



THESE / UNIVERSITE BRETAGNE SUD
sous le sceau de L'université Européenne de Bretagne

Numéro d'ordre :

pour obtenir le grade de :
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE SUD

Mention : Biotechnologies agroalimentaires, sciences de
l'aliment
École Doctorale SICMA

présentée par

Khalifa Serigne Babacar SYLLA

Laboratoire : EA 3884

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines LBCM

**Valorisation de co-
produits de la sole
tropicale (*Cynoglossus
senegalensis*)
par hydrolyse
enzymatique :
Application en nutrition
avicole**

Thèse soutenue le 30 novembre 2011
devant le jury composé de :

Pr. Carole PROST
ONIRIS, Nantes / *Rapporteur*

Dr. Stéphanie BORDENAVE
HDR, LIENSs, Université de la Rochelle / *Rapporteur*

Dr. Justine DUMAY
MMS, Université de Nantes / *Examineur*

Pr. Nathalie BOURGOUGNON
Université de Bretagne Sud, LBCM / *Directeur de thèse*

Dr. Jean-Pascal BERGE
HDR, STBM, IFREMER, Nantes / *Directeur de thèse*

Pr. Pascal JAOUEN
Université de Nantes, GEPEA / *Examineur et Président du jury*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar (EISMV) et des laboratoires du Département des Sciences et Techniques de la Biomasse Marine (STBM) de l'Institut Français de Recherche de la Mer (IFREMER). Sa réalisation a été possible grâce à l'appui financier :

- ✓ de la coopération française sur le Fond de Solidarité Prioritaire
- ✓ du service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar (EISMV)

Je tiens à remercier Mr Jean Pascal BERGE, Directeur de recherche à l'IFREMER de Nantes, pour avoir dirigé cette thèse, et pour m'avoir initié aux techniques d'hydrolyse enzymatique. Sa disponibilité et son savoir m'ont permis l'entrée dans le domaine du génie des procédés, et son savoir faire m'a permis d'avoir conscience des objectifs à atteindre lors de la réalisation d'un travail de thèse.

Toute ma reconnaissance s'adresse à Mr Malang SEYDI, Professeur titulaire à l'EISMV de Dakar, pour m'avoir confié ce sujet de recherche, pour ses précieux conseils et sa responsabilité scientifique tout au long de ce travail. Je le remercie également pour les responsabilités qu'il m'a données tout au long de ces années, m'ouvrant ainsi sur le monde de l'enseignement et de la recherche.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr le Professeur Louis Joseph PANGUI, Directeur de l'EISMV de Dakar. Son enthousiasme et son infaillible confiance m'ont été d'une grande aide pour la finalisation de cette thèse.

Je désire exprimer toute ma respectueuse reconnaissance à Mme le Professeur Nathalie BOURGOUGNON de l'Université de Bretagne-Sud, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses conseils et son soutien ont contribué à la réalisation de ce travail.

Un grand merci également au Professeur Pascal JAOUEN, au Professeur Carole PROST, au Dr. Stéphanie BORDENAVE et au Dr. Justine DUMAY ; pour avoir accepté de lire ce travail.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du centre Ifremer de Nantes et celui du laboratoire d'HIDAOA autant pour leur aide que pour leur accueil.

A ma femme, mes enfants et ma famille,

Pour leur indéfectible attachement

A mes amis (es)

Pour leur fidélité

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail

Sincères remerciements

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé d'une part au sein du département des Sciences et Techniques de la Biomasse Marine (STBM) du centre IFREMER de Nantes et du laboratoire d'hygiène et Industrie des denrées Alimentaires d'Origine Animale de l'EISMV de Dakar. D'autre part, les entreprises de transformation des produits de la pêche localisées à Dakar, ont contribué gracieusement à l'octroi des échantillons de coproduits de sole tropicale mais également elles ont permis la réalisation des enquêtes.

A ce jour, ce travail a donné lieu à la publication de trois articles dans des revues à comité de lecture et à deux communications orales dans des congrès internationaux :

➤ Articles publiés

1. Production et caractérisation de fractions protéiques à partir de coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) destinés à l'alimentation animale.

K.S.B. SYLLA, B. MUSABYEMARIYA, J.P. BERGE, Mg. SEYDI - 2008 RASPA, 2008 ; 6 (3-4) : 181-187.

2. Water ratio effect on the proteins hydrolysis of tongue sole (*Cynoglossus senegalensis*) by-products.

K.S.B. SYLLA, B. MUSABYEMARIYA, J.P. BERGE, Mg. SEYDI - 2008 RASPA, 2008 ; 6 (3-4) : 189-194.

3. Sensory and aroma characteristics of tongue sole (*Cynoglossus senegalensis*) Hydrolysates.

K.S.B. SYLLA, BERGE JP., PROST C., B. MUSABYEMARIYA, Mg. SEYDI - 2009 Microb. Hyg. Ali., 21 (60), 35-43.

➤ Conférences

1. SYLLA KSB, MUSABYEMARIYA B, BERGE JP, SEYDI Mg. (2008). Analyse sensorielle d'hydrolysats de coproduits de sole tropicale après hydrolyse enzymatique en bioréacteur double enveloppe. Atelier FAO des experts en utilisation, technologie et qualité du poisson en Afrique. Douala, Cameroun du 22 au 28 novembre 2008.

2. SYLLA KSB, MUSABYEMARIYA B, BERGE JP, SEYDI Mg. (2009). Hydrolyse enzymatique de coproduits de sole tropicale et production de molécules à forte valeur ajoutée. Sea Food Congress, Agadir, Maroc du 02 au 09 octobre 2009.

T A B L E D E S M A T I E R E S

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 4 |
| I - Coproduits et facteurs influençant leur disponibilité..... | 4 |
| 1. Définition et principaux éléments constitutifs..... | 4 |
| 2. Produits dérivés..... | 5 |
| 2.1. Définition..... | 5 |
| 2.2. Produits dérivés des coproduits de la pêche en Afrique..... | 5 |
| 2.3. Produits dérivés des coproduits de la pêche en Asie..... | 6 |
| 2.3.1. Ailerons, cartilage et huile de foie de requin..... | 6 |
| 2.3.2. Chitine et chitosane..... | 6 |
| 2.3.3. Peau..... | 7 |
| 2.4. Produits dérivés des coproduits de la pêche en Europe..... | 7 |
| 2.4.1. Farines et huiles de poisson..... | 7 |
| 2.4.2. Hachis..... | 7 |
| 2.4.3. Ensilage de crevettes et de poisson..... | 8 |
| 3. Facteurs influençant la disponibilité des coproduits de la pêche..... | 8 |
| 3.1. Surpêche et gaspillage..... | 8 |
| 3.2. Impact de la pollution et de la dégradation de l'environnement marin | 9 |
| 3.3. Effets de la croissance démographique..... | 9 |
| 3.4. Attrait du secteur des coproduits de la pêche..... | 10 |
| 3.4.1. Intérêt du poisson..... | 10 |
| 3.4.2. Atouts des coproduits d'origine marine..... | 10 |
| 3.5. Contraintes à la valorisation des coproduits d'origine marine..... | 11 |
| 3.5.1. Contraintes réglementaires..... | 11 |
| 3.5.2. Contraintes technico-économiques..... | 11 |
| 3.5.3. Contraintes humaines..... | 12 |
| II - Valorisation des coproduits par hydrolyse enzymatique | 12 |
| 1. Importance et classification des enzymes..... | 12 |
| 1.1. Définition, classe et importance..... | 12 |
| 1.2. Principe de classification..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 1.2.1. Classification fonctionnelle..... | 13 |
| 1.2.2. Classification moderne..... | 14 |
| 1.2.2.1. Classification structurale des glycosidases..... | 14 |
| 1.2.2.2. Classification des protéases..... | 14 |
| a-Peptidases à sérine..... | 15 |
| b-Peptidases à thréonine..... | 16 |
| c-Peptidases à cystéine..... | 16 |
| d-Peptidases à acide aspartique..... | 17 |
| e-Peptidases à acide glutamique..... | 17 |
| f-Métallopeptidases..... | 17 |
| g-Peptidases dont les types catalytiques sont inconnus..... | 18 |
| 2. Protéases spécifiques aux poissons..... | 19 |
| 3. Hydrolyse enzymatique..... | 22 |
| 3.1. Enzymes endogènes..... | 22 |
| 3.1.1. Enzymes des procaryotes..... | 22 |
| 3.1.2. Enzymes bactériennes..... | 22 |
| 3.2. Enzymes exogènes..... | 23 |
| 3.3. Suivi de l'hydrolyse enzymatique..... | 23 |
| 3.4. Importance de la protéolyse dans l'industrie du poisson..... | 24 |
| 3.5. Protéases industrielles utilisées..... | 24 |
| 3.5.1. Protamex..... | 25 |
| 3.5.2. Novozym FM..... | 25 |
| 3.5.3. Papaïne..... | 25 |
| 3.6. Comparaison des procédés traditionnels et enzymatiques de fabrication de farines de poisson..... | 25 |
| 3.7. Exemple d'un procédé enzymatique utilisé pour la fabrication d'hydrolysats protéiques de poisson | 27 |
| 3.8. Intérêt des hydrolysats de poisson..... | 28 |
| 3.8.1. En alimentation animale..... | 28 |
| 3.8.2. Intérêts fonctionnels..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES..... | 30 |
| I - Matériel..... | 30 |
| 1. Produits chimiques..... | 30 |
| 2. Matériel animal..... | 30 |
| 3. Matériel d'hydrolyse..... | 31 |
| 3.1. Bioréacteurs à double enveloppe..... | 31 |
| 3.2. Enzyme d'hydrolyse..... | 33 |
| II - Méthodes..... | 33 |
| 1. Production et caractérisation des fractions protéiques à partir des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) | 33 |
| 1.1. Hydrolyse enzymatique..... | 33 |
| 1.2. Caractérisation biochimique des farines de surnageant et du culot de l'hydrolysats..... | 34 |
| 1.2.1. Dosage des taux de matière sèche..... | 34 |
| 1.2.2. Dosage de l'azote total..... | 34 |
| 1.2.3. Taux de lipides..... | 35 |
| 1.2.4. Détermination des masses moléculaires des peptides par gel filtration à haute pression..... | 36 |
| 1.2.5. Détermination du degré d'hydrolyse de l'hydrolysats..... | 36 |
| 1.2.6. Analyse des acides aminés..... | 37 |
| 2. Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur les caractéristiques biochimiques du surnageant de l'hydrolysats de coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) | 37 |
| 2.1. Hydrolyse enzymatique..... | 37 |
| 2.2. Caractérisation biochimique..... | 38 |
| 3. Analyse sensorielle et caractérisation aromatique des hydrolysats..... | 38 |
| 3.1. Hydrolyse enzymatique..... | 38 |
| 3.2. Analyse sensorielle..... | 39 |
| 3.2.1. Jury..... | 39 |
| 3.2.2. Conditions d'évaluation..... | 39 |
| 3.2.3. Epreuves sensorielles..... | 39 |
| 3.2.4. Présentation des échantillons..... | 39 |
| 3.3. Caractérisation aromatique..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.1. Extraction des composés volatiles des hydrolysats..... | 40 |
| 3.3.2. Analyse des composés volatiles..... | 40 |
| 3.3.3. Interprétation des données chromatographiques..... | 41 |
| 4. Influence des fractions solubles et non solubles de l'hydrolysat de coproduits de la sole tropicale sur quelques paramètres zootechniques du poulet de chair de la souche Cobb 500..... | 41 |
| 4.1. Rations alimentaires..... | 41 |
| 4.2. Conduite de l'élevage des poussins..... | 42 |
| 4.2.1. Préparation du local..... | 42 |
| 4.2.2. Arrivée des poussins et démarrage de l'élevage..... | 43 |
| 4.2.3. Croissance et finition..... | 44 |
| 4.2.4. Abattage des animaux..... | 44 |
| 4.2.5. Calcul des paramètres zootechniques..... | 45 |
| 4.3. Analyse bromatologique des aliments..... | 45 |
| 4.3.1. Taux d'humidité, de matière sèche et de matière grasse..... | 45 |
| 4.3.2. Taux de cendre..... | 46 |
| 4.3.3. Taux de matière azotée totale | 46 |
| 4.3.4. Taux de cellulose brute..... | 46 |
| 5. Analyses statistiques..... | 47 |
| 5.1. Pour les analyses biochimiques..... | 47 |
| 5.2. Pour les analyses sensorielles..... | 47 |
| 5.3. Pour les tests de nutrition animale..... | 47 |
| | |
| CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION..... | 48 |
| I - Caractérisation biochimique des fractions protéiques issues de l'hydrolyse des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) | 48 |
| 1. Résultats..... | 48 |
| 1.1. Evolution de quelques paramètres biochimiques dans le culot et le surnageant de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysée par le complexe protéasique Protamex..... | 48 |
| 1.1.1. Taux de matière sèche..... | 48 |
| 1.1.2. Taux de protéine..... | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 1.1.3. Taux de cendre et de lipide..... | 50 |
| 1.1.4. Taux des substances organiques non dosées..... | 51 |
| 1.1.5. Profils moléculaires..... | 52 |
| 1.1.6. Degré d'hydrolyse..... | 54 |
| 1.1.7. Acides aminés..... | 54 |
| 1.2. Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur quelques paramètres biochimiques de la fraction soluble de l'hydrolysat des protéines des coproduits de la sole tropicale..... | 57 |
| 1.2.1. Taux de matière sèche des fractions protéiques..... | 57 |
| 1.2.2. Taux de protéine..... | 57 |
| 1.2.3. Degré d'hydrolyse..... | 58 |
| 1.3. Caractérisation aromatique des hydrolysats de coproduits de sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) et analyse sensorielle..... | 59 |
| 1.3.1. Caractérisation aromatique..... | 59 |
| 1.3.2. Analyse sensorielle..... | 60 |
| 2. Discussion..... | 63 |
| Conclusion..... | 68 |
| | |
| II-Influence des farines des fractions solubles et non solubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) sur quelques paramètres zootechniques du poulet de chair de la souche Cobb 500..... | 69 |
| 1. Résultats..... | 69 |
| 1.1. Caractérisation biochimique des rations alimentaires..... | 69 |
| 1.2. Consommation alimentaire individuelle quotidienne du poulet de chair de la souche Cobb 500..... | 70 |
| 1.3. Indices de consommation..... | 71 |
| 1.4. Taux de mortalité..... | 72 |
| 1.5. Masse vive moyenne..... | 73 |
| 1.6. Gain de masse moyenne quotidienne..... | 74 |
| 1.7. Masse de carcasse..... | 75 |
| 2. Discussion..... | 75 |
| Conclusion..... | 78 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 79 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 80 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Evaluation de la qualité de l'huile de Hareng..... | 26 |
| Tableau II : Composition des rations expérimentales | 42 |
| Tableau III : Plan de prophylaxie mis en œuvre lors de l'essai..... | 44 |
| Tableau IV : Evolution des taux de matière sèche (%) dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex..... | 49 |
| Tableau V : Evolution des taux de protéines (% de matière sèche) dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex..... | 50 |
| Tableau VI : Evolution des taux de lipides dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex..... | 51 |
| Tableau VII : Evolution des taux de cendres dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex..... | 51 |
| Tableau VIII : Evolution des taux des substances organiques non dosées dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex..... | 52 |
| Tableau IX : Evolution des taux d'acides aminés totaux, essentiels et du rapport acides aminés essentiels/ acides aminés totaux (% de matière sèche) dans le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse à 40°C et 50°C des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Tableau X : Evolution des taux d'acides aminés identifiés (% de matière sèche) dans le surnageant de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale (<i>Cynoglossus senegalensis</i>) au cours de l'hydrolyse à 40°C et 50°C des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex..... | 56 |
| Tableau XI : Tableau des descripteurs utilisés pour l'analyse sensorielle des hydrolysats et moyennes des notes attribuées..... | 61 |
| Tableau XII : Caractéristiques biochimiques des rations alimentaires..... | 70 |
| Tableau XIII : Influence des farines des fractions solubles et non solubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale sur les taux de mortalité des poulets de chair de la souche Cobb..... | 73 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Les principaux coproduits de poisson | 4 |
| Figure 2 : Les produits dérivés des coproduits de la sole tropicale..... | 5 |
| Figure 3 : Schéma du procédé enzymatique de fabrication de farines de poisson... | 27 |
| Figure 4 : Photo Soles tropicales (<i>Cynoglossus senegalensis</i>)..... | 30 |
| Figure 5 : Photo Carcasses de soles tropicales (<i>Cynoglossus senegalensis</i>)..... | 31 |
| Figure 6: Bioréacteur de laboratoire..... | 32 |
| Figure 7: Bioréacteur pilote | 32 |
| Figure 8 : Profil de chromatographie sur colonne capillaire CP-SIL 5 CB des coproduits de sole avant hydrolyse, après 10 min et 180 min d'hydrolyse à 40°C avec Protamex (0,1% p/p), sans contrôle de pH. ... | 53 |
| Figure 9 : Profil de chromatographie sur colonne capillaire CP-SIL 5 CB des coproduits de sole avant hydrolyse, après 10 min et 180 min d'hydrolyse à 50°C avec Protamex (0,1% p/p), sans contrôle de pH ... | 53 |
| Figure 10 : Influence du temps et de la température sur le degré d'hydrolyse des coproduits de soles à 40°C et 50°C en fonction du temps d'incubation..... | 54 |
| Figure 11 : Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur le taux de matière sèche dans les surnageants au cours de l'hydrolyse à 40°C avec Protamex à 0,1% p/p | 57 |
| Figure 12 : Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur le taux de protéines dans les surnageants au cours de l'hydrolyse à 40°C avec Protamex à 0,1% p/p..... | 58 |
| Figure 13 : Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur le degré d'hydrolyse à 40°C avec Protamex à 0,1% p/p..... | 59 |
| Figure 14 : Profils sensoriels des hydrolysats de coproduits de sole | 62 |
| Figure 15 : Cercle de corrélation ACP présentant les descripteurs sensoriels et les molécules identifiées..... | 62 |
| Figure 16 : Quantité d'aliments consommée par jour en fonction des régimes..... | 71 |
| Figure 17 : Indices de consommation du poulet de chair en fonction des régimes... | 72 |
| Figure 18 : Croissance des poulets en fonction des régimes..... | 74 |
| Figure 19 : Gain de poids journalier des poulets en fonction des régimes..... | 75 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-----------------|---|
| AAE | Acides aminés essentiels |
| AAT | Acides aminés totaux |
| ACP | Analyse en composante principale |
| AFNOR | Association Française de Normalisation |
| AGPI | Acide Gras Polyinsaturés |
| ALA | Alanine |
| ANOVA | Analyse de Variance |
| ASP | Asparagine |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| CAR-PDMS | Carboxen Poldiméthylsiloxane |
| CB | Cellulose Brute |
| CHS | Culot d'Hydrolysat de Sole |
| CIQ | Consommation Individuelle Quotidienne |
| DLC | Date limite de consommation |
| CO ₂ | Dioxyde de Carbone |
| CPG | Chromatographie Phase Gazeuse |
| Da | Dalton |
| DH | Degré Hydrolyse |
| DPM | Direction des Pêches Maritimes |
| EISMV | Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires |
| ESB | Encéphalopathie Spongiforme Bovine |
| FAO | Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture |
| FCFA | Francs de la Communauté Française d'Afrique |
| GLU | Glutamine |
| GLY | Glycine |
| GMQ | Gain Moyen Quotidien |
| HIDAOA | Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale |
| HIS | Histidine |
| HPLC | Chromatographie liquide à haute performance |
| HPP | Hydrolysat protéique de poisson |
| IC | Indice de Consommation |
| IFREMER | Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer |
| ILE | Isoleucine |
| INRA | Institut de Recherches Agricoles |
| IRL | Indice de rétention linéaire |
| ISRA | Institut Sénégalais de Recherches Agricoles |
| LCHS | Lot culot d'Hydrolysat de Sole |
| LEU | Leucine |
| LSCHS | Lot surnageant et culot d'hydrolysat de sole |
| LSHS | Lot surnageant d'hydrolysat de sole |
| LT | Lot Témoin |
| LYS | Lysine |
| MAT | Matière Azotée Totale |
| MET | Méthionine |
| MG | Matière Grasse |
| MM | Matière Minérale |
| MNI | Molécule Non Identifiée |
| MP | Matière Première |
| MS | Matière sèche |

| | |
|-----------------|--|
| NH ₃ | Ammoniac |
| PB | Protéines brutes |
| PHE | Phénylalanine |
| PRO | Proline |
| SCHS | Surnageant et Culot d'Hydrolysate de Sole |
| SER | Sérotonine |
| SHS | Surnageant d'Hydrolysate de Sole |
| SIDA | Syndrome Immuno Déficient Acquis |
| SPME | Solid Phase Micro Extraction |
| STBM | Sciences et Techniques de la Biomasse Marine |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| TM | Taux de Mortalité |
| TNBS | Trinitrobenzene Sulphonic Acid |
| TRH | Thréonine |
| TYR | Tyrosine |
| VAL | Valine |

RESUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des coproduits issus de la chaîne de transformation de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au Sénégal par la mise en œuvre d'hydrolyse enzymatique afin d'obtenir des protéines à haute valeur alimentaire. Des coproduits (viscères, têtes) de la sole tropicale, ont été hydrolysés avec l'enzyme Protamex®. Des degrés d'hydrolyse de 25% et 19% ont été obtenus respectivement à 40 et 50°C. Les résultats ont également montré que les protéines contenues dans ces coproduits sont totalement solubilisées par l'action de cette protéase au bout de 180 minutes d'hydrolyse à une température de 40°C.

La caractérisation biochimique a montré que ces hydrolysats sont riches en protéines (61%) et en minéraux (10%). Il ressort aussi de cette étude, que les hydrolysats contiennent des peptides de tailles moléculaires inférieures à 1760 Daltons. L'optimisation des conditions d'hydrolyse, nous a amené à faire varier la quantité d'eau utilisée au cours des hydrolyses dans le but d'avoir un procédé industrialisable pour lequel les dépenses liées à l'eau seront réduites. Pour ce faire, les effets de la variation du volume d'eau (10%, 25%, 50% et 100% p/p) au cours de l'hydrolyse enzymatique de coproduits de la sole tropicale par l'enzyme Protamex®, ont été comparés. Les résultats de cette étude ont montré que la réduction de moitié de la quantité d'eau dans le bioréacteur, permet de produire des hydrolysats avec la même proportion de protéines (60%) et ayant des degrés d'hydrolyse qui ne sont pas significativement différents. Enfin, ces hydrolysats ont une valeur nutritionnelle élevée pour les poulets de chairs car ils possèdent en quantité suffisante neuf (9) acides aminés essentiels pour l'alimentation animale.

Des tests de nutrition animale ont été réalisés chez des poulets de chairs. A cet effet, deux essais ont été réalisés sur 1200 poulets de souche Cobb 500 non sexés à partir de 14 jours d'âge. Les résultats ont montré que les protéines de coproduits favorisent la croissance des poulets. Les poids vifs à 6 semaines sont de 2369,60 g (lot 1), 2189,60 g (lot 2), 2298,05 g (lot 3) contre 2158,20 g (lot témoin), avec des GMQ moyens respectifs de 78,20 g, 66,72 g, 69,89 g et 68,30 g. Les poids de carcasse sont de 2112,43 g (lot 1), 1994,67 g (lot 2), 2081,75 g (lot 3) et 1989,22 g (lot témoin). La consommation alimentaire est influencée par le niveau et la nature des protéines en phase de finition. Toutefois, leur présence provoque une détérioration de l'indice de consommation pendant la finition ; il est de 2,30 (lot 1), 2,07 (lot 2), 2,05 (lot 3) et 2,0 (lot témoin).

La recherche d'éventuelles pistes de valorisation en nutrition humaine, nous a amené à effectuer une analyse sensorielle. Le profil sensoriel a été réalisé avec un jury de 14

personnes. Onze (11) profils ont été identifiés par ce panel de dégustation. Par ailleurs, la caractérisation aromatique a révélé que cinquante sept (57) molécules sont responsables de ces odeurs décrites en analyse sensorielle dont trente sept (37) ont été identifiées.

This scope of work relates to the valorization of the tongue sole (*Cynoglossus senegalensis*) by-products resulting from the processing chain in Senegal by the implementation of enzymatic hydrolysis in order to obtain high value proteins.

The by-products (viscera and heads) of tongue sole, were hydrolyzed with the Protamex® enzyme. Degrees of hydrolysis of 25% and 19% were obtained respectively with 40°C and 50°C. The results also showed that the proteins contained in these by-products are solubilized by the action of this protease at the end of 180 minutes of hydrolysis.

The biochemical characterization showed that these hydrolysates are rich in proteins (61%) and minerals (10%). However, the hydrolysates contain peptides of lower molecular sizes 1760 Dalton. For the optimization of hydrolysis conditions, the effectiveness of four different water ratio to hydrolyze sole by-products by using Protamex® were compared. It was found that by changing the hydrolysis conditions it was possible to produce hydrolysates with the same proportion of proteins (60%). Lastly, these hydrolysates have high nutritional value in order to set up table fowls because they have in big quantity nine (9) essential amino acids for the animal feed.

Finally, trials were carried out on 1200 chickens (cobb 500) since 14 days of age. The results showed that high nutritional value by-products proteins increase the growth of the birds. So, the live weights at 6 weeks are 2369.60 G (batch 1), 2189.60 G (batch 2), 2298.05 G (batch 3) against 2158.20 G (witness batch), with respective average GMQ of 78.20 G, 66.72 G, 69.89 G and 68.30 G. The carcass weights are 2112.43 G (batch 1), 1994.67 G (batch 2), 2081.75 G (batch 3) and 1989.22 G (witness batch). Food consumption seems little influenced by the level and the nature of proteins. However, their presence decreased the consumption index during the end of the study; it is 2.30 (batch 1), 2.07 (batch 2), 2.05 (batch 3) and 20.8 (witness batch).

To identify the future application of hydrolysates in human food, a sensory analysis was carried out. The sensory profile was performed with a jury of 14 specialized judges. 11 profiles were found by this panel of tasting. In addition, the aromatic characterization revealed that 57 molecules are responsible for these odours described in sensory analysis. The description of these aromatic compounds opens potential way of valorization of these hydrolysates in human consumption.

INTRODUCTION

Actuellement au Sénégal, une belle sole entière de 500 g coûte environ 1500 FCFA. Malgré ce coût élevé, une bonne partie de cette protéine animale (tête, peau, arêtes, nageoires et entrailles) se retrouvera à la poubelle. Aujourd'hui, la raréfaction des ressources halieutiques et l'institution de règles de protection des stocks conduisent à «mieux valoriser tout en pêchant moins». Ainsi, la notion de «déchets» doit-elle disparaître au profit de celle de coproduits. Au Sénégal, sur les 200 000 tonnes de produits marins annuellement transformés, le volume total de coproduits s'élève à 105 000 tonnes par an. La majeure partie de ce tonnage (80%) est utilisée pour une valorisation de masse (farine de poisson) essentiellement pour la nutrition animale.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse s'inscrit dans une perspective de gestion durable des ressources de la pêche, en contribuant au développement d'un procédé industrialisable de récupération de fractions protéiques à partir de coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) après hydrolyse enzymatique en bioréacteur. Les objectifs spécifiques de la présente thèse sont d'une part la production et la caractérisation biochimique de fractions protéiques obtenues à partir de l'hydrolyse enzymatique de coproduits de la sole et d'autre part l'étude de l'influence de ces fractions protéique sur quelques paramètres zootechniques du poulet de chair de la souche Cobb 500.

La production mondiale de poissons provenant des pêches et de l'aquaculture a été estimée à 143,6 millions de tonnes en 2006 (FAO, 2008). Une grande partie de ce tonnage a subi une transformation technologique en vue d'assurer la sécurité alimentaire. Au cours de cette noble action, une grande quantité de coproduits sous forme de têtes, de viscères, d'arêtes, de queues, de nageoires et de peaux ont été générés et abandonnés dans la nature. Cette pratique a entraîné des problèmes environnementaux. Les déchets ont été estimés à 50% du volume total (Je *et al.*, 2007). Malgré leurs grandes richesses en protéine, très souvent, ils ne font l'objet d'aucun traitement spécifique. Pourtant, la valorisation de ces coproduits, pourrait permettre à l'entreprise de gagner des devises supplémentaires et par conséquent de réduire les frais de retraitement qui devraient être élevés.

Les coproduits sont maintenant considérés comme des matières premières destinées à la production de nouvelles substances utilisables en nutrition animale, en cosmétique et en

santé humaine (antioxydants, antistress, anti-hypertensifs, collagènes, pigments...) (**Gbogouri et al., 2004; Guérard, 2006; Dumay et al., 2006; Nalinanon et al., 2008**). Leur hydrolyse enzymatique contrôlée, constitue une approche alternative d'un intérêt stratégique majeur pour réhabiliter ces biomasses et notamment leur fraction protéique. En effet, plusieurs auteurs ont montré qu'à l'issue de cette hydrolyse, la fraction soluble obtenue, généralement appelée «Hydrolysats Protéiques de Poisson, HPP» présente de nouvelles propriétés fonctionnelles (solubilité, propriétés foisonnantes, moussantes, émulsifiantes, etc.), nutritionnelles (digestibilité et allergénicité), organoleptiques (arômes) et/ou biologiques (antimicrobienne, antihypertensive, antioxydante, etc.) (**Hoylen et al., 1994; Pillevesse et al., 2006; Klompong, 2006; Huong et al., 2009**). Ces fractions à teneur protéique élevée (73 à 85 %) contiennent généralement de faibles taux d'éléments minéraux, car les arêtes osseuses non hydrolysables sont retirées. Ces hydrolysats ont donc l'avantage d'être digestes et d'avoir une haute qualité nutritive comme les matières premières d'origine animale utilisées en aquaculture (**Larbier et al., 1992**). Depuis 1973, un complexe de traitement enzymatique de coproduits de poissons a été mis en place à Boulogne. Les opérations se déroulent en plusieurs étapes: les coproduits de poisson sont broyés dans un réacteur enzymatique, les arêtes sont séparées de la chair, la partie liquide se transforme en un produit pâteux dont les qualités chimiques et bactériologiques sont contrôlées (**Cahu et al., 1999**). Au début, les hydrolysats étaient utilisés en remplacement des protéines du lait pour nourrir les veaux. En comparaison avec la caséine, les animaux nourris avec les hydrolysats de poisson gras, après un début de croissance plus lent, atteignent les mêmes masses au bout de quelques semaines (**Orskov et al., 1982; Mackie, 1982**). Aujourd'hui, ils interviennent beaucoup dans les aliments de sevrage du porcelet en l'aidant beaucoup à supporter le stress dû au sevrage précoce (**Strom & Eggum, 1981**). Par ailleurs, la médecine vétérinaire, la pharmacie humaine, la cosmétologie ainsi que la diététique sont les domaines d'utilisation des hydrolysats de poissons (**Aspmo et al., 2005**).

Une autre alternative de valorisation des coproduits de la sardine, consiste à obtenir des farines d'hydrolysat des protéines qui sont utilisées comme source de carbone et d'azote pour la production de biomasse et de métabolites. Il a déjà été montré que la synthèse des protéases a été fortement induite quand la souche de bactérie *Bacillus subtilis* a été cultivée dans un milieu contenant seulement les farines de têtes et de viscères de la sardine (*Sardinella aurita*) (**Ellouz et al., 2001**). Les hydrolysats protéiques ont été aussi utilisés comme source d'azote dans la croissance bactérienne soumise à une production d'enzymes (**Clausen et al.,**

1985; Dufosse' *et al.*, 2001; Ghorbel *et al.*, 2005; Gildberg *et al.*, 1989; Triki-Ellouz *et al.*, 2003).

