraction de la chitine (*Beaney et al.*, 2005). Rao et Stevens ont trouvé 9,6 à 10,7% de cendres dans les sédiments de fermentation effectué sur des têtes de crevette (*Rao et Stevens*, 2005).

4.1.4. Solubilisation des protéines

4.1.4.1. Protéines totales

Après hydrolyse avec la Pepsine, plus de 50% des protéines passent dans les surnageants. 52% à 72% des protéines des têtes de crevette d'élevage passent en solution. Les conditions d'hydrolyse à pH maintenu et inactivation par la température conduisent à la solubilisation la plus élevée. Après 22 heures d'hydrolyse de têtes de crevette d'élevage avec la Pepsine, cette solubilisation a été de 74%. Un écart de 2% à 22 % est noté, ce qui est bien logique, vu que l'hydrolyse a continué pendant une durée plus longue. En effet, la solubilisation des protéines au cours du temps d'hydrolyse résulte de la coupure des liaisons peptidiques. Ce phénomène est observé lors de nombreuses hydrolyses enzymatiques, pour ne pas citer que celle de co-produits de thon réalisé avec l'Alcalase pendant 12 heures au cours de laquelle la solubilisation des protéines augmente avec le temps (*Nguyen*, 2009). Dans la présente étude, comparées aux têtes de crevette d'élevage, on note une meilleure solubilisation des têtes de crevette d'origine sauvage : 77% à 93% des protéines se retrouvent dans les hydrolysats. *Slyzite et al.* ont effectué une étude sur l'effet de la composition lipidique de la matière brute sur la solubilisation des protéines au cours de l'hydrolyse enzymatique de co-produits de morue. Il a été rapporté alors que la solubilisation des protéines diminue quand la teneur en lipides dans la matière première augmente (*Slyzite et*

al., 2005). Le même phénomène est observé avec la présente étude: les protéines passent beaucoup plus dans le surnageant pour les têtes de crevette sauvage qui possèdent 2,5 fois moins de lipides que les têtes de crevette d'élevage.

En accord avec les teneurs en protéines dans les surnageants, on observe aussi une meilleure solubilisation des protéines quand le pH a été maintenu durant l'hydrolyse. Ceci pourrait être dû au fait que l'enzyme a toujours été dans les conditions optimales de son activité, ce qui n'a pas été le cas quand le pH n'a pas été régulé pendant l'hydrolyse.

En ce qui concerne la méthode d'inactivation de l'enzyme, on note que par rapport à la neutralisation, la méthode thermique augmente la solubilité des protéines des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage tandis qu'elle diminue la solubilité dans le cas des têtes de crevette sauvage hydrolysées avec la Pepsine. La principale différence de composition des 2 matières premières étudiées réside dans leur composition en lipides. La différence de leur comportement durant les hydrolyses est alors liée, entre autres, à cette composition lipidique. En effet, les lipides peuvent former des liaisons avec les protéines pour former des lipoprotéines. L'interaction entre les protéines et lipides dans le complexe lipoprotéine est généralement de nature hydrophobe. La force de cette interaction est maximale au pH voisin du pH isoélectrique de la protéine, entraînant leur insolubilisation (Cheftel *et al.*, 1986). Ceci pourrait expliquer la faible solubilisation des protéines des têtes de crevette d'élevage lors de l'inactivation de la pepsine par la neutralité, comparativement à l'inactivation thermique. Dans le cas où les lipides ne sont pas présents en quantité importante dans les têtes de crevette (têtes de crevette sauvage), l'inactivation de la Pepsine par le pH favorise la solubilisation des protéines.

4.1.4.2. Profils en acides aminés

Par rapport à l'hydrolyse de longue durée avec la Pepsine, le profil en acides aminés obtenu avec les hydrolyses de 2 heures est nettement amélioré, ce qui signifie que la destruction de certains acides aminés des têtes de crevette d'élevage est favorisée par la longue durée de l'hydrolyse. Les résultats obtenus lors de l'hydrolyse de co-produits de thon avec Protamex semblent contradictoires. En effet, lors de l'hydrolyse de co-produits de thon pendant 12 heures, la composition en acides aminés est augmentée au cours du temps (Nguyen, 2009). Ces différences pourraient être attribuées à la nature des co-produits, les différences de conditions et de la durée de l'hydrolyse ainsi qu'à la différence de l'enzyme utilisée. La concentration des acides aminés dans les hydrolysats pepsiques de 2 heures est également supérieure à celle obtenue lors des hydrolyses croisées avec la Pepsine. Cependant,

le pourcentage d'acides aminés essentiels des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage en présence de la Pepsine pendant 2 heures est similaire à celui obtenu après 22 heures d'hydrolyse. Ces résultats confirment que seulement 2 heures d'hydrolyse avec la Pepsine suffisent pour améliorer la composition en acides aminés de têtes de crevette de Madagascar.

4.1.4.3. Profils moléculaires

Pour le même type de têtes de crevettes, les profils moléculaires des hydrolysats issus de diverses conditions de pH et de différentes méthodes d'inactivation de la Pepsine sont similaires. La différence réside dans l'origine des têtes de crevette : une légère différence est observée selon que les têtes de crevette soient d'origine d'élevage ou d'origine sauvage.

Par rapport aux hydrolysats obtenus dans le chapitre 2, les peptides à petite taille obtenus avec les hydrolyses avec la pepsine pendant 2 heures sont de quantité inférieure pour les têtes de crevette d'élevage. On note que 82,5% de peptides possèdent un poids moléculaire inférieur à 1000 Da après 22 heures d'hydrolyse alors que cette proportion est seulement de 73,1% au bout de 2 heures d'hydrolyse. Ces résultats sont justifiés par le fait que la Pepsine a toujours continué à couper des liaisons peptidiques donc diminué la taille des peptides plus longtemps au cours de l'hydrolyse de longue durée. Ils sont en accord avec les résultats obtenus au cours de l'hydrolyse de co-produits de thon avec Protamex (Nguyen, 2009). Lors de cette étude en effet, il a été rapporté que la proportion des peptides de grande taille diminue en fonction du temps d'hydrolyse.

4.1.5. Solubilisation des lipides

Lors des hydrolyses des têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage avec la Pepsine, les lipides sont concentrés dans les fractions insolubles (eaux de lavage et résidus de carapace).

On note une différence de la répartition des lipides dans les hydrolysats selon la composition initiale de la matière brute : avec les têtes de crevette sauvage qui possèdent 6,8% de lipides, les lipides passent plus en solution par rapport aux têtes de crevette d'élevage (16,6% de lipides). On note aussi que la régulation du pH pendant l'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage entraîne une meilleure concentration des lipides dans les eaux de lavage, par rapport aux hydrolyses effectuées à pH libre, suite à lesquelles les lipides restent dans les résidus de lavage.

La migration des lipides a lieu lors de l'étape de centrifugation des hydrolysats (Sathivel *et al.*, 2003). En effet, Sathivel *et al.* ont rapporté une teneur en lipides inférieure à

1,5% lors de l'hydrolyse de hareng avec Alcalase à 50°C et pH 8 pendant 1 heure. Cette faible teneur en lipides a été attribuée à leur migration pendant l'étape de centrifugation. La liaison des lipides avec les protéines pour former un complexe lipoprotéique peut influencer également sur la solubilisation des lipides (Slyzite *et al.*, 2005). L'étude a été effectuée sur différents co-produits de morue, en réalisant des mélanges avec des compositions différentes. Il a été rapporté alors qu'une augmentation de la teneur en protéines dans les matières brutes induit une faible extraction des lipides dans une fraction huileuse. Ce phénomène a été attribué à la formation de liaison entre protéines et lipides. Ce phénomène pourrait être attribué dans la présente étude sur la différence de solubilisation des lipides entre les 2 sortes de têtes de crevette étudiées. Par ailleurs, le comportement des protéines aux conditions différentes de pH au cours de l'hydrolyse, ainsi que la méthode d'inactivation de l'enzyme en fin d'hydrolyse peut affecter le comportement des lipides lors de la centrifugation et du lavage. Ce qui pourrait être à l'origine des différences entre les teneurs en lipides.

Les conditions de centrifugation étant identique pour les hydrolyses des têtes de crevette d'élevage et des têtes de crevette sauvage, la différence de distribution des lipides entre les 2 types de co-produits après hydrolyses est attribuée à la différence de leurs teneurs en lipides initiales.

4.2. Amélioration de l'aviculture traditionnelle malgache

Différentes fractions obtenues lors des hydrolyses de têtes de crevette d'élevage sont utilisées pour étudier leur efficacité en aviculture. Différentes rations expérimentales sont ainsi confectionnées en incorporant ces fractions.

4.2.1. Composition des différentes rations

Pour la production de rations à teneur en protéine identique (180 g), la quantité des différentes fractions de têtes de crevette d'élevage varie de 142,5 g/kg à 195 g/kg de farine, soient environ 14% à 19% d'incorporation. Les teneurs en lipides sont très variables, allant de 68,87 g/kg à 119,09 g/kg de farine. L'énergie métabolisable est proportionnelle à la teneur en lipides. Les lipides étant concentrés dans les eaux de lavage lors des hydrolyses, ce sont alors ces fractions qui conduisent à la production de farine possédant les densités énergétiques les plus élevées.

L'incorporation de 5% de dérivés de crevette d'élevage dans les différentes rations lors de la deuxième formulation conduit à la production de farine avec une densité protéique variable, allant de 123g à 127 g de protéines pour 1 kg de farine. L'énergie métabolisable est

de 3218 kcal/kg à 3326 kcal/kg de farine et les teneurs en lipides varient de 75 g à 90 g pour 1 kg de farine.

4.2.2. Performances zootechniques des poulets

Les performances zootechniques des poulets sont déterminées par le gain de poids moyen quotidien (GMQ), l'indice de consommation (IC) et le coefficient d'efficacité protéique (PER).

4.2.2.1. Rations isoprotéiques

Pour les poulets témoins élevés selon le mode traditionnel, le gain de poids moyen quotidien (GMQ) est de 7,86g. Cette valeur est légèrement inférieure aux 8,33g rapportés par Koko *et al.* sur les poulets malgaches de 3 à 7 mois élevés de la même manière (Koko *et al.*, 2004). Aux îles Comores, ce gain est de 12g avec des poulets de race locale, élevés traditionnellement (Hofman, 2000). Plusieurs paramètres sont à l'origine de ces différences, entre autres les diversités environnementales d'élevage, conduisant à la différence de la nourriture des poulets, mais aussi la diversité des espèces.

Avec les rations isoprotéiques, les gains de poids des poulets sont tous supérieurs à ceux des poulets témoins. Une différence de 4 g à 12,5 g de gain de poids quotidien est notée. Ce résultat traduit que la supplémentation de têtes de crevette et de ses dérivés dans l'alimentation avicole traditionnelle favorise considérablement la croissance des poulets.

Par rapport à la ration formulée avec les têtes de crevette brutes, les rations à base de différentes fractions pepsiques conduisent à l'augmentation du gain de poids dans 3 rations : R2 (eau de lavage issu de l'inactivation par la température), R4 (surnageant issu de l'activation par le pH) et R6 (mélange issu de l'inactivation par le pH). Pour les autres rations, le gain de poids est inférieur à celui obtenu avec les têtes de crevette brutes. Ce gain de poids inférieur peut s'expliquer par la consommation alimentaire très faible des poulets avec ces rations. En effet, la CAJ (consommation alimentaire journalière) des poulets est de 28,93g ; 36,12g et 56,03g respectivement pour les rations R3, R1 et R5, contre 97,50g pour la ration R7 qui contient les têtes de crevette brutes. La faible consommation alimentaire des poulets pourrait être causée par le manque d'appétence des rations. Les rations R1 et R3 étant formulées avec le surnageant et l'eau de lavage obtenus après inactivation par la température, leur acidité est élevée.

L'indice de consommation se traduit par la conversion de la ration en masse de poulet. Plus l'indice de consommation est faible, plus l'aliment est converti en gain pondéral. Le lot

témoins étant élevé selon le mode traditionnel en élevant les poulets en liberté, leur consommation alimentaire n'a pas pu être mesurée, donc l'indice de consommation n'est pas connu.

Pour les rations expérimentales, l'indice de consommation obtenu avec la ration R7 confectionnée avec les têtes de crevette sans hydrolyse, est considérablement élevé par rapport aux autres rations. Cela traduit son utilisation moins importante par les poulets. L'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage constitue alors une voie de valorisation efficace pour l'alimentation avicole. La digestibilité la plus élevée est obtenue avec les rations formulées avec le mélange des fractions d'hydrolyse (2,40 et 2,78 d'indice de consommation). Il a été rapporté que certains oiseaux possèdent la chitinase dans leur appareil digestif, et la digestibilité est de 88% à 98% pour la chitine et le chitosan respectivement (Gernat, 2001). La bonne digestibilité des rations confectionnées avec les mélange de surnageant, eau de lavage et carapaces de têtes de crevette d'élevage pourrait alors être à l'origine de l'existence de chitinase dans le système digestif des poulets indigènes malgaches. L'indice de consommation des autres rations sont autour de 3 à 4.

4.2.2.2. Rations à proportion constante de dérivés de têtes de crevette

Comme avec les rations isoprotéiques, on peut constater que les rations expérimentales réalisées avec les têtes de crevette hydrolysées sont favorables pour le gain de poids des poulets, comparées à l'alimentation traditionnelle. Par contre, la matière brute (R8) est plus intéressante du point de vue gain de poids et indice de consommation par rapport à l'eau de lavage de têtes de crevette obtenu (R10). Le surnageant constitue le dérivé le plus efficace en gain de poids et en indice de consommation.

L'effet de l'alimentation sur la croissance des animaux est dû à la disponibilité des protéines (Rosenfeld *et al.*, 1997 ; Gernat *et al.*, 2001 ; Oduguwa *et al.*, 2004). Cette même raison peut être la cause de la différence entre la croissance des poulets selon leur régime. En effet, les individus qui ont servi de témoins ont puisé leurs protéines exclusivement dans des produits végétaux dont les protéines sont moins digestibles que celles d'origine animale (Rosenfeld *et al.*, 1997), raison pour laquelle ce lot a une croissance moins rapide. Le surnageant contient les protéines solubles qui sont alors les plus digestibles des échantillons étudiés, d'où leur meilleure digestibilité. Par rapport à la matière première, l'eau de lavage est moins digestible. En effet, les lipides sont concentrés dans l'eau de lavage après l'hydrolyse, ces lipides sont éventuellement liés à des protéines pour former un complexe lipoprotéine qui diminuerait l'accessibilité des protéines (Slizyte *et al.*, 2005), donc leur digestibilité.

La relation entre la croissance des poulets et leur consommation de farine reflète la digestibilité des farines. Cette digestibilité est inversement proportionnelle à l'indice de consommation. Les poulets ont le plus d'appétit avec la farine enrichie en eau de lavage des hydrolysats, mais la croissance est la moins influencée par la quantité consommée. Par contre, avec le surnageant, les poulets ont moins d'appétit avec une consommation journalière moyenne de 58,33 g de farine par individu ; mais l'indice de consommation est faible. Ces résultats confirment encore la bonne digestibilité de la farine avec la fraction soluble d'hydrolysat et la moins bonne digestibilité pour la farine avec l'eau de lavage. Les lipides sont concentrés dans l'eau de lavage, pouvant former un complexe lipoprotéique, diminuant ainsi la digestibilité.

