

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES  
École doctorale Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer  
(ED VENAM)

Année 2015

N° attribué par la bibliothèque

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

DE L'UTILISATION DE PROTÉASES  
INDUSTRIELLES POUR LA PRODUCTION DE  
SAUCES DE POISSON

---

THÈSE DE DOCTORANT

Discipline : Science agro-alimentaire

Spécialiste : Agro-alimentaire

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Minh Chau LE**

*Le 30 mars 2015, devant le jury ci-dessous*

Jean-Pascal BERGÉ, Docteur HdR, IDMER  
Stephanie BORDENAVE, Maître de Conférences, HdR, Université de la Rochelle  
Nathalie BOURGOUGNON, Professeur, Université de Bretagne Sud  
Patrick BOURSEAU, Professeur, Université de Bretagne Sud  
Justine DUMAY, maître de Conférences, Université de Nantes  
Joel FLEURENCE, Professeur, Université de Nantes  
Thi My Huong NGUYEN, Professeur, Université de Nha Trang

Direction de thèse : Jean-Pascal BERGÉ  
Codirecteur de thèse : Thi My Huong NGUYEN



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur Jean-Pascal Bergé, Directeur de recherche à l'IFREMER, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses conseils et son soutien ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Toute ma profonde reconnaissance s'adresse à Madame Nguyen Thi My Huong, Professeure à l'Université de Nha Trang au Vietnam, pour la codirection de ce travail, ses conseils et sa confiance.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du centre Ifremer de Nantes et celui du centre de recherche pour leur aide ainsi que pour leur accueil.

J'adresse de sincères remerciements à Claire et Sandrine pour leur aide dans les analyses, leurs multiples connaissances.

Mes remerciements à Jojo, Claire et Monique qui m'ont beaucoup aidé dans la correction de cette thèse et leurs - conseils linguistiques.

Après trois ans de thèse, je voudrais tout particulièrement remercier toutes les personnes rencontrées dans les laboratoires. Ils étaient tous sympathiques et ont beaucoup partagé avec moi. Encore une fois, je les remercie tous : merci à Claire pour sa présence quotidienne, son aide pour la réalisation de nombreuses expériences, merci à Anaïs pour ses conseils, son soutien et sa disponibilité permanente, merci à Régis pour son aide mathématique, merci à Françoise, Fred, Jean-Jacques et Sébastien, les microbiologistes, pour leur aide et leurs nombreux conseils, merci à Isabelle, Christine pour leur aide administrative et leur gentillesse.

Enfin, un immense merci à tous mes proches, pour leur soutien et leur patience (il en a fallu, je sais ...). Merci à Annaïs, Vincent, Gaëtan, Cécile, Taous ... merci à tous de votre présence à mes cotés.

# SOMMAIRE

|   |    |
|---|----|
| REMERCIEMENTS .....   | 1  |
| SOMMAIRE .....  | 2  |
| LISTE DE FIGURES .....  | 5  |
| LISTE DE TABLEAUX .....   | 8  |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS .....  | 9  |
| CHAPITRE 1. GÉNÉRALITES .....   | 11 |
| 1.1. Sauce de poisson .....   | 11 |
| 1.1.1. Généralités.....   | 11 |
| 1.2. Détail du procédé traditionnel de fabrication des sauces de poisson .....              | 25 |
| 1.2.1. Liquéfaction par protéolyse.....   | 25 |
| 1.2.2. Le rôle des microorganismes.....   | 27 |
| 1.3. Les paramètres influents et les modifications au cours du temps .....                  | 28 |
| 1.3.1. Température .....  | 28 |
| 1.3.2. Sel.....   | 29 |
| 1.3.3. pH.....  | 30 |
| 1.3.4. Modifications biochimiques .....   | 31 |
| 1.3.5. Modifications sensorielles.....  | 34 |
| 1.3.6. Evolution de la population microbienne .....   | 36 |
| 1.4. Accélération du procédé de fabrication.....  | 38 |
| 1.4.1. Enzymes endogènes et ajout d'extraits dans la production de la sauce de poisson..... | 38 |
| 1.4.2. Ajout d'enzymes .....  | 40 |
| 1.4.3. Ajout de microorganismes .....   | 43 |
| 1.5. Etude bibliométrique sur les sauces de poisson .....                                   | 45 |
| .....   | 48 |

|   |     |
|---|-----|
| CHAPITRE 2. HYDROLYSE EN CONDITIONS HYPERSALINES DE LA SARDINE ( <i>SARDINA PICHARDUS</i> ) ET DE L'ANCHOIS ( <i>STOLEPHORUS COMMERSONII</i> ) PAR DES PROTEASES COMMERCIALES ..... | 52  |
| 2.1. Introduction.....  | 52  |
| 2.2. Matériels et méthodes .....  | 53  |
| 2.2.1. Matériels biologiques .....  | 53  |
| 2.2.2. Matériel enzymatique.....  | 54  |
| 2.2.3. Réalisations des l'hydrolyses .....  | 56  |
| 2.2.4. Analyses biochimiques.....   | 61  |
| 2.3. Résultats des expérimentations sur la sardine .....  | 66  |
| 2.3.1. Composition proximale de la sardine .....  | 66  |
| 2.3.2. Activité des quatre enzymes commerciales en présence de quantités variables de NaCl.....   | 67  |
| 2.3.3. Hydrolyse de la sardine par Protex 51FP et Protamex .....  | 70  |
| 2.3.4. Hydrolyse de la sardine par l'enzyme Protex 51FP .....   | 81  |
| 2.4. Résultats des expérimentations sur l'anchois.....  | 86  |
| 2.4.1. Composition proximale de l'anchois.....  | 86  |
| 2.4.2. Hydrolyse de l'anchois par 51FP et Protamex .....  | 87  |
| 2.5. Bilan des hydrolyses de la sardine et de l'anchois par les enzymes Protex 51FP et Protamex pendant six heures.....   | 94  |
| CHAPITRE 3 : UTILISATION DE PROTEX 51FP COMME ACCÉLÉRATEUR D'HYDROLYSE POUR LA FABRICATION DE NUOC-MAM À PARTIR D'ANCHOIS ( <i>STOLEPHORUS COMMERSONII</i> ) .....                  | 99  |
| 3.1. Introduction.....  | 99  |
| 3.2. Matériels et méthodes .....  | 100 |
| 3.2.1. Matériel biologique : Anchois.....   | 100 |
| 3.2.2. Matériel enzymatique.....  | 100 |
| 3.2.3. Sauces Nuoc-mam commerciales.....  | 101 |
| 3.2.4. Production expérimentale de Nuoc-mam.....  | 101 |
| 3.2.5. Analyses biochimiques.....   | 103 |

|   |   |     |
|---|---|-----|
| 3.3.                                      | Résultats et discussion.....  | 109 |
| 3.3.1.                                    | Variations quantitatives et qualitatives de l'azote au cours de la maturation.....          | 109 |
| 3.3.2.                                    | Composition biochimique : comparaison entre les sauces expérimentales et commerciales.....  | 116 |
| 3.3.3.                                    | Profils des acides aminés totaux et masse moléculaire des peptides des sauces Nuoc-mam..... | 121 |
| 3.3.4.                                    | Valeur sensorielle de la sauce de poisson .....   | 128 |
| 3.3.5.                                    | Les rendements de production.....   | 131 |
| 3.4.                                      | Conclusion .....  | 133 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES ..... |   | 134 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....         |   | 140 |

## LISTE DE FIGURES

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figure 1.1  | Carte de l'Asie du sud-est.....  | 12 |
| Figure 1.2  | Procédé générique de la production de la sauce de poisson.....               | 15 |
| Figure 1.3  | Procédé de production du Patis traditionnel (FAO, 1990) .....                | 16 |
| Figure 1.4  | Patis, une sauce de poisson aux Philippines.....                             | 17 |
| Figure 1.5  | Nam-Pla, une sauce de poisson thaïlandaise .....                             | 18 |
| Figure 1.6  | Budu, une sauce de poisson en Malaisie.....                                  | 18 |
| Figure 1.7  | Trassi et Bakasang, les produits de l'Indonésie .....                        | 19 |
| Figure 1.8  | Ngapi, un produit du Myanmar .....   | 19 |
| Figure 1.9  | Shottsuru, une sauce de poisson japonaise .....                              | 20 |
| Figure 1.10 | Jeotgal, un produit coréen .....   | 21 |
| Figure 1.11 | Quelques marques de Nuoc-mam au Vietnam .....                                | 22 |
| Figure 1.12 | Les régions de production de la sauce de poisson au Vietnam .....            | 23 |
| Figure 1.13 | Production de la sauce de poisson à Cai Hai, Hai Phong, Vietnam .....        | 23 |
| Figure 1.14 | Méthode "mixte" à Phu Quoc, Phan Thiet, Nha Trang (Vietnam) .....            | 24 |
| Figure 1.15 | Evolution temporelle des publications du WOS traitant des sauces de poisson  | 45 |
| Figure 1.16 | Cartographie des concepts de référence des 144 publications .....            | 47 |
| Figure 1.17 | Réseau de collaboration entre les organismes ayant au moins 2 publication... | 48 |
| Figure 2.1  | La sardine (Sardine pilchardus) .....  | 53 |
| Figure 2.2  | L'anchois (Stolephorus commersonii) .....                                    | 54 |
| Figure 2.3  | Appareil pH star Distek évolution 6100.....                                  | 56 |
| Figure 2.4  | Première expérience d'hydrolyse de la sardine .....                          | 57 |
| Figure 2.5  | Deuxième expérience d'hydrolyse de la sardine.....                           | 58 |
| Figure 2.6  | Troisième expérience d'hydrolyse de la sardine .....                         | 59 |
| Figure 2.7  | Expérience d'hydrolyse de l'anchois .....                                    | 60 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figure 2.8  | Evolution temporelle du degré d'hydrolyse de la sardine en présence de trois concentrations de sel (10, 20 et 30% de NaCl) et de quatre enzymes ; (a) Protex 51FP, (b) Protex 6L, (c) Protamex et (d) Fungal protéase..... | 68 |
| Figure 2.9  | Degré d'hydrolyse obtenu avec les quatre enzymes en fin d'hydrolyse .....  | 69 |
| Figure 2.10 | Evolution du culot et du surnageant lors de l'hydrolyse de la sardine par l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) (température 30°C, pH libre, 350 rpm, 360 min d'hydrolyse)  | 72 |
| Figure 2.11 | Pourcentage de surnageant obtenu après hydrolyse de la sardine par l'enzyme Protamex et Protex 51FP à 360min d'hydrolyse.....  | 73 |
| Figure 2.12 | Matière organique en solution dans le surnageant après hydrolyse de la sardine par les enzymes Protamex et Protex 51FP.....  | 74 |
| Figure 2.13 | Différence de matière organique en solution dans le surnageant à 360min d'hydrolyse de la sardine par les enzymes Protamex et Protex 51FP .....  | 76 |
| Figure 2.14 | Evolution du degré d'hydrolyse de la sardine avec l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) en présence de quantités variables de NaCl .....  | 78 |
| Figure 2.15 | Comparaison des degrés d'hydrolyse de la sardine obtenus à 360 minutes en fonction des différentes conditions opératoires ( $p < 0,05$ ) .....   | 79 |
| Figure 2.16 | Influence de la température sur le degré d'hydrolyse de la sardine hydrolysée par les enzymes Protex 51FP et Protamex en présence de sel .....   | 80 |
| Figure 2.17 | Répartition des phases obtenues après hydrolyse de la sardine .....  | 83 |
| Témoin (a)  | (500g de sardine, 100ml (20%) d'eau, 125g (25%) de NaCl à 35°C, pH libre, temps d'hydrolyse 180 min, 350 rpm) .....  | 83 |
| Figure 2.18 | Bilan massique à 180min d'hydrolyse de sardines.....   | 84 |
| Figure 2.19 | Degré d'hydrolyse au cours du temps obtenu après hydrolyse de la sardine par l'enzyme Protex 51FP .....  | 85 |
| Figure 2.20 | Evolution du culot et du surnageant après hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) (température 30°C, pH libre, 360 min d'hydrolyse) .....  | 87 |
| Figure 2.21 | Pourcentage de surnageant obtenu après hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protamex et Protex 51FP.....  | 88 |
| Figure 2.22 | Matière organique en solution dans le surnageant après hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protex 51FP et Protamex.....  | 90 |
| Figure 2.23 | : Taux de matière organique en solution dans le surnageant à 360 min d'hydrolyse de l'anchois par les enzymes Protamex et Protex 51FP .....  | 90 |



|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Figure 2.24 | Evolution temporelle du degré d'hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) (température 30°C, pH libre, 360 min d'hydrolyse) ..... | 92  |
| Figure 2.25 | Comparaison des degrés d'hydrolyse de l'anchois obtenus après 360 minutes en fonction des différentes conditions opératoires ( $p < 0,05$ ) .....           | 93  |
| Figure 2.26 | Proportion de matière organique soluble de la sardine et de l'anchois après six heures d'hydrolyse par 1% de Protex 51FP.....                               | 95  |
| Figure 2.27 | Proportion de matière organique soluble de la sardine et de l'anchois après six heures d'hydrolyse par 1% de Protamex .....                                 | 95  |
| Figure 2.28 | Proportion de matière organique soluble de la sardine et de l'anchois après six heures d'hydrolyse par 1% de Protex 51FP.....                               | 96  |
| Figure 2.29 | Proportion de matière organique soluble de la sardine et de l'anchois après six heures d'hydrolyse par 1% de Protamex .....                                 | 96  |
| Figure 3.1  | Les anchois pour la production de la sauce de poisson .....   | 101 |
| Figure 3.2  | Processus de production du nuoc-mam expérimental .....  | 102 |
| Figure 3.3  | Les échantillons de fermentation du nuoc-mam .....  | 103 |
| Figure 3.4  | Contenu de l'azote total dans les échantillons de nuoc-mam .....  | 110 |
| Figure 3.5  | Contenu d'azote formaldéhyde dans les échantillons de nuoc-mam.....   | 112 |
| Figure 3.6  | Contenu d'azote ammoniacal dans les échantillons de nuoc-mam.....   | 113 |
| Figure 3.7  | Contenu de l'azote des acides aminés des échantillons de nuoc-mam.....  | 115 |
| Figure 3.8  | Valeur sensorielle de la sauce de poisson .....   | 130 |
| Figure 3.9  | Rendement de production des sauces de poisson après 6 mois de fermentation. ....  | 131 |

## LISTE DE TABLEAUX

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Tableau 1.1 | Dénomination de la sauce de poisson selon les pays .....   | 11  |
| Tableau 1.2 | Matières premières utilisées pour la production de sauce de poisson .....  | 13  |
| Tableau 1.3 | Utilisation des enzymes dans la production de sauce de poisson .....   | 41  |
| Tableau 1.4 | Utilisation des microorganismes dans la production de sauce de poisson.....                                      | 44  |
| Tableau 2.1 | Composition biochimique de la sardine ( <i>Sardina Pilchardus</i> ).....   | 66  |
| Tableau 2.2 | Composition biochimique de l'anchois ( <i>Stolephorus commersonii</i> ).....                                     | 86  |
| Tableau 3.1 | Caractéristiques biochimiques des échantillons de nuoc-mam expérimentaux et commerciaux .....                    | 118 |
| Tableau 3.2 | Principaux paramètres de classification des sauces de poisson selon différentes normes .....                     | 119 |
| Tableau 3.3 | Profil des acides aminés libres des sauces de poisson expérimentales et commerciales (mg/100ml) .....            | 126 |
| Tableau 3.4 | Répartition des masses moléculaires des peptides (exprimée en %) des sauces expérimentales et commerciales ..... | 127 |
| Tableau 3.5 | Quantité de sauce de poisson et azote récupérable.....   | 132 |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|         |   |  |
|---------|---|--|
| AAE     | : | Acide Aminé Essentiel  |
| AAANE   | : | Acide Aminé Non Essentiel                                    |
| ADN     | : | Acid Deoxyribo Nucléique                                     |
| AU      | : | Anson Unit   |
| Da      | : | Dalton   |
| DH      | : | Degré d'Hydrolyse  |
| DNFB    | : | DiNitroFluoroBenzene   |
| FAO     | : | Food and Agriculture Organisation                            |
| FDA     | : | Food and Drug Administration                                 |
| g       | : | Gramme   |
| h       | : | Heure  |
| HPLC    | : | High Performance Liquid Chromatography                       |
| IFREMER | : | Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER |
| l       | : | Litre  |
| mg      | : | Milligramme  |
| min     | : | Minute   |
| ml      | : | Millilitre   |
| N       | : | azote  |
| rpm     | : | Rotation par minute  |
| TCVN    | : | Norme nationale vietnamienne pour les sauces de poisson      |
| TISI    | : | Institut de Standards Industriels Thaïlandais                |
| UFC     | : | Unité formant des colonies                                   |



## CHAPITRE 1. GÉNÉRALITES

### 1.1. Sauce de poisson

#### 1.1.1. Généralités

La sauce de poisson est un produit fermenté traditionnel très populaire dans de nombreux pays asiatiques, en particulier en Asie du Sud-est. C'est une solution limpide, ayant une odeur et un goût prononcé, sa coloration varie du jaune paille à la couleur ambre en passant par le brun rougeâtre foncé. Cette sauce n'est pas seulement utilisée en tant que condiment, mais aussi en tant qu'ingrédient pour la préparation de plats. Selon la FAO CX/FFP/08/29/9, *“La sauce de poisson est un produit liquide clair ayant un goût salé et une saveur subtile de poisson, obtenu à partir de la fermentation naturelle d'un mélange de poisson et de sel”*. Suivant les pays, cette sauce de poisson porte différentes dénominations (Tableau 1.1).

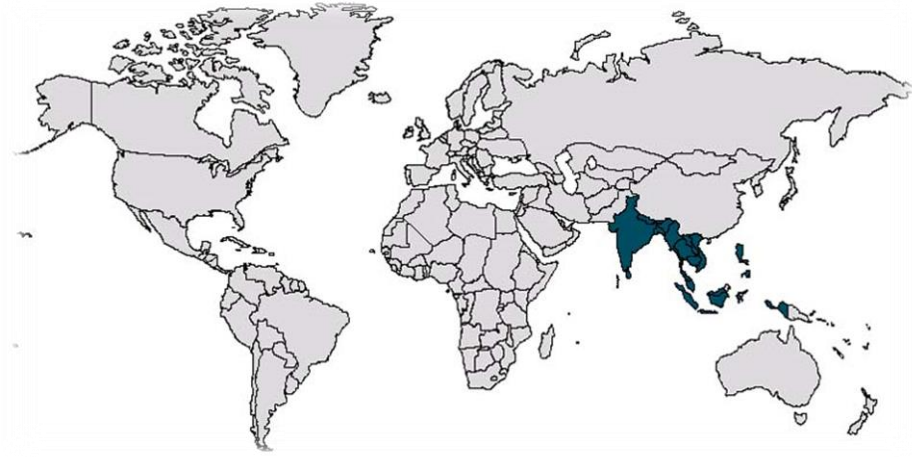
**Tableau 1.1**      **Dénomination de la sauce de poisson selon les pays**

| <b>Pays</b>        | <b>Nom</b>         |
|--------------------|--------------------|
| Birmanie (Myanmar) | Ngam-pya-ye        |
| Japon              | Shotturu           |
| Malaisie           | Budu               |
| Philippines        | Patis              |
| Thaïlande          | Nam-pla            |
| Vietnam            | Nuoc-mam           |
| Inde               | Lona ilish*        |
| Indonésie          | Bakasang, trassi** |
| Corée              | Myeolchi-jeot***   |

*Original* : Commission du codex alimentarius CX/FFP 08/29/9

\* Majumdar et Basu, 2010 ; \*\* Frans et Yoshiyuki, 1996 ; \*\*\* Jae-Hyung et Han-Joon, 2009

Chaque pays a des méthodes de fabrication distinctes pour concevoir des produits aux valeurs nutritives et sensorielles différentes.



**Figure 1.1 Carte de l'Asie du Sud-est**

Dans le Sud-est asiatique (Figure 1.1), une partie de petit poisson est essentiellement transformée en sauce. Les méthodes de fabrication sont souvent standardisées à l'intérieur des régions ou des villages, mais des variations existent en fonction des coutumes locales et des espèces de poisson utilisées. Le produit fini se présente, soit sous la forme d'un liquide limpide, tels que le Nuoc-mam (Vietnam), le Nam-Pla (Thaïlande), soit sous la forme d'une pâte de poisson, tels que le Trassi (Indonésie), le Padec (Laos), le Kapi (Thaïlande), le Mam-tom et le Mam-tep (Vietnam).

D'après le ministère des Pêches du Vietnam (2001), l'île de Phu Quoc, dans la province de Kien Giang, compte environ 100 installations de production de sauce de poisson avec une capacité d'environ 10 millions de litres par an, soit environ 5% de la production nationale qui est évaluée à 200 millions de litres par an. Seule une petite quantité est exportée, car l'utilisation de la sauce de poisson est faible dans le reste du monde. La majorité de cette production est donc consommée par la population vietnamienne.

Selon les statistiques de la FAO de 2005, les poissons de faible valeur commerciale représentent 933 183 tonnes pour le Vietnam (2001), 765 000 tonnes pour la Thaïlande (1999) et 78 000 tonnes pour les Philippines (2003). D'après le rapport du ministère des Pêches du Vietnam, 25% de la production totale de poisson sont annuellement transformés en sauce de

poisson, soit l'équivalent d'environ 233 000 tonnes de matière première.

Ces dernières années, la consommation mondiale de sauce de poisson a augmenté avec l'engouement croissant pour les mets asiatiques, tels les plats vietnamiens et thaïlandais et les sushis. Selon la FAO, l'exportation mondiale de produits à base de poisson fermenté, dont la sauce de poisson est de l'ordre de 310.000 tonnes au début des années 2000 représentant une valeur marchande de plus de 800 millions de dollars.

#### 1.1.1.1. Matières premières dans la production de la sauce de poisson

Les matières premières principalement utilisées pour la production de sauce de poisson sont le poisson et le sel avec à de rares occasions l'utilisation de compléments. La majorité des sauces sont fabriquées à partir de poissons marins. Ces poissons sont généralement des petits poissons de faible valeur commerciale tels: l'anchois, le hareng ou la sardine (Tableau 1.2). Actuellement, ce sont les sauces à base d'anchois (*Stolephorus spp*) qui ont la préférence des consommateurs.

Quelques travaux dont ceux de Lafon (1950) font état de la possibilité d'accroître la production de Nuoc-mam à partir de poissons d'eau douce.

**Tableau 1.2** Matières premières utilisées pour la production de sauce de poisson

| Nom de poisson | Pays        | Références                           |
|----------------|-------------|--------------------------------------|
| Anchovy        |             | Youngsawatdigul <i>et al.</i> , 2007 |
|                | Vietnam     | Udomsil <i>et al.</i> , 2011         |
|                | Philippines | Lafon, 1950                          |
|                | Thaïlande   | Kim <i>et al.</i> , 2004             |
|                | Corée       | Jae-Hyung <i>et al.</i> , 2009       |
|                | Malaisie    | Ling <i>et al.</i> , 2011            |
| Sardine        |             | Zaman <i>et al.</i> , 2011           |
|                | Thaïlande   | Jung-Nim <i>et al.</i> , 1999        |

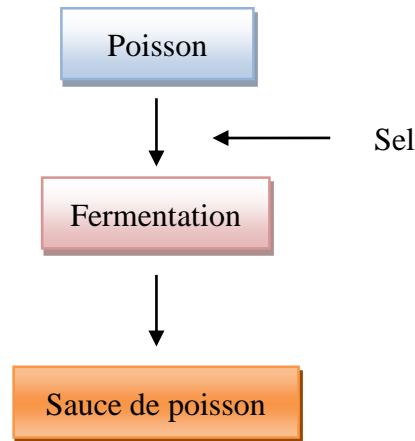
|   |                  |   |
|---|------------------|---|
|   | Indonésie        | Kilinc <i>et al.</i> , 2006   |
|   | Japon            | FAO, 1971   |
|   | Turquie          | Frans et Yoshiyuki, 1996  |
|   | Thaïlande        | FAO, 1971   |
| <i>Clupeidae</i>                                    | Philippines      | Bersamin et Napudan, 1962   |
|   | Vietnam          | Lafon 1950  |
| Round scad ( <i>Decapterus macrosoma</i> )          | Vietnam          | Hariono <i>et al.</i> , 2005<br>Lafon 1950  |
| Merlu du Pacifique ( <i>Merluccius productus</i> )  |                  | Lopetcharat <i>et al.</i> , 2001<br>Tungkawachara <i>et al.</i> , 2003                          |
| Salmon  | Japon<br>Norvège | Kaoru <i>et al.</i> , 2006<br>Yoshikawa <i>et al.</i> , 2010a,b<br>Paulsen <i>et al.</i> , 2013 |
| Flying-fish ( <i>Cypselurus ago agoo</i> )          | Japon            | Taira <i>et al.</i> , 2007  |
| Dolphinfish ( <i>Coryphaena hippurus</i> )          | Japon            | Taira <i>et al.</i> , 2007  |
| Deep-sea smelt ( <i>Glossanodon semifasciatus</i> ) | Japon            | Taira <i>et al.</i> , 2007  |
| Squid ( <i>Symplectoteuthis oualaniensis</i> )      | Chine            | Xu <i>et al.</i> , 2008   |
| Goby-fly ( <i>Ostrea spp</i> )                      | Philippines      | Bersamin et Napudan, 1962   |
| <i>Scomber, rastrelliger</i>                        | Thaïlande        | FAO, 1971   |

---



---

### 1.1.1.2. Procédé générique



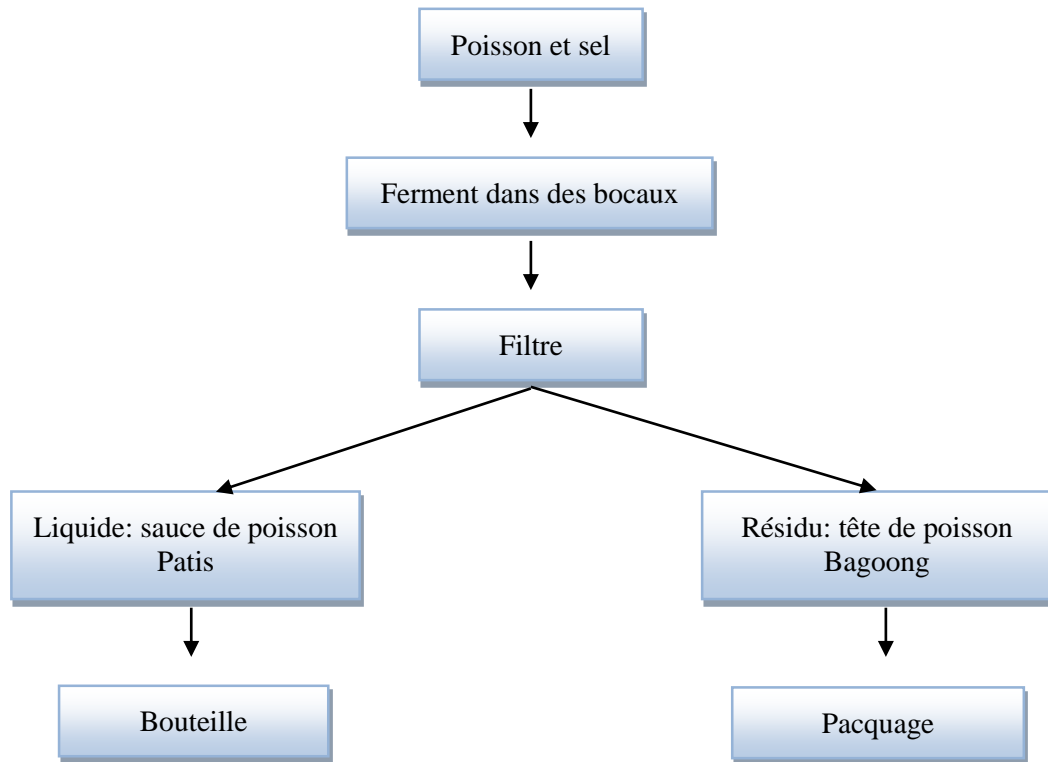
**Figure 1.2 Procédé générique de la production de la sauce de poisson**

Traditionnellement, la production de sauce de poisson commence par le nettoyage du poisson frais à l'eau froide pour enlever les impuretés et réduire la quantité de microorganismes (Lopetcharat *et al.*, 2001).