Les déchets de poisson sont des sources importantes d'enzymes protéolytiques et de protéines. Les protéases représentent le plus important groupe des enzymes industrielles utilisées dans le monde aujourd'hui. Elles constituent environ 50% du volume d'enzymes de ce marché (Rao *et al.*, 1998). Les protéases ont diverses applications dans les industries du détergeant, alimentaire, agrochimique et pharmaceutique (Gupta *et al.*, 2002; Zukowski, 1992). Aujourd'hui, il y a une demande de plus en plus croissante d'enzymes protéolytiques de poisson dans les industries alimentaires. Les viscères, l'un des plus importants coproduits de l'industrie de poissons, ont une large potentialité biotechnologique. Elles représentent une importante source d'enzymes digestives notamment de protéases. Les plus importantes enzymes protéolytiques des viscères de poisson sont la pepsine (une protéase aspartique) et les sérines protéases telles que la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase (Gildberg, 1988; Martinez & Serra, 1989). Les enzymes digestives des viscères ont une grande activité catalytique dans de variables conditions de pH et de température (Gildberg, 1992; Shahidi & Kamil, 2001). Les protéases digestives des poissons sont localisées dans la muqueuse gastrique, dans le coecum pylorique, dans les tissus pancréatiques et dans la muqueuse intestinale (Fänge & Grove, 1979; Kapoor *et al.*, 1975). La muqueuse gastrique et les tissus pancréatiques sécrètent les protéases dans la lumière du canal alimentaire alors que la muqueuse intestinale produit des protéases localisées en bordure des cellules épithéliales (Fänge & Grove, 1979). La quantité totale et les types de protéases présentes dans le tube digestif du poisson dépendent des aliments consommés (Dabrowski & Glogowski, 1977; Fänge & Grove, 1979; Kuz'mina & Golovanova, 2004). Les protéases acides des estomacs de poisson montrent une grande activité catalytique dans la zone de pH compris entre 2,0 et 4,0. Cependant, les protéases alcalines comme les trypsines, sont plus actives entre pH 8,0 et pH 10,0 (Jellouli *et al.*, 2009). Elles sont inactives et instables aux pH acides (Fänge & Grove, 1979; Simpson, 2000). Ces protéases ont de grandes activités catalytiques à faibles concentrations (Haard, 1998). Ces caractéristiques sont à la base de leur utilisation dans de nombreux processus de transformation dans les industries alimentaires. Aussi, les enzymes de poisson, sont elles utilisées pour produire des peptides bioactifs à partir des extraits protéiques de poisson.

Chapitre 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-Coproduits et facteurs influençant leur disponibilité

1-Définition et principaux éléments constitutifs

Les coproduits sont les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de transformation. La tête, la peau, les chutes de filetage, les arêtes centrales, les viscères et le foie constituent les principaux coproduits de poisson. Selon les périodes de pêche, les éléments reproducteurs tels que les œufs ou la laitance peuvent figurer parmi ces coproduits (**Guerard *et al.*, 2006, Figure 1**). Les coproduits destinés à la valorisation doivent normalement être traités selon le même procédé et conservés dans les mêmes conditions que les parties destinées à la production alimentaire, garantissant ainsi leur qualité hygiénique. Car, les protéines, principaux constituants des coproduits de la pêche, sont facilement altérables (**Parra *et al.*, 2007**).

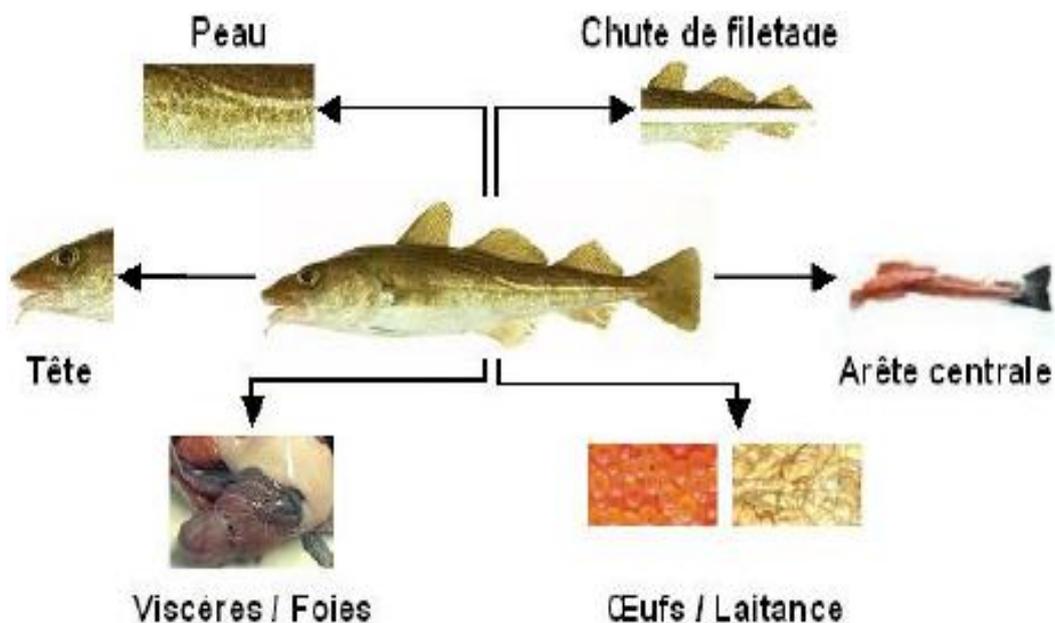


Figure 1: Principaux coproduits de poisson

2-Produits dérivés

2-1-Définition

Un produit dérivé est le produit commercial obtenu à partir d'un coproduit. Il pourra donc donner plusieurs produits dérivés (Guerard *et al.*, 2004, Tableau I et Figure 2).

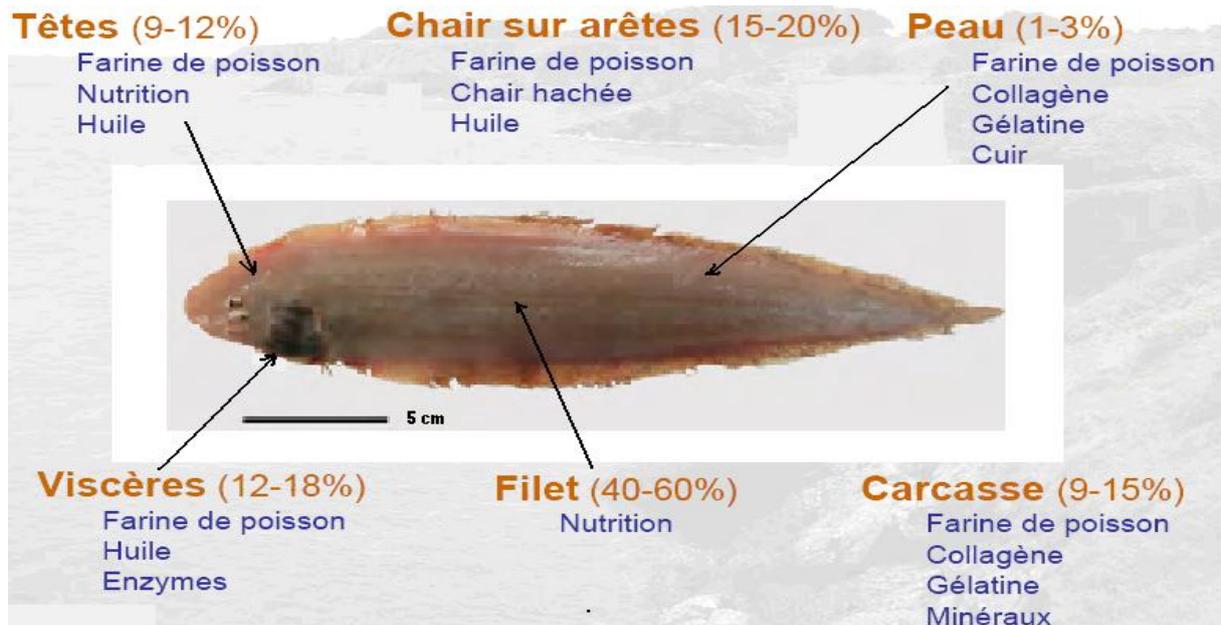


Figure 2: Produits dérivés des coproduits de la sole tropicale (d'après Guerard *et al.*, 2004)

2-2-Produits dérivés des coproduits de la pêche en Afrique

Les farines, l'huile et le compost sont les principaux coproduits dérivés de poisson rencontrés essentiellement au Sénégal (Barro, 2004). Au Maroc, il existe une diversité de produits dérivés de coproduits de poisson (FAO, 2001). Il s'agit de:

- boulettes de surimi constituées de surimi de sardine mélangé avec du calamar haché et frit dans l'huile. Ces boulettes sont conditionnées dans des sachets de 130g ;
- saucisses de surimi de sardine, dont le surimi est le constituant principal et mélangé à d'autres ingrédients;
- hamburger à base de surimi de sardine, composé de 60% de surimi, de 10% de viande hachée de bœuf et de 5% de graisse de mouton et de 25% d'autres ingrédients.

2-3-Produits dérivés des coproduits de la pêche en Asie

En Asie, il y a une plus large gamme de produits dérivés des coproduits de la pêche.

2-3-1-Ailerons, cartilage et huile de foie de requin

Ces coproduits auraient des vertus thérapeutiques et seraient très recherchés aux Etats Unis d'Amérique et ailleurs. La soupe d'ailerons serait bénéfique à la santé. Elle aurait des effets aphrodisiaques. Elle serait un repas très prisé pendant les fêtes telles que les mariages en Asie. Près de 20 milles tonnes d'ailerons sont produits puis séchés, par an, à Jakarta; ce qui représente environ 20 millions de dollars. La collecte se fait à Hong Kong, puis les ailerons sont transportés en Chine pour le nettoyage à moindre coûts. Le travail consiste à bouillir et à enlever la peau des ailerons sans abîmer la chair. Après nettoyage, ils sont retournés à Hong Kong pour être vendus un peu partout dans le monde. Comme les ailerons sont sans goût; leur préparation nécessite une bonne cuisson pendant 10 h de temps avec l'ajout d'ingrédients. L'huile de foie de requin, mise à part ses propriétés curatives, peut prévenir le cancer, les attaques cardiaques et l'hépatite. Les chercheurs américains auraient découvert qu'elle a un composant qui peut traiter le Syndrome Immuno Déficient Acquis (SIDA) (**Nilsang *et al.*, 2005**).

2-3-2-Chitine et chitosane

La chitine et le chitosane, dérivés des cuticules de crevette, de crabe et d'autres crustacés, sont récupérés et utilisés comme matières premières importantes au Japon. Ces dernières années ont été marquées par une augmentation des préparations diététiques de chitosane ayant des vertus thérapeutiques et sanitaires. La chitine et ses dérivés ont été testés par des chercheurs européens, japonais et américains dans des expérimentations médicales et dans les domaines alimentaires et nutritionnels. Le cartilage de requin est utilisé sous forme de rayons d'ailerons décoratifs par les chinois (**Subasinghe, 1999**).

2-3-3-Peau

Des articles (sacs, chaussures, ceintures, robes et porte-clefs) sont fabriqués à partir de peaux de poisson. Pour obtenir des peaux de qualité, le pelage doit se faire une fois le poisson sorti de l'eau. De préférence, les peaux doivent être proprement nettoyées sans aucun morceau de chair. Elles sont ensuite conditionnées dans des films de polyéthylène par bloc de 10 kg puis congelées. Il s'agit généralement de la peau de perche, de saumon ou du tilapia (**Yu et al., 1990**).

2-4-Produits dérivés des coproduits de la pêche en Europe

Divers sous produits peuvent être obtenus à partir des coproduits de la pêche. Ce sont les farines et huiles de poisson, les hachis, les hydrolysats protéiques et les ensilages de crevettes et de poisson.

2-4-1-Farines et huiles de poisson

Cette valorisation est actuellement la plus importante, car tous les coproduits peuvent être utilisés sans distinction. Aucun tri n'est nécessaire, seule la distinction coproduits issus de poissons sauvages ou d'élevage doit être faite. L'huile de foie de morue, naturellement riche en vitamines A et D, favorise la fixation de calcium et participe à la consolidation des os et des dents. La vitamine A joue également un rôle dans le mécanisme de la vision. L'huile de foie de morue est particulièrement bénéfique pour la croissance des enfants. Les Omega 3 issus de l'huile de poissons de mers du Sud sont très riches en acides gras polyinsaturés. Leur forme triglycéride joue un rôle préventif pour les maladies cardiovasculaires (**Dumay, 2003**).

2-4-2-Hachis

Les hachis sont destinés à la fabrication d'aliments pour animaux domestiques essentiellement les chiens et chats. Lors de leur fabrication, les coproduits sont éviscérés, broyés, filtrés puis congelés en bloc. Ils sont une très bonne source de protéines (**Suzanne, 1998**).

2-4-3-Ensilage de crevettes et de poisson

L'ensilage de crevettes résulte du fait que pendant leur transformation, les enzymes présentes naturellement dans les viscères digèrent les protéines. Elles favorisent aussi l'obtention d'un liquide utilisable comme aliment pour animaux (ruminants et volailles) (**Hall et al., 1994**). L'ensilage de poisson a une haute valeur nutritive et est très utilisé pour l'alimentation des poissons en aquaculture (**Djiba, 1992**). Il s'agit d'incorporer 3% d'acide formique dans 10 kg de déchets de thons cuits. L'hydrolysate obtenu en fin de liquéfaction (18 jours) donne, après fermentation, 84 % de pâte de pH stable à 4,03 contre 16% de perte (**Djiba, 1992**).

3-Facteurs influençant la disponibilité des coproduits de la pêche

3-1-Surpêche et gaspillage

La surexploitation n'est pas un problème récent. Elle existait déjà dans l'atlantique Nord et dans le Pacifique au début des années 1890. La surexploitation a été à la base de la conférence de Londres sur la surpêche en 1946. Les captures en mer dépassent aujourd'hui 90 millions de tonnes par an tandis que la population mondiale a doublé en 50 ans. La production halieutique a quintuplé au cours de la même période. Dans le monde entier, la consommation par habitant des produits de la mer a augmenté. Cependant, depuis peu, alors que les pêcheries continuent de s'intensifier, les captures diminuaient. La pêche excessive met en danger la biodiversité marine. De nombreuses espèces sont en voie d'extinction. Autrefois, les gros poissons comme les raies, les morues, les dorades ou mérus étaient abondantes; mais actuellement, elles sont menacées de disparition dans certains océans (**Olivia-Teles et al., 1999**).

Une grande quantité de ressources aquatiques capturées a été rejetée dans la mer. Selon la **FAO (2008)**, ces ressources s'élèvent entre 30 à 40 millions chaque année dans le monde, soit 20 à 25% des captures. Le rejet des captures occasionne des coûts pour les pêcheurs (trilage et déversement des rebuts) et ne produit pas de recettes. Au Sénégal, de 1996 à 1998, environ 90 275,5 tonnes de poissons constitués essentiellement de chinchard, de pageot, de raie, de volute et de sole ont été rejetés, soit une perte de 2.157.403 Euros (**Coly, 2000**). Les pertes, après les débarquements à quais, sont estimées à 54 000 tonnes en 1996, à 96 000

tonnes en 2003 (**DPM, 2003**). Elles peuvent être dues à des problèmes d'ordre technique (rupture de la chaîne de froid), à l'infestation des poissons, à la brisure, aux mauvaises conditions de conservation, au stockage et à la distribution. D'autres facteurs contribuent au gaspillage; c'est le cas de l'utilisation de filets dormants et de sennes tournantes capturant les espèces non cibles. L'ensemble entraîne une perte énorme en protéines valorisables par les industries de fabrication de poisson, une baisse des emplois et des exploitations (**Coly, 2000**).

3-2-Impact de la pollution et de la dégradation de l'environnement marin

La détérioration des écosystèmes aquatiques, dans les zones côtières, est aujourd'hui assez fréquente. Dans ces zones, comme ailleurs, la dégradation de l'environnement est liée au fait que ceux qui exploitent le milieu côtier ne s'intéressent qu'aux aspects économiques du travail. Ils ne pratiquent aucun contrôle sur l'état de santé de l'écosystème côtier (**Martone et al., 2005**). La pollution marine est due à une introduction directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie dans un milieu marin (**Djiba, 1992**). Cette pollution est surtout due aux déchets industriels des bateaux, aux industries pétrolières et aux eaux usées des égouts. Elle peut avoir des effets nuisibles pour les ressources biologiques et pour la santé de l'homme (**Coly, 2000**). La pollution entrave la pêche et altère aussi la qualité de l'eau de mer et de l'écosystème marin. La pollution marine peut entraîner des changements climatiques. Elle a probablement de nombreuses conséquences qui demeurent inconnues. C'est pour ces raisons que le Sénégal a pris des mesures fermes, en ratifiant la convention internationale pour la prévention de la pollution des eaux de la mer par les hydrocarbures et s'est engagé dans la lutte contre la pollution de l'environnement marin (**Djiba, 1992**).

3-3-Effets de la croissance démographique

Selon la **FAO (2008)**, la consommation de poissons par habitant passerait de 16 kg en moyenne aujourd'hui à 19-21 kg en 2030. Elle augmenterait de 57% dans les pays en développement et de 4% dans les pays industrialisés. D'ici 2016, sous l'effet de la poussée démographique et de l'accroissement du revenu disponible des ménages, la demande mondiale de poisson, à des fins de consommation alimentaire, s'établira probablement à 110 millions de tonnes. C'est pourquoi, il y aura une baisse de la disponibilité mondiale en produits halieutiques, liée à une vitesse de croissance de la population mondiale, plus rapide que celle de la production totale de poisson destinée à l'alimentation (**Dumay et al., 2006**).

Cette pression démographique et l'absence de politique rigoureuse de conservation et de gestion des ressources halieutiques confèrent aux pêches un attrait accru. Cette manière de faire ouvre des perspectives d'emploi et augmentent ainsi le risque d'aggravation de la surpêche (**Je et al., 2007**).

3-4-Attrait du secteur des coproduits de la pêche

3-4-1-Intérêt du poisson

Les océans apparaissent comme des réserves d'organismes variés. La biodiversité marine attire les chercheurs et plus récemment les industriels pour les perspectives de découvertes de nouvelles molécules. L'intérêt est d'autant plus important que leur valorisation est possible dans des secteurs aussi divers que la santé, la chimie, l'alimentation, l'environnement et la cosmétique (**Huong et al, 2007 ; Kechaou, 2009**). L'intérêt pour le poisson réside principalement dans ses qualités nutritionnelles et dans le vaste choix disponible au niveau du goût, de la texture ou de la forme. Les protéines de poissons, plus digestes que celles de la viande; sont riches en acides aminés essentiels. La teneur en lipides des poissons varie selon l'espèce, ce qui permet de distinguer les poissons "maigres" des poissons "gras". La plupart des lipides des poissons sont des triglycérides ou des acides gras essentiels tels que l'acide linoléique, l'acide linoléique ou l'acide arachidonique. Les poissons sont riches en oméga 3 et 6. Ils sont aussi pauvres en glucides et riches en sels minéraux (**Je et al., 2005**).

3-4-2-Atouts des coproduits d'origine marine

Le dynamisme de la filière des coproduits aquatiques est fondé sur les attentes des consommateurs qui influent de façon non négligeable sur le développement des marchés des aliments, de la cosmétique et de la diététique (**Guerard et al., 2006**). Suite aux répercussions des crises de l'Encéphalite Spongiforme Bovine (ESB) sur les produits d'origine carnée, la recherche de produits de substitution a permis aux produits naturels issus du milieu marin, d'acquérir une image très positive. Cette image est un atout de taille pour les marchés de la cosmétique et de la diététique. Le marché des huiles de poissons aux effets bénéfiques reconnus pour la santé et la prévention des maladies cardio-vasculaires en est un exemple (**Hoylen et al., 1994**). Actuellement, de nombreuses recherches, effectuées sur les

biotechnologies marines, conduisent à la découverte de nouvelles molécules, de nouveaux produits naturels ou procédés chimiques. Une fois les molécules intéressantes identifiées, il faut encore trouver un moyen de les produire à l'échelle industrielle. L'essentiel de la recherche de développement est donc lié à l'optimisation des procédés de production.

3-5-Contraintes à la valorisation des coproduits d'origine marine

Les produits dérivés des coproduits aquatiques sont directement en concurrence avec ceux issus de la filière viande, laquelle a mis en place depuis plus longtemps ses circuits de recyclage et de valorisation des coproduits. Enfin, les produits dérivés obtenus semblent moins compétitifs, en raison de coûts de production plus élevés.

3-5-1-Contraintes réglementaires

Les contraintes réglementaires portent plus particulièrement sur deux modes de valorisation:

- la valorisation par les produits diététiques et nutraceutiques souffre d'une réglementation internationale restrictive. En effet, cette réglementation ne reconnaît et n'autorise qu'un très petit nombre de compléments alimentaires. Ils sont destinés à être ingérés en complément de l'alimentation courante afin de pallier l'insuffisance réelle ou supposée des apports journaliers;
- la valorisation par les pulpes alimentaires est plus difficilement réalisable en Afrique que dans les pays européens. Au Sénégal, la fabrication des pulpes d'arêtes doit être réalisée sur place et sans délai après l'opération de filetage, ce qui interdit tout transport de coproduits destinés à cet effet (**Parra *et al.*, 2007**).

3-5-2-Contraintes technico-économiques

Les quantités disponibles par type de coproduits et par espèce sont limitées du fait du caractère pluri-spécifique des pêcheries françaises et de l'atomisation des ateliers de mareyage. En revanche, les coproduits issus des industries de conserverie ou de saurisserie présentent l'avantage d'être monospécifiques et plus concentrés géographiquement que ceux issus du mareyage (**Nilsang *et al.*, 2005**). Le coût de revient des coproduits prêts à l'emploi est élevé du fait du circuit de collecte impliquant plusieurs étapes : tri, lavage, congélation

stockage et transport (**Guérard *et al.*, 2006**). La qualité intrinsèque des coproduits varie en fonction de l'espèce et des saisons. Cette matière première est donc difficile à standardiser, contrairement à la filière viande où les espèces sont sélectionnées et les conditions d'élevage standardisées (**Huong *et al.*, 2007**).

3-5-3-Contraintes humaines

Le frein majeur à la valorisation des coproduits, au niveau de la filière amont, semble être la faible prise de conscience des producteurs. Les coproduits, pour être valorisés, doivent être considérés comme des matières nobles, au même titre que les produits finis tels que les filets et les darnes (**Huong *et al.*, 2007**).

II-Valorisation des coproduits par hydrolyse enzymatique

L'utilisation de méthodes enzymatiques pour la récupération de lipides ou de protéines d'origine marine est une bonne alternative aux traitements mécaniques ou chimiques qui entraînent des dommages ou une moins bonne récolte du produit. Les enzymes sont actives à très faibles concentrations et sous des conditions douces de température et de pH. Le procédé enzymatique varie selon la nature du coproduit traité. Le type d'enzymes utilisées pour l'extraction est directement lié à la nature de la molécule à extraire. Par exemple, les protéases sont utilisées pour la solubilisation des protéines des coproduits mais aussi pour améliorer l'extraction de lipides des tissus de poissons (**Dumay, 2006**).

1-Importance et classification des enzymes

1-1-Définition, classe et importance

Les enzymes sont des protéines peu stables et solubles en phase aqueuse. Elles ont été mises en évidence à la fin du 19^{ème} siècle. Les principales propriétés des enzymes sont leur spécificité et leur régulation. Il existe 10 000 enzymes (autant que de réactions) dont seulement 3 196 ont été répertoriées en 1992 (**Kechaou *et al.*, 2009**). Les enzymes, par leur efficacité et leur spécificité, catalysent les réactions chimiques essentielles pour la vie. Comme tout catalyseur, elles n'interviennent pas dans la réaction et sont retrouvées intactes à

la fin de la réaction. Ces biocatalyseurs augmentent spécifiquement et de façon remarquable la vitesse des réactions du métabolisme. Il existe six classes d'enzymes : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases, avec chacune une action particulière (**Dumay et al., 2004**). Leur utilisation est rendue difficile par leur instabilité. L'activité catalytique est souvent perdue en quelques heures. Il faut les immobiliser pour les utiliser en biotechnologie. Cette technique permet la réalisation de biocapteurs ou bioréacteurs. Les enzymes utilisées dans les procédés de valorisation des coproduits de la pêche peuvent avoir trois origines différentes: soit ce sont les enzymes endogènes du poisson (enzymes digestives ou tissulaires), soit ce sont les enzymes produites par les bactéries présentes dans le milieu, ou encore ce sont des enzymes commerciales, ajoutées pour accélérer le processus.

1-2-Principe de classification

1-2-1-Classification fonctionnelle

La classification fonctionnelle ou internationale est la plus ancienne des classifications des hydrolases. Elle est basée sur le type de réaction catalysée et la spécificité de substrat. Chaque enzyme reçoit un numéro EC. Le premier chiffre de ce numéro classe l'enzyme suivant son activité. Le second chiffre désigne le type de fonction affectée par l'activité enzymatique. Le troisième et le quatrième chiffres permettent de préciser le substrat. Les numéros correspondant aux glycosides hydrolases sont donc du type EC 3.2.1.x, "x" dépendant du substrat. Ainsi, en décomposant un numéro EC nous avons accès à la spécificité d'une enzyme d'une façon systématique. Par exemple, les endo-beta-(1,3)-glucanases, référencées sous le numéro EC 3.2.1.39, sont : (3) des hydrolases ; (2) des glycosylases ; (1) des *O*-glycosidases ; (39) hydrolysant les liaisons beta-(1,3) des beta-(1,3)-glucanes. Les beta-glucosidases sont identifiées par EC 3.2.1.21 (**Sarry, 2001**). Cependant la classification de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) ne tient pas compte des caractéristiques structurales, c'est-à-dire des similarités de séquences protéiques et donc de la structure tridimensionnelle et du mécanisme d'action (inversion ou rétention de configuration), des enzymes. Elle ne tient pas non plus compte du fait que ces enzymes peuvent agir sur différents substrats, et est donc mal adaptée à la description des glycosides hydrolases (**Beldman et al., 1985; Bonnin et al., 1997**).

1-2-2-Classification moderne

Avec le nombre de plus en plus croissant d'enzymes purifiées et caractérisées dont les structures primaires et tertiaires ont été déterminées, une classification rigoureuse s'imposait. Différentes classifications ont été proposées et elles se sont attachées à les regrouper en clans, familles et sous-familles, à l'intérieur de chaque groupe majeur de mécanisme catalytique (**Henrissat *et al.*, 1989; Rawlings & Barrett, 1993**) et en fonction de leur comportement en présence d'inhibiteurs protéasiques spécifiques (**Beynon & Bond, 1989**). Selon **Rawlings & Barrett (1993, 1995)**, le "clan" est le terme utilisé pour décrire un groupe de membres de familles ayant évolué à partir d'une seule protéine ancestrale, mais qui ont divergé à tel point qu'on ne peut plus prouver leur lien de parenté par comparaison de leur structure primaire. La différence fondamentale entre les familles au sein d'un clan réside au niveau de la structure tertiaire.

1-2-3-Classification des protéases

Le nom du clan est formé de deux lettres: la première lettre représente le type catalytique et la seconde est ajoutée arbitrairement (MA : Métallopeptidases du clan A). Le type catalytique se réfère à la nature chimique des groupes responsables de la catalyse des protéases. Ainsi, chez les types sérine ou thréonine peptidase, le groupe catalytique nucléophile est généralement le groupe hydroxyle d'un résidu de sérine ou de thréonine au site catalytique. Pour le type cystéine, c'est le groupe sulfhydryle et dans le cas des types acide aspartique et métallopeptidase, c'est une molécule d'eau activée. Une "famille" de peptidases est un groupe dans lequel tout membre montre un lien statistiquement significatif d'homologie de séquence en acides aminés au niveau du site actif avec au moins un autre membre de la famille. Selon ces auteurs, pour certaines familles plus complexes, la subdivision en sous-familles est utilisée. Chaque famille est nommée avec une lettre et un nombre; la lettre représentant le type catalytique et le nombre est assigné arbitrairement (M1 : Métallopeptidases de la famille 1). Les peptidases à sérine, thréonine et cystéine sont très différentes de celles à acide aspartique et à métal car elles sont non seulement les seules à pouvoir se comporter volontiers comme des transférases, mais aussi à cause de l'acte

catalytique. Les protéases sont divisées en deux groupes selon leurs mécanismes d'hydrolyse: les endoprotéases et les exopeptidases. Les endoprotéases coupent les liaisons peptidiques situées à l'intérieur des protéines pour libérer des peptides, alors que les exopeptidases telles que les carboxypeptidases ou les aminopeptidases, dégradent les peptides à partir des extrémités pour donner des acides aminés (**Huong et al., 2007**). Il existe 4 classes majeures de protéases selon la spécificité de clivage: les sérines protéases (EC3.4.21), les cystéines protéases (EC3.4.22), les protéases aspartiques (EC3.4.23) et les métalloprotéases (EC3.4.24) (**Guerard, 2006**).

a-Peptidases à sérine

Les peptidases à sérine sont regroupées actuellement en 10 clans, 40 familles et 52 sous-familles par comparaison des structures tertiaires et l'ordre des résidus d'acides aminés dans la séquence catalytique (**Barrett et al., 1998**). Le clan le plus important est SA, à l'intérieur duquel on trouve la famille S1, la plus représentée de ce clan et qui contient les enzymes les plus connues des peptidases à sérine (trypsine et chymotrypsine). Ces peptidases comptent une trentaine de familles, qui diffèrent les unes des autres par leur séquence en acides aminés (**Barrett et al., 1998**). Elles sont d'origines diverses et sont rencontrées chez les mammifères, dans le pancréas (trypsines, chymotrypsines, élastases, kallikreines) et le sang (facteur Xa, thrombine). Ces familles sont aussi présentes chez les micro-organismes (subtilisine, V8, protéinase K,...) et les invertébrés (collagénases). La souche GX6638 de l'alcalophile *Baccillus sp.* contient plusieurs protéases dont deux sont des protéases à sérine. Ces deux enzymes protéolytiques possèdent des activités estérasiques. La protéase AS est très stable en milieu alcalin où elle conserve 88% de son activité à pH 12 pendant 24 h à 25°C. La protéase HS possède à son tour une thermostabilité exceptionnelle. A pH 9,5, l'enzyme a une demi vie de 100 min à 50°C et 25 min à 60°C (**Durham et al., 1987**). Quant à la protéase à sérine de la bactérie photosynthétique *Rubrivivase gelatinosus* KDDS1, elle a un pH optimum d'hydrolyse de 9,6 et une température optimale d'hydrolyse de 45°C. Cette protéase est stable aux pH compris entre 7 et 10 à 4°C pendant 14 heures. Elle est inhibée par un seul inhibiteur des protéases à sérine: le PMSF (Phénylméthylsulfonylfluoride). Cette enzyme protéolytique préfère les résidus méthionyle et phénylalanyle en position P₁, ce qui fait d'elle l'unique protéase à sérine préférant le résidu méthionyle (**Kobei et al., 2004**). Une autre protéase à sérine d'origine animale, isolée des myofibrilles du muscle du lézard *Saurida undosquamis* est quant à elle, inhibée par les inhibiteurs de protéases à sérine tels que le leupeptine, le TLCK

(Tosylchlorométhylketone), l'inhibiteur trypsinique de soja, l' α_1 -antitrypsine et l'aprotinine. Cette enzyme ne reconnaît que la liaison peptidique engageant uniquement le groupement carboxylique de l'arginine (**Ohkubo et al., 2004**).

b-Peptidases à thréonine

Cette classe d'hydrolases a été seulement reconnue depuis une décennie, et sa connaissance est en pleine évolution (**Barrett et al., 1998**). Ces biocatalyseurs hydrolytiques sont regroupés au sein d'un même clan (nommé TA), à l'intérieur duquel les peptidases sont divisées en cinq familles (T1A, T1B, T2, T3 et T5). Le nucléophile est la thréonine mais il peut être la sérine ou la cystéine. La nature des autres acides aminés du site actif reste à élucider, malgré qu'il soit connu qu'au cours de l'hydrolyse, le proton est fourni par le groupe aminé N-terminal. Il faut noter que toutes les peptidases de ce groupe sont des endopeptidases et des exemples sont connus chez les bactéries, les archaées et les eucaryotes mais pas chez les virus.

c-Peptidases à cystéine

Les peptidases à cystéine regroupent plusieurs cathepsines lysosomales de mammifère, les peptidases cytosoliques activées par le calcium (calpaïnes) et les peptidases de plantes (la papaïne et l'actinidine). La papaïne demeure le membre le mieux étudié de ce groupe (**Drenth et al., 1971**). Les peptidases à cystéine sont constituées de 8 clans, 56 familles et 65 sous-familles. Elles ont pour nucléophile, le groupe sulfhydryle du résidu Cys. Leur mécanisme catalytique est similaire à celui du type des peptidases à sérine dans lequel un nucléophile et un donneur de proton sont exigés. Le donneur de proton chez toutes les peptidases à cystéine identifiées à ce jour, est le résidu His. Cependant, dans certaines familles, un troisième résidu est nécessaire pour orienter le noyau imidazole de l'histidine. Les réactions catalysées par les peptidases à cystéine procèdent *via* la formation d'un thio-ester intermédiaire. L'ordre des résidus de la cystéine et de l'histidine (Cys/His ou His/Cys) dans la séquence linéaire des acides aminés du site catalytique diffère entre les familles; ce qui laisse supposer que les peptidases à cystéine ont évolué à partir de plusieurs origines séparées (**Rawlings & Barrett, 1994**).

d-Peptidases à acide aspartique

Elles sont regroupées en 6 clans à l'intérieur desquels il y a 13 familles et 20 sous familles dont les structures tertiaires des peptidases sont connues. Le clan majoritaire est AA. Il comprend la famille la plus importante (A1), dans laquelle se trouve la pepsine A, la chymosine, la rénine et la penicillopepsine. Les peptidases décrites sont des endopeptidases (**Barrett *et al.*, 1998**). A la différence des peptidases à sérine et à cystéine, ce groupe d'enzymes tout comme celui des métallopeptidases ne forme pas de complexe intermédiaire covalent. De ce fait, ce groupe catalyse les liaisons peptidiques sans l'utilisation de l'attaque nucléophile par un groupe fonctionnel de l'enzyme (**Hofmann & Fink, 1984 ; Hofmann *et al.*, 1984 ; Dunn & Fink, 1984**).

e-Peptidases à acide glutamique

Les peptidases à acide glutamique représentent le type le moins représentatif des peptidases. Elles sont regroupées en un "clan" (GA) à l'intérieur duquel il y a une seule famille (G1) caractérisée par une seule sous-famille (G1). La peptidase acyaltidoglutamique du micro-organisme *Scytalidium lignicolum* dont la structure est connue, fait partie de ce groupe de peptidases.

f-Métallopeptidases

Comme leur nom l'indique, les métallopeptidases ne peuvent fonctionner sans la présence, dans leur site actif, d'un atome de métal, ce qui les différencie des protéases dont la catalyse est uniquement assurée par des acides aminés de la protéine. Elles sont très largement répandues dans le monde vivant, aussi bien chez les bactéries et les champignons que chez les organismes supérieurs. Les métallopeptidases, *via* la maturation et la dégradation des peptides ou de protéines, participent à la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques vitales. Les métallopeptidases font partie des hydrolases chez lesquelles une molécule d'eau sert d'intermédiaire à l'attaque nucléophile d'une liaison peptidique. C'est une caractéristique qu'elles partagent avec les peptidases à acide aspartique, sauf que chez les métallopeptidases, un cation divalent, habituellement le zinc, mais quelques fois le cobalt ou le manganèse,

active la molécule d'eau. L'ion métallique est maintenu en place par interaction avec les résidus d'acides aminés, habituellement au nombre de trois. Les ligands du métal connus chez les métallopeptidases, sont les résidus His, Glu, Asp ou Lys. En plus de ces ligands, au moins un autre résidu est exigé pour la catalyse. C'est le résidu Glu chez la plupart des métallopeptidases, mais dans certains cas le résidu Lys ou Arg peut être impliqué dans la catalyse (c'est le cas pour la leucyl aminopeptidase) ou le résidu Tyr (certaines peptidases des sous-familles Astacine et Serralysine). Par ailleurs, il faut souligner que le rôle de la Glu n'est pas établi de façon définitive. Initialement, on a pensé qu'elle agissait selon un mécanisme général de catalyse basique (**James, 1993**), mais une autre observation récente suggère plutôt un rôle électrophile (**Mock & Stanford, 1996**).