4.3 Activités antimicrobiennes

D'après les résultats, les activités antimicrobiennes identifiées dans les hydrolysats de têtes de crevette sont aussi bien positives sur des bactéries gram négatives que des bactéries gram positives alimentaires testées. En effet, une activité antimicrobienne est détectée sur les 3 souches de bactérie gram positive testées, notamment *Brochothrix thermosphata*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. Par contre, une activité a été criblée sur 2 souches de bactérie gram négative (*Serratia liquefaciens* et *Shewanella putrefaciens*) parmi les 5 souches testées. Sur ces 2 souches inhibées cependant, un hydrolysat présente une action activatrice de la croissance sur la souche *Shewanella putrefaciens*. Les fractions issues des hydrolysats obtenus par action de la pepsine pendant 2 heures à pH contrôlé présentent des activités inhibitrices sur des microorganismes alimentaires. Les hydrolysats de têtes de crevette d'élevage et têtes de crevette sauvage obtenus dans ces conditions, avec les 2 types d'inactivation du pH, présentent tous une activité inhibitrice de la croissance des souches *Brochothrix monosphacta* et *Listeria monocytogenes*, des bactéries qui peuvent être retrouvées dans les aliments et conduire à leur détérioration. En effet, *Brochothrix monosphacta* constitue un agent majeur d'altération des viandes et des produits carnés stockés à l'air libre, sous atmosphère modifiée ou dans des enceintes réfrigérées ; il n'a cependant pas de pouvoir pathogène. Son métabolisme conduit à la production d'acétoïne, de diacétyl et de 3-méthylbutanol qui confèrent une odeur désagréable aux produits. La croissance de *Brochothrix monosphacta* est inhibée par la bactérie *Brochothrix campestris* qui produit une bactériocine, la brochocine-C (Euzéby, 2000). Contrairement à *Brochothrix thermosphacta*, le genre *Listeria monocytogenes* possède un pouvoir pathogène chez l'homme et chez les

animaux. La listériose se traduit par la septicémie ou l'infection du système nerveux central chez l'homme adulte. L'infection se produit généralement par ingestion d'aliments fortement infectés. La dose infectante chez l'homme varie avec le statut immunitaire de l'individu et de la virulence de la souche. Il a été rapporté cependant que les aliments incriminés possèdent plus de 10^3 unités de bactéries par gramme d'aliment. *Listeria monocytogenes* étant une bactérie qui résiste au milieu extérieur, la contamination des aliments pourraient se passer au cours de leur transformation (Euzéby, 2000). L'hydrolysats de têtes de crevette sauvage issu de la même condition d'hydrolyse que précédemment, et avec inactivation de la pepsine par le pH, présente en plus une inhibition contre la croissance de *Serratia liquefaciens* et *Staphylococcus aureus*, 2 microorganismes pathogènes pouvant être rencontrés dans les aliments (Euzéby, 2000).

Concernant les microorganismes pathogènes aquacoles, l'hydrolysats de têtes de crevette d'élevage obtenu par traitement avec la pepsine pendant 2 heures à pH contrôlé, et par inactivation par la température, présente des activités inhibitrices contre *Vagococcus*, *Listonella anguillarum* et *Vibrio alginolyticus*. L'hydrolysats a été fractionné sur colonne C18 et 2 fractions ont été ainsi obtenues, respectivement à 10% et à 80% d'élution avec l'acétonitrile. L'utilisation de la colonne C18 permet de fractionner la substance selon leur polarité (Defer, 2009). Ainsi, dans la littérature, cette méthode a été largement utilisée lors de fractionnement et de purification des substances antimicrobiennes. On peut citer comme exemple le cas de l'écrevisse (Jiravanichpaisal *et al.*, 2007), de la crevette *Penaeus vannamei* (Destoumieux *et al.*, 1997a, Destoumieux *et al.*, 1999), des crevettes *Pandalus borealis* et *Pagurus bernhardus* ainsi que des crabes *Hyas araneus* et *Paralithodes camtschatica* Tilesius (Haug *et al.*, 2002). Il est bien connu que les peptides à activité antibactérienne possèdent une nature amphiphilique (Fleury *et al.*, 2008). Ils sont alors pour la plupart des cas concentrés dans les éluats générés avec plus de 40% d'acétonitrile. C'est le cas par exemple des peptides antimicrobiens isolés de différentes espèces de mollusque *Cerastoderma edule*, *Ruditapes hilippinarum*, *Crepidula fornicata* et *Buccinum undatum* qui se sont retrouvés dans les fractions obtenues avec 40% et 80% d'élution avec l'acétonitrile, la fraction obtenue à 10% ne présentant pas d'activité (Defer *et al.*, 2009). On peut citer aussi les travaux effectués par Destoumieux *et al.* lors de l'identification des pénaéidines dans l'hémolymphe de la crevette pénaéides *Penaeus vannamei* : la première étape de la purification a été effectuée par chromatographie sur colonne C 18 et l'élution a été réalisée avec de l'acétonitrile à 40% et à 80% (Destoumieux *et al.*, 1997a).

Dans la présente étude, en différence avec les précédentes études effectuées sur les peptides à activité antimicrobienne, l'activité a été retrouvée dans la fraction 10% lors de la chromatographie sur colonne C 18. Ces résultats suggèrent la nature fortement hydrophile et peu hydrophobe de la substance active, ce qui n'est pas en accord avec la nature couramment amphiphilique des PAMs. D'autres substances que des peptides pourraient alors être à l'origine de ces activités : on peut avancer la concentration élevée en sel ainsi que le chitosan qui est rapporté pour posséder une activité antimicrobienne (Kim et al., 2008 ; Rasmussen et Morrissey, 2008). Sur la partie céphalothoracique de crevettes *Pandalus borealis*, les travaux effectués par Haug *et al.* ont également rapporté l'existence d'activité antimicrobienne dans les fractions éluées avec 10% d'acétonitrile lors de chromatographie sur colonne C 18 sur une souche de *Vibrio alginilyticus*. Lors de cette étude, il a été rapporté que le chitosan, constituant l'exosquelette de la crevette pourrait, entre autres, être à l'origine de l'activité identifiée (Haug *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'activité antimicrobienne du chitosan a été étudiée lors de différents travaux. Ainsi, le chitosan obtenu à partir de carapaces de crevette par extraction avec du HCl et du NaOH a montré une activité inhibitrice de la croissance d'*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* après incubation à 37°C pendant 48 heures, et à raison de 2% (Du *et al.*, 2009). L'inhibition des souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus* a été également observée lors d'utilisation de film alimentaire composé de konjac glycomannane, de chitosan et de nisine (Dutta *et al.*, 2009). L'activité antimicrobienne du chitosan est influencée par son poids moléculaire, son degré d'acétylation, ainsi que d'autres facteurs tels que la composition du milieu de culture microbienne (Dutta *et al.*, 2009).

Dans la présente étude, le test sur Gel recouvert des éluats de l'hydrolysate obtenu par chromatographie sur colonne C 18 a permis d'évaluer le poids moléculaire de la substance active à 2 à 3 kDa. Les PAMs amphiphiles avec une α alpha possèdent un poids moléculaire similaire (Fleury et al., 2008). Ce poids moléculaire est également comparable à ceux obtenus par Haug *et al.* (2 kDa à 12 kDa) sur les substances à activités antimicrobiennes chez les crevettes et les crabes (Haug *et al.*, 2002).

5. CONCLUSION

Les hydrolyses de 2 heures conduites sur les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage démontrent une solubilisation de la matière et des protéines légèrement élevée lorsque le pH est maintenu à 2 pendant les hydrolyses. Les teneurs en cendres dans les résidus de lavage sont moins élevées à pH maintenu, ce qui montre une pureté plus élevée de la chitine. Les méthodes d'inactivation par la chaleur ou le pH influent la solubilisation des protéines différemment pour les 2 sortes de têtes de crevette. En effet, la neutralisation par le pH défavorise cette solubilisation pour les têtes de crevette d'élevage qui sont plus riches en lipides par rapport aux têtes de crevette sauvage. Cette solubilisation pourrait être attribuée à l'interaction élevée des complexes lipoprotéines à un pH voisin du point isoélectrique de la protéine. Dans ce chapitre, un essai d'extraction de la chitine dans les culots d'hydrolyse a été effectué. La déprotéinisation et la déminéralisation des carapaces obtenues sont similaires à celles rapportées dans la littérature, par fermentation de co-produits de crevette (Cira *et al.*, 2002 ; Beaney *et al.*, 2005, Rao et Stevens, 2005). On note également une meilleure concentration des acides aminés dans les surnageants lors des hydrolyses de 2 heures avec la Pepsine, comparée à celle effectuée à longue durée, et celles effectuées par croisement d'enzymes.

Les travaux sur l'efficacité nutritionnelle sur modèle de poulets se sont avérés intéressants pour les hydrolysats. Les hydrolysats de têtes de crevettes obtenus avec la Pepsine pourront constituer de bonnes sources nutritionnelles pour les poulets. La digestibilité des différentes fractions de têtes de crevette d'élevage issues de l'hydrolyse avec la pepsine pendant 2 heures est nettement plus élevée par rapport à la matière brute. Les meilleurs résultats sur le gain de poids des poulets sont obtenus avec les fractions d'hydrolyse obtenues par inactivation de la Pepsine par neutralisation. La consommation des fractions acides (obtenues par inactivation de la pepsine par la chaleur) n'est pas élevée, conduisant à des gains de poids moins importants, quoique leurs digestibilités soient intéressantes.

Concernant les activités antimicrobiennes, l'hydrolysat de têtes de crevette d'élevage obtenu avec contrôle du pH et inactivation par la température présente un intérêt particulier. En effet, il présente une activité contre des microorganismes pathogènes aquacoles et des microorganismes alimentaires.

En bref, l'hydrolyse des têtes de crevette avec la Pepsine constitue une voie intéressante pour leur valorisation. Ces hydrolyses permettent en effet la solubilisation de la matière, générant des substances à activité antimicrobienne et améliorant leur digestibilité en

alimentation avicole. D'autre part, elles permettent la déprotéinisation et la déminéralisation des carapaces, favorisant ainsi l'extraction de la chitine. Les meilleurs résultats de solubilisation, d'activité antimicrobienne et de digestibilité pour le poulet sont obtenus avec les hydrolyses à pH contrôlé. L'acidité générée par l'inactivation par la température n'est pas favorable pour l'alimentation des poulets quoique cette mode d'inactivation conduise à la production d'hydrolysats à activités antimicrobiennes.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette étude a été de valoriser les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage de Madagascar. Ainsi, l'hydrolyse enzymatique par addition d'enzymes exogènes a été choisie pour extraire les différentes substances valorisables présentes dans ces co-produits. Deux domaines ont été ensuite exploités pour rechercher des applications des fractions résultantes : l'aviculture traditionnelle et l'activité antimicrobienne.

Dans un premier temps, différentes protéases commerciales, notamment la Pepsine, la Novozym 37020, la Protex 6L et la Delvolase, ont été testées sur des têtes de crevette d'élevage pendant 22 heures, puis les enzymes ont été croisées, pour étudier le comportement des matières premières. Il en ressortait qu'indépendamment de l'enzyme utilisée, l'hydrolyse des têtes de crevette d'élevage conduit à la génération de 2 phases : une phase soluble contenant en majorité les protéines ainsi que les peptides et acides aminés générés au cours de la protéolyse, et une phase insoluble renfermant les résidus de carapaces, la presque totalité des lipides initialement présents dans les têtes de crevette et quelques protéines résiduelles. Les hydrolyses effectuées en milieu alcalin, avec la Delvolase et la Protex 6L améliorent la solubilisation des protéines tandis que celles effectuées en milieu acides favorisent la solubilisation des matières minérales. La pepsine fait exception car elle est favorable aussi bien pour la solubilisation des protéines que celle de la matière minérale. L'analyse des acides aminés contenus dans les hydrolysats a permis de constater que les hydrolyses enzymatiques conduisent à la concentration des acides aminés dans les surnageants, améliorant la qualité des protéines par l'augmentation du pourcentage des acides aminés indispensables et des acides aminés exhausteurs de goût. Si les hydrolyses de longue durée sont plus favorables pour la concentration d'acides aminés exhausteurs de goût, les hydrolyses croisées sont convenables pour la concentration des acides aminés indispensables. Les hydrolysats issus d'hydrolyses croisées possèdent également un pourcentage de peptides de petite taille légèrement supérieur à ceux obtenus par hydrolyse de longue durée. Autrement, la solubilisation de la matière est similaire avec celle obtenue lors d'hydrolyse de longue durée. L'hydrolyse du culot obtenu avec la pepsine conduit à une solubilisation minimale de la matière et des protéines, ce qui indique que la matière est presque totalement hydrolysée lors du

traitement avec la Pepsine pendant 2 heures. Pour toutes ces raisons, la Pepsine est choisie pour effectuer les hydrolyses des têtes de crevette d'élevage et de têtes de crevette sauvage.

Le deuxième chapitre du travail concerne l'optimisation de l'hydrolyse avec la Pepsine et la valorisation des fractions résultantes par la recherche d'application en alimentation avicole traditionnelle malgache et la recherche d'activité antimicrobienne. Ainsi, des hydrolyses sont effectuées sur les têtes de crevette d'élevage et les têtes de crevette sauvage pendant 2 heures avec la Pepsine, d'une part en laissant le pH évoluer librement, et d'autre part en maintenant le pH à 2. Deux méthodes d'inactivation sont testées pour chaque hydrolyse : la température et le pH. Dans ce chapitre, les culots d'hydrolyse ont été soumis à des lavages pour séparer les autres constituants des carapaces qui contiennent la chitine.

Il découlait de ces expériences que la solubilisation de la matière et des protéines est légèrement améliorée par le contrôle du pH pendant l'hydrolyse. Par contre, les méthodes d'inactivation par la température ou le pH ne semblent pas affecter la répartition des substances et la composition des fractions finales. Les résidus de carapaces obtenus lors des hydrolyses possèdent des teneurs en protéines et en matières minérales faibles. Cette déprotéinisation et déminéralisation des carapaces sont améliorées nettement lors des hydrolyses à pH contrôlé.

En ce qui concerne les tests sur l'alimentation avicole, toutes les fractions résultantes des hydrolyses pepsiques possèdent une digestibilité nettement améliorée par rapport à la matière brute. Le gain de poids des poulets soumis à l'alimentation enrichie en dérivés de têtes de crevette est supérieur à ceux élevés selon le mode traditionnel. Cependant, les fractions obtenues par inactivation de la Pepsine par la température ne conduisent pas à un gain de poids supérieur à ceux alimentés avec les matières brutes. Ceci résulte de l'acidité de ces fractions qui provoque une faible consommation par les poulets. La fraction la plus efficace dans l'amélioration de l'alimentation avicole est le surnageant de têtes de crevette d'élevage obtenu à pH contrôlé et avec inactivation par le pH, avec une obtention d'un gain de poids moyen quotidien d'environ 20 g.

Des activités antimicrobiennes contre des souches de microorganismes alimentaires et des souches de microorganismes pathogènes aquacoles sont identifiées chez le surnageant de têtes de crevette d'élevage issu d'hydrolyse de 2 heures avec la Pepsine, avec contrôle du pH et par inactivation par la température.