Une fois lavés, les poissons sont mélangés avec du sel selon un ratio poisson / sel de 2:1 à 3:1 et fermentés à température ambiante pendant 6-24 mois, selon la zone de production (Lopetcharat *et al.*, 2001 ; Jung-Nim *et al.*, 2001 ; Fukami *et al.*, 2002). Les fortes teneurs en sel des saumures diminuent l'activité des enzymes endogènes et sont nécessaires pour prévenir l'altération u mélange de poissons fermentés (Aspmoa *et al.*, 2005) (Figure 1.2).

À la fin de la période de fermentation, le liquide surnageant est évacué et filtré à travers des lits de sable. Le filtrat peut être exposé au soleil de 1 à 3 mois pour améliorer la couleur et l'arôme de la sauce avant le conditionnement et la distribution. Le résidu, qui contient des tissus de poissons non hydrolysés, est à nouveau traité avec une solution saturée de saumure pendant un maximum de trois mois et immédiatement mis en bouteille (Chaveesuk *et al.*, 1993). Afin d'améliorer la couleur et la saveur de la sauce de poisson, des colorants (comme le caramel) et des additifs sont également ajoutés (Lopetcharat *et al.*, 2001). Parmi toutes les étapes de ce procédé, il s'avère que la période de fermentation est la plus contraignante de par sa durée très longue (9-12 mois).

### 1.1.1.3. Particularités de chaque pays



**Figure 1.3 Procédé de production du Patis traditionnel (FAO, 1990)**

Aux Philippines, la sauce de poisson est appelée "Patis". Elle est obtenue comme sous-produit pendant la fabrication de la pâte de poisson (Figure 1.3) et elle ressemble en tout point au Nuoc-mam, tant par les espèces de poisson utilisées que par le mode de fabrication (Bersamin et Napudan, 1962). Les sauces de meilleure qualité sont celles qui sont préparées à partir d'anchois (*Stolephorus* spp), de Goby-fly, de clupéidés et de petites crevettes connues sous le nom "crevette filtreuse" (*Atya* spp). Hamm et Clague, (1950) recommandent de préparer le Patis avec suffisamment de sel pour arriver à saturation soit un ratio poisson/sel de 3-5:1 en fonction des matières premières. Ces auteurs ont montré qu'une exposition à des températures allant jusqu'à 45°C pendant la première semaine de fermentation était favorable et que le taux de digestion dépendait de la pureté du sel.

Pour obtenir le Patis, la fermentation se fait classiquement dans des jarres de terre ou dans des réservoirs en matériau similaire. Elle est longue et dure généralement de six mois à un an. Le taux de fermentation peut varier en fonction du pH, du mélange et de la température (Dagoon, 2000). L'exposition à la lumière du soleil peut également réduire le temps

nécessaire de deux mois (Sanchez, 2008). Au cours du processus de fermentation, les constituants des poissons ou des crevettes se désintègrent pour aboutir à un liquide clair et jaunâtre de bonne qualité, le Patis, qui peut être récolté dès qu'il développe son odeur caractéristique (Figure 1.4). Il est alors pasteurisé puis mis en bouteille, tandis que le résidu est transformé en Bagoong par fermentation pendant 60 à 90 jours (FAO 1990).

Le Bagoong est riche en protéines (10,3g/100g), en calcium (535mg/100g), en phosphore (313mg/100g) et en rétinol (360µg/100g). Le Patis est également riche en protéines (10,6g/100g), mais il contient moins de minéraux et de vitamines que le Bagoong (Sanchez, 2008).



**Figure 1.4 Patis, une sauce de poisson aux Philippines**

En Thaïlande, l'industrie de la sauce de poisson s'est bien développée dans le nord et le nord-est du pays. Le nom local de cette sauce est "Nam-Pla" (น้ำปลา). Elle est préparée de préférence à partir de *Stolephoru spp*, mais les espèces de *Scomber*, *Rastrelliger* et certains *Clupeidae* sont également utilisées. On la prépare aussi avec des poissons d'eau douce (*Cirrhinus*) en Thaïlande centrale. En général, on utilise moins de sel pour la fabrication du Nam-Pla que pour celle du Nuoc-mam.

Le Nam-Pla est fabriqué en mélangeant trois volumes de petits poissons entiers (*Stolephorus* ou *sardinelles*) avec un ou deux volumes de sel ; l'ensemble est ensuite transféré dans des grands réservoirs en béton. Les poissons sont conservés avec de la glace et du sel marin de la capture au transfert en usine. L'hydrolyse des protéines, pendant la fermentation, repose principalement sur l'action des protéases endogènes contenues dans le muscle de poisson et les viscères, ainsi que des protéases produites par des bactéries halophiles. La sauce de poisson traditionnelle est obtenue par filtration et mise en bouteille telle quelle ou mélangée avec des ingrédients pour obtenir des produits finis (Gildberg et Thongthai 2001, Yongsawatdigul *et al.*, 2007, Wichaphon *et al.*, 2011) (Figure 1.5).



**Figure 1.5 Nam-Pla, une sauce de poisson thaïlandaise**

En Malaisie, le budu est une sauce préparée avec de petits anchois. Elle est obtenue en mélangeant cinq parties de poisson avec une partie de sel, dans des jarres de terre cuite contenant du sucre de tamarin (fruit du tamarinier) et du sucre de palme. Après six semaines, la chair de poisson s'est décomposée pour former une sauce sombre de saveur sucrée dont la durée de conservation pourrait atteindre deux ans (FAO, 1971) (Figures 1.6)



**Figure 1.6 Budu, une sauce de poisson en Malaisie**

En Indonésie, on fabrique une pâte de poisson appelée "Trassi". La méthode de transformation diffère de celle du Vietnam. Le mélange n'est pas placé dans un récipient, mais séché au soleil en couches minces. Le "Trassi udang" est préparé à partir de petites crevettes appelées "rabon". Au cours de la transformation, la teneur en eau diminue de 80 % à 50%. L'odeur désagréable due à la décomposition disparaît graduellement. Le produit fini contient généralement 50 à 75% d'eau, 15 à 20% de sel et 27 à 30% de matière sèche (FAO, 1971) (Figure 1.7).

Le Bakasang est un produit traditionnel de poisson fermenté largement consommé dans l'est de l'Indonésie. La sauce est produite à partir de la fermentation de petits poissons (ou de viscères de gros poissons prélevés lors du processus de fumage) qui ont été prétraités avec du sel à environ 150-200 g/kg (poids humide). Dans le procédé traditionnel, le poisson est placé dans des bouteilles bouchées qui sont conservées dans un local chaud (généralement près de la source de chauffage de la maison). La fermentation dure environ 3 à 6 semaines. La température n'étant pas contrôlée, elle peut varier de 30 à 50°C. Sous l'action de la fermentation, le poisson frais est dégradé pour former un mélange épais, salé, brun clair, qui possède un arôme et une saveur caractéristique (Frans et Yoshiyuki, 1995) (Figure 1.7).



**Figure 1.7 Trassi et Bakasang, les produits de l'Indonésie**

Au Myanmar, le "Ngapi" est préparé de la même manière que le "Pra hoc" en république Khmère (un produit du Sud Vietnam). Ce produit contient fréquemment de grandes proportions de poisson. Un mélange comparable, appelé "Belachan" est fabriqué en Malaisie avec de petites crevettes. Une quantité relativement faible de sel est utilisée (4 à 5kg pour 100kg de crevettes). Il est probable que la décomposition d'origine bactérienne soit importante et que le produit soit quelque peu dangereux pour la santé (Figure 18).



**Figure 1.8 Ngapi, un produit du Myanmar**

Le Japon est tout particulièrement intéressant, car une grande diversité de produits à base de poisson fermenté y est fabriquée. Cela va des sauces à base de poisson, obtenues avec des produits viscéraux fermentés (Shiokara), aux produits type "Izushi" (fermentation combinée avec des glucides) jusqu'aux produits fermentés destinés à l'alimentation animale.

Le Shottsuru (しよつる) est une sauce de poisson piquante, condiment traditionnel de la région d'Akita (Figure 1.9). Il est semblable au Nam-Pla thaï. Il est généralement fabriqué à partir d'un trichodontidé, le "Sand Fish" ou hatahata (*Arctoscopus japonicus*) (Rao, 1967). Dans le passé, le Shottsuru était produit à la maison ; aujourd'hui seul un petit nombre de producteurs demeure. Quelques-uns utilisent encore la méthode traditionnelle avec comme ingrédients, du hatahata et du sel exclusivement. Un obstacle à la survie de cette tradition a été la baisse drastique de la pêche de hatahata dans les années 1990.

Le Shottsuru est également réalisé à partir de sardines, d'anchois et de mollusques, en particulier de calmars. Après fermentation, le liquide est filtré, bouilli et peut alors être conservé pendant des années. Ce produit est parfois transformé en "Shyoyu" par adjonction de déchets de graines de soja ou de "Koji" de blé (blé fermenté avec de la levure). On fabrique du "Uwo-shyoyu" avec du hatahata et du "Ika-shyoyu" avec des viscères de calmar.



**Figure 1.9** Shottsuru, une sauce de poisson japonaise

Le Jeotgal (젓갈) ou Jeot est un produit salé fermenté, utilisé dans la cuisine coréenne comme additif pour améliorer le goût des aliments ou seulement comme un aliment en soi (Figure 1.10). Il est réalisé en ajoutant 20 à 30% de sel à divers types de produits de la mer, tels que les crevettes, les huîtres, les crustacés, le poisson, les œufs de poisson, les viscères de poisson. La conservation par le sel et la fermentation ultérieure permettent d'obtenir un produit consommable. Selon les principaux ingrédients et les méthodes de préparation régionales, plus de 160 sortes de Jeotgal existent en Corée dont 30 environ sont commercialisées (Ling *et al.*, 2011). Le Myeolchi-

Jeot est réalisé avec des anchois salés (environ 20%) mis à fermenter pendant une longue période (plusieurs années). Les anchois sont ici choisis, car ils contiennent souvent des teneurs en acides aminés élevées (Jae-Hyung *et al.*, 2009).



**Figure 1.10 Jeotgal, un produit coréen**

Le Nuoc-mam est le produit traditionnel du Vietnam. C'est un liquide riche en azote, essentiellement en acides aminés. Il est issu de l'hydrolyse des protéines de poisson grâce aux protéases du poisson.

Toute la production vietnamienne de Nuoc-mam est maintenant entièrement absorbée par le marché national, alors qu'auparavant le Vietnam exportait en Thaïlande et en Malaisie. Il est difficile de se procurer des informations au sujet des quantités produites. Le Nuoc-mam a été étudié de façon plus approfondie que toute autre sauce à base de poisson produite dans la région. D'une manière générale, les résultats applicables à ce produit le sont également aux autres sauces fabriquées en Asie du Sud-est (Boury, 1952).

Le Nuoc-mam est un liquide limpide, de couleur variant entre l'ambre jaune et le brun foncé, qui est riche en sel et en composés azotés solubles. Il est fabriqué habituellement à partir de petits poissons des genres *Stolephorus*, *Engraulis*, *Clupeoides*, *Dorosoma* et *Decapterus*. La méthode de fabrication consiste essentiellement à mélanger des poissons non éviscérés avec du sel dans des pots de terre cuite qui sont ensuite hermétiquement fermés puis enfouis sous terre. Quelques mois plus tard, les pots sont déterrés, ouverts et en décantant le liquide surnageant, on obtient le Nuoc-mam. Ce mode de fabrication traditionnel s'est répandu au Vietnam entre le 19<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> siècle.

Quand le Nuoc-mam est fabriqué pour la vente, de grandes cuves munies de robinets de bambou sont utilisées (Rao, 1967). Avec cet ancien procédé, des couches de poisson et de sel sont placées alternativement depuis le fond jusqu'à la partie supérieure de la cuve, la dernière couche étant une couche de sel. La proportion de sel varie selon l'espèce, mais en général 4 à



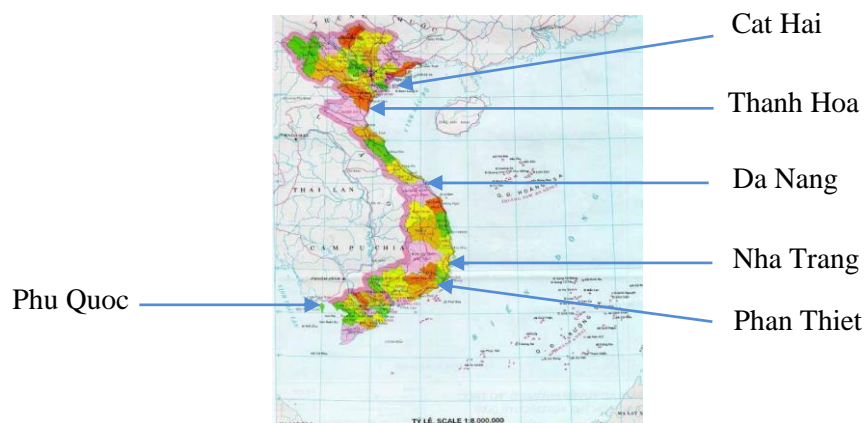
5 parties de sel sont utilisées pour 6 parties de poisson. Après trois jours d'incubation, on laisse s'écouler un liquide sanguinolent (Nuoc-boi) et ce pendant trois jours. Le Nuoc-boi est conservé à part. Le poisson est comprimé soigneusement et la surface supérieure aplanie. Une partie du Nuoc-boi est reversée sur les poissons jusqu'à ce qu'ils soient entièrement immergés. La cuve est ensuite couverte de plateaux en bambou sur lesquels de gros poids sont placés. Après des durées variables, déterminées par les dimensions et l'espèce des poissons, les robinets des cuves sont ouverts et le liquide fermenté soutiré. C'est ainsi qu'est obtenu le Nuoc-mam de première qualité (nuoc-nhat, nuoc-cot, mam-nhi). Un an, et parfois même davantage, est nécessaire pour fabriquer du Nuoc-mam avec de gros poissons, mais la durée est plus courte avec des petits poissons. Des Nuoc-mam de qualité inférieure sont préparés par lessivage des résidus présents dans les cuves avec une saumure fraîche ou de l'eau de mer. Leur qualité peut être améliorée en faisant passer la saumure dans une série de cuves ; l'opération peut être répétée plusieurs fois. On obtient alors un Nuoc-mam dont la teneur en azote diminue progressivement et qui se conserve moins longtemps. Dans certains cas, du miel caramélisé, du maïs ou du riz grillé est ajouté dans les cuves pendant le lessivage (Figure 1.11).



**Figure 1.11** Quelques marques de Nuoc-mam au Vietnam

Aujourd'hui, il y a trois méthodes de fabrication de Nuoc-mam au Vietnam. La méthode "danh-khuay" (mélange) est appliquée au nord alors que la méthode "gai-nen" (compression) est appliquée au sud. Une méthode mixte existe également (Figure 1.12).





**Figure 1.12 Les régions de production de la sauce de poisson au Vietnam**

La méthode "danh-khuay" (mélange) est spécifique de Cat Hai (Hai Phong, Vietnam), elle diffère de celles des autres régions, par l'addition d'eau de source (Figure 1.13). Du sel est ajouté à plusieurs reprises en remuant constamment afin de faciliter l'activité enzymatique, la diminution des microorganismes et ainsi de raccourcir la durée de production du Nuoc-mam.



**Figure 1.13 Production de la sauce de poisson à Cai Hai, Hai Phong, Vietnam**

Avec la méthode gai-nen (compression), les poissons sont mélangés dès le début avec le sel puis l'ensemble est comprimé. Il n'y a ni ajout d'eau ni agitation. Cette méthode est réalisée de Thanh-Hoa à Da-Nang et dans les provinces du Sud et Centre Vietnam.

Une méthode "mixte" combine les deux méthodes précédentes afin de profiter des avantages de chacune. Des couches de poisson et de sel sont disposées alternativement et la dernière couche de poisson est recouverte par une plus grande quantité de sel. Pour les petits poissons, il est ajouté environ 25 à 30% de sel et 30 à 35% pour les plus gros. Cette étape est la même que dans la méthode "gai-nen". Quand le liquide des cuves atteint 22 à 25° baumés,

la sauce contient suffisamment de sel; le liquide est alors soutiré, mélangé (méthode "danh-khuay"), exposé au soleil et remis dans les cuves, à plusieurs reprises (Figure 1.14).



**Figure 1.14 Méthode “mixte” à Phu Quoc, Phan Thiet, Nha Trang (Vietnam)**

Aujourd’hui, l’évolution de la technologie et des équipements fait que les procédés de production de sauce de poisson ont changé, cependant ils sont encore structurés sur la base des méthodes traditionnelles.

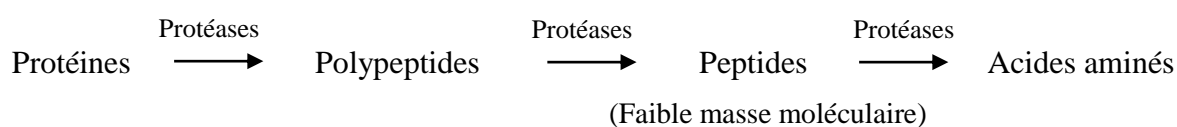
Dans la sauce de poisson vietnamienne, l’azote total est constitué de différents groupes de composés. Une étude de Jung-Nim *et al.*, (2001) indique qu’ils se répartissent de la manière suivante : 10,7% d’acides aminés libres, 56,6% d’acides aminés totaux, 20,0% de peptides, 3,4% de pyroglutamate, 4,0% de nucléosides et de bases, 3,2% de créatine et de créatinine. La somme de 97,9% suggère que presque tous les composés contenant de l’azote ont été déterminés dans la présente expérience (Jung-Nim *et al.*, 2001). La teneur en acides aminés totaux est plus élevée dans les sauces vietnamiennes, puis dans les japonaises et les thaïlandaises. Les sauces de poisson provenant de ces trois pays ont montré des compositions similaires en acides aminés, tels que l’acide aspartique, l’acide glutamique, l’alanine, la valine, la lysine et l’histidine. Les composés responsables du goût (35) ont été déterminés pour un type de Nuoc-mam vietnamien de première qualité dont la teneur totale en composés extractibles atteint un maximum de 20g d’azote/100 ml (Jung-Nim *et al.*, 2001 ; Jung-Nim *et al.*, 2002).

## 1.2. Détail du procédé traditionnel de fabrication des sauces de poisson

### 1.2.1. Liquéfaction par protéolyse

#### 1.2.1.1. Enzymes digestives

Pendant la fermentation, la protéolyse s'effectue par les protéases endogènes du muscle de poisson et des organes digestifs. Le schéma de la dégradation des protéines dans le processus de production de sauce de poisson traditionnelle est présenté ci-dessous. Les protéases attaquent les liaisons peptidiques des molécules de protéines pour les rompre, des peptides plus courts sont générés et au final des acides aminés sont libérés. Cette hydrolyse est bien évidemment progressive.



Les viscères des poissons sont une source importante d'enzymes, en particulier de protéases essentiellement produites par leurs glandes digestives. Comme les protéases de plantes, d'animaux et de microorganismes, les protéases digestives des animaux marins coupent les liaisons peptidiques avec la participation des molécules d'eau en tant que réactif (Simpson, 2000). Ces protéases digestives ont été étudiées sur plusieurs espèces de poissons et de décapodes et il apparaît que leur distribution change selon les espèces, mais aussi les organes (Garcia-Carreno et Haard, 1993). Torrissen (1984) a ainsi rapporté que l'activité protéolytique de l'intestin de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*) est supérieure à celle du saumon atlantique (*Salmo salar*). De même, l'activité protéolytique du cæcum pylorique est supérieure chez le saumon royal (*Oncorhynchus tshawytscha*) par comparaison avec celle de la truite arc-en-ciel (Dimes *et al.*, 1994). Pour le discus commun (*Symphysodon aequifasciatus*), l'activité protéolytique s'est révélée plus élevée dans l'intestin que dans l'estomac (Chong *et al.*, 2002).

Dans les intestins de poissons les protéases trouvées sont la trypsine, la chymotrypsine, la collagénase, l'élastase, la carboxypeptidase et les estérases carboxyliques. Elles sont normalement sécrétées par le cæcum pylorique et le pancréas (Haard, 1994).

La pepsine est présente dans l'estomac du poisson et active en conditions acides (Gildberg *et al.*, 1990), tandis que la trypsine est concentrée dans le cæcum pylorique et active en conditions neutres *et alcalines* (Ásgeirsson *et al.*, 1989).

Des études portant sur le merlu du Pacifique (*Merluccius productus*) ont montré que, lors des processus de fermentation des sauces de poisson, l'activité de la cathepsine H était extrêmement faible tandis que la cathepsine B s'avérait être l'enzyme la plus active (Kang et Lanier 2000 ; Tungkawachara *et al.*, 2003). An *et al.*, (1994) ont signalé que la cathepsine L avait l'activité la plus haute à 55°C, tandis que la cathepsine B possédait la plus grande activité entre 20 et 37°C et la cathepsine H à 20°C. Par conséquent, la cathepsine B pourrait être une enzyme importante pour le développement de l'arôme de la sauce de poisson pendant la période de fermentation. Néanmoins, il ressort que les activités des cathepsines H, B et L diminuent rapidement et régulièrement au bout du premier mois d'incubation. Au bout de 9 mois, les activités enzymatiques sont même négligeables probablement à cause de la force ionique élevée due à la forte teneur en sels qui affecte alors la stabilité des enzymes (Stauffer 1989 ; Tungkawachara *et al.*, 2003).

Dans le processus de fabrication des sauces de poisson, les protéases principalement impliquées sont : la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, et la cathepsine. Cependant, les fortes teneurs en sel des saumures diminuent l'activité de ces enzymes endogènes, la vitesse d'autolyse est donc lente, ce qui se traduit par des périodes de maturation allant de 6 à 12 mois, voire plus parfois. Pendant cette maturation, la couleur, l'odeur et la saveur de ce qui deviendra la sauce de poisson évoluent. Ce n'est qu'après une longue phase de fermentation que les protéines sont entièrement solubilisées et que se développent l'odeur, la saveur et la couleur du Nuoc-mam (Dissaraphong *et al.*, 2006).

#### **1.2.1.2. Enzymes bactériennes**

Lors de la production de la sauce de poisson, la protéolyse s'effectue par des protéases endogènes, mais aussi par le biais de protéases microbiennes produites par des bactéries telles, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Halococcus* sp., *Halobacterium Salinarium*, *Halobacterium cutirubrum* (Gildberg et Thongthai, 2001; Šližytė, 2005; Tungkawachara *et al.*, 2003). De très nombreux travaux ont porté sur l'étude et la caractérisation de ces protéases bactériennes. Choorit et Prasertsan (1992) ont ainsi rapporté

que sur huit souches de *Bacillus* isolées à partir de poissons fermentés (Budu), quatre isolats possédaient une activité élevée de protéase. Ils ont déterminé que le pH optimal pour ces enzymes se situait entre 7,0 et 8,0 et que leur température optimale était de 55°C. Ils ont aussi montré que ces protéases gardaient 40% de leur activité d'origine après 20 min à 55°C mais qu'elles perdaient toute activité à 65°C. Trois des quatre isolats ont été identifiés comme *Bacillus subtilis*, le quatrième comme *Bacillus licheniformis*. Anihouvi *et al.*, (2007) ont eu rapporté que *Bacillus* sp. et *Staphylococcus* sp. possédaient des activités protéolytiques et lipolytiques alors que *Micrococcus* sp. ne présentait qu'une faible activité protéolytique. Dans tous les cas, les activités protéolytiques et lipolytiques d'origine microbienne sont le fait de bactéries halophiles peu affectées par la forte teneur en sel du milieu (Akolkar *et al.*, 2010 ; Fukami *et al.*, 2004 ; Yuen *et al.*, 2009; Udomsil *et al.*, 2011 ; Youngsawatdigul *et al.*, 2007). Néanmoins, il peut arriver que même si des bactéries halophiles soient détectées, leur activité enzymatique ne suffise pas à expliquer la protéolyse. C'est le cas par exemple dans une étude portant sur la fabrication du Jeotgal où bien que *Halodenitrificans virgibacillus* KM2100 et *Staphylococcus* spp continuaient à se multiplier en présence de 20% de NaCl, aucune activité protéolytique n'ait été détectée (Ling *et al.*, 2011).