Les métallopeptidases sont regroupées en 15 clans, 52 familles et 77 sous-familles (**Barrett *et al.*, 1998**):

- les clans *MA* et *MB*

Ces clans regroupent à eux seuls près de la moitié des enzymes des familles et sous familles des métallopeptidases. Les ligands du zinc de ces protéases sont des résidus His dans le motif His-Glu-Xaa-Xaa-His (pour *MA*) ou His-Glu-Xaa-Xaa-His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-His/Asp (pour *MB*) où Xaa, représente un acide aminé quelconque.

- le clan *MC* et les autres clans

Le clan *MC* regroupe les métallo-carboxypeptidases. Il est constitué d'une seule famille (*M14*) qui contient aussi bien des enzymes animales (carboxypeptidases A et B) que bactériennes (carboxypeptidase T et γ -D-glutamyl (L)-mésodiaminopimélate peptidase D).

- les autres clans

Ils se rapprochent de l'un ou l'autre des clans *MA*, *MB* ou *MC*, mais diffèrent de ceux-ci et de chacun d'entre eux par les structures tridimensionnelles, l'agencement des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse enzymatique et le lien de parenté ancestral des peptidases qui les constituent.

g-Peptidases dont les types catalytiques sont inconnus

Certaines peptidases déjà caractérisées, n'ont pas pu être classées dans l'un quelconque des types catalytiques, du fait que leur mécanisme d'action chevauche deux types catalytiques ou tout simplement, parce que le motif du site actif et l'inhibiteur spécifique de groupe appartiennent à deux types catalytiques différents. On dénombre des familles de métallopeptidases qui ne peuvent être encore assignées à un clan. Parmi elles, dix possèdent le

motif HEXXH mais pas les autres caractéristiques des clans MA ou MB, et les autres, ne possèdent aucun motif similaire à un quelconque clan des métallopeptidases (**Barrett et al., 1998**). Dans ce groupe de peptidases dont le type catalytique est inconnu, on peut citer:

- le facteur de sporulation SpoIIIGA de *Bacillus subtilis* (U4);
- l'endopeptidase de la muréine de *Escherichia coli* (U6);
- la peptidase du bactériophage T4 (U9);
- la collégenase de *Porphyromonas gingivalis* (U32);
- la peptidase du bactériophage HK97 (U35);
- l'endopeptidase (protéine P5 de la muréine) du bactériophage phi-6 (U40);
- la prényl peptidase 2 de *Saccharomyces cerevisiae* (U48);
- la lit peptidase de *Escherichia coli* (U49);
- la protéine yabG de *Bacillus subtilis* (U57);
- la muramoyl-tétrapeptide carboxypeptidase de *Escherichia coli* (U61);
- la microcine-processing peptidase 1 de *Escherichia coli* (U61);
- la pseudomuréine endoisopeptidase Pei de *Methanobacterium* phage psiM2 (U64).

2-Protéases spécifiques aux mammifères et aux poissons

Les sérines protéases telles que la trypsine (EC 3.4.21.3), la chymotrypsine (EC 3.4.21.1, EC 3.4.21.2) et l'élastase (EC.3.4.21.36) existent généralement sous plusieurs formes chez les mammifères et les poissons. Elles se distinguent les unes des autres par leurs propriétés biochimiques et catalytiques (**Želazko et al., 2008**). **Ryan (1965)** a signalé l'existence dans les extraits acides de *Meleagris gallopavo* et du poulet turque respectivement des activités tryptiques et chymotryptiques. Dans le tube digestif du poulet, trois tryptines dont deux formes cationiques et une forme anionique ont été purifiées. Dans ce même tissu, deux ou trois chymotryptines et deux élastases a été soupçonnées (**Guyonnet et al., 1999**). En comparant les séquences N-terminales de ces enzymes pancréatiques à celles du bœuf (*Bos taurus*), la trypsine anionique a montré une homologie de séquence avec 74% tandis que celle de la trypsine cationique est de 83%. L'homologie de séquence des chymotryptines n'est seulement que de 50%. L'homologie de séquence en acides aminés entre l'élastase du poulet et celle de bœuf est supérieure à 70% (**Guyonnet et al., 1999**).

La trypsine (EC 3.4.21.4) hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés par leur groupement carboxyles des acides aminés tels que l'arginine et la lysine. Elle joue un rôle très important dans les processus biologiques notamment dans la digestion et

l'activation des zymogènes de chymotrypsine et des autres enzymes. Cette enzyme a été isolée dans le coecum de plusieurs espèces de poisson, tels que tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Bezerra *et al.*, 2001), la sardine (*Sardinops sagax caerulea*) (Castillo-Yañez *et al.*, 2005), chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Kurtovic *et al.*, 2006), bigeye snapper (*Pricanthus macracanthus*) (Hau & Benjakul, 2006), arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*) (Kishimura *et al.*, 2006a), spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*) (Souza *et al.*, 2007), walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) (Kishimura *et al.*, 2008) et mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) (Lu *et al.*, 2008). La trypsine peut être utilisée pour accélérer l'hydrolyse des protéines. Klomklao *et al.* (2006a) ont montré que l'ajout de spleen from skipjack tuna accélère la vitesse de dégradation des protéines du muscle de sardine. Cette enzyme est aussi utilisée pour produire des hydrolysats possédant une activité anti-oxydante (Khantaphant & Benjakul, 2008).

Différentes masses moléculaires de trypsine ont été mises en évidence. Elles se situent généralement entre 20 et 40 kDa. Les masses moléculaires des trypsines du poisson mandarin fish sont de 21 et 21,5 kDa (Lu *et al.*, 2008). Celles de la même enzyme de arabesque greenling et de walleye Pollock sont de 24 kDa (Kishimura *et al.*, 2006a, 2008). Les masses moléculaires des trypsines (25 kDa) de la sardine Monterey sardine (Castillo-Yañez *et al.*, 2005), de New Zealand hoki (26 kDa) (Shi *et al.*, 2007), de chinook salmon et de bluefish (*Pomatomus saltatrix*) (28 kDa) (Klomklao *et al.*, 2007d; Kurtovic *et al.*, 2006) sont très proches. Elles sont par contre différentes de celles de la trypsine (38,5 kDa) de tambaqui (Bezerra *et al.*, 2001).

Les températures optimales d'hydrolyse des trypsines sont très variables. Elles dépendent des conditions réactionnelles (substrats, durée d'incubation etc.) (Klomklao *et al.*, 2007a) et de la température de l'habitat de l'organisme (Kishimura *et al.*, 2008). Les températures optimales d'hydrolyse des trypsines de coecum pylorique de brownstripe red snapper, de menhaden (*Brevoortiu* spp.), de mullet (*Mugil* spp.) (Pavlisko *et al.*, 1999), de Japanese anchovy (Ahsan & Watabe, 2001), de chinook salmon (Kurtovic *et al.*, 2006), de New Zealand hoki (Shi *et al.*, 2007), des sardines *Sardina pilchardus* (Bougatef *et al.*, 2007) et *Sardina melanostictus* (Kishimura *et al.*, 2006a) sont identiques lorsque le N α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) est utilisé comme substrat. Elle est de 60°C. Cette température optimale est supérieure à celles des trypsines de poisson vivant dans des milieux où il fait froid. Les températures optimales d'hydrolyse des trypsines de poisson vivant dans ces milieux varient entre 40-45°C (Simpson, 2000; Jellouli *et al.*, 2009).

Les trypsines ont leurs activités maximales aux pH alcalins. Selon **Simpson (2000)**, les pH optima d'hydrolyse de ces enzymes se situent entre 7,5 et 10,5. Les pH optima des trypsines du coecum pylorique de bigeye snapper et de chinook salmon sont identiques. Il est de 8,0 (**Hau & Benjakul, 2006; Kurtovic et al., 2006**). Cette valeur est inférieure à celles des trypsines de spotted goatfish (pH 9,0) (**Souza et al., 2007**), de tambaqui (pH 9,5), de Japanese anchovy (pH 9,5) (**Ahsan & Watabe, 2001; Bezerra et al., 2001**) et de Grey triggerfish (pH 10,5) (*Balistes capriscus*). La trypsine de Grey triggerfish est très stable aux pH compris entre 7,0-12,0 (**Jellouli et al., 2009**).

Les protéases aspartiques des invertébrés sont les pepsines, les cathepsines D et E et les rénines (**Barrett, 1979**). Ces enzymes interviennent dans la dégradation des protéines intracellulaires. Parmi elles, les cathepsines D et E ont des activités protéases générales (**Hamilton et al., 2003**). Les acides protéases des estomacs (**Fänge & Grove, 1979; Kapoor et al., 1975**) de poisson sont très actives et stables aux pH compris entre 2 et 4 (**Simpson, 2000**). Généralement, les poissons synthétisent deux pepsines: la pepsine I et la pepsine II. La pepsine I est très abondante dans certaines espèces de poissons telles que la sardine (*Sardinops melanostica*) et capelin (*Mallotus villosus*) (**Noda & Murakami, 1981; Gildberg & Raa, 1983**), alors que la pepsine II est très présente dans les espèces comme cod (*Gadus morhua*) et salmon (*Oncorhynchus keta*) (**Gildberg, 1988; Sanchez-Chiang et al., 1987**). Les pepsines de poisson ont une faible activité sur les petits peptides comme les autres protéases aspartiques. Elles sont capables de dégrader fortement l'hémoglobine (**Sanchez-Chiang et al., 1987; Squires et al., 1986**). La pepsine I dégrade activement l'hémoglobine aux pH compris entre 3 et 4 tandis que la pepsine II hydrolyse fortement ce même substrat aux pH compris entre 2 et 3. Les températures optimales d'hydrolyse de ces enzymes varient entre 35 et 55°C. Les pepsines de poisson conservent 40 à 60% de leurs activités catalytiques aux températures comprises entre 5 et 10°C. Elles sont moins stables que celles des mammifères. Les pepsines actives ont des masses moléculaires qui tournent autour de 35 kDa (**Gildberg, 1988; Gildberg & Raa, 1983**). Les points isoélectriques des pepsines I et II varient respectivement de 6,5 à 7 et de 4 à 4,5. Généralement les points isoélectriques des pepsines des mammifères sont plus basses que ceux des pepsines de poisson, ceci à cause de la forte teneur en acides aminés basiques dans les pepsines de poisson (**Herriot, 1962**). Les trypsines sont inhibées par la pepstatine A (**Simpson, 2000**).

Les métalloprotéases digestives des poissons sont les carboxypeptidases A et B et les aminopeptidases. Les carboxypeptidases A et B sont sécrétées par le pancréas (**Fänge & Grove, 1979**) tandis que les aminopeptidases peuvent être présentes dans de nombreux tissus

telle que la muqueuse intestinale in teleosts (**Fänge & Grove, 1979; Taylor, 1993**). Les leucines aminopeptidases, une classe d'exoprotéases cellulaires, dégradent les peptides et les protéines à partir de l'extrémité N-terminale en libérant préférentiellement des résidus de leucine. Ces enzymes sont très rares dans les tissus de poisson. Cependant, elles ont été isolées et caractérisées dans le coecum pylorique de la sardine (*Sardina pilchardus*) (**Martinez & Serra, 1989**), Alaska pollack roe et dans le coecum pylorique de tuna (**Chiou et al., 1989; Hajjou & Le Gal, 1994**).

Les autres protéases de poissons sont les calpaines intracellulaires et les cathepsines lysosomales notamment les cathepsines D et L (**Huss, 1995**). La cathepsine L et les calpains sont des cystéines protéases alors que la cathepsine D est une protéase aspartique.

3-Hydrolyse enzymatique

3-1-Enzymes endogènes

3-1-1-Enzymes des procaryotes

Les enzymes des procaryotes sont localisées dans les cellules ou stockées sous forme de précurseurs. Elles jouent un rôle très important dans le métabolisme cellulaire. Elles peuvent avoir une origine digestive ou tissulaire. Les activités lipasiques, protéasiques ou glycosidasiques ont été trouvées dans les glandes digestives de nombreux organismes marins (**Guerard et al., 2001**). Les enzymes tissulaires sont localisées dans de petites vésicules du cytoplasme appelées lysosomes. Les enzymes lysosomales ont une faible activité comparée à celles des enzymes intestinales. Les enzymes tissulaires sont inhibées par de fortes teneurs de sel, ce qui limite la prolifération de microorganismes contaminants (**Duffosse et al., 1997**).

3-1-2-Enzymes bactériennes

Les enzymes bactériennes sont les plus utilisées en biotechnologie car elles sont facilement isolables par centrifugation des cultures bactériennes, particulièrement stables. Elles peuvent être extra ou intracellulaires. Les enzymes intracellulaires jouent un rôle dans la formation des arômes. Les enzymes extracellulaires sont des hydrolases dont une majorité de protéases. Par exemple, les bactéries des sauces de poissons orientales sont des *Bacillus* et *Halobacterium*. Elles croissent jusqu'à des concentrations de sel de 4 M et possèdent des

activités lipasique, gélatinasiqne ou encore caséinasiqne (**Dufosse et al., 1997**).

3-2-Enzymes exogènes

Les enzymes exogènes ou commerciales sont utilisées couramment pour accélérer la cinétique d'autolyse qui est très lente. Cela permet de diminuer le temps de maturation des produits et ainsi les coûts de production. Les enzymes commerciales sont principalement des protéases utilisées comme auxiliaires de technologies. Elles peuvent être d'origines microbienne (monzyme, pronase), animale (pepsine) ou végétale (ficine, bromélaïne, papaïne). De nouvelles études portent sur la recherche d'espèces bactériennes productrices d'enzymes adaptées à la transformation de produits marins (**Dumay et al., 2006**). Le choix de la protéase dépend du produit final recherché. Certaines protéases sont plus efficaces que d'autres en raison de leur plus large spécificité mais elles peuvent aussi ajouter une certaine amertume (**Dumay et al., 2006**).

3-3-Suivi de l'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse ne s'arrête que quand le substrat est totalement épuisé dans le milieu réactionnel ou que les conditions d'hydrolyse ne sont plus favorables à l'enzyme (**Huong et al., 2007**). Le suivi de l'hydrolyse est capital car les propriétés fonctionnelles du produit final dépendent du degré d'hydrolyse (DH). Le degré d'amertume est lié à la présence de groupements hydrophobes dans les résidus d'acides aminés composant les peptides obtenus après hydrolyse. En fait, la composition primaire en acides aminés de la protéine hydrolysée est plus responsable de l'amertume du produit final que la spécificité des protéases utilisées (**Gbogouri et al., 2004**). L'hydrolyse des protéines doit être contrôlée avec attention pour maintenir une qualité uniforme du produit fini. Pour cela, le degré d'hydrolyse qui correspond au pourcentage de liaisons peptidiques rompues au cours de l'hydrolyse est mesuré.

$$\% \text{ DH} = (\text{nb de liaisons peptidiques rompues} / \text{nb de liaisons peptidiques totales}) \times 100$$

Il est un paramètre de contrôle essentiel. Il existe plusieurs méthodes de suivi de cette hydrolyse: la technique de pH-stat, la méthode de la dépression du point de congélation, la méthode de Kjeldahl ou encore la méthode TNBS. La méthode la plus courante est le dosage des groupements terminaux (NH₂ et COOH). Les valeurs de DH trouvées par ces différentes

techniques ne sont souvent pas directement comparables (**Nalinanon *et al.*, 2008**). De nombreux paramètres influencent l'hydrolyse enzymatique: la température, le pH, la concentration en enzyme, la force ionique, la présence ou l'absence de substances inhibitrices ou activatrices, la quantité d'eau ajoutée, etc. (**Guerard, 2006**).

3-4-Importance de la protéolyse dans l'industrie du poisson

Les protéases clivent les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire de la protéine. Au minimum deux peptides sont obtenus. L'hydrolyse enzymatique présente beaucoup d'avantages vis-à-vis de l'autolyse ou de l'hydrolyse chimique. L'addition d'enzymes exogènes commerciales réduit le temps nécessaire pour atteindre un même degré d'hydrolyse et permet un bon contrôle de l'hydrolyse et de la taille des peptides obtenus. De plus, la dégradation hydrolytique du produit par la racémisation, observée en hydrolyse acide ou alcaline n'a pas lieu dans le cas de l'hydrolyse enzymatique (**Guerard, 2006**). L'utilisation d'enzymes d'origine marine est limitée à cause du manque d'informations de base sur ces enzymes, du caractère cyclique de la matière et de l'attitude négative du public vis-à-vis de substances issues de viscères de poissons (**Dumay *et al.*, 2006**). En sélectionnant l'enzyme et les conditions de digestion, plusieurs degrés d'hydrolyse ou ruptures de protéines peuvent être utilisés pour obtenir des produits finis avec de larges propriétés fonctionnelles et biologiques. L'introduction de nouvelles protéases telle que Flavourzyme qui est capable de dégrader les peptides amers a résolu le problème de l'amertume des produits finis.

3-5-Protéases industrielles utilisées

Les enzymes utilisées pour la dégradation des protéines sont appelées protéases. Elles sont très bien caractérisées et leurs utilisations bien établies dans l'industrie alimentaire. La plupart des protéases commerciales solubilisent avec succès les protéines des espèces de poissons et les coproduits. La majorité des protéases industrielles dérivent de microorganismes (Protamex, Alcalase 2,4L, Novozym FM) et dans une moindre mesure de plantes (papaïne, bormélaïne et ficine) et de sources animales (pepsine et trypsine) (**Dumay *et al.*, 2003**).

3-5-1-Protamex

Protamex est une enzyme industrielle produite par génie génétique par l'entreprise danoise Novozymes SA. C'est un complexe protéasique provenant de plusieurs espèces de *Bacillus* pour hydrolyser des protéines destinées à l'industrie alimentaire. Ce complexe protéasique a une activité maximale à pH 7-8 et a une température de 50°C. Contrairement à d'autres endoprotéases, Protamex a été élaborée de façon à ne pas générer de peptides amers, même lorsque les degrés d'hydrolyse sont faibles. Protamex est un mélange des enzymes Alcalase et Neutrase (Dumay *et al.*, 2006).

3-5-2-Novozyme FM

Novozym FM est une endoprotéase très efficace et produite à faible coût à partir de *Bacillus licheniformis*. Elle peut être utilisée dans la fabrication d'aliments pour poisson ou plus spécifiquement pour réduire la viscosité des eaux de colle. Elle agit de façon optimale à 50°C et à pH 8 (Guerard *et al.*, 2006).

3-5-3-Papaïne

La papaïne est une endopeptidase végétale issue de la papaye. Elle est classée parmi les cystéines protéases. Ses conditions d'activités optimales sont un pH compris entre 5 et 8 et une température allant de 40 à 80°C (Dumay *et al.*, 2006).

3-6-Comparaison des procédés traditionnels et enzymatiques de fabrication de farines de poisson

Des poissons tels que le hareng, sont utilisés pour produire des farines ou des huiles de poissons pour l'industrie des petfood. Ils peuvent être traités soit par un procédé traditionnel par pressage, soit avec des protéases à bas prix. Le principal bénéfice est l'amélioration de la qualité de la farine de poisson (**Tableau I**) ou de l'huile grâce à une meilleure séparation de la phase huileuse. Comparé à la technologie traditionnelle, le procédé enzymatique permet d'obtenir d'une part une huile de meilleure qualité c'est-à-dire moins oxydée et contenant moins d'acides gras libres (pourvu que la matière première soit de bonne qualité), d'autre part,

une teneur en huile diminuée et un degré d'hydrolyse plus élevé dans la farine de poisson (Hoylen *et al.*, 1994). Dans le procédé traditionnel de fabrication de farines de poisson (cuisson sous pression), le principal problème est l'évaporation des eaux de colle en raison de leur haute viscosité. La réduction de la viscosité de ces eaux par traitement enzymatique améliore grandement la capacité de production de farines de poisson. Le procédé (Figure 3) nécessite que l'enzyme agisse sur les eaux de colle avant qu'elles n'entrent dans l'évaporateur ou le sécheur principal (Pillevesse *et al.*, 2006). Les principaux bénéfices du traitement enzymatique des eaux de colle sont l'augmentation de la capacité de production, l'économie d'énergie lors de l'évaporation et l'augmentation de la quantité de matière sèche récupérée, résultant de l'amélioration économique globale du procédé traditionnel. Par ailleurs, le traitement enzymatique a un impact important sur la quantité de matière sèche récupérée à partir des eaux de colle. Les récupérations sont d'environ 43% et 29% de matière sèche respectivement avec et sans enzymes.

Tableau I: Evaluation de la qualité de l'huile de Hareng (d'après Pillevesse *et al.*, 2006)

| Paramètres déterminés | Procédé traditionnel | Procédé enzymatique |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| Acides gras libres (%) | 10,8 | 8,6 |
| Teneur en peroxyde (meq/kg huile) | 34 | 7 |

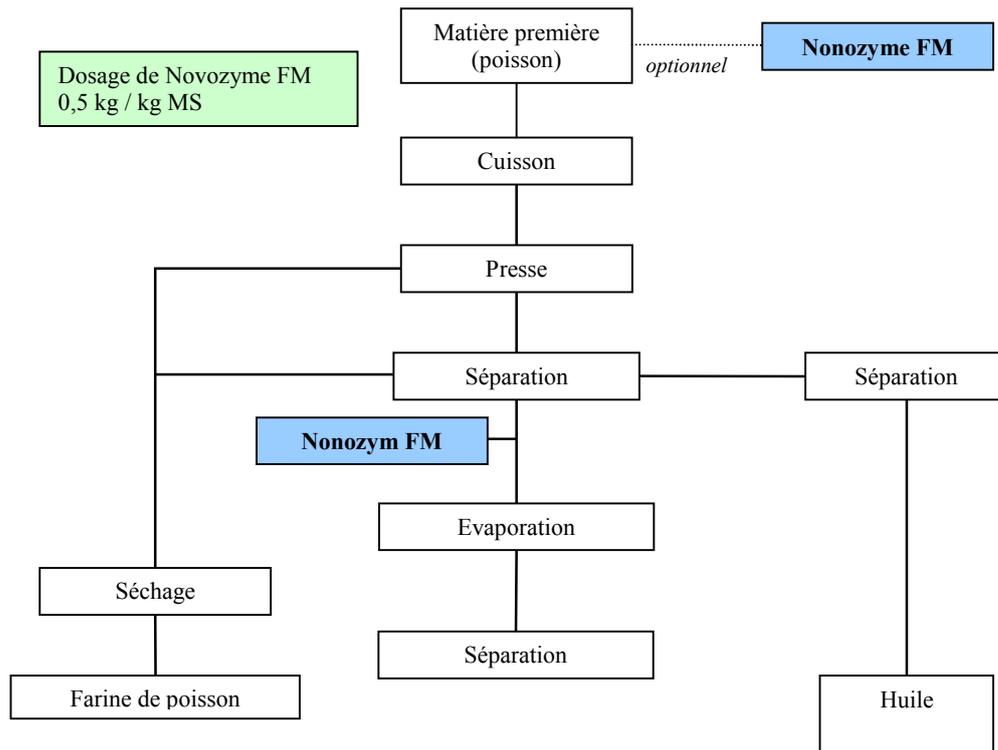


Figure 3 : Schéma du procédé enzymatique de fabrication de farines de poisson (d'après Pillevesse *et al.*, 2006)

3-7-Exemple d'un procédé enzymatique utilisé pour la fabrication d'hydrolysats protéiques de poisson

Dans de nombreux cas, la matière première est d'abord chauffée afin de dénaturer les protéases endogènes. La réaction peut se poursuivre pendant au moins une heure, voire plusieurs, selon l'activité de l'enzyme employée, la température du procédé et d'autres facteurs. Après séparation des parties solides, le pH est ajusté et la phase aqueuse est clarifiée, et ensuite déshydratée. La nécessité d'inactiver les enzymes ajoutées par le pH ou un traitement à la chaleur à la fin de la réaction en batch augmente le prix du procédé. Il est possible d'améliorer ceci en couplant l'hydrolyse enzymatique à une technologie à membrane afin de réaliser le procédé de façon continue (Pillevesse *et al.*, 2006).

3-8-Intérêt des hydrolysats de poisson

Les hydrolysats présentent les mêmes avantages que les matières premières d'origine animale pour l'aquaculture sans en avoir les nombreux inconvénients (**Infofish, 2002**). En effet, ils contiennent des acides aminés libres qui sont assimilables pour les animaux. De plus, ces hydrolysats constituent un produit très appétant et parfaitement accepté, grâce à l'arôme de poisson et présentent une granulométrie fine facilitant la fabrication d'aliments suivant des procédés telle que la microparticulation (**Jones, 1995**). Ils contiennent un peu de minéraux et ne risquent donc pas de polluer les eaux d'élevages aquacoles. Leur état microbiologique est assuré par la stérilisation au cours de la fabrication. Leur concentration dans les aliments est très variable puisqu'ils sont capables d'améliorer la croissance même à faible dose (**Dumay et al., 2006**).

3-8-1-En alimentation animale

Les hydrolysats de poisson sont utilisés comme substitut du lait pour les bovins, les ovins et les porcins. En comparaison avec la caséine, les animaux nourris avec les hydrolysats de poisson gras, après un début de croissance plus lent, arrivent à la même masse au bout de quelques semaines (**Orskov et al., 1982; Penda, 2008**). De plus, une étude économique a montré l'intérêt des peptides de poisson en tant que substituts du lait (**Merritt, 1982**). Pour le bétail adulte, l'ensilage obtenu à partir d'herbe peut être également remplacé par des hydrolysats de poisson (**Ouellet et al., 1997**). Mais c'est dans le domaine de l'aquaculture que ces hydrolysats sont les plus valorisés. En effet, en aquaculture, la charge récurrente la plus importante est la source protéique apportée aux animaux. Les protéines de poisson hydrolysées, en plus de leur faible coût, sont d'une grande digestibilité. De plus, de nombreuses études ont montré que certains hydrolysats de poisson possèdent des propriétés nutraceutiques. Ainsi, le remplacement des farines de poisson par des hydrolysats de poisson augmenterait-il la croissance des crevettes et des larves de poisson (**Liaset, 2000**).

3-8-2-Intérêts fonctionnels

Les hydrolysats de poisson, pour pouvoir entrer dans la composition des aliments, doivent avoir des propriétés particulières, concernant l'hydrophobicité, les facultés d'émulsion (et leur stabilité) ou de formation de mousse, la capacité à retenir l'eau. D'une manière générale, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont liées aux conditions d'hydrolyse. Ainsi, en contrôlant ces conditions, il est possible d'obtenir les propriétés

fonctionnelles voulues, ce qui permettrait de trouver des applications variées dans les domaines alimentaires, comme dans l'élaboration de vinaigrettes ou de saucisses industrielles (Slizyte *et al.*, 2005).

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

I-Matériel

1-Produits chimiques

La glycine, la Protamex®, la ribonucléase, l'aprotinine, la rénine, la vasopressine et la leucine sont des produits de chez SIGMA Aldrich. Les autres produits chimiques sont de qualité analytique.

2-Matériel animal

Les coproduits utilisés dans ce travail sont la tête et les viscères de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) (**Figures 4 et 5**). Ils proviennent des usines «Sénégal Pêche» et «La Pirogue Bleue-Dakar», deux entreprises basées à Dakar (Sénégal). Après la récolte des coproduits, ils ont été congelés à -20°C pour les hydrolyses enzymatiques. Les poulets de chair de la souche Cobb 500 qui ont permis de réaliser les tests de production animale ont été ceux de la ferme avicole «Sédima» située à Dakar (Sénégal).