En comparant les résultats obtenus au cours de cette étude, on peut constater que l'hydrolyse enzymatique des têtes de crevette de Madagascar constitue une voie intéressante

pour leur valorisation. En plus d'améliorer leur qualité nutritionnelle par la concentration des acides aminés dans la fraction soluble, elle conduit à la déprotéinisation et la déminéralisation partielle des carapaces, qui est favorable pour l'extraction de la chitine. L'hydrolyse à pH maintenu à 2 pendant 2 heures avec la Pepsine est prometteuse car elle permet l'obtention de surnageant efficace pour l'amélioration de l'alimentation avicole, et elle présente une activité antimicrobienne. Ces conditions d'hydrolyse conduit également à la génération de résidus de carapaces moins chargés en protéines (5% de la matière sèche) par rapport aux autres hydrolyses. Les résidus de carapaces résultants possèdent une teneur en protéines de 5,54% à 10,76%, une teneur en cendres de 4,28% à 5,66% et une teneur en lipides de 10,01% à 22,28% de la matière sèche. Ces teneurs sont intéressantes pour l'extraction de la chitine, les lipides pouvant être éliminés par traitement avec du solvant organique. Le surnageant issu des mêmes conditions d'hydrolyses avec inactivation de la pepsine par la température, présente des activités antimicrobiennes et l'eau de lavage possède une grande digestibilité pour les poulets. Cependant, la ration formulée avec cette fraction d'eau de lavage ne présente pas beaucoup d'appétence. L'addition d'un facteur d'appétence serait donc intéressante pour optimiser leur efficacité en aviculture traditionnelle.

PERSPECTIVES

Ce travail est loin d'être exhaustif, ainsi nos perspectives portent sur :

- L'étude de l'astaxanthine qui est une molécule à haute valeur ajoutée pouvant être extraite des têtes de crevette et qui possède des intérêts en aquaculture .
- L'étude de la possibilité d'extraction de la chitine par hydrolyse enzymatique, ses dérivés étant également des molécules d'intérêt dans plusieurs domaines.
- L'exploitation d'autres activités biologiques, vu que les hydrolysats obtenus au cours de cette étude possèdent des peptides de petite taille, potentielle source d'activités biologiques.
- L'identification et la purification de la molécule antimicrobienne active générée lors de l'hydrolyse pepsique des têtes de crevette d'élevage.
- La recherche de substances allergisantes et de peptides amers pour des utilisations éventuelles en alimentation humaine.
- La conduite d'hydrolyse enzymatique en présence de protéase et de lipase.
- Le transfert de ces techniques à grande échelle étant donné que les produits dérivés obtenus possèdent une valeur marchande élevée.
- L'approfondissement de la recherche en alimentation avicole et la recherche d'autres applications en alimentation animale telle que l'aquaculture

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDUL-HAMID, A., BAKAR, J., BEE, G.H.. 2002. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chemistry*, 78, 69-74.
- ADLER-NISSEN, J., 1977. Enzymic hydrolysis of food proteins. *Process Biochemistry*, 12, 18-19.
- ADLER-NISSEN J.,1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; 27, 12.
- ADLER-NISSEN, J., 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, N.Y., U.S.A..
- AMICHE, M., SEON, A.A., WROBLEWSKI, H., NICOLAS, P., 2000. Isolation of dermatoxin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a novel member of the dermaseptin genes family. *European Journal of Biochemistry*, 267, 4583-4592.
- ANDRIEUX G., 2004 . La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture: état des lieux et analyse. Etudes de l'Ofimer, pp 63.
- ANEIROS, A., GARATEIX, A., 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*, 803, 41-53.
- AOAC, 2005. Official methods of analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- APRIA, 1979. Microbiologie et industries alimentaire: Production de nucleotides, d'arômes, d'enzymes et d'autres corps spécifiques par les microorganismes. Tome 3. APRIA Ed., Paris. pp 162.
- ARCHER, M.R.; RUSSEL, D., 2007. Crustacea processing waste management. SEAFISH Research and Development, United Kingdom, pp. 23.
- ARMENTA-LOPEZ, R. ; GUERRERO, I. ; HUERTA, S., 2002. Astaxanthin extraction from shrimp waste by lactic fermentation and enzymatic hydrolysis of the carotenoprotein complex. *Journal of Food Science*, 67, 1002-1006.
- ARMENTA, R.E.; GUERRERO-LEGARRETA, I., 2009. Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry*, 112, 310-315.

- ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H., 2005. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochemistry*, 40, 3714-3722.
- ASPMO, S.I.; HORN, S.J.H.; EIJSINK, V.G.H., 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40, 1957-1966.
- BABU, C.M.; CHAKRABARTI, R.; SURYA SAMBASIVARAO, K.R., 2008. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 227-235.
- BALD, C.; AURREKOETEXA, G.; PERERA, N.; GARTZIA, I.; AGUIRRE, P.; BOUJARD, T.; KAUSHIK, S., 2004. Essai d'utilisation de déchets de thons pour la fabrication d'aliments pour poissons. *Dossier de l'environnement de l'INRA*, 26-31.
- BALS, R., 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infections. *Respiratory Research*, 1, 141-150.
- BEANEY, P.; LIZARDI-MENDOZA, J.; HEALY, M., 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 145-150.
- BEAULIEU, L.; THIBODEAU, J.; BRYL, P.; CARBONNEAU, M.-É., 2009. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: A source of high-valued biomolecules. *Bioresource Technology*, 100, 3332-3342.
- BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M.T.; 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3423-3430.
- BENTINGER M.; BRISMAR K.; DALLNER G., 2007 The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7S :S41–S50.
- BHASKAR, N.; SURESH, P.V.; SAKHARE, P.Z.; SACHINDRA, N.M., 2007. Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1427-1434.
- BHATNAGAR, A.; SILLANPAA, N., 2009. Applications of chitin and chitosan-derivates for the detoxification of water and wastewater. A review. *Advances in colloid and interface science*, 152.

- BIRKEMO, G.A.; LUDERS, T.; ANDERSEN, O.; NES, I.F.; NISSEN-MEYER, J., 2003. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1646 : 207-215.
- BLUM, J.-C., 1984. L'alimentation des animaux monogastriques. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- BOCQUET, J., 1982. Généralités sur les microorganismes, in « Biotechnologie », R. Scriban Ed. Paris, Lavoisier. Partie II, 15-55.
- BOMAN, H.G., AGERBERTH, B., BOMAN, A., 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity*, 61, 2978- 2984.
- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., 2001. Total Lipid, Cholesterol, and Fatty Acids of Farmed Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and Wild Marine Shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 359-369.
- BUENO-SOLANO, C.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; CAMPAS-BAYPOLI, O.N.; LAUTERIO-GARCÍA, R.; ADAN-BANTE, N.P.; SÁNCHEZ-MACHADO, D.I., 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112, 671-675.
- BULET, P., HETRU, C., DIMARCQ, J.-L., HOFFMANN, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 23, 329-344.
- BULET, P., STÖCKLIN, R., MENIN, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 169-184.
- CALADO, R.; FIGUEIREDO, J.; ROSA, R.; NUNES, M.L.; NARCISO, L., 2005. Effects of temperature, density, and diet on development, survival, settlement synchronism, and fatty acid profile of the ornamental shrimp *Lysmata seticaudata*. *Aquaculture*, 245, 221-237.
- CAMPAGNA, S.; SAINT, N.; MOLLE, G. ; AUMELAS, A., 2007. Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry*, 46 : 1771-1778.
- CAO, W.; ZHANG, C.; HONG, P.; JI, H., 2008. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chemistry*, 109, 176-183.

- CAO, W.; ZHANG, C.; HONG, P.; JI, H.; HAO, J.; ZHANG, J., 2009. Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 244-249.
- CASTEELS, P., AMPE, C., RIVIERE, L., DAMME, J., ELICONE, C., FLEMING, M., JACOBS, F., TEMPST, P., 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187, 381-386.
- CHABOUD, C.; DOMALAIN, G.; RASOANANDRASANA, N. ; TIANDRAZA, A., 2002. Aperçu de 'exploitation et de ses contextes. In « La ruée vers l'or rose. Regards croisés sur l'exploitation crevette traditionnelle malgache ». Geodefroit, S. ; Chaboud, G ; Breton, Y. Ed. IRD. Latitude, 23, 36-56.
- CHAN, D.I., PRENNER, E.J., VOGEL, H.J., 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1758, 1184-1202.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L; LORIENT, D., 1985. Protéines alimentaires. Tec. et Doc. ed.. Paris. pp 309.
- CIRA, L.A.; HUERTA, S.; HALL, G.M.; SHIRAI, K., 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37, 1359-1366.
- COLE, A.M.; WEIS, P.; DIAMOND, G., 1997. Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 12008-12013.
- COWARD-KELLY, G., AGBOGBO, F.K., HOLTZAPPLE, M.T., 2006. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. *Bioresource Technology*, 97, 1515-1520.
- CREMADES, O. ; PARRADO, J. ; ALVAREZ-OSSORIO, M.-C. ; JOVER, M. ; COLLANTES DE TERÁN, L. ; GUTIERREZ, J.F. ; BAUTISTA, J., 2003. Isolation and characterization of carotenoproteins from crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chemistry*, 82, 559-566.
- CROOKE, W.M.; SIMPSON, W.E., 1971. Determination of ammonium in Kjeldhal digests of crops by an automated procedure. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 22, 9-&.

- CSORDAS, A.; MICHL, H., 1970. Isolation and structural resolution of a haemolytically active polypeptide from the immune secretion of a European toad. *Monatshefte für Chemie*, 101, 182-189.
- CUDENNEC, B., RAVALLEC-PLÉ, R., COUROIS, E., FOUCHEREAU-PERON, M., 2008. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111, 970-975.
- CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S., 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics*, 54, 442-445.
- CUTHBERTSON, B. J.; YANG, Y.; BACHERE, E.; BULLESBACH, E. E.; GROSS, P. S.; AUMELAS, A., 2005. Solution Structure of Synthetic Penaeidin-4 with Structural and Functional Comparisons with Penaeidin-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 : 16009-16018.
- DA SILVA, P., JOUVENSAL, L., LAMBERTY, M., BULET, P., CAILLE, A., VOVELLE, F., 2003. Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite *Pseudacanthotermes spiniger*. *Protein Science*, 12, 438-446.
- DAFFRE, S., BULET, P., SPISNI, A., EHRET-SABATIER, L., RODRIGUES, E.G., TRAVASSOS, L.R., 2008. Bioactive natural peptides. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35, 597-691.
- DAUKSAS, E.; FALCH, E.; SLIZYTE, R.; RUSTAD, T., 2005. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40, 2659-2670.
- DEFER, D., BOURGOUGNON, N., FLEURY, Y., 2009. Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture*, 293, 1-7.
- DEFER, D., 2009. Recherche d'activités antimicrobiennes chez les mollusques marins. Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir d'hémolymphe de *Cassostrea gigas* et de bactéries associés. Ecole doctorale SICMA. Université de Bretagne Sud, pp 245.
- DE SOUZA BEZERRA, R.; ABADIE-GUEDES, R.; MELO, F.R.M.; PAIVA, A.M.D.A.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, Â.; GUEDES, R.C.A., 2005. Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression. *Neuroscience Letters*, 391, 51-55.

- DESTOUMIEUX, D. ; BULET, P. ; LOEW, D. ; VANDORSSELAER, A. ; RODRIGUEZ, J. ; BACHERE, E., 1997a. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28398-28406.
- DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; RODRIGUEZ, J. ; BACHERE, E., 1997b. The antimicrobial defense of penaeid crustaceans: characterization of a new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei*. *Development and Comparative Immunology*, 21 : 206.
- DESTOUMIEUX, D., BULET, P., STRUB, J.M., VAN DORSSELAER, A., BACHERE, E., 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 266, 335-346.
- DESTOUMIEUX-GARZON, D. ; SAULNIER, D. ; GARNIER, J. ; JOUFFREY, C. ; BULET, P. ; BACHERE, E., 2001. Crustacean immunity - Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 47070-47077.
- DI MARIO, F. ; RAPANÀ, P. ; TOMATI, U. ; GALLI, E., 2008. Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 8-12.
- DOUGLAS, S. E.; GALLANT, J. W.; GONG, Z.; HEW, C., 2001. Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Development and Comparative Immunology*, 25 : 137-147.
- DOUGLAS, S. E.; PATRZYKAT, A.; PYTYCK, J.; GALLANT, J. W., 2003. Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *European Journal of Biochemistry*, 270 : 3720-3730.
- DU, Y. ; ZHAO, Y. ; DAI, S. ; YANG, B., 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, In Press, Corrected Proof.
- DUMAY, J., 2006. Extraction de lipides par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: Application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*) Ecole doctorale Mécanique, Thermique et Génie civil de Nantes. Université de Nantes, pp. 306.

- DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGÉ, J.P., 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41, 2327-2332.
- DUPIN, H.; CUQ, J.L.; MALEWIAK, M.I.; LEYNAUD-ROUAUD, C.; BERTIER, A.M., 1992. Alimentation et nutrition humaines. ESF ed. Paris. pp 1533.
- DUQUESNE, S., DESTOUMIEUX-GARZON, D., PEDUZZI, J., REBUFFAT, S., 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, 24, 708-734.
- DUTTA, P.K. ; TRIPATHI, S. ; MEHROTRA, G.K. ; DUTTA, J., 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- EVERS, D.J.; CARROLL, D.J., 1998. Ensiling salt-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. *Animal Feed Science and Technology*, 71, 241-249.
- EUZÉBY, J.P., 2000. Dictionnaire de biologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacterio/index.html>.
- FAGBENRO, O.A.; BELLO-OLUSOJI, O.A., 1997. Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. *Food Chemistry*, 60, 489-493.
- FAITHONG, N.; BENJAKUL, S.; PHATCHARAT, S.; BINSAN, W., 2010. Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. *Food Chemistry*, 119, 133-140.
- FALCH, E.; RUSTAD, T.; JONSDOTTIR, R.; SHAW, N.B.; DUMAY, J.; BERGÉ, J.P.,; ARASON, S.; KERRY, J.P.; SANDBAKK, M.; AURSAND, M., 2006. Geographical and seasonal differences in lipid composition and relative weight of by-products from gadiform species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 727-736.
- FANIMO, A.O.; ODUGUWA, O.O.; ONIFADE, A.O.; OLUTUNDE, T.O., 2000. Protein quality of shrimp-waste meal. *Bioresource Technology*, 72, 185-188.
- FANIMO, A.O.; ODUGUWA, B.O.; ODUGUWA, O.O.; AJASA, O.Y.; JEGEDE, O., 2004. Feeding value of shrimp meal for growing pigs. *Archivos de Zootecnia*, 53.
- FANIMO, A.O.; SUSENBETH, A.; SÜDEKUM, K.H., 2006. Protein utilisation, lysine bioavailability and nutrient digestibility of shrimp meal in growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 129, 196-209.
- FAO, 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. in: F.F.a.A. Department (Ed.), Rome.

- FAOSTAT, 2009. FAO Statistical Databases, Food and Agricultural Organisation of the United Nations.
- FERNANDES, J. M. O.; MOLLE, G.; KEMP, G. D. ; SMITH, V. J., 2004. Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Development and Comparative Immunology*, 28 : 127-138.
- FERRER, J., PAEZ, G., MARMOL, Z., RAMONES, E., GARCIA, H., FORSTER, C.F., 1996. Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresource Technology*, 57, 55-60.
- FLEURY, Y., DEFER, D., BOURGOUGNON, N., 2008. Antimicrobial peptides and antiviral activities from marine fished or farmed animals, in “Added Value to Fisheries Waste”, J.P. Bergé Ed., *Transworld Research Network – Indian publisher*. Chapter 8, 163-196.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- GBOGOURI, G.A. ; LINDER, M. ; FANNI, J. ; PARMENTIER, M., 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69, C615-C622.
- GERNAT, A.G., 2001. The effect of using different levels of shrimp meals in laying hen diets. *Poultry Science*, 80, 633-636.
- GIBERT, O.; RAKSHIT, S.K., 2005. Cassava starch snack formulation using functional shell fish by-products: mechanical, sorption and geometric properties. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85, 1938-1946.
- GILDBERG, A.; STENBERG, E., 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36, 809-812.
- GILLET, R., 2008. Global study of shrimp fisheries. FAO, Rome, pp 331.
- GILLOR, O., KIRKUP, B.C., RILEY, M.A., ALLEN I. LASKIN, J.W.B.a.G.M.G., 2004. Colicins and Microcins: The Next Generation Antimicrobials, *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 129-146.