### 1.2.2. Le rôle des microorganismes

Une grande variété de microorganismes intervient lors du processus d'élaboration des sauces de poisson. Comme le décrit Orejana (1983), il y a : (i) les organismes naturellement présents dans les poissons, *Predominandy*, *Pseudomonas* et *Achromobacter*, (ii) les organismes associés à l'eau et l'environnement tels que les genres *Clostridium* et *Escherichia*, (iii) les organismes terrestres qui ne sont pas normalement associés à l'environnement marin et (iv) les organismes associés au sel marin et à d'autres additifs, par exemple *Bacillus*, *Micrococcus* et *Halobacterium*.

Ces bactéries, pour la plupart halophiles peuvent jouer un rôle dans la dégradation des protéines, mais elles interviennent également dans le développement de composés responsables de l'odeur et de la saveur typique des sauces de poissons. Ainsi, lorsque la sauce de poisson est produite dans des conditions aseptiques, l'odeur caractéristique de sauce de poisson ne se développe elle pas (Beddows et Ardeshir 1979a). Les bactéries présentes dans les sauces de poisson peuvent donc être classées en deux catégories: les bactéries produisant des enzymes

protéolytiques et les bactéries contribuant à la saveur et au développement des arômes.

En fait il semblerait même que les microorganismes ne jouent pas forcément un rôle majeur dans la protéolyse de poissons, leur nombre décroissant régulièrement au fur et à mesure que la fermentation progresse, ils sont néanmoins responsables du développement de l'arôme caractéristique des sauces de poisson (Hamm et Clague 1950; Saisithi *et al.*, 1966).

Il a ainsi été montré que l'action microbienne intervenait dans la production d'acides volatils notamment par le fait que la plupart des acides trouvés atteignent des concentrations très élevées dans les poissons incubés sans sel (Beddows *et al.*, 1979 et 1980 ; Sanceda *et al.*, 1986).

Lopetcharat et Park, (2002) ont estimé que les microorganismes devaient jouer un rôle important dans l'étape ultérieure de la fermentation et dans la phase de maturation et que la dégradation des protéines par les bactéries conduisait à la production de composés volatils à partir d'acides aminés et de petits peptides. Récemment, Udomsil *et al.*, (2011) ont montré que *T. halophilus* favorisait l'augmentation de la teneur en acides aminés qui servaient de précurseurs aux aldéhydes, composés importants de la sauce de poisson. En présence de *T. halophilus*, les acides aminés libres augmentaient et contribuaient ainsi à la saveur "umami" et sucrée de la sauce de poisson.

Ce n'est que récemment que des sauces de poissons ont étéensemencées avec des microorganismes sélectionnés. En 2011, Zaman *et al.*, ont utilisé *Staphylococcus carnosus* FS19 et *Bacillus amyloliquefaciens* FS05. Il s'est avéré que ces bactéries ont effectivement hydrolysé les protéines d'anchois tout en produisant des précurseurs d'acides aminés libres permettant ainsi la formation d'amines par des décarboxylases.

### **1.3. Les paramètres influents et les modifications au cours du temps**

#### **1.3.1. Température**

La température est un des paramètres clés intervenant lors des processus d'hydrolyse en général et d'autolyse en particulier. Pour les sauces de poisson, il s'avère que, dans une certaine limite (de 30 à 47°C), la vitesse d'hydrolyse apparaît proportionnelle à la température (Yongsawatdigul *et al.*, 2004, Lopetcharat *et al.*, 2001). Néanmoins, quand la température dépasse cette valeur haute, non seulement la vitesse d'hydrolyse n'augmente plus, mais elle

peut même diminuer par dénaturation thermique des enzymes (la plupart des enzymes qui interviennent sont inactivées à des températures supérieures à 70°C).

Comme le suggère certains auteurs une augmentation raisonnée de la température pourrait donc accélérer le processus de fabrication de la sauce de poisson par un accroissement de l'activité enzymatique et donc l'obtention de degré d'hydrolyse plus élevé (Lopetcharat *et al.*, 2001 ; Lopetcharat et Park, 2002 ; Yongsawatdigul *et al.*, 2004). Ces auteurs situent la température optimale entre 35 et 45°C, une température trop haute pouvant entraîner en plus de la dénaturation des enzymes, l'apparition de caractéristiques sensorielles inappropriées.

### 1.3.2. Sel

Le sel est une matière première indispensable pour la fabrication de la sauce de poisson, car il contribue à la prévention de la dégradation des poissons. En effet, une concentration élevée en sel (20% à 30%) freine la prolifération bactérienne et donc l'altération des poissons. Cependant, de trop fortes concentrations en sel peuvent en général s'avérer inhibitrices de l'activité enzymatique et particulièrement de l'activité protéasique (Klomllao *et al.*, 2006). A l'inverse, une réduction de la teneur en sel accélère la protéolyse (Gildberg *et al.*, 1984; Gildberg et Thongthai 2001; Klomklao *et al.*, 2006c), mais de trop faibles concentrations peuvent s'avérer néfastes, car le développement bactérien n'étant plus limité, cela entraîne l'apparition d'odeurs indésirables.

Pendant la fermentation, si la teneur en sel de la sauce de poisson peut légèrement augmenter les premiers jours elle se stabilise ensuite atteignant ainsi un équilibre (Chayovan *et al.*, 1983a ; Lopetcharat et Park 2002 ; Yongsawatdigul *et al.*, 2004). Néanmoins, compte tenu de la très grande diversité des procédés de fabrication, celle-ci peut être très variable : 15,7% dans une sauce laotienne, 18% dans une sauce japonaise, 20,2% dans une sauce vietnamienne et de 21,4 à 22,7% dans des sauces de Thaïlande, de Chine, de Sud-Corée et de Myanmar (Jung-Nim *et al.*, 2001, 2002).

La qualité du sel est également importante. Plus celui-ci est pur, plus la qualité de la sauce de poisson sera bonne. Par exemple, une amertume peut survenir si les teneurs en chlorure de calcium et chlorure de magnésium sont trop élevées. Par ailleurs, plus les cristaux de sel seront petits, plus rapide sera leur dissolution et plus la dégradation du poisson sera sous

contrôle. Idéalement, il convient donc d'utiliser un sel de grande pureté se présentant sous la forme de petits cristaux. La teneur en sel optimale sera à adapter à chaque production.

### 1.3.3. pH

Comme pour la température, le pH module également l'activité des enzymes impliquées dans l'élaboration des sauces de poissons. Chaque enzyme a une gamme de pH optimale qui lui est propre. Cependant, les principales enzymes qui interviennent ici sont des trypsines et des pepsines qui fonctionnent parfaitement au pH naturel de la chair du poisson.

La diminution du pH observée lors de la fermentation peut être associée à des acides organiques comme l'acide lactique, l'acide acétique, produits par certains microorganismes (Achinewhu et Oboh, 2002 ; Achinewhu *et al.*, 2004) . Inversement, l'augmentation du pH peut être causée par la formation de composés basiques tel de l'azote volatil (Ing-Lung *et al.*, 2003 ; Wichaphon *et al.*, 2011). Les deux phénomènes peuvent être observés selon les procédés mis en œuvre.

Ainsi, Ijjon et Ohta (1996) ont rapporté que le pH du Bakasang (sauce de poisson fermentée indonésienne) variait de 5,95 à 6,50. Chaveesuk *et al.*, (1993) ont eux constaté que la valeur du pH final de la sauce de poisson produite à partir de hareng de l'Atlantique (*Clupea harengus*) variait de 5,82 à 5,85. Enfin Aquerreta *et al.*, (2001) ont trouvé une variation de pH de 4,90 à 5,42 dans le Garum (sauce de poisson fermentée en Grèce) probablement à cause de l'accumulation de composés basiques.

A l'inverse, une maturation de 6 mois de merlu frais du Pacifique entraîne une diminution de pH (6,93 – 5,6) probablement liée à la présence d'ions libres d'hydrogène, d'acides aminés libres, et d'acides aminés d'oligopeptides (Tungkawachara *et al.*, 2003).

Plusieurs paramètres peuvent expliquer ces variations et cette très grande diversité de pH observées. En premier lieu la quantité de sel mise en jeu intervient. Ainsi le pH d'un échantillon contenant 100g sel/kg de sardine sera inférieur à celui d'un échantillon ayant 200g sel/kg, (5,5 et 5,9, respectivement). La teneur en glucose semble également déterminante, les échantillons en contenant le plus présenteront une plus grande diminution de pH (Frans et Yoshiyuki, 1996). Achinewhu et Oboh (2002) suggèrent à ce propos que ceci pourrait être attribué à l'activité de *Lactobacillus* sp. qui utiliserait les glucides du milieu pour produire de



l'acide lactique. Enfin, l'ajout de microorganismes contribue également à modifier plus ou moins fortement l'équilibre acido-basique des sauces de poisson (Hariono *et al.*, 2005). Ainsi, l'adjonction de *Aspergillus oryzae* et *Monascus purpureus* dans une sauce de bonite entraîne une augmentation de 3 unités de pH (5 – 8) au cours de la fermentation (Ing-Lung *et al.*, 2003). Sur des sauces traditionnelles malaisiennes à base d'anchois, l'alcalination est du même ordre au bout de 120 jours lorsque *Staphylococcus carnosus* FS19 et *Bacillus amyloliquefaciens* FS05 sont ajoutés (Zaman *et al.*, 2011).

Au final, les sauces commerciales traditionnelles ont donc un pH très variable : 4,9 au Laos, de 5,4 à 5,8 au Vietnam, en Thaïlande, au Japon et en Corée; de 6,15 en Chine, de 6,23 au Myanmar (Jung-Nim *et al.*, 2001, 2002).

#### **1.3.4. Modifications biochimiques**

##### **1.3.4.1. Modifications au niveau des composés azotés**

Des composés azotés solubles, tels que certains peptides et des acides aminés libres sont générés par la protéolyse lors du processus de fabrication de la sauce. Ces composés azotés proviennent bien évidemment des protéines, mais aussi des composés non protéiques tels que les nucléotides, l'ammoniaque et l'urée (Shahidi, 1995; Finne, 1992 ; Jung-Nim *et al.*, 2001, 2002). La teneur en azote total est utilisée comme indicateur pour déterminer la catégorie et le prix de la sauce de poisson. En Thaïlande, les produits contenant une teneur en azote total supérieure à 20 g/l sont placés en "catégorie I" et avec 15 à 20 g/l en "catégorie II" (Thaïs Industriel Standard, 1983). Au Vietnam, avec une teneur en azote total de 25 g/l le produit est considéré "spécial", avec 20 g/l "surfin", avec 15 g/l il est mis en "catégorie 1" et avec 10 g/l "en catégorie 2" (TCVN 5107-2003). Dans une enquête sur les sauces de poissons asiatiques, Jung-Nim *et al.*, (2001) signalent que ce sont les échantillons vietnamiens qui ont la teneur en azote total la plus élevée, puis viennent ceux du Japon et de Thaïlande, la plus faible étant pour les sauces du Myanmar et du Laos. Ces différences peuvent être dues à de nombreux paramètres tels la matière première utilisée, le procédé, le temps de fermentation, ...

Lopetcharat et Park, 2002 ont ainsi rapporté que la teneur en azote total de la sauce de merlu du Pacifique (*Merluccius productus*) augmente de 6,40 à 15,7 g N/l pendant les 10 premiers jours de fermentation. Une étude de Taira *et al.*, (2007) a quant à elle montré que

l'azote total dans des sauces de coryphènes (*Coryphaena hippurus*) et les poissons-volant du Japon (*Cypselurus agoo agoo*) augmentait fortement au cours des 30 premiers jours de fermentation, puis ensuite progressivement jusqu'à 90 jours, pour ensuite rester constante jusqu'à la fin de la fermentation.

L'azote aminé qui traduit la quantité d'acides aminés libres augmente aussi fort logiquement au cours de la fermentation et donc de la protéolyse. Là aussi, de très nombreux facteurs influent sur ce critère. Tungkawachara *et al.*, (2003) ont par exemple montré que après 9 mois de fermentation, la quantité d'acides aminés libres de la sauce de poisson fabriquée à partir de merlu du Pacifique était deux fois plus élevée (38,37mg/ml) que pour une sauce de poisson réalisée avec un mélange de merlu du Pacifique et de co-produits (16,56 mg/ml). Ces variations se ressentaient également sur les teneurs en azote total et reflétaient très certainement des différences dans le degré d'hydrolyse.

La teneur en azote aminé représente la quantité de groupes amines dans la sauce de poisson, elle est directement liée à la dégradation des polypeptides (Tungkawachara *et al.*, 2003). L'azote aminé est généralement utilisé comme indicateur du degré de fermentation (Lopetcharat *et al.*, 2001). Cette teneur commence d'abord par augmenter dans les premiers jours pour atteindre un maximum vers 10 à 15 jours puis diminue ensuite régulièrement pour atteindre son minimum (Lopetcharat et Park, 2002). L'augmentation de la teneur en azote ammoniacal durant les premiers jours pourrait être due à des enzymes de poissons qui seraient très actives durant le début de la fermentation (Beddow *et al.*, 1980). La diminution quant à elle pourrait être causée par sa diffusion lente dans l'air. Une autre tentative d'explication serait la formation de base de Schiff dans la réaction des amines avec les aldéhydes ou les cétones (Wade, 1991).

#### **1.3.4.2. Modifications au niveau de l'histamine**

Dans les aliments, l'histamine ( $C_5H_9N_3$ ) est principalement formée à partir d'un acide aminé, l'histidine ( $C_6H_9N_3O_2$ ), par les décarboxylases des bactéries (Rodtong *et al.*, 2005). D'après Brillantes *et al.*, (2002), c'est l'histidine-décarboxylase présente dans le poisson qui est responsable de la production d'histamine au cours du processus de fermentation. Néanmoins ces auteurs notent que cette production d'histamine est limitée si les poissons utilisés sont frais. Yongsawatdigul *et al.*, (2004) considèrent eux qu'une légère augmentation

de la teneur en histamine dans la sauce de poisson au cours de la maturation est plutôt est révélatrice de l'activité de l'histidine-décarboxylase avant la fermentation, que de l'activité des bactéries halophiles pendant la fermentation. Sanceda *et al.*, (1999) précisent quant à eux que la forte concentration en sel inhibe la croissance de microorganismes susceptibles de produire l'histidine décarboxylase. Ce que confirme une étude récente démontrant que l'utilisation de concentrations en sel supérieures à 17% pouvait diminuer la formation d'histamine (Jesebel and Erlinda, 2012). Néanmoins, là aussi plusieurs facteurs peuvent s'avérer influents sur la teneur finale en histamine dans la sauce de poisson.

Taira *et al.*, (2007) ont par exemple montré que pour une même matière première et un même procédé, la formation d'histamine variait selon la nature des matériaux des cuves de fermentation (bois, béton, terre,...).

Toutefois, il est évident que ce sont les microorganismes et particulièrement les bactéries halophiles présentes dans le milieu qui sont à même de moduler le plus fortement le taux d'histamine dans la sauce. Il convient ici de distinguer 2 types de bactéries selon leur mode d'action antagoniste : celles qui vont produire de l'histamine et celles capables de la dégrader. Par exemple, *Staphylococcus epidermidis* TYH1, isolée pendant la fermentation de poisson japonais, est une bactérie produisant de l'histamine par l'intermédiaire d'une histidine-décarboxylase dont l'activité décroît avec l'augmentation de la teneur en sel (Ayumi *et al.*, 2014). Quelques études ont porté sur la recherche de bactéries à même de faire baisser le taux d'histamine dans les sauces de poisson et plusieurs souches ont pu être identifiées telles : *Bacillus amyloliquefaciens* FS-05, *Irgibacillus* sp. SK37, *Staphylococcus carnosus* FS-19, *Staphylococcus condiment* FS-22, *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 et *Virgibacillus* sp. KS33 (Yongsawatdigul *et al.*, 2007 ; Zaman *et al.*, 2011, 2014). Lorsque ces souches sont inoculées, une réduction notable de 15 à 60% de la teneur en histamine peut être observée par rapport à des lots témoins nonensemencés et ce même en présence de fortes concentrations de sel.

Quoi qu'il en soit, pour pouvoir être commercialisées, les sauces de poisson doivent présenter une teneur en histamine en deçà des seuils établis par différentes normes (TCVN 5107, 2003 ; codex 302, 2011 ; FDA, 2014), la teneur maximale autorisée étant en général de l'ordre de 400 ppm.

### **1.3.5. Modifications sensorielles**

#### **1.3.5.1. Modifications de couleur**

Lopetcharat et Park (2002) ont montré que la couleur brune de la sauce de poisson était due à une réaction de brunissement non enzymatique de type Maillard faisant intervenir des composés azotés et des sucres. Le brunissement progressif des sauces observé lors de l'entreposage est lié à l'augmentation régulière de la teneur en mélanoïdine (Lee *et al.*, 1977).

Les composés azotés nécessaires à cette réaction sont de type aminés libres et petits peptides résultants de la protéolyse. Même si la teneur en sucres réducteurs est faible dans le poisson, des dérivés de glucides, tels que le glucose-6-phosphate et autres substances présentes dans les voies métaboliques, peuvent également agir en tant que réactifs pour initier cette réaction de Maillard (Kawashima et Yamanaka, 1996).

Le type de matière première utilisée influe fortement sur la couleur finale du produit. Tungkawachara *et al.*, (2003) indiquent par exemple que la sauce de poisson fabriquée à partir d'un mélange de merlu du Pacifique et de sous-produits donne des résultats différents (plus faible acceptabilité de la couleur par un jury expert) que des sauces faites à partir de merlu entier ou d'anchois. D'une manière générale, les sauces produites à partir de poissons entiers sont plus sombres avec un développement plus rapide de la couleur brune que pour les sauces de poisson produites à partir de sous-produits.

Dans certains cas, il peut s'avérer utile de modifier la couleur de la sauce afin d'améliorer son acceptabilité. L'adjonction de microorganisme tel *T. halophilus* producteur d'acide lactique est efficace pour limiter le brunissement. L'utilisation de rayons gamma a aussi été étudiée (Kim *et al.*, 2004). Ces auteurs ont montré que lorsque les sauces étaient irradiées, la luminosité (L) et la couleur jaune (b) des échantillons diminuaient nettement après deux semaines. Cependant, une couleur requise peut assez facilement être obtenue par l'addition de caramel ou de mélasse (Beddows, 1985).

#### **1.3.5.2. Modifications de la saveur et des arômes**

Si la couleur est un facteur important pour l'acceptabilité des sauces de poisson traditionnelles par les consommateurs, la saveur et l'arôme s'avèrent être des paramètres

déterminants. L'arôme est même le premier indicateur de la qualité de la sauce de poisson d'après Ing-Lung *et al.*, (2003).

Selon Chayovan *et al.*, (1983b), les dégradations des protéines de poisson en acides aminés libres sont principalement responsables de la saveur agréable de la sauce de poisson. Plusieurs auteurs ont donc tenté d'identifier les acides aminés les plus influents sur le goût du produit. Pour Jung-Nim *et al.*, (2002), il s'agit de l'acide glutamique, la thréonine, l'alanine, la valine, l'histidine, la proline, la tyrosine, la cystine et méthionine. Chaveesuk lui identifie la lysine, l'arginine, l'alanine et l'acide glutamique. Quant à Tungkawachara *et al.*, (2003), ils considèrent que chaque acide aminé apporte sa propre saveur au mélange. Enfin pour Kaoru *et al.*, (2006) le goût « umami » caractéristique dépendrait essentiellement de la teneur en acide glutamique libre. Il apparaît donc que les acides aminés sont à même de moduler le goût de la sauce toutefois ce ne sont pas les seuls composés responsables.

En effet, Fukami *et al.*, (2004) ont démontré que divers composés volatils, comprenant des acides, des carbonyles, des composés azotés et des composés soufrés, se formaient pendant la fermentation et participaient à la formation de l'arôme particulier des sauces de poisson. Sanceda *et al.*, (1983) ont identifié 4 catégories de composés (neutres, basiques, acides et phénoliques) en réalisant une distillation fractionnée de Patis philippins du commerce. D'après eux, la fraction acide semble jouer un rôle majeur dans l'arôme du Patis, car toute autre fraction combinée avec elle donne un arôme similaire à celui du produit analysé. Dans une autre étude, Sanceda *et al.*, (1986) ont observé que la plupart des acides identifiés dans les Patis du commerce étaient trouvés en faible quantité après seulement 24h de fermentation, ce qui suggère que ces acides pourraient avoir été formés avant le salage, durant la période de récolte et de transport du poisson. Cependant, presque tous les acides identifiés dans la sauce se forment pendant les trois mois suivants avec même une augmentation qualitative et quantitative des acides gras pendant la durée de fermentation.

Saisithi *et al.*, (1966) ont démontré que certaines bactéries contenues dans la sauce de poisson pouvaient produire des acides gras à partir des acides aminés. Beddows *et al.*, (1980) ont eux étudié l'origine et le mécanisme de formation des acides gras volatils présents dans le Budu, une sauce de poisson de Malaisie. Ils en ont conclu que les acides gras ne semblaient pas provenir de la dégradation des lipides des poissons. Ils ont ainsi démontré que les acides aminés sont les précurseurs d'acides n-butanol et n-pentanol et qu'ils contribuaient également à la formation d'autres acides. Cependant, le mécanisme par lequel

les acides gras ont été produits n'a pas été élucidé. Ooshiro *et al.*, (1981) ont finalement également confirmé que les acides gras volatils étaient des éléments importants dans le développement de l'arôme des sauces de poisson.

Les acides gras volatils sont les composés volatils les plus abondants dans la sauce de poisson. En général, les modifications subies par le poisson pendant la fermentation conduisent à une augmentation de la quantité d'acides volatils dans le liquide avec des valeurs significativement plus élevées en condition d'aérobiose (Sanceda *et al.*, 2001). Les différences d'arôme des sauces de poisson couramment utilisées seraient attribuées aux caractéristiques aromatiques des principaux composés volatils, mais aussi de ceux présents en petite quantité (Ing-Lung *et al.*, 2003). L'analyse la plus complète à ce jour a permis d'identifier jusqu'à 76 composés volatils dans des sauces de poisson (Wichaphon *et al.*, 2011).

L'odeur d'ammoniaque peut parfois être perçue dans les sauces de poisson. Cet arôme particulier peut être extrait par solvant dans la partie basique de la sauce (McIver *et al.*, 1982). Son analyse révèle la présence de composés azotés dont la triméthylamine (Sanceda *et al.*, 1984). La formation d'un tel arôme ammoniacal n'implique pas nécessairement une action bactérienne, puisque l'ammoniac et la triméthylamine peuvent se former dans des conditions aseptiques. Cependant, il est fort possible que des bactéries, lorsqu'elles sont présentes, puissent augmenter la quantité formée et donc contribuer à l'intensité de l'arôme (Beddows, 1985). Fukami *et al.*, (2004) ont ainsi isolé et identifié dans une sauce de maquereau, la bactérie *Staphylococcus xylosus*, qui d'après eux serait responsable de l'odeur de ce type de sauces fabriquées en Thaïlande.

Bien que la saveur et l'arôme puissent fortement varier selon le pays d'origine, le procédé mis en œuvre et la matière première utilisée, la sauce de poisson a généralement un goût à prédominance salée ; les acides aminés, les petits peptides et d'autres composés notamment volatils contribuant quant à eux à la saveur globale.

### **1.3.6. Evolution de la population microbienne**

Les conditions n'étant pas axéniques lors de la fabrication de la sauce de poisson, les microorganismes et particulièrement les bactéries halophiles voient leur population varier au cours du procédé et ce particulièrement en raison de la forte salinité du milieu. Ainsi pendant

les 10 premiers jours, une augmentation du nombre de microorganismes halophiles suivi d'une décroissance rapide (Lopetcharat *et al.*, 2001). Après vingt jours d'incubation ce sont majoritairement des bactéries productrices lactiques ainsi que des bactéries des genres *Streptococcus* et *Pediococcus* qui sont détectées (Frans et Yoshiyuki 1996).

La mise en contact du poisson avec une grande quantité de sel impacte fortement sur sa flore interne qui constitue la très grande majorité des microorganismes du départ. Taira *et al.*, (2007) ont ainsi rapporté que la population de bactéries *hétérotrophes* estimée à  $10^6$  ufc/ml au départ diminuait pour atteindre  $10^4$  ufc/ml en fin de la fermentation. Néanmoins, leur étude qualitative met en évidence que ce sont des bactéries halophiles et halophiles extrêmes qui diminuent légèrement dans les quatorze premiers jours pour ensuite augmenter considérablement par la suite. Des analyses de l'ADNr 16S pratiquées sur les colonies isolées pendant la fermentation ont révélé que le genre dominant était *Staphylococcus* spp jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour de fermentation et que les bactéries lactiques halophiles appartenant au genre *Tetragenococcus* spp dominaient au 30<sup>ème</sup> jour et par la suite, tout au long de la période de fermentation. Des observations similaires ont été faites sur du Budu, diminution notable de la population bactérienne lors du processus avec majoritairement au départ *Micrococcus* sp qui initie la fermentation avant d'être peu à peu remplacée par des *Staphylococcus* (Yuen *et al.*, 2009).

Il paraît cependant évident que l'on ne puisse résumer la flore bactérienne de ces sauces à quelques genres ou espèces majoritaires, la réalité étant plus complexe. Ainsi, ce ne sont pas moins de 224 isolats appartenant au genre *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterim*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Alcaligenes* qui ont été trouvés dans des échantillons de poissons fermentés avec majoritairement *Bacillus* spp (48,7%) et *Staphylococcus* spp (27,3%) (Anihouvi *et al.*, 2007). Le suivi de cette population au cours du procédé a révélé que pendant la fermentation, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus xylosus* et *Micrococcus luteus* étaient les souches les plus représentatives. Les *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp et *Micrococcus* spp initiaient la fermentation, mais les *Micrococcus* spp peu nombreux disparaissaient après 4 jours.

Bien souvent l'étude de ces flores particulières permet la découverte de nouvelles espèces bactériennes comme le montre l'étude de Ling *et al.*, (2011) portant sur du Jeotgal, (produit coréen à base de poisson fermenté), dans laquelle 104 espèces appartenant à 47 genres et 31 espèces précédemment inconnues ont pu être isolées.

## **1.4. Accélération du procédé de fabrication**

### **1.4.1. Enzymes endogènes et ajout d'extraits dans la production de la sauce de poisson**

Au cours de la production de sauce de poisson, l'hydrolyse des tissus semble être principalement un processus autolytique dû aux enzymes endogènes du poisson (Beddows *et al.*, 1979). Orejana et Liston, (1981) ont établi que la trypsine et les enzymes de type trypsine étaient les principaux agents de la protéolyse dans la production de Patis et que, compte tenu de la forte salinité, les bactéries et leurs enzymes ne jouaient qu'un rôle mineur. Néanmoins, les enzymes endogènes des poissons peuvent être elles aussi inhibées notamment par la forte concentration en sel. De plus cette inhibition semble varier considérablement selon les différentes espèces de poisson.