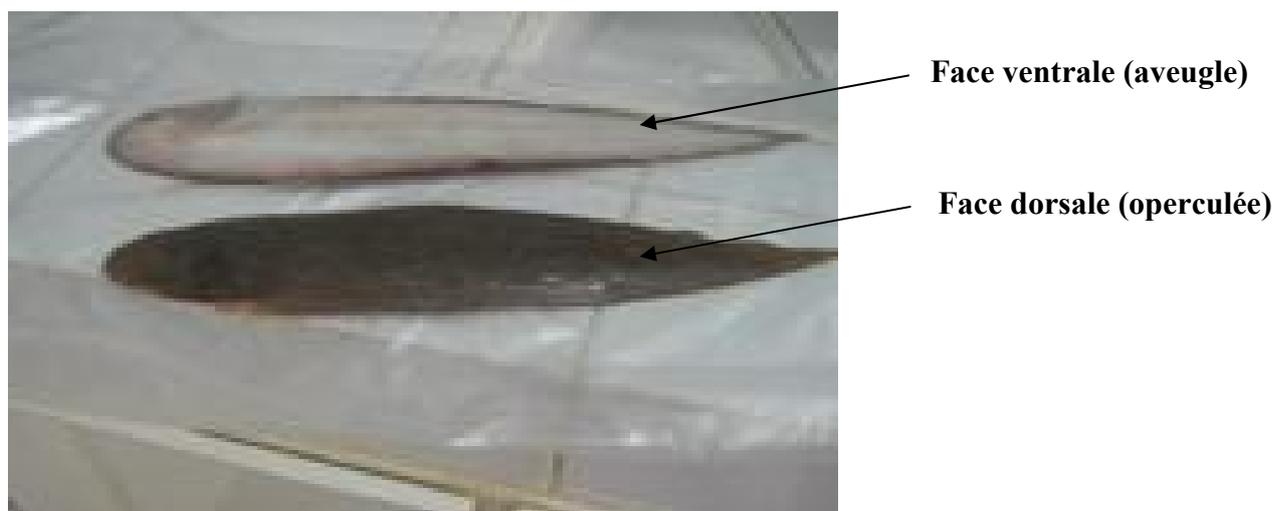


Figure 4: Soles tropicales (*Cynoglossus senegalensis*)

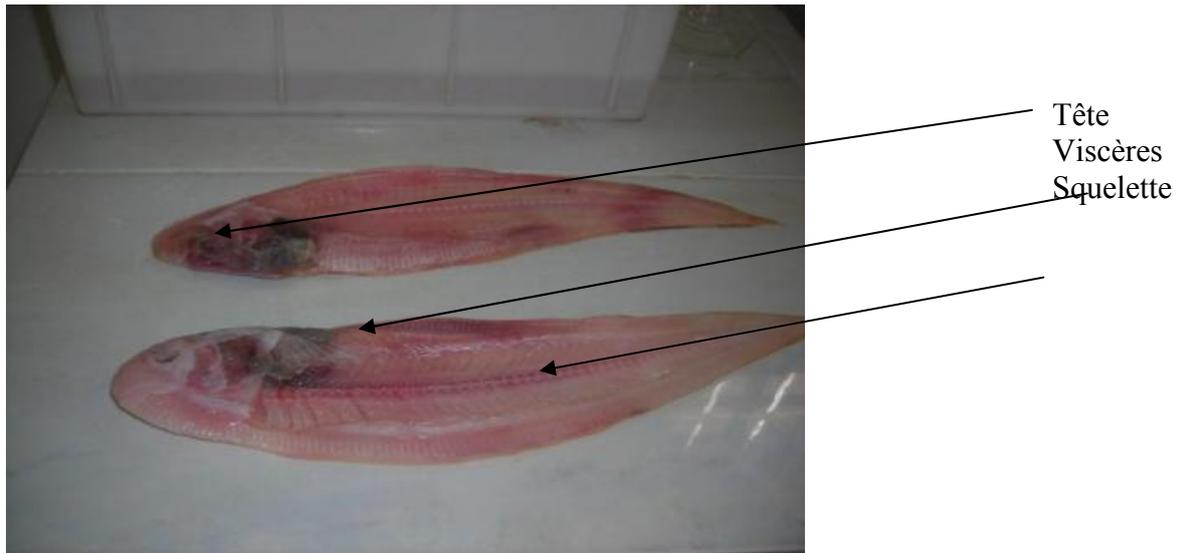


Figure 5: Carcasses de soles tropicales (*Cynoglossus senegalensis*)

3-Matériel d'hydrolyse

3-1-Bioréacteurs à double enveloppe

Le réacteur est cylindrique avec un volume de 4 l (**Figure 6**) qui permet de travailler sur de petits volumes au laboratoire en conférant une meilleure récupération. Un second modèle d'une capacité de 20 l est utilisé pour réaliser des essais pilote à l'échelle industrielle (**Figure 7**). La température est régulée soit par le biais d'une double enveloppe à circulation continue, soit par l'ajout d'un thermoplongeur directement dans le système. Les réacteurs disposent de plusieurs entrées pour permettre d'ajouter des accessoires ou pour pouvoir intervenir sur le milieu réactionnel. Par ces entrées peuvent ainsi être introduits dans le système des capteurs de mesure physique (sonde de température, électrode de pH, sonde de pression...), des sondes de distribution (liquide, gaz...), etc. Les réacteurs enzymatiques sont utilisés de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle.



Figure 6 : Bioréacteur à double enveloppes de laboratoire



Figure 7: Bioréacteur à double enveloppes de 20 l de capacité

3-2-Enzyme d'hydrolyse

L'enzyme utilisée pour les hydrolyses de broyat de coproduits de la sole tropicale est le Protamex® fabriquée par la firme Novozymes SA (Danemark). C'est un complexe protéasique produit par génie génétique de *Bacillus*, destiné à l'industrie alimentaire. Contrairement à d'autres endoprotéases, Protamex® a été élaborée pour éviter la production de peptides amers lorsque les degrés d'hydrolyse sont faibles. Le complexe protéasique est constitué des enzymes Alcalase et Neutrase qui possèdent les numéros enzymatiques EC3.4.21.62 et EC3.4.24.28. Protamex® a été standardisée par le fournisseur en unités Anson par g (AU/g). L'activité déclarée de Protamex® est de 1,5 AU /g. Les conditions optimales de son fonctionnement sont une température comprise entre 35°C et 60°C et un pH compris entre 5,5 et 7,5. Protamex® peut être inactivée à 85°C pendant 10 min lorsque le pH est de 8.

II-Méthodes

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

1-1-Hydrolyse enzymatique

Cinq cents (500) g de coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) décongelés ont été broyés dans une broyeuse de type Blender (Waring Commercial, USA) pendant environ 10 min. Le broyat obtenu a été introduit dans un bioréacteur à double enveloppe puis homogénéisé avec un volume égal d'eau distillé (agitation continue à 300 rpm). Lorsque la température intérieure du bioréacteur a été stabilisée à 40 ou 50°C, la préparation enzymatique Protamex® a été ajoutée (0,75 AU). L'incubation a été réalisée pendant 180 min sous agitation. A chaque 10 min, des parties aliquotes de 10 ml ont été prélevées jusqu'à 1 heure de réaction puis toutes les 30 min jusqu'à 3h. Les parties aliquotes prélevées ont été immédiatement chauffées à 85°C pendant 15 min pour arrêter la protéolyse par dénaturation thermique de l'enzyme. Après ce traitement thermique, les parties aliquotes ont été centrifugées dans une centrifugeuse réfrigérée à 10 000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant (fraction protéique soluble) et le culot (fraction insoluble) ont été séparés puis lyophilisés par un lyophilisateur. Les lyophilisats ont été broyés dans un mortier grâce à un pilon en porcelaine pour donner des farines protéiques qui ont été conservées à 4°C pour analyse. Un broyat de coproduit n'ayant pas subi de digestion par la préparation enzymatique Protamex® a été centrifugé comme précédemment. Le surnageant obtenu a été lyophilisé et la farine a été conservée dans les mêmes conditions que les premières préparations.

1-2-Characterisation biochimique des farines de surnageant et du culot de l'hydrolysat

1-2-1-Dosage des taux de matière sèche

Le taux de matière sèche de chaque farine a été déterminé selon la méthode (AOAC, 1990). Trois (3) g de farine (PE) ont été pesés dans des creusets en porcelaine préalablement tarés. L'ensemble creuset et échantillon (M_1) a été porté à l'étuve à 105°C pendant 24 h. Au bout du temps de séchage, le creuset retiré de l'étuve (M_2) a été mis au dessiccateur pour le refroidissement pendant 30 min avant d'être pesé sur une balance de précision de marque Sartorius. Le taux de matière sèche (T_{MS}) a été déterminé à partir du calcul suivant:

$$T_{MS} = \frac{M_1 - M_2}{PE} \times 100$$

1-2-2-Dosage de l'azote total

Le dosage des protéines de chaque farine a été réalisé selon la méthode de Kjeldahl (Hoylen *et al.*, 1994). Quatre (4) g de farine ont été chauffés à 450°C pendant 150 min en présence d'une pincée du mélange de catalyseurs (Sélénium + sulfate de potassium) et de 20 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 95-97%. Le minéralisât obtenu a été complété à 60 ml avec de l'eau distillée. A ce volume, ont été ajoutés 50 ml de soude (40%, p/v) avant d'être porté à ébullition dans un distillateur de type LEGALLAIS. L'ammoniac qui se dégageait a été piégé dans un vase doseur contenant 10 ml du mélange acido-basique (4%, p/v) indicateur mixte (Rouge de méthyle + vert de bromocrésol) à pH 4,4-5,8. Le dosage a été réalisé par une solution d'acide chlorhydrique 1 N. Le pourcentage d'azote a été déterminé selon la relation mathématique suivante:

Avec:

$$\%N = \frac{V_{(HCl)} \times N_{(HCl)} \times 14,007 \times 100}{1000 \times PE}$$

$V_{(HCl)}$: Volume en ml de l'acide chlorhydrique.

$N_{(HCl)}$: Normalité de l'acide chlorhydrique versé (1N).

PE: Prise d'essai.

%N: Taux d'azote.

14,007: Masse atomique de l'azote.

La teneur en protéine a été obtenue en multipliant le taux d'azote par 6,25 (Glowa, 1974).

1-2-3-Taux de lipides

Le taux de lipides a été estimé selon la méthode de **Folch *et al.* (1957)**. Cinq (5) g de farine ont été dissous dans 20 ml de mélange de solvant chloroforme/méthanol (2/1, v/v). Ce milieu réactionnel a été mis sous agitation pendant 60 min. Il a été ensuite filtré sur du verre fritté. Les composés solides non lipidiques et non solubilisés dans le mélange de solvants ont été éliminés. Le filtrat a été alors versé dans une ampoule à décanter contenant 50 ml de chlorure de sodium (0,9%, v/v). Elle a été agitée vigoureusement jusqu'à émulsion complète du milieu réactionnel. Après cette opération, la décantation a été réalisée pendant 3 h en chambre froide à l'abri de la lumière. La phase organique inférieure de l'ampoule a été récupérée dans un ballon taré. Les solvants ont été évaporés grâce à l'utilisation d'un évaporateur rotatif. Après leur évaporation totale, le ballon contenant l'extrait lipidique a été pesé. La phase aqueuse supérieure a été éliminée. Le taux de lipides a été calculé selon la formule suivante:

$$X_L = \frac{(M_2 - M_1) \cdot 100}{M_0} (\%)$$

M_0 : Masse d'échantillon (g)

M_1 : Masse du ballon vide (g).

M_2 : Masse du ballon contenant l'extrait lipidique après évaporation du solvant (g).

1-2-4-Détermination des masses moléculaires des peptides par gel filtration à haute pression

Le profil de distribution des peptides de farine issus du surnageant ou du culot de l'hydrolysate de coproduits de la sole tropicale a été déterminé par chromatographie liquide à haute performance utilisant une colonne d'exclusion moléculaire (Superdex peptide 10/300GL). Après filtration à travers une membrane hydrophile DURAPORE (millipore 0,45

µm), 50 µl du mélange réactionnel ont été analysés qualitativement par chromatographie liquide à haute performance à température ambiante. Les peptides ont été suivis par absorption en ultra-violet (UV) à 214 nm avec comme phase mobile, le mélange chlorure de sodium/acétonitrile/acide trifluoroacétique (1/5/9; v/v/v) et un débit de 0,5 ml/min. Les protéines standards utilisées ont été la ribonucléase (13700 Da), l'aprotinine (6500 Da), la rénine (1760 Da), la vasopressine (1084 Da) et la leucine (294 Da).

1-2-5-Détermination du degré d'hydrolyse de l'hydrolysats

Le degré d'hydrolyse a été défini comme étant le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques coupées (h) et le nombre total de liaisons peptidiques (h_{tot}) par unité de masse. Il a été déterminé selon la méthode de **Goodwin, (1968)** utilisant le dinitrofluorobenzène (DNFB). Un (1) ml de surnageant de l'hydrolysats obtenu à la fin de l'hydrolyse (dilué 1/200) a été mélangé avec 1 ml de solution de tétraborate de sodium (2%, v/v). Ce milieu réactionnel, après agitation, a été dilué dans 0,25 ml de solution de 2,4-dinitrofluorobenzène (DNFB/éthanol : 0,013/1, v/v) puis chauffé à 60°C pendant 10 min. Il a été ensuite refroidi sur la paillasse à la température ambiante (25°C) pendant 10 min. Après ce refroidissement, deux (2) ml d'acide chlorhydrique (10 N) y ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Une courbe de calibration a été établie en utilisant la glycine comme acide aminé de référence (ml/mg). L'absorbance a été lue à 410 nm. Une mole d'amine est égale à une liaison peptidique coupée. Le degré d'hydrolyse (DH) a été donné par le rapport de **Ravallec-Plé (2000)** :

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{\text{Nombre de moles d'amines x coefficient dilué}}{\text{Masse de protéines (en g) dans 1 ml x } h_{tot}} \times 100$$

h_{tot} correspond au nombre de liaisons peptidiques dans la protéine. Les valeurs sont différentes suivant le matériel protéique utilisé. NOVO Nordisk préconise pour le poisson une valeur de 8,6 milliéquivalent/g.

1-2-6-Analyse des acides aminés

La composition en acides aminés de la farine a été déterminée en chromatographie en phase gazeuse (CPG-FID). Dix (10) mg de farine issue du surnageant ou du culot de l'hydrolysats de coproduit de la sole tropicale ont été hydrolysés à l'aide de 0,2 ml d'acide chlorhydrique (6 N) dans une ampoule scellée sous vide pendant 24 h à 110°C dans un bain à

sec. L'hydrolysate a été ensuite séché sous azote et dilué dans 2,5 ml d'eau distillée. L'analyse des acides aminés a été réalisée en utilisant la procédure EZ: Faast (Phenomenex, des Etats-Unis) consistant en une étape d'extraction de phase solide suivie d'une dérivation et de l'extraction liquide/liquide. Une partie aliquote de la phase organique qui contenait les acides aminés dérivés a été analysée sur un système CPG-FID (Perkin Elmer Autosystem XL). Les acides aminés ont été identifiés par leurs temps de rétention et quantifiés par une courbe d'étalonnage et leur facteur de réponse par rapport au standard interne (la norvaline ajoutée à une concentration de 200 μ mol/l dans chaque échantillon).

2-Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur les caractéristiques biochimiques du surnageant de l'hydrolysate de coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

2-1-Hydrolyse enzymatique

Sept cents cinquante (750) g de coproduits de la sole décongelés ont été broyés dans une broyeuse de type Blender (Waring Commercial, USA) pendant environ 10 min. Le broyat obtenu a été introduit dans un bioréacteur à double enveloppe puis homogénéisé avec un volume d'eau distillé (100%, 50%, 25% ou 10%, p/p) (sous agitation continue à 300 rpm). Lorsque la température intérieure du bioréacteur a été stabilisée à 40°C, la préparation enzymatique Protamex® a été ajoutée (0,75 AU). L'incubation a été réalisée pendant 180 min sous agitation. A chaque 2 min, des parties aliquotes de 5 ml ont été prélevées jusqu'à 10 min d'hydrolyse puis toutes les 10 min jusqu'à 1h et enfin toutes les 30 min jusqu'à 5h30 min. Les parties aliquotes prélevées ont été immédiatement chauffées à 85°C pendant 15 min pour arrêter la protéolyse par dénaturation thermique de l'enzyme. Après ce traitement thermique, les parties aliquotes ont été centrifugées dans une centrifugeuse réfrigérée à 10 000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant (fraction protéique soluble) et le culot (fraction insoluble) ont été séparés. Seule la fraction protéique soluble a été lyophilisée pour donner une farine qui a été conservée à 4°C pour analyse.

2-2-Caractérisation biochimique

La détermination du taux de matière sèche, le dosage de l'azote total, la détermination du degré d'hydrolyse et les profils moléculaires, ont été effectués uniquement sur le surnageant selon les méthodes décrites ci-dessus.

3-Analyse sensorielle et caractérisation aromatique des hydrolysats

3-1-Hydrolyse enzymatique

Seize (16) kg de coproduit de sole décongelé ont été broyés dans une broyeuse de type Blender (Waring Commercial, USA) pendant environ 10 min. Le broyat obtenu a été introduit dans un bioréacteur à double enveloppes puis homogénéisé avec un volume égal d'eau distillée (sous agitation continue à 300 rpm). Lorsque la température intérieure du réacteur a été stabilisée à 40 ou 50°C, la préparation enzymatique Protamex® a été ajoutée (0,75 AU). L'incubation a été réalisée pendant 3 ou 6 h sous agitation. A chaque 2 min, des parties aliquotes de 10 ml ont été prélevées jusqu'à 10 min d'hydrolyse puis toutes les 10 min jusqu'à 1h et enfin toutes les 30 min jusqu'à 5h30 min. Les parties aliquotes prélevées ont été immédiatement chauffées au bain marie bouillant (85°C ou 95°C) pendant 15 min pour arrêter la protéolyse par dénaturation thermique de l'enzyme. Après ce traitement thermique, les parties aliquotes ont été centrifugées dans une centrifugeuse réfrigérée à 10 000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant (fraction protéique soluble) et le culot (fraction insoluble) ont été séparés. Le surnageant a été filtré à l'aide de filtres de 0,2 µm de diamètre et stocké au congélateur -80°C avant d'être présenté pour une analyse sensorielle.

3-2-Analyse sensorielle

3-2-1-Jury

Les évaluations sensorielles ont été réalisées par un panel spécialisé dans la caractérisation des produits de la mer. Ce panel de dégustation a été constitué par des volontaires dont les performances sensorielles ont été testées et qui ont participé régulièrement à des évaluations de produits. Quatorze (14) juges ont participé à cette étude.

3-2-2-Conditions d'évaluation

Une salle d'analyse sensorielle répondant aux spécifications de la norme AFNOR V-09-105 a permis de mettre en œuvre les tests dans des conditions standardisées. Cette salle climatisée a été composée de 10 cabines individuelles de dégustation, éclairées par une lumière blanche standard ($T = 6500^{\circ}\text{K}$) et équipées d'un système informatique permettant l'acquisition automatique des données (logiciel Fizz, Biosystèmes, Dijon).

3-2-3-Epreuves sensorielles

Un test de description des odeurs perçues a été réalisé sur les échantillons à comparer, ceci afin de générer et de sélectionner une liste de descripteurs pertinents et si possible discriminants. Le lendemain, un test de type profil sensoriel a été mis en place afin d'identifier les critères sensoriels qui différenciaient l'odeur des hydrolysats (stockés 24h à 4°C) et leur niveau d'intensité. Au cours de ce test, le panel a été invité à noter les attributs sur une échelle continue bornée par les termes «faible intensité» et «forte intensité», correspondant à une notation de 0 à 10.

3-2-4-Présentation des échantillons

Après décongélation, cent (100) ml de surnageant filtré de chaque hydrolysat ont été repartis dans une dizaine de piluliers, codés de façon anonyme avec un code à 3 chiffres. Les échantillons ont été proposés simultanément au panel et selon un ordre défini par un carré Latin, de façon à éviter tout biais dû à l'ordre de présentations.

3-3-Caractérisation aromatique

3-3-1-Extraction des composés volatiles des hydrolysats

Vingt (20) ml de surnageant filtré de chaque hydrolysat conservés à -80°C ont été décongelés durant 30 min dans un bain marie de 30°C . Après cette décongélation, ils ont été placés dans un flacon de verre brun de 60 ml contenant un barreau aimanté ainsi que 1 ml de tétradécane (2 g/l dans du méthanol). Après 20 min de stabilisation du milieu réactionnel, une fibre de $75\ \mu\text{m}$ de Carboxen/polydiméthylsiloxane a été exposée à l'espace de tête de l'échantillon pendant 30 min. Durant l'extraction, l'échantillon a été constamment sous agitation à l'aide du barreau aimanté pendant 40 min. A la fin de l'extraction, la fibre a été injectée dans le chromatographe en phase gazeuse (CPG) où elle a été désorbée pendant 5 min.

3-3-2-Analyse des composés volatiles

L'identification des composés volatiles a été réalisée avec un CPG Agilent 5890N couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID) et à un détecteur de masse quadripôle Agilent 5973 Network. Les composés volatiles ont été séparés avec une colonne capillaire polaire de type DB-WAX de $30\ \text{m} \times 0,32\ \text{mm}$, $0,5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur de film (J&W Scientific, Folsom, USA). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de $2\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (pression : $62,4\ \text{KPa}$). La température de l'injecteur a été fixée à 260°C en mode split (fuite) pendant 2 min puis en mode splitless (sans fuite) pendant le reste de l'analyse. La température du four a été maintenu constant pendant 10 min à 50°C , puis a augmenté de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 152°C . Elle a été augmentée de nouveau de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 230°C où elle a été maintenue constante pendant 5 min (durée totale de l'analyse : 48 min). Le détecteur de masse a été soumis à une température de 250°C . Il a opéré en mode scan, avec une ionisation en impact électronique (énergie d'ionisation : $70\ \text{eV}$) et une gamme de masse allant de 33 à $300\ \text{uma}$ (unité de masse atomique) avec une fréquence de scan de $2,72\ \text{scans}\cdot\text{s}^{-1}$, utilisé pour détecter les ions formés.

3-3-3-Interprétation des données chromatographiques

L'identification des composés présents sur les chromatogrammes a été faite de trois manières différentes :

-comparaison des indices de rétention linéaires (IRL) de ces composés à des indices de rétention théoriques.

-comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux des standards de la base Wiley 6.

-comparaison avec des standards de la base de données interne.

Cette diversité de méthodes a permis d'augmenter les chances d'identifier les composés présents dans les hydrolysats avec exactitude.

4-Influence des fractions solubles et non solubles de l'hydrolysat de coproduis de la sole tropicale sur quelques paramètres zootechniques du poulet de chair de la souche Cobb 500

4-1-Rations alimentaires

En période de démarrage, tous les poulets de chair de la souche Cobb 500 ont été nourris avec un aliment commercial à base de maïs. Cette phase a duré pendant 10 jours. Dans les phases suivantes, ils ont reçu, successivement, un aliment de croissance et un aliment de finition. Les périodes de croissance et de finition des animaux ont durées respectivement pendant 15 et 20 jours. Les rations alimentaires ont été conçues de manière à pouvoir évaluer l'influence des fractions soluble (SHS) et insoluble (CHS) de l'hydrolysat de coproduis de la sole tropicale sur quelques paramètres zootechniques des animaux. Ainsi, les rations alimentaires témoins ne contenaient pas ces substances. La ration alimentaire 1 contenait 5 % de SHS et pas de CHS. Dans la ration alimentaire 2, c'était la situation contraire. La ration alimentaire 3, contenait 2,5 % de SHS et 2,5 de CHS. La ration alimentaire témoin n'a pas reçu de SHS et de CHS. Les compositions des rations alimentaires sont présentées dans le **tableau II**.

Tableau II : Composition des rations alimentaires des animaux (%)

| Matières premières (%) | Ration alimentaire témoin | | Ration alimentaire 2 | | Ration alimentaire 1 | | Ration alimentaire 3 | |
|------------------------|---------------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|
| | Croissance | Finition | Croissance | Finition | Croissance | Finition | Croissance | Finition |
| | Maïs | 0,63 | 0,677 | 0,59 | 0,6557 | 0,59 | 0,6557 | 0,60 |
| Son de mil | 0,21 | 0,18 | 0,226 | 0,2 | 0,226 | 0,2 | 0,226 | 0,2 |
| Huile végétale | 0,0343 | 0,0286 | 0,333 | 0,02 | 0,0333 | 0,02 | 0,0333 | 0,02 |
| Son de blé | 0,08 | 0,06 | 0,08 | 0,06 | 0,08 | 0,06 | 0,08 | 0,06 |
| SHS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,05 | 0,05 | 0,025 | 0,025 |
| CHS | 0 | 0 | 0,05 | 0,05 | 0 | 0 | 0,025 | 0,025 |
| Prémix | 0 | 0,0015 | 0 | 0,002 | 0 | 0,002 | 0 | 0,002 |
| Tourteaux | 0 | 0,0012 | 0 | 0,0015 | 0 | 0,0015 | 0 | 0,0015 |
| Tourteaux coton | 0 | 0,001 | 0 | 0,0011 | 0 | 0,0011 | 0 | 0,0011 |
| Farine poisson | 0,015 | 0,002 | 0,02 | 0,008 | 0,02 | 0,008 | 0,02 | 0,008 |
| Lysine | 0,0267 | 0 | 0,0267 | 0 | 0,0267 | 0 | 0,0267 | 0 |
| Méthionine | 0 | 0,0267 | 0 | 0,0267 | 0 | 0,0267 | 0 | 0,0267 |
| Phosphore | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| Calcium | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |

4-2-Conduite de l'élevage des poussins

Elle est basée sur le principe d'élevage en «bande unique», consistant en la gestion de lots d'animaux de même âge, même espèce et de même type de production.

4-2-1-Préparation du local

Avant la réception des poussins, le bâtiment d'élevage a fait l'objet d'un vide sanitaire. Il a consisté à vider la salle du matériel mobile, puis à procéder à un lavage à grande eau, suivi de la désinfection avec de la chaux vive et, deux jours plus tard, de pulvérisation d'un désinfectant (Virkon®) sur les murs et le plafond. Le bâtiment a été maintenu fermé pendant une semaine correspondant au temps nécessaire à l'élimination des germes présents. Une nouvelle désinfection de la salle et du matériel a été réalisée deux jours avant l'arrivée

des animaux. De même, avant d'étendre la litière faite de copeaux de bois, une couche de chaux éteinte a été étalée sur toute la surface du sol. Des gardes en carton permettant une densité de 50 individus/m² ont été installées. Le radiant fixé aux poutres et suspendu à environ 1 m du sol, a permis de chauffer l'aire de démarrage à une température de 28° C.

4-2-2-Arrivée des poussins et démarrage de l'élevage

Mille deux cent (1200) poussins de la souche Cobb 500 ont été achetés au couvoir de la ferme avicole de Mbao (Dakar-Sénégal) qui les a vaccinés contre la pseudo-peste aviaire ou maladie de Newcastle. Ils ont ensuite été transportés en voiture dans des caisses en carton jusqu'au bâtiment d'élevage situé à 2 km du couvoir. A l'arrivée des poussins de la souche Cobb 500, les contrôles suivants ont été effectués:

- nombre de poussins livrés;
- masse moyenne des poussins;
- état des poussins.

Le plan de prophylaxie suivi a été celui du fournisseur des poussins (**Tableau III**). Pendant la phase de démarrage, les sujets ont reçu eau et aliment à volonté. La période ainsi couverte a été de 2 semaines.

Tableau III : Plan de prophylaxie mis en œuvre lors de l'élevage des poussins

| Age (jours) | Opérations | Produits |
|--------------|--|---|
| 1 | Vaccination contre la maladie de Newcastle | IMOPEST (couvoir), vaccin HB1 (trempage de bec) |
| 2, 3 et 4 | Prévention des réactions post-vaccinales et du stress | Anti-stress (eau de boisson) |
| 9 | Vaccination contre la maladie de Gumboro | HipraGumboro (eau de boisson) |
| 10, 11 et 12 | Prévention des réactions post-vaccinales et du stress | Anti-stress (eau de boisson) |
| 17 | Rappels vaccins contre les maladies de Gumboro et de Newcastle | HipraGumboro + HB1 (eau de boisson) |
| 18, 19 et 20 | Prévention des réactions post-vaccinales et du stress | Anti-stress (eau de boisson) |
| 22, 23 et 24 | Prévention de la coccidiose | Anticoccidien (eau de boisson) |
| 30, 31 et 32 | Prévention des troubles de la croissance | Vitaminothérapie (eau de boisson) |

4-2-3-Croissance et finition

Au début de la phase de démarrage, les animaux ont été pesés individuellement, bagués et répartis de manière aléatoire sur des parquets d'élevage en fonction du traitement subi, la densité étant de 10 sujets/m² jusqu'à l'abattage. A partir de ce moment, les trois groupes de poulets ont été nourri à volonté avec la ration alimentaire jusqu'en fin de bande. Les quantités d'aliment servies et les refus ont été pesés pour en déduire la consommation. Les masses hebdomadaires ainsi que les cas de mortalités ont été enregistrés. Des autopsies ont été réalisées pour déterminer les causes exactes de la mort de l'animal.

4-2-4-Abattage des animaux

A six (6) semaines, les animaux ont été abattus par saignée et déplumés sans échaudage ni mouillage. Ils ont ensuite été éviscérés puis, têtes et pattes ont été coupées. Les masses vives avant l'abattage et les masses de carcasses ont été déterminées avec une balance.

4-2-5-Calcul des paramètres zootechniques

Les données récoltées au cours de chaque essai ont permis de calculer les quantités d'aliment consommées (Ci), les gains moyens quotidiens (GMQ) et les indices de consommation (IC) à âge-type, ainsi que les taux de mortalité (TM).

Consommation alimentaire moyenne (Cm)

$$C_m = \frac{\text{Quantité d'aliments distribuée (g) par jour} - \text{Quantité d'aliments refusée (g) par jour}}{\text{Nombre de sujets}}$$

Gain moyen quotidien (GMQ)

$$\text{Gain Moyen Quotidien (GMQ)} = \frac{\text{Gain de poids (g) pendant une période}}{\text{Durée de la période (jours)}}$$

Indice de consommation (IC)

$$\text{Indice de Consommation (IC)} = \frac{\text{Quantité d'aliments consommée pendant une période (g)}}{\text{Gain de poids durant la période (g)}}$$

Taux de mortalité (TM)

$$TM = \frac{\text{Nombre de morts au cours d'une période}}{\text{Effectif en début de période}} \times 100$$

4-3-Analyse bromatologique des aliments

4-3-1-Taux d'humidité, de matière sèche et de matière grasse

Ils ont été déterminés selon les méthodes déjà décrites.

4-3-2-Taux de cendres

Le taux de cendre a été déterminé selon la méthode de **Duche *et al.* (1992)**. Trois (3) g d'aliment ont été calcinés au four à 550°C pendant 8 h. La cendre a été refroidie après un passage à l'étuve à 103°C pendant 30 min puis au dessiccateur pendant 45 min. Le taux de cendre a été déterminé à partir de la relation suivante:

$$\text{MM (g/kg)} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \times 1000$$

P₁ = masse de la capsule vide

P₂ = masse de la capsule contenant la prise d'essai

P₃ = masse de la capsule contenant le résidu incinéré

Le calcium a été dosé à partir de la cendre obtenue suite à une minéralisation en phase sèche. Il s'en est suivi alors une attaque à l'acide acétique en présence d'oxalate d'ammonium qui a abouti à la formation d'oxalate de calcium. Ce précipité a réagi avec l'acide sulfurique pour donner l'acide oxalique qui a été titré par une solution de permanganate de potassium (0,1M).

4-3-3-Taux de matière azotée totale

Elle a été déterminée selon la méthode de Kjeldahl déjà décrite comme précédemment.

4-3-4-Taux de cellulose brute

Taux de cellulose brute a été déterminé selon la méthode de **Pago (1985)** utilisant deux hydrolyses successives. Un (1) g d'aliment (P_e) a été dégradé avec 20 ml d'acide sulfurique (0,26 M) et 25 ml d'hydroxyde de soude (0,23 M). Après ces hydrolyses, le résidu a été filtré dans un creuset en verre fritté et rincé abondamment avec 27ml d'eau distillée et 30 ml d'acétone pur. Il a été ensuite séché à l'étuve pendant 12 h à 105°C puis refroidi au dessiccateur et pesé sur la balance de (P₁). Après calcination au four moufle à 550°C pendant 8 h, la cendre obtenue a été pesée sur la même balance (P₂). La perte de masse résultant de la calcination correspond au taux de cellulose brute de la prise d'essai. Il a été déterminé par la formule suivante:

$$\text{MM (g/kg)} = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_2} \times 1000$$

5-Analyses statistiques

5-1-Pour les analyses biochimiques

Les essais ont été réalisés en triplicata. Le test d'ANOVA a été utilisé pour l'analyse statistique. Le but est d'évaluer l'hypothèse que les moyennes de distributions sont en effet égales. Les moyennes ont été acceptées comme sensiblement différent au niveau de seuil 95% ($p < 0,05$).

5-2-Pour les analyses sensorielles

Les données ont été traitées par une analyse de variance à deux facteurs (effet produit et effet juge). Une analyse en composante principale normée (ACP) a été réalisée sur les moyennes des notes du groupe. Cette ACP permet, en complément de l'analyse de variance, de visualiser les principales caractéristiques de chaque produit.

5-3-Pour les tests de nutrition animale

La comparaison entre les moyennes a été réalisée grâce au test de la différence significative minimale (z-test) dans le logiciel Excel, alors que les taux de mortalité ont été comparés à l'aide du test du khi deux. Les calculs ainsi effectués ont fait l'objet d'un traitement statistique à l'aide du logiciel Statistical Package for the Social Sciences, par le biais d'une analyse de variance. Toutes les analyses ont été effectuées au seuil de 5 %.

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

I-Caractérisation biochimique des fractions protéiques issues de l'hydrolyse des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

1-Résultats

1-1-Evolution de quelques paramètres biochimiques dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysée par le complexe protéasique Protamex.

1-1-1-Taux de matière sèche

Avant hydrolyse le broyat de coproduit a un taux de matière sèche de 40 %. Lorsque la digestion a lieu à 40°C ou à 50°C, le taux de matière sèche du surnageant de broyat de coproduit augmente significativement au seuil de 5% dans la farine de la fraction soluble avec l'avancement de la protéolyse jusqu'à 60 min de réaction. Après ce temps d'incubation, cette augmentation est faible. Elle n'est pas significative au seuil de 5%. A 60 min de réaction, le taux de matière sèche de la farine de la fraction soluble est de $33,2 \pm 0,6$ % à 40°C alors que celui obtenu à 50°C est de $20,9 \pm 0,6$ %. A la fin de la réaction, c'est-à-dire à 180 min d'incubation, les taux de matière sèche dans la farine cette fraction protéique à 40°C et 50°C sont respectivement de $36,2 \pm 0,5$ % et de $26,2 \pm 0,5$ %. Le taux de matière sèche à 40°C dans la farine de la fraction soluble est supérieur à celui de la farine de la même fraction obtenue à 50°C.