- GORAYA, J., KNOOP, F.C., CONLON, J.M., 1999. Ranatuerin 1T: an antimicrobial peptide isolated from the skin of the frog, *Rana temporaria*. *Peptides*, 20:159-160.
- GOYTORTÚA-BORES, E.; CIVERA-CERECEDO, R.; ROCHA-MEZA, S.; GREEN-YEE, A., 2006. Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*, 256, 414-422.
- GUEGUEN, Y.; GARNIER, J.; ROBERT, L.; LEFRANC, M.-P.; MOUGENOT, I.; DE LORGERIL, J.; JANECH, M.; GROSS, P.S.; WARR, G.W.; CUTHBERTSON, B.; BARRACCO, M.A.; BULET, P.; AUMELAS, A.; YANG, Y.; BO, D.; XIANG, J.; TASSANAKAJON, A.; PIQUEMAL, D.; BACHÈRE, E., 2006. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 283-288.
- 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.
- GUÉRARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 489-498.
- GUÉRARD, F. ; SUMAYA-MARTINEZ, M.T. ; LAROQUE, D. ; CHABEAUD, A. ; DUFOSSÉ, L., 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42, 1486-1491.
- GUEST, G.M; RAPOPRT, S., 1939. Role of acid-soluble phosphorus compounds in red blood cells. *American Journal of disease of Children*, 58, 1072-1089.
- HAN, T.; AYE, K.N.; NWE, N., 2008. Production and effectiveness of SMART® organic fertilizer from marine biowastes. *Journal of Biotechnology*, 136, S590-S590.
- HANDAYANI, A.D.; SUTRISNO; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S., 2008. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Penaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresource Technology*, 99, 4414-4419.
- HARA, S.; YAMAKAWA, M., 1995. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical Journal*, 310, 651-656.

- HARTMANN, R.; MEISEL, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- HAUG, T.; KJUUL, A.K.; STENSVÅG, K.; SANDSDALEN, E.; STYRVOLD, O.B., 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology*, 12, 371-385.
- HAUTON, C.; BROCKTON, V.; SMITH, V.J., 2006. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. *Molecular Immunology*, 43, 1490-1496.
- HE, H.; CHEN, X.; SUN, C.; ZHANG, Y.; GAO, P., 2006. Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technology*, 97, 385-390.
- HE, H.-L., CHEN, X.-L., WU, H., SUN, C.-Y., ZHANG, Y.-Z., ZHOU, B.-C., 2007. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology*, 98, 3499-3505.
- HE, H.L., WU, H., CHEN, X.L., SHI, M., ZHANG, X.Y., SUN, C.Y., ZHANG, Y.Z., ZHOU, B.C., 2008. Pilot and plant scaled production of ACE inhibitory hydrolysates from *Acetes chinensis* and its in vivo antihypertensive effect. *Bioresource Technology*, 99, 5956-5959.
- HEALY, M.; GREEN, A.; HEALY, A., 2003. Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnologica*, 23, 151-160.
- HEIDMANN-SOCCOL, M.C.; OETTERER, M.; ROSA-GALLO, C.; FILLET-SPOTO, M.H.; OLIVEIRA-BIATO, D., 2005. Effects of modified atmosphere and vacuum on the shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8.
- HERBINIERE, J., BRAQUART-VARNIER, C., GREVE, P., STRUB, J.-M., FRERE, J., VAN DORSSELAER, A., MARTIN, G., 2005. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Developmental and Comparative Immunology*, 29, 489-499.

- HEU, M.-S.; KIM, J.-S.; SHAHIDI, F., 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82, 235-242.
- HOFMAN, A., 2000. Amélioration de l'aviculture traditionnelle aux Iles Comores. Impact de la claustration et de la complémentation en provende locale sur la productivité de la volaille locale. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Liège, Liège, pp. 71.
- HOISCHEN, D. ; COLMENARES, L.U. ; LIU, J. ; SIMMONS, C.J. ; BRITTON, G. ; LIU, R.S.H., 1998. Fluorinated Analogs of the Carotenoprotein, [alpha]-Crustacyanin. *Bioorganic Chemistry*, 26, 365-374.
- HOLAK, T.A., ENGSTRÖM, A., KRAULIS, P.J., LINDEBERG, G., BENNICHI, H., JONES, T.A., GRONENBORN, A.M., CLORE, G.M., 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*, 27, 7620- 7629.
- HOOVER, D.M., RAJASHANKAR, K.R., BLUMENTHAL, R., PURI, A., OPPENHEIM, J.J., CHERTOV, O., LUBKOWSKI, J., 2000. The Structure of Human beta - Defensin-2 Shows Evidence of Higher Order Oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 32911-32918.
- IBRAHIM, H.M.; SALAMA, M.F.; EL-BANNA, H.A., 1999. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung*, 43.
- IJIMA, N., TANIMOTO, N., EMOTO, Y., MORITA, Y., UEMATSU, K., MURAKAMI, T., NAKAI, T., 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysophsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *FEBS Journal*, 270, 675-686.
- ILANKOVAN, P.; HEIN, S.; NG, C.-H.; TRUNG, T.S.; STEVENS, W.F., 2006. Production of N-acetyl chitobiose from various chitin substrates using commercial enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 63, 245-250.
- IMM, J.Y.; LEE, C.M., 1999. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47.
- INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF FATTY ACIDS AND LIPIDS (ISSFAL), July 2004. Recommendations for dietary intake of polyunsaturated fatty acids in healthy adults.. (www.issfal.org.uk).
- IWAI, H., NAKAJIMA, Y., NATORI, S., ARATA, Y., SHIMADA, I., 1993. Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by 1H-NMR. *European Journal of Biochemistry*, 217, 639-644.

- JACK, R.W.; JUNG, G., 2000. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 310-317.
- JE, J.Y.; PARK, P.J.; KWON, J.Y.; KIM, S.K., 2004. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from *Alaska pollack (Theragra chalcogramma)* frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52.
- JE, J.Y.; KIM, S.Y.; KIM, S.K., 2005. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. *European Food Research and Technology*, 221.
- JE, J.-Y.; QIAN, Z.-J.; BYUN, H.-G.; KIM, S.-K., 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840-846.
- JENSSEN, H., HAMILL, P., HANCOCK, R.E.W., 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 491-511.
- JEON, Y.-J., BYUN, H.-G., KIM, S.-K., 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35, 471-478.
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, S.Y.; KIM, Y.-A.; ANDRÉN, T.; SÖDERHÄLL, I., 2007. Antibacterial peptides in haemocytes and haematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Developmental & Comparative Immunology*, 31, 441-455.
- JO, G.H.; JUNG, W.J.; KUK, J.H.; OH, K.T.; KIM, Y.J.; PARK, R.D., 2008. Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. *Carbohydrate Polymers*, 74, 504-508.
- JOHNSON, H.M., 2002. Perspectives de marché dans le secteur international du poisson et des fruits de mer. Autres produits/usages et questions de salubrité alimentaire. Bureau du Commissaire au développement de l'aquaculture.
- JUN, S.Y.; PARK, P.J.; JUNG, W.K.; KIM, S.K., 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219.
- JUNG, W.-K., PARK, P.-J., BYUN, H.-G., MOON, S.-H., KIM, S.-K., 2005. Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91, 333-340.

- JUNG, W.-K.; KARAWITA, R.; HEO, S.-J.; LEE, B.-J.; KIM, S.-K.; JEON, Y.-J., 2006. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41, 2097-2100.
- JUNG, W.K.; KIM, S.K., 2007. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *European Food Research and Technology*, 224.
- JUNG, W.K.; SHAHIDI, F.; KIM, S.K., 2008. Calcium from fish bone and other marine resources. In: C.S.F. Barrow (Ed.) Marine nutraceuticals and functional foods. *Nutraceutical Science and Technology*, New York, pp. 419-429.
- JUNG NIM, P.; ISHIDA, K.; WATANABE, T.; ENDOH, K.; WATANABE, K.; MURAKAMI, M.; ABE, H., 2002. Taste effects of oligopeptides in a Vietnamese fish sauce. *Fisheries Science*, 68.
- KANG, C.-J.; WANG, J.-X.; ZHAO, X.-F.; YANG, X.-M.; SHAO, H.-L.; XIANG, J.-H., 2004. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaedin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16, 513-525.
- KARAKOLTSIDIS, P.A. ; ZOTOS, A. ; CONSTANTINIDES, S.M., 1995. Composition of the Commercially Important Mediterranean Finfish, Crustaceans, and Molluscs. *Journal of Food Composition and Analysis*, 8, 258-273.
- KECHAOU, E.S.; DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU J.-P.; BERGÉ, J.-P.; AMAR, R.B., 2009. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 158-164.
- KHOO, L.; ROBINETTE, D.W.; NOGA, E.J., 1999. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Marine Biotechnology*, 1, 44-51.
- KIM, S.-Y., JE, J.-Y., KIM, S.-K., 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 31-38.
- KIM, J.S.; SHAHIDI, F.; HEU, M.S., 2003. Characteristics of salt-fermented sauces from shrimp processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 784-792.

- KIM, J.-S.; SHAHIDI, F.; HEU, M.-S., 2005. Tenderization of meat by salt-fermented sauce from shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 93, 243-249.
- KIM, S.K.; MENDIS, E.; SHAHIDI, F., 2008a. Marine fisheries by-products as potential nutraceuticals: an overview. In: C.S.F. Barrow (Ed.) *Marine nutraceuticals and functional foods*. Nutraceutical Science and Technology, New York, pp. 1-22.
- KIM, S.K.; RAJAPAKSE, N.; SHAHIDI, F., 2008b. Production of bioactive chitosan oligosaccharides and their potential use as nutraceuticals. In: C.S. Barrow, F (Ed.) *Marine nutraceuticals and functional foods*. Nutraceutical Science and Technology, New York, pp. 183- 196.
- KJARTANSSON, G.T.; ZIVANOVIC, S.; KRISTBERGSSON, K.; WEISS, J., 2006. Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54.
- KOKO, M.; MAMINIAINA, O.F.; RAVAOMANANA, J.; RAKOTONINDRINA, S.J., 2002. Aviculture villageoise à Madagascar: Productivité et situation épidémiologique. Characteristics and parameters of family poultry production in Africa, pp. 47-63.
- KOKO, M. ; MAMINIAINA, O.F. ; RAVAOMANANA, J. ; RAKOTONINDRINA, S.J., 2004. Aviculture villageoise à Madagascar: Productivité et performance de croissance. IAEA ed. In: IAEA (Ed.) *Improving farmyard poultry production in Africa: Interventions and their economic assessment*, Viennes, pp. 135-145.
- KOKRYAKOV, V.N., HARWIG, S.S.L., PANYUTICH, E.A., SHEVCHENKO, A.A., ALESHINA, G.M., SHAMOVA, O.V., KORNEVA, H.A., LEHRER, R.I., 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Letters*, 327, 231-236.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLA, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T., 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 307-319.
- KRIS-ETHERTON P.M.; HARRIS W.S.; APPEL L.J., 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106:2747–2757.
- KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 43-81.

- KUMAR, M.; MUZZARELLI, R.A.A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A.J., 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104, 6017-6084.
- LAEDERACH, A., ANDREOTTI, A.H., FULTON, D.B., 2002. Solution and Micelle-Bound Structures of Tachyplesin I and Its Active Aromatic Linear Derivatives. *Biochemistry*, 41, 12359-12368.
- LAINING, A.; RACHMANSYAH; AHMAD, T.; WILLIAMS, K., 2003. Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture*, 218, 529-538.
- LAMBERT, J., KEPPI, E., DIMARCQ, J.L., WICKER, C., REICHHART, J.M., DUNBAR, B., LEPAGE, P., VAN DORSSELAER, A., HOFFMANN, J., FOTHERGILL, J., 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 262-266.
- LANDON, C., VOVELLE, F., SODANO, P., PAJON, A., 2000. The active site of drosomycin, a small insect antifungal protein, delineated by comparison with the modeled structure of Rs-AFP2, a plant antifungal protein. *Journal of Peptide Research*, 56, 231-238.
- LARBIER, M. ; LECLERCQ, B., 1992. Nutrition et alimentation des volailles. INRA Ed. Paris. pp 355.
- LAURENT, L., 1991. Eléments minéraux, in "Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Tome 4", J-L. Multon Ed., Lavoisier, Paris. p79-96.
- LAUTH, X.; SHIKE, H.; BURNS, J.C.; WESTERMAN, M.E.; OSTLAND, V.E.; CARLBERG, J.M.; VAN OLST, J.C.; NIZET, V.; TAYLOR, S.W.; SHIMIZU, C.; BULET, P., 2002. Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass. *Journal of Biological Chemistry*, 277 : 5030-5039.
- LEE, I.H., CHO, Y., LEHRER, R.I., 1997a. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*, 65, 2898-2903.
- LEE, I.H., CHO, Y., LEHRER, R.I., 1997b. Styelins, Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides from the Solitary Tunicate, *Styela clava*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118, 515-521.

- LEE, S.H.; ROH., S K.; PARK, K. H.; YOON, K R., 1999. Effective extraction of astaxanthin pigment from shrimp using proteolytic enzymes. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 4, 199- 204.
- LEE, I.H., ZHAO, C., NGUYEN, T., MENZEL, L., WARING, A.J., LEHRER, R.I., SHERMAN, M.A., 2001. Clavaspirin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *Journal of Peptide Research*, 58, 445-456.
- LEE, S. Y.; LEE, B. L.; SODERHALL, K., 2003. Processing of an Antibacterial Peptide from Hemocyanin of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 278 : 7927-7933.
- LEE, C.G.; DA SILVA, C.A.; LEE, J.-Y.; HARTL, D.; ELIAS, J.A., 2008. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Current Opinion in Immunology*, 20, 684-689.
- LEÓN H.; SHIBATA M.C. ; SIVAKUMARAN, S. ; DORGAN, M. ; CHATTERLEY, T. ; TSUYUKI, R.T., 2008. Effect of fish oil on arrhythmias and mortality: systematic review. *BMJ*. (23);337:a2931.
- LI, P.; WANG, X.; HARDY, R.W.; GATLIN, D.M., 2004. Nutritional value of fisheries by-catch and by-product meals in the diet of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 236, 485-496.
- LI, C.; HAUG, T.; STYRVOLD, O.B.; JØRGENSEN, T.Ø.; STENSVÅG, K., 2008. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32, 1430-1440.
- LIAN, P.Z.; LEE, C.M.; PARK, E., 2005. Characterization of squid-processing byproduct hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53.
- LIASET, B.; LIED, E.; ESPE, M., 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80, 581- 589.
- LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M., 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex(TM) protease. *Process Biochemistry*, 37, 1263-1269.