Siringan *et al.*, (2006a) ont rapporté que l'activité autolytique des anchois indiens diminuait avec l'augmentation de la concentration en NaCl et que l'activité autolytique en présence de 25% de NaCl correspondait à environ 52% de l'activité d'un témoin sans sel. Cette action protéolytique en milieu salé peut poser problème comme par exemple la capacité à dégrader les protéines dans des filets d'anchois salés commerciaux où la teneur en sel est classiquement de l'ordre de 16% (Ishida *et al.*, 1994)

Lors d'une étude, Klomklao *et al.*, (2008) ont montré que les protéases endogènes de la sardine pouvaient hydrolyser les protéines musculaires, même avec une concentration en sel élevée, mais dans une proportion moindre qu'en absence de sel. Ils ont mesuré que plus de 50% de l'activité autolytique était ainsi conservé en présence de 10 à 25% de NaCl et que cette activité avec 30% de NaCl représentait encore environ 15% de celle d'un échantillon sans NaCl. Il a donc été suggéré que les protéases endogènes de la sardine pouvaient être utilisées pour accélérer la production de sauce de poisson. C'est parfois le cas, où un extrait viscéral de sardines, contenant de nombreuses protéases, est utilisé en supplémentation lors de la préparation de la sauce de sardines. Pour ce faire, la chair est incubée avec l'extrait viscéral pendant 5 heures à pH 8,0 et à 50°C. Le mélange est ensuite clarifié par centrifugation, 25% de NaCl sont alors ajoutés et le tout mis à fermenter. L'analyse du produit final ne fait pas ressortir de différences biochimiques et sensorielles significatives par rapport à une sauce non supplémentée (Yoshinaka *et al.*, 1983). Dans une autre étude, les auteurs ont considérablement



réduit le temps du procédé en ajoutant au milieu des broyats de rate de thon ou de rate de sardine riches en trypsine et chymotrypsine (Klomkiao *et al.*, 2006c).

Lors d'une étude sur la fermentation du Patis Orejana et Liston (1981) ont montré que l'activité tryptique augmentait pour atteindre un maximum dans le premier mois, mais ensuite diminuer considérablement. Ils ont également montré que la digestion des protéines lors de la fermentation de la sauce de poisson était considérablement réduite lorsque la trypsine était inhibée par l'addition d'un inhibiteur. Ils ont ainsi mis en évidence l'action de la trypsine dans solubilisation des tissus et la digestion des protéines et ce malgré une activité partiellement inhibée par le sel. Ces auteurs expliquent que la diminution de l'activité de la trypsine dans le Patis peut être causée par l'accumulation de produits finaux (peptides de petites tailles et acides aminés), par des inhibiteurs de sang de poisson ou par des substances produites par des bactéries. Uhe *et al.*, (1995), ont eux estimés que la chymotrypsine jouait probablement un rôle encore plus important que la trypsine pendant la fermentation puisque elle était plus active dans des conditions neutres ou d'acides faibles or le pH d'une sauce de poisson passe d'un pH neutre à un pH acide lors de la fermentation (Lopetcharat *et al.*, 2001). Chaveesuk *et al.*, (1993) ont rapporté que l'addition de trypsine et de chymotrypsine pouvait accélérer la fermentation de la sauce de poisson de hareng et réduire jusqu'à 2 mois le temps de fermentation.

En dehors de la trypsine et de la chymotrypsine, des cathepsines notamment les A et D sont également impliquées dans l'hydrolyse des protéines au cours de la fermentation. Si la trypsine et la chymotrypsine sont généralement actives dans un milieu neutre, les cathepsines le sont dans un milieu acide. Par conséquent, pendant les premières étapes de la fermentation, ce sont la trypsine et la chymotrypsine qui interviennent dans l'hydrolyse des protéines puis ensuite c'est au tour des cathepsines lorsque le pH devient acide.

Si, selon Del Rosario *et al.*, (1984), les cathepsines B et D possèderaient des effets négligeables dans cette hydrolyse, en revanche, la cathepsine L et les enzymes métalloprotéases semblent jouer un rôle important (Lopetcharat *et al.*, 2001). D'après Tungkawachara *et al.*, (2003), la température à laquelle se déroule la fermentation semble être le paramètre le plus influent sur l'activité de ces enzymes. Ils ont ainsi mis en évidence que lors de la production d'une sauce de merlu du Pacifique à 30°C, l'activité de la cathepsine H et de la cathepsine L étaient extrêmement faibles (température optimale de 20°C et 55°C respectivement) tandis que la cathepsine B était la plus active (température optimale entre 20 et 37°C).

Pour augmenter l'activité protéolytique des enzymes des poissons, certains activateurs tels le calcium peuvent être ajoutés même si les effets ne sont pas toujours compris et maîtrisés (An *et al.*, 1994). Yoshinaka *et al.*, (1983) ont ainsi montré que le calcium protégeait la trypsine contre l'autodigestion et qu'il augmentait aussi légèrement son activité protéolytique. À une concentration inférieure à 1  $\mu\text{M}$ , le calcium n'a aucune influence sur l'activité des extraits de rate, quelle que soit l'espèce de poisson, mais lorsque la concentration en calcium dépasse 1  $\mu\text{M}$ , l'activité des protéases semble augmenter (Klomkiao *et al.*, 2004). Toutefois, Gildberg, (2001) rapporte que l'ajout de chlorure de calcium à une concentration supérieure à 2  $\mu\text{M}$  n'a aucun effet sur la sauce de poisson produite à partir de capelan du sud Arctique et sur les intestins de la morue de l'Atlantique.

#### **1.4.2. Ajout d'enzymes**

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables d'accélérer les réactions chimiques et sont utilisées comme des outils biologiques pour améliorer les opérations de traitement des aliments ou la qualité des aliments. L'utilisation d'une enzyme en tant qu'adjuvant présente un certain nombre d'avantages par rapport à l'emploi de produits chimiques (grande spécificité, efficacité de catalyse à des températures modérées etc.), tout en étant écologique. En fonction de leur origine, 3 catégories d'enzymes peuvent être identifiées : animale, végétale et microbienne (Tableau 1.3). Ces dernières étant actuellement les plus développées par les industriels du secteur, car elles présentent de nombreux avantages : production contrôlée, extraction facilitée, modification génétique...

**Tableau 1.3 Utilisation des enzymes dans la production de sauce de poisson**

| <b>Enzyme</b>                                     | <b>Nature</b>                  | <b>Poisson</b>                | <b>Références</b>                       |
|---|--------------------------------|-------------------------------|---|
| Papaïne   | Végétale                       | -                             | Guevara <i>et al.</i> , (1972)          |
| Biopraxe<br>Pronase                               | Microbienne                    | -                             | Murayama <i>et al.</i> , (1962)         |
| Pronase<br>Koji ( <i>Aspergillus oryzae</i> )     | Microbienne                    | Anchois                       | Miyazawa <i>et al.</i> , 1979           |
| Bromélaïne<br>Papaïne<br>Ficine                   | Végétale                       | Ikan bilis<br>(anchois séché) | Beddows et Ardeshir,<br>(1979)          |
| Papaïne<br>Bromélaïne<br>Trypsine                 | Végétale<br>Végétale<br>Animal | Sardines                      | Ooshiro <i>et al.</i> , 1981            |
| Pronase<br>Trypsine<br>Chymotrypsine              | Animal                         | Capelan                       | Raksakulthai <i>et al.</i> ,<br>(1986), |
| Trypsine<br>Chymotrypsine                         | Animal                         | Hareng                        | Chaveesuk <i>et al.</i> , (1994)        |
| Pronase<br>Neutraxe                               | Microbienne                    | -                             | Aquerreta <i>et al.</i> , (2001)        |
| Flavourzyme<br>Koji ( <i>Aspergillus oryzae</i> ) | Microbienne                    | Calmar                        | Xu <i>et al.</i> , 2008                 |
| Koji  | Microbienne                    | Salmon                        | Kaoru <i>et al.</i> , 2006.             |

Tous ces travaux mettent en évidence que si l'apport d'enzyme exogène favorise la liquéfaction des matériaux et donc accélèrent le processus d'élaboration des sauces cela se ne s'accompagne pas toujours de la formation des arômes et des saveurs traditionnels qui finalement détermineront la valeur marchande du produit

C'est en 1962 que Murayama *et al.*, ont pour la première fois montré que l'ajout d'enzymes exogènes (en l'occurrence de la biopruse et de la pronase) était à même de réduire sensiblement la durée de fermentation et que la sauce de poisson obtenue était de bonne qualité. De très nombreux travaux ont suivi portant sur la réduction du temps de fabrication et/ou l'amélioration de la qualité du produit fini. Guevara *et al.*, (1972) ont ainsi utilisé la papaine dans la production de Patis ; la durée de fermentation a été réduite à 4-7 jours, sans effet négatif sur la saveur de la sauce. Des anchois japonais ont été fermentés avec 20% de sel et en présence de koji (35%) ou de pronase (0,5%) et conservés à 30°C pendant 150 jours (Miyazawa *et al.*, 1979). L'ajout de "koji" a eu un effet prononcé sur la liquéfaction des protéines et la formation d'acides aminés libres, mais l'effet du pronase sur l'hydrolyse des protéines a été négligeable. Beddows et Ardeshir, (1979a) ont étudié l'influence de la bromélaïne, la papaine et la ficine sur l'hydrolyse des protéines en utilisant de l'ikan bilis (anchois séché) haché. La bromélaïne a donné de meilleurs résultats que la papaine ou la ficine, avec de plus grandes quantités de protéines de poissons solubilisées. Les composés azotés étaient de nature similaire à ceux produits avec les méthodes de fermentation traditionnelles, mais le produit final possédait moins d'arôme. D'autres essais d'utilisation de la papaine, de la bromélaïne et de la trypsine pour produire de la sauce de poisson à partir de sardines, ont montré que les résultats étaient optimaux à 37°C et à pH 5,2, en utilisant 0,3% de papaine, et 25% de sel. Le produit obtenu avait une saveur et une couleur satisfaisante, mais ne possédait pas l'arôme typique de la sauce de poisson (Ooshiro *et al.*, 1981). Pour Raksakulthai *et al.*, (1986), l'addition de protéases, telles que la pronase, la trypsine, la chymotrypsine augmente généralement la vitesse initiale d'hydrolyse des protéines, mais ne donne pas un produit ayant une teneur en acides aminés libres beaucoup plus élevée que celle des sauces sans ajout d'enzymes. Chaveesuk *et al.*, (1994) ont étudié l'effet de l'addition de trypsine et de chymotrypsine sur l'accélération de la fermentation de sauce de hareng. Il en ressort que cet apport permet une réduction du temps de fermentation d'environ deux mois. Qui plus est, les teneurs en azote total, en protéines solubles, en acides aminés libres et en acides aminés totaux apparaissent sensiblement plus

élevées que celles de la sauce de poisson non supplémentée en enzymes. Pour Aquerreta *et al.*, (2001) qui ont étudié l'action de la Pronase, il est préférable de la laisser agir pendant quelque temps avec une faible concentration de NaCl (5%) puis seulement après ajuster la concentration de sel à la valeur souhaitée. Enfin pour Xu *et al.*, (2008) qui l'activité de Flavourzyme dans le processus de fermentation du calmar est très variable, elle commence par décroître pendant 10 jours pour ensuite remonter et atteindre son maximum au bout de 20 jours et finalement retomber.

### **1.4.3. Ajout de microorganismes**

Tout comme il est possible d'utiliser des enzymes exogènes pour accélérer le processus de fabrication des sauces, l'apport de microorganismes peut lui aussi permettre de réduire le temps nécessaire à l'obtention d'un produit commercial.

L'accélération de la fermentation de la sauce de sardines par l'ajout de bactéries halophytes, (ici des *Bacilluries* isolées de sauce de poisson) a été pour la première fois étudiée par Ok *et al.*, (1982). Un produit acceptable a ainsi pu être obtenu au bout de seulement 3 mois de maturation. Ces résultats ont ouvert la voie à la recherche de « ferments » à même d'améliorer le procédé de fabrication des sauces de poissons.

Anihouvi *et al.*, (2007) préconisent par exemple d'utiliser une supplémentation en *Bacillus* sp. et *Staphylococcus* sp. pour initier la fermentation. Yoshikawa *et al.*, (2010a) eux préfèrent utiliser *C. versatilis*, *Z. rouxii* et *T. halophilus* comme inoculum dès le démarrage constatant que ces souches inhibaient le développement des microorganismes d'altération. Akolkar *et al.*, (2010) optent eux pour *Halobacterium* sp. SP1 tandis que Zaman *et al.*, (2011) préfèrent *Staphylococcus carnosus* FS19 et *Bacillus amyloliquefaciens* FS05. Malgré la très grande diversité des protocoles opératoires et des organismes étudiés, tous ces résultats suggèrent que l'adjonction contrôlée de microorganismes peut être efficace non seulement pour réduire la durée de fermentation, mais aussi pour améliorer la qualité des produits finis.

Il convient de noter ici que dans certains cas les microorganismes identifiés comme « ferment » potentiel ont fait l'objet d'étude visant à appréhender leur mode d'action. Fort logiquement, des actions protéolytiques ont ainsi pu être mises en évidence, et les protéases associées parfois isolées. Par exemple, une protéase partiellement purifiée à partir d'une bactérie

marine modérément halophile (*Pseudomonas* sp.) a été utilisée pour réduire le processus de fermentation de la sauce de poisson (Nakano *et al.*, 1986). Il s'est avéré que cette enzyme pouvait raccourcir la durée de fermentation de 1,5 à 3 mois et que le produit obtenu contenait une teneur élevée en acides aminés intéressants au niveau nutritionnel. Des tests sensoriels additionnels ont montré que ce produit avait une saveur acceptable et qu'il était de bonne qualité par rapport aux produits commerciaux.

**Tableau 1.4 Utilisation des microorganismes dans la production de sauce de poisson**

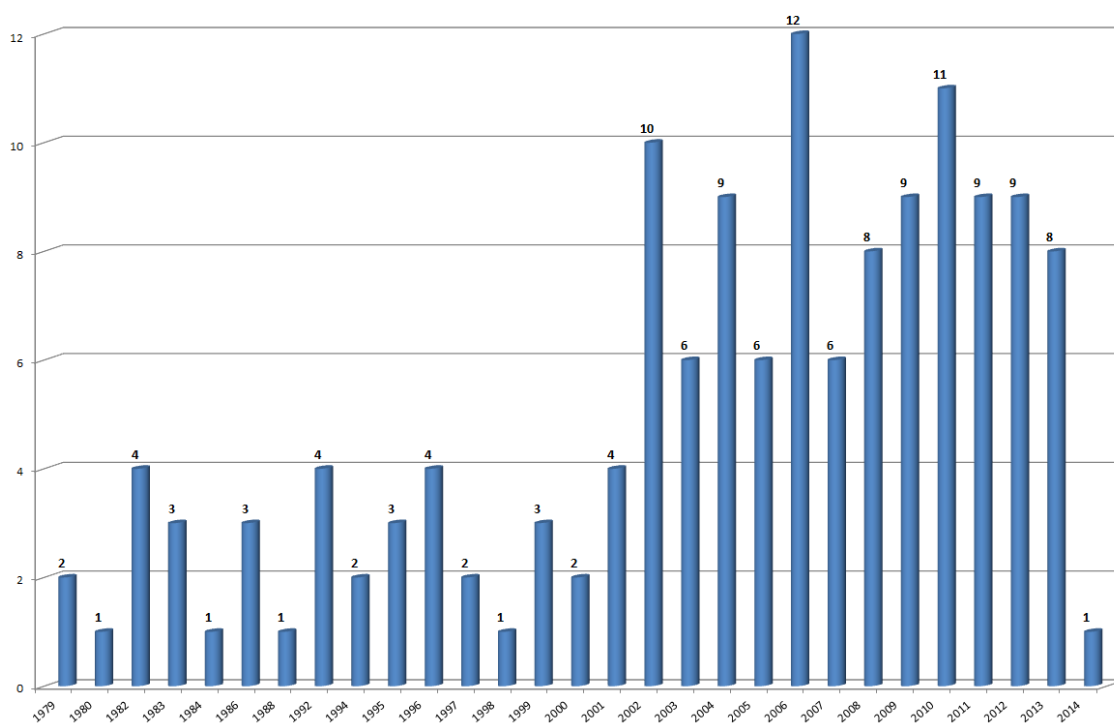
| <b>Microorganismes</b>            | <b>Type de sauce</b>   | <b>Références</b>                     |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Bacilluries                       | Sardines               | Ok <i>et al.</i> , (1982)             |
| <i>Pseudomonas</i> sp.            |                        | Nakano <i>et al.</i> , 1986           |
| <i>Staphylococcus xylosum</i>     | Maquereau              | Fukami <i>et al.</i> , (2004)         |
| <i>Halobacterium</i> sp.          | Pampus argenteus       | Akolkar <i>et al.</i> , (2010)        |
|                                   | Cynoglossus arel       |                                       |
|                                   | Scomberomorus guttatus |                                       |
| <i>Tetragenococcus halophilus</i> | Anchois                | Udomsil <i>et al.</i> , (2011)        |
| <i>Virgibacillus</i> sp           |                        | Yongsawatdigul <i>et al.</i> , (2007) |
| Halotolerant                      | Salmon                 | Yoshikawa <i>et al.</i> , (2010a)     |
| <i>Virgibacillus</i> sp.          |                        | Youngsawatdigul <i>et</i>             |
| <i>Irgibacillus</i> sp.           | Anchois                | <i>al.</i> , (2007)                   |
| <i>Staphylococcus</i> sp.         |                        |                                       |

Enfin il faut signaler que parfois ce sont à la fois des enzymes exogènes et des « ferments » qui sont utilisés pour maximiser le procédé. C'est ce que présentent Youngsawatdigul *et al.*, (2007) dans une étude où ils montrent qu'une sauce de poisson en tout point comparable à une sauce traditionnelle peut être obtenue en 4 mois si l'on y ajoute des protéases et un inoculum de *Staphylococcus* sp. SK1-1-5.

## 1.5. Etude bibliométrique sur les sauces de poisson

Une étude bibliométrique sur les sauces de poisson a été réalisée via le Web of Sciences (WOS) pour les publications dites de rang A.

L'évolution temporelle de ces publications est présentée sur la Figure 1.15



**Figure 1.15 Evolution temporelle des publications du WOS traitant des sauces de poisson**

Après une première recherche dans le WOS à partir des termes : fish sauce / Nuoc mam / nampla / patis / shotturu / ngapi / fish fermentation / halophilic bacteria / enzyme / proteinase

/ protease et un complément de références, 144 documents ont été retenus. Les données couvrent la période de 1979 à 2014, certaines données incomplètes n'ayant pas été retenues.

Les auteurs sont de vingt-sept nationalités. Les plus nombreux sont les chercheurs japonais (50), vient ensuite les thaïlandais (40), les sud-coréens (12) et les américains (10) pour tous les autres pays, ce sont seulement 1 à 2 scientifiques qui travaillent sur le sujet. En Europe, quelques rares études ont été publiées, notamment en Norvège, mais aucune en France.

Les 8 établissements les plus actifs dans le domaine sont japonais et thaïlandais. L'Université de Tokyo (Japon) avec 18 articles est l'organisme qui a le plus publié sur ce sujet suivie par l'université thaïlandaise de Suranaree Univ Ratchasima qui arrive en deuxième position avec 17 publications. L'Université de Bangkok (Thaïlande) et l'Université de Hokkaido (Japon) en ont 15 chacune. Tandis que l'Université de Prince Songkla (Thaïlande) et le Japan Food Research Laboratories ont publié 10 et 9 fois respectivement. La Figure 17 représente le réseau de collaboration entre les organismes ayant au moins publiés deux fois sur le sujet. On remarque que chaque grand « publiant » possède son réseau propre de collaborateurs et qu'au final peu de travaux communs sont réalisés entre eux à l'exception notable des deux universités thaïlandaises.

Parmi les 144 publications étudiées certains concepts reviennent souvent (Figure 1.16), avec une plus forte prévalence pour "amine", "glutamic", "salt" et "volatile". Viennent ensuite les termes "amino acid", "fermentation", "fish sauce", "histamine" et "microorganism". Suivent "protease", "bacteria" et "enzyme". Enfin "arôme", "bacillus subtilis", "biochemical" et "odor". Leur évolution temporelle révèle que ces dernières années, ce sont surtout les concepts "amine", "fish sauce", "glutamic", "salt", "volatile", "amino acid" et "histamine" qui ont été étudiés.



**[Amine]** | [Amino acid] | Arginine | Aroma | Bacillus subtilis |  
[Bacteria] | Biochemical | Cacl2 | Casein | Degradation | [Enzyme] | Extracellular | Fatty acid  
| [Fermentation] | [Fish sauce] | Flavor | **[Glutamic]**  
| [Halophile] | [Histamine] | Histidine | Hydrolyze | Incubation | Industrial | Koji |  
Lysine | Maximal activity | [Microorganism] | Molecular mass | Nam | Odor |  
Phenotypic | Predominant | [Protease] | Putrescine | Raw material | Rrna gene sequence |  
**[Salt]** | Sardine | Soybean | Starter culture | Subtilisin | Synthetic | Taste | Thailand |  
Treatment | Tuna | Viscera | **[Volatile]** | Yeast | Yield |

Figure 1.16 Cartographie des concepts de référence des 144 publications

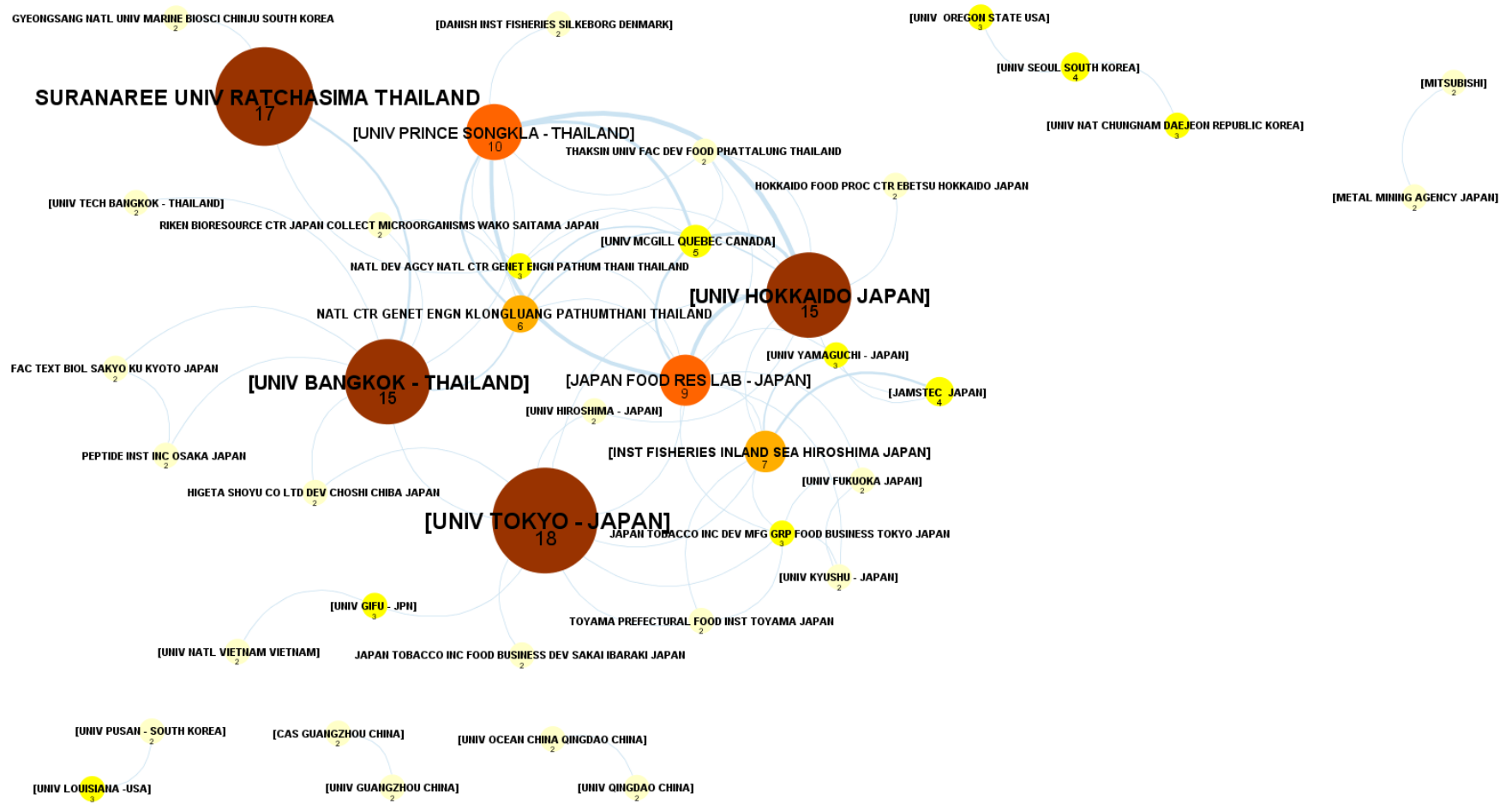


Figure 1.17 Réseau de collaboration entre les organismes ayant au moins 2 publication



## **CHAPITRE 2. HYDROLYSE EN CONDITIONS HYPERSALINES DE LA SARDINE (*SARDINA PICHARDUS*) ET DE L'ANCHOIS (*STOLEPHORUS COMMERSONII*) PAR DES PROTEASES COMMERCIALES**

### **2.1. Introduction**

Ce chapitre est dédié à la conduite d'hydrolyses enzymatiques de sardines (*Sardina pilchardus*) françaises et d'anchois bombra (*Stolephorus commersonii*) issus du Vietnam. L'objectif de cette étude est de déterminer les paramètres de l'hydrolyse enzymatique en présence de différentes concentrations en NaCl. Le but est de déterminer si des protéases industrielles peuvent être avantageusement utilisées dans la production de sauce de poisson. En effet, d'après Saisithi (1994) cela n'a rien d'évident, car non seulement les enzymes commerciales sont chères, mais elles sont en plus généralement très inhibées par de fortes concentrations en sel. Qui plus est, non seulement le rendement en peptides, mais également les composants et les fonctions de ces peptides sont influencés par l'enzyme utilisée dans l'hydrolyse des protéines. Aussi, est-il nécessaire de choisir une enzyme appropriée pour réaliser l'hydrolyse, (Guo *et al.*, 2009).

