

ETUDE COMPARATIVE DE LA MATURATION

D'ANCHOIS FRAIS ET DECONGELES.

--:--:--:--

par J.L. VALLET

Elève Ingénieur de l'ENITIAA (Nantes)

Etude effectuée à l'Institut  
scientifique et technique  
des Pêches maritimes - Nantes.

Avril - Octobre 1978

## Remerciements

Je tiens à remercier les chercheurs et les techniciens de l'Institut scientifique et technique des Pêches maritimes ainsi que les entreprises "PAPA FALCONE" et "FREYSSENGEAS" pour leur aide, m'ayant ainsi permis de mener à bien ce stage de fin d'étude.

Table des matières.

	Pages
• Introduction	
• DONNEES TECHNOLOGIQUES ET ECONOMIQUES	
I. Exposé biologique et technologique	3
1. Matières premières, données biologiques et pêche	3
2. Transformation à l'usine	4
II. Exposé économique	6
III. Données bibliographiques	11
• TRAVAIL DE LABORATOIRE	
I. Présentation du plan de travail	15
A. Données théoriques	15
B. Matière première et préparation des échantillons	16
C. Plan d'analyse	17
II. Etude comparée de la maturation de l'anchois frais et de l'anchois congelé.	17
A. Variation du taux d'humidité	17
B. Etude biochimique	21
1. Evolution de la matière azotée	
2. Evolution de la teneur en acides aminés	
a) Principe et techniques	
b) Interprétation des résultats	
c) Etude microbiologique	34
1. Données bibliographiques	
2. Schéma expérimental	
3. Résultats	

III. Etude de l'influence du réensemencement	37
A. Principe	37
B. Variation du taux de matière sèche dessalée	38
C. Etude biochimique	40
1. Evolution de la matière azotée	
2. Evolution de la teneur en acides aminés	
D. Etude microbiologique	45
IV. Conclusion sur la partie expérimentale	45
PROPOSITION POUR UNE ETUDE FUTURE	46

## INTRODUCTION

---

De tous temps, certains procédés de transformation ont été mis au point afin de garder les excédents de produits et d'en assurer leur conservation lors du stockage. Ces principaux procédés utilisés empiriquement, séchage, fumage et salage avaient pour effet la diminution de l'activité de l'eau libre et par conséquent la création d'un milieu défavorable au développement bactérien.

Le plus simple de ces procédés est le séchage à l'air libre, qui agit par diminution de l'activité de l'eau. Le fumage et une variante du séchage, ou l'évaporation de l'eau libre est accélérée par chauffage, et où de plus l'action bactéricide des composés de la fumée diminue la pollution bactérienne de surface, de 50 à 90 % (SHEWAN). Dans le cas du salage, la déshydratation se traduit par l'extraction des liquides tissulaires par osmose, accompagnée de la création d'un milieu défavorable à la croissance de la plupart des bactéries responsables de l'altération des poissons. Tous ces procédés s'accompagnent de transformations organoleptiques importantes.

Actuellement il existe de nombreux autres moyens de conservation modernes comme la congélation ou l'appertisation. Ainsi pour la pêche à la morue, les campagnes étant très longues, le sel était utilisé comme conservateur. Actuellement le salage est supplanté par la congélation.

Cependant, par coutumes et habitudes alimentaires, dans les pays de technologie évoluée, ces procédés empiriques sont toujours utilisés, non plus comme moyen conservateur, mais pour préparer des produits aux caractéristiques organoleptiques particulières.

Il en est ainsi pour le salage des anchois, qui donne lieu à une maturation avec apparition du goût, de la couleur et de la saveur "anchoitée".

Actuellement cette maturation est assez mal connue scientifiquement et donc mal contrôlée. Elle ne peut être obtenue qu'avec du poisson frais, supprimant ainsi les possibilités de stockage avant maturation. Par expérience industrielle, les anchois congelés n'auraient pas la faculté de bien mûrir rapidement.

Notre travail a pour but d'étudier les possibilités de pré-conservation par congélation, avant mise en maturation. Le principe est une étude biochimique et microbiologique comparative, sur des échantillons de même origine, mis en maturation dans les mêmes conditions à l'état frais et après congélation et conservation à - 25°C. Parallèlement, des essais de réensemencement ont été menés sur les échantillons congelés.

Le travail se décompose comme suit :

- un exposé technologique et économique sur l'industrie de l'anchois,
- le travail de laboratoire
- la synthèse de résultats avec une proposition d'orientation pour une étude future.

DONNEES TECHNOLOGIQUES et ECONOMIQUES

I. Exposé biologique et technologique.

A. Principe de fabrication.

1. Matières premières, données biologiques et pêche.

Actuellement l'espèce utilisée en France pour la fabrication des anchois est Engraulis encrasicolus (1).

L'anchois, poisson au corps allongé à section transversale arrondie, a le dos bleu et le ventre argenté. Il vit en général 3 ans et peut atteindre une taille maximale de 20 cm. Il mesure en moyenne 10 cm à un an, 15 cm à deux ans et 18 cm à trois ans (D. Guérault et J.L. Avrilla).

Comme beaucoup de poissons, l'anchois a une biologie étroitement liée à la physiologie de sa reproduction. Il se nourrit essentiellement de zooplancton, oeufs de poissons et copépodes. De mai à octobre, quand le plancton est le plus abondant, l'anchois a une croissance importante accompagnée d'une accumulation de réserves grasses. La teneur en matières grasses du poisson est maximale en automne (Fraya, 1955). Avec les premiers froids, le poisson disparaît dans les eaux profondes. Ses réserves grasses lui permettent une hibernation dans des conditions nutritionnelles défavorables et l'élaboration des produits sexuels.

Dès le premier réchauffement printanier, le poisson sexuellement mûr, se rapproche des côtes et de la surface, en bancs, pour frayer. Quand la température dépasse le minimum de 14,5 °C, il commence à pondre (S. Arbault et N. Lacroix).

La durée et la période de fraie sont variables selon les lieux géographiques et coïncident à peu près avec la saison de pêche sauf en Vendée et Bretagne où l'on capture l'anchois bien après la ponte. Sur la côte atlantique il pond de mai à juillet, la ponte de printemps étant courte et bien plus abondante que celle de l'été (S. Arbault et N. Lacroix). En Méditerranée la période de fraie s'échelonne d'avril à août. Dans tous les cas les conditions de température sont primordiales pour le développement des oeufs et la croissance des larves .

./.

(1) Depuis un certain nombre d'années et du fait des importations, d'autres espèces d'anchois ont été travaillées en France (E. anchoita, provenant d'Argentine par exemple).

L'anchois est donc capturé quand il se rassemble en bancs. En Méditerranée, on le pêche au lamparo, tandis qu'en Atlantique, on utilise la senne coulissante (F. Kabbaq).

Actuellement dans les ports d'Hendaye et de Saint Jean de Luz, les sauteurs recommandent aux pêcheurs d'opérer un présalage de 3 à 5 % en vrac à bord. En effet, le poisson pêché est stocké en vrac dans les viviers destinés à l'appât vivant pour la pêche au thon. Le poisson étant fragile, lors de conditions climatiques défavorables, il pourrait subir un début de dégradation. On peut limiter ce risque par un présalage appliqué lors de la pêche, au fur et à mesure du remplissage du vivier.

Au débarquement, le poisson est transféré à l'aide de grandes épuisettes dans des containers métalliques ou en fibres de verre de 750 à 850 kg puis est transporté à l'usine (photo n° 1).

## 2. Transformation à l'usine.

Le salage de l'anchois, industrie spécifiquement méridionale, est essentiellement localisée en France, sur les côtes basques et méditerranéennes.

Arrivés à l'usine, les anchois sont placés en vrac en cuve de 800 kg (photo n° 2) dans du sel sec ou une saumure saturée. Ce stockage peut durer de quelques à 3 mois maximum, mais il s'accompagne d'un début de maturation. Il permet d'attendre la transformation, qui pour des raisons de main d'oeuvre ne peut pas être effectuée immédiatement.

Les anchois sont ensuite étêtés et éviscérés (photo n° 3). Les viscères sont retirés en même temps que la tête. Cette opération est faite manuellement par du personnel féminin en partie saisonnier.

Les anchois sont ensuite disposés en baril (photos n° 4 & 5) avec du sel demi-fin n° 2 (indifféremment du sel gemme ou de mer) pour rester en maturation de 4 à 8 mois sous pressage. L'entreposage se fait en hangar (photo n° 6). Il est susceptible de connaître d'importantes variations de température entre le jour et la nuit, et suivant les saisons. Ces différentes opérations sont résumées sur la figure 1.

La méthode la plus fréquemment utilisée en France est le salage en



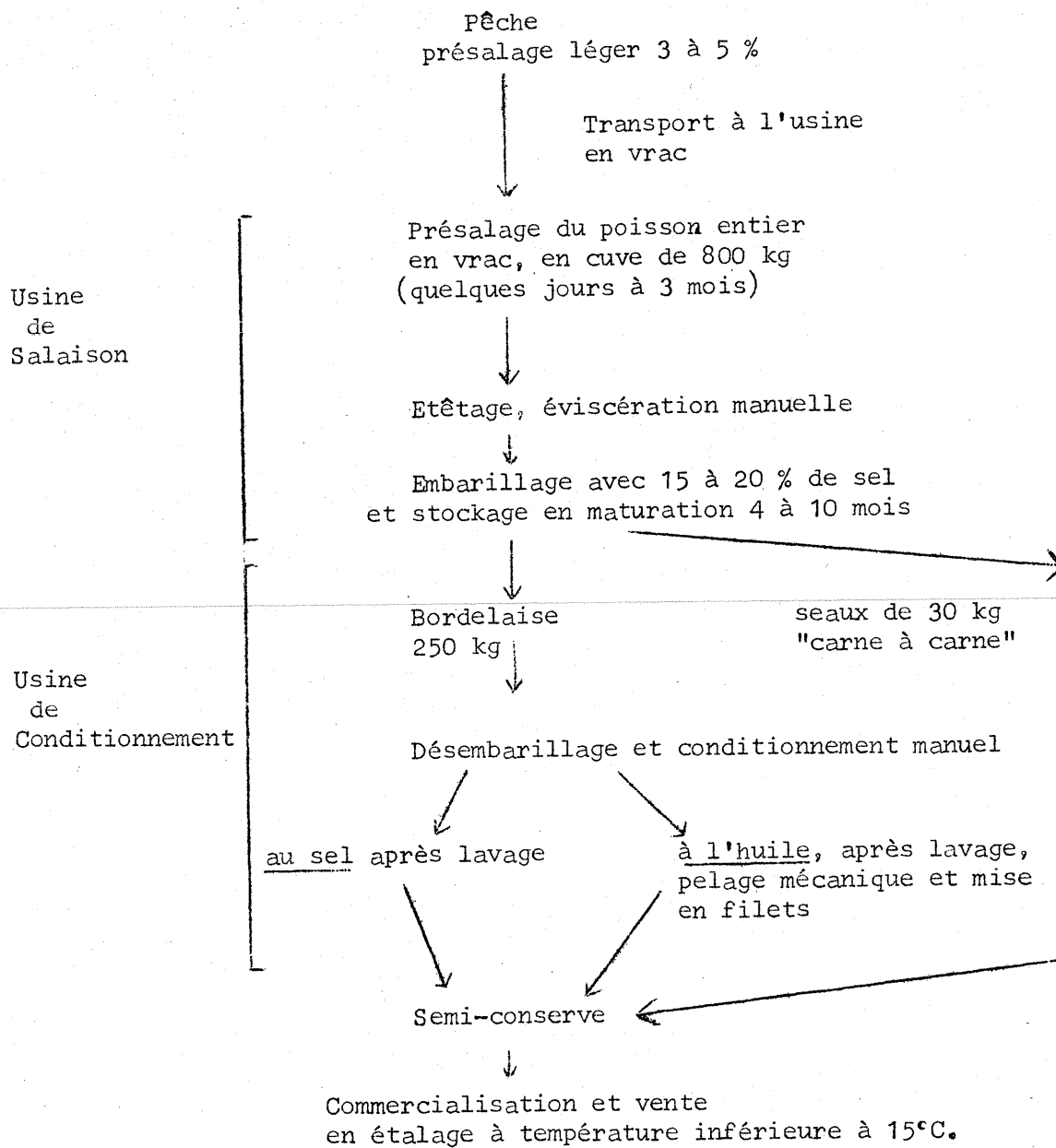


Fig. 1. Schéma des opérations.

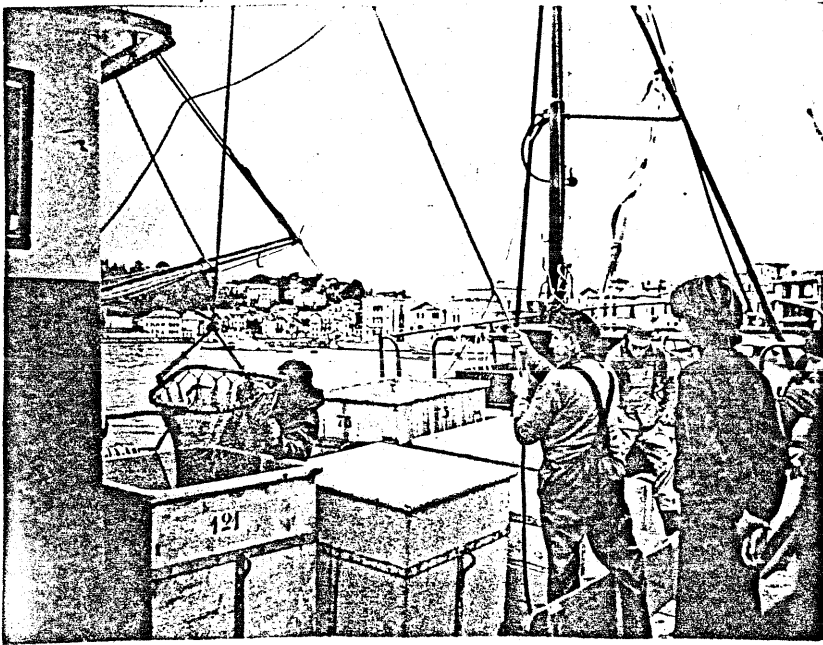


Fig1; débarquement de l'anchois  
a St Jean de Luz

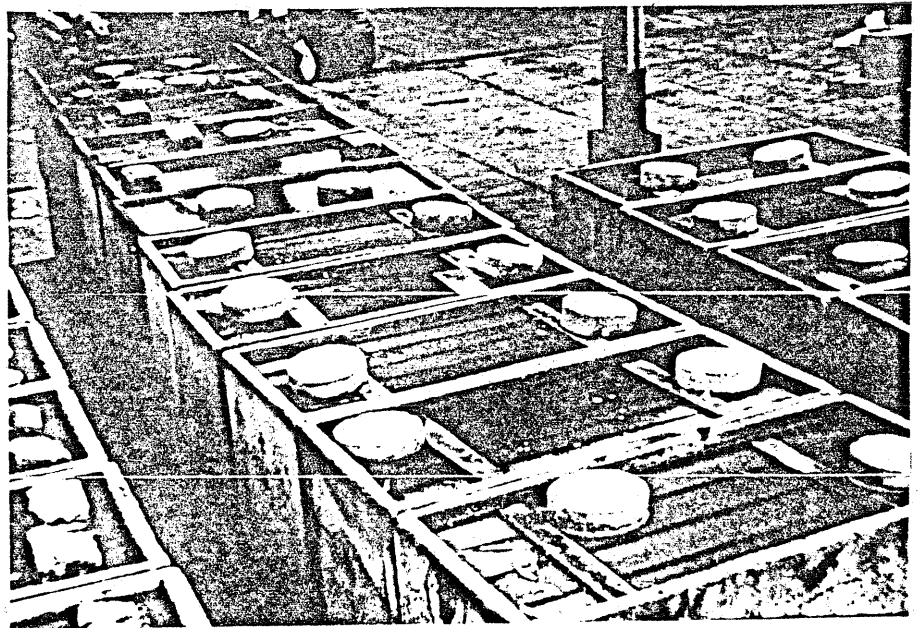


Fig2 ; stockage avant mise en barils



Fig3;étêtage et éviscération



Fig4; embarillage des anchois



Fig5; disposition en baril

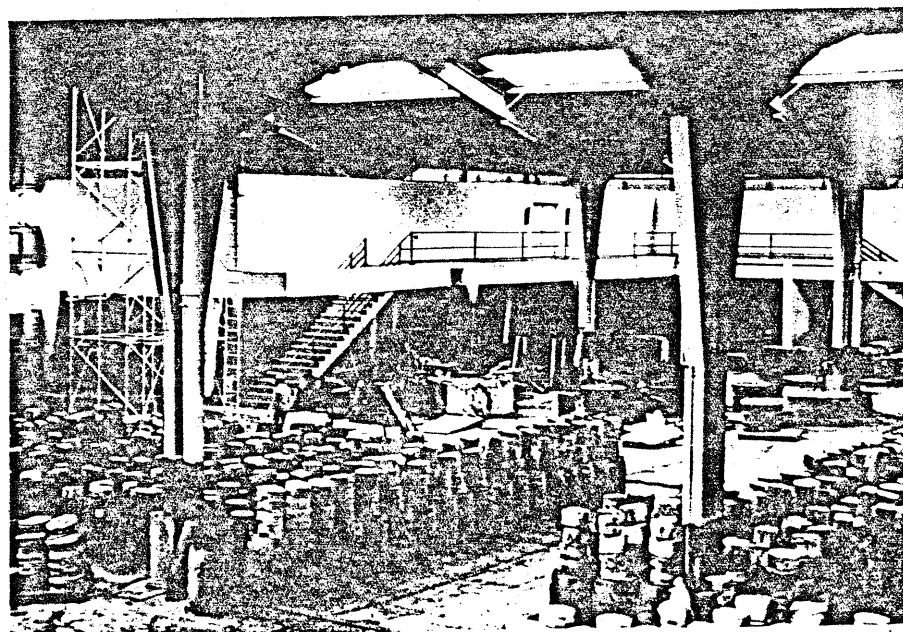


Fig6; anchois en cours de maturation

bordelaise des poissons rangés en couches successives avec 15 à 20 % de sel.

Dans tous les cas les barils sont pressés (photo n° 6) pour permettre l'exsudation du liquide tissulaire ainsi que des graisses. Cependant un trop fort pressage peut aboutir à un écrasement des poissons, qui seront très difficiles à séparer lors <sup>du</sup> des-embarillage. L'intensité du pressage varie fortement avec les fabricants et peut aller de 40 à 120 kg. Les barils utilisés actuellement sont essentiellement des bordelaises de 250 kg en matière plastique.

Dans certaines entreprises, on trouve encore des bordelaises en chêne. Mais d'un prix de revient élevé, elles sont peu à peu abandonnées, à cause des difficultés de fabrication et d'entretien.

D'autre part certains fabricants utilisent des seaux métalliques de 30 kg pour la préparation "Carne à Carne" (photos 4 & 5) appelée encore "méthode sicilienne". Le poisson est placé à plat avec du sel demi-fin et se trouve donc "chair à chair". En début de maturation les seaux sont chargés par des poids, puis ils sont ensuite disposés en chevalet (Dieuzeide). Le rendement du travail poisson frais/poisson salé terminé varie entre 65 et 70 % suivant les entreprises.

En fin de maturation, lorsque les anchois sont "mûrs", c'est à dire de couleur rosée avec la saveur anchoitée particulière, les poissons sont sortis des barils, puis lavés et reconditionnés avec une saumure saturée, pour les semi-conserves d'anchois au sel. Dans le cas d'un conditionnement à l'huile, ils sont lavés, et pelés mécaniquement à l'eau chaude (ou saumure chaude). Ils sont ensuite mis en filets et conditionnés manuellement en pots de verre ou boîtes métalliques, destinés à la commercialisation.

Dans l'ensemble le schéma de fabrication est resté très artisanal, n'utilisant pas les possibilités offertes par le contrôle de la température. Or dans toutes transformations enzymatiques et bactériennes, la température joue un rôle important. De plus le travail est très saisonnier et emploie essentiellement de la main d'oeuvre féminine temporaire.

La structure même des entreprises crée des problèmes de gestion, car les immobilisations de matière première et de matériel de stockage sont

considérables. Le résultat est toujours aléatoire, fonction de l'état biologique du poisson et de sa provenance. En effet, les industriels ont constaté que plus l'anchois était pêché au Nord (Vendée, Bretagne) plus il mûrissait difficilement. Or l'allongement de la maturation réduit la rentabilité. Ceci explique que l'on ne trouve des usines de salage que sur la côte basque et méditerranéenne.