- LIASET, B. ; JULSHAMN, K. ; ESPE, M., 2003. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex(TM). *Process Biochemistry*, 38, 1747-1759.
- LICEAGA-GESUALDO, A.M.; LI-CHAN, E.C.Y., 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64, 1000-1004.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- LUDERS, T.; BIRKEMO, G.A.; NISSEN-MEYER, J.; ANDERSEN, O.; NES, I.F., 2005. Proline Conformation-Dependent Antimicrobial Activity of a Proline-Rich Histone H1 N-Terminal Peptide Fragment Isolated from the Skin Mucus of Atlantic Salmon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 : 2399-2406.
- LUZIA, L.A. ; SAMPAIO, G.R. ; CASTELLUCCI, C.M.N. ; TORRES, E.A.F.S., 2003. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, 83, 93-97.
- MACKINTOSH, J.A., VEAL, D.A., BEATTIE, A.J., GOOLEY, A.A., 1998. Isolation from an Ant *Myrmecia gulosa* of Two Inducible O-Glycosylated Proline-rich Antibacterial Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 6139-6143.
- MANDARD, N., SODANO, P., LABBE, H., BONMATIN, J.M., BULET, P., HETRU, C., PTAK, M., VOVELLE, F., 1998. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *European Journal of Biochemistry*, 256, 404-410.
- MANDARD, N., SY, D., MAUFRAIS, C., BONMATIN, J.M., BULET, P., HETRU, C., VOVELLE, F., 1999. Androctonin, a Novel Antimicrobial Peptide from Scorpion *Androctonus Australis*: Solution Structure and Molecular Dynamics Simulations in the Presence of a Lipid Monolayer. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 17, 367-380.
- MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J.,2001. Coenzymes Q9 and Q10: Contents in Foods and Dietary Intake. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14:409-417.
- MISSION ECONOMIQUE DE TANANARIVE, 2008. Le secteur halieutique à Madagascar. UBIFRANCE, pp 4.

- MIYATA, T., TOKUNAGA, F., YONEYA, T., YOSHIKAWA, K., IWANAGA, S., NIWA, M., TAKAO, T., SHIMONISHI, Y., 1989. Antimicrobial Peptides, Isolated from Horseshoe Crab Hemocytes, Tachyplesin II, and Polyphemusins I and II: Chemical Structures and Biological Activity. *Journal of Biochemistry*, 106, 663-668.
- MOR, A., AMICHE, M., NICOLAS, P., 1994. Structure, synthesis, and activity of Dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*, 33, 6642-6650.
- MORGANTI, P.; MORGANTI, G., 2008. Chitin nanofibrils for advanced cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology*, 26, 334-340.
- MORIKAWA, N., HAGIWARA, K., NAKAJIMA, T., 1992. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189, 184-190.
- MORRIS, S.; VAN, A. W. J.; AHERN, M. D., 2005. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia. *Aquatic Toxicology*, 75, 16-31.
- MUNOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; SAULNIER, D.; BACHERE, E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 269, 2678-2689.
- MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; GARNIER, J.; GUEGUEN, Y.; BULET, P., SAULNIER, D.; BACHÈRE, E., 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 961-972.
- MUTA, T., FUJIMOTO, T., NAKAJIMA, H., IWANAGA, S., 1990. Tachyplesins Isolated from Hemocytes of Southeast Asian Horseshoe Crabs (*Carcinoscorpius rotundicauda* and *Tachypleus gigas*): Identification of a New Tachyplesin, Tachyplesin III, and a Processing Intermediate of Its Precursor. *Journal of Biochemistry*, 108, 261-266.
- NAKAJIMA, K.; YOSHIE-STARK, Y.; OGUSHI, M., 2009. Comparison of ACE inhibitory and DPPH scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chemistry*, 114, 844- 851.
- NGO, D.-N.; LEE, S.-H.; KIM, M.-M.; KIM, S.-K., 2009. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. *Journal of Functional Foods*, 1, 188-198.

- NGUYEN, T.M.H., 2009. Valorisation de matières premières marines de faible valeur ajoutée: Application aux co-produits de thons. Université de Nantes, Nantes, pp. 192.
- NORMAH, I.; JAMILAH, B.; SAARI, N.; CHE-MAN-YAAKOB, B., 2005. Optimization of hydrolysis conditions for the production of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by alcalase. *Journal of Muscle Foods*, 16.
- ODUGUWA, O.O.F.; A. O.; OLAYEMI, V. O.; OTERI, N., 2004. The feeding value of sun-dried shrimp waste-meal base diet for starter and finisher broilers. *Archivos de Zootecnia*, 53, 87-90.
- OLAIZOLA, M., 2008. The production and health benefits of astaxanthin. In: C.S.F. Barrow (Ed.) Marine nutraceuticals and functional foods. Nutraceutical Science and Technology, New York, pp. 321-344.
- OLIVEIRA CAVALHEIRO, J.M.; OLIVEIRA DE SOUZA, E.; BORA, P.S., 2007. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. *Bioresource Technology*, 98, 602-606.
- OVISSIPOUR, M.A.A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; SAFARI, R.; SAHIRI, H., 2009. The effect of hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from persian turgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115, 238-242.
- PACHECO, N.; GARNICA-GONZÁLEZ, M.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, J.Y.; FLORES-ALBINO, B.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E.; SHIRAI, K., 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100, 2849-2854.
- PANASIUK, R.; AMAROWICZ, R.; KOSTYRA, H.; SIJTSMA, L., 1998. Determination of [alpha]-amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chemistry*, 62, 363-367.
- PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S. C., 1996. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218,408.
- PARK, I. Y.; PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S. C. 1998. Parasine I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters*, 437 : 258-262.
- PEPE S. ; MARASCO S.F.; HAAS, S.J. ;SHEERAN, F.L.; KRUM, H.; ROSENFELDT, F.L., 2007. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. *Mitochondrion*, 7S:S154–S167.

- PERALTA, E.M.; HATATE, H.; KAWABE, D.; KUWAHARA, R.; WAKAMATSU, S.; YUKI, T.; MURATA, H., 2008. Improving antioxidant activity and nutritional components of Philippine salt-fermented shrimp paste through prolonged fermentation. *Food Chemistry*, 111, 72-77.
- PICOT, L.; BORDENAVE, S.; DIDELOT, S.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; SANNIER, F.; THORKELSSON, G.; BERGÉ, J.P.; GUÉRARD, F.; CHABEAUD, A.; PICOT, J.M., 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41, 1217-1222.
- PIERRE, T.N., SEON, A.A., AMICHE, M., NICOLAS, P., 2000. Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobialopeptide precursors. *European Journal of Biochemistry*, 267, 370-378.
- PLASCENCIA-JATOMEA, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; ARREDONDO-FIGUEROA, J.L.; HAL, G.M.; SHIRAI, K., 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 82, 753-759.
- RAFALIMANANA, T., 2003. Les crevettes péneïdes exploitées sur la côte Ouest de Madagascar: Variabilités spatio-temporelles des paramètres biologiques et dynamique des populations. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Rennes, pp. 261.
- RAI, A.K.; SWAPNA, H.C.; BHASKAR, M.; HALAMI, P.M.; SACHINDRA, N.M., 2010. Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. *Enzyme and microbial technology*, 46, 9-13.
- RAJ, P.A., MARCUS, E., SUKUMARAN, D., K., 1998. Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biopolymers*, 45, 51-67.
- RAO, M.S.; MUNOZ, J.H.; STEVENS, W.F., 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 808-813.
- RAO, M.S.; STEVENS, W.F., 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 1080-1087.
- RASMUSSEN, R.S.M. ; M. T., 2008. Chitin and chitosan. In: C.S. Barrow, F. (Ed.) Marine nutraceuticals and functional foods. Nutraceutical Science and Technology, New York, pp. 155- 182.

- RAVALLEC-PLÉ R.; GILMARTIN L.; WORMHOUDT A.V.; GAL Y.L., 2000. Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80: 1-5.
- RAVALLEC-PLÉ, R.; VAN WORMHOUDT, A., 2003. Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134, 669-679.
- REESE G.; AYUSO R.; LEHRER S.B., 1999. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *International Archives of Allergy and Immunology*, 119:247-258.
- REFSTIE, S. ; OLLI, J.J. ; STANDAL, H., 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, 239, 331-349.
- ROMEO, D., SKERLAVAJ, B., BOLOGNESI, M., GENNARO, R., 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 9573-9575.
- ROSENFELD, D.J.; GERNAT, A.G.; MARCANO, J.D.; MURILLO, J.G.; LOPEZ, G.H.; FLORES, J.A., 1997. The effect of using different levels of shrimp meal in broiler diets. *Poultry Science*, 76.
- RUTTANAPORNVAREESAKUL, Y.; IKEDA, M.; HARA, K.; OSAKO, K.; ORAWAN, K.; NOZAKI, Y., 2005. Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. *Fisheries Science*, 71.
- RUTTANAPORNVAREESAKUL, Y.; IKEDA, M.; HARA, K.; OSATOMI, K.; OSAKO, K.; KONGPUN, O.; NOZAKI, Y., 2006a. Concentration-dependent suppressive effect of shrimp head protein hydrolysate on dehydration-induced denaturation of lizardfish myofibrils. *Bioresource Technology*, 97, 762-769.
- RUTTANAPORNVAREESAKUL, Y.; SOMJIT, K.; OTSUKA, A.; HARA, K.; OSATOMI, K.; OSAKO, K.; KONGPUN, O.; NOZAKI, Y., 2006b. Cryoprotective effects of shrimp head protein hydrolysate on gel forming ability and protein denaturation of lizardfish surimi during frozen storage. *Fisheries Science*, 72.
- SACHINDRA, N.M.; BHASKAR, N., 2008. In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. *Bioresource Technology*, 99, 9013-9016.

- SACHINDRA, N.M. ; BHASKAR, N. ; MAHENDRAKAR, N.S., 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26, 1092-1098.
- SACHINDRA, N.M.; BHASKAR, N.; SIDDEGOWDA, G.S.; SATHISHA, A.D.; SURESH, P.V., 2007. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. *Bioresource Technology*, 98, 1642-1646.
- SACHINDRA, N.M. ; MAHENDRAKAR, N.S., 2005. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96, 1195-1200.
- SACHINDRA, N.M. ; NARAYAN, B. ; MAHENDRAKAR, N.S., 2005. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85.
- SAHA, B.C.; HAYASHI, K., 2001. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnology Advances*, 19, 355-370.
- SAI, K.P., JAGANNADHAM, M.V., VAIRAMANI, M., RAJU, N.P., DEVI, A.S., NAGARAJ, R., SITARAM, N., 2001. Tigerinins: Novel Antimicrobial Peptides from the Indian Frog *Rana tigrina*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 2701-2707.
- SALERNO, G.; PARRINELLO, N.; ROCH, P.; CAMMARATA, M., 2007. cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146: 521-529.
- SAMPAIO, G.R.; BASTOS, D.H.M.; SOARES, R.A.M.; QUEIROZ, Y.S.; TORRES, E.A.F.S., 2006. Fatty acids and cholesterol oxidation in salted and dried shrimp. *Food Chemistry*, 95, 344-351.
- SATHIVEL, S.; BECHTEL, P.J.; BABBITT, J.; SMILEY, S.; CRAPO, C.; REPPOND, K.D.; PRINYAWIWATKUL, W., 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68.
- SAUVANT, D., 2005. Principes généraux de l'alimentation animale. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, pp. 38.
- SCHIBLI, D.J., HWANG, P.M., VOGEL, H.J., 1999. Structure of the Antimicrobial Peptide Titrpticin Bound to Micelles: A Distinct Membrane-Bound Peptide Fold. *Biochemistry*, 38, 16749-16755.

- SCHNEIDER, M., 2001. Phospholipids for functional food. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 98-101.
- SELSTED, M.E., BROWN, D.M., DELANGE, R.J., HARWIG, S.S., LEHRER, R.I., 1985a. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 4579-4584.
- SELSTED, M.E., HARWIG, S.S., GANZ, T., SCHILLING, J.W., LEHRER, R.I., 1985b. Primary Structures of Three Human Neutrophil Defensins. *Journal of Clinical Investigation*, 76, 1436-1439.
- SELSTED, M.E., NOVOTNY, M.J., MORRIS, W.L., TANG, Y.Q., SMITH, W., CULLOR, J.S., 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 4292-4295.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.-Q.; SYNOWIECKI, J., 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285-293.
- SHIKE, H., LAUTH, X., WESTERMAN, M.E., OSTLAND, V.E., CARLBERG, J.M., VAN OLST, J.C., SHIMIZU, C., BULET, P., BURNS, J.C., 2002. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *FEBS Journal*, 269, 2232-2237.
- SIMPSON, B.K.; HAARD, N.F.; 1985. The use of proteolytic enzymes to extract Carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry*, 7, 212-222.
- SILPHADUANG, U.; NOGA, E.J., 2001. Antimicrobials: Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*, 414 : 268-269.
- SILVA, P.I., JR., DAFFRE, S., BULET, P., 2000. Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33464-33470.
- SIMMACO, M., MIGNOGNA, G., BARRA, D., BOSSA, F., 1993. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Letters*, 324, 159-161.
- SIMMACO, M., MIGNOGNA, G., BARRA, D., BOSSA, F., 1994. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 11956-11961.

- SIMMACO, M., MIGNOGNA, G., CANOFENI, S., MIELE, R., MANGONI, M.L., BARRA, D., 1996. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *European Journal of Biochemistry*, 242, 788-792.
- SKIERKA, E.; SADOWSKA, M., 2007. The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 105, 1302-1306.
- SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRØ, 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.
- SLIZYTE, R.; MOZURAITYTE, R.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; FALCH, E.; FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T., 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44, 668- 677.
- SLIZYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRØ, I., 2005. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40, 3680-3692.
- STEINHARDT, H., BEYCHOK, S., 1964. Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. In: Neurath H., editor. *The proteins*, vol 2. (139-304). New York : Academic Press.
- STENSVÅG, K.; HAUG, T.; SPERSTAD, S.V.; REKDAL, Ø.; INDREVOLL, B.; STYRVOLD, O.B., 2008. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32, 275-285.
- STEWART, J.C.M., 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 104, 10-14.
- STORICI, P., TOSSI, A., LENARČIČ, B., ROMEO, D., 1996. Purification and Structural Characterization of Bovine Cathelicidins, Precursors of Antimicrobial Peptides. *European Journal of Biochemistry*, 238, 769-776.
- SUDARYONO, A.; TSVETNENKO, E.; EVANS, L.H., 1996. Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 143, 331-340.
- SUMAYA-MARTINEZ, M.T., 2004. Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes: Etude de l'activité Antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glucation. 188.

- SUPUNGUL, P.; KLINBUNGA, S.; PICHYANGKURA, R.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A., 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61, 123-135.
- SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N.A.A.Q., 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68, 147-152.
- SYNOWIECKI, J., AL-KHATEEB, N.A.A.Q., 2003. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 145-171.
- TANG, Y.-Q., YUAN, J., OUML, SAPAY, G., OUML, SAPAY, K., TRAN, D., MILLER, C.J., OUELLETTE, A.J., SELSTED, M.E., 1999. A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated α -Defensins. *Science*, 286, 498-502.
- THIANSILAKUL, Y.; BENJAKUL, S.; SHAHIDI, F., 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103, 1385-1394.
- THOMAS S.R.; WITTING P.K.; STOCKER R.A., 1999. Role for reduced coenzyme Q in atherosclerosis. *BioFactors*, 9:207–224.
- TIBBETTS, S.M.; MILLEY, J.E.; LALL, S.P., 2006. Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 261, 1314-1327.
- TSAI, Y.-H. ; LIN, C.-Y. ; CHIEN, L.-T. ; LEE, T.-M. ; WEI, C.-I. ; HWANG, D.-F., 2006. Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. *Food Chemistry*, 98, 64-70.
- VIEIRA, G.H.F.; MARTIN, A.M.; SAKER-SAMPAIAO, S.; OMAR, S.; GONCALVES, R.C.F., 1995. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus spp.*) processing wastes. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 69.
- VIEIRA, G.H.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; MACRAE, A.; SOUSA, O.V., 2005. Peptone preparation from fishing by-products. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85.
- WAKAMATSU, K., TAKEDA, A., TACHI, T., MATSUZAKI, K., 2002. Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles. *Biopolymers*, 64, 314-327.