Le taux de matière sèche diminue significativement au seuil de 5 % dans la farine de la fraction insoluble c'est-à-dire dans la farine du culot lorsque la digestion a lieu à 40°C ou à 50°C pendant 60 min. Au-delà de ce temps de réaction, cette diminution n'est plus significative au seuil de 5 %. A 60 min de réaction, le taux de matière sèche de la farine de la fraction insoluble est de $7,4 \pm 0,1$ à 40°C alors que celui obtenu à 50°C au même temps d'incubation est de $19,4 \pm 0,1$ %. A la fin de la réaction, c'est-à-dire à 180 min d'incubation, les taux de matière sèche dans cette farine de la fraction protéique à 40°C et 50°C sont

respectivement de $4,1 \pm 0,1$ et de $13,8 \pm 0,1$ %. Le taux de matière sèche à 40°C dans la farine de la fraction insoluble est inférieur à celui de la farine de la même fraction obtenue à 50°C (Tableaux IV).

Tableau IV: Evolution des taux de matière sèche (%) dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex.

| Température d'hydrolyse ($^{\circ}\text{C}$) | Type de farine | Temps d'hydrolyse (en min) | | | | | | |
|--|----------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 40 | surnageant | 40 | $17,8 \pm 0,3$ | $30,3 \pm 0,3$ | $33,2 \pm 0,6$ | $33,9 \pm 0,3$ | $34,7 \pm 0,4$ | $36,2 \pm 0,5$ |
| | culot | | $22,8 \pm 0,2$ | $10,2 \pm 0,2$ | $7,4 \pm 0,1$ | $6,6 \pm 0,2$ | $5,9 \pm 0,1$ | $4,1 \pm 0,1$ |
| 50 | surnageant | 40 | $13,1 \pm 0,3$ | $17,5 \pm 0,3$ | $20,9 \pm 0,6$ | $25,2 \pm 0,3$ | $25,7 \pm 0,4$ | $26,2 \pm 0,5$ |
| | culot | | $27,1 \pm 0,2$ | $22,6 \pm 0,2$ | $19,4 \pm 0,1$ | $15,1 \pm 0,2$ | $14,4 \pm 0,1$ | $13,8 \pm 0,1$ |

1-1-2-Taux de protéines

Le taux de protéine dans la farine de la fraction soluble a atteint $15,7 \pm 0,2$ % de matière sèche dans les 60 premières min de la réaction à 40°C tandis qu'à 50°C , à ce même temps d'incubation, il a été estimé à $13,7 \pm 0,2$ % de matière sèche. Le taux de protéine dans la farine de la fraction soluble a augmenté de façon significative au seuil de 5% pendant les 60 premières min d'incubation quelle que soit la température d'étude. Au-delà de 60 min d'hydrolyse, le taux de protéine de la farine de la fraction soluble est resté pratiquement stable quelle que soit la température de la réaction. Il a pu atteindre en 3 h de réaction $15,9 \pm 0,1$ et $14,2 \pm 0,1\%$ respectivement à 40 et 50°C . Le taux de protéine à 40°C dans la farine de la fraction soluble est supérieur à celui de la farine de la même fraction à 50°C .

Le taux de protéine diminue significativement au seuil de 5 % dans la farine de la fraction insoluble c'est-à-dire dans la farine du culot lorsque la digestion a lieu à 40°C ou à 50°C pendant 60 min. A 60 min de réaction, le taux de protéine de la farine de la fraction insoluble est de $8,3 \pm 0,2$ à 40°C alors que celui obtenu à 50°C au même temps d'incubation est de $9,3 \pm 0,2$ %. Au-delà de 60 min de réaction, la diminution n'est plus significative au seuil de 5 %. A la fin de la réaction, c'est-à-dire à 180 min d'incubation, les taux de protéine dans les farines des fractions protéiques à 40°C et 50°C sont respectivement de $8,3 \pm 0,3$ et de $8,7 \pm 0,3$ %. Le taux de protéine à 40°C dans la farine de la fraction insoluble est inférieur à celui de la farine de la même fraction obtenue à 50°C pendant les 60 premières min de

réaction. Au-delà de ce temps d'incubation, les taux protéiques ne varient pas au seuil de 5 % (Tableaux V).

Tableau V: Evolution des taux de protéines (% de matière sèche) dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex.

| Température d'hydrolyse (°C) | Type de farine | Temps d'hydrolyse (en min) | | | | | | |
|------------------------------|----------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 40 | surnageant | 23,05 | 11,7 ±0,4 | 14,2 ±0,6 | 15,7 ±0,2 | 15,8 ±0,1 | 15,8 ±0,1 | 15,9 ±0,1 |
| | culot | | 12,4 ±0,1 | 8,9 ±0,3 | 8,3 ±0,2 | 8,3 ±0,2 | 8,4 ±0,3 | 8,3 ±0,3 |
| 50 | surnageant | 23,05 | 9,9 ±0,4 | 11,8 ±0,6 | 13,7 ±0,2 | 14,1 ±0,1 | 14,1 ±0,1 | 14,2 ±0,1 |
| | culot | | 13,1 ±0,1 | 11,5 ±0,3 | 9,3 ±0,2 | 8,9 ±0,2 | 8,8 ±0,3 | 8,7 ±0,3 |

1-1-3-Taux de cendres et de lipides

Les taux de cendres et de lipides ne varient pas de façon significative au seuil de 5% dans les fractions protéiques (soluble et insoluble) de l'hydrolysate de coproduit de la sole tropicale quels que soient le temps et la température de réaction. Entre 20 min et 3 h d'hydrolyse, les taux de cendre et de lipide se situent respectivement entre $2,3 \pm 0,1$ et $2,6 \pm 0,3$; $1,3 \pm 0,1$ % et $1,1 \pm 0,1$ % dans la farine de la fraction soluble à 40°C. A 50°C, les mêmes taux sont $2,2 \pm 0,1$ et $2,8 \pm 0,3$; $1,2 \pm 0,1$ et $1,5 \pm 0,1$. Dans les farines des fractions insolubles, les taux de cendre et de lipide se situent respectivement entre $5,9 \pm 0,2$ et $6,2 \pm 0,2$; $0,4 \pm 0,1$ et $0,6 \pm 0,2$ % de matière sèche à 40°C. A 50°C, les mêmes taux sont $6,8 \pm 0,2$ et $6,2 \pm 0,2$; $0,5 \pm 0,1$ et $0,2 \pm 0,2$. Le taux de lipide de la farine de la fraction soluble est plus élevé que celui de la farine de la fraction insoluble quel que soit la température d'hydrolyse. Pour le taux de cendre, la situation contraire a été observée. Les taux de cendres sont significativement différents des taux de lipides (Tableaux VI et VII).

Tableau VI: Evolution des taux de lipides dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex.

| Température d'hydrolyse (°C) | Type de farine | Temps d'hydrolyse (min) | | | | | | |
|------------------------------|----------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 0 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 40 | surnageant | 1,8 | 1,3 ±0,1 | 1,3 ±0,3 | 1,3 ±0,4 | 1,3 ±0,5 | 1,2 ±0,1 | 1,1 ±0,1 |
| | culot | | 0,4 ±0,1 | 0,3 ±0,1 | 0,4 ±0,2 | 0,4 ±0,4 | 0,5 ±0,5 | 0,6 ±0,2 |
| 50 | surnageant | 1,8 | 1,2 ±0,1 | 1,4 ±0,3 | 1,2 ±0,4 | 1,4 ±0,5 | 1,5 ±0,1 | 1,5 ±0,1 |
| | culot | | 0,5 ±0,1 | 0,4 ±0,1 | 0,6 ±0,2 | 0,3 ±0,4 | 0,2 ±0,5 | 0,2 ±0,2 |

Tableau VII: Evolution des taux de cendres dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysée par le complexe protéasique Protamex.

| Température d'hydrolyse (°C) | Type de farine | Temps d'hydrolyse (min) | | | | | | |
|------------------------------|----------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 0 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 40 | surnageant | 9,2 | 2,3 ±0,1 | 2,6 ±0,4 | 2,6 ±0,3 | 2,5 ±0,3 | 2,5 ±0,1 | 2,6 ±0,3 |
| | culot | | 5,9 ±0,2 | 5,9 ±0,2 | 5,9 ±0,4 | 5,8 ±0,1 | 5,9 ±0,2 | 5,8 ±0,2 |
| 50 | surnageant | 9,2 | 2,2 ±0,1 | 2,3 ±0,4 | 2,3 ±0,3 | 2,7 ±0,3 | 2,9 ±0,1 | 2,8 ±0,3 |
| | culot | | 6,8 ±0,2 | 6,4 ±0,2 | 6,6 ±0,4 | 5,9 ±0,1 | 5,4 ±0,2 | 6,2 ±0,2 |

1-1-4-Taux des substances organiques non dosées

Les taux des substances organiques non dosées ne varient pas de façon significative au seuil de 5% dans les fractions protéiques soluble et insoluble de l'hydrolysate de coproduit de la sole tropicale quels que soient le temps et la température de réaction. Ceux des farines des fractions solubles sont statistiquement inférieurs aux taux de substances organiques non dosées des farines des fractions insolubles. Il n'ya pas de différence significative au seuil de 5 % entre les taux obtenus à 40°C et 50°C. A 180 min de réaction, les taux des substances organiques non dosées dans les farines des fractions solubles et insolubles sont respectivement de 2,7 ± 0,4 et de 3,2 ± 0,1 % de matière sèche à 40°C. A 50°C, les mêmes taux sont de 2,8 ± 0,4 et 3,1 ± 0,1 (**Tableau VIII**).

Tableau VIII: Evolution des taux des substances organiques non dosées dans le culot et le surnageant de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au cours de l'hydrolyse des protéines catalysée par le complexe protéasique Protamex.

| Température d'hydrolyse (°C) | Type de farine | Temps d'hydrolyse (en min) | | | | | | |
|------------------------------|----------------|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 0 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 40 | surnageant | 6 | 2,8 ±0,3 | 2,6 ±0,2 | 2,6 ±0,3 | 2,7 ±0,3 | 2,8 ±0,1 | 2,7 ±0,4 |
| | culot | | 3,2 ±0,1 | 3,3 ±0,1 | 3,2 ±0,2 | 3,1 ±0,1 | 3,1 ±0,2 | 3,2 ±0,1 |
| 50 | surnageant | 6 | 2,7 ±0,3 | 2,8 ±0,2 | 2,4 ±0,3 | 2,5 ±0,3 | 2,7 ±0,1 | 2,8 ±0,4 |
| | culot | | 3,1 ±0,1 | 3,1 ±0,1 | 3,7 ±0,2 | 3,6 ±0,1 | 3,2 ±0,2 | 3,1 ±0,1 |

1-1-5-Profiles moléculaires

La fraction soluble des coproduits de la sole tropicale avant l'hydrolyse par le complexe protéasique Protamex est composée en majorité d'un ensemble de peptides dont les masses moléculaires varient entre 13700 et 1084 Da. Ensuite, viennent les peptides dont les masses moléculaires sont inférieures ou égales à celle de la leucine c'est-à-dire 294 Da. En 10 min de réaction à 40°C, le complexe protéasique Protamex a hydrolysé une grande quantité des peptides dont les masses moléculaires se situent entre 13700 et 1084 Da. A 180 min de réaction, la quantité de ces peptides a encore considérablement diminué. Les peptides dont les masses moléculaires sont inférieures ou égales à celle de la leucine ont été aussi considérablement transformés. Pourtant à 50°C, cette hydrolyse n'a pas été efficace quel que soit le temps de réaction (**Figures 8 et 9**).

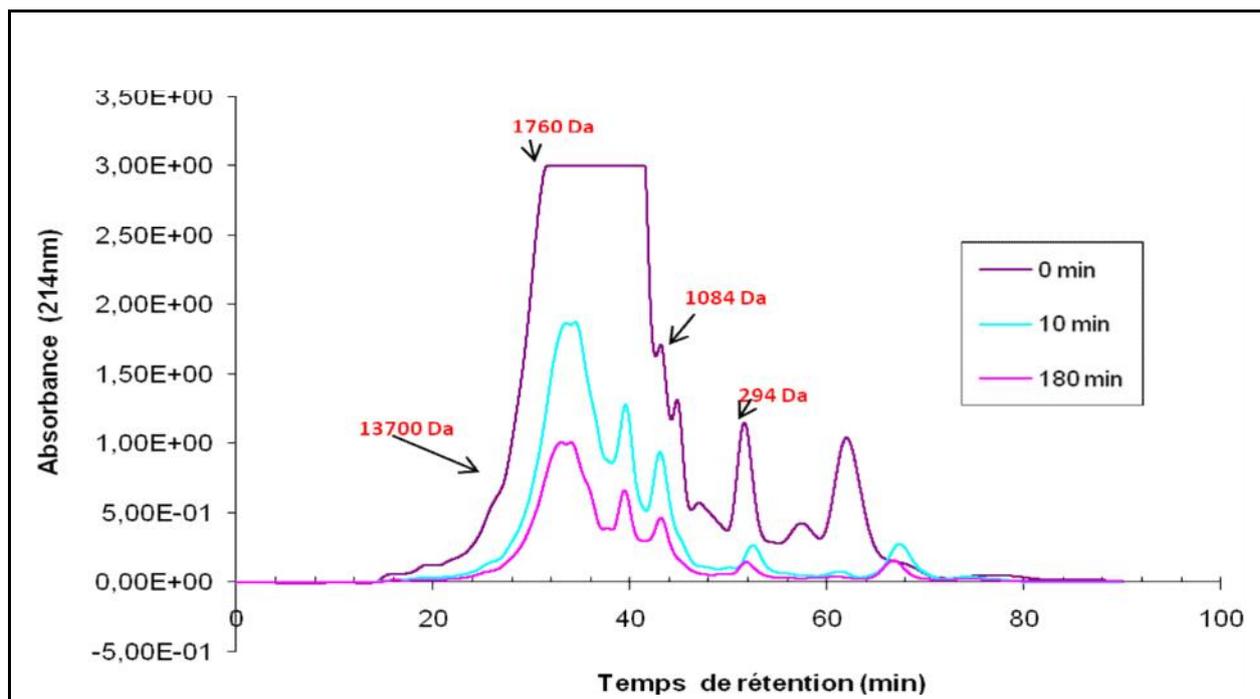


Figure 8 : Profil d'élution des peptides des fractions solubles obtenues par hydrolyse à 40°C à différents temps des protéines du broyat des coproduits de la sole (*Cynoglossus senegalensis*) après chromatographie d'exclusion moléculaire sur le gel Superdex peptide 10/300GL

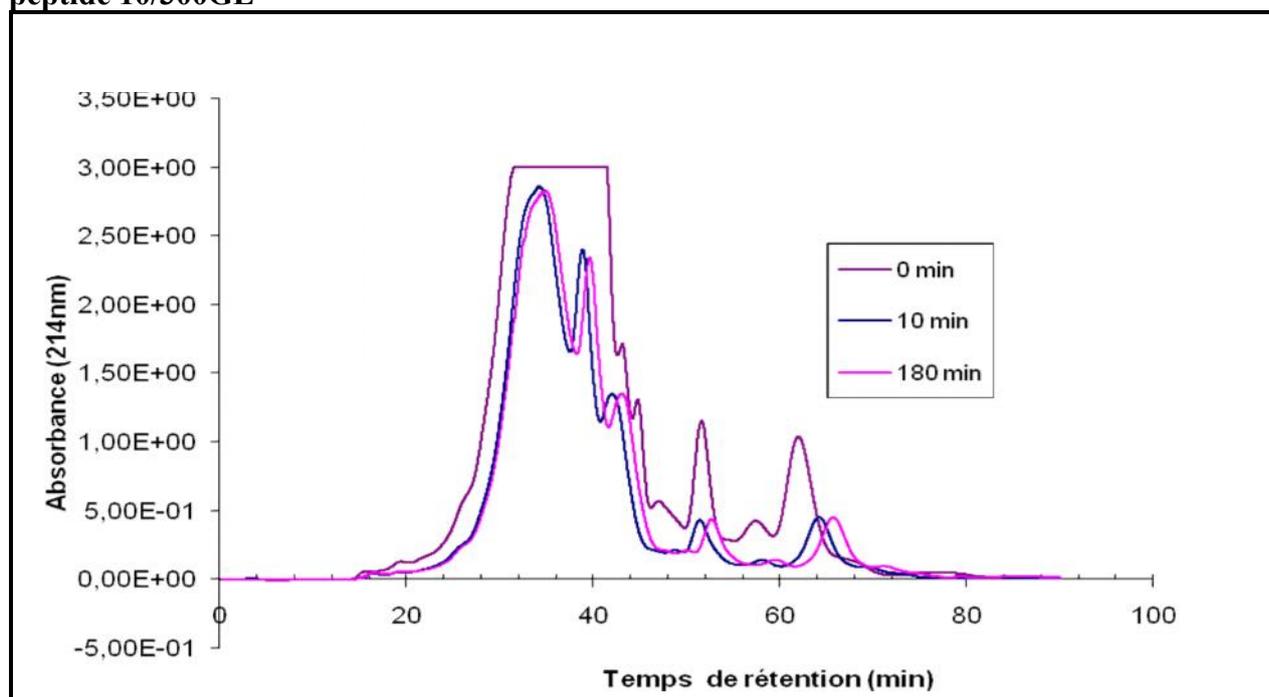


Figure 9 : Profil d'élution des peptides des fractions solubles obtenues par hydrolyse à 50°C à différents temps des protéines du broyat des coproduits de la sole (*Cynoglossus senegalensis*) après chromatographie d'exclusion moléculaire sur le gel Superdex peptide 10/300GL

1-1-6-Degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse des protéines des fractions solubles de l'hydrolysats du broyat des coproduits de la sole tropicale augmente avec le temps d'incubation du milieu réactionnel jusqu'à 50 min. Au-delà de ce temps de réaction, l'augmentation devient faible ou nulle. Le degré d'hydrolyse à 40°C dans la fraction soluble est supérieur à celui de la même fraction obtenue à 50°C (**Figure 10**). A 50 min de réaction, les valeurs sont respectivement de 22,5 % et 17,5 %. Alors qu'à 180 min de réaction, elles sont de 25 et 18,5%.

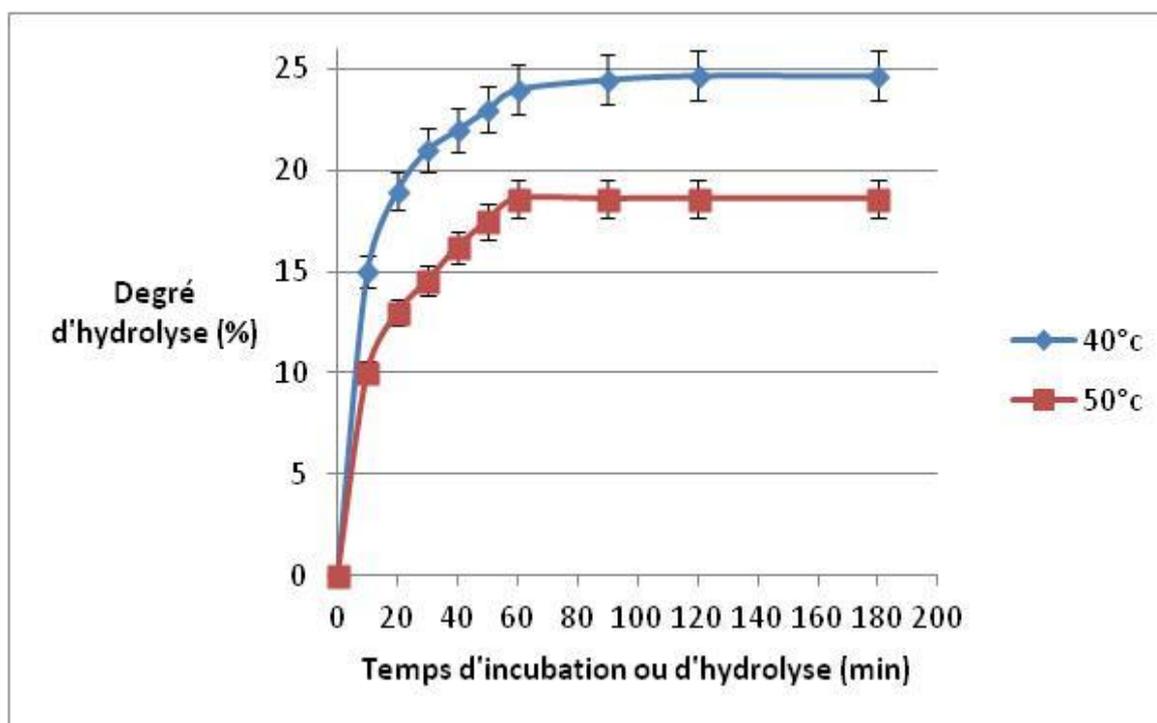


Figure 10: Influence du temps et de la température sur le degré d'hydrolyse des protéines des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

1-1-7-Acides aminés

Avant l'hydrolyse, le taux d'acides aminés essentiels était de 4,59 g/100g de matière sèche tandis que celui des acides aminés totaux était de 12,86g/100g de matière sèche. Après l'hydrolyse, une augmentation de ces taux d'acides aminés a été observée. A 40°C, le taux d'acides aminés essentiels a oscillé entre 8,6g/100g à 33,6g/100g de matière sèche. La plus forte valeur a été obtenue à 120 min de réaction. Elle est de 33,64/100g de matière sèche. A 50°C, la quantité d'acides aminés essentiels évoluait entre 10,8g/100g et 24,9g/100g de matière sèche (**Tableau IX**). La plus forte valeur a été obtenue à 120 min de réaction. Elle est de 27,11g/100g de matière sèche. Entre 20 et 60 min de réaction, le taux d'acides aminés

essentiels n'a pratiquement pas évolué. Il a varié entre 24,58 et 24,59 g/100g de matière sèche. Les taux d'acides aminés essentiels n'ont pas pu atteindre la moitié des taux d'acides aminés totaux (**Tableau X**).

Au total, 15 acides aminés ont été mis en évidence quelle que soit la température d'incubation du milieu réactionnel. Il s'agit de l'alanine, de la glycine, de la leucine, de la méthionine, de la phénylalanine, de la valine, de la cystéine, du tryptophane, de l'arginine, de l'asparagine, de la glutamine, de l'isoleucine, de la thréonine, de la sérine et de la lysine. Il n'a pas été possible de détecter la cystéine, le tryptophane, l'arginine, l'asparagine et la glutamine. Parmi les acides aminés identifiés, se trouvent 9 acides aminés essentiels qui sont la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la valine, la cystéine et la lysine. A 40°C et 50°C, les acides aminés qui ont les taux les plus élevés sont respectivement l'ASP, la GLU et la GLY, la GLU (**Tableau X**).

Tableau IX: Evolution des taux d'acides aminés totaux, essentiels et du rapport acides aminés essentiels/ acides aminés totaux (% de matière sèche) dans le surnageant de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) au cours de l'hydrolyse à 40°C et 50°C des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex

| Température d'hydrolyse (°C) | Acides aminés | Temps d'hydrolyse (min) | | | | | | |
|------------------------------|--|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 40°C | acides aminés totaux | 12,86 | 33,8 | 43,2 | 72,38 | 60,36 | 77,05 | 45,63 |
| | acides aminés essentiels | 4,59 | 14,83 | 19,73 | 32,41 | 27,74 | 33,64 | 20,84 |
| | rapport acides aminés essentiels/ totaux | 35,71 | 43,87 | 45,67 | 44,77 | 45,95 | 43,65 | 45,67 |
| 50°C | acides aminés totaux | 12,86 | 63,27 | 65,05 | 61,93 | 59,5 | 65,35 | 23,42 |
| | acides aminés essentiels | 4,59 | 24,58 | 24,62 | 24,59 | 23,77 | 27,11 | 10,83 |
| | rapport acides aminés essentiels/ totaux | 35,71 | 38,84 | 37,84 | 39,70 | 39,94 | 41,48 | 46,24 |

Tableau X: Evolution des taux d'acides aminés identifiés (% de matière sèche) dans le surnageant de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

au cours de l'hydrolyse à 40°C et 50°C des protéines catalysées par le complexe protéasique Protamex

| Température d'hydrolyse | Acides aminés identifiés dans la farine de la fraction soluble | Temps d'hydrolyse (en min) | | | | | | |
|-------------------------|--|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | | 0 | 20 | 40 | 60 | 90 | 120 | 180 |
| 40°C | ALA | 1,31 | 2,46 | 2,45 | 5,06 | 3,20 | 5,34 | 2,52 |
| | GLY | 2,35 | 2,59 | 3,30 | 8,86 | 4,44 | 8,86 | 3,46 |
| | VAL | 0,10 | 1,47 | 1,98 | 3,85 | 2,68 | 4,20 | 2,12 |
| | LEU | 2,11 | 4,58 | 6,16 | 6,18 | 9,10 | 6,56 | 6,60 |
| | ILE | 1,05 | 1,29 | 1,71 | 4,30 | 2,56 | 4,54 | 2,09 |
| | THR | 0,08 | 0,54 | 0,75 | 3,91 | 1,03 | 3,94 | 0,79 |
| | SER | 0,08 | 0,73 | 1,03 | 3,93 | 1,42 | 3,87 | 1,29 |
| | PRO | 1,21 | 1,82 | 2,36 | 5,20 | 3,37 | 5,24 | 2,86 |
| | ASP | 1,14 | 3,74 | 4,79 | 8,97 | 6,41 | 9,45 | 4,81 |
| | MET | 0,04 | 1,22 | 1,75 | 2,26 | 2,44 | 2,13 | 1,90 |
| | GLU | 2,25 | 7,01 | 8,68 | 10,47 | 12,42 | 13,12 | 9,33 |
| | PHE | 0,04 | 2,93 | 3,82 | 3,10 | 5,09 | 3,08 | 3,80 |
| | LYS | 1,016 | 1,13 | 1,34 | 3,38 | 1,63 | 3,70 | 1,08 |
| | HIS | 0,07 | 0,94 | 1,19 | 1,50 | 1,79 | 1,62 | 1,17 |
| TYR | 0,01 | 1,35 | 1,89 | 1,41 | 2,78 | 1,40 | 1,81 | |
| 50°C | ALA | 1,31 | 6,43 | 6,25 | 6,02 | 5,80 | 5,76 | 3,14 |
| | GLY | 2,35 | 11,12 | 10,67 | 10,53 | 8,78 | 7,81 | 3,06 |
| | VAL | 0,108 | 2,77 | 3,03 | 2,76 | 3,14 | 3,38 | 1,04 |
| | LEU | 2,11 | 4,96 | 4,77 | 4,92 | 4,83 | 5,20 | 3,98 |
| | ILE | 1,05 | 3,09 | 3,19 | 3,19 | 3,04 | 3,72 | 0,19 |
| | THR | 0,08 | 2,73 | 2,99 | 2,79 | 2,68 | 3,14 | 0,25 |
| | SER | 0,08 | 2,48 | 2,70 | 2,81 | 2,50 | 2,98 | 0,50 |
| | PRO | 1,21 | 5,56 | 6,08 | 5,40 | 4,95 | 4,74 | 2,38 |
| | ASP | 1,14 | 6,57 | 7,13 | 6,29 | 6,54 | 7,62 | 0,92 |
| | MET | 0,04 | 1,95 | 1,84 | 1,91 | 1,75 | 1,97 | 1,06 |
| | GLU | 2,25 | 8,09 | 9,30 | 7,93 | 8,73 | 11,29 | 1,43 |
| | PHE | 0,04 | 2,60 | 2,46 | 2,46 | 2,18 | 2,22 | 2,37 |
| | LYS | 1,01 | 2,88 | 2,51 | 2,67 | 2,61 | 3,30 | 0,75 |
| | HIS | 0,07 | 1,12 | 1,13 | 1,08 | 1,04 | 1,20 | 0,69 |
| TYR | 0,01 | 0,92 | 1,00 | 1,17 | 0,93 | 1,02 | 1,66 | |

1-2-Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur quelques paramètres biochimiques de la fraction soluble de l'hydrolysate des protéines des coproduits de la sole tropicale

1-2-1-Taux de matière sèche des fractions protéiques

Le taux de matière sèche de la fraction protéique augmente considérablement avec l'avancement de la protéolyse quel que soit le volume d'eau du milieu réactionnel. A 6h de réaction, le taux de matière sèche atteint 93,6%, 92,1%, 74,1% et 71,2% respectivement pour 100%, 50%, 25% et 10% (p/p) de quantité d'eau distillée utilisée dans le bioréacteur. Les quantités d'eau de 100% et de 50% (p/p) ont permis d'obtenir les taux de matière sèche les plus élevés (**Figure 11**).

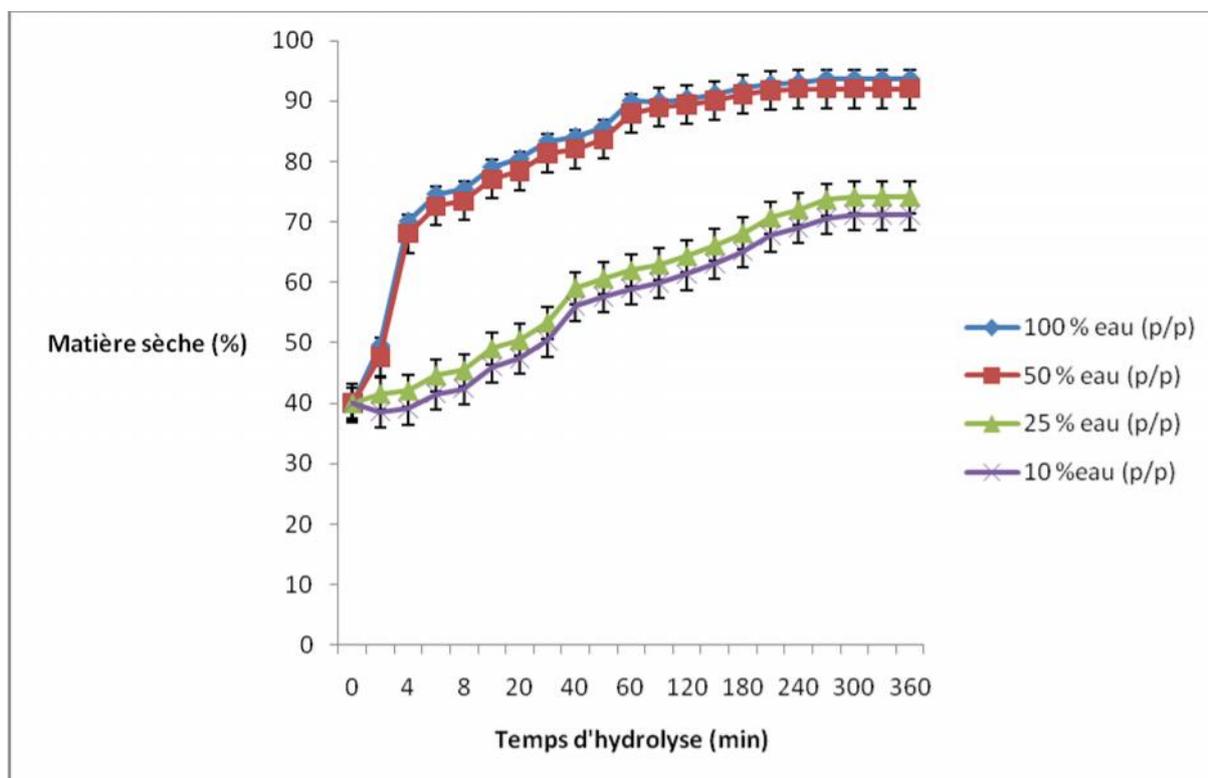


Figure 11: Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur le taux de matière sèche de la fraction soluble de l'hydrolyse à 40°C des protéines des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

1-2-2-Taux de protéines

Le taux de protéine de la fraction protéique augmente considérablement avec l'avancement de la protéolyse quel que soit le volume d'eau du milieu réactionnel jusqu'à 3 h de réaction. Au-delà de ce temps d'incubation, le taux de protéine se stabilise. A 6h de réaction, les taux de protéine atteignent 16g/100g MS, 14,5g/100g MS, 12,5g/100g MS et 11,5g/100g MS respectivement pour 100%, 50%, 25% et 10% (p/p) de quantité d'eau distillée

utilisée dans le bioréacteur. Les quantités d'eau de 100% et 50% (p/p) ont permis d'obtenir les taux de protéine le plus élevé (**Figure 12**).