## II. Exposé économique.

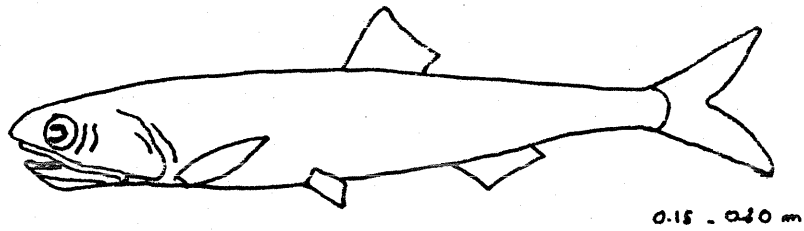
Ces 20 dernières années, les mélanges de population ont été très importants et le pourcentage de personnes provenant d'Afrique du Nord et autres pays méditerranéens a augmenté en fortes proportions sur tout le territoire français. Ces personnes ayant conservé leurs habitudes alimentaires, la demande d'anchois salés s'est accrue. Les saleurs, pour répondre à cette nouvelle demande ont encouragé les pêcheurs à accroître leurs prises puis ont cherché à importer. Cependant, le salage étant le seul débouché industriel de cette pêche, de nombreux problèmes de relations existent entre pêcheurs et saleurs en particulier sur la qualité des pêches, le poisson devant satisfaire à des normes de taille. Le moule maximum est en effet de 50 à 55 poissons au kilogramme. La pêche est surtout fonction de facteurs naturels incontrôlables.

Comme nous l'avions vu précédemment, la pêche de l'anchois est très saisonnière et la taille ainsi que la qualité du poisson (augmentation du taux de graisse) diminuent rapidement durant la campagne.

D'autre part les temps de maturation allant de 4 à 8 mois, il en résulte un facteur limitant pour les saleurs. En effet ceux-ci ne débloquent des crédits matière première que dans la mesure où ils seront certains d'écouler les stocks de l'année précédente. Le potentiel de pêche est donc limité par les possibilités d'achat des saleurs.

Nous allons suivre l'évolution de la pêche et du marché depuis 1972.

Sur la figure 2 nous constatons que le tonnage pêché est sujet à de nombreuses variations et depuis 1972 la tendance est à la baisse des prix. En revanche, on remarque que sur la figure 3 le tonnage d'anchois salés en fût, utilisé comme matière première pour la semi-conserve est



Engraulis encrasicolus ; anchois

Fig 2; tonnage pêché national

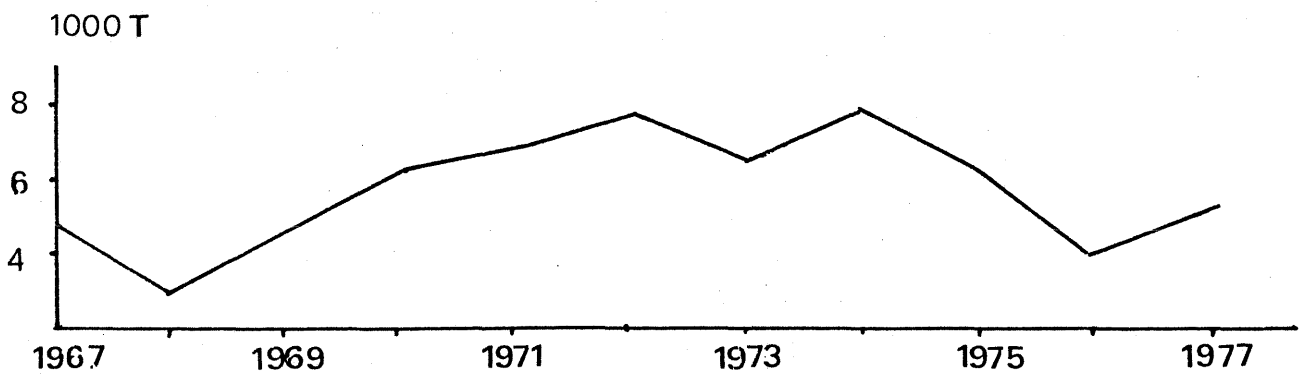


Fig 3; tonnage total salé en fût utilisé pour la fabrication de semi-conserves

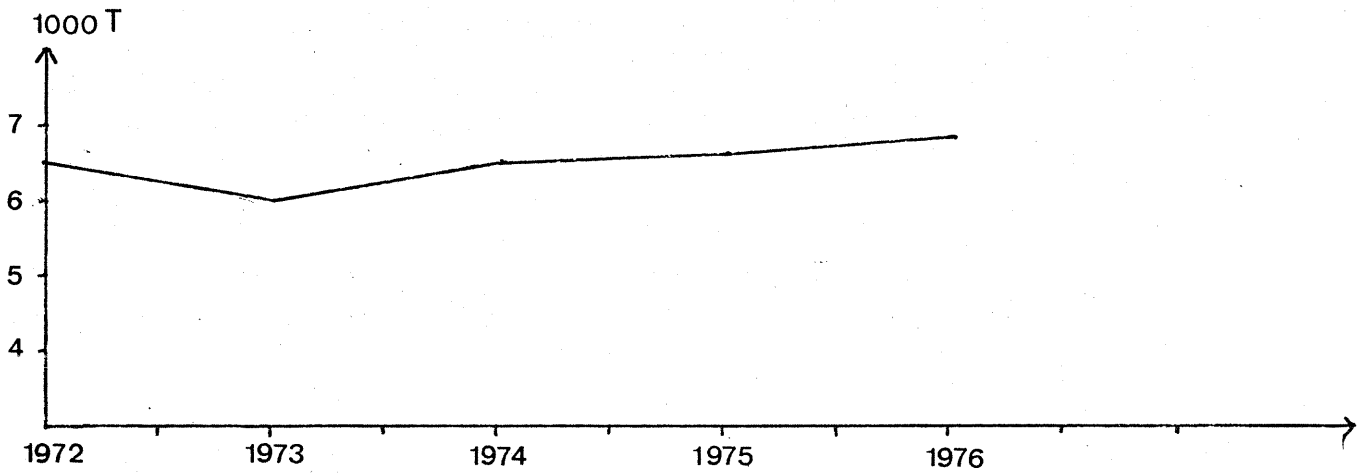


Fig 4; tonnage salé en fût importé

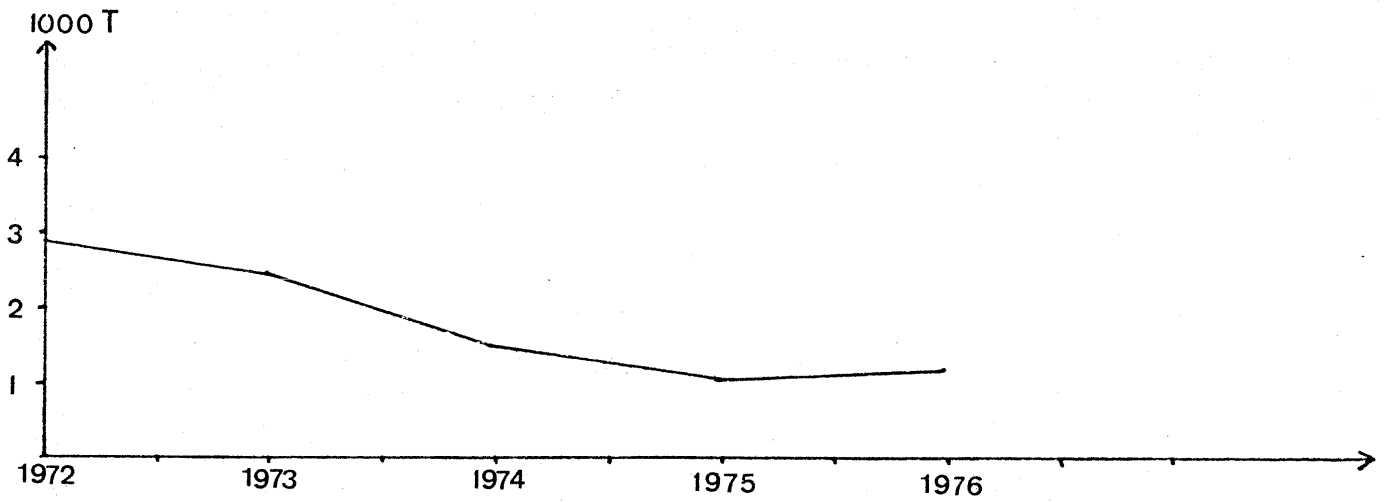
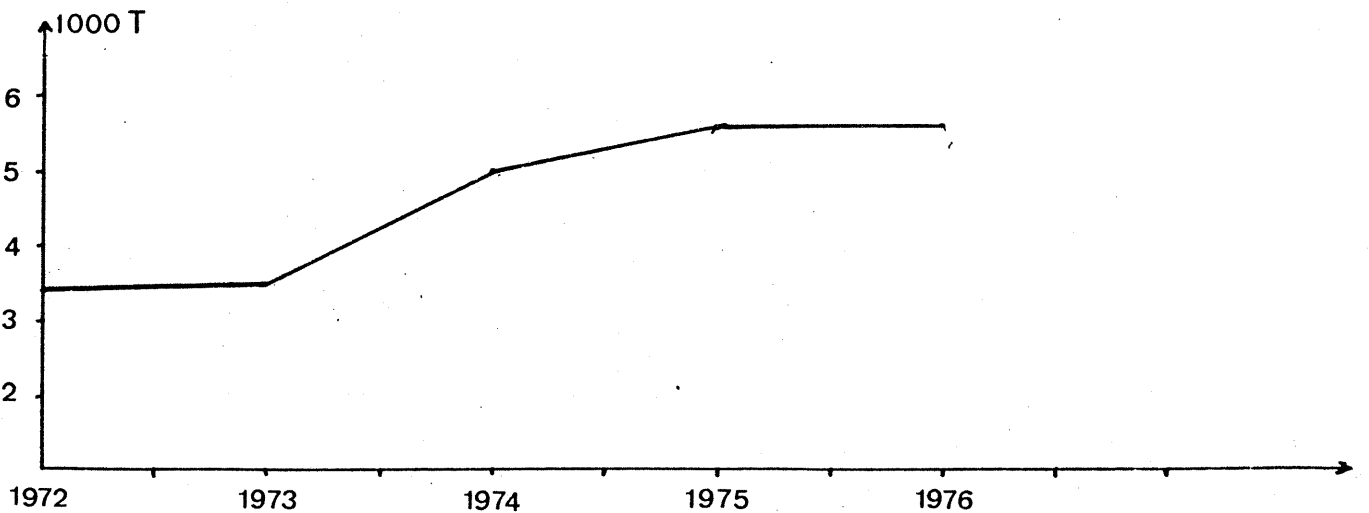


Fig 6; tonnage salé en fût produit à partir de la pêche française





relativement stable et même légèrement en hausse. Les sauteurs compensent le déficit de la pêche par des importations d'anchois d'Argentine, d'Algérie et de Yougoslavie.

Cependant si nous dissociions les importations et la production française d'anchois salés en fût, on constate une diminution du tonnage importé (fig. 4 et 5). Ceci est dû aux problèmes de qualité rencontrés par les conserveurs, avec les produits importés, notamment d'Argentine sous forme congelée. Ces poissons sont très difficiles, voire impossible à faire mûrir. Les importations ne se font plus que sous la forme d'anchois salés en barils.

En revanche le tonnage d'anchois salés produit à partir de la pêche française a subi une forte augmentation en 1973 et 1974 (fig. 6). Ceci met bien en évidence l'action tampon entre la pêche et la semi-conserve, due aux longues périodes de maturation. Dans les chiffres statistiques, l'expression du tonnage salé en fût est différée au minimum d'un an avec l'expression du tonnage pêché, ayant servi à sa fabrication.

Cette évolution de la production française d'anchois salés en fût est confirmée par la courbe d'activité (essentiellement saisonnière) fig. 7. Le chiffre de 1972 est exceptionnel car la production s'est étalée sur 2 périodes, du fait de la bonne campagne d'automne.

Malheureusement pour la pêche, subsiste de nombreux problèmes et en premier lieu celui de la détermination du prix de vente du kilo frais. Si nous tenons compte de l'inflation de la monnaie, celui-ci est en baisse constante depuis 1972 (fig. 8). Ceci provoque un mécontentement général des pêcheurs, le non renouvellement de la flotte et la diminution du nombre de pêcheurs (Rapport de la Chambre Syndicale Nationale de la Conserve, 1975).

Ainsi 1975 a été une année difficile. Des contrats n'ont pas pu être établis entre transformateurs et pêcheurs. La concurrence s'est développée anarchiquement à des prix très bas. La consommation a baissé de 30 à 40 % à la suite de l'arrêté du 4 octobre 1973 réglementant la vente des semi-conserves à une température inférieure à + 15°C (C.S.C.). L'état dut garantir les prix d'achat du kilo frais aux pêcheurs, et des quotas de pêche furent imposés : 8 tonnes par jour et par bateau en début de saison et

Fig5; pourcentage d'importation d'anchois salés en fût

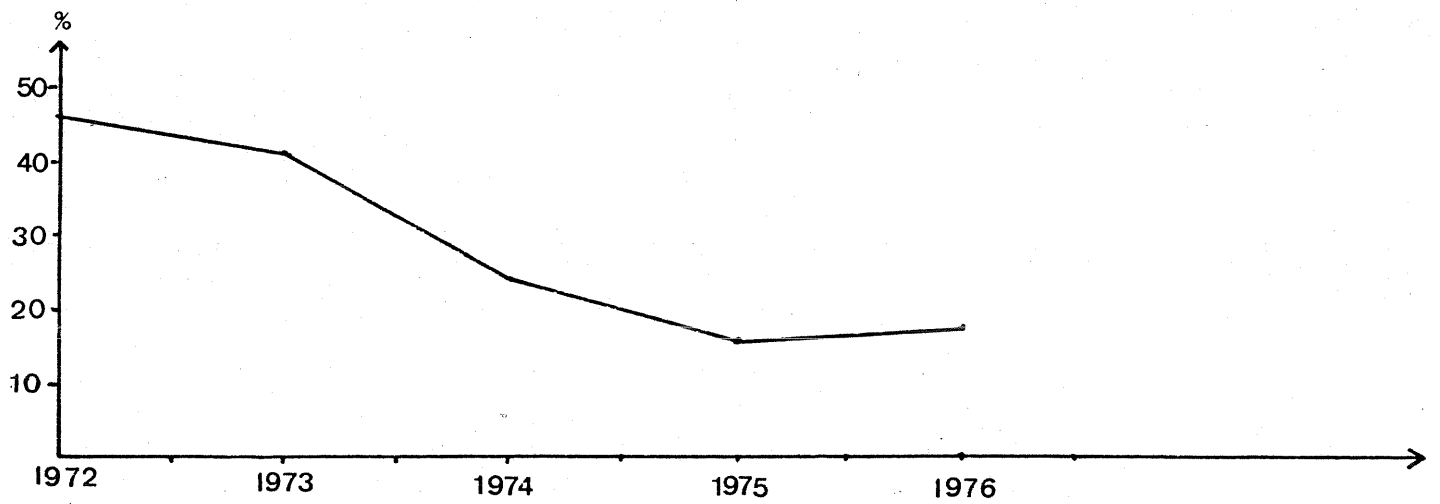


Fig 7, nombre d'heures de travail ouvrier

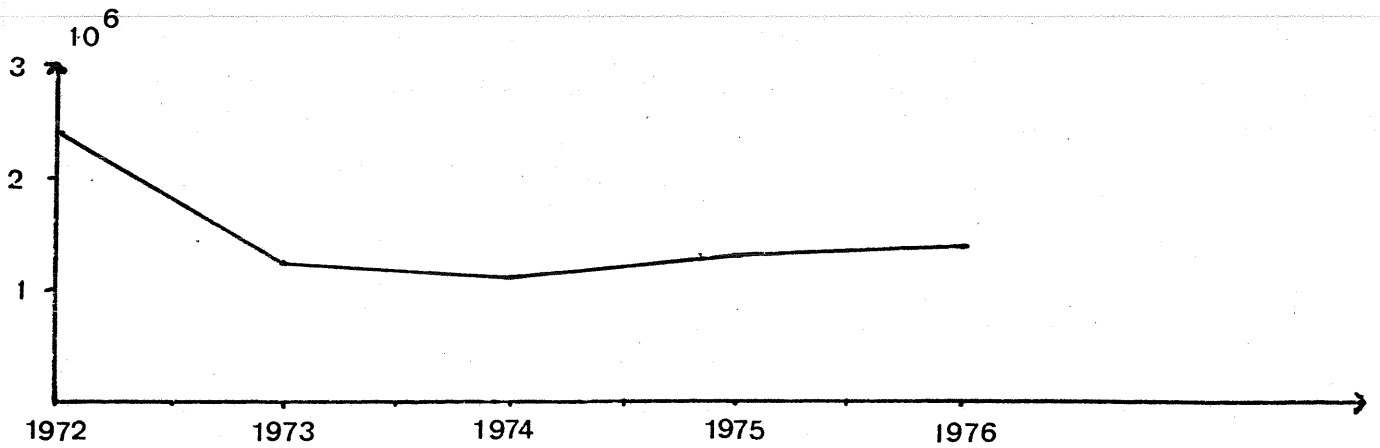
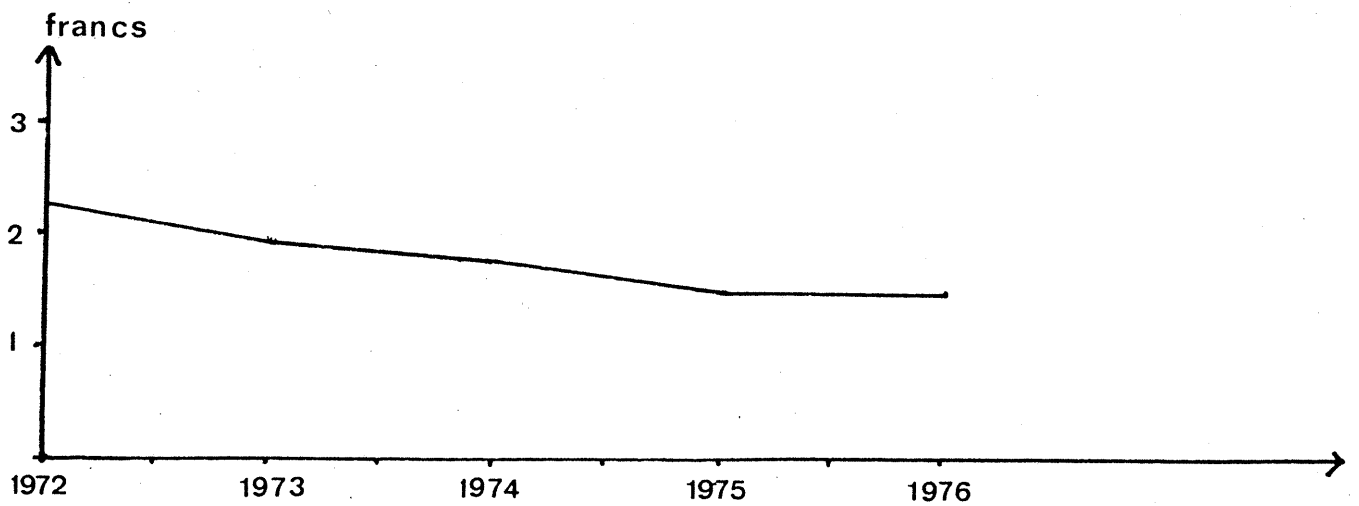


Fig8; prix moyen au Kg de l'anchois frais (non actualisé)



4 tonnes en fin de saison.

Nous assistons actuellement à une crise grave bien que la vente potentielle de produit fini pourrait être accrue par l'exportation vers les pays de la C.E.E.

Il semble que parmi les causes de cette crise, interviennent les lourdes immobilisations de capitaux ainsi que la concurrence très importante des autres pays producteurs.

Une meilleure connaissance du produit, de son évolution et l'introduction éventuelle de l'utilisation du froid pourrait peut être apporter des améliorations à ces problèmes.

### III. Données bibliographiques et justification de l'étude.

A la suite d'entretiens avec différents responsables d'entreprises de la côte basque, il semble que le souhait général des fabricants, serait de pouvoir contrôler leur fabrication, soit par stockage de la pêche, soit par stockage du produit fini ou par contrôle du temps de maturation.

Actuellement, les structures de fabrication sont très artisanales et le travail est essentiellement un travail de manutention et de stockage. Pour des raisons de conjoncture économique, les sauteurs produisent à partir des structures déjà existantes, sans envisager de nouveaux schémas de fabrication et d'investissements.

Un certain nombre de travaux ont été effectués sur l'anchois. Le principal souci des chercheurs a été la mise en évidence du type d'évolution subi par la chair lors de la maturation.

Deux grandes tendances se sont dessinées au début de ces travaux.