- WANG, S.-L.; LIN, T.-Y.; YEN, Y.-H.; LIAO, H.-F.; CHEN, Y.-J., 2006. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research*, 341, 2507-2515.
- WANG, S.-L.; CHEN, S.-J.; WANG, C.-L., 2008a. Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydrate Research*, 343, 1171-1179.
- WANG, S.L.; LIN, H.T.; LIANG, T.W.; CHEN, Y.Z.; YEN, Y.H.; GUO, S.P., 2008b. Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresource Technology*, 99, 4386- 4393.
- WESKA, R.F.; MOURA, J.M.; BATISTA, L.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A., 2007. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80, 749-753.
- XU, Y.; GALLERT, C.; WINTER, J., 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 687-697.
- YAMADA, K.; NATORI, S., 1993. Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin. *Biochemical Journal*, 291, 275-279.
- ZHAO, Q.Y., SANNIER, F., PIOT, J.M., 1996. Kinetics of appearance of four hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by HPLC coupled with photodiode array detection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1295, 73-80.
- ZHAO, C., LIAW, L., LEE, I.H., LEHRER, R.I., 1997. cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. *FEBS Letters*, 412, 144-148.
- ZASLOFF, M., 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 5449-5453.

10-Aug-2010

Dear Dr Bergé:

Ref: Proteolysis of shrimp by-products (*Penaeus monodon*) from Madagascar

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in CyTA - Journal of Food. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter, along with those of the editor who coordinated the review of your paper.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to CyTA - Journal of Food and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Dr Vázquez Vázquez
Editor in Chief, CyTA - Journal of Food
manuel.vazquez@usc.es

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

On page 9, lines 48, 50 and 58 change isoelectic pH by isoelectric point

Reviewer: 2

Comments to the Author

Teh manuscript was improved hus my recommendation is accept

Editor's Comments to Author:

Associate Editor

Comments to the Author:

(There are no comments. Please check to see if comments were attached to this e-mail.)

There are now over 1050 Taylor & Francis titles available on our free tables of contents alerting service! To register for this free service visit: www.informaworld.com/alerting.

Proteolysis of shrimp by-products (*Penaeus monodon*) from Madagascar

Randriamahatody, Z.^{1,2,3}; Sylla, K.S.B.¹; Nguyen, H.T.M.¹; Donnay-Moreno, C.¹,

Razanamparany, L.³, Bourgougnon, N.²; Bergé, J. P.^{1,*}

¹ *Laboratoire de Science et Technologie de la Biomasse Marines IFREMER BP21105, 44311 Nantes cedex 03, France.*

² *Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 2594, Université de Bretagne Sud, Campus de Tohannic, Centre de recherche Yves Coppens, 56017 Vannes, France.*

³ *Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et à la Nutrition, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, BP 906, 101 Antananarivo, Madagascar.*

*Corresponding author : Tel +33 240374079, Fax +33 240374071, E-mail address

jpberge@ifremer.fr

Abstract:

To generate and extract elements from shrimp heads, proteolysis were performed with four commercial enzymes (Pepsin, Novozym 37020, Protex 6L, Delvolase) at acidic and alkaline conditions for 22 hours. Soluble and insoluble fractions were generated after hydrolysis. Chemical compositions of each fraction, amino acids composition and molecular profile of soluble peptides were determined. More than half of the total dry matter was found in aqueous phases including most of the protein while lipids were found to remain insoluble. Resulting hydrolysates were mainly constituted by small peptides (> 80% below 1000Da). 14

to 15 amino acids were identified. Hydrolysis increased the level of essential amino acids in the hydrolysates, including Lysine which is lacking in vegetables. Proteolysis of shrimp heads increase that way their potential nutritional value while allowing the concentration of lipids in the insoluble phase and the partial demineralisation of exoskeleton, which is favourable for chitin extraction.

Keywords: by-products, shrimp, proteolysis, hydrolysate.

INTRODUCTION

Worldwide fishery production was reported to be about 144 million tonnes in 2006, 36 % of which was from aquaculture, and approximately 33% are used for non-food purpose. Shrimp constitutes the main fish traded in value term with 16% of the total value of internationally traded fishery products (Food and Agriculture Organization [FAO], 2009).

In Madagascar, shrimp exportation constitutes 73% of the total fisheries product. The average of production is 12 977 tonnes in 2006, including 51% of contribution from cultivated shrimp (Mission Economique de Tananarive, 2008).

Shrimp transformation lead to wastes generation. In Madagascar, they are composted to fertilizer or used in animal feeding; industrial transformation contributes only to about 10% of those products. These wastes are mainly constituted by cephalothorax and exoskeleton which represent at least 40% of the whole shrimp. Many studies have revealed that they contain useful components like proteins, lipids, astaxanthin and of course chitin, which is well known as a marketable product. Indeed, numerous works have been conducted for recovering those valuable products. Chemical procedures were developed to extract chitin and chitosan (Sagheer *et al.*, 2009) and astaxanthin (Sachindra & Mahendrakar, 2005; Sachindra, Bhaskar

& Mahendrakar, 2006). Fermentation and silage were experienced to recover chitin (Beaney, Lizardi-Mendoza & Healy, 2005; Bhaskar, Suresh, Sakhare & Sachindra, 2007; Rao, Munoz & Stevens, 2000), astaxanthin (Cira, Huerta, Hall & Shirai, 2002; Fagbenro & Bello-Olusoji, 1997; M. Healy, Green & A Healy, 2003) but also for animal feeding (Oliveira Cavalheiro, Oliveira de Souza & Bora, 2007). Enzymatic hydrolysis was used for chitin extraction (Ferrer *et al.*, 1996; Gagné & Simpson, 1993; Gildberg & Stenberg, 2001; Synowiecki & Al-Khateeb, 2000), for carotenoprotein recovering (Babu, Chakrabarti & Surya Sambasivarao, 2008; Simpson & Haard, 1985), and for generation of bioactive or functional peptides (He, Chen, Sun, Zhang & Gao, 2006; Ravallec-Plé & Van Wormhoudt, 2003; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2006).

Proteins represent the major component of shrimp heads (Fagbenro & Bello-Olusoji, 1997; Cira *et al.*, 2002; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005; Coward-Kelly, Agbogbo & Holtzapple, 2006; Babu *et al.*, 2008; Limam, Sadok & El Abed, 2008) which could be thus an excellent source of bioactive peptides and essential amino acids. Enzymatic hydrolysis is a gentle method to extract and ameliorate proteins quality from shrimp heads. Commercial proteases are available in a wide range of activity. To hydrolyse marine by-products, proteases working in neutral or alkaline environment are usually used and their effectiveness of protein recovery and peptides generation were largely reported. The choice of protease defines the environmental conditions of the reaction. In presence of by-products containing hard tissues like exoskeleton in shrimp head, proteolysis realised at extreme pH conditions and for a long duration could also contribute to the extraction of other components such as chitin which is known to have interests in several domain such as nutraceuticals, nutrition...

In this work we have decided to use enzymes that work at extreme pH (over 9 or below 4) in order to screen their effectiveness on matter of solubilization and distribution but also to avoid bacterial contamination that may occurs at neutral pH notably when long time

hydrolysis are conducted (here 22 hours).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Raw material

Heads of frozen aquaculture shrimp (*Penaeus monodon*, Family: *Panaeidae*, Order: *Decapoda*, Class: *Malacostraca*, Phylum: *Arthropoda*) were collected from a processing factory (UNIMA®, Madagascar) on August 2005. They were packed in plastic bags and stored at –20 °C until use. Maximal time of storage was 3 months.

External enzymes

All the enzymes used here are endopeptidase ones.

Pepsin from porcine stomach mucosa (EC 3.4.23.1) was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

Novozym 37020 is a large spectra protease produced by fermentation, it was provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark).

Protex 6L (EC 3.4.21.62) is an alkaline serine endopeptidase derived from a selected strain of *B. licheniformis*, it was provided by Genecor International (New York, USA).

Delvolase (E.C 3.4.21.14) is an industrial enzyme mixture from DSM Food Specialties (Seclin, France); the main constituent is a serine protease made from *Bacillus licheniformis*.

Hydrolysis

Figure 1 outlines the overall process employed in the production of shrimp head

hydrolysates. The frozen and minced shrimp heads were stored overnight at 4°C for thawing and homogenized with MilliQ-purified water (ratio 1:1, w/v). For each hydrolysis, 100 g sample head were used. The mixture was directly poured into a 300 mL closed glass vessel with a double jacket to enable thermal exchanges (heating or cooling). In order to ensure a good proteolysis and despite the lack of data on this substrate, hydrolysis reactions were performed at pH and temperature known to be optimal for enzyme activity on reference molecules: Pepsin: pH 2, 40 °C; Novozym 37020: pH 3, 50 °C; Protex 6L: pH 9.5, 60 °C; Delvolase: pH 10, 60 °C. Before hydrolysis, mixing was performed for an initial 15 min to adjust the pH (by adding 1 M HCl or 2 M NaOH) and to obtain the desired temperature (using a water bath). Hydrolysis was initiated by adding enzymes. Due to the difference of specific activity of enzymes, different ratio enzyme/substrat were used to reach the maximum activity of each enzyme. Thus, 5 g/kg of Pepsin or Novozym 37020; 10 g/kg of Protex 6L and 20 g/kg of Delvolase were adopted. The mixtures were continuously stirred at 300 rpm for 24 hours. Temperature and pH were regulated (by using 2 M HCl or 2 M NaOH).

The degree of hydrolysis (DH) is defined as the % of peptide bonds cleaved during the enzymatic reaction. There is proportionality between the number of peptide bonds cleaved and the acid or base consumption which is given by the following equation:

$$\%DH = h/h_{tot} \times 100$$

where, h, number of peptide bonds broken; $h_{tot} = 8.6$ meq/g, total number of peptide bonds in substrate (Adler-Nissen, 1986).

According to Adler-Nissen (1977), when the reaction pH is above the pK_a of the α -NH group, then the equation is:

$$\%DH = h/h_{tot} \times 100 = (BN_b/\alpha h_{tot}MP) \times 100$$

where B = X ml, base consumption in ml; $N_b = 2$ N NaOH, normality of the base; α is the average degree of dissociation of the α -NH groups (see below); MP is the mass of

protein in grams ($N \times 6.25$) (Adler-Nissen, 1977).

According to Zhao *et al.* (1996), when the reaction pH is below the pK_a of the α -NH group, the DH value can be estimated from the equation

$$\%DH = h/h_{tot} \times 100 = (AN_a / (1-\alpha)h_{tot}MP) \times 100$$

where A is the acid consumption in ml, N_a is the normality of the acid, α and MP are similar as above (Zhao, Sannier & Piot, 1996).

The degree of dissociation was found in the following way

$$\alpha = (10^{pH-pK}) / (1 + 10^{pH-pK})$$

The pK values at different temperatures T (Kelvin) were calculated from Steinhard and Beychok (1964):

$$pK = 7.8 + \frac{(298 - T)}{298T} \times 2400$$

After 22 hours (1335 min), hydrolysis were stopped by enzyme inactivation: addition of 5 M NaOH to reach neutrality for Pepsin; heating at 85 °C for 25 min for Novozym 37020, 85 °C for 20 min for Protex 6L and 90 °C for 20 min for Delvolase. After cooling at room temperature, the hydrolysates were centrifuged at 10.000 g for 20 min. Two fractions were thus collected: the insoluble sludge and the soluble aqueous phase. Each fraction was then freeze-dried and stored at -20 °C until further analyses.

Chemical analysis

All the analyses were performed in triplicate except the amino acid profile and the molecular weight distribution.

Moisture content was determined by oven drying samples at 105 °C until constant weight (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 2005). Ash content was carried

out by ignition of samples at 600 °C for 24 h (AOAC, 2005). The total nitrogen content of the non-hydrolyzed raw material, aqueous phase and insoluble sludge generated by hydrolysis was determined using the Kjeldahl method (Crooke & Simpson, 1971). Crude protein was estimated by multiplying the total nitrogen content (%N) by the factor 6.25.

Amino acid composition was determined for the raw (non-hydrolysed) material and hydrolysates according to a previous study (Kechaou *et al.*, 2009). Briefly, ten milligrams of freeze-dried samples were previously digested with HCl under nitrogen atmosphere for 18 hours. Then, the samples were completely dried under a nitrogen atmosphere and subsequently diluted by adding 2.5 ml water. The amino acid analysis was thus performed using the EZ:faast™ procedure (Penomenex, USA) consisting of a solid phase extraction step followed by derivatization and liquid/liquid extraction. An aliquot of the organic phase was analysed on a GC-FID system (Perkin Elmer Autosystem XL). The injector temperature was maintained at 250 °C while detection occurred at 320 °C. Separation was achieved using a Zebro ZB-AAA GC column (10 m x 0.25mm) with the oven temperature linearly increasing from 110 to 320 °C at 32°C/min. Helium was employed as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. The amino acids were quantified by their response factor relative to the internal standard norvaline added at a concentration of 200 µmol/L.

Lipids were extracted according to the Folch procedure (Folch, Lees & Stanley, 1957). Total lipid content was determined gravimetrically after solvent extraction and evaporation.

Determination of Molecular Weight

The molecular weight distribution of peptides in the hydrolysates was analysed by gel filtration chromatography. The molecular weight fractions were separated using a high performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with a size exclusion column (Superdex peptide 10/300 GL). The mobile phase consisted of water with trifluoroacetic 1 g/L

and acetonitrile 5 g/L (70:30), the flow rate was 0.5 mL/min. The chromatography was monitored by measuring the absorbance at 214 nm. The column was calibrated with standards: Ribonuclease A (13700 Da), Aprotinin (6500 Da), Renin (1760 Da), Vasopressine (1084 Da) and Leucine (294 Da). The molecular weight ranges of the different fractions were based on the retention times of the collected fractions and determined from a standard curve.

Statistical analysis

All data presented are means \pm standard deviations. Analyses of variance (One way ANOVA) were performed by Statgraphics Plus version 5.1 (Manugistics Inc., USA). The method used to discriminate among means was Fisher's least significant difference (LSD) procedure. Mean were accepted as significantly different at 95% level ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Without any antimicrobial treatment (of the raw material and during the hydrolysis) bacterial proliferation may have occurred. Microbial compounds that can be microbially formed during the process may affect the global odour of the products (due to complex mixtures of volatile compounds such as unsaturated carbonyl compounds and alcohols with 6, 8 or 9 carbon atoms). However, non significant modification of the overall aroma was percept even after 22 hours of hydrolysis confirming a reduced bacterial proliferation under such conditions of hydrolysis.