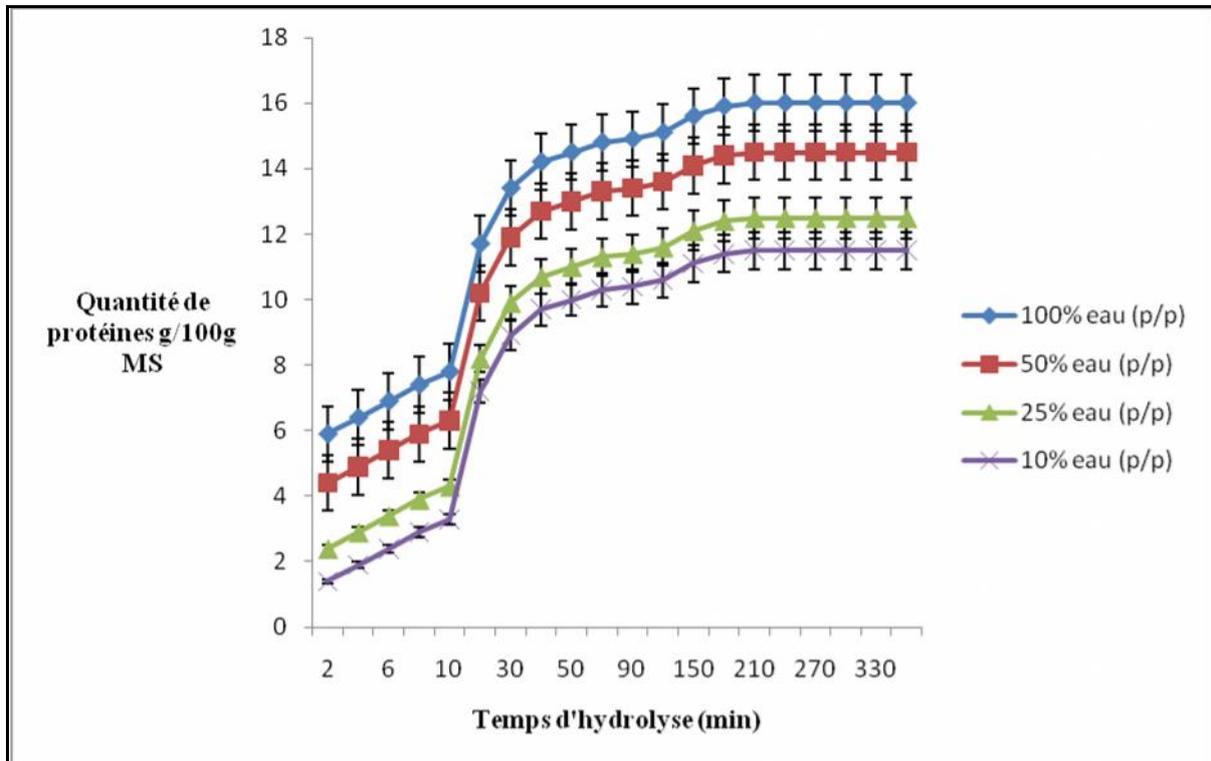


Figure 12 : Influence du temps d'hydrolyse et du volume d'eau du milieu réactionnel sur le taux de protéine de la fraction soluble de l'hydrolyse à 40°C des protéines des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

1-2-3-Degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse de la fraction protéique augmente considérablement avec l'avancement de la protéolyse quel que soit le volume d'eau du milieu réactionnel jusqu'à 1 h 30 mn de réaction. Au-delà de ce temps d'incubation, le degré d'hydrolyse se stabilise. A 6h de réaction, le degré d'hydrolyse atteignent 16g/100g MS, 14,5g/100g MS, 12,5g/100g MS et 11,5g/100g MS respectivement pour 100%, 50%, 25% et 10% (p/p) de quantité d'eau distillée utilisée dans le bioréacteur. Les quantités d'eau de 100% et 50% (p/p) ont permis d'obtenir le degré d'hydrolyse le plus élevé (**Figure 13**).

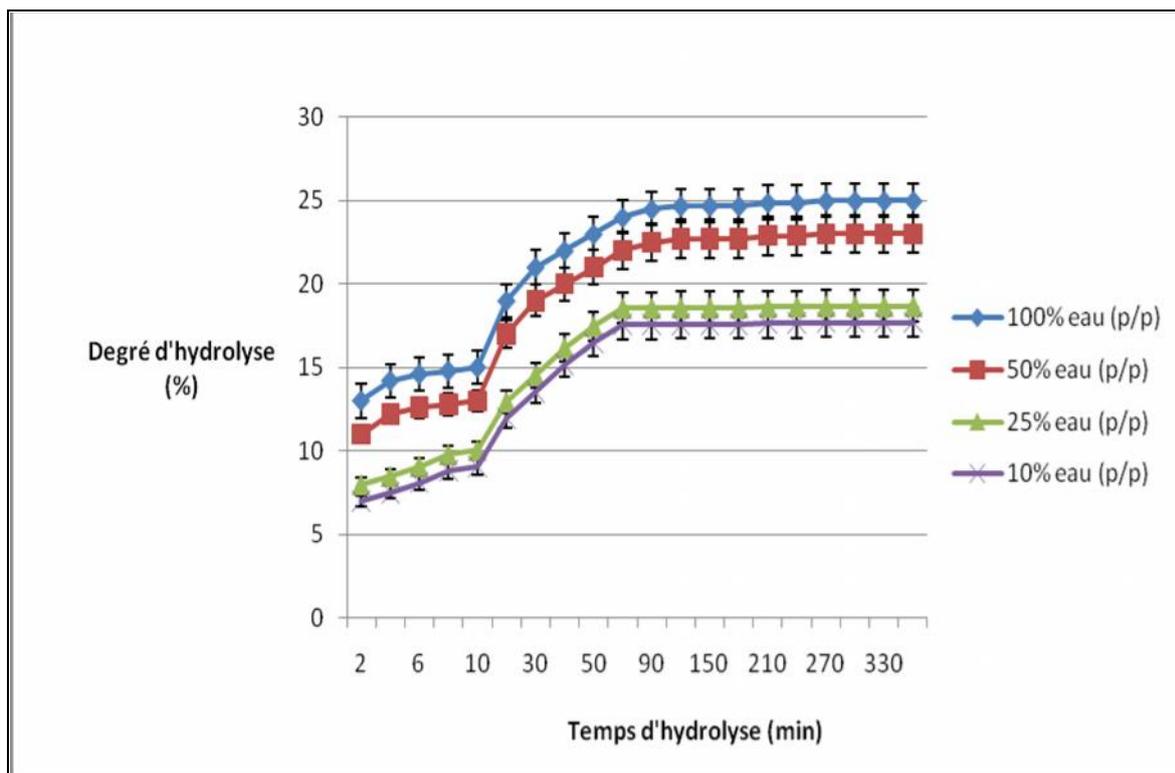


Figure 13 : Influence du volume d'eau du milieu réactionnel sur le degré d'hydrolyse des protéines de la fraction soluble de l'hydrolyse à 40°C des protéines des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*)

1-3-Caractérisation aromatique des hydrolysats de coproduits de sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) et analyse sensorielle

1-3-1-Caractérisation aromatique

Dans les hydrolysats de coproduits de sole, cinquante sept (57) molécules aromatiques ont été mises en évidence dont trente quatre (34) ont été formellement identifiées. Il s'agit du 3-pentanone, du pentenal, du 1-penten-3-ol, du 1-pentanol, du (E)-2-pentenal, du (E)-2-penten-1-ol, du (Z)-2-penten-1-ol, du 1-hexen-3-ol, du (Z)-3-hexenal, du (E)-2-hexenal, du 1-hexanol, du 3-octanone, du 2,3 octanedione, du 1-octen-3-ol, du octanal, du (E)-2-octenal, du (E)-2-octen-1-ol, du 1-octanol, du (E, E)-3,5-octadien-2-one, du 2-nonanone, du nonanal, du nonanol, du (E)-2-nonenal, du (E, Z)-2,6-nonadienal, du propanol, de l'hexanal, du 6-méthyl-2-heptanone, du thiopen, de S-méthyl ester/acide éthanetioique, du diméthyl disulfide, de l'acide acétique, du 2-éthyl-furane, des 3 et 2- méthyl butanol, du 3-méthyl- thiopène.

1-3-2-Analyse sensorielle

La liste de descripteurs et les moyennes des notes attribuées sont présentées dans le **tableau XI**. Ces résultats montrent que:

- les 4 hydrolysats obtenus après 3 h de réaction ne sont pas significativement différents: leur odeur est intense et légèrement marine, «crustacé séché», «algue séchée», «poisson gras» et «poisson séché»;
- les 2 hydrolysats obtenus après 6 h de réaction à 50°C se distinguent des précédents par leur note «crustacé séché» plus intense, en particulier avec la température d'inactivation de 95°C;
- les 2 hydrolysats obtenus après 6h de réaction à 40°C sont caractérisés par une « faible odeur marine » et de fortes odeurs «de pied et de soufre», quelle que soit la température d'inactivation. A noter que ces 2 produits, une fois diluée (environ 20 fois), ne présentent plus ces odeurs mais plutôt une odeur marine, d'huître/fruitée.

Les profils sensoriels des hydrolysats basés sur une analyse en composante principale (ACP) utilisant une analyse de variance à deux facteurs (effet juge et effet produit) sont présentés sur la **figure 14**. L'analyse en composante principale (ACP), faites sur les scores moyens pour chaque descripteur sensoriel et toutes les conditions d'hydrolyse (**figure 15**), montre une bonne discrimination entre les échantillons. L'axe horizontal plan ACP décrit 82.04% de la variance. Le premier axe est principalement défini d'un côté par les descripteurs : "feet/cheese : pied/fromage", "fécal", "soufre" et de l'autre côté par l'attribut "marine/iode". Le deuxième axe est représenté par deux descripteurs en direction opposée : "poissons gras" et "intensité globale". Ce graphique fait apparaître trois groupes d'hydrolysats avec des caractéristiques sensorielles spécifiques.

-le premier groupe est constitué par l'hydrolysat (T40, t6 : température d'hydrolyse = 40°C, temps d'hydrolyse = 6 heures) qui développe une forte odeur d'intensité globale et une odeur de "camembert", "fécale" ou de "soufre" comme notes olfactives ;

-les deux autres groupes apparaissent sur le deuxième axe : au dessus de la figure, un groupe de deux échantillons, avec 3 heures d'hydrolyse, qui ont des notes olfactives légères. Il s'agit de l'odeur "marine/iode" et principalement une de "poissons gras". L'échantillon T50, t6 (température d'hydrolyse = 50°C, temps d'hydrolyse = 6 heures) représente le troisième groupe avec des notes de "crustacés séchés".

Tableau XI : Tableau des descripteurs utilisés pour l'analyse sensorielle des hydrolysats et moyennes des notes attribuées

| Descripteurs ou odeurs | Temps et température d'hydrolyse | | | | | | | | F calc. | Probabilité |
|---------------------------|--|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|---------------------------------|
| | 3h/40°C | 3h/50°C | 6h/40°C | 6h/50°C | 3h/40°C | 3h/50°C | 6h/40°C | 6h/50°C | | |
| | Température d'inactivation de l'enzyme | | | | | | | | | |
| | 85°C | | | | 95°C | | | | | |
| intensité globale | 5.45 bc | 5.23 c | 8.19 a | 5.71 bc | 5.49 bc | 5.63 bc | 7.84 a | 6.50 b | 10.95 | <0.0001 *** |
| marine/iodée | 2.46 a | 2.53 a | 1.26 b | 2.72 a | 2.59 a | 2.26 a | 1.24 b | 2.84 a | 4.16 | 0.0005 *** |
| crustacé séché | 2.56 b | 2.59 b | 2.45 b | 3.41 ab | 2.70 b | 2.28 b | 2.19 b | 4.63 a | 3.18 | 0.0047 ** |
| algue séchée | 2.07 | 1.85 | 1.59 | 2.74 | 2.63 | 2.58 | 1.68 | 2.25 | 1.02 | 0.42 |
| poisson gras | 1.85 ab | 2.09 a | 0.41 c | 1.73 ab | 1.66 ab | 1.74 ab | 0.64 bc | 1.26abc | 2.45 | 0.02 * |
| rance/huile de lin | 0.76 | 1.03 | 0.64 | 0.97 | 1.38 | 1.32 | 1.07 | 0.52 | 1.14 | 0.34 |
| chien mouillé | 0.96 | 0.61 | 0.78 | 0.56 | 0.82 | 1.06 | 0.92 | 0.59 | 0.63 | 0.72 |
| poisson séché | 1.81 | 2.59 | 2.94 | 2.36 | 1.77 | 2.16 | 2.34 | 2.51 | 0.93 | 0.49 |
| pied/fromage | 0.31 b | 0.26 b | 2.67 a | 0.29 b | 0.35 b | 0.53 b | 2.51 a | 0.29 b | 8.38 | <0.0001 *** |
| soufrée | 0.89 b | 0.78 b | 4.31 a | 0.76 b | 0.74 b | 0.80 b | 4.10 a | 0.59 b | 16.90 | <0.0001 *** |
| Fécale | 0.41 b | 0.12 b | 3.19 a | 0.19 b | 0.29 b | 0.37 b | 2.44 a | 0.15 b | 10.35 | <0.0001 *** |

p>5% : non significatif, * : différence significative au seuil de 5%, ** : différence significative au seuil de 1%, *** : différence significative au seuil de 0.1%. Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes

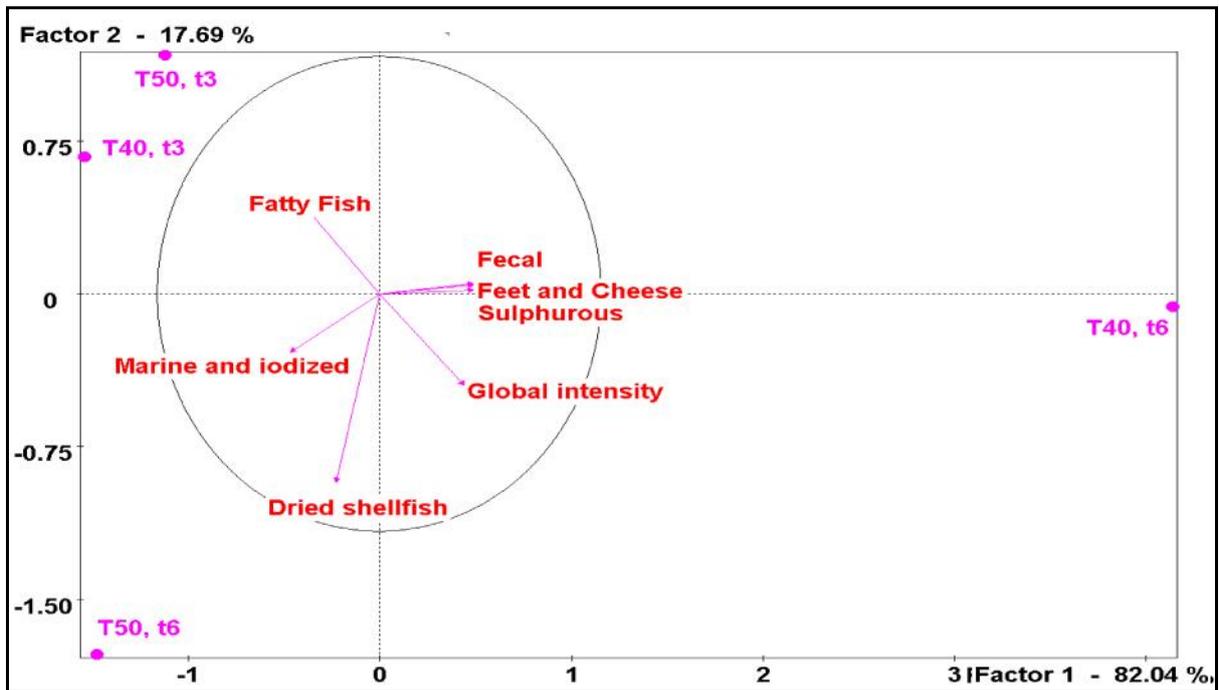


Figure 14: Profils sensoriels des hydrolysats de coproduits de la sole (*Cynoglossus senegalensis*)

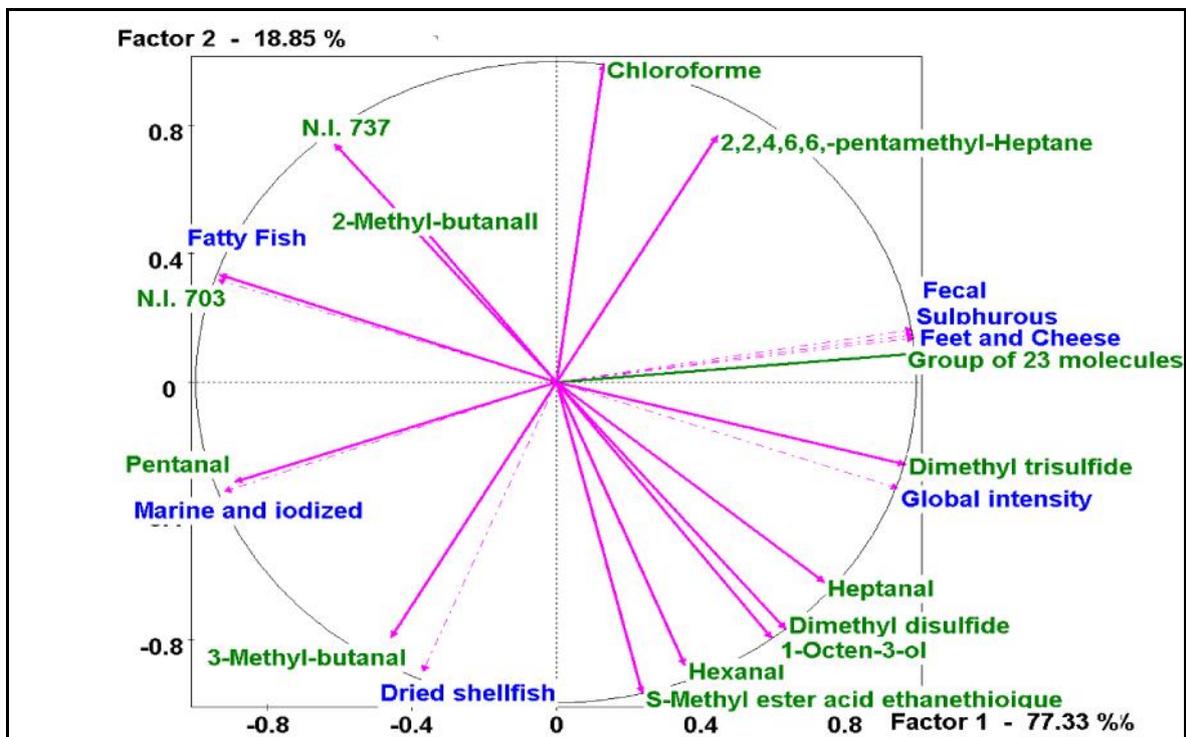


Figure 15 : Cercle de corrélation ACP présentant les descripteurs sensoriels et les molécules identifiées: — variables actives (molécules); - - - variables illustratives (descripteurs)

2-Discussion

Ces dernières années, de nombreux travaux ont porté sur l'hydrolyse des coproduits de poisson (Aspmo *et al.*, 2005; Dauksas *et al.*, 2005; Sathivel *et al.*, 2005a; Gbogouri *et al.*, 2004; Dumay *et al.*, 2006, Dumay, 2006; Souissi *et al.*, 2007; Dumay *et al.*, 2004; Kechaou *et al.*, 2009). Les principales protéases identifiées dans ces matrices marines sont des protéases acides (pepsine), aspartiques (trypsine, chymotrypsine, élastase), cystéiques (calpaine) et des métalloprotéases (collagénase) (Dumay, 2006). Elles sont localisées généralement dans les viscères. Au niveau de la sole tropicale *Cynoglossus senegalensis*, les principales protéases identifiées sont la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine (Klomklao *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2007; Nalinanon *et al.*, 2008). Les deux dernières activités sont maximales pour des pH >8 et pour une température de 55°C (Klomklao *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2007). Quant à la pepsine, son activité est maximale à pH 2 et une température de 55°C (Nalinanon *et al.*, 2008). Dans ce travail, les coproduits de sole n'ont pas été chauffés avant l'hydrolyse, les enzymes endogènes étaient donc toujours actives. Elles ont certainement participé à l'acte catalytique notamment la chymotrypsine et la trypsine puisque que les réactions d'hydrolyse ont été réalisées à pH 6,4 et aux températures de 40°C et 50°C. Cependant, Il convient de signaler que cette participation catalytique n'influencerait pas de façon significative la vitesse de la réaction lorsque le complexe protéasique Protamex est utilisé comme enzyme exogène (Dumay, 2006, Kechaou *et al.*, 2009). L'inactivation thermique des enzymes endogènes et des protéines entraîne des changements de conformation de ces substances organiques favorisant la protéolyse par les enzymes exogènes. Comme l'objectif de ce travail était de proposer, à terme, un procédé simple et économique transférable à l'industrie pour la valorisation des coproduits, l'inactivation préalable des enzymes endogènes n'a pas été retenue.

Avant l'hydrolyse, le broyat du coproduit de la sole tropicale a un taux de matière sèche de 40 %. Lorsque le complexe protéasique Protamex est ajouté à ce milieu, ce taux a augmenté avec le temps d'incubation. Ce résultat est identique à ceux présentés dans la littérature (Shahidi *et al.*, 1995; Benjakul & Morrissey, 1997; Benjakul & Morrissey, 1997; Liceaga-Gesualdo & Li-Chan, 1999; Gbogouri *et al.*, 2004). Il pourra s'expliquer par le fait que le complexe protéasique a effectivement dégradé les protéines du broyat libérant dans le milieu réactionnel des peptides, des acides et certaines substances organiques et minérales (Dumay *et al.*, 2004; Aspmo *et al.*, 2005; Dumay *et al.*, 2006; Dumay, 2009; Kechaou *et al.*, 2009). Cette situation n'a pas concerné les taux de lipide et de cendre qui sont faibles et qui n'ont pratiquement pas varié. Ce résultat est similaire à ceux de Nilsang *et al.*

(2005) qui ont obtenu une faible teneur en lipides dans ces fractions malgré la déstructuration des tissus. Ils ont affirmé que cette situation pourrait être due à une «exclusion des lipides avec les protéines insolubles» lors des processus de centrifugation. L'obtention d'un taux de matière sèche à 40°C supérieur à celui de 50°C suggère que le complexe protéasique a une activité maximale qui doit être proche de 40°C. Ce résultat corrobore avec ceux obtenus par **Slizyte et al. (2005)** sur des hydrolysats de coproduits de la Morue. En effet, ce complexe enzymatique, constitué de deux protéases en occurrence Alcalase et Neutrase, a son activité catalytique maximale à la températures de 50°C et aux pH compris entre 7 et 8. Le pH du milieu réactionnel étant proche de 6,4, il a pu faire varier certainement la température optimale d'hydrolyse du complexe protéasique l'amenant de 50°C à 40°C. Les enzymes du complexe protéasique ont une activité catalytique dont la stabilité ne dépasse pas 60 min dans le milieu réactionnel. Cette remarque a été aussi faite au niveau des profils moléculaires des peptides des hydrolysats et du degré d'hydrolyse. L'allure générale de ces cinétiques est classique et s'apparente à celles décrites dans la littérature notamment pour des produits et coproduits marins: estomacs de thon (**Guérard et al., 2001; Guérard et al., 2002**), têtes et muscles de harengs (**Liceaga-Gesualdo & Li-Chan, 1999; Sathivel et al., 2003**), muscles de saumon (**Kristinsson et Rasco, 2000a; Kristinsson et Rasco, 2000b**), têtes de saumon (**Gbogouri et al., 2004; Sathivel et al., 2005a**), muscles de morue (**Ravallec-Plé et al., 2000b**), têtes et viscères de sardine (**Dumay, 2006; Souissi et al., 2007; Kechaou et al., 2009**). Cette cinétique en deux temps s'explique par le fait que, dans une première phase, la vitesse de réaction est rapide et correspond à la rupture des liaisons peptidiques accessibles facilement, la seconde étape (plateau) traduit le fait que l'enzyme n'est plus capable de couper de liaisons peptidiques. Cependant, d'autres paramètres peuvent influencer cette cinétique. Il s'agit de l'augmentation de la teneur en peptides solubles dans le milieu réactionnel qui est susceptible d'agir comme inhibiteurs de la réaction de protéolyse (**Shahidi et al., 1995; Souissi et al., 2007**) et de l'inactivation partielle du complexe protéasique Protamex au cours du temps d'hydrolyse (**Guérard et al., 2002**). Les degrés d'hydrolyse à 40 et 50°C obtenus au bout de 180 min de réaction ne sont pas identiques. Cette situation est similaire à celles obtenues par plusieurs travaux (**Ravallec Plé et al., 2001; Dumay, 2006; Kechaou et al., 2009**). De telles variations de degrés d'hydrolyse traduisent bien une forte influence de la température sur l'hydrolyse. Cette différence peut s'expliquer d'une part par l'action du Protamex sur le substrat, qui atteint son optimum vers 40°C, d'autre part, cette différence peut être liée à l'efficacité du procédé d'hydrolyse. En effet, **Aspmo et al. (2005)**, ont montré que la quantité d'azote non protéique produite au cours de l'hydrolyse a une influence significative

dans la détermination des degrés d'hydrolyse par la méthode DNFB. La quantité d'eau dans le milieu réactionnel influence considérablement le degré d'hydrolyse des protéines. Une utilisation de 50 et de 100% (p/p) d'eau favorise l'acte catalytique et une libération beaucoup plus rapide des peptides dans le milieu réactionnel. Ces résultats ont été déjà obtenus par plusieurs auteurs au cours de l'hydrolyse enzymatique des coproduits (**Badal et al., 2001; Hoylen et al., 1994; Huong et al., 2007**). Après 240 min d'hydrolyse, les courbes de degrés d'hydrolyse ont atteint leur maximum. Ceci peut s'expliquer par le fait que les coproduits de soles constituent un substrat complexe (avec des viscères, des têtes et des squelettes), ils contiennent une quantité significative d'azote sous forme d'azote non protéique. L'hydrolyse de tels composés nécessite une longue durée afin de réaliser la dégradation et la solubilisation (**Aspmo et al., 2005; Badal et al., 2001**).

La fraction soluble des coproduits de la sole tropicale avant l'hydrolyse est composée en majorité d'un ensemble de peptides dont les masses moléculaires se situent entre 13700 et 1084 Da. Ensuite viennent les peptides dont les masses moléculaires sont inférieures ou égales à celle de la leucine c'est-à-dire 294 Da. En 10 min de réaction à 40°C, le complexe protéasique a hydrolysé une grande quantité des peptides dont les masses moléculaires se situent entre 13700 et 1084 Da. A 180 min de réaction, la quantité de ces peptides a considérablement diminué au profit du deuxième groupe. L'enrichissement des surnageants en acides aminés essentiels au cours d'une protéolyse n'est pas nouveau. Ainsi, cela a été déjà observé lors de l'hydrolyse de coproduits de calmar et de sardine (**Lian et al., 2005, Kechaou et al., 2009**). Il a même été établi que la durée de l'hydrolyse avait un effet notable sur la libération de certains acides aminés et donc sur les activités biologiques éventuelles des hydrolysats (**Wu et al., 2003**). Ces résultats ouvrent des pistes potentielles d'utilisation des hydrolysats de coproduits de la sole en formulation d'aliments de volailles. Cependant, il apparaît important de combiner le concept de «protéine idéale» (l'apport protéique étant une composante essentielle de la croissance des poulets de chairs) et celui lié aux acides aminés potentiellement limitant (**Leclercq, 1998; Relandeau et al., 2005; Zaman et al., 2008**). De plus, un apport en protéines et/ou en acides aminés insuffisants ou à l'inverse trop important entraînerait une altération des performances zootechniques du poulet (**Konashi et al., 2000 ; Métayer et al., 2008 ; Quentin et al., 2004**). Comme nous l'avions signalé, la cystéine n'a été dosée dans aucun échantillon. La teneur en acides aminés soufrés est également faible. En effet, pour la plupart des échantillons, le pourcentage de lysine est inférieur à celui de la «protéine idéale». Pour ces acides aminés, seuls les temps d'hydrolyse 20 min, 40 min, 90

min à 40°C sont intéressants. Ce point doit être pris en compte puisque les acides aminés soufrés sont les premiers acides aminés limitant pour les poulets de chair (**Baker, 2006**).

Ces résultats peuvent être corrélés à ceux obtenus par **Huong *et al.* (2007)** sur des hydrolysats de têtes de thons. Ces auteurs ont montré qu'il existe une forte corrélation entre la dégradation des protéines et leur solubilisation pendant l'hydrolyse. En effet, la distribution moléculaire des peptides d'un hydrolysats permet d'appréhender les voies de valorisation potentielles. En effet, une corrélation est très souvent observée entre cette taille et les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de ces hydrolysats: solubilité, stabilité thermique, capacité de rétention d'eau, etc. Les propriétés biologiques éventuelles des ces hydrolysats (antioxydante, antihypertensive, immunomodulante, antiprolifératrice...) sont aussi dépendantes de la taille moyenne des peptides mais aussi de leur composition en acide aminés (**Ravallec-Plé *et al.*, 2000a; Je *et al.*, 2005; Kim & Mendis, 2006; Picot *et al.*, 2006; Benjakul & Morrissey, 1997, Je *et al.*, 2007, Guérard *et al.*, 2001; Guérard *et al.*, 2002; Aspino *et al.*, 2005**). Selon **Benjakul *et al.* (1997)**, la répartition pondérale des molécules lors de l'hydrolyse enzymatique renseigne sur les futurs domaines d'application. Il a montré à travers son étude, que le pourcentage de protéines diminue au profit de celui des peptides au cours de l'hydrolyse. Il a pu isoler des peptides bioactifs qui ont un poids moléculaire compris entre 10 000 Da > PM > 200 Da à partir de coproduits de poissons.

Les teneurs en cendres des fractions solubles obtenues après hydrolyses des coproduits de la sole sont supérieures à celles contenues dans les culots. Cette situation peut être due à la composition proximale des coproduits dans lesquels on retrouve un mélange de viscères, de têtes et de squelettes (**Liceaga-Gesualdo *et al.*, 1999; Kristinsson *et al.*, 2000b; Sathivel *et al.*, 2003; Sathivel *et al.*, 2005a; Sathivel *et al.*, 2006**). En effet, au cours de l'hydrolyse, les membranes cellulaires des muscles restant collées au squelette ont eu tendance à se regrouper et à former des vésicules insolubles qui vont former des « boulettes » lors de la centrifugation et se retrouver dans le culot (**Shahidi *et al.*, 1995, Benjakul & Morrissey., 1997**). Compte tenu de la teneur élevée en protéines de ces fractions, de nombreuses applications peuvent être envisagées comme par exemple l'alimentation humaine ou animale (**Yu & Tan, 1990; Yu & Kaur, 1992; Cahu *et al.*, 1999; Oliva-Teles *et al.*, 1999; Refstie *et al.*, 2004**) ou encore mettre à profit leur richesse en azote pour la croissance des bactéries (**Dufossé *et al.*, 1997; Guérard *et al.*, 2001, Martone *et al.*, 2005**) ou pour l'agriculture (**Kurbanoglu *et al.*, 2002**).

Parmi les molécules aromatiques identifiées, certaines sont issues de la dégradation des acides gras. En effet, la dégradation des acides gras Omega 3 et Omega 6 permet la formation de beaucoup de molécules volatiles. Comparés aux graisses animales qui sont

riches en acides gras contenant 18 carbones, les produits de la mer ont beaucoup d'acides gras avec 20 ou 22 carbones. Ces acides gras peuvent être transformés en composés volatiles de plusieurs manières par :

-l'action des lipo-oxygénases qui sont très actives et qui ont une grande activité sur la peau et les viscères. Les molécules résultant de cette dégradation sont principalement des alcools et des cétones avec 8 carbones qui confèrent les odeurs d'algue marine, de légume frais et de métal aux produits de la mer. Dans les hydrolysats de coproduits de sole, plusieurs molécules résultant de la dégradation des acides gras par l'effet des lipo-oxygénases, ont été trouvées : 3-pentanone, pentenal, 1-penten-3-ol, 1-pentanol, (E)-2-pentenal, (E)-2-penten-1-ol, (Z)-2-penten-1-ol, 1-hexen-3-ol, (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenal, 1-hexanol, 3-octonone, 2,3 octanedione, 1-octen-3-ol, octanal, (E)-2-octenal, (E)-2-octen-1-ol, 1-octanol, (E, E)-3,5-octadien-2-one, 2-Nonanone, nonanal, nonanol, (E)-2-nonenal, (E, Z)-2,6-nonadienal;

-l'oxydation, car historiquement le goût et l'odeur des poissons sont associés à l'oxydation aux acides gras polyinsaturés notamment les oméga 3 (**Rustad et al., 2003**). Dans les hydrolysats de coproduits de la sole plusieurs molécules résultant de cette dégradation ont été identifiées. Il s'agit du propanol et de l'hexanal. Par ailleurs, les acides gras polyinsaturés ne sont pas les seuls lipides précurseurs de la flaveur des produits de la mer. En effet, les composés dérivés des caroténoïdes contribuent fortement aux caractéristiques aromatiques des algues marines. Ces composés volatiles donnent aux produits de la pêche des notes olfactives d'algues vertes, d'herbes et de géranium. Dans les hydrolysats de coproduits de la sole, seule la 6-méthyl-2-heptanone a été identifiée comme dérivés des caroténoïdes.