L'anchois est une espèce de poisson largement utilisées dans la production de sauce de poisson traditionnelle, toutefois lors des essais en France l'approvisionnement en anchois n'a pas été possible, il a alors été décidé de travailler sur un autre petit poisson pélagique de composition proche, la sardine. Les expérimentations sont conduites au laboratoire tout en gardant à l'esprit une éventuelle transposition possible au Vietnam sans trop perturber les procédés traditionnels, pour cela 3 contraintes ont été fixées.

La première concernait la possibilité de pouvoir mener les hydrolyses en présence de sel, élément indispensable à la production et à la conservation de la sauce de poisson (Aspmoa *et al.*, 2005). Le deuxième critère imposé consistait à réaliser ces expérimentations sans ajustement du pH du milieu d'hydrolyse tel que pratiqué au Vietnam. Généralement, le pH du mélange poissons/sel/eau est proche de la neutralité. Enfin le dernier critère imposé a été la température, les sauces de poissons étant réalisées traditionnellement à l'air libre, la température de l'hydrolyse est la température ambiante à savoir entre 30 et 35°C (Fukami *et al.*, 2002). Compte tenu de ces exigences, seules 4 protéases industrielles à large spectre ont été retenues pour la suite de l'étude. Il s'agit de Protamex, Protex 51FP, Protex 6L et Funal protéase.

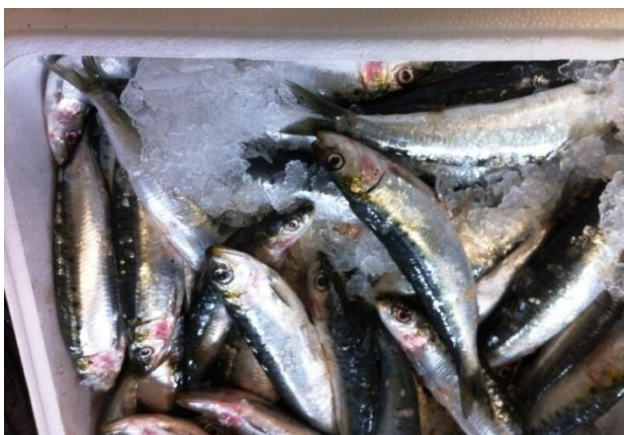
Les hydrolyses ont été réalisées sur des durées de 3 et 6h ce qui n'est pas comparable à ce qui se pratique lors de la production de la sauce de poisson, qui peut prendre jusqu'à six mois, un an ou plus. Cependant, l'intérêt était ici d'observer l'efficacité de ces protéases sur la phase initiale du procédé à savoir la liquéfaction des matrices par hydrolyse des protéines.

## 2.2. Matériels et méthodes

### 2.2.1. Matériels biologiques

La sardine (*Sardina pilchardus*) est une espèce de poisson de la famille des *clupeidae*, qui comprend également le hareng et l'aloise. Selon les régions, elle porte différents noms : *célan*, *célerin*, *pilchard*, *sarda* ou *sardinyola*. Son nom d'origine grecque provient de *Sardaigne*. C'est un poisson commun dans les eaux côtières.

Pour chaque essai, environ 40 kg de sardines fraîches ont été commandés au Marché d'Intérêt National (MIN) de Nantes. Les poissons ont été fournis par les Pêcheries Océanes (Nantes, France). Pêchées dans la journée et conservées sous glace. Les sardines ont été utilisées entières lors des essais.



**Figure 2.1** La sardine (*Sardine pilchardus*)

L'anchois bombra vient du nom anglais *commerson's anchovy*, son nom scientifique est *Stolephorus commersonii*. C'est une espèce de poisson de la famille des *engraulidae*, normalement ils ont une taille maximum de 20 cm, ils vivent dans les eaux côtières jusqu'à 150m entre la surface et le fond



**Figure 2.2 L'anchois (*Stolephorus commersonii*)**

Ces anchois ont été pêchés dans les zones maritimes de Nha Trang au Vietnam en avril 2013. Cent kilogrammes d'anchois ont été achetés au port de pêche et transportés sous glace au laboratoire, où ils sont broyés. Chaque aliquote de 500g a été placée dans un sac plastique et conservée à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### **2.2.2. Matériel enzymatique**

Les 4 enzymes sélectionnées sont toutes des protéases à large spectre produites par des bactéries. A notre connaissance, elles n'ont jamais été étudiées pour produire de la sauce de poisson en conditions « traditionnelles ».

#### **2.2.2.1. Protamex**

Protamex® est une enzyme industrielle produite par génie génétique par la firme Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Il s'agit d'un complexe peptidique de la classe des hydrolases développé par plusieurs espèces de *Bacillus* pour l'hydrolyse des protéines destinées à l'industrie alimentaire. Contrairement à d'autres endoprotéases, Protamex® a été élaborée de façon à ne pas générer de peptides amers, même lorsque les degrés d'hydrolyses sont faibles. Protamex® correspond à un mélange des enzymes Alcalase et Neutrase. Du fait du mélange enzymatique présent dans ce complexe, Protamex® possède les numéros enzymatiques suivants: EC 3.4.21.62 et EC 3.4.24.28. Les conditions optimales d'hydrolyse sont un pH compris entre 5,5 et 7,5 et une température comprise entre 35 et 60°C. Protamex peut être inactivée par chauffage à 85°C pendant 10 min lorsque le pH est de 8.

#### **2.2.2.2. Protex 51FP**

Protex 51FP est une enzyme industrielle produite par génie génétique par la société Genencor International B.V, (Leiden, Pays Bas). C'est un mélange d'endo et d'exopeptidases issus à partir de *Aspergillus oryzae var.* Les domaines d'application de Protex 51FP sont, la transformation des protéines et la production d'aliments pour les animaux. Les conditions idéales d'hydrolyse sont un pH compris entre 6,0 et 9,0 avec un optimum à 7,5 et une température comprise entre 25 et 60°C avec un optimum à 50°C. Protex 51FP peut être inactivé par chauffage à 90°C pendant 10 min.

#### **2.2.2.3. Protex 6L**

Protex 6L est également une enzyme industrielle produite par génie génétique par la société Genencor International B.V, (Leiden, Pays Bas). C'est une protéase alcaline bactérienne issue de *Bacillus licheniformis*. Les domaines d'application pour l'enzyme Protex 6L sont, la transformation des protéines, la récupération d'argent à partir de matériaux de production cinématographique et la production d'aliments pour animaux domestiques. Les conditions idéales d'hydrolyse sont un pH compris entre 7,0 et 10,0 avec un optimum à 9,5 et une température comprise entre 25 et 70°C avec un optimum à 60°C. Protex 6L peut être inactivée par chauffage à 80-85°C pendant 5 à 10 minutes

#### **2.2.2.4. Fungal protéase**

Fungal protéase (HU) est une enzyme dérivée de la moisissure d'*Aspergillus oryzae var.* C'est une enzyme industrielle produite par la société BIO-CAT INC (New York, USA). L'enzyme présente, à la fois des activités exo et endo-peptidase. Il s'agit d'un produit de qualité alimentaire avec une large spécificité de substrat, capable d'hydrolyser efficacement la plupart des protéines. Elle est active pour une plage de température de 25 à 60°C, avec un optimum à 50°C et dans une gamme de pH de 6,0 à 9,0 avec un optimum à 7,5. La Fungal protéase est inactivée par chauffage à 90°C pendant 10 minutes.

## 2.2.3. Réalisations des l'hydrolyses

### 2.2.3.1. Hydrolyse de la sardine

Avant l'hydrolyse, la sardine est broyée par un mélangeur pendant une minute, ensuite les poissons sont hydrolysés dans un système de réacteurs en verre, sous agitation et chauffage contrôlés (Distek évolution 6100, Figure 2.3).

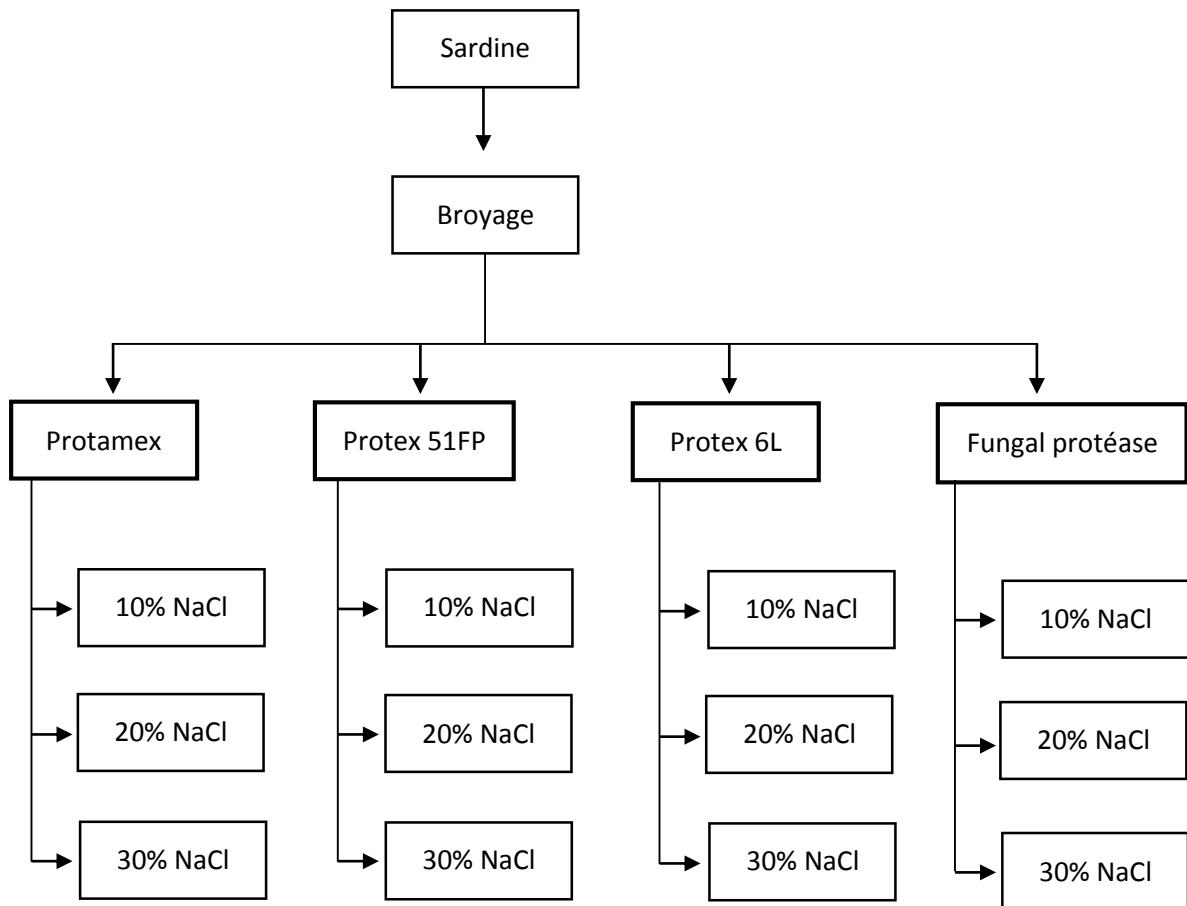


**Figure 2.3 Appareil pH star Distek évolution 6100**

Pour chaque enzyme, trois expériences différentes correspondant à trois concentrations de sel (10, 20 et 30% NaCl (p/p)) sont réalisées. Chaque essai est mené sur 500 g de sardines en présence de 20% d'eau (m/m). Ces essais ont pour objectif d'évaluer les activités des quatre enzymes sélectionnées, en présence de différentes concentrations en sel et de les hiérarchiser entre elles (Figure 2.4).

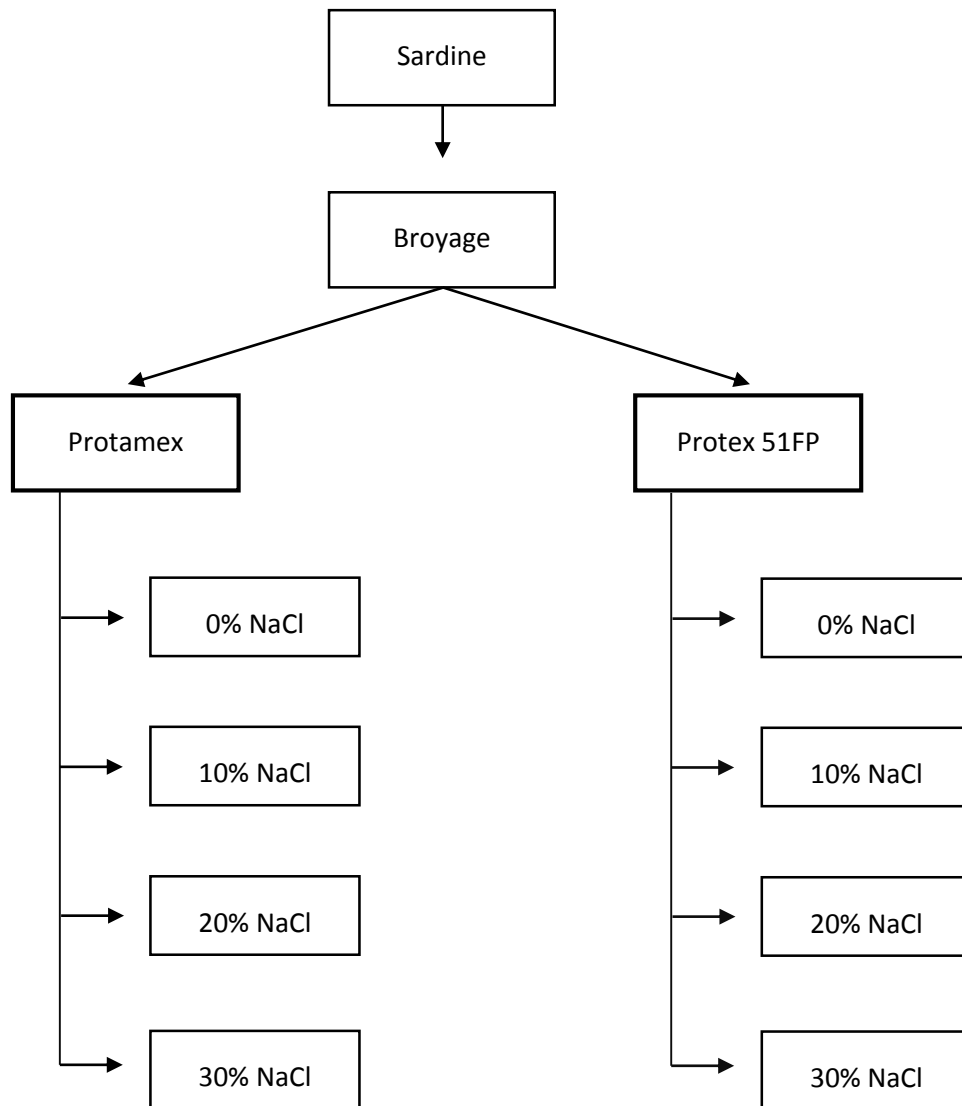
L'appareil Distek est réglé à une vitesse de rotation de 350 rpm, et à une température de 35°C. Le pH est laissé libre. Lorsque la température est atteinte dans le réacteur 1% d'enzymes est alors ajouté au mélange sardine/eau/sel. L'hydrolyse est maintenue 3 heures. Des prélèvements de 40ml sont réalisés aux temps 0, 15, 30, 45, 60, 120 et 180 minutes et rapidement inactivés 10 minutes à 90°C. Tous ces prélèvements sont ensuite centrifugés 20 minutes à 10 000 g et 4°C, afin de pouvoir séparer les différentes phases (culot et surnageant) qui seront analysées par la suite.





**Figure 2.4 Première expérience d'hydrolyse de la sardine**

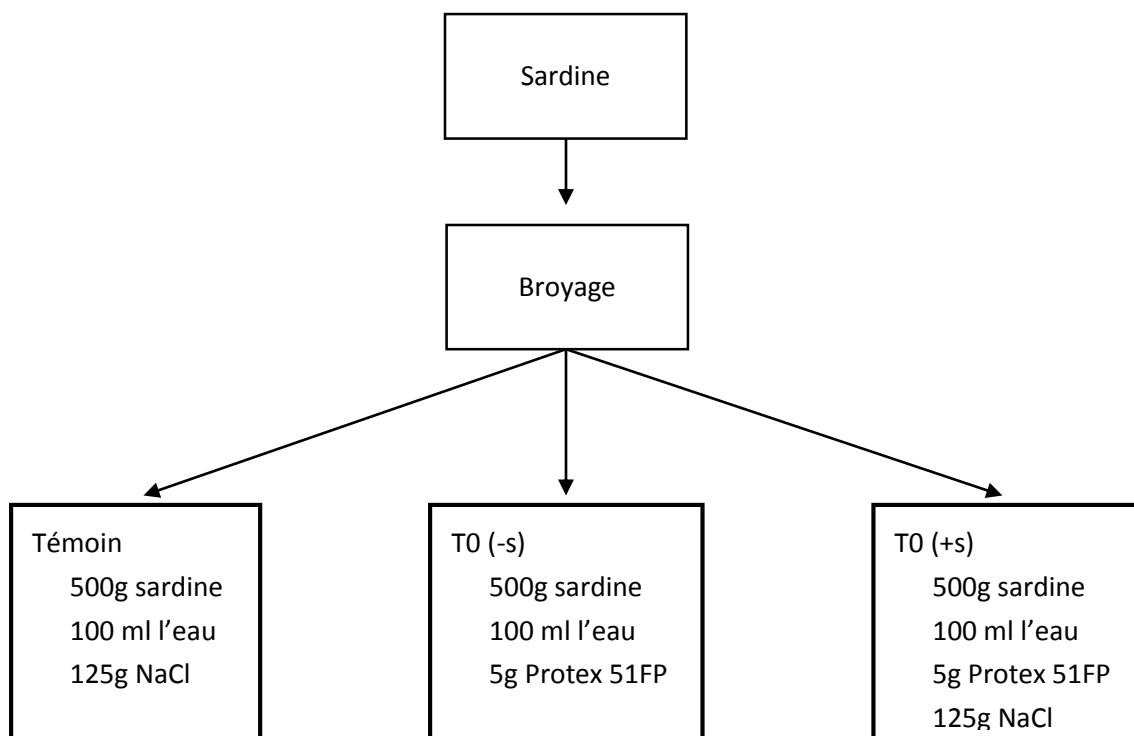
Au vu des premiers résultats (cf 2.3.2) et afin d'être dans les conditions les plus proches de la fabrication de la sauce de poisson traditionnelle, une deuxième expérience est menée sur l'hydrolyse de sardine par deux enzymes Protex 51FP et Protamex à 30°C (Figure 2.5). Huit lots sont ainsi réalisés : quatre avec Protamex et quatre avec Protex 51FP, avec pour chacun quatre concentrations de sel différentes (0, 10, 20 et 30% NaCl). Chaque réacteur contenant 500 grammes de sardines et 20% d'eau est mis sous agitation à 350 rpm. Lorsque la température réactionnel atteint 30°C, 1% d'enzyme (Protex 51FP ou Protamex) est alors ajouté, le pH étant laissé libre. Chaque essai est réalisé en triplicata. Des prélèvements de 40ml sont réalisés au temps d'hydrolyse 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 et 360 minutes et inactivés immédiatement à 90°C pendant 10 minutes. Les prélèvements sont centrifugés (10 000 g, 4°C, 20minutes), afin de séparer les différentes phases : culot (fraction insoluble) et surnageant (fraction soluble). Tous les échantillons sont congelés à -20°C dans l'attente de leur caractérisation.



**Figure 2.5 Deuxième expérience d’hydrolyse de la sardine**

Au vu des résultats de cette 2<sup>nd</sup>e expérience (cf 2.3.3) des essais complémentaires d’hydrolyse de la sardine ont été effectués en présence de Protex 51FP (Figure 2.6), avec une concentration en sel de 25% (correspondant à la fabrication de la sauce traditionnelle). Ces essais ont été réalisés sur trois lots : témoin, T0 (+s) et T0 (-s). Le lot témoin est réalisé à partir de 500 gammes de sardine, 100ml (20%) d’eau et 125g (25%) de NaCl. T0 (+s) est réalisé comme le lot témoin, mais en présence de 5g (1%) d’enzyme Protex 51FP. T0 (-s) est hydrolysé dans les mêmes conditions, mais sans ajout de sel. Ces essais sont réalisés en triplicata. Les hydrolyses sont menées à 30°C et 350 rpm. Des prélèvements de 40ml sont réalisés aux temps 0, 15, 30, 45,

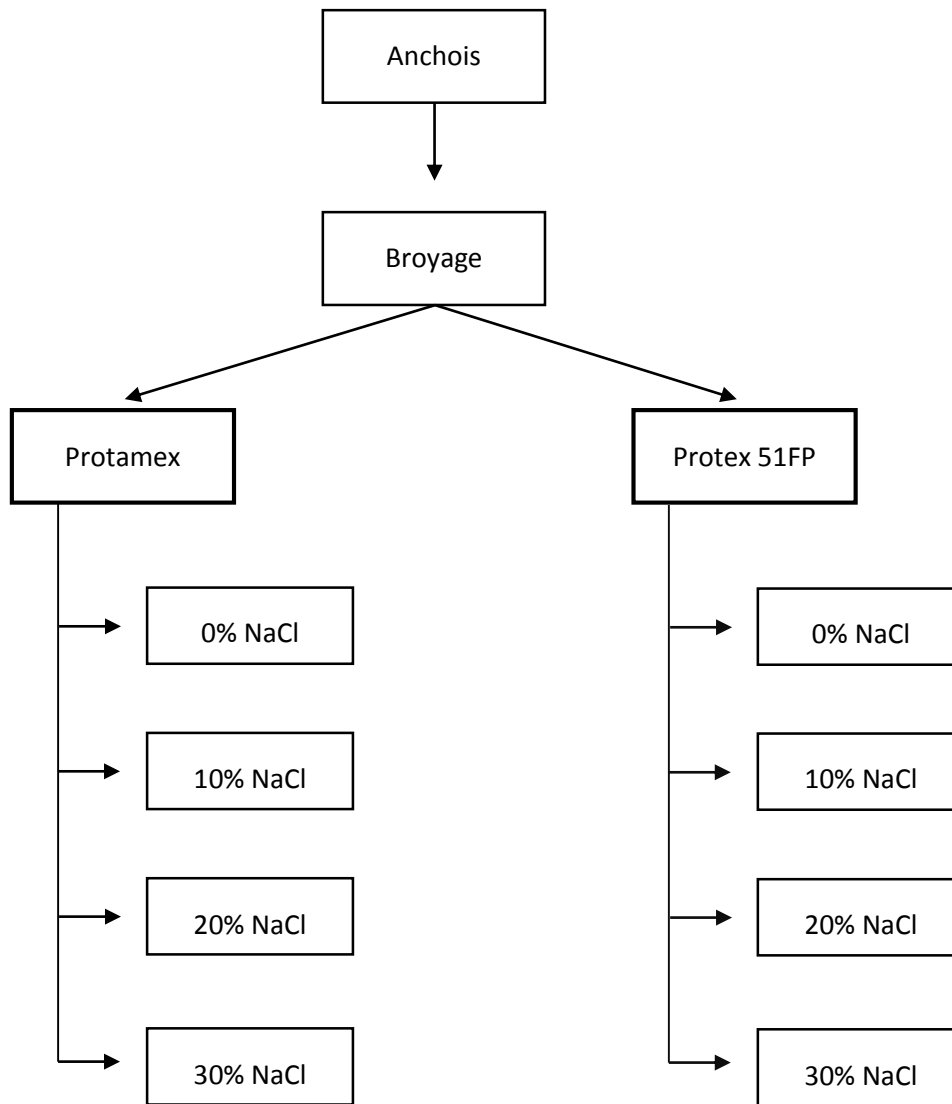
60, 120 et 180 minutes et seront traités comme dans les deux premières expériences.



**Figure 2.6 Troisième expérience d'hydrolyse de la sardine**

### **2.2.3.2. Hydrolyse de l'anchois**

Ces expériences sont similaires à celle réalisées sur la sardine, mais réalisées au Vietnam, où la sardine n'est pas disponible. Les hydrolyses de l'anchois ont été également réalisées avec les deux enzymes Protex 51FP et Protamex, en présence de quatre concentrations de sel (0, 10, 20, et 30% de NaCl) à 30°C, en triplicata (Figure 2.7). Cependant, les hydrolyses ont été réalisées dans des récipients en verre résistant à la chaleur et la température de 30°C est stabilisée grâce à un réservoir thermostatique.



**Figure 2.7**    **Expérience d'hydrolyse de l'anchois**

## 2.2.4. Analyses biochimiques

### 2.2.4.1. Dosage de la matière sèche

La teneur en matière sèche des échantillons est déterminée par dessiccation à l'étuve à  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selon le mode opératoire suivant:

Environ 10 g de matière fraîche sont déposés dans une coupelle. Soit  $m_1$  cette masse. Après séchage à l'étuve à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures, la coupelle est refroidie dans un dessiccateur (pour éviter la réabsorption d'humidité). Le taux de matière sèche est déterminé de la manière suivante :

$$x(\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100$$

$x$  : Teneur en matière sèche (%)

$m_0$  : Masse de la coupelle (g)

$m_1$  : Masse de la prise d'essai (g)

$m_2$  : Masse de la coupelle et de la prise d'essai après séchage (g)

### 2.2.4.2. Dosage de la teneur en cendres

Pour déterminer la matière minérale, l'échantillon est séché, prélevé, repesé et introduit dans un creuset en céramique puis dans un four à moufle réglé à  $600^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  pendant toute une nuit. A la sortie, le creuset est laissé à refroidir toujours dans un dessiccateur, puis la teneur en matière minérale est déterminée gravimétriquement, de la même manière que la matière sèche.

#### **2.2.4.3. Dosage de la matière organique**

Le taux de matière organique d'un échantillon est établi en soustrayant de la masse de cet échantillon, les teneurs en eau et en cendres.

#### **2.2.4.4. Analyse des lipides**

Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957). Cette technique repose sur le principe d'extraction à froid des lipides par un mélange de solvants méthanol/chloroforme (1/2, v/v). L'addition d'une solution aqueuse de NaCl à 0,9% (p/v) favorise l'obtention d'un système biphasique. La phase supérieure constituée de méthanol et d'eau contient les composés hydrophiles (glucides et protéines) tandis que les lipides sont dissous dans la phase organique inférieure.