Ainsi les Suédois ont essayé de mettre en évidence une action bactérienne (rapport SIK). Le poisson avant mise en maturation a été stérilisé au formaldéhyde. Mais des problèmes de dénaturation dus à ce procédé de stérilisation faussèrent les résultats. D'autres essais furent faits, mais

en stérilisant la chair par rayonnement n'altérant pas la structure.

La maturation a été suivie sur différents lots inoculés ou non. L'anchoitage ne fut obtenu que pour les échantillons inoculés. D'autre part les intestins du poisson semblent avoir une importance notable sur la maturation. Des travaux ont été menés par le Dr. F. Alm et ont mis en évidence dans la chair, une activité forte des enzymes intestinaux en début de maturation, puis une baisse d'activité. Dans la saumure, l'activité enzymatique due au transfert atteint un maximum au bout de quelques semaines puis une forte décroissance par inactivation. Des tests microbiologiques sur du poisson stérilisé ou non, n'ont pas donné de résultats probants, mais le sel n'avait pas été stérilisé.

Il faut être très prudent dans l'utilisation de ces travaux, en effet les Nordiques n'ont pas la même définition du produit anchoité que nous. Ils préparent ces "anchois" généralement à partir de sprat, sardine et hareng. Ils sont parfois accomodés avec du sucre.

Plus récemment des équipes de chercheurs italiens (G. Baldrati, G. Guidi, P. Pirazzoli) se sont intéressés à la maturation de l'anchois, et plus particulièrement à l'influence du pressage sur la vitesse de maturation. Les résultats suivants ont été obtenus. Le taux de rancidité diminue au cours de la maturation, la quantité d'azote total et le pH sont constants, le pourcentage de sel dans la chair est maximum sur l'échantillon le moins pressé, l'activité de l'eau dépend du sel en solution dans le liquide tissulaire et donc de la pression exercée.

Ils constatent également le développement de germes halophiles sur les échantillons les moins pressés, ainsi qu'une protéolyse plus rapide pour de faibles charges. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour des anchois de printemps (donc maigres) avec le pressage suivant :

23 g/cm<sup>2</sup> les 15 premiers jours puis  
140 g/cm<sup>2</sup> jusqu'en fin de maturation.

Les conditions optimales étaient obtenues pour une activité de l'eau  $a_w = 0,73$  et un pourcentage minimum de matière sèche de 50 %.

Le critère de fin de maturation était que le rapport acides aminés libres sur acides mainés totaux soit au moins égal à 20 %. Ceci nous a conduit à suivre l'évolution quantitative et qualitative des acides aminés, sur nos échantillons.

Lepierre et Mercier-Marques (1951, 1959) considèrent que seule l'action enzymatique est responsable de la maturation sans intervention de phénomène bactérien. Les conditions idéales seraient une température entre 15 et 20°C à un pH = 7. La trypsine aurait une action favorable. L'activité des enzymes de la chair serait sujette à de fortes variations, en fonction des saisons et de l'alimentation du poisson.

Certains auteurs considèrent que la maturation est atteinte pour un rapport minimum  $\frac{\text{azote non protéique}}{\text{azote total}}$  de 33 %. (Rapport FAO 1971).

Pour ce dernier point, l'étude des résultats d'analyses effectuées par les laboratoires de l'ISTPM, dans le cadre du contrôle de la fabrication des anchois, semble montrer que ce critère est insuffisant (fig. 9). En effet sur 48 échantillons 17 présentant des caractères médiocres ou non anchoités ont un rapport moyen  $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$  (azote non protéique) de 29 % avec 6 échantillons pour lesquels le rapport  $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$  azote total était supérieur à 33 %. 31 échantillons de caractère anchoité avaient un rapport moyen  $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$  de 36,7 %. 7 d'entre eux présentant un rapport  $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$  inférieur à 33 %.

Actuellement les principaux critères de fin de maturation sont les critères organoleptiques évalués par dégustation.

Notre étude, partant de ces différents résultats et des problèmes économiques actuels de l'industrie de l'anchois, sera orientée sur l'utilisation possible de la congélation. Suite aux travaux de F. Kabbaj, nous considérons que le phénomène de l'anchoitage est un phénomène complexe ou intervient protéolyse enzymatique et transformations bactériennes, vraisemblablement responsables de la saveur, de l'odeur et de la couleur.

Nous allons maintenant aborder l'exposé des travaux réalisés dans les laboratoires de l'ISTPM, avec en première partie le détail du plan de travail.

Caractères organoleptiques observés.

Saveur normale anchoitée		Caractères organoleptiques médiocres ou non anchoités	
Valeur de $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$ en %		Valeur de $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$ en %	
	37 % <u>31,7</u>		<u>33,13</u>
	38,22 35,5		24,13
	42,5 37,4		<u>49,94</u>
	<u>29,21</u> <u>30,5</u>		<u>37,72</u>
	47,8 42,5		43,1
	33,3 36		29,02
31 éch.	<u>26,7</u> 38	17 échant.	26,7
	35,8 <u>27</u>		<u>49,3</u>
	<u>43,17</u> <u>29,92</u>		17,6
	38,4 39,6		19,4
	<u>26,5</u> 48,6		25,9
	40,17 46,9		<u>38,5</u>
	36,9 36,9		10,7
	36,8 42,8		31,2
	35,1 <u>30,8</u>		17,2
	36,9		18,3
			21,15
	Valeur moyenne $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$ 36,7%		Valeur moyenne $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$ 29 %
	<u>Chiffres soulignés :</u> inférieurs à 33 %		supérieurs à 33 %

Fig. 9. - Pourcentage d'azote non protéique rapporté à l'azote total sur des semi-conserves d'anchois.  
Chiffres extraits des bulletins d'analyse et de contrôle de l'ISTPM sur 48 échantillons.

TRAVAIL de LABORATOIRE.I. Présentation du plan de travail.A. Données théoriques.

L'étude de F. Kabbaj ayant permis de mieux expliquer le phénomène de maturation, nous allons nous efforcer de confirmer ces résultats et de mettre en évidence les certaines différences biochimiques et microbiologiques pouvant éventuellement exister au cours de la maturation de la matière première fraîche et congelée. Pour être significative, l'étude sera faite sur des anchois de même origine et dans les mêmes conditions d'expérience. Parallèlement à cette étude comparative, nous effectuerons des essais de "réensemencement" d'échantillons congelés, par de la saumure prélevée sur des échantillons frais reconnus en cours de maturation. En effet, le processus de congélation a plusieurs influences sur le produit. Le but de ce traitement par le froid est de bloquer l'évolution de la dégradation enzymatique et microbiologique du produit. Le froid a une action directe par la température, et une action indirecte par fixation de l'eau du produit. L'eau libre, l'eau liée et l'eau de constitution sont fixées sous forme de glace. Cependant, la taille des cristaux varie avec les conditions de congélation et plus le phénomène sera long, plus la taille de ces cristaux sera importante, entraînant des lésions mécaniques des tissus, ainsi que l'éclatement des cellules. Un tel produit décongelé sera de moins bonne qualité qu'un produit ayant subi une congélation rapide.

D'autre part le blocage de l'activité enzymatique est accompagné d'une destruction partielle du potentiel enzymatique du produit. Cette destruction augmente avec les durées de stockage. Il en est de même pour les microorganismes, certains sont tués par l'action du froid, d'autres prennent des formes de résistance telles que les spores. Mais de toutes façons la population bactérienne est modifiée qualitativement.

L'ensemble complexe du phénomène de congélation implique qu'il existera d'importantes différences entre une matière première fraîche et une autre congelée, qui pourront modifier le processus de maturation.

Nous suivrons donc comparativement la maturation d'un échantillon frais et d'un échantillon ayant subi la congélation. Nous étudierons essentiellement l'activité de la protéolyse et de la croissance bactérienne, une étude plus complète de la maturation dans des conditions "normales" ayant été réalisée par F. Kabbaj.

D'autre part en posant l'hypothèse d'une diminution de l'aptitude à la maturation de l'anchois congelé, nous réaliserons l'ensemencement d'échantillons congelés avec de la saumure prélevée sur des anchois frais en cours de maturation. Lors de la maturation on constate un transfert d'enzymes protéolytiques de la chair dans la saumure. L'activité enzymatique y sera maximum au bout de quelques semaines puis diminuera rapidement (F. Alm). De même l'activité microbienne dans la saumure atteint un maximum dans un délai de quelques semaines pour rester stationnaire puis décroître (F. Kabbaj). Ces données devraient permettre de déterminer le moment supposé optimum pour effectuer le réensemencement.

#### B. Matière première et préparation des échantillons.

Pour que les résultats puissent être significatifs, il était indispensable que les échantillons soient de même origine et placés en maturation dans les mêmes conditions. Pour cela les barils ont été tous préparés par les "Conserveries et Conditionnement de l'Océan" à Hendaye avec du poisson provenant d'une même pêche. Le moule moyen était de 45 au kilo. Compte tenu du rendement de fabrication du poisson salé à partir de matière première fraîche nous avons prévu la préparation de 12 barils de 30 kg (étêtés, vidés) à partir de 500 kg de poisson. Quatre barils ont été préparés dès le retour de pêche, le reste du poisson ayant été congelé en l'état et stocké par l'entreprise "FRAYSSENGEAS" à Saint Jean de Luz. Les anchois ont été congelés individuellement dans un tunnel à azote liquide CRYO QUICK. Les conditions ont été les suivantes :

Tunnel	(T° entrée	- 100°C
	(T° sortie	- 95°C
Anchois	(T° entrée	15°C (température à coeur)
	(T° sortie	- 37°C

Le temps de passage sous azote était de 14 mn. Le poisson a ensuite été conditionné en cartons de 10 kg, et stocké en chambre froide régulée à - 25°C. Les conditions de congélation semblent donc avoir été les meilleures pour ce type de produit de faible volume.



Le plan de mise en maturation des échantillons est exposé sur le tableau 10. Les 12 échantillons ont été placés dans les mêmes conditions de maturation à l'ISTPM. Pour cela nous avons utilisé une chambre à température régulée à 20°C. Le pressage a été identique pour tous les échantillons. Pendant le 1er mois de maturation nous avons appliqué un pressage de 23 g/cm<sup>2</sup> soit 16 kg puis pour le reste de la maturation un pressage de 140 g/cm<sup>2</sup> soit 98 kg, ces conditions étant considérées comme les meilleures (Baldrati).

### C. Plan d'analyse.

Nous nous sommes attachés essentiellement à suivre l'évolution de la protéolyse et du dénombrement bactérien. Cette étude a été complétée par des tests organoleptiques.

Biochimiquement, nous avons analysé les teneurs en azote total et non protéique sur le poisson et la saumure. Sur le poisson nous doserons également l'azote volatil total et la triméthylamine pour contrôler le bon déroulement de la maturation. L'apparition de teneurs anormales en ABVT et TMA seront le signe d'une altération bien que peu probable dans un milieu salé à 20 % donc très sélectif.

Tous les mois nous ferons sur la chair une chromatographie d'éluion permettant de déterminer quantitativement et qualitativement la teneur en acides aminés totaux et libres. Les protocoles d'analyse sont détaillés en annexe.

## II. Etude comparée de la maturation de l'anchois frais et de l'anchois congelé.

Les échantillons frais et congelés ont été placés en maturation avec un mois de décalage, le poisson congelé étant resté un mois en stockage à - 25°C. La décongélation a été faite à l'air libre et les barils ont été préparés dans les mêmes conditions que les échantillons frais. Sur tous les graphes, les temps de maturation ont été reportés à une même origine.

### A. Variation du taux d'humidité.

Lors du salage du poisson nous assistons à une diminution du taux d'humidité de la chair. Cette modification est due au transfert de l'eau du poisson dans la saumure. Parallèlement il y a transfert de sel dans la

Echantillon	Code	nbre d'éch. de 30 kg	Temps de stockage à - 25°C	Date de mise en maturation	Date de "réensemencement"
FRAIS	F	4	/	21 avril	/
CONGELE	Témoin Tc	2	4 semaines	22 mai	/
	I	2	4 semaines	22 mai	5.06
	II	2	6 semaines	5 juin	26.06
	III	2	8 semaines	19 juin	10.07

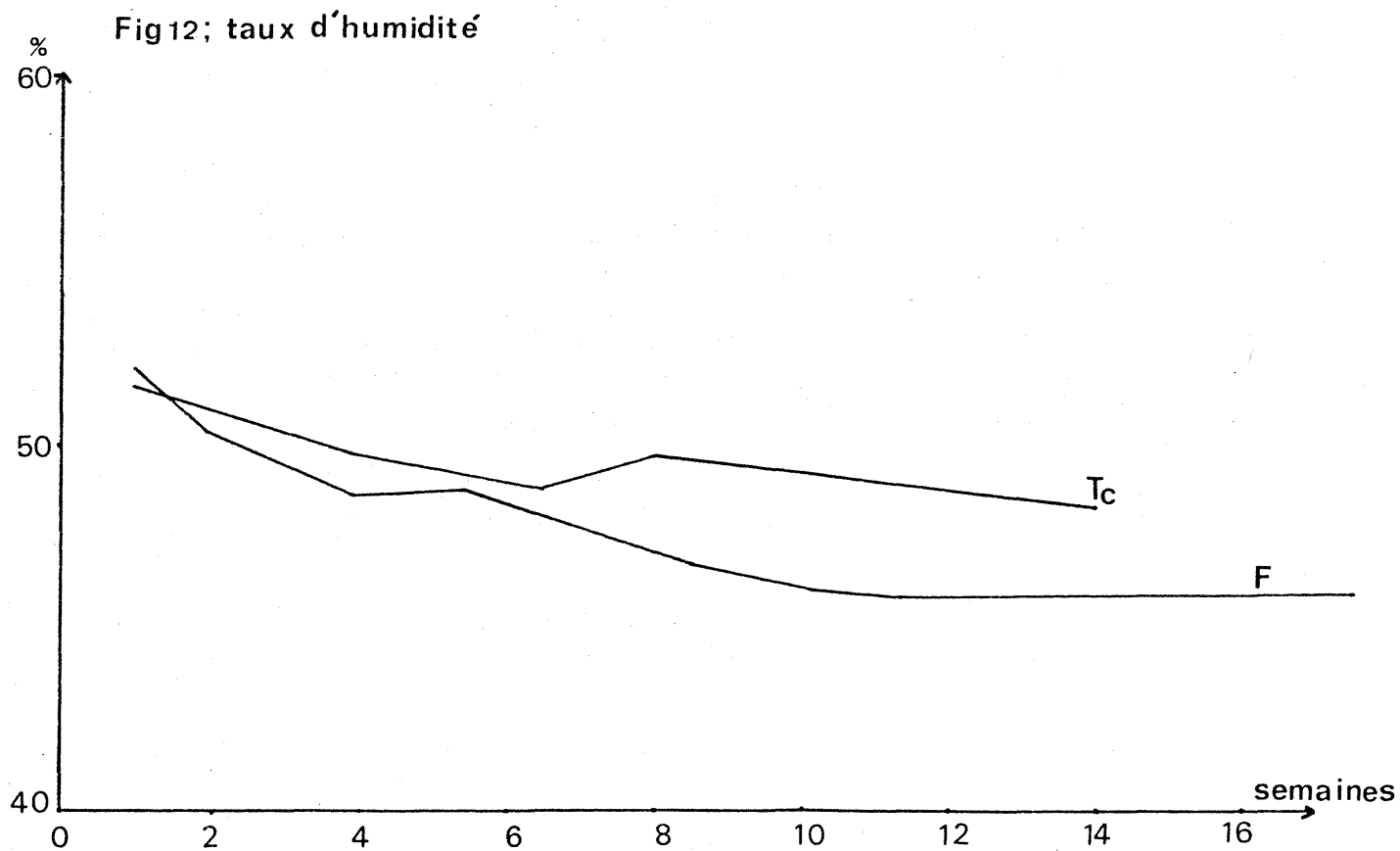
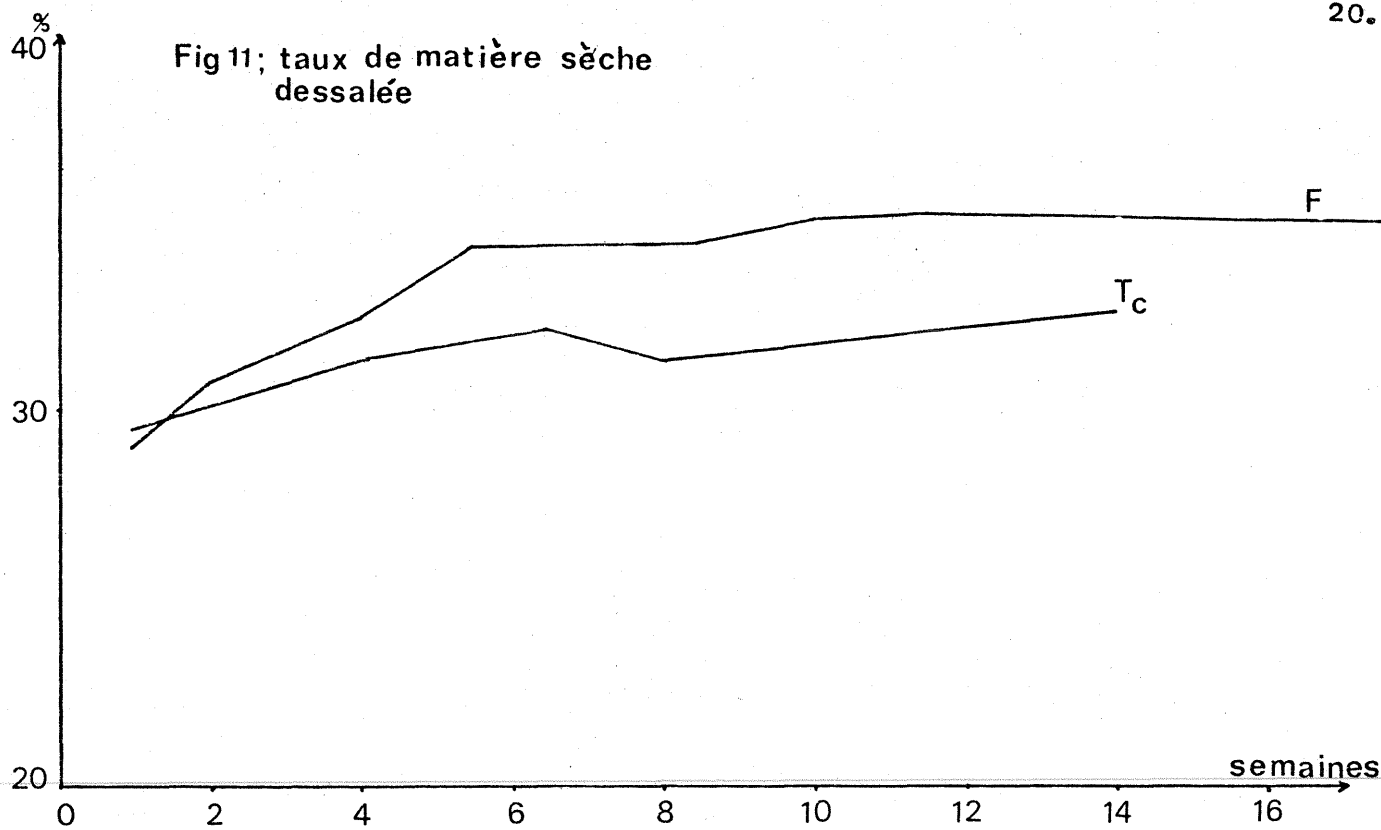
Tableau 10. Plan de travail.

chair, très rapide durant les premières 24 heures (F. Kabbaj) il se stabilise à une teneur moyenne en NaCl de 19 %. Pour des raisons pratiques les prélèvements n'ont pu être commencés qu'une semaine après le début de la maturation.

Sur les figures 11 et 12 nous notons un taux d'humidité légèrement plus important sur l'échantillon frais, puis une inversion très rapide au profit du congelé. Les variations se font sur une fourchette d'environ 6 % et l'on constate que, sur les deux échantillons, après un délai de maturation de 4 à 5 semaines, l'évolution du taux de matière sèche dessalée (MD 0) se stabilise à des niveaux parallèles avec un écart de 2 %.

On peut poser comme hypothèse l'explication suivante : lors de la congélation, par suite de la formation de cristaux de glace, il y a une dégradation physique partielle de la structure tissulaire entraînant l'exsudation d'eau lors de la décongélation, d'où un taux d'humidité initial plus faible sur les échantillons congelés que sur les frais. En revanche au cours des 5 premières semaines de maturation, la structure tissulaire partiellement dégradée de l'échantillon congelé, permet une meilleure pénétration des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ . Ils vont se solvater avec l'eau d'hydratation des protéines qui coagulent, pour passer sous forme de solution saline concentrée (Fr. Del Valle, J.R. Nickerson). Il va en résulter, à l'analyse, un taux d'humidité plus important sur l'échantillon congelé, mais également une augmentation de la dureté de la chair, que nous avons pu constater à la dégustation.