Dans les hydrolysats de coproduits de sole, les molécules soufrées suivantes ont été identifiées: thiopen, S-méthyl ester/acide éthanetioique et dimethyl disulfide. Traditionnellement, les saveurs résultant des molécules de soufre sont associés à la dégradation des produits de la pêche. Néanmoins, ce genre de molécules a été plusieurs fois identifié sur des poissons vivants. Donc, la présence de telles molécules n'implique pas immédiatement l'altération des produits.

Les composés volatiles issus de la réaction de Maillard retrouvés dans les hydrolysats de coproduits de la sole peuvent être scindés en 3 groupes :

-le groupe provenant de la transformation des sucres en furanes, pyrones, cyclopentènes, carbonyles et acides. Deux molécules provenant de cette réaction ont été trouvés dans les hydrolysats. Il s'agit de l'acide acétique et le 2-éthyl-furane;

-le groupe issu de la dégradation des acides aminés à partir de la réaction de Strecker. Des molécules telles que le 3 ou 2-méthyl butanol provenant de la dégradation de la leucine ou de l'iso-leucine ont été identifiées;

-le groupe résultant de la réaction de condensation des aldols conduisant à la formation des pyroles, des pyridines, des imidazoles, des pyrazines, des oxazoles, des thiazoles et des thiopènes. Le 3-méthyl-thiopène a été trouvé dans les hydrolysats.

D'une manière générale une corrélation a été trouvée entre les odeurs décrites en analyse sensorielle et les composés identifiés d'une part et d'autre part, avec l'origine de ces molécules:-l'odeur de poissons et de céphalopodes séchés est reliée à la réaction de Maillard et à la dégradation des acides gras polyinsaturés ;

-les odeurs de pied, de fromage et de soufre sont rattachées à l'oxydation des acides gras saturés, des polysaccharides. Il est intéressant de noter l'interaction entre le temps et la température de l'hydrolyse. En effet, les caractéristiques d'arome développées après 6 heures d'hydrolyse sont différentes selon la température appliquée, 40°C ou 50°C. Les odeurs caractéristiques des hydrolysats de coproduits de la sole peuvent être dues à la dégradation de protéines et de lipides pendant l'hydrolyse enzymatique (**Saisithi *et al.*, 1966; Beddows *et al.*, 1976**). De nombreuses études ont montré que la durée et la température d'hydrolyse contribuaient au développement des composés d'odeur et de saveur dans les hydrolysats de poissons (**Dougan, 1975; Beddow *et al.*, 1980; Sanceda *et al.*, 1992; Saisithi, 1994; Peralta *et al.*, 1996**).

Conclusion

Cette étude a montré que les protéines contenues dans les coproduits de la sole tropicale peuvent être solubilisées par hydrolyse enzymatique en utilisant Protamex®. Les résultats ont indiqué que les hydrolysats représentent une source importante de protéines, d'acides aminés essentiels et de minéraux. Les caractéristiques biochimiques obtenues à 40°C sont meilleurs à ceux de 50°C. Elles sont liées à la quantité d'eau du milieu réactionnel.

Ces résultats ouvrent des pistes de valorisation en nutrition animale. C'est ainsi que dans la deuxième partie de ce travail, seront présentés les résultats relatifs à l'étude de l'influence des farines des fractions solubles et non solubles de l'hydrolysats des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) sur quelques paramètres zootechniques du poulet de chair de la souche Cobb 500.

II-Influence des farines des fractions solubles et non solubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) sur quelques paramètres zootechniques du poulet de chair de la souche Cobb 500

1-Résultats

1-1-Characterisation biochimique des rations alimentaires

Les taux de protéine des rations alimentaires supplémentées avec les farines des fractions solubles et insolubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale sont supérieurs à ceux de la ration alimentaire témoin. Pour les aliments distribués en phase de croissance, les régimes contenant respectivement 5% de farine de la fraction soluble de l'hydrolysat de la sole (SHS), 5% de farine de la fraction insoluble de l'hydrolysat de la sole (CHS) et de 2,5% de SHS et de 2,5% de CHS (SCHS), ont des taux de protéines brutes respectivement de 24,19%, de 22,05% et de 21,40% contre 20,65% pour le régime témoin. En phase de finition, le régime SHS contient 3% de plus en protéines par rapport au témoin (**Tableau XII**). La supériorité en protéines des 2 autres rations est de 1% par rapport au témoin. Les rations alimentaires ne sont pas iso-protéiques car les régimes supplémentés avec les fractions solubles et insolubles de l'hydrolysat de la sole sont plus riches en protéines que le régime témoin. Par ailleurs, ces rations alimentaires enrichies en protéines d'hydrolysat de la sole correspondent mieux aux recommandations nutritionnelles pour les poulets de la souche Cobb 500 utilisée dans cette étude (21% de protéines brutes en croissance et 19% en finition).

Tableau XII : Caractéristiques biochimiques des rations alimentaires

| Paramètre biochimique | Ration alimentaire témoin | | Ration SHS | | Ration CHS | | Ration SCHS | |
|-----------------------|---------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|-------------|----------|
| | Croissance | Finition | Croissance | Finition | Croissance | Finition | Croissance | Finition |
| Matière sèche (%) | 88,76 | 88,80 | 90,05 | 90,11 | 92,75 | 92,80 | 91,23 | 91,38 |
| Protéine brute (%) | 20,65 | 18,75 | 24,19 | 21,90 | 22,05 | 19,75 | 21,40 | 19,32 |
| Cellulose brute (%) | 4,94 | 7,18 | 4,61 | 6,10 | 4,16 | 3,96 | 4,57 | 6,10 |
| Matière grasse (%) | 4,41 | 5,42 | 4,51 | 5,90 | 4,11 | 5,69 | 4,06 | 5,79 |
| Calcium (%) | 1,32 | 0,98 | 1,59 | 0,73 | 1,47 | 0,69 | 1,27 | 0,62 |
| Cendres (%) | 11,04 | 10,60 | 11,00 | 10,24 | 12,19 | 12,80 | 11,60 | 10,08 |

1-2-Consommation alimentaire individuelle quotidienne du poulet de chair de la souche Cobb 500

En période de croissance, la consommation alimentaire journalière ne varie pas avec le niveau de protéines des différentes rations alimentaires proposées aux poulets de chair de la souche Cobb 500. La consommation alimentaire journalière est de 93 g/ jour. Par contre, pendant la phase de finition, il y a une augmentation de la quantité d'aliment consommée par jour par les poulets du lot SHS (**Figure 16**). Cette consommation quotidienne alimentaire est de 160 g/ jour. Elle dépasse à peu près de 16g/jour celles des lots témoin, CHS et SCHS (144 g/ jour). Ces résultats laissent supposer, qu'il n'y a pas à priori de problèmes d'appétence générés par le rajout des protéines d'hydrolysate de la sole. Au cours de cette étude, les refus d'aliments sont quasi-nuls dans le lot témoin et les lots supplémentés. Il n'y a pas d'effets particuliers enregistrés concernant l'adjonction de protéines d'hydrolysate de la sole. Le comportement alimentaire des poulets issus de cette étude est normal car ni le taux d'incorporation dans la ration, ni la nature des hydrolysats (surnageant, culot ou mélange des deux) n'ont abouti à l'inappétence.

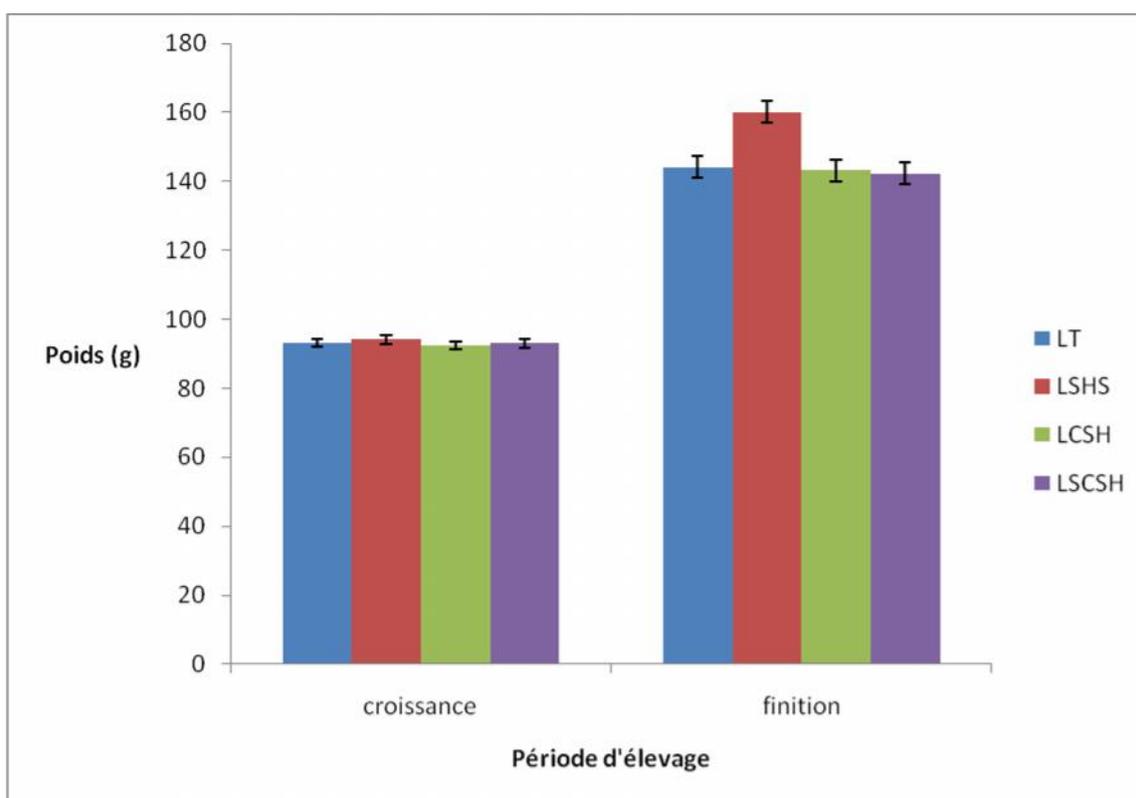


Figure 16: Consommation alimentaire individuelle quotidienne du poulet de chair de la souche Cobb 500 en fonction des rations alimentaires

1-3-Indices de consommation

Les valeurs de l'indice de consommation des poulets de chair pendant la phase de croissance varient entre 1,84 et 1,89. Il n'y a donc pas de différence significative entre les régimes alimentaires proposés aux poulets de chair. Les valeurs de l'indice de consommation des poulets de chair de la phase de finition se situent entre 2,05 et 2,30. Il n'y a pas de différence significative entre les régimes alimentaires témoin, CHS et SCHS proposés aux poulets de chair. Cet indice de consommation ne dépasse pas 2,08. Il est inférieur à celui obtenu avec la ration alimentaire SHS dont la valeur est de 2,30. Les indices de consommation de la phase de croissance sont inférieurs à ceux de la phase de finition (**Figure 17**).

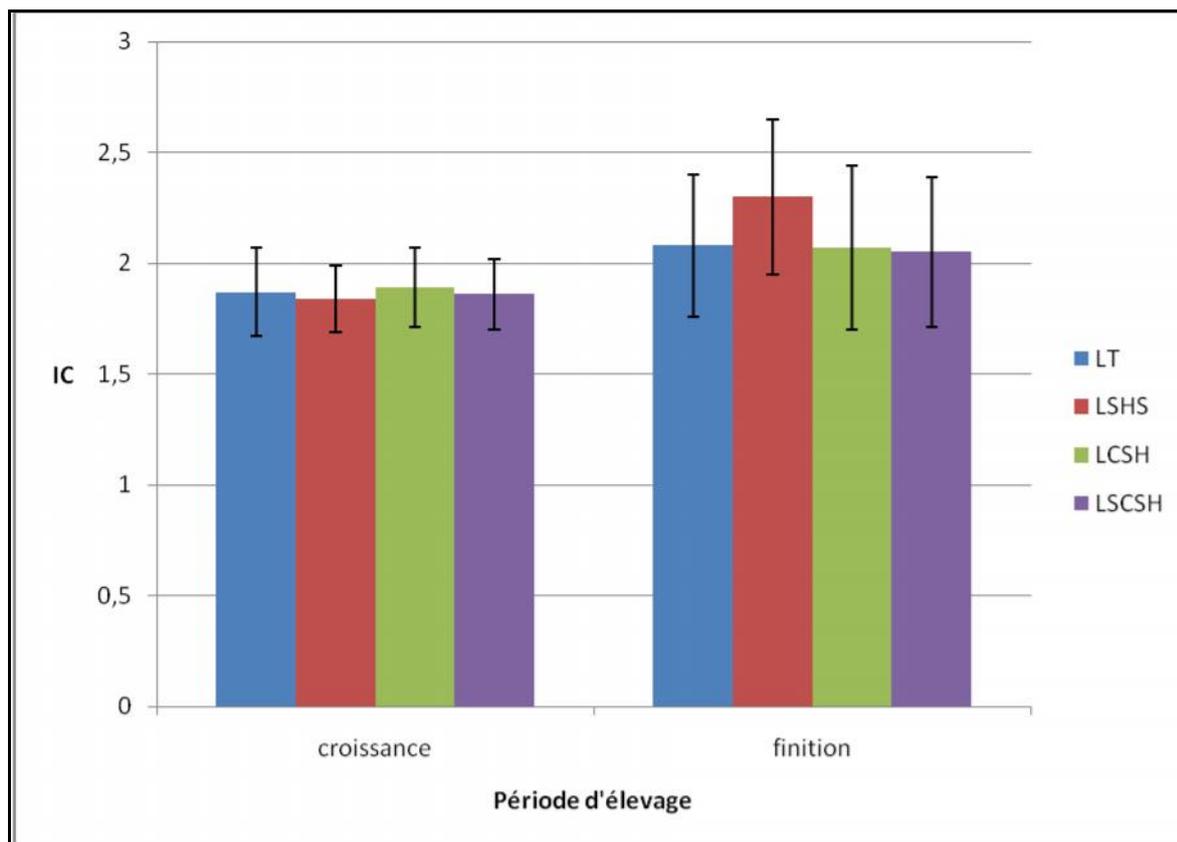


Figure 17: Indices de consommation du poulet de chair de la souche Cobb 500 en fonction des régimes

1-4-Taux de mortalité

D'une manière générale, la ration alimentaire SHS a les taux de mortalité les plus bas lorsqu'ils sont comparés à ceux des rations alimentaires CHS, SCHS et témoin. Ces taux sont de 1,25 et 3,40 pour respectivement pour les phases de croissance et de finition. La ration alimentaire témoin a les taux de mortalité les plus élevés. Ils sont de 2,30 et de 3,50 pour respectivement les phases de croissance et de finition. Les rations alimentaires CHS et SCHS ont les mêmes taux de mortalité. Les taux de mortalité en phase de croissance sont plus faibles que ceux de la phase de finition (**Tableau XIII**).

Tableau XIII : Influence des farines des fractions solubles et non solubles de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale sur les taux de mortalité des poulets de chair de la souche Cobb

| Etapas d'élevage | Ration alimentaire (Mortalité en %) | | | | Comparaison statistique |
|------------------|-------------------------------------|------------|------------|-------------|-------------------------|
| | Ration alimentaire témoin | Ration SHS | Ration CHS | Ration SCHS | |
| Croissance | 2,30 | 1,25 | 1,90 | 1,92 | s |
| Finition | 3,50 | 3,40 | 3,42 | 3,44 | ns |
| Tout l'essai | 3,90 | 3,10 | 3,30 | 3,23 | ns |

s ; effet significatif à $p < 0,05$, ns: non significatif

1-5-Masse vive moyenne

A 2 semaines d'élevage, les rations alimentaires SHS, CHS, SCHS et témoin ont permis aux poulets d'avoir les mêmes masses vives. Il n'y a donc pas de différence significative entre les masses vives des poulets au seuil $p < 0,05$.

A 4 semaines (en phase de croissance), une forte croissance a été observée au niveau des poulets soumis aux rations alimentaires 1, 2, 3 et témoin. Cependant, les poulets soumis aux rations alimentaires SHS, CHS, SCHS ont des masses vives statistiquement identiques. Elles ne dépassent pas 1288,78 g. Ces masses vives ne dépassent pas celle des poulets soumis à la ration alimentaire témoin (**Figure 18**).

Enfin, en phase de finition (6 semaines), cette évolution pondérale devient plus marquée pour les poulets soumis aux rations alimentaires SHS, CHS, SCHS et témoin. Les poulets soumis aux rations alimentaires SHS et SCHS ont des masses vives moyennes plus élevées que celles qui ont reçu les rations alimentaires CHS et témoin (2160 g).

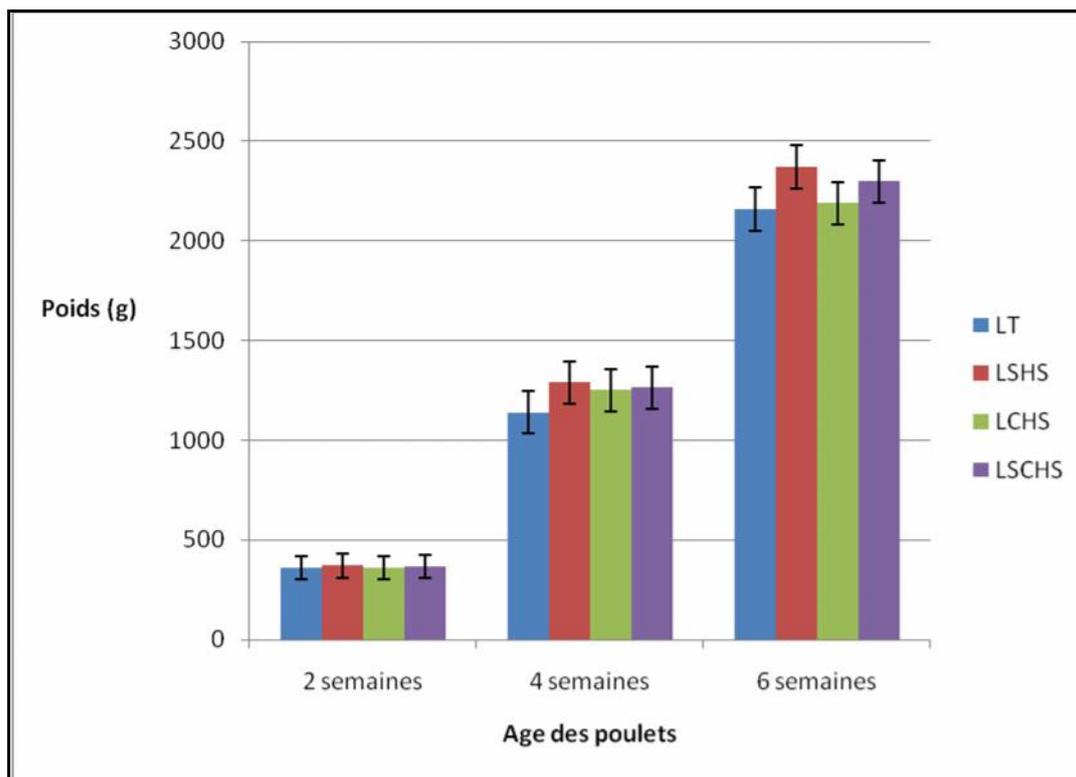


Figure 18: Masses vives moyennes du poulet de chair de la souche Cobb 500 en fonction des régimes

1-6-Gain de masse moyenne quotidienne

En période de croissance, les gains de masse moyennes journalières ou encore gains moyens quotidiens (GMQ) des rations alimentaires témoin, CHS et SCHS sont statistiquement identiques (66 g/jour). Leur gain de masse moyenne journalière de la ration alimentaire est statistiquement inférieur à celui de la ration alimentaire SHS (74,12 g/jour) (**Figure 19**). Pendant la phase de finition, les GMQ varient entre 66,72 et 78,20 g/jour pour l'ensemble des rations alimentaires. La ration alimentaire témoin a un GMQ significativement inférieur à ceux des trois autres rations alimentaires. Cette différence est de l'ordre de 12, 4 et 3 g/jour pour respectivement les rations alimentaires SHS, SCHS et CHS. La ration alimentaire SHS a le GMQ le plus élevé (**Figure 19**).

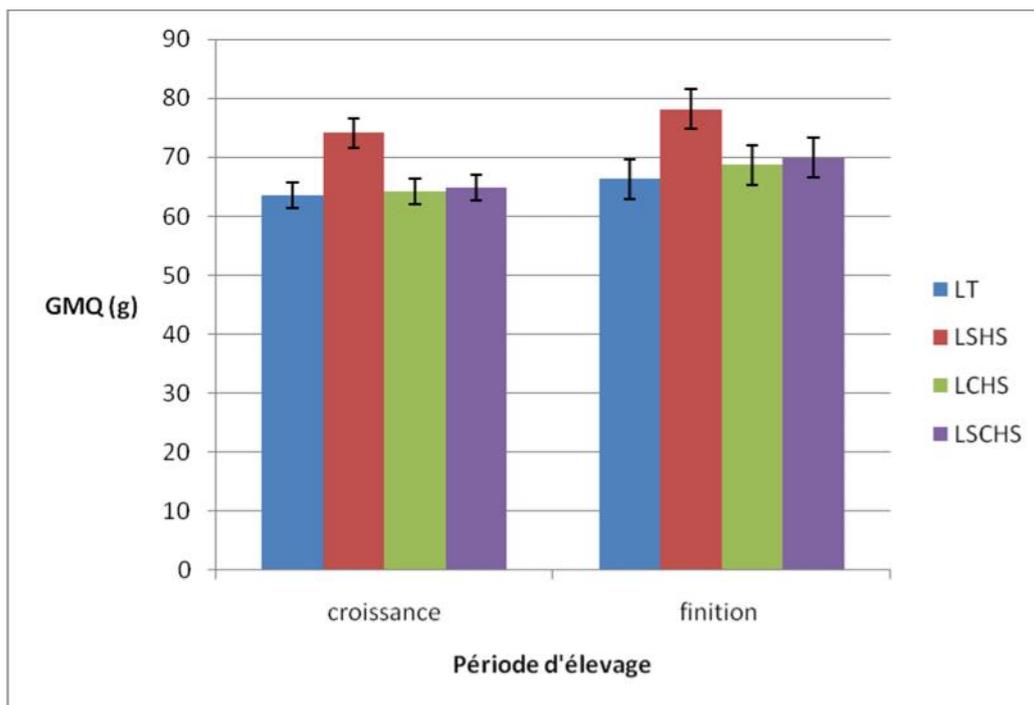


Figure 19: Gain de masse moyenne quotidienne du poulet de chair de la souche Cobb 500 en fonction des régimes

1-7-Masse de carcasse

Les rations alimentaires SHS, CHS et SCHS ont conduit à une prise de masse des poulets. La masse de carcasse du poulet soumis à la ration alimentaire SHS diffère significativement de celle du poulet du lot témoin. Cette différence est de 123g. Les écarts de masse de carcasse entre le régime alimentaire témoin et les régimes alimentaires CHS et SCHS sont respectivement de 5,45 g et de 92,53g. Les rations alimentaires SHS et SCHS sont les plus efficaces pour l'alimentation des poulets de chair de la souche Cobb.

2-Discussion

Les rations alimentaires enrichies en protéines des farines des fractions solubles et insolubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole correspondent aux régimes nutritionnels recommandés dans l'élevage des poulets à chair de la souche Cobb 500. Ce régime doit contenir 21% de protéines brutes en croissance et 19% en finition. Ces rations alimentaires, en période de croissance, n'influencent pas la consommation alimentaire journalière des poulets. Par contre, pendant la phase de finition, il y a une augmentation de la quantité d'aliment consommée par jour par les poulets du lot SHS c'est à dire recevant la ration alimentaire

contenant la farine de la fraction soluble de l'hydrolysate des coproduits de la sole. Cette consommation quotidienne dépasse à peu près de 16g/jour celles des lots témoin, CHS et SCHS. Cette faible différence montre qu'il n'y a pas eu à priori de problèmes d'appétence générés par les protéines de l'hydrolysate de la sole. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Coca-Sinova (2008)** et **Farhat (1999)**, qui ont trouvé que l'ajout de protéines de poissons à de faibles doses dans l'aliment des poulets de chair ne modifie pas la consommation alimentaire. Il favorise bien au contraire une bonne digestibilité des molécules des rations alimentaires qui les contiennent (**Tesseraud, 1996 et 1999 ; Adedokun, 2008; Dei, 2008**).

Les indices de consommation de la phase de croissance sont inférieurs à ceux de la phase de finition. Ce résultat corrobore avec ceux obtenus par **Fan (2008); Jimenez-Moreno (2009)** qui ont trouvé que les meilleurs indices de consommation sont obtenus pendant la période de croissance. En effet, ces auteurs ont montré que cette période permet à l'animal d'établir le lien entre l'apparence physique et le niveau nutritionnel de l'aliment. En outre, durant cette période, les poulets ont un besoin en croissance plus élevé en terme de protéines d'où la nécessité de séparer les aliments à distribuer de ceux de la période de finition. En phase de finition, l'indice de consommation le plus élevé est obtenu avec la ration alimentaire contenant la fraction soluble de l'hydrolysate de la carcasse de la sole. Ceci montre que cet aliment n'est pas bien consommé et digéré par le poulet de chair en phase de finition alors qu'il l'était en phase de croissance. Cette situation pourrait s'expliquer soit par une faible hydrolyse des protéines contenues dans cet aliment soit par une faible absorption des molécules digérées au niveau du tube digestif du poulet. Avec l'âge, les poulets ont progressivement réduit la part de l'aliment à consommer. Cette assertion a été déjà signalé par **Habyarimana (1994)** et **Ndoye (1996)**, qui ont démontré qu'en phase de finition, les poulets de chairs «perçoivent» les différences de niveau nutritionnel des aliments offerts et ajustent leur ingéré protéique de façon à consommer en fonction de leur besoin en finitions. Par ailleurs, selon **Raonimanana (2004)**, les meilleurs indices de consommation sont obtenus avec des rations ayant un taux de protéines compris entre 20 et 25 %. Ce qui correspond au taux de protéines du régime LSHS en croissance et en finition.

Les taux de mortalité en phase de croissance sont plus faibles que ceux de la phase de finition. En phase de croissance, le taux de mortalité enregistré au niveau des poulets de chair sous à la ration alimentaire témoin est supérieur à ceux des poulets nourris avec les rations alimentaires 1, 2 et 3. Quant à la phase de finition, les taux sont identiques. Ces résultats montrent que l'origine des protéines des rations alimentaires n'est pas la cause de la mortalité

des poulets de chair de la souche Cobb en phase de finition. Cette situation pourrait être due à un taux de protéine élevé dans ces rations alimentaires. Cette assertion rejoint celle de **Ndoye (1996)** qui a décrit un taux important de mortalité après un pic de température avec des rations de finitions riches en protéines (entre 19 et 21%) chez les sujets les plus gros. Pour cela, **Picard et al. (1993)** ont préconisé le système d'alimentation séparé consistant à supprimer l'accès à la mangeoire quelques heures avant et pendant le pic thermique. Ainsi, il est nécessaire de différencier les rations en fonction de l'âge des poulets et de la température ambiante. Sinon, il faudrait envisager d'étudier des taux d'incorporation de protéines de l'hydrolysate plus faibles c'est-à-dire inférieurs à 5 %. Toutefois, les taux de mortalité obtenus pendant tout l'essai restent inférieurs à ceux recommandés par **Kluth (2009)** et **Zhou (2009)**. En effet, ces auteurs ont recommandé une mortalité de 2-3 % en croissance et un maximum de 5 % en finition.

Le GMQ est beaucoup plus élevé chez les poulets nourris avec la ration alimentaire SHS c'est-à-dire celle contenant la fraction soluble de l'hydrolysate de la carcasse de la sole tropicale (GMQ moyen de 74,12 et 78, 20 g/jour) que ceux contenant la fraction insoluble (ration alimentaire CHS) et la moitié de fractions solubles et insolubles (ration alimentaire SCHS) quelle que soit la phase d'évolution des poulets. Ce résultat montre que les protéines contenues dans la ration alimentaire SHS sont beaucoup consommées, bien digérées et assimilées par les poulets de chair en phase de croissance qui ont pu en tirer profit. Ce résultat est en accord avec ceux trouvés par plusieurs auteurs (**Berri et al., 2001; Gongnet et al., 1995; Farhat et al., 1999**) sur les poulets de chair. En effet, ces chercheurs ont signalé que la croissance chez ces animaux est très rapide, le poussin pouvant passer de 40 g à un jour à 2000 g à 7 semaines d'âge. Cette prise de masse est associée à une efficacité alimentaire élevée et consiste en une synthèse protéique à partir des acides aminés alimentaires. D'où l'importance de rations riches en protéines. Ce résultat est par contre différent de ceux obtenus par **Dei (2008)**. En effet, selon cet auteur, une augmentation de 9,2 à 16,2 % du taux de protéines de la ration provoque le déséquilibre du rapport calories/protéines à l'origine de la baisse du gain de masse observée chez le poulet de chair. Ravindran cité par **Adedokun (2008)** a évoqué l'impact négatif de la richesse de la ration alimentaire en protéine variant entre 25-30 % sur le plumage et la croissance des poulets de chair. **Tesseraud & Le Bihan-Duval (1999)** ont rapporté que chez les poulets nourris avec des rations très riches en protéines, les besoins en lipides pour la croissance seraient plus élevés que chez ceux dont l'alimentation est moins riche. Il y a eu aussi des chercheurs pour qui l'ajout de protéines dans une ration alimentaire de base ne modifie ni la croissance, ni la prise alimentaire (**Grizard et**

al., 1999; Kluth *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009). Cette variabilité de résultat a aussi influencé le taux de protéine alimentaire favorable à une bonne croissance chez les poulets de chair. C'est ainsi qu'il est passé de 14–15 % (Aletor, 1992; Baker, 1996; Baker, 2006), à 20–25 % (Grizard *et al.*, 1999; Kidd *et al.*, 2004; Lessire, 2001; Metayer *et al.*, 2008; Naulia *et al.*, 2002) en passant par 16–19% (Berri *et al.*, 2001 ; Costa *et al.*, 2001). En phase de finition, il avait été noté un indice de consommation élevé traduisant une faible consommation de cet aliment. Cette faible consommation pourrait s'expliquer par une prise de masse importante par les poulets de chair en phase de croissance. En phase de finition la qualité des acides aminés reçus a pu favoriser un gain de masse au niveau de ces animaux

Conclusion

Au terme de ce travail, il est important de noter que:

-la consommation alimentaire n'est pas améliorée par le rajout de protéines en phase de croissance mais plutôt en période de finition;

-l'indice de consommation augmente avec l'âge des poulets et s'est détérioré en phase de finition pour la ration supplémentée avec la farine fraction soluble de l'hydrolysat des coproduit de la sole tropicale;

-une baisse de la mortalité dans les lots de poulets de chair de la souche Cobb soumis aux rations alimentaires contenant les farines des fractions solubles et insolubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale;

-la croissance et le gain de masse ont été améliorés par les rations alimentaires contenant les farines des fractions solubles et insolubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale;

-la masse de carcasse est meilleure avec le lot de poulets de chair de souche Cobb recevant la farine de la fraction soluble de l'hydrolysat des coproduit de la sole tropicale.

En définitive, la fraction soluble de l'hydrolysat de la carcasse de la sole tropicale permet d'obtenir de bons paramètres zootechniques au niveau des poulets de chair de souche Cobbs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La sole est une des espèces emblématiques de la pêche mondiale en général et Sénégalaise en particulier. Compte tenu du fort tonnage débarqué, nombre d'industries se sont spécialisées dans sa transformation, générant un fort volume de déchets (tête, peau, viscères, arête centrale...). Les coûts économiques et environnementaux qui en résultent sont élevés aussi convient-il de trouver de nouvelles utilisations pour ces biomasses.

Ce travail a porté sur l'intérêt d'une protéolyse enzymatique de ces matières afin de liquéfier au maximum les matrices et de voir quelles pourraient être les valorisations potentielles.