Proximal composition of shrimp head

On dry weight basis, proteins were found to be the major constituents of shrimp head ($49.1 \pm 0.9\%$) while lipids and ashes were equivalent and represented around 17-19% ($16.6 \pm 0.2\%$ and $18.7 \pm 0.1\%$ respectively). Chitin was considered as the residue and thus estimated to be around 16%.

Degree of hydrolysis

During hydrolysis, shrimp head turned into a free flowing liquid. Hydrolytic curves corresponding to Pepsin, Novozym 37020, Protex 6L and Delvolase are reported in Figure 2. Whatever the enzyme used, first order kinetics was observed with an initial rapid phase where a large number of peptides bonds are broken (rapid consumption of HCl or NaOH), followed by a decreased rate of hydrolysis and finally approaching a stationary phase where no apparent hydrolysis takes place. Such hydrolysis curves are similar to those previously published on herring muscle and head (Liceaga-Gesualdo & Li-Chan, 1999; Sathivel *et al.*, 2003), salmon head (Gbogouri, Linder, Fanni & Parmentier, 2004; Sathivel, Smiley, Prinyawiwatkul & Bechtel, 2005) and cuttlefish and sardine viscera (Dumay, Donnay-Moreno, Barnathan, Bergé & Jaouen, 2006; Kechaou *et al.*, 2009) for example. At higher %DH, product inhibition may occur due to the high concentration of soluble peptides that can act as effective substrate competitors (Weil, 2005).

After 22 hours of hydrolysis, %DH varied from 18.6%DH (Protex 6L) to 36.5%DH (Pepsin). Such results are in accordance with previous proteolysis conducted on marine substrates like shrimp discards (%DH = 30% with Alcalase; Synowiecki & Al-Khateeb, 2000) or sardine heads (%DH = 20% with Protamex; Dumay *et al.*, 2006).

Regarding the kinetics, Pepsin was the most efficient in hydrolysing shrimp head leading to the highest %DH but also reaching 33.5%DH in less than 3 hours (167 min). Thus, Pepsin was the most performing enzyme in term of proteolysis (peptidic bond broken) and reaction rate (time of proteolysis). Despite a lowest maximal %DH (22.3%DH) at the end, Novozym 37020 appeared to be second most efficient enzyme as, after 3 hours, 17.9%DH was observed (92% of the final value). Both of these enzymes are acidic ones which could explain their highest proteolytic activities on shrimp heads. Indeed, protein solubility and conformation is influenced by pH condition: each protein has an isoelectric pH where their

insolubility is maximal. As far as the pH condition is different of isoelectric pH of the protein, their solubility is increased, improving their capacity to interact with the enzyme. Proteins like glutenin have a maximal solubility at pH 2 or pH 12. Our results suggest that shrimp head proteins are glutenin-like as far as isoelectric pH is concerned.

For the alkaline proteases Protex 6L and Delvolase, lowest efficiencies (18.6 and 23.7%DH) and reaction rates (73.5 and 56.2% of the final value after 3 hours) were obtained. Moreover, even after 22 hours proteolysis seemed to continue as little increases of %DH were observed.

Dry matter distribution

Without hydrolysis (i.e. in the crude head shrimp), after the centrifugation step, only 31.6% of dry matter was located into the soluble phase while 68.4% remained insoluble (Figure 3). After conducting hydrolysis on shrimp head samples, the dry matter distribution was mainly located in the supernatant, regardless to the enzyme used. This illustrates the solubilization of the matter under the action of the proteases as previously noticed notably on fish by-products (Aspmo, Horn & Eusink, 2005; Dumay *et al.*, 2006; Kechaou *et al.*, 2009). However, slight differences were observed according to the enzyme. Indeed, Protex 6L and Pepsin were found to be the most efficient in terms of dry matter solubilization with 64.1 and 63.5% of dry matter located in supernatant phase after hydrolysis while Novozym 37020 and Delvolase have completed only 53.5% and 51.6% of solubilization respectively. However, it is important to notice that despite the long time of hydrolysis (22 hours), at least 36% of shrimp head remained insoluble. It is due to the presence of exoskeleton which are not easily hydrolysed. Anyway, those insoluble phases have an interest for chitin extraction and chitosan production (Gildberg & Stenberg, 1991). Indeed, after proteolysis, chitin remains insoluble and can be easily extracted from sludge. After shrimp heads (*Pandalus borealis*) proteolysis

with Alcalase followed by filtration, Gildberg and Stenberg could recover peptides and astaxantin in filtrates. Sludge was then used to extract chitin by chemical method. Chitosan quality issued from that chitin was not influenced by enzymatic action (Gildberg & Stenberg, 2001). In addition it has to be said that due to pH regulation by NaOH or HCl, salts are generated during the proteolysis leading to slight increases in total weight (from 3 to 6.2%).

Proximate composition

The average chemical composition (based on triplicates) of the freeze-dried soluble and insoluble fractions after 22 hours of hydrolysis are presented on Table 1. Regardless to the enzyme used, according to statistical analysis, supernatants were found to be rich in protein (48.1 to 64.7%) and poor in lipid (1.2 to 3.8%). As expected, those results illustrate the effectiveness of proteases to solubilize proteins but such enzymes seem here ineffective to recover lipids of shrimp heads into the resulting the soluble phases.

Such high levels of protein recovery into soluble phase have been previously observed either for hydrolysates of shrimp discards (Synowiecki & Al-Khateeb, 2000), for shrimp head silage (Oliveira Cavaleiro *et al.*, 2007) and after fermentation of shrimp biowaste (Bueno-Solano *et al.*, 2009). However, in some cases, higher protein recovery rates have been obtained (69 to 91% on dry weight basis) (Gildberg & Stenberg, 2001; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005; Limam *et al.*, 2008) which could be due to biochemical differences (proximate composition of raw material) and processing conditions (enzyme type, temperature, pH...) as previously noticed (Slyzite, Dauksas, Falch, Storro & Rustad, 2005, Dumay *et al.*, 2006).

The few amounts of lipid into the supernatants are in accordance with previous studies on shrimp waste hydrolysates where less than 1% of lipids were quantified (Gildberg & Stenberg, 2001; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2006). Regardless to the enzyme used, the major part of lipids remained into the sludge (95.7, 88.9, 78.1 and 84.5% for Pepsin,

Novozym 37020, Protex 6L and Delvolase respectively).

Regarding the ash content of the supernatant, it ranged from 24% (Delvolase) to 41% (Pepsin). According to enzyme used, ash contents are significantly ($P \leq 0.05$) different. Anyway, hydrolysis under acidic pH led to hydrolysates richer in minerals (33% and 41% respectively for Novozym 37020 and Pepsin) while proteolysis under alkaline conditions led to a lower level of minerals (24% and 29% respectively for Protex 6L and Delvolase). Such results are expected as it is well known that demineralisation of shrimp carapace occurs at low pH and this is the basis of the chitin extraction by chemical treatments (Cauchie, Jaspars-Versali, Hoffmann & Thomé, 2002; Paulino, Simionato, Garcia & Nozaki, 2006; Pillai, Paul & Sharma, 2009; Sagheer, Al-Sughayer, Muslim & Elsabee, 2009; Yen, Yang & Mau, 2009) or by fermentation process (Bhaskar *et al.*, 2007; Cira *et al.*, 2002; Jung, Kuk, Kim & Park, 2005; Pacheco *et al.*, 2009). In addition, low pH increases the solubility of insoluble salt of Calcium (Jung & Kim, 2007). It has to be noticed that addition of acid or alkaline during hydrolysis increases ash content in hydrolysates (Thiansilakul, Benjakul & Shahidi, 2007). Indeed, regarding to the DH which is related to the quantity of acid or alkaline added, Pepsin which induced to the highest DH generated the hydrolysate richest in ash. Inversely, hydrolysis with Protex 6L produced the hydrolysate poorest in ash, while the DH obtained was the lowest.

Such long time hydrolysis have lead to a protein enrichment of the supernatants (Pepsin except) and a great reduction of their fat contents. Indeed, by comparison to non-hydrolysed material, the lipid amount into supernatant was reduced by up to 16 with Pepsin (16.6 g of lipid per 100 g of dry head and 1.4 g of lipid per 100 g of supernatant). This factor reduction is around 5 for the other enzymes (Novozym 37020, Protex 6L and Delvolase). However, such proteolysis and notably the one under acidic conditions have lead to a mineral enrichment of the soluble phases. Consequently, the resulting sludges were found to be poorer

in proteins and richer in lipids by comparison to raw material. This confirms that such proteolysis can lead to very different fractions on a biochemical point of view.

Nitrogen recovery

Nitrogen recovery indicates the percentage of nitrogen solubilized into hydrolysate to total nitrogen in the raw material (Figure 4). After 22 h of hydrolysis, the amounts of soluble nitrogen were 79.5, 73.9, 70.3% and 54.9 with Protex 6L, Pepsin, Delvolase and Novozym 37020 respectively.

Such levels of nitrogen recovery are in accordance with those previously observed in similar studies on the same material (Gildberg & Steinberg 2001; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2005; Limam *et al.*, 2008) as well as on fish such as Atlantic salmon muscle (Kristinsson & Rasco, 2000), cuttlefish and sardine viscera (Kechaou *et al.*, 2009), hoki frame (Jung & Kim, 2007).

By comparison to the observed %DH (see above) some discrepancies appear here due to the fact that %DH do not reflect the protein solubilization but give the proportion of peptidic bonds cleaved under protease actions. Thus, if Pepsin was found to be an efficient enzyme for cleaving the double bonds or recovering the proteins this was not the case for Protex 6L which was found to be the best for cleaving but the worst for recovering nitrogen. This illustrates the complementarities between those 2 indicators and the capacities of the proteases to cleave or not peptidic bonds of already solubilized proteins leading to the reduction of the molecular size distribution of the soluble peptides. As all those enzymes are endoproteases, cleaving peptidic bond will in some case be not sufficient to induce a higher nitrogen recovery as the resulting peptides are not small enough to become soluble after centrifugation.

Some authors have observed that, during shrimp biowaste fermentation, protein

solubilization was enhanced at higher pH (Bhaskar *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2000). This is partially confirmed here where the alkaline proteases (Protex 6L and Delvolase) were found efficient while Novozym 37020 not. However, Pepsin which has worked at pH=2 counterbalances this. Further studies are thus needed to confirm or not such pH influence.

Molecular weight

Shrimp head hydrolysates were separated using gel chromatography to compare their peptide size composition. The resulting chromatogram of Pepsin hydrolysate is presented on Figure 5 as an example. The data treatment of those chromatograms (area under the curve) is presented on Figure 6.

Enzymatic hydrolysis of shrimp head has enhanced the solubility of proteins but has also cut them into shorter peptides. Indeed, 82.5 to 92.7% of soluble peptides had a molecular weight below 1000 Da and 38.1 to 49.6 % had their molecular weights ranging from 250 to 500 Da. However, regarding to the enzyme used, slight differences can be noticed. Indeed, after 22 hours of proteolysis with Delvolase, less than 2% of the soluble peptides were found bigger than 2000 Da while 3 times more were quantified into Pepsin supernatant. (7.5%). With Protex 6L, up to 17% of peptides under 250 Da were detected while they represented less than 10% in Delvolase' soluble phase. Those results are similar to some previous studies with shrimp head hydrolysate where the major peptides were found between 1400 to 300 Da (Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2006).

It is well known that the smaller the peptides are, the highest their absorption by the intestinal tract will be (He *et al.*, 2006; Plascencia-Jatomea, Olvera-Novoa, Arredondo-Figueroa, Hal & Shirai, 2002). In addition, numerous short chain peptides have been identified, notably into marine hydrolysates, for their biological properties (Chabeaud *et al.*, 2009; He *et al.*, 2006; Je, Park, Kwon & Kim, 2004; Je, Qian, Byun & Kim, 2007; Ravallec-

Plé & Van Wormhoudt, 2003). Thus, such enzymatic hydrolysis can be a good way of upgrading shrimp heads by producing hydrolysates rich in small peptides for nutritional and biological purposes.

Amino acid composition

The total amino-acid compositions of raw material and the 4 hydrolysates after 22 hour-hydrolysis are presented in Table 2.

As expected, the proteolysis has lead to an amino acid enrichment in the supernatant by comparison to the soluble phase recovered after centrifugation of the raw material. Indeed, starting with 177 mg of amino acid per gram of dry weight, up to 398 mg were obtained into the Protex 6L supernatant. However, this enrichment was not similar whatever the enzymes, as only 239 mg were quantified into the Novozym 37020 supernatant, 271 and 303 mg into the Pepsin and Delvolase ones (and 398 mg into the Protex 6L one). Those results fit with nitrogen recovery rates as the nitrogen is mostly under the peptidic form.

From 14 to 15 different amino acids were detected into those different fractions as in some cases, some amino acids were not anymore detected into the soluble phases (Methionine with Novozym 37020 and Histidine with Protex 6L). It is reported that alkaline condition at pH under 9.5 may lead to the desamination of basic amino acids. Histidine destruction after hydrolysis with Protex 6L may result from that. However, with or without proteolysis, and whatever the enzyme, the proportion of essential amino acids (EAA) was found to be stable, between 35 to 40%. 8 essential amino acids were identified in raw material and shrimp heads hydrolysates. Tryptophane was not identified as well as cysteine which is conditionally essential for the reason that it is needed at high amounts in some physiopathological circumstance. The absence of tryptophan in shrimp heads and shrimp heads hydrolysates is explained by its destruction at acidic condition during amino acid analysis. Cystein is

sensitive to oxidation and under thermal treatment at alkaline condition, converted to dehydroalanine or lanthionine (Cheftel, Cuq & Lorient, 1985). Those reactions may be responsible of the destruction of cysteine in shrimp heads and shrimp heads hydrolysates.

In terms of concentrations, in raw material and hydrolysates, more than 60% of the total amino acids were constituted by Glutamic acid (14–17%), Aspartic acid (10-15%), Glycine (8-12%), Alanine (7-12%), Leucine (8-9%) and Proline (7-10%). Such results are in accordance with previous results on shrimp biowaste hydrolysates (Armenta & Guerrero-Legarreta, 2009; Ruttanapornvareesakul *et al.*, 2006; Synowiecki & Al-Khateeb, 2000) where Aspartic acid and Glutamic acid were detected in high amounts. However, some discrepancies can be noticed regarding the enzyme. Indeed, the alkaline enzymes (Protex 6L and Delvolase) were found to be the most efficient for the recovery of Methionine (increase factor of 7 and 5 respectively) and on Serine (increase factor of 4 and 3 respectively). At the opposite, Novozym 37020 seems to be non appropriate for the extraction of Methionine (not anymore detected) and Tyrosine, Alanine and Phenylalanine with lower values compared to raw material (this is also the case for Protex 6L with Histidine).

Among the major amino acids detected into the 4 hydrolysates, some have an important nutritional interest. Indeed, Leucine is an essential one that has to be given into feed and foodstuffs while Glutamic acid, Aspartic acid, Alanine and Glycine are known to be flavour enhancers (Heu *et al.*, 2003; Jung Nim, T Watanabe, Endoh, K Watanabe & Abe, 2002). Moreover, the levels of EAA are in accordance with the nutritional recommendation of the FAO (Cao, Zhang, Hong & Ji, 2008). At last, the increase of the Lysine content is of interest notably for feed purpose as this amino acid is the limiting one in cereals and has to be added notably in poultry feed.

These results indicate that shrimp head hydrolysates can be a good source of high nutritional quality products for feed or food purposes.