Sur la figure 12 nous observons que le taux d'humidité est plus faible sur l'échantillon frais, cela pourrait être dû à un meilleur état physique des fibres musculaires ; à la dégustation, la chair semble moins "sèche" que celle de l'échantillon congelé.



## B. Etude biochimique.

Les prélèvements ont été faits le jour même des manipulations, et ont été entreposés à 0°C entre les différents tests. Il a été prélevé environ 50 cc de saumure et 4 à 5 anchois qui ont été broyés jusqu'à obtention d'une pâte homogène après mise en filets.

### 1. Evolution de la matière azotée.

Nous avons suivi la protéolyse par l'évolution de la teneur en azote non protéique (NPN) rapportée à l'azote total (NT). Les dosages ont été faits par la méthode de Kjeldahl. Les résultats ont été établis par rapport à la matière humide (M H) et par rapport à la matière sèche dessalée (M S D) en tenant compte d'un pourcentage moyen de NaCl de 19 % (F. Kabbaj).

Au vu des résultats figurant sur les graphes 13, 14, 15, 16, nous pouvons constater que le fait de congeler le poisson provoque un ralentissement de la protéolyse.

Sur la figure 15 la valeur élevée du rapport NPN/NT pour le poisson frais est vraisemblablement due à une erreur de manipulation.

D'autre part nous constatons que la production d'azote non protéique, atteint rapidement un palier (8 à 10 semaines) bien que les caractéristiques organoleptiques de l'anchoitage ne soient pas encore perceptibles sur le poisson congelé et très faibles sur le poisson frais.

Il semble donc que le critère biochimique du rapport NPN/NT ne puisse être retenu comme critère absolu d'anchoitage.

Sur la figure 17, les résultats des dosages de l'azote basique volatil total (A B V T) et de la triméthylamine (T M A) rapportés à l'azote total confirment le blocage par le sel de l'altération due aux germes putréfiants.

L'efficacité du salage quant à la putréfaction est identique dans le cas du poisson frais et du poisson congelé. Seule une légère augmentation de l'A B V T, qui atteint rapidement un palier est peut-être imputable à l'activité de bactéries fermentaires sélectionnées par la congélation.

## 2. Evolution de la teneur en acides aminés.

Une étude précédente faite par Baldrati, Guidi et Pirazzoli a mis en évidence l'intérêt de suivre l'évolution qualitative et quantitative des acides aminés libres et totaux. Nous avons effectué une étude similaire sur nos échantillons.

### a) Principe et techniques.

Le principe général d'analyse est une chromatographie d'élution en phase liquide. L'extraction des acides aminés totaux se fait à chaud par hydrolyse par HCl, et l'extraction des acides aminés libres à froid par l'éthanol à 82°. Les protocoles d'analyse sont exposés en annexe.

Nous avons utilisé la technique chromatographique de Moore et Stein (1958). Sur un analyseur Phoenix les échantillons d'acides aminés remis dans une solution tampon de PH connu, sont passé à travers une colonne de résine échangeuse d'ions de caractéristiques suivantes :

- . résine sphérique PHOENIX pour les acides aminés acides et neutre (hauteur : 60 cm, diamètre intérieur : 0,9 cm) ;

- . résine sphérique AMINEX A 5 de BIO-RAD pour les aminoacides basiques (hauteur : 10 cm, diamètre intérieur : 0,6 cm).

Fig13: taux d'azote total et non protéique rapportés à la matière humide

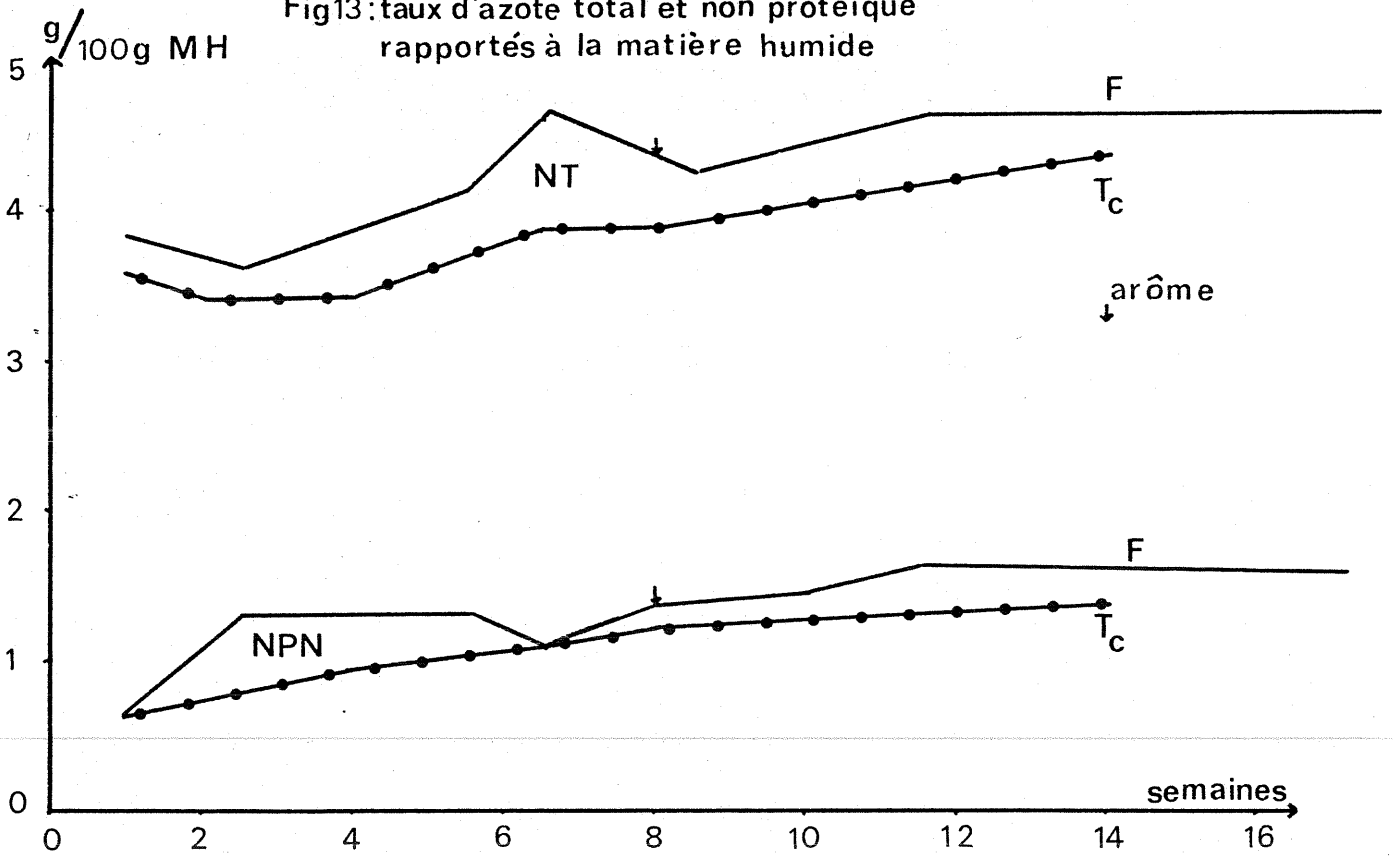


Fig14; taux d'azote total et non protéique rapportés à la matière sèche dessalée

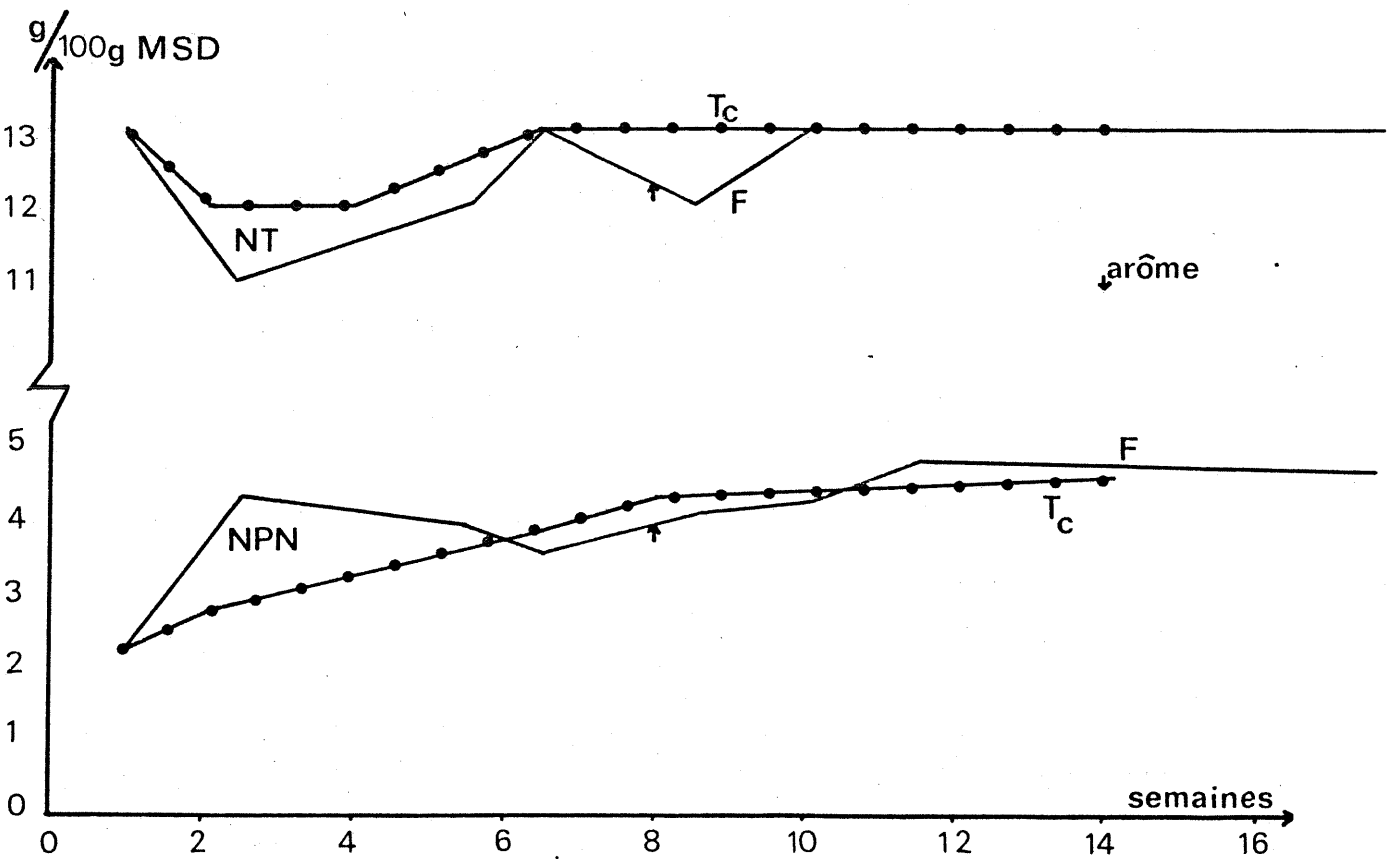


Fig15; taux d'azote non protéique rapporté à l'azote total

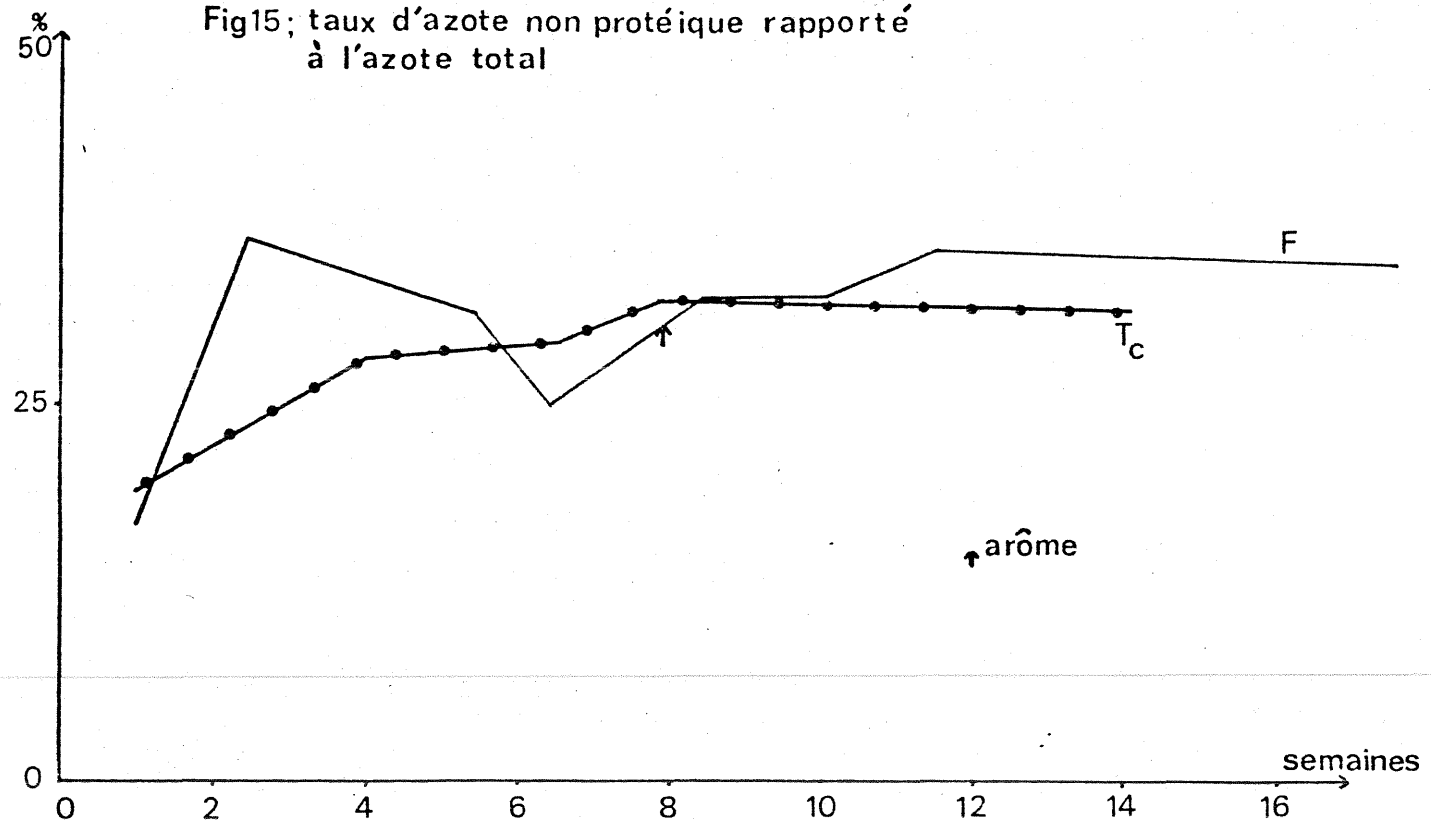


Fig16; taux d'azote total dans la saumure

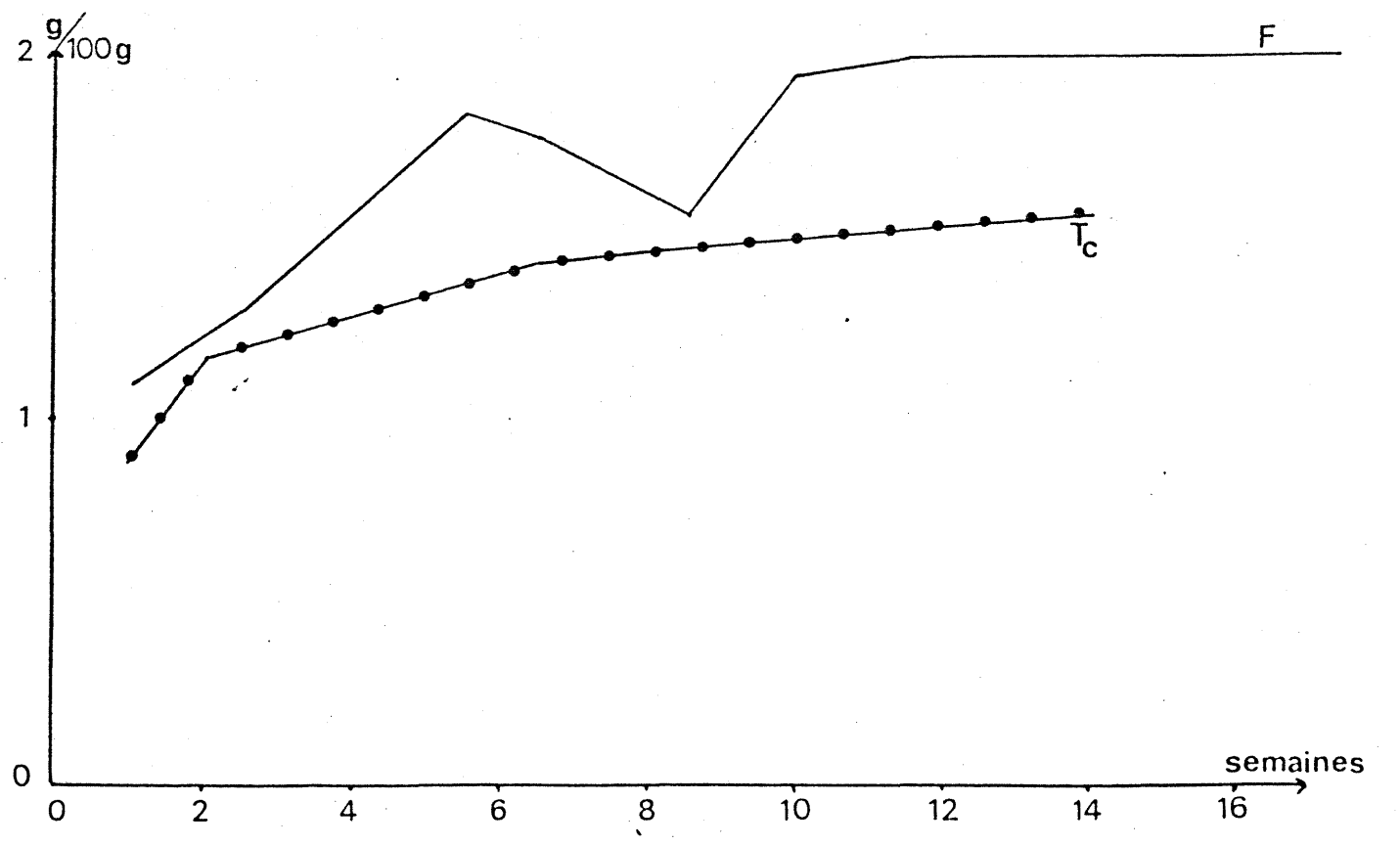
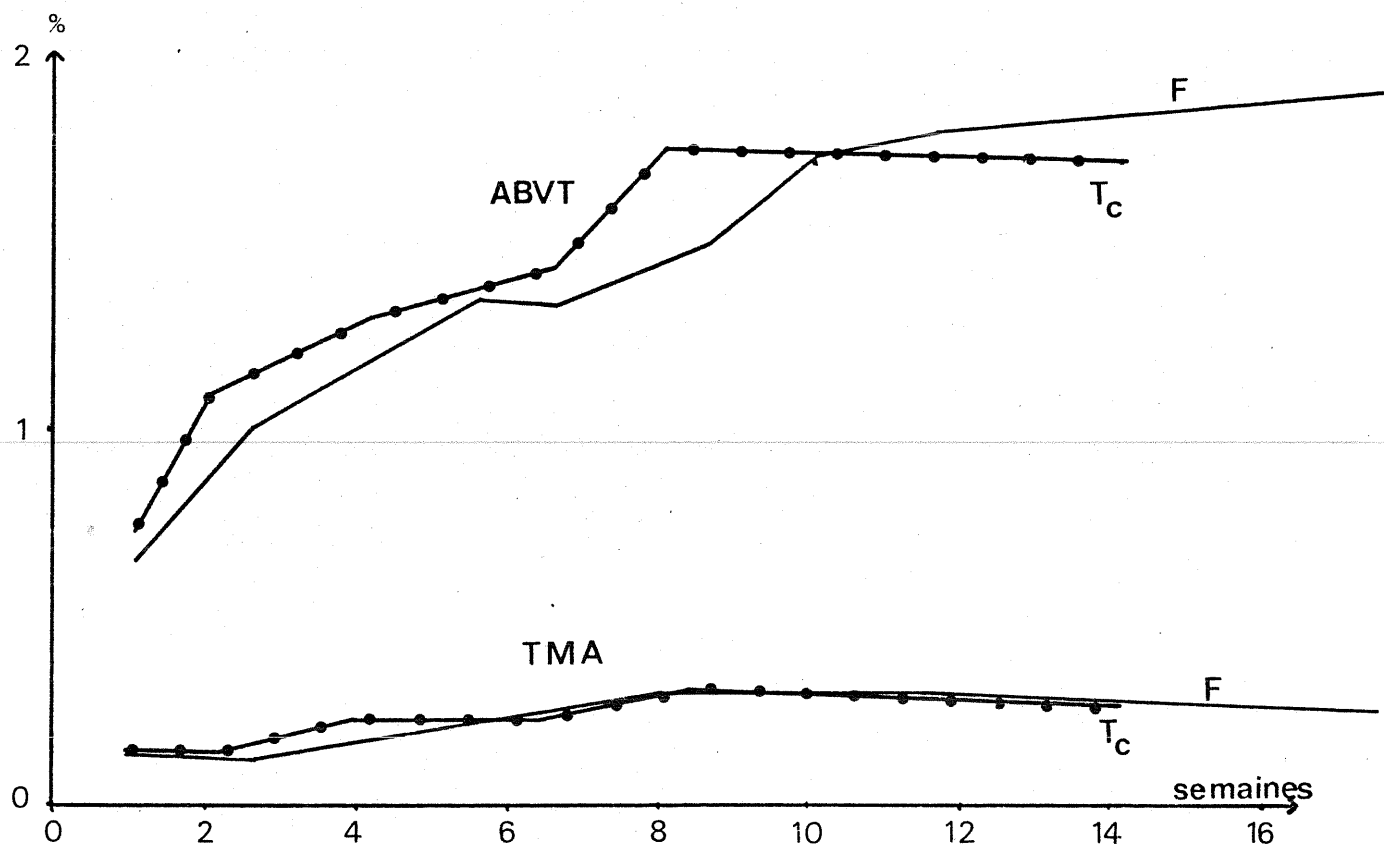




Fig 17 taux d'azote volatil et d'amines tertiaires volatiles rapportés à l'azote total



La colonne est équilibrée par une solution tampon identique à celle utilisée pour la dilution des acides aminés, de telle manière que le pH et la force ionique du tampon permettent la fixation sur la résine de la plupart des composés.