La première partie expérimentale de ce travail a ainsi consisté à étudier la protéolyse des protéines contenues dans les coproduits de la sole tropicale par hydrolyse enzymatique en utilisant Protamex®. Les résultats ont indiqué que les hydrolysats représentent une source importante de protéines, d'acides aminés essentiels et de minéraux. Les caractéristiques biochimiques obtenues à 40°C sont plus intéressantes que celles obtenues à 50°C d'hydrolyse. Elles sont liées à la quantité d'eau du milieu réactionnel.

La deuxième partie de ce travail a porté sur la recherche d'application alimentaire pour les fractions résultantes de la protéolyse des coproduits de la sole. Il ressort de ces essais de nutrition animal chez le poulet de chair que :

- la consommation alimentaire n'est pas améliorée par le rajout de protéines en phase de croissance mais plutôt en période de finition;

- l'indice de consommation augmente avec l'âge des poulets et s'est détérioré en phase de finition pour la ration supplémentée avec la farine fraction soluble de l'hydrolysat des coproduit de la sole tropicale;

- une baisse de la mortalité dans les lots de poulets de chair de la souche Cobb soumis aux rations alimentaires contenant les farines des fractions solubles et insolubles de l'hydrolysat des coproduits de la sole tropicale;

-la croissance et le gain de masse ont été améliorés par les rations alimentaires contenant les farines des fractions solubles et insolubles de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale;

-la masse de carcasse est meilleure avec le lot de poulet de chair de souche Cobb recevant la farine de la fraction soluble de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale.

En définitive, la farine de la fraction soluble de l'hydrolysate des coproduits de la sole tropicale permet d'obtenir de bons paramètres zootechniques au niveau des poulets de chair de souche Cobbs.

Ces travaux débouchent donc sur des perspectives encourageantes pour les usines de transformation de la sole tropicale. En effet, cette valorisation des coproduits issus de la chaîne de transformation de la sole, au travers de la production d'hydrolysats, s'est avérée simple, peu coûteuse et les résultats obtenus à l'aide de nombreuses expérimentations laissent envisager un avenir prometteur à ces produits. Ces voies de valorisation ne sont cependant pas les seules perspectives envisageables. Il conviendrait en effet de s'intéresser également à la l'utilisation de la fraction soluble pour la production d'arômes en alimentation humaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adedokun A., Adeola O., Parsons C. M., Lilburn M. S. & Applegate T. J. (2008). Standardized ileal amino acid digestibility of plant feedstuffs in broiler chickens and turkey poulters using a nitrogen-free or casein diet. *Poult. Sci.* 87: 2535-2548.

Ahsan M. N. & Watabe S. (2001). Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. *J. Protein Chem.* 20: 49–58.

Aletor V. A. & Olonimoyo F. I. (1992). Feeding differently processed soya bean: effect on performance, protein utilization, relative organ weights, carcass traits and economics of producing broiler-chickens. *Nahrung* 36: 357-363.

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*, 63 pp.

Aspmo S. I., Horn S. J. & Eijsink V. G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Proc. Biochem.* 40: 1957-1966.

Badal C. S. & Kiyoshi H. (2001). Debittering of protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.* 19: 355-370.

Baker D. H., Fernandez S. R., Webel D. M. & Parsons C. M. (1996). Sulfur amino acid requirement and cystine replacement value of broiler chicks during the period three to six weeks posthatching. *Poult. Sci.* 75: 737-742.

Baker D. H. (2006). Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. *J. Nut.* 136: 1670S-1675S.

Barrett A. J. (1979). Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase. Ciba Found. Symp. 75: 37–50.

Barrett A. J., Rawlings N. D. & Woessner J. F. (1998). Handbook of proteolytic enzymes. Barrett AJ., Rawlings ND. & Woessner JF, (eds). Academic press, San Diego, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 1-1666.

Barro M. (2004). Valorisation des produits de la pêche après capture au Sénégal. Thèse: méd. Vét.: Dakar; N° 24, 152 p.

Beddows C. G., Ismail M. & Steinkraus K. H. (1976). The use of bromelain in the hydrolysis of mackerel and the investigation of fermented fish aroma. J. Food. Technol. 11: 379.

Beldman G., Searle-Van L. M. F., Rombouts F. M. & Voragen A. G. J. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride* : Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and alpha-glucosidases. Eur. J. Biochem. **196**: 303-308.

Benjakul S. & Morrissey M.T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. J. Agric. Food Chem. 45: 3423-3430.

Bergot P. J., Blanc & Escaffre A. (1981). Relationship between number of pyloric caeca and growth in rainbow trout. Aquaculture 22: 81–96.

Berri C., Wacrenier N. & Millet N. (2001). Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of boilers from experimental and commercial lines. Poult. Sci. 80: 833-838.

Beynon R. J. & Bond J. S. (1989). Proteolytic enzymes, a practical approach. Beynon R.J., and Bond.J.S. (eds.) IRL Press, Oxford, New York, Tokyo. p. v.

Bezerra R. S., Lins, E. J. F., Alencar R. B., Paiva P. M. G., Chaves M. E. C., Coelho L. C. B. B. et al. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem.* 40: 1829–1834.

Bihan-duval E., Millet N. & Remignon H. (1999). Broiler meat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. *Poult. Sci.* 39: 346-353.

Bonnin E., Renard C., Thibault S-F. & Ducroo P. (1997). Les enzymes de degradation des parois végétales : mode d'action et utilisations alimentaires. In : *Enzymes en agroalimentaire* (Larreta-Garde V.) ed. Lavoisier Tec. et Doc., Paris pp 168-200.

Bosworth, B. G., Libey G. S. & Notter D. R. (1998). Relationships among total weight, body shape, visceral components, and fillet traits in palmetto bass (striped bass female *Morone saxatilis* × white bass male *M. chrysops*) and paradise bass (striped bass female *M. saxatilis* × yellow bass male *M. mississippiensis*). *J. World Aquac. Soc.* 29: 40–50.

Bosworth B. G., Holland M., & Brazil B. L. (2001). Evaluation of ultrasound imagery and body shape to predict carcass and fillet yield in farm-raised catfish. *J. Anim. Sci.* 79:1483–1490.

Bougatef A., Souissi N., Fakhfakh N., Ellouz-Triki Y. & Nasri M. (2007). Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.* 102: 343–350.

Bugeon J. et al. (2007). Déterminisme morphologique du rendement en filets chez la truite arc-en-ciel. 12^{eme} journées des sciences du muscle et technologie de la viande, rapport 139-149 p.

Cahu C. L., Zambonino I. J. L., Quazuguel P. & Le Gall M. M. (1999). Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171(1-2): 109-119.

Castillo-Yañez F. J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F. L. & Del Toro M. A. N. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140B: 91–98.

Castillo-Yanez F. J., Pacheca-aguilar R., Garcia-carreno, F. L. & Navarrete-del T. M. (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem.* 85: 343-350.

Chiou T. K., Matsui T. & Konosu, S. (1989). Purification and properties of an aminopeptidase from Alaska pollack, *Theragra chalcogramma*, roe. *J. Biochem. (Tokyo)*, 105: 505–509.

Cibert C., Fermon Y., Vallod D. & Meunier F. J. (1999). Morphological screening of carp *cyprinus carpio*: relationship between morphology and fillet yield. *Aquat. Living Resour.* 12:1–10.

Clausen E., Gildberg A. & Raa J. (1985). Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1556–1557.

Coca-sinova A., Valencia D. G, Jimenez-moreno E, Lazaro R. & Mateos G. G. (2008). Apparent ileal digestibility of energy, nitrogen, and amino acids of soybean meals of different origin in broilers. *Poult. Sci.* 87: 2613-2623.

Coly H. (2000). Valorisation des pertes après capture des pêches maritimes au Sénégal. mémoire d'étude de technicien des pêches : Dakar ; 24 p.

Costa E. F., Miller B. R., Pesti G. M., Bakali R. I. & Ewing H. P. (2001). Studies on feeding peanut meal as a protein source for boiler chickens. *Poult. Sci.* 80: 306-313.

Congnet G. P., Halle I. V. L .B., Parigi-Billi R. & Sah.ande S. (1995). Influence des niveaux de protéines alimentaires sur les performances de croissance et le rendement des carcasses de la pintade commune (*numida me/et/gris*) et du poulet de chair (*Gallus domesticus*) en milieu tropical sec. *Rev. Méd. Vét.* 3: 10-15.

Cros S. B., Bourseau P., Jouen P. & Prost C. (2004). Desalination of mussel cooking juices by electrodialysis: effect of the aroma profile. *J. Food Eng.* 69: 263-269.

Dabrowski K. & Glogowski J. (1977). Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54: 129–134.

Dauksas E., Falch E., Slizyte R. & Rustad T. (2005). Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymatic hydrolysis of cod (*gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.* 40: 2659-70.

Dei H. K., Rose S. P, Mackenzie A. M. & Amarowicz R. (2008). Growth performance of broiler chickens fed diets containing shea nut (*Vitellaria paradoxa*, gaertn.) meal fermented with *Aspergillus niger*. *Poult. Sci.* 87: 1773-1778.

Direction des pêches maritimes du Sénégal. (2008). Résultats généraux des pêches maritimes. 80 p.

Djiba A. (1992). Utilisation des déchets de poissons par la technique d'ensilage pour l'alimentation des poissons a intérêt aquacole. rapport de stage pour l'obtention du diplôme de master européen in aquaculture management. Université de Montpellier II, 46 p.

Dougan J. & Howard G. E. (1975). Some flavoring constituents of fermented fish sauce. *J. Sci. Food Agric.* 26: 887-94.

Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R. & Wolthers B. G. (1971). The structure of papain. *Adv. Protein Chem.* 25: 79-115.

Duche A., Lefevre P., Sabroux V., Berdon D. & Bernard G. (1992). Les techniques d'analyses d'aliments du bétail appliquées au CIRAD - EMVT, 79 p.

Dufosse I., De la broisse D. & Guerard F. (1997). Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite production. *Res. Dev. Microbiol.* 1: 365-381.

Dufosse L., De la Broise D. & Guérard F. (2001). Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: A new method based on Gompertz modeling of microbial growth. *Curr. Microbiol.* 42: 32–38.

Dumay J. (2003). Contribution à l'analyse de lipides issus de la biomasse marine en vue de la recherche de molécules à activité biologique. Mémoire: sciences de la vie et de la terre: Nantes (Ecole pratique des hautes études), 67 p.

Dumay J., Barthomeuf C. & Bergé J. P. (2004). How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. *J. Aquatic Food Product Technol.* 13: 69-84.

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 Biochem.* 14: 1-6.

Dumay J. (2006). Extraction des lipides par voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*) thèse d'université : sciences de la vie et de la terre: Université de Nantes, 325 p.

Dunn B. M. & Fink A. L. (1984). Cryoenzymology of porcine pepsin. *Biochemistry* 23: 5241-5247.

Durham D. R., Stewart D.B. & Stellway E. J. (1987). Novel alkaline and heat stable serine protease from alkalophilic *Bacillus sp.* strain GX 6638 *J. Bacteriol.* 169: 2762-2768.

Ellouz Y., Bayoudh A., Kammoun S., Gharsallah N. & Nasri M. (2001). Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Biol. Technol.* 80: 49–51.

Elvingson P. & Johansson K. (1993). Genetic and environmental components of variation in body traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to age. *Aquaculture* 118:191–204.

Elvingson P. & Nilsson J. (1994). Phenotypic and genetic parameters of body and compositional traits in arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquac. Fish. Manag.* 25: 677–685.

Fan H. P, Xie M, Wang W. W, Hou S. S & Huang W. (2008). Effects of dietary energy on growth performance and carcass quality of white growing pekin ducks from two to six weeks of age. *Poult. Sci.* 87: 1162-1164

Fänge R. & Grove D. (1979). Digestion. In W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish physiology. Bioenergetics and growth* (Vol. 8). New York: Academic Press Inc.

FAO. (1999). La qualité et son évolution dans le poisson frais. <en ligne> <http://www.fao.org/docrep/003/t1768f/t1768f09.htm>

FAO (2008). Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. département des pêches et de l'aquaculture de la FAO - organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture Rome, 2008, 92 pp.

FAO (2004). Food and Agriculture Organisation. Fishery statistics, Rome, Italy.

FAO/DANIDA (2001). Contribution d'experts FAO/DANIDA (Bangkok, 18-30 mai 1998) directives pour la collecte régulière de données sur la pêche de capture.rome: FAO- division de l'information.- 123p

Farhat A. & Chavez E. R. (1999). Effects of line, dietary protein, sex, age, and feed withdrawal on insulin-like growth factor-i in white Pekin ducks. *Poult. Sci.* 78: 1307-1312.

Folch J., Lees N. & Sloan-Stanley G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497- 509.

Gbogouri G. A., Linder M., Fanni J. & Parmentier M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by-products hydrolysates. *J. Food Sci.* 69(8): 615-22.

Ghorbel S., Souissi N., Triki-Ellouz Y., Dufosse L., Guérard F. & Nasri M. (2005). Preparation and testing of sardinella protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 33–38.

Gildberg A. (1988). Aspartic protease in fishes and aquatic invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. B 91: 425-435.

Gildberg A. (1992). Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. Biol. Technol. 39: 271–276.

Gildberg A., Batista I., & Ström E. (1989). Preparation and characterization of peptones obtained by two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. Biotechnol. Appl. Biochem. 11: 413–423.

Gildberg A. Arnesen J. A. & Carlehog M. (2002). Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation process. Biochemistry 38: 475-480.

Gildberg A. & Raa J. (1983). Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). Comp. Biochem. Physiol. A 75: 337–342.

Gjedrem T. (1997). Flesh quality improvement in fish through breeding. Aquacult. Int. 5:197–206.

Gjerde B., & Schaeffer L. R. (1989). Body traits in rainbow trout. ii. estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. Aquaculture 80: 25–44.

Grizard J., Picard B., Dardevet D. & Balage M. (1999). Regulation of muscle growth and development. pages 177-201 in protein metabolism and nutrition. publication 96. Edition. EAAP, wageningen, the netherlands.

Guérard F., Dufosse L., De La Broise D. & Binet A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. J. Molec. Catalysis B: Enzymatic 11: 1051-1059.

Guérard F., Guimasl & Binet A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic* 20: 489-498.

Guérard F., Batista I., Pires C. & Thorkelson G. (2006). Report on sources and selection criteria for raw material. *Rapport établi pour le programme seafood plus.*- 57 p.

Gupta R., Beg Q. & Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15–32.

Guyonnet V., Tluścik F., Long P. L., Polanowski A. & Travis J. (1999). Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, Chymotrypsin and elastase from the chicken. *J. Chromatogr. A* 852: 217–225.

Haard N. F. (1998). Specialty enzymes from marine organisms. *Food Technol.* 52: 64–67.

Habyarimana F. (1994). Elevage du poulet de chair dans la région de Dakar: structure et productivité. Thèse. Méd. Vét.: Dakar; n°28, 110 p.

Hajjou M. & Le Gal Y. (1994). Purification and characterization of an aminopeptidase from tuna (*Thunnus albacares*) pyloric caeca. *Biochim. Biophys. Acta* 1204: 1–13.

Hamilton K. A., Nisbet A. J., Lehane M. J., Taylor M. A. & Billingsley P. F. (2003). A physiological and biochemical model for digestion in the ectoparasitic mite, *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae). *Int. J. Parasitol.* 33: 773–785.

Hall M. G. & DA Silva S. (1994). Ensilage des déchets de crevettes. *Infofish International*, 2 :5-7

Hau P. V. & Benjakul S. (2006). Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*). *J. Food Biochem.* 30: 478-495.

Hofmann T. & Fink A. L. (1984). Cryoenzymology of penicillopepsin. *Biochemistry* 23: 5247-5253.

Hofmann T., Dunn B. M. & Fink A. L. (1984). Mechanism of action of aspartyl proteinases. *Biochemistry* 23: 5253-5256.

Herriot R. M. (1962). Pepsinogen and pepsin. *J. Gen. Physiol.* 45: 57–76.

Hoylen N. T. & Merritt J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* 59: 76-79.

Huong N., Donnay-Moreno C. & Bergé J. P. (2007). Enzymatic hydrolysis of tuna by-products by using protamex protease. proceeding wefta annual meeting; espain.1-6.

Huss H. H. (Eds.). (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper 348.

Infofish International (2002). Nouveaux produits, nouvelles découvertes et nouvelles technologies. *infofish international*, 5 :75

James M. N. G. (1993). Convergence of active-center geometries among the proteolytic enzymes. In: *Proteolysis and protein turnover* (Bond, J.S. and Barrett, A.J., eds). London: Portland Press, pp. 1-8.

Je J. Y., Park P. J. & Kim S. K. (2005). Antioxydant activity of a peptide isolated from alaska pollack (*Theraga chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 38: 45-50.

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 Biochem.* 42: 840-846.

Jellouli K., Bougatef A., Daassi D., Balti R., Barkia A. & Nasri M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. *Food Chem.* 116644–116650.

Jimenez-Moreno E, Gonzalez J. M, Gonzalez-Serranoa, Lazaro R. & Mateos G. G. (2009). Effect of dietary fiber and fat on performance and digestive traits of broilers from one to twenty-one days of age. *Poult. Sci.* 88: 2562-2574.

Jenkins J., Lo L. L., Harris G. & Pickersgill R. (1995). Beta-glucosidase, beta-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold beta/alpha architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of beta-strands four and seven. *FEBS Lett.* 362: 281-285.

Jones D. A. (1995). Frippak-the facts. a response to the articles by p.r. muir and d.c. sutton. *J. World Aquacult. Soc.* 26: 220-222.

Kapoor B. G., Smit H. & Verighina I. A. (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Marine Biol.* 13: 109–239.

Kause A., Paananen T., Ritola O. & Koskinen H. (2007). Direct and indirect selection of visceral lipid weight, fillet weight, and fillet percentage in a rainbow trout breeding program. *J Anim Sci.* 85: 3218-3227.

Kechaou E. S., Dumay 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. *J. Biosci. Bioengin.* 107: 158-164.

Khantaphant S. & Benjakul S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 151B: 410-419.

Kidd M. T., Corzo A., Hoehler D., Kerr B. J., Barber S. J. & Branton S. L. (2004). Threonine needs of broiler chickens with different growth rates. *Poult. Sci.* 83: 1368-1375.

Kim S. K. & Mendis E. (2006). Bioactive compounds from marine processing by-products - a review. *Food Res. Int.* 39: 383-393.

Kishimura H., Hayashi K., Miyashita Y. & Nonami Y. (2006a). Characteristics of trypsin from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). Food Chem. 97: 65-70.

Kishimura H., Klomklao S., Benjakul S. & Chun B. S. (2008). Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). Food Chem. 106: 194-199.

Klomklao S., Benjakul S. & Visessanguan W. (2004). Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in thailand. Food Biochem. 28: 355-372.

Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., & Simpson B. K. (2006a). Effects of the addition of spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) on the liquefaction and characteristics of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbosa*). Food Chem. 98: 440–452.

Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. & Simpson B. K. (2007a). 29 kDa trypsin from the pyloric ceca of Atlantic bonito (*Sarda sarda*): Recovery and characterization. J. Agric. Food Chem. 55: 4548–4553.

Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. & Simpson B. K. (2007d). Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). Comp. Biochem. Physiol. 148B: 382–389.

Kluth H. & Rodehutsord M. (2009). Effect of inclusion of cellulose in the diet on the inevitable endogenous amino acid losses in the ileum of broiler chicken. Poult. Sci. 88: 1199-1205.

Kobei O., Tanskul S., Oyama H. & Noparatraporn N. (2004). Purification and characterization of alkaline serine proteinase from photosynthetic bacterium, *Rubrivivase gelatinosus*. Biosci. Biotechnol. 68: 650-655.

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

Kristinsson H. G. & Rasco B. A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochem.* 36: 131-139.

Kristinsson H. G. & Rasco B. A. (2000). Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J. Agric. Food Chem.* 48: 657-666.

Kurbanoglu E. B & Algur O. F. (2002). The influence of ram horn hydrolysate on the crop yield of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Sci Hort.* 94(3-4): 351-357.

Kurtovic I., Marshall S. N. & Simpson B. K. (2006). Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol.* 143B: 432-440.

Kuzmina V. V. & Golovanova I. L. (2004). Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion. *Aquaculture* 234: 347-360.

Labier M. & Lecleq B. (1992). Les matières premières utilisées en aquaculture. (525-301) in: nutrition et alimentation des volailles.- Paris: INRA.- 355p.

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

Le Guen S., Prost C. & Demaimay M. (2000). Characterization of odourant compounds of mussels according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 869: 361-371.

Le Guen S., Prost C. & Demaimay M. (2000). Critical comparison of three olfactometric methods for identification of the most potent odorants in cooked mussels (*Mytilus edulis*). *J. Agric. Food Chem.* 48: 1307-1314.

Le Guen S., Prost C. & Demaimay M. (2001). Evaluation of the representativeness of the odor of cooked mussel extracts and relationship between sensory descriptors and potent odorants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1321-1327.

Lessire M. (2001). Matières grasses alimentaires et composition lipidique des volailles. *INRA Prod. Anim.* 14: 365-370.

Liaset B., Lied E. & Espe M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric.* 80: 581-589.

Liceaga-Gesualdo A. M. & Li-Chan E.C.Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* 64: 1000-1004.

Lu B.-J., Zhou L.-G., Cai Q.-F., Hara K., Maeda A., Su W.-J., et al. (2008). Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chem.* 110, 352–360.

Mackie I. M. (1982). General review of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 7: 113-124.

Martinez A. & Serra J. L. (1989). Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 93: 61–66.

Martone C. B., Borla O. P. & Sanchez J. J. (2005). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Biol. Technol.* 96: 383-7.

Metayer S., Seiliez I., Collin A., Duchenea S., Mercier Y., Geraert P-A. & Tesseraud S. (2008). Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J. Nut. Biochem.* 19: 207-215.

Merritt J. H. (1982). Assessment of the production costs of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1: 147-151.

Mock W. L. & Stanford D. J. (1996). Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry* 35: 7369-7377.

Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguan W. & Kishimura H. (2008). Tuna pepsin: characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threagfin bream (*Nemipterus ssp*). *J. Food Sci.* 73(5): 413-419.

Naulia U. & Singh K. S. (2002). Effect of substitution of groundnut with soybean meal at varying fish meal and protein levels on performance and egg quality of layer chickens. *Asian Australas. J. Anim.* 15 : 1617-1621.

Ndoye N. (1996). Etude de la qualité nutritionnelle des aliments de volailles vendus au Sénégal et de l'effet de leur supplémentation en lysine, méthionine et en lipides sur les performances zootechniques du poulet de chair. Thèse. Méd. Vét. : Dakar: n°6, 132 p.

Neira R., Lhorente J. P., Araneda C., Diaz N. & Bustos E. (2004). Studies on carcass quality traits in two populations of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture* 241:117–131.

Nilsang S., Lertsiri S., Suphantharika M. & Assavanig A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J. Food Eng.* 70: 571-8.

Noda M. & Murakami K. (1981). Studies on proteases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteases from the stomach. *Biochem. Biophys. Acta Part B* 65: 27–34.

Ohkubo M., Miyagawa K., Osatomi K., Hara K., Nozaki Y. & Ishihara T. (2004). Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from Lizard fish (*Sawida undosquamis*) muscle. *Comp. Biochem. Phys. Part B* 137: 139-150.

Oliva-Teles A., Cerqueira A. L. & Gonçalves P. (1999). The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture* 79(1-4): 195-201.

Orskov E. R., Soliman H. S. & Clark C. F. S. (1982). Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 7: 135

Ouellet D. R., Seoane J. R., Veira D. M. & Proulx J. G. (1997). Effects of supplementation with fish meal or fish protein hydrolysate on growth, nutrient digestibility and rumen fermentation of growing cattle fed grass silage. *Anim. Feed Sci. Tech.* 68: 307-26.

Pavlisko A., Rial A. & Coppes Z. (1999). Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortiu* spp.) and mullet (*Mugil* spp.) from the southwest Atlantic region. *J. Food Biochem.* 23 : 225–241.

Pago J. (1985). L'élevage en pays tropicaux, Paris, maisonneuve, 526 p.

Parra A. M., Rosas A., Lazo J. P. & Viana M. T. (2007). Partial characterization of the digestive enzymes of pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol Biochem.* 33: 223-31.

Penda R. E. (2007). Contribution à la valorisation des protéines d'hydrolysats obtenues par hydrolyse enzymatique des coproduits (squelette) de la sole tropicale: *Cynoglossus senegalensis* au Sénégal. Thèse : méd. vét. Dakar; n°22, 96 p.

Pennarun A. L., Prost C. & Haure J. (2001). Organoleptic characteristics and aromatic composition of oysters *Crassostrea gigas* fattened with microalgae *Skeletonema costatum* and *t-isochrysis*, in new species. *New Technologies, e.a. society*, editor 2001: Trondheim, Norway.

Peralta R. R., Shimoda M. & Osajima Y. (1996). Further identification of volatile compounds in fish sauce. *Agric. Food Chem.* 44 (11): 3606-3610.

Perry T. C. & Fox D. G. (1997). Predicting carcass composition and individual feed requirement in live cattle widely varying in body size. *J. Anim. Sci.* 75: 300–307.

Picard M., Sauveur B., Ferrandji F., Angulo I. & Mongin P. (1993). Ajustement technico-économique possible de l'alimentation des volailles dans les pays chauds. I.N.R.A, Prod. Anim. 6 (2) 87 –

Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelsson G., Berge J. P., Guerard F., Chabeaud A. & Piot J. M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. Process Biochem. 41: 1217-22.

Piveteau F., Guen S. L., Gandemer G., Baud J. P. & Prost C. (2000). Aroma of fresh oysters *crassostrea gigas*: composition and aroma notes .J. Agric. Food Chem. 48: 3214-3219.

Prost C., Sérot T. & Demaimay M. (1998). Identification of most potent odorants in wild and farmed cooked tubot (*Scophthalmus maximus l.*). J. Agric. Food Chem. 48: 4851-4857.

Prost C., Guen S. L., Courcoux P. & Demaimay M. (2000). Similarities among 40 pure odorant compounds evaluated by consumers. J. Sensory Studies 16 : 551-565.

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

Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. & Deshpande V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 : 597–635.

Raonimanana H. H. (2004). Contribution à l'étude de l'influence de l'incorporation à doses faibles de graines de *Caiba pentandra* et de *Heritiera littoralis* dans l'alimentation des poulets de chair. Mémoire Université Antananarivo, 94 p.

Ravallec-Ple R, Gilmartin L, Wormhoudt A. V. & Gal Y. L. (2000a). Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. J. Sci. Food Agric. 80 : 1-5.

Ravallec-Ple R. (2000b). Valorisation d'hydrolysats d'origine marine; optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. Thèse Méd Vét.: Université de Bretagne Occidentale, 89 p.

Rawlings ND & Barrett AJ (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**: 205-218.

Rawlings N. D. & Barrett A. J. (1994). Families of cysteine peptidases. In proteolytic enzymes : serine and cysteine peptidases. *Methods in enzymology*. Ed. Alan J. Barrett. vol 244 Academic Press, San Diego, New York, Tokyo, Toronto. pp. 461-486.

Rawlings N. D. & Barrett A. J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**: 183-228.

Refstie S., Olli J.J. & Standal H. (2004). Feed intake, growth and protein utilization by post-smolt atlantic salmon (*salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture* 239: 331-349.

Relandeau C. & Le Bellego L. (2005). Besoin en acides aminés du poulet de chair : revue sur la lysine, la thréonine et les autres acides aminés. *Anim. Nut.* 27 : 1-36.

Ricard F. H., Marche G. & Le Bihan-Duval E. (1994). Essai d'amélioration par sélection de la qualité de carcasse du poulet de chair. *INRA Prod. Anim.* 7: 253-261

Rustad T (2003). Utilization of marine by-products. *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2: 458-463.

Rutten M. J. M., Bovenhuis H., & Komen H. (2004). Modeling fillet traits based on body measurements in three Nile tilapia strains (*oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture. Journal.* 231: 113-122.

Ryan C. A. (1965). Chicken chymotrypsin and turkey trypsin. Part II. Physiological and enzymatic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 110: 175-183.

Saisithi P. (1994). Traditional fermented fish: fish sauce production. in: martin a.m., (eds), *fisheries processing*, chapman & hall, london 111-31.

Sanceda N. G., Kurata T., Suzuki Y. & Arakawa N. (1992). Oxygen effect on volatile acids formation during fermentation in manufacture of fish sauce. *Food Science*. 57: 1120-2.

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. *J. Food Sci.* 68: 2196-2200.

Sathivel S., Bechtel P.J., Babbitt J., Prinyawiwatkul W. & Patterson M. (2005a). Functional, nutritional, and rheological properties of protein powders from arrowtooth flounder and their application in mayonnaise. *J. Food Science*. 70: 57-63.

Sathivel S., Smiley S., Prinyawiwatkul W. & Bechtel P. J. (2005B). Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *J. Food Sci.* 70: 401-406.

Sathivel S. & Bechtel P. J. (2006). Properties of soluble protein powders from alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 41: 520-529.

Shahidi F., Han X-Q. H. & Synowieck J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 53: 285-293.

Slizyte R., Rustad T. & Storro I. (2005a). Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochem.* 40: 3680-3692.

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

Souissi N., Ali B., Yousra T-E. & Moncef N. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. Food Technol. Biotechnol. 45 : 187–194.

Subasinghe S. (1999). Chitine à partir de déchets de crustacés: les avantages sur la santé dominant les usages industriels. Infofish Inter. 3:5

Sanchez-Chiang L., Cisternas E. & Ponce O. (1987). Partial purification of pepsins of adult and juvenile salmon fish (*Oncorhynchus keta*). Effect of NaCl on proteolytic activities. Comp. Biochem. Physiol. Part B 87: 793-797.

Sarry J.E. (2001). Etude biochimique et moléculaire de beta-D-glucoside hydrolases de la baie de raisin (*Vitis vinefera L.*). PhD Thesis, Université Montpellier II, France.

Shahidi F., & Kamil J. Y. V. A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. Trends Food Sci. Technol. 12: 435-464.

Shi C., Marshall S. N. & Simpson B. K. (2007). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of the New Zealand hoki fish (*Macruronus Novaezealandiae*). J. Food Biochem.31: 772–796.

Simpson B. K. (2000). Digestive proteinases from marine animals. In N. F. Haard & B. K. Simpson (Eds.), Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality (pp. 531–540). New York: Marcel Dekker.

Souza A. A. G., Amaral I. P. G., Santo A. R. E., Carvalho L. B., Jr. & Bezerra R. S. (2007). Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). Food Chem. 100: 1429–1434.

Squires E. J., Haard N. F. & Feltham L. A. (1986). Gastric proteases of the Greenland cod (*Gadus ogac.*) I. Isolation and kinetic properties. Biochem. Cell. Biol. 64: 205–214.

Strom T. & Eggum B. O. (1981). Nutritional value of fish viscera silage. J. Sci. Food Agric. 32: 115–120.

Taylor A. (1993). Aminopeptidases: Structure and function. *FASEB Journal*, 7, 290–298.

Triki-Ellouz Y., Ghorbel B., Souissi N., Kammoun S. & Nasri M. (2003). Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 41-45.

Tesseraud S., Maaa N., Peresson R. & CHagneau M. (1996). Relative responses of protein turnover in three different skeletal muscles to dietary lysine deficiency in chicks. *Poult. Sci.* 37: 641-650.

Tesseraud S., Le Bihan-Duval E., Peresson R., Michel J. & Chagneau M. (1999). Response of chick lines selected on carcass quality to dietary lysine supply: live performance and muscle development. *Poult. Sci.* 78: 80-84.

Varlet V., Knockaert C., Prost C. & Serot T. (2006). Comparison of odor active volatile compounds of fresh and smoked salmon. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3391-3401.

Wu H. C., Chen H. M., & Shiau C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 36: 949-957.

Yu S. Y. & Tan L. (1990). Acceptability of crackers ('keropok') with fish protein hydrolysate. *Int. J. Food Sci. Tech.* 25: 204-208.

Zaman Q. U., Mushtaq T., Nawaz H., Mirza M. A. & Mahmood S. (2008). Effect of varying dietary energy and protein on broiler performance in hot climate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 15 : 52-60.

Zhou T. X., Chen Y. J., Yoo J. S., Huang Y., Lee J. H., Jang H. D., Shin S. O., Kim H. J., Cho J. H. & Kim I. H. (2009). Effects of chitoooligosaccharide supplementation on performance, blood characteristics, relative organ weight, and meat quality in broiler chickens. *Poult. Sci.* 88: 593-600.

Żelazko M., Chrzanowska J. & Polanowski A (2008). Pancreatic proteolytic enzymes of ostrich purified on immobilized protein inhibitors. Characterization of a new form of chymotrypsin (Chtr1). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 151: 102–109.

Zukowski M. M. (1992). Production of commercially valuable products. In R. H. Doi & M. Mc Gloughlin (Eds.), *Biology of bacilli: Application to industry* (pp. 311–337). London: Butterworth-Heinemann.