CONCLUSIONS

Proteolysis is well known to be a gentle method for recovering proteins from marine by-products, and thus generate peptides with functional and biological activity, but also improving amino acid composition increasing that way the protein quality. Extraction of elements from hard tissues requires extreme environmental conditions. In this study, we have tried to gather the 2 hypothesis by conducting long time proteolysis with acidic or alkaline enzymes.

This study like previous ones confirms thus that enzymatic hydrolysis is an effective process to separate components from marine biomass for further upgrading. Whatever the protease used here, proteins were recovered in the aqueous phase as peptides with small size and their quality were improved by the increasing of amino acid contents. That is of interest in nutrition.

Conducting enzymatic hydrolysis at extreme condition was realised successfully to extract calcium and peptides from hoki frame. Such hydrolysates are interesting for calcium sources in human nutrition (Jung & Kim, 2007). The present study showed that mineral solubilisation under acidic condition by enzymatic hydrolysis is also possible with shirmp head.

This study has confirmed that enzymatic hydrolysis could be a valuable upgrading process for shrimp wastes notably the head as it is quite simple to implement and because it generates rich protein hydrolysates with low fat content that can be useful for food and feed purpose. Additionally the insoluble fractions contain valuable component such as lipids, insoluble proteins and partially demineralised and deproteinised chitin that can be further separated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank AUF (Agence Universitaire pour la Francophonie) for their financial support.

This study is part of the actions conducted by the members of the SEA^{PRO} network (www.seapro.fr) which aims to promote a better use of the marine biomass with sustainable process.

REFERENCES

- Adler-Nissen, J. (1977). Enzymic hydrolysis of food proteins. *Process Biochemistry*, 12, 18-19.
- Alder-Nissen, J., (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*, Elsevier Applied Science Publishers, New York., U.S.A.
- Aspmo, S.I., Horn S.J. & Eusink, V.G.H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. *Process Biochemistry*, 40, 1957-1966.
- Armenta, R.E & Guerrero-Legarreta, I. (2009). amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chemistry*, 112, 310-315.
- Babu, C.M., Chakrabarti, R. & Surya Sambasivarao, K.R. (2008). Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 227-235.
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J. & Healy, M. (2005). Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 145-150.

- Bhaskar, N., Suresh, P.V., Sakhare, P.Z. & Sachindra, N.M. (2007). Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1427-1434.
- Bueno-Solano, C., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O.N., Lauterio-García, R., Adan-Bante, N.P. & Sánchez-Machado, D.I. (2009). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*, 112, 671-675.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P. & Ji, H. (2008). Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chemistry*, 109, 176-183.
- Cauchie, H.-M., Jaspard, M.-F., Hoffmann, L. & Thomé, J.-P. (2002). Potential of using *Daphnia magna* (Crustacea) developing in an aerated waste stabilisation pond as a commercial source of chitin. *Aquaculture*, 205, 103-117.
- Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M. & Guérard, F. (2009). Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology*, 66, 463-471.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. & Lorient, D. (1985). *Protéines alimentaires* [Food proteins]. Paris : Tec. et Doc. ed..
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37, 1359-1366.

- Coward-Kelly, G., Agbogbo, F.K. & Holtzapple, M.T. (2006). Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. *Bioresource Technology*, 97, 1515-1520.
- Crooke, W.M. & Simpson, W.E. (1971). Determination of ammonium in Kjeldhal digests of crops by an automated procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, 1256-1262.
- Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P. & Bergé, J.P. (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41, 2327-2332.
- Fagbenro, O.A. & Bello-Olusoji, O.A. (1997). Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. *Food Chemistry*, 60, 489-493.
- FAO. (2009). The state of world fisheries and aquaculture 2008. Retrieved from FAO website: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>
- Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Garcia, H. & Forster, C.F. (1996). Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. *Bioresource Technology*, 57, 55-60.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Gagné, L.A. & Simpson, B.K. (1993). Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnology*, 7, 253-263.
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J. & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by-products hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69, C615-C622.

- Gildberg, A. & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36, 809-812.
- He, H., Chen, X., Sun, C., Zhang, Y. & Gao, P. (2006). Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technology*, 97, 385-390.
- Healy, M., Green, A. & Healy, A. (2003). Bioprocessing of marine crustacean shell waste. *Acta Biotechnologica*, 23, 151-160.
- Heu, M.-S., Kim, J.-S. & Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82, 235-242.
- Je, J.Y., Park, P.J., Kwon, J.Y. & Kim, S.K. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7842-7845.
- Je, J.-Y., Qian, Z.-J., Byun, H.-G. & Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840-846.
- Jung Nim, P., Watanabe, T., Endoh, K., Watanabe, K. & Abe, H. (2002). Taste-active components in a Vietnamese fish sauce. *Fisheries Science*, 68, 913-920.
- Jung, W.J., Kuk, J.H., Kim, K.Y. & Park, R.D. (2005). Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 851-854.
- Jung, W.K. & Kim, S.K. (2007). Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *European Food Research and Technology*, 224, 763-767.
- Kechaou E.S., D.J., Donnay-Moreno C., Jaouen P., Gouygou J-P., Bergé J-P. & Ben Amar R. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina*

- pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 158-164.
- Kristinsson, H.G. & Rasco, B.A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 657-666.
- Liceaga-Gesualdo, A.M. & Li-Chan, E.C.Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64, 1000-1004.
- Limam Z., Sadok S. & El Abed A. (2008). Enzymatic Hydrolysis of Shrimp Head Waste: Functional and Biochemical Properties. *Food Biotechnology*, 22, (4): 352 - 362.
- Mission Economique de Tananarive. (2008). Le secteur halieutique à Madagascar. Retrieved from ubifrance website: <http://www.ubifrance.fr/peche-et-aquaculture-et-produits-transformes/userdocument.axd?id=001b0843720a>
- Official Methods of Analysis of AOAC International. (2005). AOAC International. Washington, USA, Secs 930.15.
- Oliveira Cavalheiro, J.M., Oliveira de Souza, E. & Bora, P.S. (2007). Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. *Bioresource Technology*, 98, 602-606.
- Pacheco, N., Garnica-González, M., Ramírez-Hernández, J.Y., Flores-Albino, B., Gimeno, M., Bárzana, E. & Shirai, K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100, 2849-2854.
- Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C. & Nozaki, J. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 98-103.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. & Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641-678.

- Plascencia-Jatomea, M., Olvera-Novoa, M.A., Arredondo-Figueroa, J.L., Hal, G.M. & Shirai, K. (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 753-759.
- Rao, M.S., Munoz, J.H. & Stevens, W.F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 808-813.
- Ravallec-Plé, R. & Van Wormhoudt, A. (2003). Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134, 669-679.
- Ruttanapornvareesakul, Y., Ikeda, M., Hara, K., Osako, K., Orawan, K. & Nozaki, Y. (2005). Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. *Fisheries Science*, 71, 220-228.
- Ruttanapornvareesakul, Y., Ikeda, M., Hara, K., Osatomi, K., Osako, K., Kongpun, O. & Nozaki, Y. (2006). Concentration-dependent suppressive effect of shrimp head protein hydrolysate on dehydration-induced denaturation of lizardfish myofibrils. *Bioresource Technology*, 97, 762-769.
- Sachindra, N.M. & Mahendrakar, N.S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96, 1195-1200.
- Sachindra, N.M., Bhaskar, N & Mahendrakar, N.S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26, 1092-1098.

- Sagheer, F.A.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S. & Elsabee, M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77, 410-419.
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K.D. & 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, P.J. (2005). Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70, 401-406.
- Simpson, B.K. & Haard, N.F. (1985). The use of proteolytic enzymes to extract Carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry*, 7, 212-222.
- Slizyte, R.; Dauksas, E.; Falch, E.; Storrø, 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.
- Steinhardt, H. & Beychok, S. (1964). Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. In: Neurath H., editor. *The proteins*, vol 2. (139-304). New York: Academic Press.
- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N.A.A.Q. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68, 147-152.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103, 1385-1394.
- Weil, J.-H. (2005). *Biochimie générale* [General Biochemistry]. Paris: DUNOD ed..

Yen, M.-T., Yang, J.-H. & Mau, J.-L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 75, 15-21.

Zhao, Q.Y., Sannier, F. & Piot, J.M. (1996). Kinetics of appearance of four hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by HPLC coupled with photodiode array detection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1295, 73-80.

Table 1: Chemical composition of fractions of hydrolysed shrimp head with commercial enzyme, g/100g on dry basis.

Tabla 1: Composición química de las fracciones de cabezas de gamba hidrolizadas con enzima comercial, g/100g en base seca.

Fractions	Enzyme	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)	Chitin (%)
Soluble	Pepsin	48.12 ± 1.57	1.17 ± 0.34	41.1 ± 0.46	9.61
	Novozym 37020	51.59 ± 0.01	3.01 ± 2.28	32.93 ± 0.06	12.47
	Protex 6L	63.86 ± 0.21	3.81 ± 0.21	23.86 ± 0.27	8.47
	Delvolase	64.73 ± 0.83	3.57 ± 0.02	28.62 ± 0.93	3.08
Insoluble	Pepsin	29.57 ± 0.29	36.20 ± 0.32	20.31 ± 0.12	13.92
	Novozym 37020	47.14 ± 0.32	29.19 ± 1.02	9.24 ± 0.62	14.44
	Protex 6L	29.44 ± 0.27	24.31 ± 1.11	36.80 ± 0.56	9.45
	Delvolase	29.19 ± 0.96	20.82 ± 0.94	30.79 ± 0.16	14.20

Table 2: Amino acid composition in raw material and hydrolysates, mg/g on dry weight basis.

Tabla 2: Composición en aminoácidos para la materia prima y los hidrolizados, mg/g en base seca.

Amino acid	Raw material	Pepsin	Novozym 37020	Protex 6L	Delvolase
Leucine	15.72	22.27	19.65	35.37	24.89
Phenylalanine	11.55	18.15	3.30	24.75	18.15
Valine	9.36	12.87	16.38	24.57	19.89
Lysine	8.76	17.52	16.06	16.06	11.68
Isoleucine	7.86	14.41	13.10	23.58	18.34
Threonine	5.95	10.71	15.47	20.23	14.28
Histidine	1.55	4.65	6.20	0.00	6.20
Methionine	1.49	4.47	0.00	10.43	7.45
Essential amino acids (EAA)	62.24	105.05	90.16	154.99	120.88
Glutamic acid	24.99	39.69	39.69	60.27	49.98
Alanine	21.36	26.70	16.91	32.04	24.03
Aspartic acid	21.28	41.23	23.94	43.89	35.91
Glycine	18.75	21.00	28.50	35.25	27.75
Proline	17.25	21.85	24.15	27.60	24.15
Tyrosine	7.24	10.86	5.43	18.10	7.24
Serine	4.20	4.20	9.45	16.80	13.65
Non essential amino acids (NEAA)	115.07	165.53	148.07	233.95	182.71
%EAA	35.10	38.82	37.85	39.85	39.82
EAA/NEAA	0.54	0.63	0.61	0.66	0.66

Figure Captions

Figure 1: Hydrolysis process flow diagram.

Figura 1: Organigrama del proceso de hidrólisis.

Figure 2: 22 hours hydrolysis curves of shrimp head with commercial enzymes.

Figura 2 : Curvas de la hidrólisis de 22 horas de cabezas de gamba con enzimas comerciales.

Figure 3: Dry matter distribution in supernatant and sludge after 22 hours of hydrolysis of shrimp head with commercial enzymes.

Figura 3: Distribución de la materia seca en el sobrenadante y residuo después de 22 horas de hidrólisis de cabezas de gamba con enzimas comerciales.

Figure 4: Nitrogen distribution in supernatant and sludge after 22 hours of hydrolysis of shrimp head with commercial enzymes.

Figura 4: Distribución de Nitrógeno en el sobrenadante y residuo después de 22 horas de hidrólisis de cabezas de gamba con enzimas comerciales.

Figure 5: Chromatogram of shrimp head hydrolysate with Pepsin.

Figura 5: Cromatograma de hidrolizado de cabeza de gamba con Pepsina.

Figure 6: Peptides molecular weight distribution in hydrolysates.

Figura 6: Distribución de pesos moleculares en los hidrolizados.

ANNEXES



Figure 1 : Poulets indigènes malgaches.



Figure 2 : Pesage de poulet lors des expérimentations de l'efficacité nutritionnelle des fractions de têtes crevette.



Figure 3 : Conduite des expérimentations d'efficacité nutritionnelle sur des poulets



Figure 4 : Exemple de ration expérimentale avec des dérivés de têtes de crevette.

Résumé

Les co-produits de la mer représentent des ressources biologiques valorisables pouvant générer différentes molécules d'intérêts nutritionnels et biologiques. L'objectif de ce travail est d'étudier les potentiels alimentaires des hydrolysats de têtes de crevette d'élevage et de pêche de Madagascar. Ainsi, 4 enzymes actives à pH extrême ont été testées : Pepsine, Novozym 37020, Protex 6L et Delvolase. La Pepsine s'est avérée être la plus appropriée, conduisant à la production de peptides de petite taille avec un poids moléculaire inférieur à 1 000 Da et l'amélioration du profil en acides aminés, favorisant la qualité nutritionnelle. L'hydrolyse pepsique a été optimisée par la condition de pH libre ou maintenu durant l'hydrolyse, et l'inactivation par la chaleur ou par le pH. L'introduction dans l'alimentation avicole traditionnelle malgache des hydrolysats obtenus a conduit à l'amélioration de la production, avec un gain de poids des poulets pouvant aller jusqu'à 2,3 fois supérieur aux témoins. Des activités antimicrobiennes sur de microorganismes pathogènes aquacoles et alimentaires ont été identifiées. L'hydrolyse pepsique pendant 2 heures à pH maintenu a été la plus efficace dans ces 2 domaines d'application. Elle a été aussi la plus favorable pour l'extraction de la chitine en produisant les résidus de carapaces les moins chargés en matières minérales et en protéines. Ces résultats suggèrent que l'hydrolyse enzymatique constitue une méthode efficace pour l'amélioration de la qualité nutritionnelle des têtes de crevette d'élevage et de pêche de Madagascar et la génération de substance à activité antimicrobienne, tout en favorisant l'extraction de la chitine.

Mots-clé : Co-produits, crevette, protéolyse enzymatique, aviculture, activité antimicrobienne.

Abstract

Marine by-products represent valuable biological resources able to generate molecules with biological and nutritional interests. The objective of the present study is to investigate nutritional potentials of hydrolysates from fished and farmed shrimp heads from Madagascar. Thus, 4 enzymes operational at extreme pH conditions were screened : Pepsin, Novozym 37020, Protex 6L and Delvolase. Pepsine was the most efficient enzyme conducting to the production of small-sized peptides with molecular weight inferior to 1 000 Da and the amelioration of amino acids profile, promoting the nutritional quality. Then, peptic hydrolysis was optimized by using different pH conditions and different enzyme inactivations. Introduction of resulting hydrolysates into traditional malagasy poultry feeding ameliorated the production, with weight gains 2,3 times higher. Some hydrolysates presented also growth inhibition activity again fishes pathogenic and food microorganisms. Two hours peptic hydrolysis at maintained pH seemed to be the most efficient condition in the 2 fields studied. It was also the most effective for chitin extraction by producing the poorest mineral and protein containing exoskeleton residues. Those results suggest the efficiency of enzymatic hydrolysis of shrimp heads from Madagascar to ameliorate their nutritional quality, while allowing partially chitin extraction.

Keywords : By-products, shrimp, enzymatic proteolysis, poultry, antimicrobial activity.