Il s'établit un équilibre entre les groupes actifs de la résine, les ions du tampon et les groupes ionisables des constituants du mélange.

L'élution des acides aminés se fait par modification du pH et de la force ionique du tampon à température constante.

Pour les acides aminés totaux, acides et neutres, l'élution se fait à 55°C à un débit de 60 ml/h. Une solution tampon de force ionique 0,2 à pH 3,25 est utilisée pendant les 105 premières minutes, puis une solution tampon de force ionique 0,2 à pH 4,25 pour le reste de l'analyse.

Pour les acides aminés totaux basiques, le passage se fait à un débit de 60 ml/h et à 55°C. L'élution se fait au moyen d'un seul tampon de pH 5,28 et de force ionique 0,35.

L'analyse des acides et neutres d'une part et des basiques d'autre part constitue deux opérations différentes.

Dans le cas des acides aminés libres, acides et neutres, le protocole est un peu différent. L'analyse est effectuée sur une colonne de 60 cm avec un débit de 50 ml/h, la résine étant la même.

Les solutions tampon sont les mêmes que pour les acides aminés totaux, cependant le changement intervient au bout de 180 mn et la température sera modifiée.

Pendant les 120 premières minutes elle est de 30°C puis 55°C pour le reste de l'analyse. Ceci permet la séparation des acides aminés aux pouvoirs de rétention les plus faibles.

Pour les acides aminés libres basiques, le protocole est identique à celui des acides aminés totaux basiques.

Les acides aminés sont ensuite dosés qualitativement et quantitativement par méthode colorimétrique après réaction avec la ninhydrine.

Cette opération se fait automatiquement à deux longueurs d'ondes (fig. 18 et 19) : 570 nm pour la majorité des acides aminés (tracé A) et 440 nm pour la proline -(tracé B). Le tracé C correspond à une atténuation d'amplitude pour les pics les plus grands, à une longueur d'onde de 570 nm.

La détermination des acides aminés se fait par comparaison avec une solution témoin, de composition connue quantitativement et qualitativement, élevée dans les mêmes conditions.

Nous pouvons doser par cette méthode les acides aminés suivants :

acides	neutres	basiques
Ac. Aspartique	Alanine	Lysine
Thréonine	Valine	Histidine
Sérine	Méthionine	Arginine
Ac. Glutamique	Isoleucine	
	Tyrosine	
	Phénylalanine	
	Glycine	
	Proline	

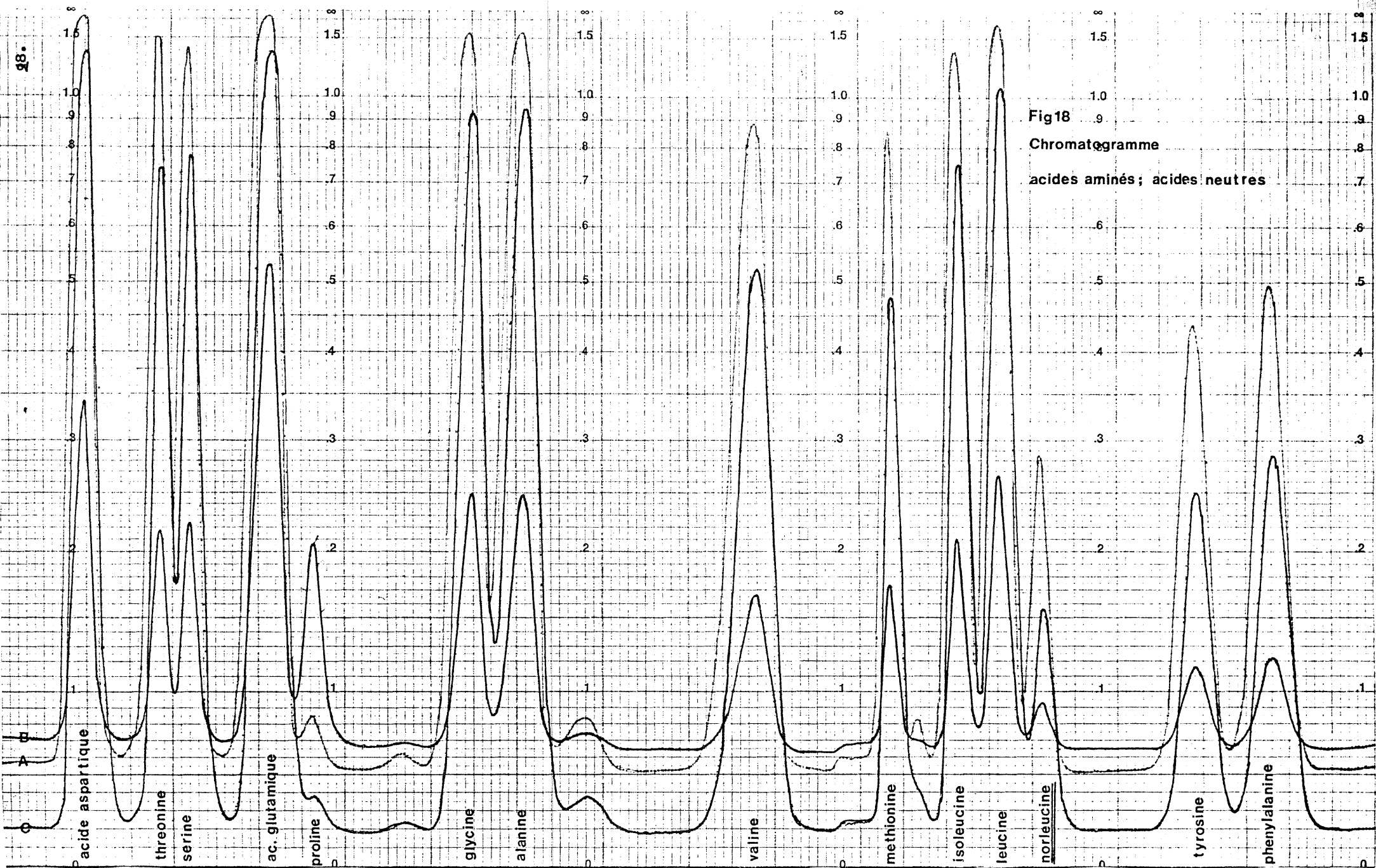
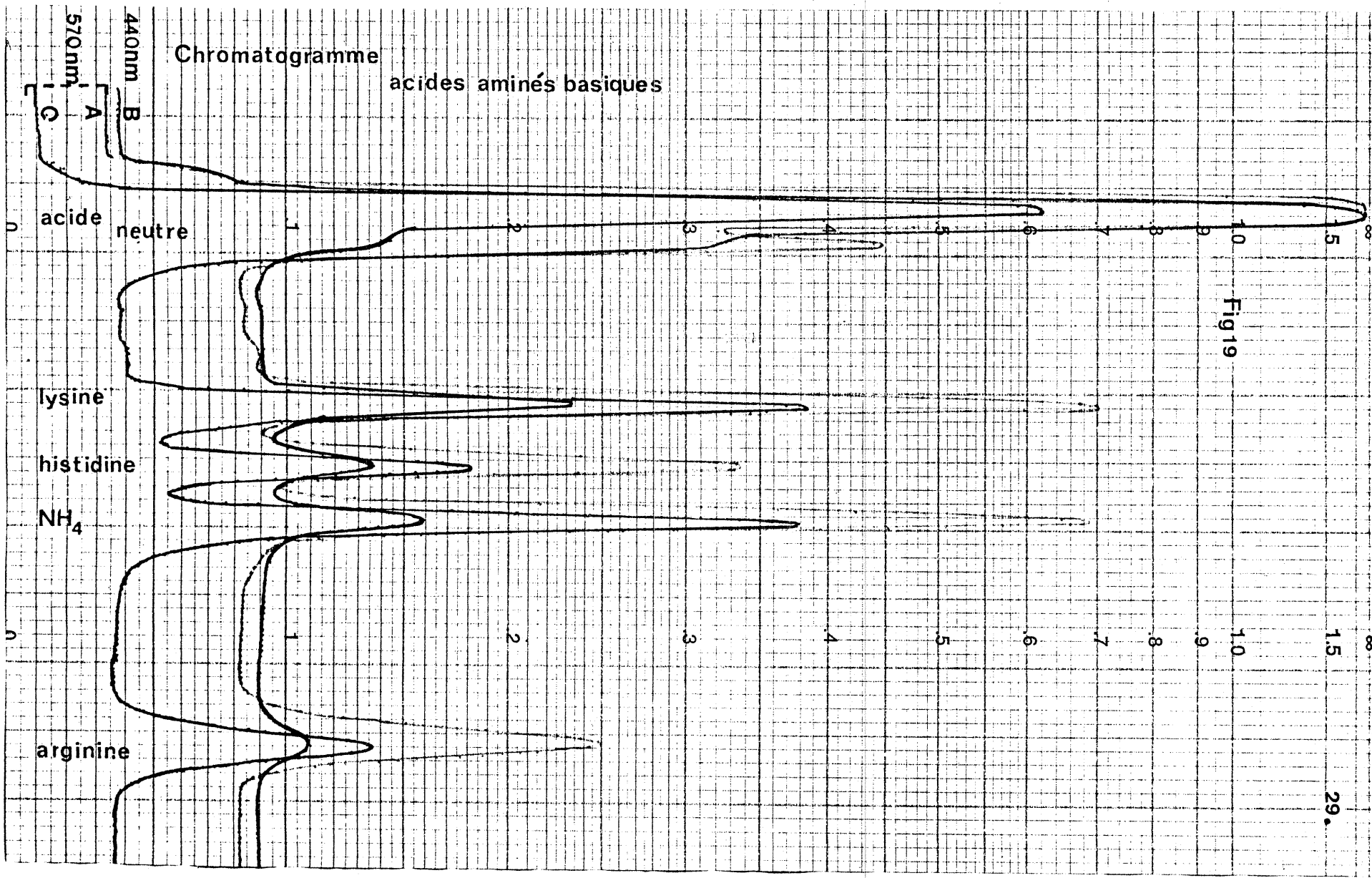


Fig 18  
Chromatogramme  
acides aminés ; acides neutres



Comme exemple de chromatogramme nous pouvons prendre la première analyse de l'échantillon frais.

Sur la figure 18 nous avons le chromatogramme des acides aminés acides et neutres. Le coefficient de récupération des acides aminés et le dosage quantitatif est donné par le taux de récupération d'une quantité connue de norleucine, introduite en début de phase d'extraction des acides aminés.

Nous constatons que la proline n'apparaît distinctement que pour la lecture à 440 nm, de même nous voyons la présence probable de méthylsulfoxyde provenant de l'oxydation de la méthionine.

Sur le chromatogramme des acides aminés totaux basiques (fig. 19) nous constatons que les acides aminés et neutres sortent groupés en premier et on note la présence de  $\text{NH}_4$  provenant de la dégradation des acides aminés.

#### b) Interprétation des résultats.

En suivant l'évolution du pourcentage des acides aminés libres par rapport aux acides aminés totaux (fig. 20) nous constatons que même pour l'échantillon frais nous n'atteignons pas les 20 % qui seraient le critère de fin de maturation (Baldrati), alors que le rapport NPN/NT est supérieur à 33 % au bout de huit semaines.

Un examen organoleptique nous montre qu'effectivement les échantillons ne sont pas "mûrs".

Il est à noter que la tendance générale d'évolution est moins rapide pour l'échantillon frais que pour l'échantillon congelé.

Sur la figure 21, il apparaît que durant la protéolyse les acides aminés libres acides sont libérés plus rapidement que les basiques (observation déjà faite par KIESVAARA) avec une décroissance rapide en début de maturation puis stabilisation.

Il apparaît également que le poisson frais évolue plus rapidement que le congelé bien que sur la figure 22, la quantité d'acides aminés libres, libérée par 100 g de matière sèche dessalée soit sensiblement voisine pour le frais et le congelé.

Il est à noter également que la quantité d'histidine dosée sur les acides aminés libres est plus faible que pour les autres acides aminés.

Cette perte est probablement due à un phénomène de décarboxylation (Baldrati).

Au vu de ces résultats, l'étude de la variation du rapport  $\frac{\text{acides aminés libres}}{\text{acides aminés totaux}}$  pourrait éventuellement être un critère de maturation, cependant il faudrait pouvoir confirmer ces résultats par un plus grand nombre d'analyses.