1 gramme d'échantillon sec ou 5 grammes d'échantillon humide sont pesés dans un erlenmeyer de 250 ml. Les échantillons secs (correspondant aux fractions lyophilisées) doivent être préalablement réhydratés avant l'extraction. Quatre volumes d'eau sont alors ajoutés aux échantillons secs.

Vingt volumes de solution chloroforme/méthanol (2/1) sont ajoutés. Le mélange est mis sous agitation pendant 60 minutes. Par filtration sur verre fritté, les composés solides non lipidiques et non solubilisés dans le mélange de solvants sont éliminés. Le filtrat est alors versé dans une ampoule à décanter. Une quantité d'eau salée (0,9% NaCl) est ajoutée à raison de 20% du volume total de chloroforme/méthanol. L'ampoule est agitée jusqu'à émulsion complète du mélange puis la décantation est réalisée pendant trois heures en chambre froide à l'abri de la lumière.

La phase organique inférieure est récupérée dans un ballon taré, évaporée à l'évaporateur rotatif, puis placée sous azote pour éliminer toute trace de solvant. Après évaporation totale du

solvant, le ballon contenant l'extrait lipidique est pesé. La phase aqueuse supérieure est éliminée.

La teneur en lipides est calculée selon la formule suivante :

$$x(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100$$

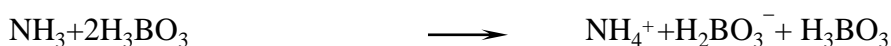
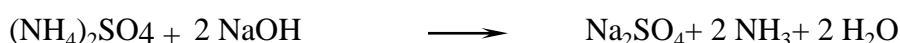
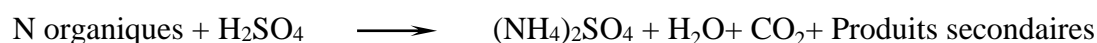
$m_0$  : Masse d'échantillon (g)

$m_1$  : Masse du ballon vide (g)

$m_2$  : Masse du ballon contenant l'extrait lipidique après évaporation du solvant (g)

#### 2.2.4.5. Analyse des protéines-brutes

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl. L'échantillon est minéralisé à l'aide d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) concentré en présence d'un catalyseur ( $K_2SO_4/CuSO_4$  avec le taux 5/2). L'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium ( $(NH_4)_2SO_4$ ), et libéré ensuite sous forme d'ammoniac par la soude (NaOH) concentrée (10M). L'ammoniac fixé par l'acide borique est ensuite titré avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 1N.



Environ 1 gramme de matière sèche (MS), ou 4 grammes de matière fraîche (MF) sont introduits dans des tubes à minéralisation. Une pastille de minéralisation et 20 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans les tubes. Puis les tubes coiffés de leurs capteurs de fumée sont mis à chauffer progressivement jusqu'à 450°C. Lorsque la solution est devenue vert pâle, la minéralisation est arrêtée. Après refroidissement des tubes, les capteurs de fumée sont rincés avec de l'eau récupérée dans les tubes. Le contenu des tubes est mis en solution avec 20 ml d'eau, puis installé dans l'unité de distillation.

Dans un erlenmeyer de 250 ml, 20 ml de solution d'acide borique à 4% contenant un indicateur coloré (vert de bromocrésol et rouge de méthyle) sont versés. L'erlenmeyer est ensuite installé dans l'unité de distillation en prenant bien soin à ce que la tige plonge dans la solution.

L'échantillon minéralisé est neutralisé à l'aide de soude 10N de façon à obtenir un volume total de 80 ml. La distillation est réalisée et stoppée lorsque le volume de distillat atteint 150ml. Le titrage de l'azote par l'acide chlorhydrique 1N est alors réalisé. Le volume ajouté est noté  $v$  (en ml). La teneur en protéines brutes est déterminée en multipliant la teneur en azote



total par le facteur 6,25, facteur utilisé pour la conversion de l'azote en protéine.

La teneur en azote total est donnée par la formule :

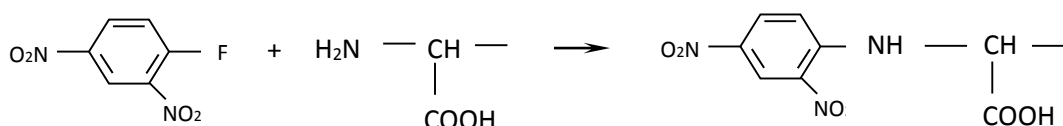
$$\% N = \frac{1,4 \times v}{m}$$

$v$  : Le volume de HCl 1N

$m$  : La masse d'échantillon introduite dans le tube

#### 2.2.4.6. Détermination du degré d'hydrolyse de l'hydrolysats

Le degré d'hydrolyse est défini par le nombre de liaisons peptidiques coupées (h) par rapport au nombre total de liaisons peptidiques ( $h_{tot}$ ) par unité de masse. À l'occasion de chaque coupure d'une liaison peptidique, un groupe aminé libéré est formé. Le degré d'hydrolyse est donc déterminé en mesurant la quantité de groupes aminés libérés. Le dosage des groupes aminés libérés est basé sur la réaction entre le dinitrofluorobenzène (DNFB) avec le groupe aminé des acides aminés (Goodwin, 1968). La réaction entre le DNFB et un acide aminé libre produit un dérivé dinitrophénylé de couleur jaune. La densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 410 nm.



Après centrifugation des prélèvements réalisés au cours de l'hydrolyse, le surnageant est dilué au 1/500ème. 1ml de surnageant dilué est ajouté à 1ml de solution de tétraborate Tétradécahydraté (3,80%). Après agitation, 0,25ml de solution de 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB/éthanol avec le taux 0,013/1 de volume) sont ajoutés. Les échantillons sont chauffés à 60°C pendant 10 minutes, puis refroidis sous l'eau du robinet.

2 ml d'acide hydrochlorique 10N sont ajoutés pour arrêter la réaction. Une courbe de calibration est établie en utilisant la glycine comme référence (SIGMA, France). L'absorbance est lue à 410 nm et le nombre de moles d'amine est ainsi déterminé. Une mole d'amine est

égale à une liaison peptidique coupée.

Le degré d'hydrolyse est donné par le rapport (Ravallec-Plé, 2000):

$$DH(\%) = \frac{\text{Nombre de moles d'amines} \times \text{dilution}}{\text{Masse de protéin (en g) dans 1 ml surnageant} \times h_{\text{tot}} \times 10^{-3}} \times 100$$

$h_{\text{tot}}$  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.

Le nombre de moles d'amine est déterminé en fonction de la gamme d'étalonnage : préparation de la solution mère à 1mM (Soit 75 mg de glycine dans 100ml) puis dilution de cette solution au 1/10. Définir des plages de concentration de glycine de 0 à 1  $\mu\text{mol}$  (volume sol mère glycine (ml) + volume eau (ml) = 1ml de solution à concentration de glycine déterminée), puis la mesure par l'appareil colorimétrique UV1800. Une équation de régression linéaire sera construite sur la base des résultats obtenus, un coefficient R proche de 1 donnera un résultat acceptable.

## 2.3. Résultats des expérimentations sur la sardine

### 2.3.1. Composition proximale de la sardine

La composition biochimique des sardines est présentée dans le Tableau 2.1.

**Tableau 2.1 Composition biochimique de la sardine (*Sardina Pilchardus*)**

| Matières                           | Contenus     |             |               |             |
|------------------------------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
|                                    | Humidité (%) | Lipides (%) | Protéines (%) | Cendres (%) |
| <b>Sardine</b>                     | 66,00±0,63   | 13,46±0,25  | 15,96±0,27    | 2,74±0,45   |
| <b>Sous-produit de la Sardine*</b> | 67,30±0,70   | 14,50±2,10  | 12,70±0,80    | 4,90±0,90   |
| <b>Viscères de la sardine**</b>    | 77,65 ± 0,00 | 4,90 ± 0,10 | 15,8 ± 1,10   | 1,90 ± 0,00 |

\* Batista *et al.*, (2009) ; \*\* Dumay *et al.*, (2006)

Le taux d'humidité trouvé est similaire à celui des sous-produits de sardine annoncé par Batista *et al.*, (2009), mais moindre que celui trouvé dans les viscères de sardine (Dumay *et al.*, 2006). Ceci s'explique par la moindre proportion de matière grasse dans les viscères.

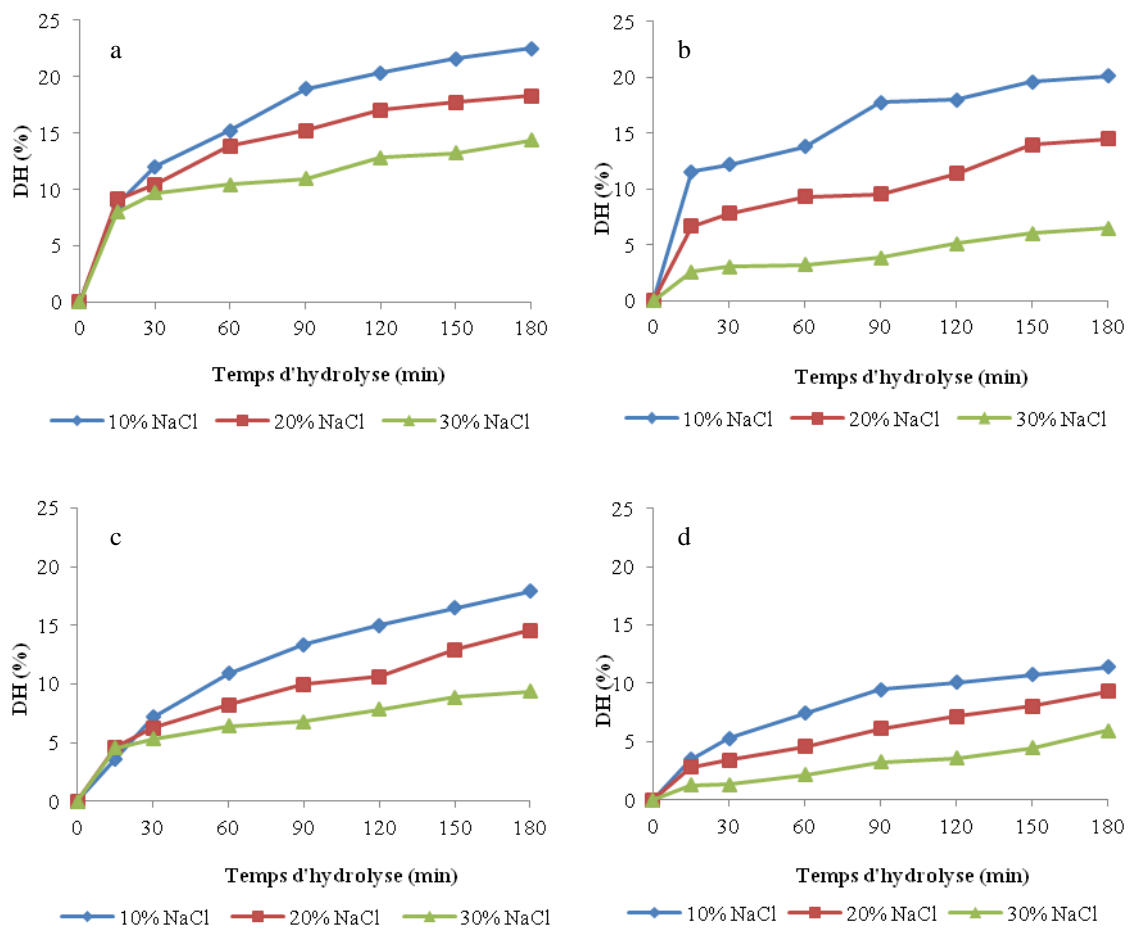
En ce qui concerne les protéines, le taux de 16% est équivalent à celui annoncé par Dumay *et al.*, (2006) pour les viscères, mais un peu supérieur à celui trouvé pour les sous-produits. Enfin la teneur en cendres trouvée est intermédiaire à celle des viscères ou des sous-produits

### **2.3.2. Activité des quatre enzymes commerciales en présence de quantités variables de NaCl**

Cette série d'expériences visait à établir le comportement des quatre protéases industrielles sélectionnées sur l'hydrolyse de la sardine selon les conditions opératoires imposées par les procédés traditionnels : forte concentration en sel, température ambiante et pH libre (Figure 2.8). L'activité enzymatique est essentiellement évaluée par la mesure du degré d'hydrolyse (DH).

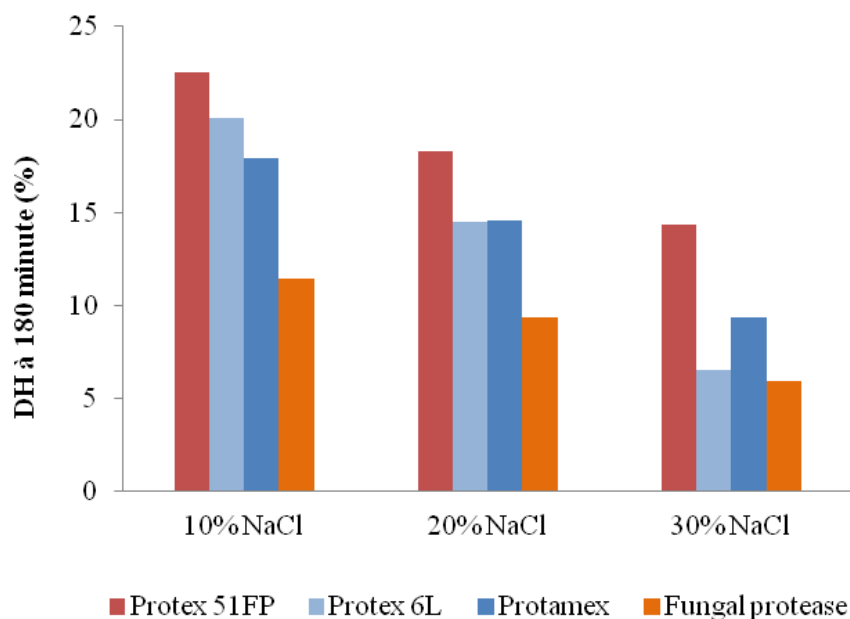
En effet, le degré d'hydrolyse est une mesure de l'ampleur de la dégradation de l'hydrolyse d'une protéine, il est l'indicateur le plus largement utilisé pour la comparaison des hydrolysats de protéines (Bougatef *et al.*, 2010).

Les cinétiques sont typiques à savoir une phase rapide d'hydrolyse (ici 15 minutes) suivie d'un ralentissement. Cependant, même après trois heures de réaction, et, quelles que soient les conditions, aucune enzyme ne semble avoir fini d'hydrolyser les protéines puisqu'aucune phase plateau n'est observée. Cela démontre que le DH maximal n'a jamais été atteint et qu'il conviendrait de prolonger les expérimentations pour déterminer le taux d'hydrolyse maximal que ces enzymes peuvent offrir dans ces conditions. Néanmoins, quelle que soit l'enzyme, l'hydrolyse paraît affectée par la teneur en sel.



**Figure 2.8 Evolution temporelle du degré d'hydrolyse de la sardine en présence de trois concentrations de sel (10, 20 et 30% de NaCl) et de quatre enzymes ; (a) Protex 51FP, (b) Protex 6L, (c) Protamex et (d) Fungal protéase**

En effet, les valeurs de DH s'avèrent inversement proportionnelles aux concentrations en sel. Protex 51FP semble être l'enzyme dont l'activité est la moins perturbée par une augmentation de 10 à 30% du NaCl puisque le DH mesuré au bout de trois heures ne diminue « que » de 36% (22,5 → 14,3) (Figure 2.9). Viennent ensuite Protamex (-47%), Fungal protéase (-55%) puis Protex 6L qui est la plus affectée (-70%). Par ailleurs, il apparaît très clairement que pour une même concentration de NaCl, toutes les enzymes ne sont pas équivalentes entre elles.



**Figure 2.9 Degré d'hydrolyse obtenu avec les quatre enzymes en fin d'hydrolyse**

Ainsi, quelle que soit la teneur en sel, parmi les quatre enzymes, Protex 51FP est toujours celle qui hydrolyse le plus la sardine, dans les conditions fixées, avec des DH au bout de trois heures de 22,5, 18,28 et 14,35% pour 10, 20 et 30% de NaCl respectivement (Figure 2.9). À l'inverse, la Fungal protéase est l'enzyme qui donne les moins bons DH à trois heures quelle que soit la concentration en sel utilisée (11,4 ; 9,3 et 5,9% avec 10, 20 et 30% de sel, respectivement). Protex 6L et Protamex donnent des résultats intermédiaires avec cependant une inversion de leur classement en fonction des conditions. Ainsi à 10% de NaCl, Protex 6L apparaît plus efficace, à 20% les deux enzymes ont une activité protéolytique du même ordre à 30%. Il convient de noter qu'en présence de 20% de NaCl le taux d'hydrolyse de la sardine pour ces deux enzymes et équivalent à celui obtenu avec Protex 51FP, mais avec 30% de NaCl.

Il est très difficile de comparer ces résultats à ceux de la littérature tant les conditions utilisées sont différentes. Ainsi pour ce même substrat, à savoir la sardine, Kechaou *et al.*, (2009) et Batista *et al.*, (2009) indiquent que c'est l'alcalase qui donne les meilleurs résultats, tandis que pour Dumay *et al.*, (2006) cette enzyme est moins active que Protamex. Dans une autre étude, Jia *et al.*, 2010 rapporte que parmi plusieurs enzymes c'est Protamex qui donne la valeur de DH la plus élevée (29,78%) après 6 h d'hydrolyse de peau de lieu d'Alaska. Hathwar *et al.*,

2011 ont eux montré, en testant quatre enzymes commerciales sur des déchets de deux espèces de carpes Catla (*Catla Catla*) et Rohu (*Labeo rohita*), que c'était la Fungal protéase qui donnait le DH le plus élevé (49,10%) suivi de Protex 7L (environ 45%) tandis que les enzymes alcalase et neutrase hydrolysaient plus faiblement. Cette grande variabilité de résultats illustre parfaitement l'influence de très nombreux paramètres et ne permet donc guère de comparaison.

D'autre part il convient également de tenir compte de l'activité protéolytique des enzymes endogènes qui n'ont pas été inactivées et qui se trouvent dans des conditions de pH et de température quasi optimales. Comme l'ont montré Noda *et al.*, (1982) trois protéases alcalines (I, II et III) sont présentes dans le cæcum pylorique de la sardine. Le type I est une protéase alcaline, le type II une enzyme chymotrypsine ionique et le type III une enzyme trypsine ionique. L'activité protéolytique de ces trois enzymes est inhibée différemment en fonction de la concentration de NaCl ajoutée. La protéase alcaline de type I est instable quand la teneur en NaCl dépasse 15%, tandis que la trypsine est encore stable avec 25% de NaCl et ce même a bout de trois mois. Quant à l'activité de la chymotrypsine elle est inhibée à partir de 20% de sel.

Ces premiers essais montrent que c'est la protéase Protex 51FP qui donne les meilleurs résultats quelle que soit la concentration en sel et qu'à l'inverse la Fungal protéase soit la moins efficace. Avec 10% de NaCl, le DH le plus élevé est obtenu avec Protex 51FP, suivi de Protex 6L, Protamex et enfin la Fungal protéase. À 20% de NaCl, aucune différence significative n'est observée entre Protex 6L et Protamex. Par contre à 30% de sel la valeur du DH pour Protamex est plus élevée que pour Protex 6L. Ces résultats laissent à penser que la tolérance au sel de Protamex est meilleure que celle de Protex 6L. Elle serait donc plus adaptée pour la production de la sauce de poisson, qui nécessite la présence d'une quantité de sel d'environ 20 à 30%.

Protex 51FP donnant des valeurs élevées de DH pour toutes les concentrations en sel et Protamex donnant une bonne activité à des concentrations élevées en sel, ce sont ces deux enzymes qui sont retenues pour la suite des expériences.

### **2.3.3. Hydrolyse de la sardine par Protex 51FP et Protamex**

Afin de compléter ces premiers résultats une série d'hydrolyse avec les deux enzymes : Protamex et Protex 51FP, toujours en présence des mêmes quantités de NaCl a été réalisée. Le temps de la réaction a été étendu à 6 heures et la température légèrement

augmentée (35°C au lieu de 30°C) afin de se retrouver dans les conditions les plus proches de la fabrication de la sauce de poisson traditionnelle. Ces expérimentations devraient permettre d'identifier laquelle de ces deux enzymes est la plus adaptée pour entrer dans le procédé de de la sauce de sardine.

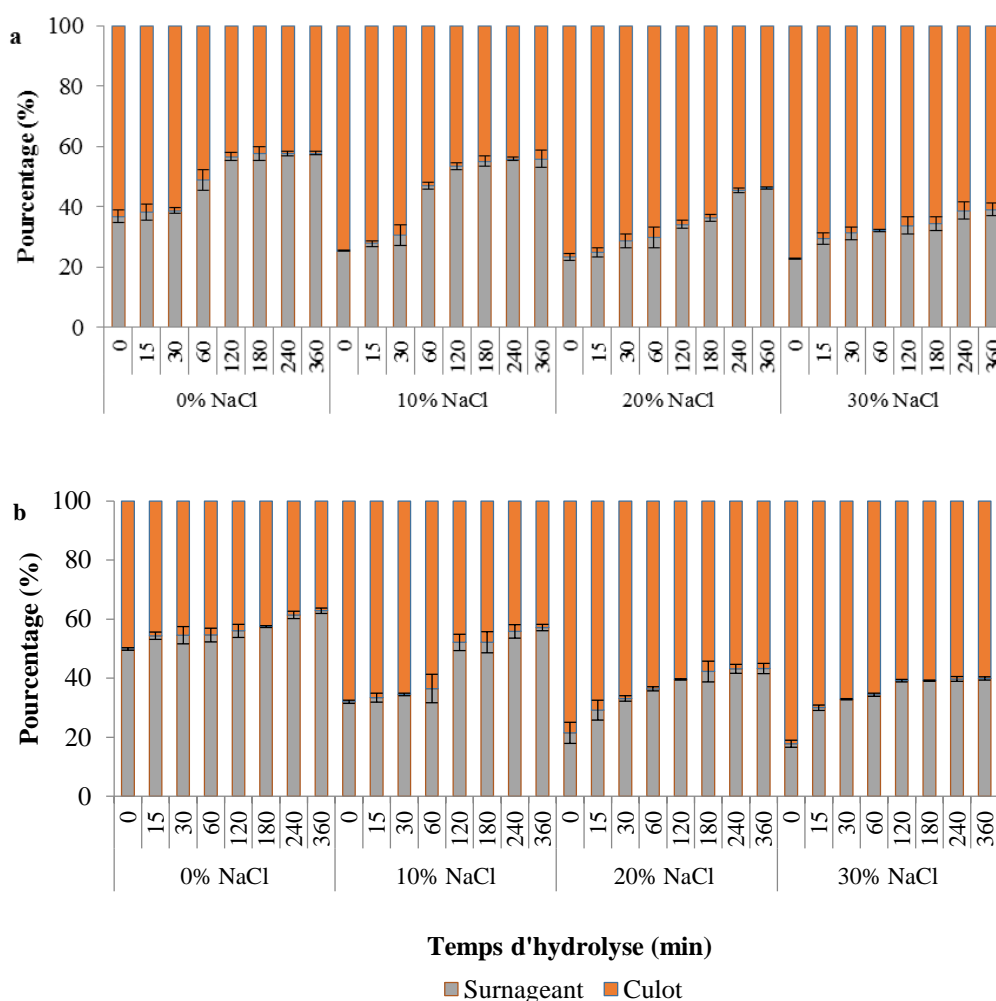
### **2.3.3.1. Bilan massique des différentes phases obtenues après hydrolyse de la sardine**

La répartition de chaque phase résultante de la centrifugation à savoir culot et surnageant est indiquée sur la Figure 2.10 (a) pour Protex 51FP et Figure 2.10 (b) pour Protamex.

Pour les deux enzymes l'avancement de la protéolyse entraîne une solubilisation de la matière qui se traduit par une augmentation de la quantité de surnageant et une réduction de la phase insoluble. Néanmoins, les deux enzymes ne se comportent pas de façon identique surtout en présence de sel avec l'apparition plus ou moins rapide d'une phase de plateau illustrant l'incapacité à obtenir plus de matière soluble dans la phase liquide.

Avec Protex 51FP et en absence de sel, la quantité de surnageant dans le milieu d'hydrolyse est, dès le début, plus importante que dans les autres expériences avec sel ( $37 \pm 2\%$ ). Cette proportion augmente ensuite pour atteindre un plateau au bout de trois heures (58%). Il semble à la vue de ces résultats que trois heures suffisent à Protex 51FP en absence de sel et à 35°C pour solubiliser la sardine. En présence de 10% NaCl, le taux de solubilisation est plus faible au départ, mais il augmente beaucoup plus rapidement que sans sel pour atteindre un plateau au bout de deux heures avec une valeur sensiblement identique à la précédente ( $56 \pm 3\%$ ). L'augmentation de la teneur en sel (20 et 30% de NaCl) semble affecter le fonctionnement de Protex 51FP puisque les cinétiques de solubilisation sont beaucoup plus longues, aucun plateau n'est atteint même après six heures et les valeurs finales obtenues sont plus faibles (46% et 39% respectivement). Il ressort donc que dans toutes les conditions d'hydrolyse, Protex 51FP permet l'augmentation de la quantité de surnageant en fonction du temps, mais que cette solubilisation

de la sardine soit plus ou moins rapide et efficace selon la concentration en sel.