Fig20; taux d'acides aminés libres rapporté aux acides aminés totaux

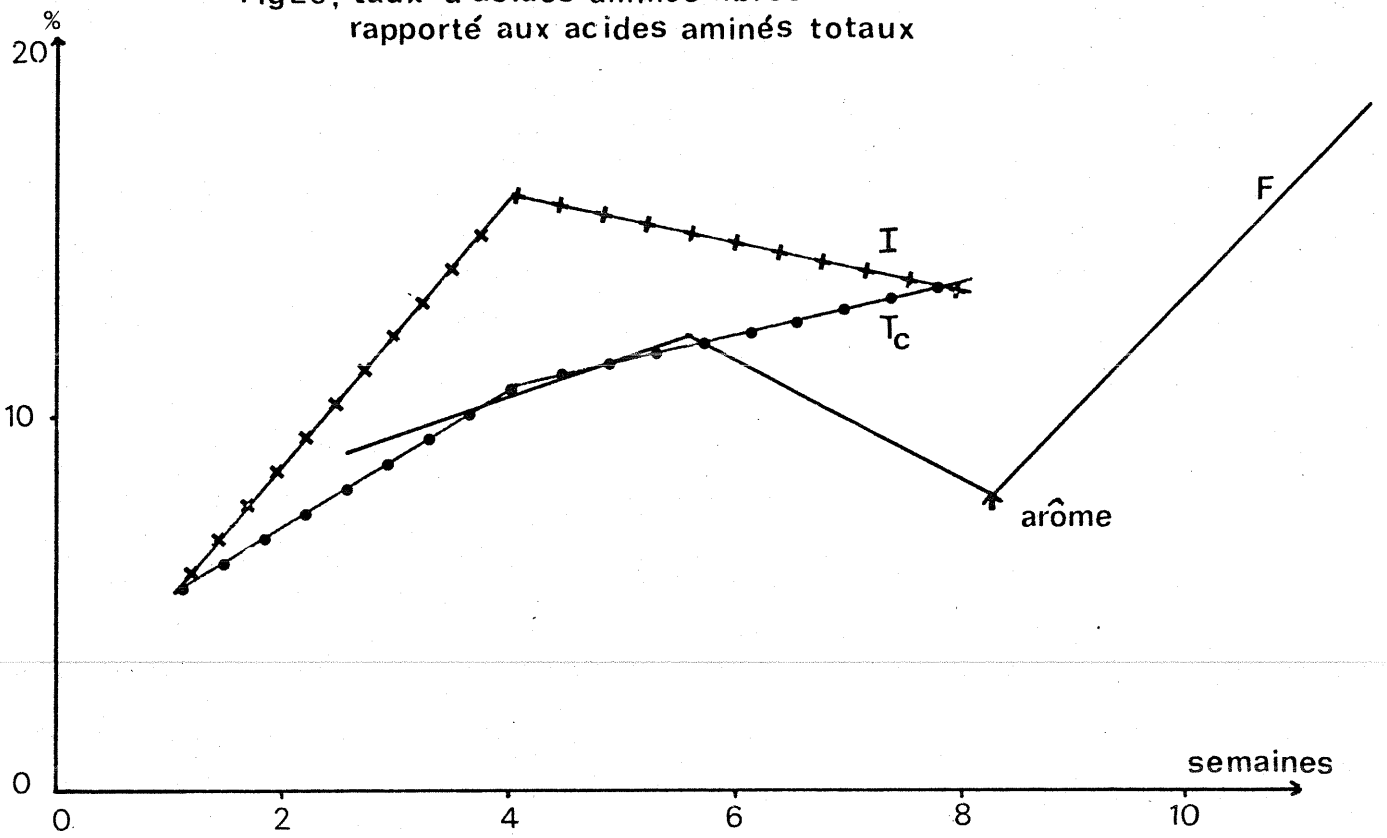


Fig21; rapport acides aminés libres

acides /  
basiques

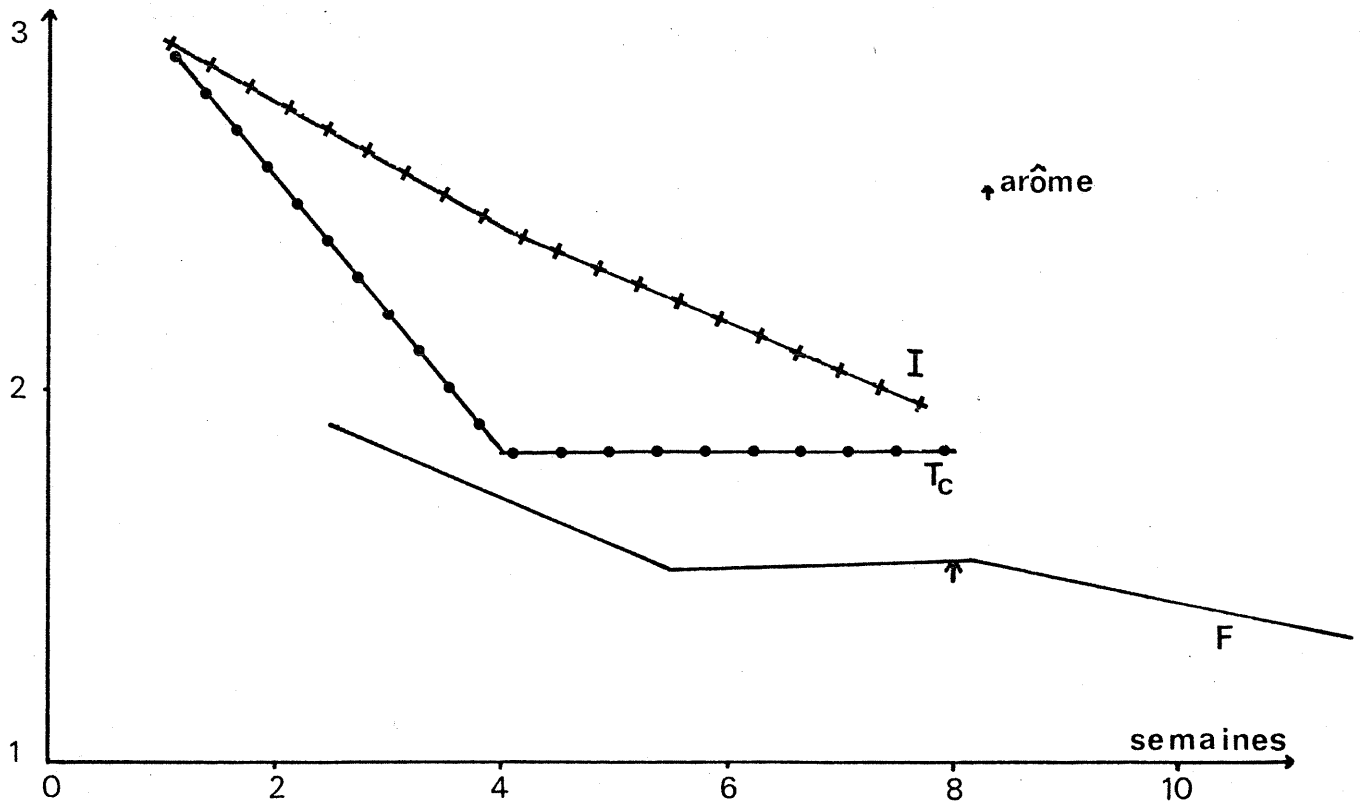
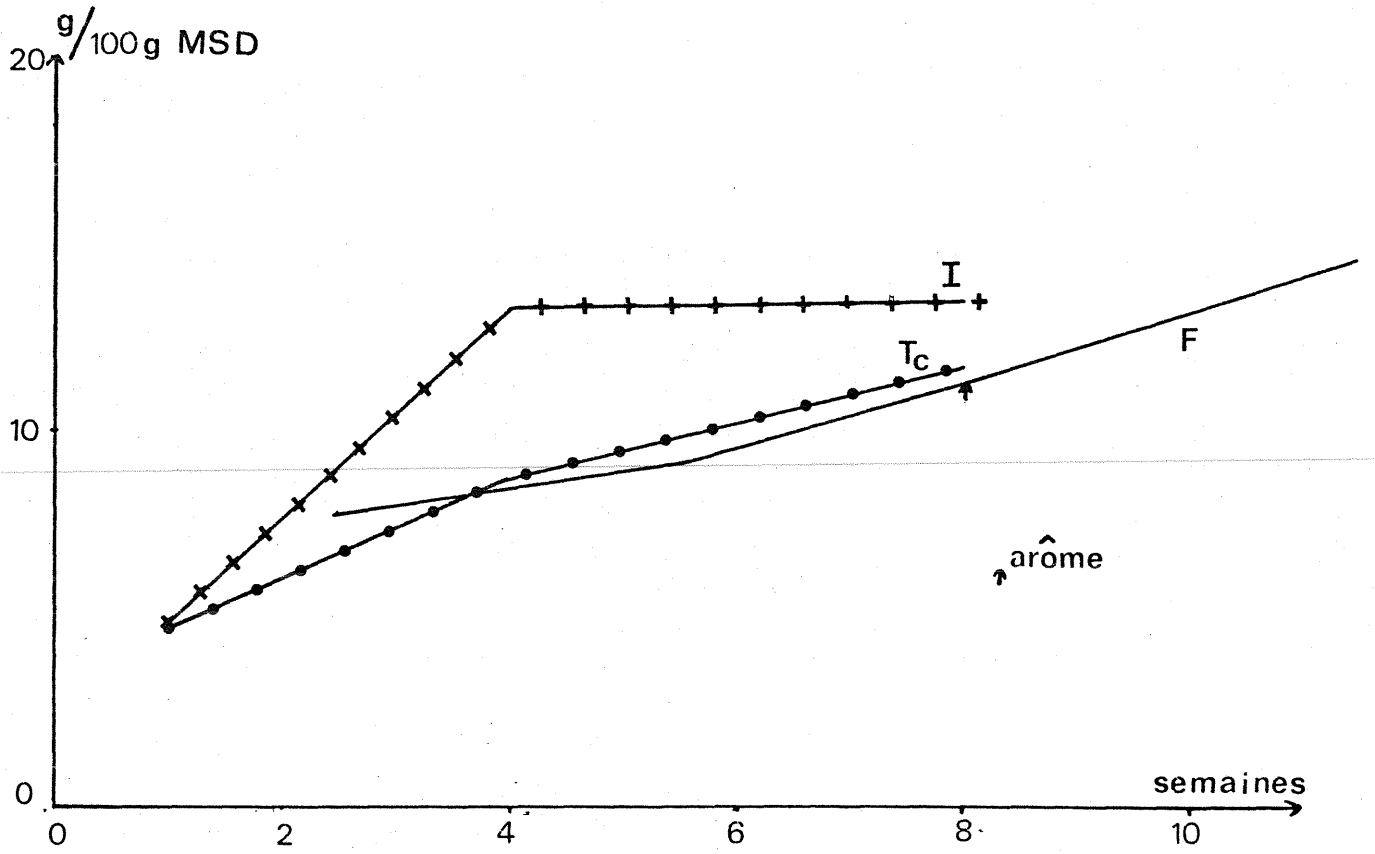




Fig 22; acides aminés libres



### C. Etude microbiologique.

#### 1. Données bibliographiques.

Le salage du poisson agit avant tout comme élément de conservation. On assiste à une diminution de l'activité microbienne provoquée par l'accroissement de la pression osmotique et la dessiccation des tissus.

D'autre part nous avons une action directe du sel sur les germes putréfiants. Il existe cependant un certain nombre de germes dont la croissance peut être compatible avec la présence de sel.

Ces germes proviennent d'une part de la microflore du sel et de celle du poisson, d'autre part de la contamination extérieure. Ils peuvent être classés en trois groupes (Shewan, Hansen).

- germes halophiles (pathogènes et putréfiants) dont la croissance est bloquée pour une concentration en sel supérieure à 6 %.
- germes halotolérants, tels les sporulants, les micrococccis et quelques anaérobies qui peuvent supporter des concentrations en sel de 6 % à saturation.
- germes halophiles, qui ont besoin pour se développer d'une concentration minimum en sel de 2 %.

Des germes de ces deux derniers groupes pourraient être responsables de certaines saveurs du poisson saumuré ainsi que d'une augmentation de l'activité enzymatique tissulaire (Hansen). La température optimale de développement serait de 37°C pour un pH de 6 à 10.

Plus spécifiquement, F. Kabbaj a mis en évidence un phénomène de développement bactérien important, lors de la maturation de l'anchois, dans la chair et la saumure. Ce développement serait lié à l'anchoitage et participerait à l'apparition des caractères d'odeur, de couleur et de goût "anchoité".

## 2. Schéma expérimental.

Pour rester proche des conditions de maturation, nous avons utilisé des milieux salés à 20 % et l'incubation des souches a été faite à la même température de 20°C, où étaient entreposés les barils. Les dénombrements ont été pratiqués sur la chair et la saumure, en milieu liquide, par la méthode de Mac Grady.

A chaque prélèvement, 20 g de chair et 20 g de saumure ont été broyés respectivement avec 80 ml d'eau peptonée, salée à 20 %. Les dilutions ultérieures ont été effectuées, dans du bouillon nutritif également salé à 20 %.

Les isolements ont été réalisés par ensemencement en surface à la pipette à boule, sur milieu de Penso, à partir de la dilution  $\bar{1}$ . Les techniques et les compositions de milieu sont données en annexe.

## 3. Résultats.

Nous avons pu constater l'existence d'un développement bactérien important, ce qui confirme les travaux de F. Kabbaj. Cependant, il semble que la méthode de Mac Grady n'ait pas été bien appropriée, tant par le choix du milieu que par le principe du dénombrement en milieu liquide.

Sur le tableau 1 de la page suivante, nous pouvons constater l'existence d'une croissance bactérienne importante dans la chair et la saumure.

D'autre part, à la suite d'isolement en milieux solides, après observation microscopique et coloration de Gram, nous avons pu mettre en évidence la présence de Cocci Gram<sup>+</sup> ainsi que de batonnets Gram<sup>-</sup>, fins et longs pouvant être du genre Pseudomonas, ainsi que d'autres courts et épais pouvant être du genre Bacillus.

Temps de maturation en semaine		1	3	6	7	10
N° échantil.						
F	chair	1 250	12 500	30 000	125 000	650 000
	saumure	3 000	125 000	12 500	60 000	1 000 000
Tc	chair	12 500	12 500	5 500 000		
	saumure	6 500	125 000	3 500 000		
I	chair	12 500	300 000	3 500 000		
	saumure	3 000	300 000	1 250 000		

Tableau 1. Nombre de germes probables par gramme d'échantillon.

Cette activité bactérienne était très voisine sur les échantillons frais et décongelés, bien qu'il semble que le démarrage de la croissance bactérienne soit beaucoup plus important sur l'échantillon décongelé. En effet la congélation a créé une sélection des germes, et seuls les types résistants tels que les sporulants ont pu se développer après décongélation dans un milieu où la concurrence était très réduite.

Ceci se traduit par le phénomène d'explosion bactérienne. Cependant une étude bactériologique plus approfondie, après identification sur des échantillons congelés serait intéressante.

### III. Etude de l'influence du réensemencement.

#### A. Principe.

En ayant émis l'hypothèse d'un ralentissement de la maturation due à la congélation, nous avons pratiqué un "réensemencement" des échantillons congelés à partir de saumure prélevée sur des échantillons frais. En effet, lors de la maturation normale d'un échantillon, une partie du potentiel enzymatique et bactérien est présente dans la saumure et pourrait éventuellement pallier les pertes dues à la congélation et au stockage.

Nous avons remplacé toute la saumure d'un échantillon décongelé puis salé par de la saumure prélevée sur un échantillon frais en cours de maturation normale.

Pour que les anchois décongelés puissent être bien imprégnés de saumure, les poissons furent entièrement retirés des barils puis, après avoir mis la nouvelle saumure, on les y replaça comme pour un salage ordinaire.

Les périodes de réensemencements ont été déterminées d'après les travaux de F. Kabbaj. Sur un échantillon mûrissant normalement, la croissance bactérienne atteint son maximum au bout d'environ 8 semaines

et coïncide avec l'apparition de l'arôme. Nous avons donc utilisé pour l'échantillon I une saumure de 6 semaines prélevée dans la phase de croissance bactérienne logarithmique, puis une saumure de 8 semaines pour l'échantillon II et de 10 semaines (phase stationnaire) pour l'échantillon III.

Les changements de saumure ont été pratiqués 16 jours à 3 semaines après le début de mise en maturation des barils I, II et III.

Le protocole d'étude est le même que pour l'étude comparative des échantillons frais et congelés.

#### B. Variation du taux de matière sèche dessalée.

Si nous comparons les échantillons réensemencés avec les échantillons F et Tc (fig. 23, 24, 25), nous constatons que les variations du taux de matière sèche dessalée (M S D) ne sont pas identiques pour les échantillons I, II et III.

L'échantillon I (fig. 23) a une évolution de son taux de M S D sensiblement identique à l'échantillon Tc. En revanche les échantillons II (fig. 24) et III (fig. 25) ont des pourcentages de M S D supérieurs à celui de Tc.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences. Il est tout d'abord vraisemblable que les temps de stockage plus importants à  $-25^{\circ}\text{C}$  des échantillons II et III soient responsables d'une dessiccation plus forte. La différence est moins sensible entre les échantillons I et Tc.

D'autre part cette perte d'humidité sur les échantillons II et III a pu se produire à la décongélation. En effet lors du stockage à  $-25^{\circ}\text{C}$ , parallèlement à la dénaturation physique des tissus, la protéolyse enzymatique se poursuit au ralenti. Ce phénomène pourrait donc diminuer les possibilités de rétention d'eau et être responsable d'une exsudation plus importante à la décongélation.

## Taux de matière sèche dessalée;

Fig23

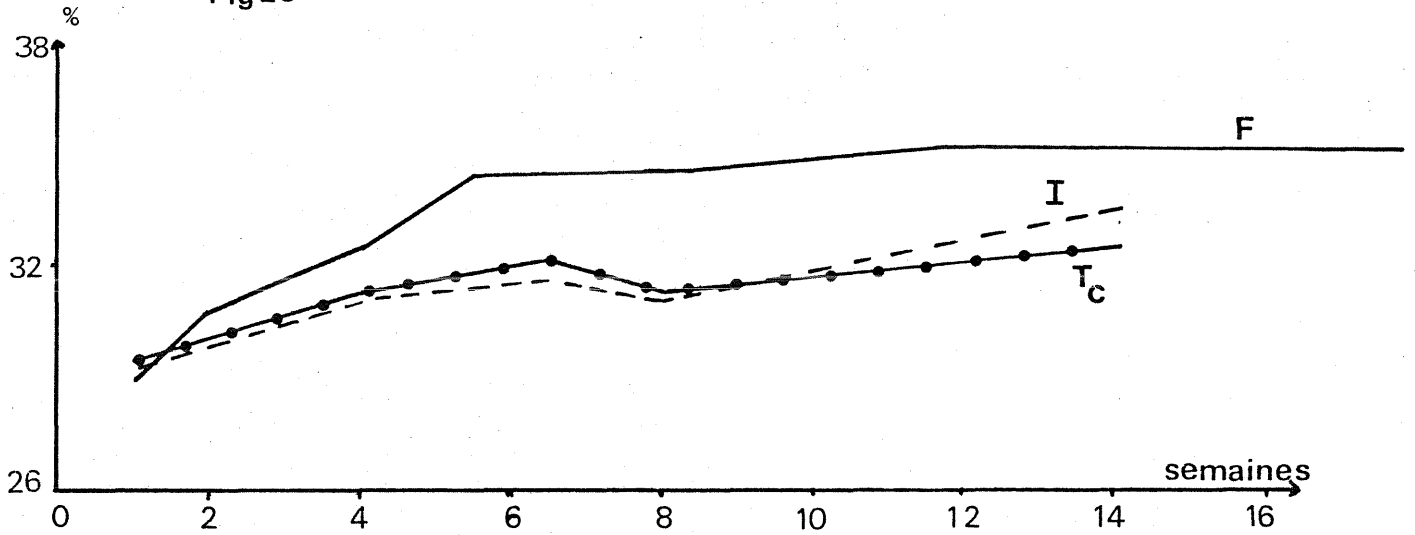


Fig24

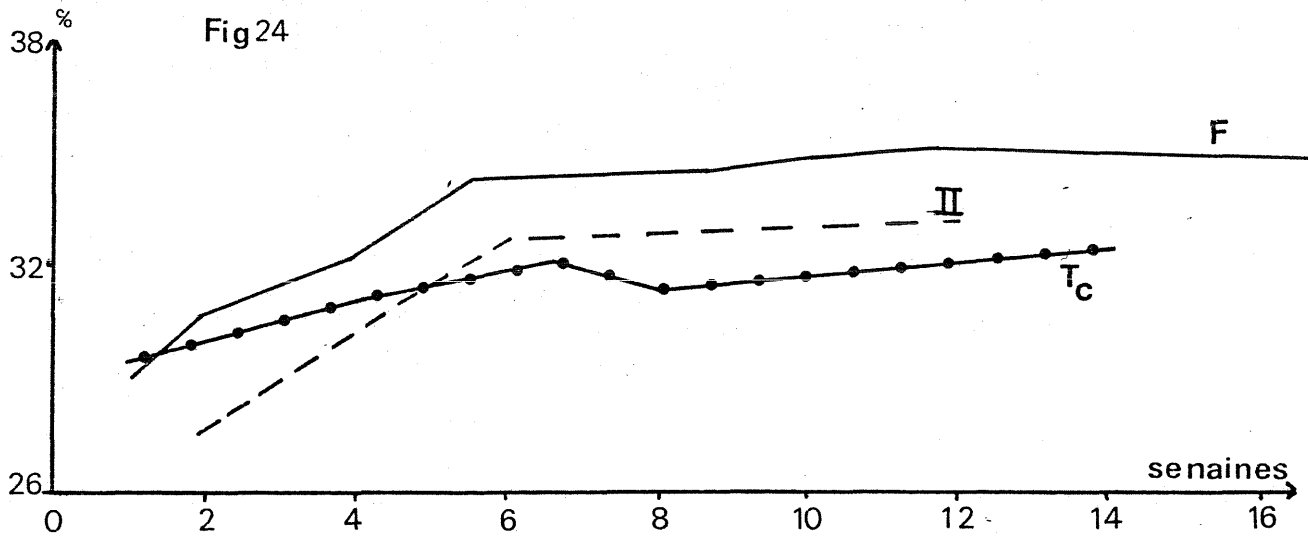
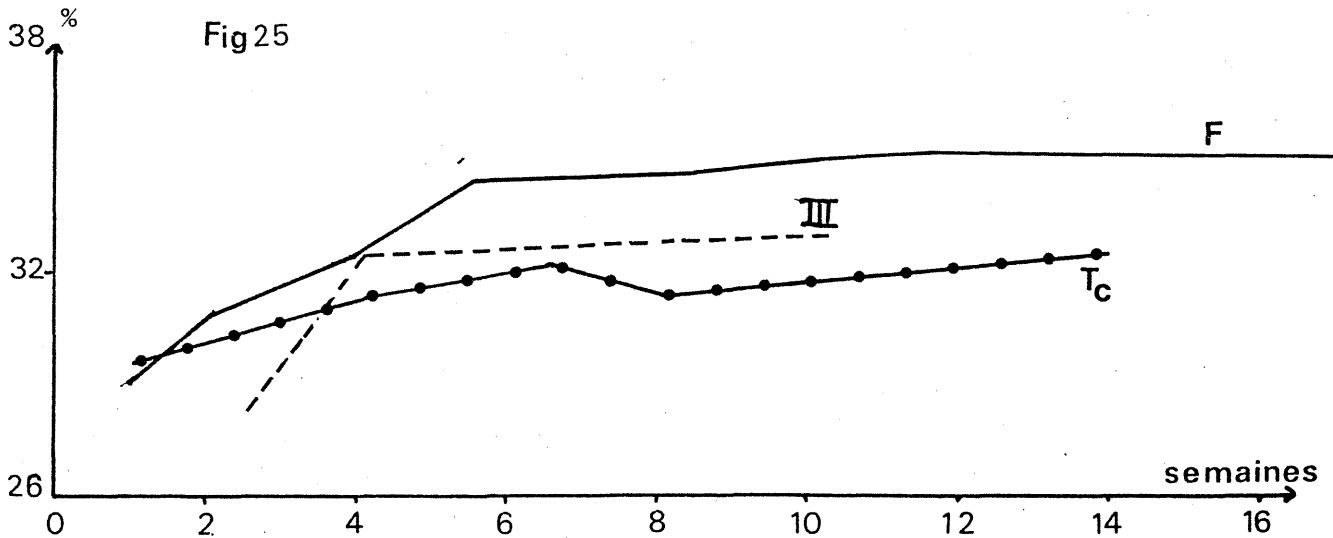


Fig25



Il semble également que les réensemencements n'ont pas d'action sensible sur l'évolution du taux de matière sèche dessalée

### C. Etude biochimique.

Les protocoles d'analyse étant identiques à ceux utilisés pour les échantillons F et Tc, nous nous bornerons à exprimer les résultats en faisant à chaque observation la comparaison d'un échantillon réensemencé avec les échantillons F et Tc.

#### 1. Evolution de la matière azotée.

Nous avons pu constater précédemment que la congélation avant la mise en maturation, était responsable d'un ralentissement notable de la protéolyse.

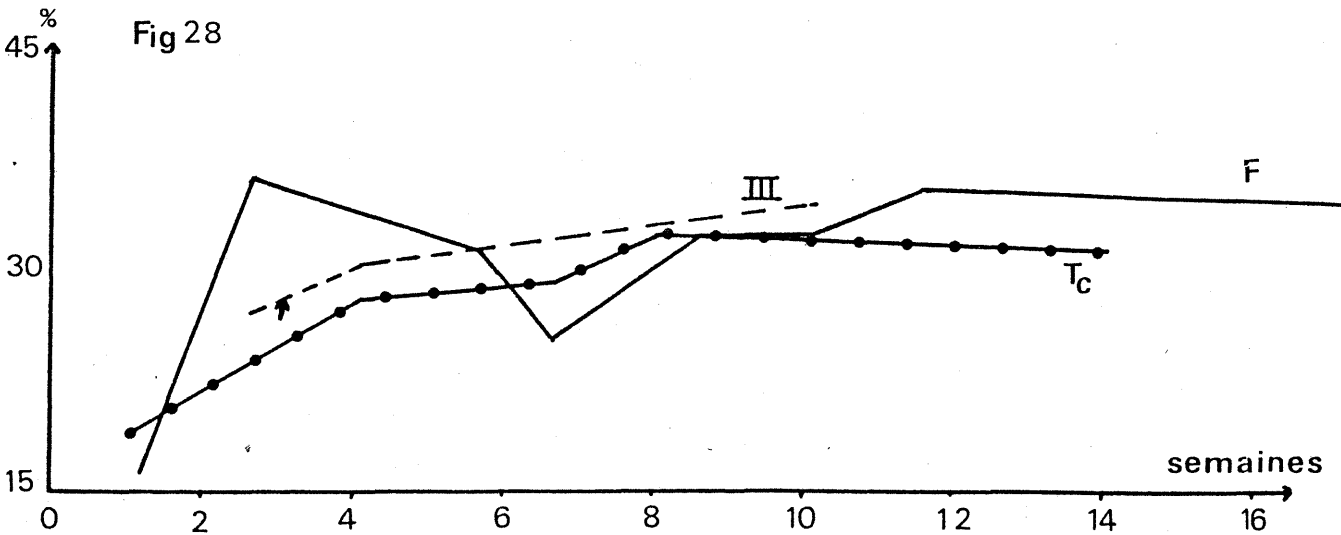
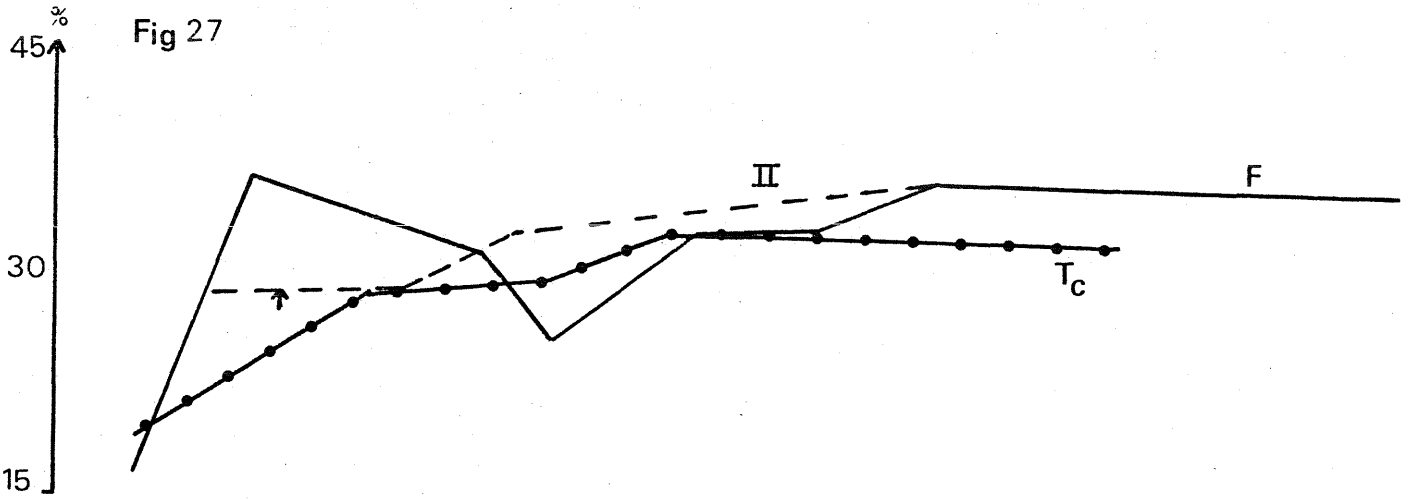
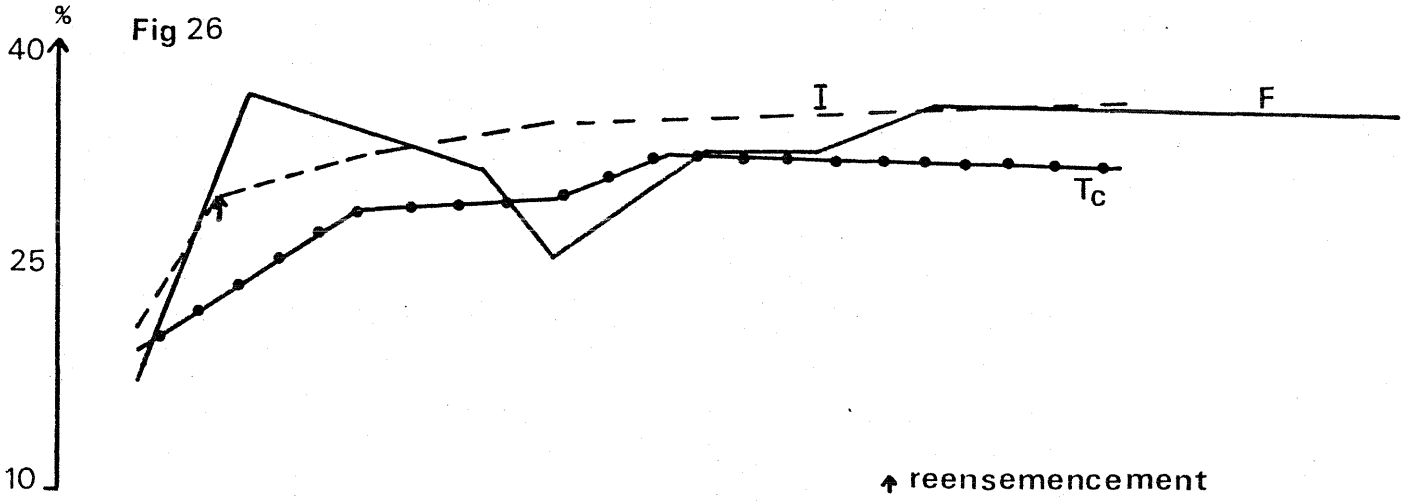
Si nous examinons les figures 26 à 34, il apparaît que, pour les échantillons I, II et III, l'évolution de la protéolyse se situe à un niveau supérieur à celui de l'échantillon Tc. De même, le niveau initial de la protéolyse est plus important pour les échantillons I, II et III (fig. 26, 27, 28). Cette observation laisse supposer que, lors du stockage en chambre froide, il y ait eu poursuite d'une manière ralentie, de la protéolyse.

Cependant, après mise en maturation, le niveau plus élevé du taux d'azote non protéique rapporté à l'azote total ( $\frac{\text{NPN}}{\text{NT}}$ ) des échantillons I, II et III que celui du témoin pourrait ~~être~~ être imputable au réensemencement.

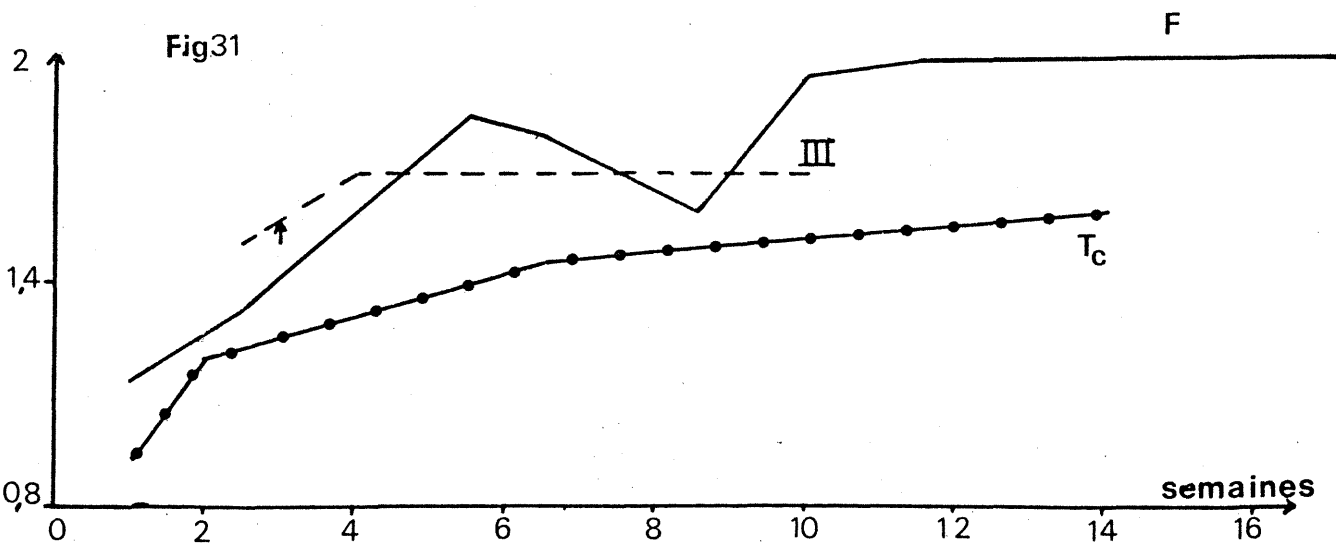
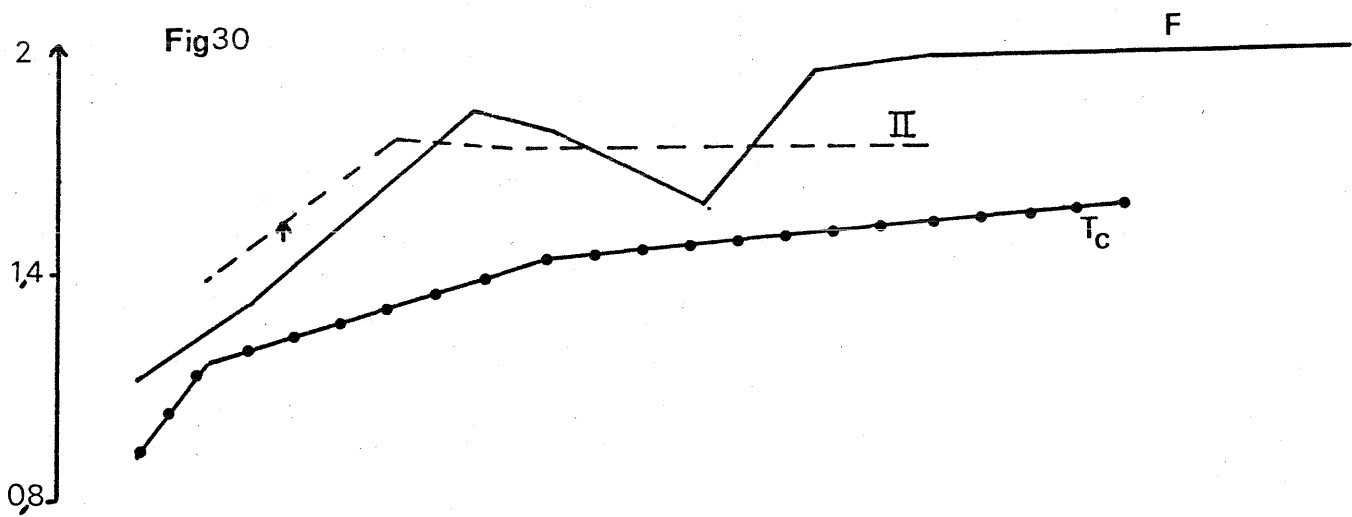
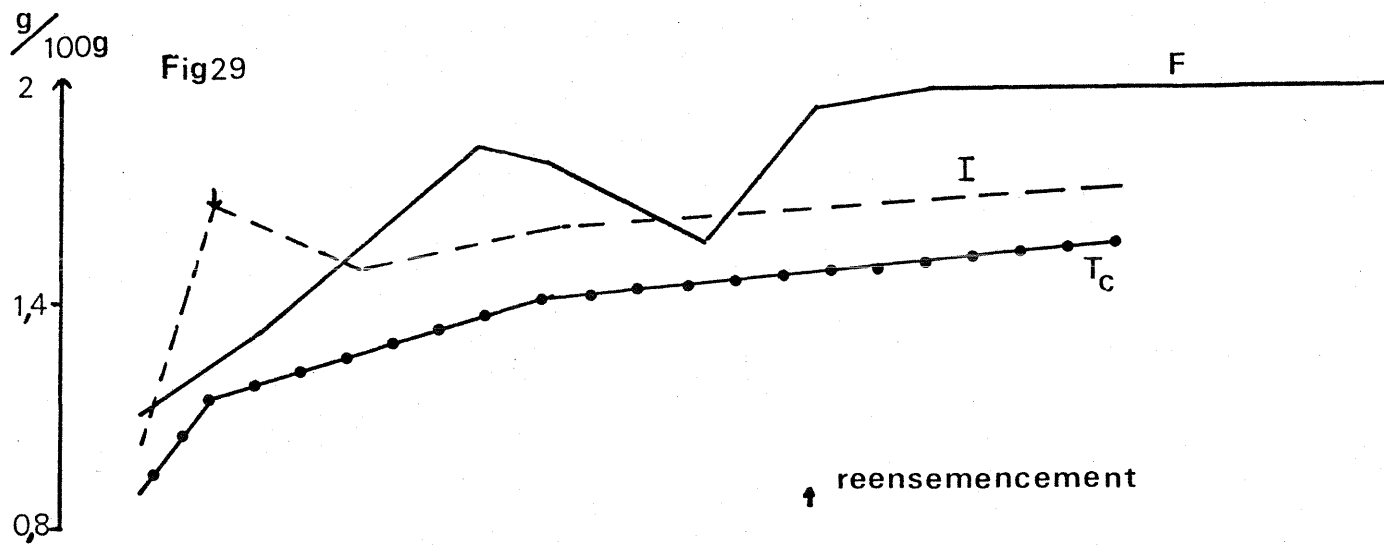
L'apport d'une saumure de potentiel d'activité enzymatique plus élevé, entrainerait une accélération de la protéolyse. En tenant compte des différentes saumures utilisées, il apparaîtrait que les conditions les plus favorables soient l'utilisation d'une saumure de 6 semaines (fig. 26).

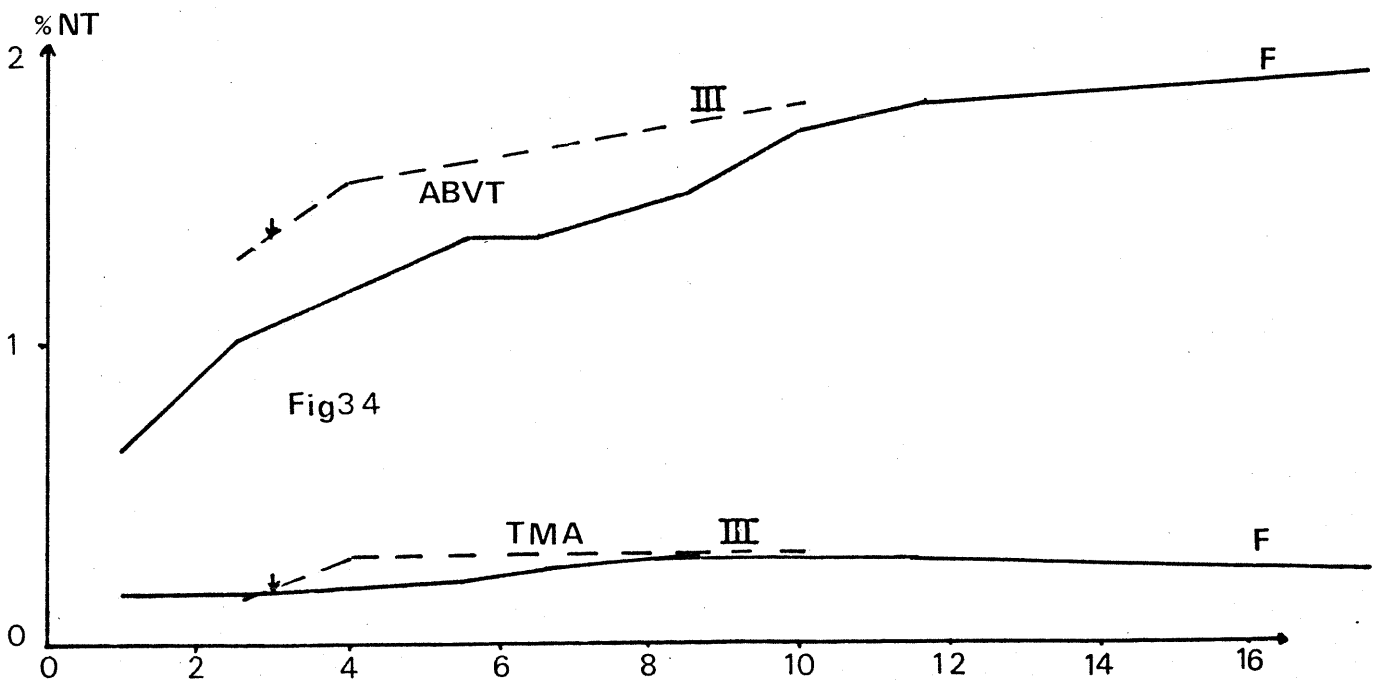
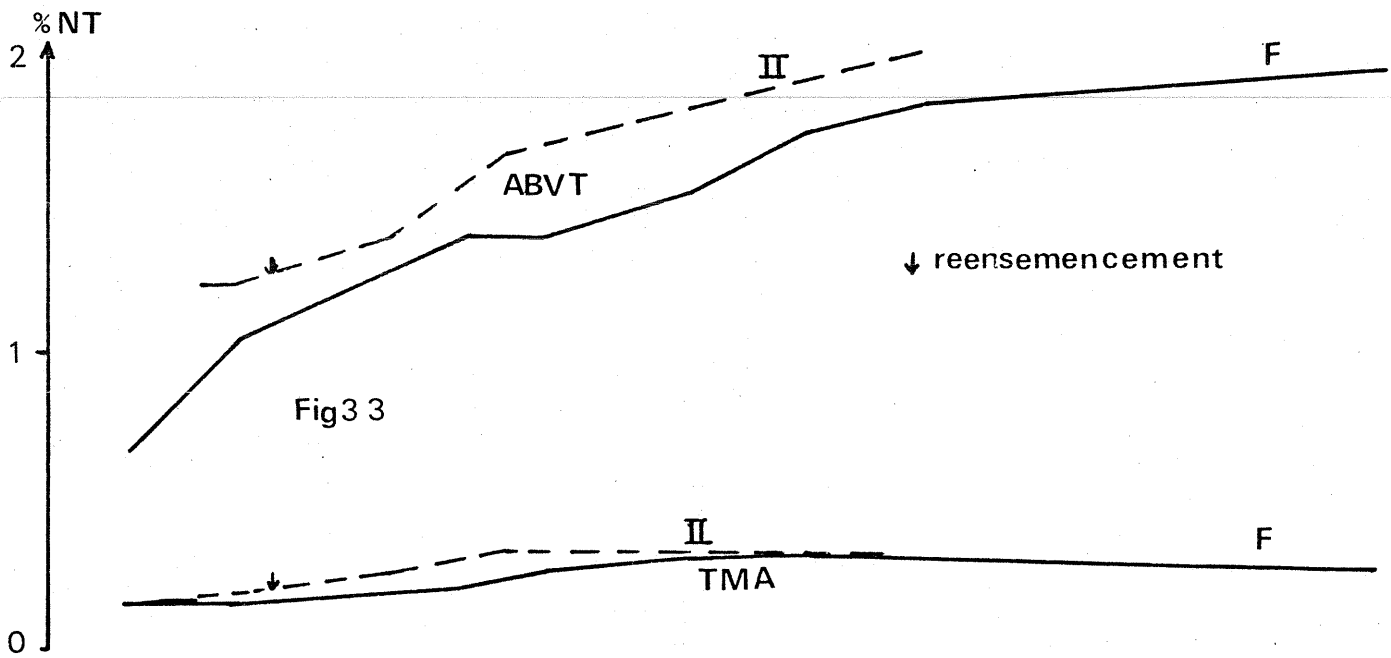
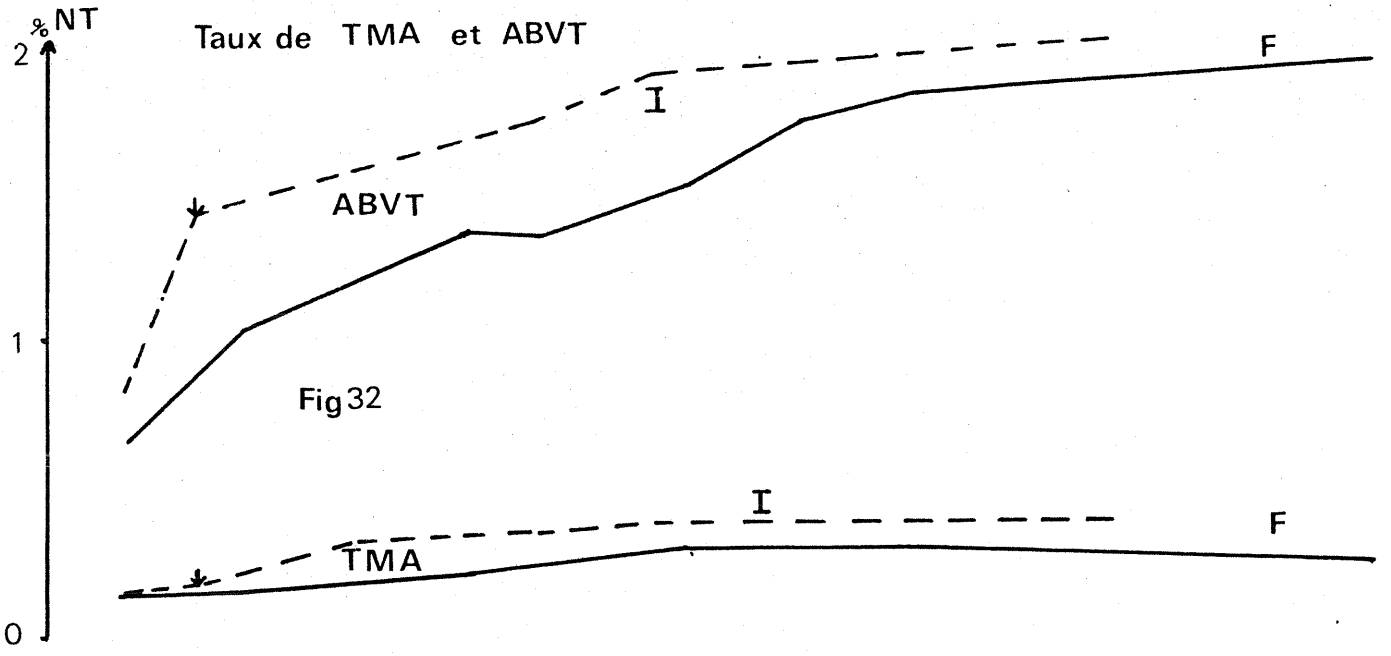


Taux d'azote non protéique rapporté à l'azote total



Taux d'azote total présent dans la saumure





Seul l'échantillon I présentait les caractéristiques d'un début sensible d'anchoitage après 3 mois de maturation. Ceci a pu être mis en évidence par examen organoleptique. Sur les échantillons II, III bien que le taux d'azote non protéique rapporté à l'azote total ait dépassé 33 %, aucun début d'anchoitage n'a pu être encore perceptible.