**Figure 2.10 Evolution du culot et du surnageant lors de l'hydrolyse de la sardine par l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) (température 30°C, pH libre, 350 rpm, 360 min d'hydrolyse)**

0 % NaCl : 500g de sardine, 100ml (20%) d'eau, 5g (1%) de Protex 51FP  
 10% NaCl : 500g de sardine, 100ml d'eau, 5g de Protex 51FP et 50g de NaCl  
 20% NaCl : 500g de sardine, 100ml d'eau, 5g de Protex 51FP et 100g de NaCl  
 30% NaCl : 500g de sardine, 100ml d'eau, 5g de Protex 51FP et 150g de NaCl

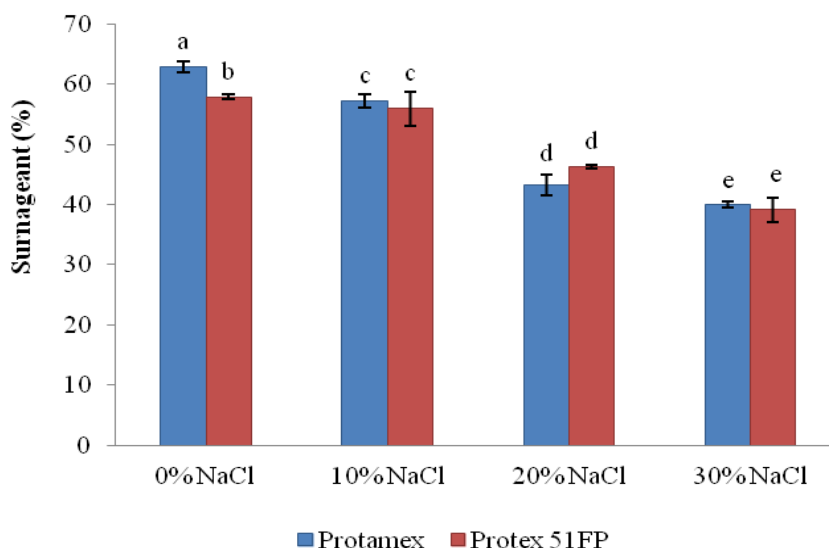
Les expérimentations avec Protamex donnent des résultats similaires dans le sens où, quelle que soit la concentration en sel, il y a augmentation du surnageant et diminution du culot dans le milieu au cours du temps.

En absence de sel, la proportion de surnageant dans le milieu est très élevée dès le début de l'hydrolyse (50%) et augmente régulièrement pour atteindre une valeur de (63%) à 360



minutes. Aucune phase plateau n'est observée même après six heures de réaction. Lorsque 10% de NaCl sont ajoutés l'action de Protamex est très fortement affectée puisque, un plateau apparaît au bout de seulement deux heures avec un taux de solubilisation plus faible que dans l'expérimentation précédente (57%)

L'augmentation de la teneur en sel (20% et 30%) ne fait que renforcer cette observation à savoir une solubilisation moindre de la sardine par Protamex et une phase plateau atteinte rapidement (entre deux et trois heures). Tout comme Protex 51FP, Protamex est à même de solubiliser la sardine même en présence de sel et à 35°C. Cependant, le fonctionnement de cette enzyme apparaît très perturbé dès que la teneur en sel augmente. Cela se traduit par des taux de solubilisation moindres et par l'observation d'une phase plateau assez rapidement (entre deux et trois heures).



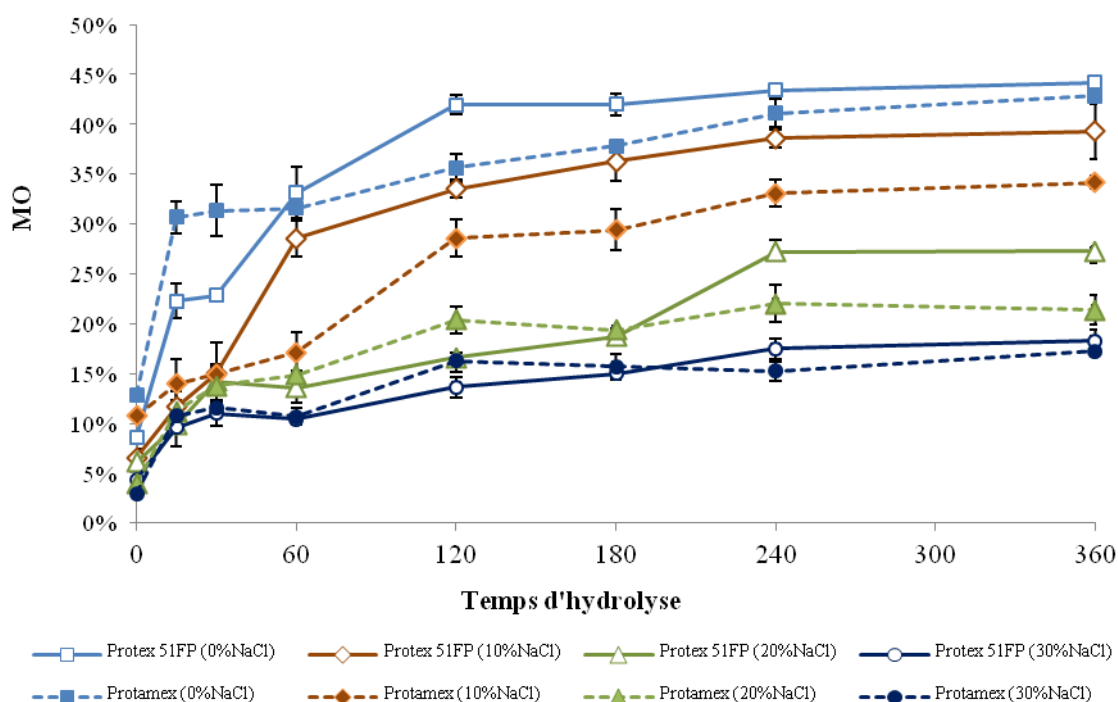
**Figure 2.11 Pourcentage de surnageant obtenu après hydrolyse de la sardine par l'enzyme Protamex et Protex 51FP à 360min d'hydrolyse**

a, b, c, d, e : différences significatives et signification statistique ( $p < 0,05$ ) pour le pourcentage de surnageant après hydrolyse de la sardine entre Protex 51FP et Protamex,

La Figure 2.11 illustre le taux de solubilisation de la sardine observé à la fin des expérimentations (360 minutes) pour les deux enzymes en fonction de la teneur en NaCl. Quelle que soit l'enzyme, ce taux apparaît inversement proportionnel à la teneur en sel du milieu. Par contre, à l'exception des deux expériences conduites en l'absence de sel, pour toutes les autres,

aucune différence significative n'est observée entre les deux enzymes après six heures de réaction. Sur cette simple base il n'apparaît donc pas possible de choisir entre Protex 51FP et Protamex pour solubiliser la sardine en présence de sel.

### 2.3.3.2. Matière organique en solution dans le surnageant après hydrolyse de la sardine



**Figure 2.12 Matière organique en solution dans le surnageant après hydrolyse de la sardine par les enzymes Protamex et Protex 51FP**

La présence de NaCl dans les échantillons fausse l'analyse de la solubilisation de la matière par mesure de la distribution de la matière sèche comme il est d'usage de le faire. En effet, comme décrit dans la partie précédente, la proportion de surnageant augmente au cours du temps, mais les plus grandes valeurs sont observées dans les échantillons contenant le plus de sel. Ceci s'explique par la solubilisation d'une grande partie du sel ajouté au milieu augmentant donc de facto la teneur en matière sèche des prélèvements. Afin de s'affranchir de cela, il a été décidé de suivre la distribution de la matière organique (MO) en lieu et place de la

matière sèche. Les résultats analytiques correspondants sont illustrés sur la Figure 2.12.

Quelles que soient les conditions, la valeur de MO soluble augmente avec l'avancement de la réaction reflétant bien l'action positive des enzymes sur la solubilisation de la matière première, notamment par leur activité protéolytique, qui conduit à la formation de peptides potentiellement plus solubles que les protéines natives (Kechaou *et al.*, 2012).

Néanmoins, comme pour le bilan massique, les valeurs de MO diffèrent en fonction des concentrations de sel avec là encore une relation inversement proportionnelle. Ceci peut s'expliquer par l'inhibition probable des complexes enzymatiques utilisés ici en présence de fortes proportions de NaCl. En effet comme cela a été décrit à quelques reprises, ces enzymes industrielles ne sont pas aussi halotolérantes que les enzymes extraites des bactéries halophiles et voient donc leur activité plus ou moins rapidement décroître dès lors que la teneur en sel augmente (Beddows & Ardeshir, 1979; Miyazawa *et al.*, 1979; Chaveesuk *et al.*, 1993; Raksakulthai *et al.*, 1986).

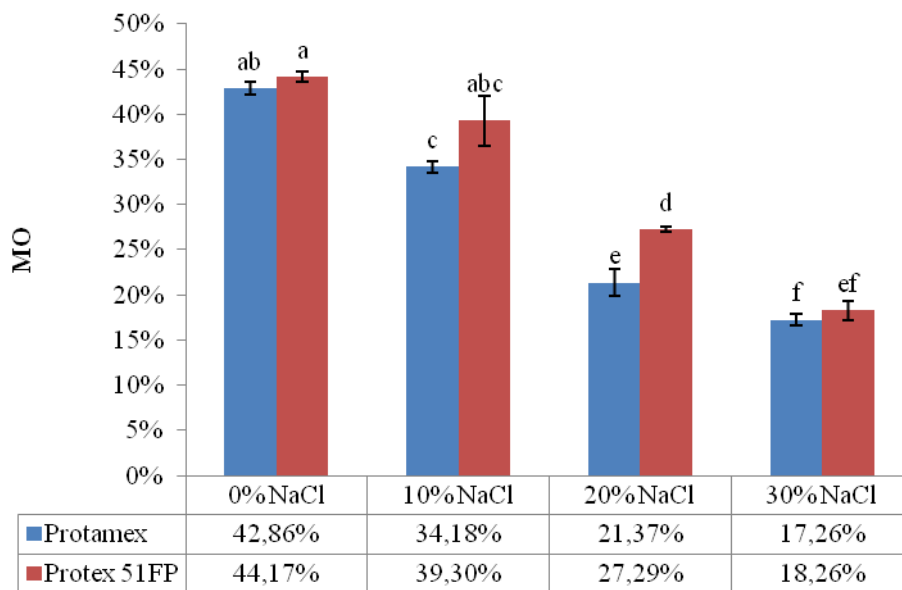
Avec Protex 51FP, les cinétiques de solubilisation sont classiques à savoir une forte augmentation initiale puis un ralentissement conduisant à l'obtention d'un plateau en général au bout de quatre heures. Les valeurs maximales de matière solubilisée sont inversement proportionnelles à la teneur en sel. Deux hypothèses peuvent expliquer cela. La première est une possible inhibition de l'enzyme par les produits formés durant la première partie d'hydrolyse, ces produits agissant comme substrat en concurrence avec les protéines de poisson non digérées ou partiellement digérées (Souissi *et al.*, (2007). La deuxième est que la présence de sel concurrence directement le passage en solution des composés hydrolysés, plus il y a de sel moins le milieu est à même d'absorber des composés, le sel passant prioritairement en solution. Il conviendrait pour statuer d'effectuer des analyses complémentaires par exemple la mesure du DH (2.3.3.3) qui permettrait de voir si l'activité de Protex 51FP est ou non arrêtée (inhibition ou dénaturation) lorsque le plateau est atteint.

Les cinétiques de solubilisation de la matière organique de la sardine sous l'action de Protamex ont la même allure à savoir une solubilisation forte au départ puis un ralentissement voir un plateau (pour au moins les essais avec 10 et 20% de NaCl). La relation inverse entre teneur en sel et matière solubilisée est là aussi observée. Cependant, pour une même teneur en sel dans le milieu, il semble que la solubilisation soit moindre avec Protamex qu'avec

Protex 51FP.

La Figure 2.13 illustre le taux de solubilisation de la matière organique après six heures de réaction enzymatique. L'effet négatif du sel est bien visible quelle que soit l'enzyme puisque chaque ajout de sel entraîne une diminution notable de la matière organique récupérée dans le surnageant. Au final, ce sont près de 60% de matière organique en moins par rapport aux témoins qui sont retrouvés dans la phase soluble lorsque le milieu contient 30% de NaCl (18,26/44.17 pour Protex 51FP ; 17,26/42,86 pour Protamex)

Bien que pour toutes les conditions testées, Protex51FP semble plus à même de solubiliser la sardine, les analyses statistiques révèlent que ces différences avec Protamex ne sont pas significatives (au seuil de 5%) sauf à 20% de sel.



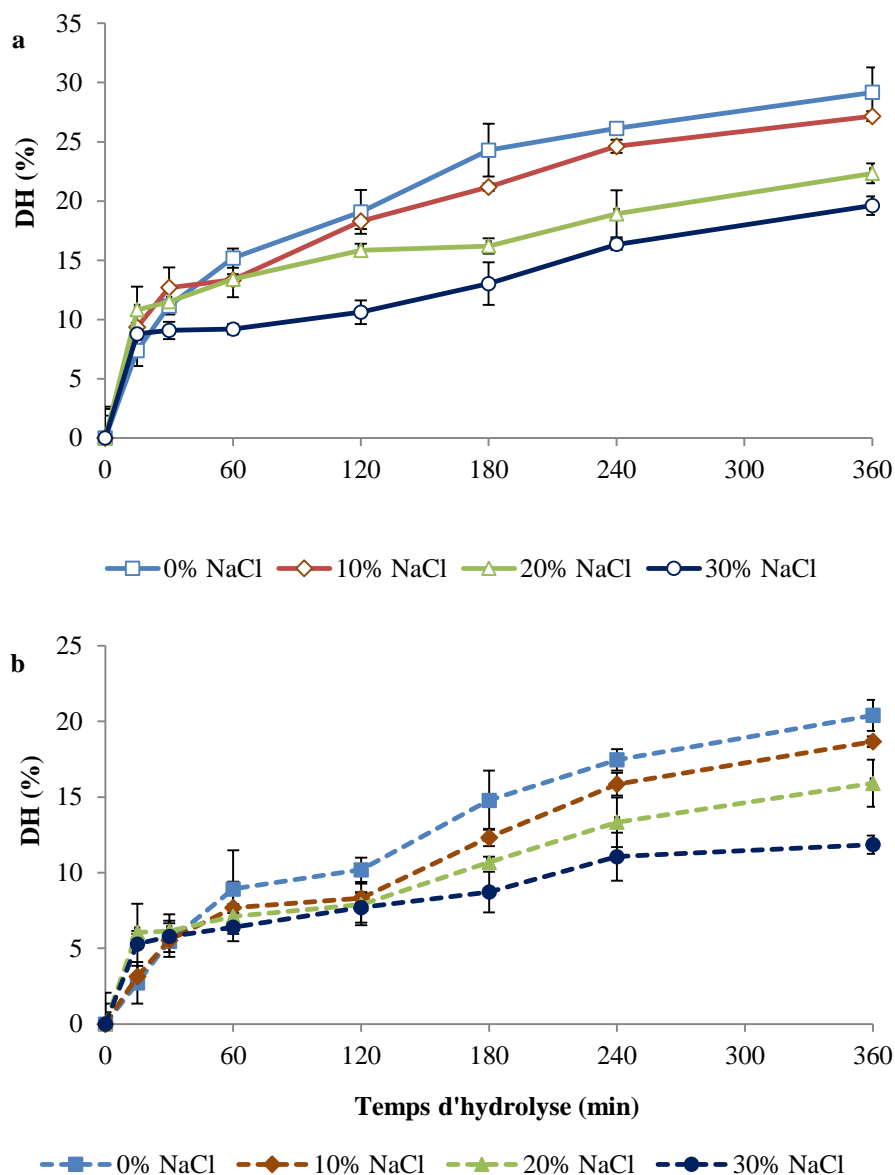
**Figure 2.13** Différence de matière organique en solution dans le surnageant à 360min d'hydrolyse de la sardine par les enzymes Protamex et Protex 51FP

a, b, c, d, e : différences significatives et signification statistique ( $p < 0,05$ ) pour la valeur de MO du surnageant après hydrolyse de la sardine par Protamex et Protex 51FP,

### 2.3.3.3. Mesure du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH) indique le pourcentage de liaisons peptidiques qui ont été coupées lors de l'hydrolyse (Adler-Nissen, 1976). C'est l'un des paramètres de base qui décrit les propriétés des hydrolysats et qui doit être contrôlé pendant l'hydrolyse de protéines. Cette mesure est essentielle, car plusieurs propriétés des hydrolysats de protéines sont étroitement liées aux DH. L'hydrolyse des liaisons peptidiques provoque plusieurs changements tels que l'augmentation des groupes amines et carboxyles, ce qui augmente la solubilité. Le poids moléculaire de la protéine diminue et la structure polymorphe est détruite, ce qui affecte les propriétés fonctionnelles des protéines (Nielsen, 1997)

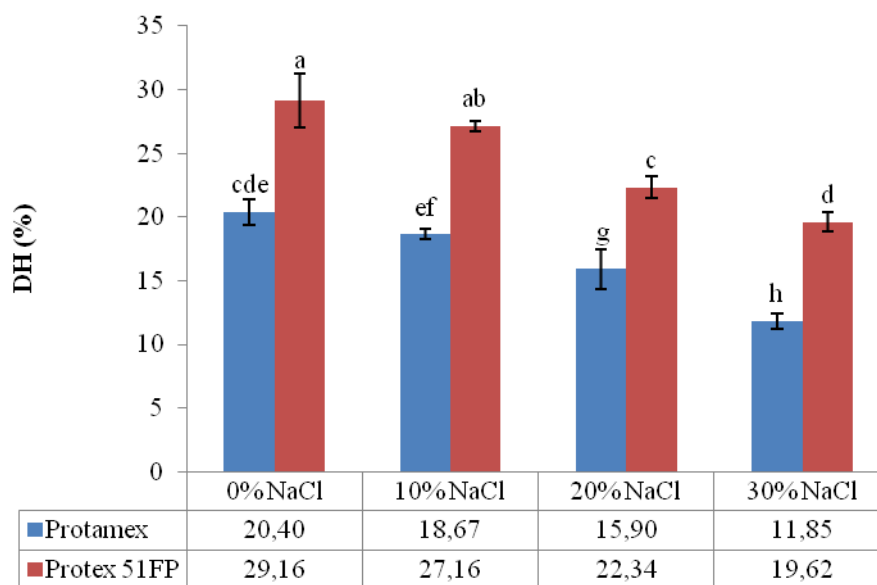
La Figure 2.14 (a) représente l'évolution du degré d'hydrolyse de la sardine au cours du temps par l'enzyme Protex 51FP. Les valeurs de DH augmentent fortement au début de la réaction (pendant la première demi-heure), puis plus progressivement jusqu'à 360 minutes sans jamais atteindre de plateau. Ces cinétiques sont relativement typiques des réactions de protéolyse et ont été observées à de nombreuses reprises notamment sur des co-produits marins y compris de sardine (Kechaou *et al.*, 2009 ; Liaset *et al.*, 2003 ; Quaglia & Orban, 1987). Cette non-linéarité peut être due à plusieurs facteurs. Ainsi, les peptides formés peuvent par exemple provoquer des réactions hydrophobes ou des auto-associations entre peptides, conduisant à la formation de peptides plus grands et entraînant une réduction de leur solubilisation dans la phase liquide (Kechaou *et al.*, 2012). Les produits d'hydrolyse peuvent devenir un substrat concurrent des protéines non digérées ou partiellement digérées du poisson (Souissi *et al.*, 2007). Enfin, des interactions protéines-protéines peuvent être induites, ce qui conduit à une solubilité inférieure (Wachirattanapongmetee *et al.*, 2009). Quoiqu'il en soit, l'absence de plateau indique que dans ces conditions même après six heures, la protéolyse n'est pas terminée. Cela permet donc de statuer quant à la non-dénaturation de Protex 51FP qui reste toujours active même en présence de 30% de sel. Néanmoins, il est clair que le NaCl influence négativement l'action protéolytique de l'enzyme et que plus celui-ci est abondant moins elle est à même de couper les liaisons peptidiques.



**Figure 2.14 Evolution du degré d'hydrolyse de la sardine avec l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) en présence de quantités variables de NaCl**

Les cinétiques d'hydrolyse observées avec Protamex (Figure 14 b) sont du même type (hydrolyse rapide au début puis ralentissement) avec cependant un plateau qui semble être atteint au bout de quatre heures en présence de 30% de NaCl. Là aussi, le sel perturbe profondément la cinétique de protéolyse, avec une relation inverse entre la teneur en NaCl et le nombre de liaisons peptidiques rompues par Protamex. L'observation d'un plateau, au bout de 240 minutes en présence de 30% de sel, semble indiquer qu'une limite ait été atteinte et que, cette enzyme, dans ces conditions, ne soit pas capable de couper plus de protéines de la sardine.

Compte tenu des conditions opératoires (présence de sel, basse température, pH libre), il est très difficile de comparer les valeurs de DH obtenues ici avec celles de la littérature. Néanmoins, les degrés d'hydrolyse mesurés en absence de sel semblent cohérents et s'inscrivent dans la gamme de DH préalablement observés pour ce type de matrice ou ce type d'enzymes (Martínez-Montaña *et al.*, 2010 ; Batista *et al.*, 2009 ; Kechaou *et al.*, 2009 ; Souissi *et al.*, 2007 ; Hathwar *et al.*, 2011 ; Dumay *et al.*, 2006 ; Dumay *et al.*, 2006 ; Castro-Ceseña *et al.*, 2012).



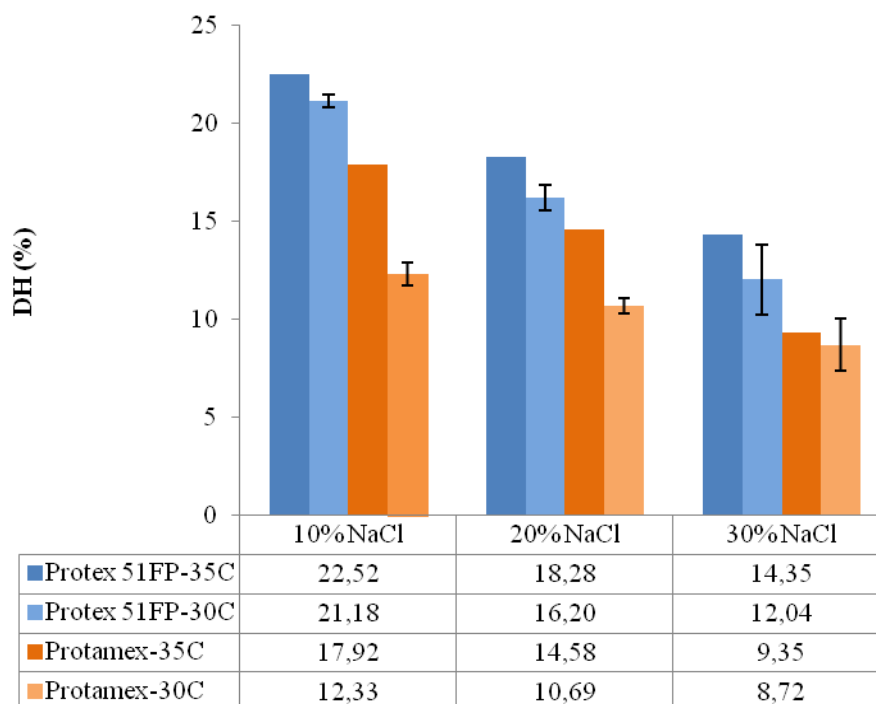
**Figure 2.15 Comparaison des degrés d'hydrolyse de la sardine obtenus à 360 minutes en fonction des différentes conditions opératoires ( $p < 0,05$ )**

Quelles que soient les conditions d'hydrolyse, les valeurs finales de DH obtenues en présence de Protex 51FP sont statistiquement supérieures ( $p < 0,05$ ) (Figure 2.15) à celles en présence de Protamex. Qui plus est, même avec 10 ou 20% de sel, les degrés d'hydrolyse mesurés avec Protex 51FP sont plus élevés que celui mesuré avec Protamex en absence de sel et celui obtenu avec 30% de sel n'est pas statistiquement différent (19,62% / 20,40%). Si Protex 51FP apparaît donc plus active que Protamex pour hydrolyser la sardine dans ces conditions, les deux enzymes sont tout de même notablement affectées par la présence de NaCl. Ainsi par comparaison avec une hydrolyse témoin (sans sel), les DH mesurés au bout de six heures avec 30% de NaCl ont diminué de près de 33% pour Protex 51FP (19,62 / 29,16) et de 42% pour Protamex (11,85 / 20,40).

#### 2.3.3.4. Effet de la température sur la protéolyse de la sardine

Dans le domaine de la chimie, la règle de Van't Hoff dit que lorsque la température augmente de 10°C, la vitesse de réaction chimique augmente de 2 à 4 fois. Toutefois, dans le cas d'une hydrolyse enzymatique du poisson cette règle ne peut s'appliquer, car les protéines sont altérées par les fortes températures.

Pour chaque enzyme industrielle, le fournisseur annonce une plage de températures dans laquelle l'enzyme est fonctionnelle et suit globalement une allure gaussienne centrée sur un optimum. Pour les deux enzymes étudiées, les expérimentations conduites se situant en deçà des optima, logiquement la sardine devrait être plus hydrolysée à 35°C qu'à 30°C.



**Figure 2.16 Influence de la température sur le degré d'hydrolyse de la sardine hydrolysée par les enzymes Protex 51FP et Protamex en présence de sel**

C'est ce que confirment les résultats (Figure 2.16) avec pour toutes les conditions une hydrolyse plus poussée lorsque la température augmente de 5°C (30 → 35°C). Par contre curieusement ce gain n'est pas identique en fonction des enzymes et du taux de sel. Ainsi



pour Protex 51FP, plus il y a de sel, plus l'effet positif de l'augmentation de température sera notable : +6% à 10% NaCl, +13% à 20% NaCl et +19% à 30% NaCl. Pour Protamex, c'est l'inverse à savoir : +45% à 10% NaCl, +36% à 20% NaCL et +7% à 30% NaCl.

Cela traduit une fois de plus le comportement différent de ces deux enzymes et l'intérêt de bien les étudier afin de décider laquelle des deux sera la plus appropriée pour être utilisés dans les procédés traditionnels de fabrication de sauce de poisson. Néanmoins, Protex 51FP apparaît moins sensible à la variation de température étudiée et semble donc être à priori plus à même d'être utilisée en conditions naturelles où la température n'est pas contrôlée.

*Remarque : la non-répétition des expériences à 35°C empêche tout traitement statistique*

#### **2.3.4. Hydrolyse de la sardine par l'enzyme Protex 51FP**

Dans les expériences précédentes, nous avons testé différentes concentrations en sel (10%, 20% et 30%) sur l'activité des enzymes. Au vu de ces premiers résultats, et afin de se rapprocher de la fabrication traditionnelle de la sauce de poisson, un essai à 25% en sel est mis en place. Celui-ci sera réalisé avec l'enzyme Protex 51FP qui semble la plus adaptée à travailler dans ces conditions.