Ces différentes observations sont confirmées par un transfert d'azote plus important dans les saumures I, II et III (fig. 29, 30, 31) qui serait signe d'une activité protéolytique plus importante. Sur la figure 19 le pic de la 2ème semaine correspond au réensemencement.

Les variations des taux d'azote basique volatil total (ABVT) et de triméthylamine (TMA) rapportés à l'azote total (fig. 32, 33, 34) des échantillons I, II et III sont très voisins de ceux obtenus pour l'échantillon frais F. Le taux légèrement supérieur d'ABVT semble difficilement imputable au réensemencement et serait plutôt dû à une dénaturation bactériologique intervenue lors de la décongélation.

## 2. Evolution de la teneur en acides aminés.

Pour des raisons matérielles, les dosages des acides aminés libres et totaux, n'ont pu être effectués que sur l'échantillon I.

En comparant les taux d'acides aminés libres rapportés aux acides aminés totaux, pour les échantillons I, F et Tc (fig. 20) à la quantité d'acides aminés libres rapportée à la matière sèche dessalée (fig. 22), il semble que la libération d'acides aminés soit plus rapide pour l'échantillon I, traduisant ainsi une activité protéolytique plus intense. En effet, pour l'échantillon I (fig. 21) la quantité d'acides aminés acides libérés par rapport aux basiques est plus forte que pour les échantillons F et Tc. Or les acides aminés acides sont les premiers libérés et peuvent traduire une accélération du processus de maturation, dû au réensemencement. D'autre part, cette plus grande activité doit vraisemblablement entraîner parallèlement une libération plus importante de peptides qui pourraient être à l'origine de l'apparition de l'arôme anchoité de l'échantillon I.

Un nombre plus important d'analyses aurait toutefois été nécessaire pour confirmer ces observations.

#### D. Etude microbiologique.

Si nous comparons les dénombrements des différents échantillons (tableau 1) il semble que le réensemencement ne soit pas mis en évidence. Sur l'échantillon I lors de la 3<sup>è</sup> semaine de maturation, nous pouvons constater que la population bactérienne totale est plus importante que sur l'échantillon Tc. Ceci peut s'expliquer par l'apport de germes, lors du réensemencement qui a eu lieu la 2<sup>ème</sup> semaine. Cependant au bout de 6 semaines, nous obtenons des nombres totaux de germes équivalents pour I et Tc, et qui sont supérieurs à ceux de l'échantillon F. Il faut malgré tout être très prudent quant à l'interprétation de ces résultats, les dénombrements bactériologiques pouvant être sujets à des écarts importants. D'autre part, pour pouvoir tirer des conclusions quant à l'influence du réensemencement sur la maturation, il sera indispensable de réaliser l'identification des germes. En effet, lors du réensemencement, l'équilibre qualitatif des germes présents est différents dans le poisson et dans la saumure utilisée pour réensemencer. Il s'ensuit une compétition qui va tendre vers un nouvel équilibre, pouvant être propice au développement des germes "favorables" à la maturation.

#### IV. Conclusion sur la partie expérimentale.

A la suite de notre travail de laboratoire nous avons pu mettre en évidence les différences dues à la congélation, au niveau de la protéolyse. En effet il apparaît que le traitement par le froid entraîne un ralentissement notable de l'activité protéolytique. D'autre part l'étude de l'évolution qualitative et quantitative des acides aminés totaux et libres, devrait permettre d'établir un critère objectif de maturation, complété par des tests organoleptiques. En effet, contrairement au taux d'azote non protéique rapporté à l'azote total, qui évolue d'une manière très variable, il semble que le taux des acides aminés libres rapporté aux acides aminés totaux croît d'une manière plus régulière durant la maturation.

Nous avons pu également mettre en évidence l'existence d'une croissance bactérienne tant sur l'échantillon décongelé que frais.

Ces observations confirment les résultats obtenus par F. Kabbaj.

Il apparaît également que l'échantillon témoin congelé, après 3 mois de maturation, ne présente pas encore les caractères d'un début d'anchoitage. Dans les mêmes délais, l'échantillon frais avait déjà acquis la couleur, l'odeur et le goût de l'anchois "mûr". Cette différence de vitesse de maturation ne peut être imputable qu'à la congélation et au stockage à - 25°C. Le poisson était de même origine et les conditions de maturation identiques.

L'étude de la possibilité de réensemencement d'échantillons décongelés semble s'être avérée positive. En effet l'échantillon I présentait à la dégustation, les caractères d'un début d'anchoitage, après 3 mois de maturation. Sur les échantillons II et III, ces caractères n'étaient pas encore sensibles à la fin des travaux, mais les temps de maturation n'étaient respectivement que de 8 et 6 semaines.

Il faut cependant émettre des réserves quant à ce procédé. En effet nous avons pu constater sur les anchois congelés, la présence d'hématomes foncés le long de la colonne vertébrale et dans la chair. Ce phénomène est sans doute imputable à la diffusion du sang, suite à la destruction mécanique partielle provoquée par la congélation. De plus les temps de stockage à - 25°C ont été de 2 mois au maximum et il serait intéressant de faire une étude similaire avec des durées de stockage plus importantes.

Cette étude bien qu'incomplète, aura permis d'envisager l'utilisation possible de matière première congelée. Cependant, ces résultats devant être complétés par une étude plus approfondie.

#### V. Proposition pour une étude future.

Actuellement, dans l'industrie, l'anchois congelé n'est plus utilisé par suite de la difficulté voire l'impossibilité à la faire mûrir. Par notre étude nous voulions essayer de mieux comprendre les modifications que pouvaient entraîner la congélation, ainsi que d'envisager

un palliatif aux inconvénients qu'elles entraînent pour les professionnels.

Il semble que le procédé de réensemencement ait permis de faire mûrir des échantillons congelés. Cependant ce procédé semble difficilement applicable tel quel, à une fabrication industrielle.

Il serait donc intéressant dans le cas de la poursuite de l'étude, d'envisager une analyse bactériologique approfondie de la saumure fraîche, à différentes étapes de la maturation et pour un âge maximum de 3 mois.

D'autre part, il faudrait confirmer les résultats de la maturation d'anchois décongelés. Une seule étude étant insuffisante pour en tirer des conclusions définitives. Le but final de ces études devrait être la mise au point d'un procédé industriel permettant l'utilisation de matières premières congelées.

Au niveau des techniques de congélation, il serait également intéressant de faire une étude comparative en utilisant différents modes de congélation, comme l'air pulsé, la congélation par plaques ou en saumure.

De même, il faudrait suivre l'évolution biochimique et bactériologique de l'anchois lors du stockage en chambre froide, et pratiquer des temps de stockage supérieurs à ceux que nous avons pu pratiquer et qui ont été de 2 mois maximum.

Nous ne nous sommes intéressés qu'aux anchois de la Côte basque dont nous connaissons l'aptitude à bien mûrir, afin d'obtenir des résultats comparables. Cependant le réensemencement pourrait peut-être s'appliquer, en dehors de la congélation, au mûrissement d'anchois pêchés plus au nord, qui semblent présenter des difficultés à mûrir correctement.

## ANNEXE

### I. Méthodes d'extraction des acides aminés.

#### A. Acides aminés totaux.

Extraction par hydrolyse à 1'HCl.

- Hydrolyser environ 2 g (pesé exactement) d'échantillon frais dans 500 ml d'HCl 6 N pendant 24 heures. Travailler sous ébullition à reflux par réfrigérant. Ajouter en début d'hydrolyse la solution de Norleucine de molarité connue (5 ml à 10  $\mu$ moles/ml).
- Filtrer sous vide sur creuset de verre fritté n° 4.
- Compléter le filtrat à 1 l par de l'eau distillée.
- Prélever 500 ml et évaporer sur évaporateur rotatif (40°C), laver 3 à 4 fois à l'eau distillée.
- Reprendre dans 50 ml de tampon citrate 0,2 N pH = 2,2.
- Filtrer sur papier avant le passage dans l'analyseur.

#### B. Acides aminés libres.

Méthode N. PAWELAK, P. PION

Réf. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. Vol. 8, fac. 4, p. 517 (1968).

##### 1. Extraction.

L'extraction se fait à froid par de l'éthanol 82°.

- Broyer environ 2 g (pesé exactement) de chair avec 14 ml d'éthanol 95°, 2 ml d'eau distillée, et la solution de Norleucine de molarité connue (2 ml à 10  $\mu$ moles/ml). Les broyages seront faits à l'ultra-turrax pendant environ 1 mn. Après chaque broyage les échantillons seront refroidis à - 20°C.
- Renouveler le broyage 3 fois.
- Centrifuger à 4°C - 20 mn à 3 000 t/mn
- Prélever le surnageant et poursuivre de la même manière l'extraction sur le résidu.



## 2.- PURIFICATION DES EXTRAITS

### Principe

Les extraits éthanoliques sont purifiés sur une résine échangeuse de cations pour éliminer, les sucres, les acides organiques et certains sels minéraux (nitrate,  $\text{Fe}^{++}$ ). Pour cela, les acides aminés libres et amides, (sauf la taurine) sont fixés sur une résine échangeuse de cations (polystyrène sulfonique, sous forme  $\text{H}^+$ ), puis élués quantitativement par une base volatile facile à éliminer (ammoniaque). Dans ces conditions les acides organiques et les sucres ne sont pas fixés sur la résine tandis que les cations minéraux ne sont pas élués par l'ammoniaque utilisée. La plupart d'entre eux seront éliminés par la suite au cours de la régénération de l'échangeur. Les concentrations des solutions d'ammoniaque utilisées sont choisies de manière à assurer une élution quantitative de tous les acides aminés (y compris lysine, histidine, arginine), sans séjour prolongé de la glutamine dans une solution alcaline concentrée.

### Réalisation

#### - REACTIFS

##### - Résine Amberlite IR 120

Les diverses solutions acides et alcalines sont effectuées à partir de produit RP. Les dilutions suivantes sont utilisées (les normalités indiquées sont approximatives)

- <u>Hcl</u>	2N	167 ml	d'Hcl RP/1	(d = 1,19)
		4N	334 ml	d'Hcl RP/1 (d = 1,19)
- <u>NH<sub>4</sub>OH</u>	2N	187 ml	NH <sub>4</sub> OH RP/1	(d = 0,925)
		4N	374 ml	NH <sub>4</sub> OH RP/1 (d = 0,925)
- <u>NaOH</u>	0,2N	8g/l		
	N	40g/l		
	2N	80g/l		

#### V - PREPARATION DE LA RESINE

Les résines sont livrées sous forme  $\text{Na}^+$ . Les particules colloïdales sont éliminées en laissant décanter la résine dans 5 fois son volume d'eau contenu dans une éprouvette, pendant 10 mn environ. Le surnageant

est jeté, et l'opération répétée jusqu'à ce qu'il soit clair. Le résidu est ensuite traité pour éliminer les cations éventuellement fixés, et les remplacer par des ions  $\text{Na}^+$ .

La résine, placée dans une colonne (25 cm de long, 4 cm de diamètre), est transformée quantitativement en forme  $\text{H}^+$  par 3 à 5 fois son volume d' $\text{HCl}$  4N. Le filtrat souvent coloré en jaune au début (ions métalliques), devient progressivement incolore. La vitesse de passage ne doit pas dépasser 100 ml de solution par litre de résine et par minute.

L'excès d'acide chlorhydrique est éliminé par un lavage à l'eau distillée, jusqu'à neutralité de l'effluent (papier pH). La vitesse de passage, identique au début à celle de l'acide, peut être portée ensuite à 200 ml par litre de résine et par minute.

La résine est alors traitée par 4 à 6 volumes de  $\text{NaOH}$  2N (même vitesse que pour  $\text{HCl}$ ), puis chauffée une heure au bain marie bouillant dans trois fois son volume de  $\text{NaOH}$  N. Elle est ensuite lavée à l'eau distillée, jusqu'à neutralité de l'effluent, puis conservée sous forme de sel de sodium, de préférence au froid (en solution  $\text{NaOH}$  0,2N).

#### -Colonnes

Les réactions d'échange d'ions sont réalisées en faisant couler l'extrait à purifier, puis les agents éluants à travers des colonnes contenant l'échangeur d'ions. Ces colonnes sont munies d'une tubulure latérale capillaire, partant de la base, et se terminant par un robinet situé au dessus du niveau de la résine, afin d'en éviter l'assèchement. La résine est retenue à la base de la colonne par du coton de verre hyperfin (Prolabo). Les volumes utiles des colonnes sont choisis en tenant compte de la teneur approximative en cations de la solution à purifier, et de la capacité d'échange de la résine (1, 6-1, 8 milliéquivalents par ml), en utilisant un coefficient de sécurité de l'ordre de 4, car les réactions d'échange sont lentes et loin d'être complètes dans les conditions opératoires utilisées (débit en particulier). Les colonnes utilisées sont de caractéristiques suivantes : hauteur utile 20 cm, diamètre intérieur 9 mm.

./.

./.

### - Régénération de la résine

Les résines neuves, préalablement traitées, ou déjà utilisées sont conservées soit sous forme  $\text{Na}^+$ , soit sous forme  $\text{NH}_4^+$ . Après élimination des solutions alcalinées éventuellement présentes par lavages à l'eau distillée, l'échangeur est transformé en forme  $\text{H}^+$  par 5 volumes d' $\text{HCl}$  2N (débit  $1\text{ml/mn/cm}^2$  de section de colonne). L'excès d' $\text{HCl}$  est éliminé par lavage à l'eau bidistillée jusqu'à résistivité constante de l'effluent (débit  $2\text{ml/mn/cm}^2$ ).

### - Fixation des acides aminés

Elle est effectuée de préférence à  $4^\circ\text{C}$ , en laissant couler à travers les colonnes de résine l'extrait éthanolique contenant les acides aminés préalablement acidifiés (10ml d'acide acétique glacial pour environ 2 g d'éch.frais) (débit  $1\text{ml/mn/cm}^2$ ). Les composés non retenus sur la résine sont éliminés par 7 fois le volume utile de la colonne d'eau bidistillée (débit  $2\text{ml/mn/cm}^2$ ). L'effluent est conservé afin de déterminer les pertes éventuelles d'acides aminés libres lors du passage sur colonne.

### - ELUTION DES ACIDES AMINES ET AMIDES

L'éluat se fait à l'aide de l'ammoniaque. La plupart des acides aminés acides et neutres sont élués par de l'ammoniaque 2N (2volumes) suivi d'un rinçage puis rincés avec un volume d'eau déminéralisée. On obtient ainsi l'éluat A.

Les acides aminés basiques sont ensuite élués, en particulier l'arginine par 3 volumes d'ammoniaque 4N, et un rinçage à l'aide d'un volume d'eau déminéralisée. On obtient ainsi l'éluat B.

### - Concentration des éluats

Les éluats A et B sont débarrassés de leur ammoniaque, et concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif (Craig) sous vide (10 mm de mercure) muni d'une source chaude maintenue entre  $38$  et  $40^\circ$ , et d'une source froide maintenue de  $-15^\circ$  à  $-20^\circ$ . Les éluats A et B sont regroupés lorsque l'éluat B est débarrassé de son ammoniac. Après évaporation le contenu du ballon est repris par de l'eau qui est évaporée à nouveau. Cette opération est répétée jusqu'à disparition de l'odeur d'ammoniac. L'élimination complète de l'ammoniac peut être favorisée par la présence dans le piège de l'évaporateur de cristaux d'acide citrique.

Les acides aminés sont ensuite repris dans le ballon évaporateur

par du tampon 2,2 0,2 N et amenés à un volume connu en complétant avec du tampon 2,2 0,2 N. La solution est filtrée sur papier avant la pose de l'échantillon sur l'analyseur automatique.

### 3. Remarque.

Sur nos échantillons, nous avons eu des problèmes de colmatage des colonnes de purification, par la graisse du poisson. Il faudrait pouvoir envisager un mode de dégraissage de la chair, avant l'extraction, ne provoquant pas la destruction des acides aminés.

### C. Préparation des solutions.

#### 1. Tampon citrate de sodium 0,2 N pH 2,2.

Dissoudre dans l'eau distillée.

- 21 g d'acide citrique monohydraté
- 8 g d'hydroxide de sodium
- 16 ml d'HCl ( 20 = 1,19 g/ml)
- 0,1 ml d'acide caprylique
- 20 ml de thiodiglycol
- 2 ml d'une solution aqueuse à 50 % d'alcool laurique polyéthoxylé à environ 23 molécules d'oxyéthylène

Compléter à 1 l par de l'eau distillée.

#### 2. Solution de Norleucine.

Solution à 10 umoles/ml

Dissoudre 0,1312 g de Norleucine pour 100 ml de HCl 0,1 N,

Travailler entre 30° et 40°C

Conserver la solution au froid.

## II. Milieux bactériologiques employés.

### A. Dénombrement.

Les dénombrements ont été faits en bouillon nutritif peptoné BIO-MERIEUX pH 6,9 salé à 20 %.

### B. Isolement.

Les isolements ont été réalisés sur milieu solide de PENSO

en boîte de Pétri. Ensemencement par stries à la pipette à boule sur une boîte divisée en 4 quarts.

Milieu de PENSO.

Beef extract Difco	10 g
Peptone	5 g
Yeast extract Difco	5 g
Agar	30 g
NaCl	200 g
H <sub>2</sub> O distillée	1 000 ml
pH : 7,2	
Autoclavage : 121°C - 15 mn.	

BIBLIOGRAPHIE.

- ALM (F.).- Scandinavian anchovies and tidbits. "Fish as Food", Vol. III page 195. Academic Press, New York - Londra (1965).
- ALM (F.).- "The ripening process in Scandinavian anchovy" S I K - rapport 147, Göteborg (1964).
- BALDRATI (G.), CASSARA (A.), GUIDI (G.), PIRAZZOLI (P.), PORRETTA (A.).-  
Technologia di trasformazione delle acciughe. "I Maturazione sotto sale di acciughe fresche e congelate". Industria conserve n° 4 pages 261 - 266 (1975).
- BALDRATI (G.), GUIDI (G.), PIRAZZOLI (P.) PORRETTA (A.).-  
Technologia di trasformazione delle acciughe. "Influenza della pressatura sulla maturazione delle acciughe sotto sale". Industria conserve n° 3, pages 221 - 234 (1977).
- DIEUZEIDE (R.), NOVELLA (M.).- Essai sur la technique des salaisons de poissons. Documents et renseignements agricoles. Bulletin n° 167 (1951).
- F. A. O. (1971).- Rapport sur les pêches n° 100.
- HJÖRT, HANSEN (S.).- The bacteriology of semi-preserved herring and frozen fish. S wed Inst. Food. Preserv. Research. Göteborg, 1953 p.b. 100.
- KABBAJ (F.).- Etude préliminaire de la maturation de l'anchois salé et approche des problèmes liés à l'origine du poisson. Rapport de stage ISTPM (1975).
- LEDERER (E.).dir.- Chromatographie en chimie organique et biologique. Masson 1959 - 60.
- RAGULIN (A.E.).- Select. Art. from Tech fo Fish Processing p. 46, 65 (1958).

MOORE (S.), STEIN (W.H.).- Chromato of aminoacids on sulfonated polystyrene resins.- J. Bio. Chem. 192, 663 (1951).

MOORE (S.), STEIN (W.H.).- Electrolytic desalting of amino acids. Conversion of arginine to ornithine. J. Bio. Chem. 190, 103 (1951).