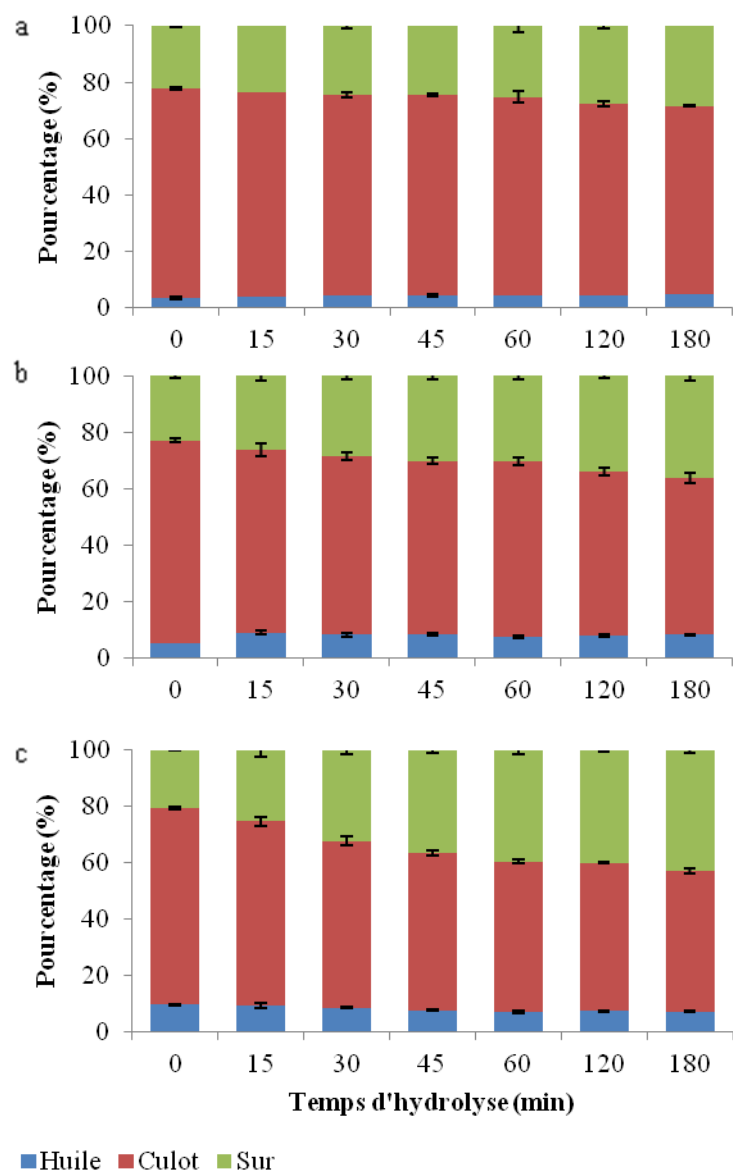
Un témoin, dans les mêmes conditions que la méthode traditionnelle: poissons, 25% de sel, 20% d'eau à 30°C, sera comparé à deux expériences supplémentées en Protex 51FP, avec un échantillon à 25% de sel [T0 (+s)] et un sans sel [T0 (-s)].

##### **2.3.4.1. Distribution de la matière**

Au cours de l'avancement de la réaction, une liquéfaction plus ou moins avancée de la sardine survient sous l'action des enzymes endogènes et additionnelles dans certains cas. Comme attendu sur ce type de matrices, trois phases peuvent ainsi être identifiées et isolées par centrifugation ; une phase huile qui surnage, une phase aqueuse qui contient les éléments solubles et un culot contenant les éléments insolubles (Dumay *et al.*, 2006). Pour les trois lots, logiquement, la proportion de phase soluble augmente avec le déroulement de l'hydrolyse (Figure 2.17). En effet, cela est dû à l'activité des enzymes protéolytiques qui libèrent des

polypeptides, des peptides, des acides aminés et l'eau des cellules. Pour le témoin, cette augmentation (beaucoup plus modeste) est le fait des enzymes endogènes, les seules qui interviennent dans le procédé traditionnel. Entre les deux échantillons additionnés de Protex 51FP, c'est celui dénué de sel [T0 (-s)] qui présente le plus fort taux de solubilisation ce qui est logique au vu des effets inhibiteurs du sel vus précédemment.

La Figure 2.18, illustre la répartition du surnageant, de l'huile et du culot obtenue en fin d'hydrolyse (180 min). Il apparaît clairement que c'est pour le lot additionné de Protex 51FP, mais dépourvu de sel [T0 (-s)] que la solubilisation a été maximale et qu'à l'inverse pour le lot témoin cette liquéfaction ait été la plus faible. L'analyse statistique révèle que pour les 3 lots, les différences sont significatives, quelle que soit la phase étudiée. Cela indique donc que non seulement la protéase Protex 51FP, mais aussi le sel sont influents et que l'enzyme est négativement affecté par celui-ci (ce qui est en accord avec les précédentes observations). La « libération » d'huile est elle aussi dépendante des conditions et suit la même tendance à savoir qu'elle est maximale pour T0 (-s) et minimale pour le témoin. Cela est là encore logique, il est en effet connu qu'une corrélation positive existe entre le taux d'hydrolyse (donc indirectement de solubilisation) et la récupération en huile (Dumay *et al.*, 2006 ; Kechaou *et al.*, 2009 ; Hathwar *et al.*, 2011)

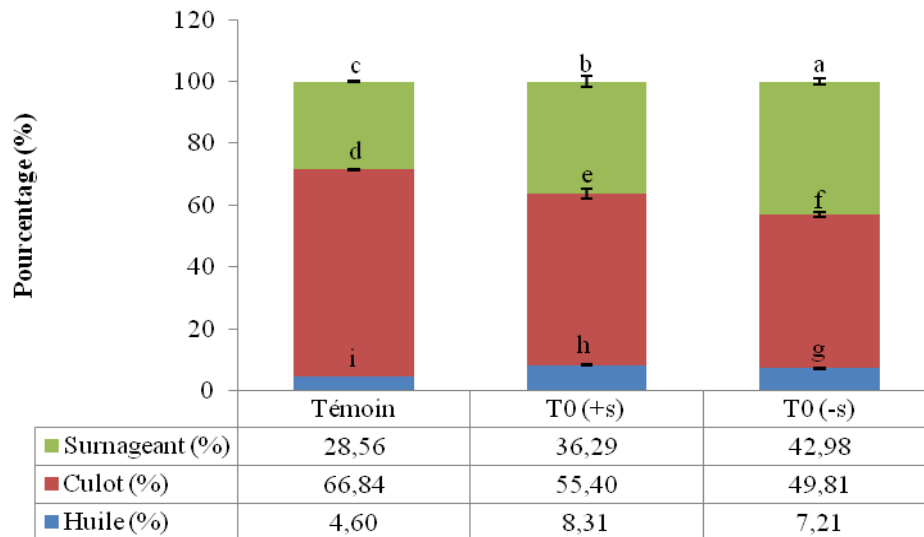


**Figure 2.17 Répartition des phases obtenues après hydrolyse de la sardine**

**Témoin (a)** (500g de sardine, 100ml (20%) d'eau, 125g (25%) de NaCl à 35°C, pH libre, temps d'hydrolyse 180 min, 350 rpm)

**T0 (+s)** (b) (500g de sardine, 100ml d'eau, 125g de NaCl et 5g (1%) de Protex 51FP à 35°C, pH libre, temps d'hydrolyse 180 min, 350 rpm)

**T0 (-s)** (c) (500g de sardine, 100ml d'eau, 5g de Protex 51FP à 35°C, pH libre, temps d'hydrolyse 180 min, 350 r pm)



**Figure 2.18 Bilan massique à 180min d'hydrolyse de sardines**

**Témoin** 500g de sardines, 100 ml d'eau, 125g de NaCl

**T0 (+s)** 500g de sardines, 100 d'eau, 125g de NaCl et 5g de Protex 51FP

**T0 (-s)** 500g de sardines, 100ml d'eau et 5g de Protex 51FP

Conditions d'hydrolyse: Température 35°C, pH libre, temps d'hydrolyse de 180 min, 350 rpm

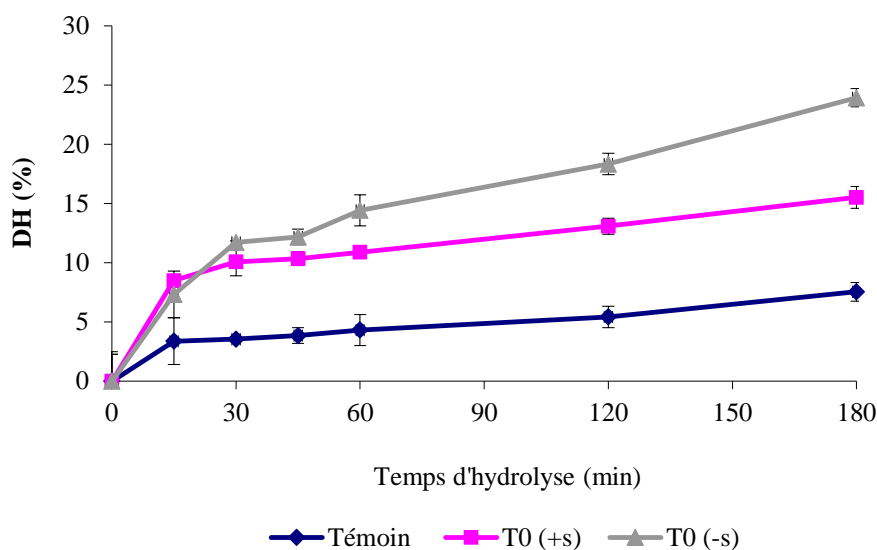
a, b, c: différences significatives et signification statistique ( $p < 0,05$ ) pour la valeur du surnageant

d, e, f: différences significatives et signification statistique ( $p < 0,05$ ) pour la valeur du culot

g, h, i: différences significatives et signification statistique ( $p < 0,05$ ) pour la valeur de l'huile

#### 2.3.4.2. Le degré d'hydrolyse

La Figure 2.19 illustre les cinétiques du degré d'hydrolyse pour les trois lots. Comme pour les expériences précédentes, les allures des courbes sont classiques avec une augmentation rapide (première demi-heure) suivie d'un ralentissement, mais là encore aucun plateau n'est observé, la protéolyse n'est donc pas terminée, quel que soit l'échantillon.



**Figure 2.19 Evolution du degré d'hydrolyse de la sardine au cours du temps en présence ou non de Protex 51FP et de sel**

Pour le témoin, l'autolyse de la sardine conduit à un DH de 7,5% au bout de trois heures. Comme attendu, la présence de sel à hauteur de 25% n'inhibe donc pas totalement les protéases endogènes de la sardine, celles-ci pouvant même rester actives jusqu'à 50% de sel (Noda et Murakami, 1981 ; Vo Van *et al.*, 1983 ; Klomklao *et al.*, 2008)

C'est dans l'échantillon additionné de Protex 51FP, mais sans NaCl [T0 (-s)], que le degré d'hydrolyse après 3h est le plus élevé (23,93%). Une valeur identique avait déjà été obtenue dans les mêmes conditions (cf. 2.3.3.3). L'addition de 25% de NaCl [T0 (+s)] entraîne une diminution notable (-35%) du DH, avec une valeur maximale à 3 heures de 15,52 %. Cette valeur est en cohérence avec les essais préalablement conduits dans les mêmes conditions (Figure 2.14a) à savoir intermédiaire à celles obtenues pour 20% de sel (DH=16%) et 30% de sel (DH=13).

Il ressort de ces différentes expériences que la liquéfaction initiale de la sardine peut être conduite sous la seule action des protéases endogènes, celles-ci apparaissant moyennement sensibles au sel. Cependant, ce processus sera long notamment pour obtenir d'une part un bon taux de solubilisation et d'autre part un degré d'hydrolyse élevé. L'adjonction de protéases industrielles peut s'avérer intéressante pour d'une part accélérer le processus de solubilisation et d'autre part obtenir plus rapidement un fort degré d'hydrolyse. Néanmoins, il convient de bien choisir cette enzyme qui doit pouvoir supporter une forte salinité (20 à 30%) et être active

à des températures basses (30-35°C). Sur la sardine et dans les conditions étudiées, il ressort que parmi les quatre enzymes testées, Protex 51FP s'avère être la plus performante. Son activité résiduelle à 30% de NaCl est encore très intéressante et elle se révèle finalement assez active même à 30°C. Dans les conditions les plus défavorables (30°C et 30% de NaCl), un ajout de 1% de cette enzyme permet, en 3 heures, d'avoir près de 27% de matière solubilisée en plus (28.6→ 36,3%) et d'avoir des protéines beaucoup plus hydrolysées (DH passe de 7,5 à 15%). L'avantage à court terme est donc indéniable, reste à voir si l'impact sera visible sur une production finalisée (liquéfaction + fermentation) et si cela se traduira par des retombées économiques positives (Aspmoa *et al.*, 2005).

## 2.4. Résultats des expérimentations sur l'anchois

### 2.4.1. Composition proximale de l'anchois

Tableau 2.2 Composition biochimique de l'anchois (*Stolephorus commersonii*)

|                | Humidité (%) | Lipide (%) | Protéine(%) | Cendre(%) |
|----------------|--------------|------------|-------------|-----------|
| <b>Anchois</b> | 78,26±0,71   | 2,35±0,27  | 16,32±0,34  | 2,46±0,41 |
| <b>3-5g*</b>   | 76,47±0,36   | 2,41±0,20  | 14,71±0,39  | 6,63±0,33 |
| <b>6-10g*</b>  | 76,97±0,59   | 1,97±0,14  | 16,95±0,27  | 4,02±0,08 |
| <b>25-30g*</b> | 80,65±0,29   | 1,25±0,10  | 15,71±0,34  | 2,40±0,46 |

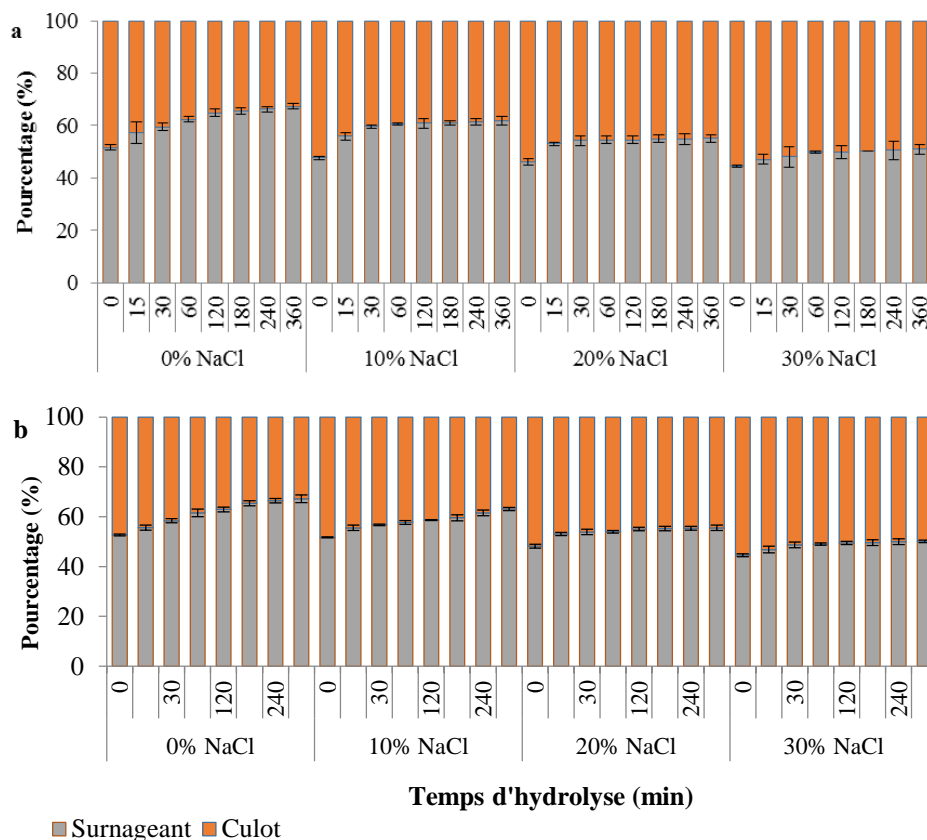
\* Sankar *et al.*, 2013

La composition biochimique des anchois ayant été utilisés pour les expérimentations est indiquée dans le Tableau 2.2. Cette matière première diffère quelque peu de la précédente (sardine) à savoir qu'elle contient plus d'eau (78% / 66%) et beaucoup moins de lipides (2,35% / 13,5%). Les teneurs en protéines et en cendres sont par contre du même ordre. Globalement cette composition proximale est celle attendue si l'on se réfère aux travaux conduits par Sankar *et al.*, en 2013.

## 2.4.2. Hydrolyse de l'anchois par 51FP et Protamex

### 2.4.2.1. Bilan massique des différentes phases obtenues après hydrolyse de l'anchois

La répartition de chaque phase résultante de la centrifugation à savoir culot et surnageant est indiquée sur la Figure 2.20 (a) pour Protex 51FP et la Figure 2.20 (b) pour Protamex.



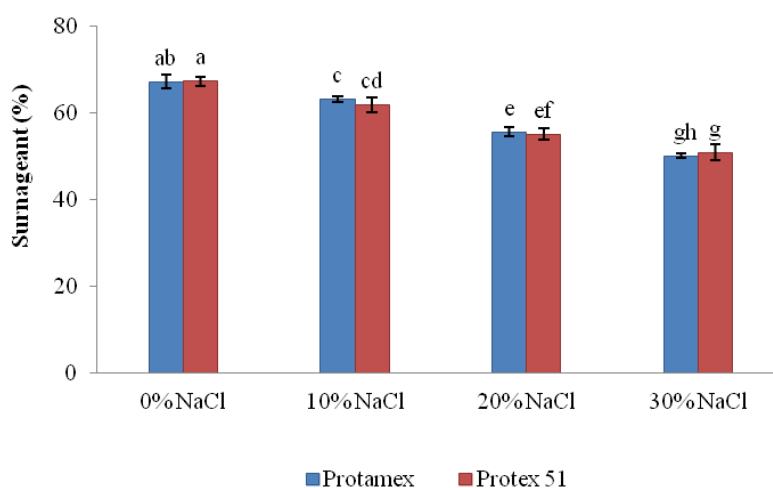
**Figure 2.20 Evolution du culot et du surnageant après hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) (température 30°C, pH libre, 360 min d'hydrolyse)**

Comme avec la sardine, l'anchois se solubilise progressivement sous l'action des deux enzymes entraînant une augmentation progressive de la quantité de surnageant et une réduction du culot. Ici également, le sel affecte négativement la protéolyse de l'anchois sous l'action des deux enzymes. Cela se traduit non seulement par une diminution notable de la matière

solubilisée, mais aussi par l'apparition de plateaux de plus en plus précoces quand la teneur en sel augmente.

Pour les expériences conduites avec Protex 51FP, en l'absence de sel, la proportion de matière solubilisée augmente de plus de 40% en six heures, mais ces augmentations ne sont que de 29, 22 et 18% environ pour 10, 20 et 30% de NaCl respectivement. Par ailleurs, dès que du sel est présent, il semble que Protex 51FP ne soit plus à même de solubiliser de l'anchois après une heure de réaction. Cependant, il convient de noter que l'effet négatif du sel n'est pas aussi marqué que lors des essais précédents avec la même enzyme sur la sardine.

Les cinétiques de solubilisation de l'anchois avec Protamex possèdent la même allure. Les meilleurs résultats (+22%) sont obtenus avec le lot dépourvu de sel pour lequel aucune phase de plateau n'est observée même après six heures de réaction. Dans tous les autres cas, le taux de solubilisation est moindre et diminue lorsque le taux de sel augmente (+15%, +13% et +10%). Là aussi, des phases plateaux précoces (dès 30 à 60 minutes) sont observées, mais pas sur le lot avec 10% de sel pour lequel la solubilisation semble se poursuivre après six heures. L'effet négatif du sel sur l'activité de Protamex est donc là aussi confirmé, mais il est beaucoup moins notable que pour les essais sur la sardine.



**Figure 2.21** Pourcentage de surnageant obtenu après hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protamex et Protex 51FP

La Figure 2.21 illustre les taux de solubilisation obtenus en fin d'expérimentation soit après six heures de protéolyse. Comme pour la sardine, il ressort que pour une enzyme donnée,

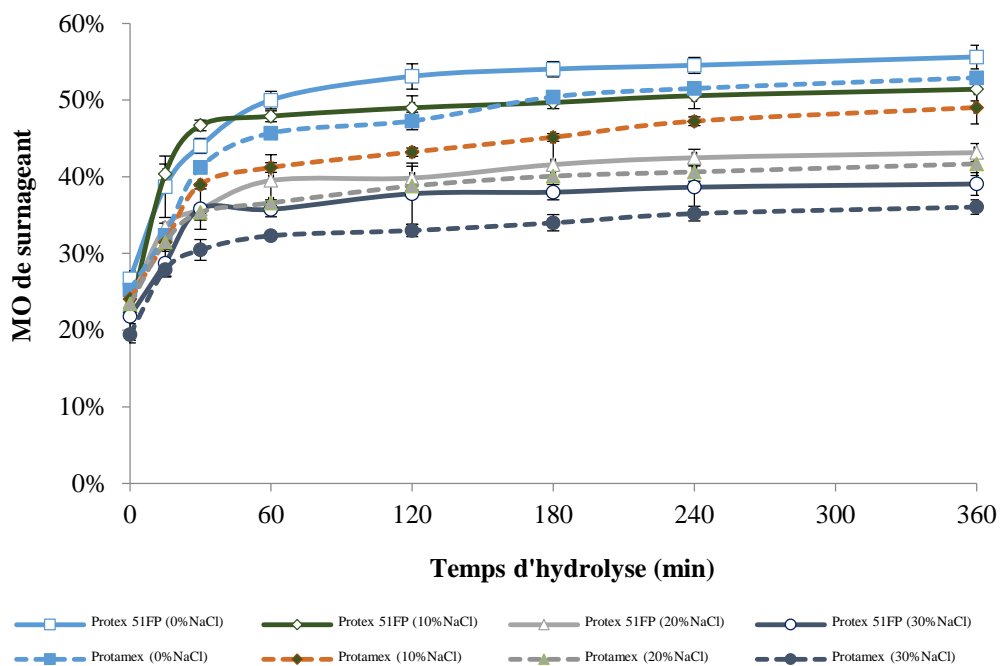


tous ces taux sont statistiquement différents les uns des autres en fonction de la teneur en sel du milieu réactionnel. Plus celle-ci est élevée, moins grande sera la solubilisation. Comme pour la sardine également, aucune des deux enzymes ne se distingue sur ce critère, le taux de solubilisation à six heures étant identique avec Protex 51FP et Protamex quelle que soit la concentration en sel.

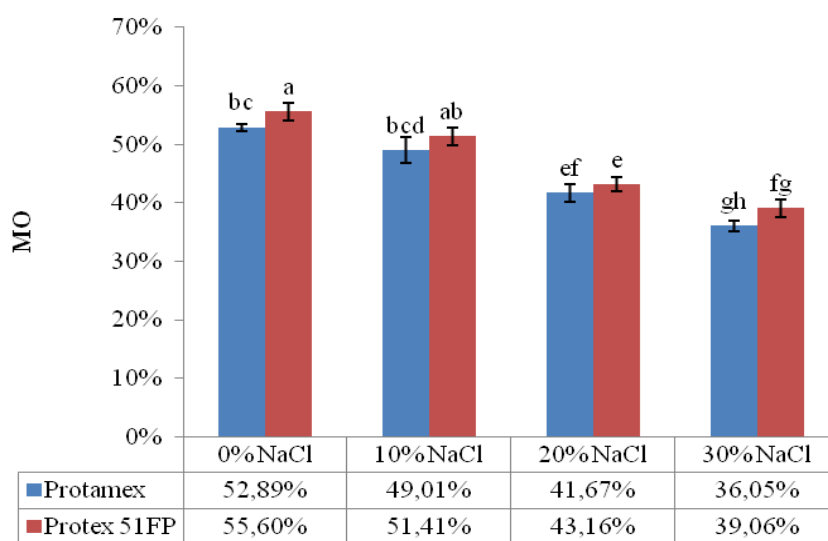
En fin d'expérience, ce sont plus des 2/3 de l'anchois qui ont été solubilisés par les protéases en l'absence de sel ( $67,34 \pm 1,08\%$ ), soit près de 17% de plus que pour les essais avec la sardine. En présence de 30% de sel, la teneur en matière sèche retrouvée après 6 heures dans la phase soluble chute pour ne représenter qu'un peu plus de la moitié ( $50,91 \pm 1,76\%$ ), mais excède toujours celle trouvée avec la sardine dans les mêmes conditions opératoires. Il ressort que systématiquement, l'anchois est plus facilement hydrolysé par ces deux enzymes que la sardine. La teneur en matière grasse beaucoup plus faible chez l'anchois est en partie responsable de cela, mais c'est surtout le fait que la sardine utilisée était fraîche contrairement à l'anchois d'origine congelé et décongelé ici pour les essais. Il en est bien connu que la congélation/décongélation impacte fortement sur les tissus et les déstructure.

#### **2.4.2.2. Matière organique en solution dans le surnageant après hydrolyse de l'anchois**

Comme mentionné précédemment le suivi du taux de matière organique dans le surnageant permet de connaître la solubilisation du poisson et d'évaluer le rendement de production, en s'affranchissant de la teneur en sel. Les allures des cinétiques sont typiques avec une augmentation initiale très rapide, un ralentissement et une phase plateau (Figure 2.22). Comme pour la sardine, les valeurs maximales obtenues sont inversement proportionnelles à la teneur en sel dans le milieu reflétant un réel effet négatif sur l'activité protéolytique de ces enzymes. Quelles que soient les conditions, la protéolyse semble plus rapide et plus importante pour les essais conduits avec Protex 51FP par comparaison à ceux avec Protamex. En effet, la proportion de MO solubilisée y est toujours plus importante.



**Figure 2.22 Matière organique en solution dans le surnageant après hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protex 51FP et Protamex**



**Figure 2.23 : Taux de matière organique en solution dans le surnageant à 360 min d'hydrolyse de l'anchois par les enzymes Protamex et Protex 51FP**

Lorsque Protex 51FP est utilisée, la phase plateau est atteinte très rapidement à savoir environ deux heures. Cela révèle que l'enzyme agit très rapidement et qu'il n'est pas utile de

prolonger trop l'expérimentation. Avec Protamex, le plateau est observé plus tardivement, à savoir après quatre heures.

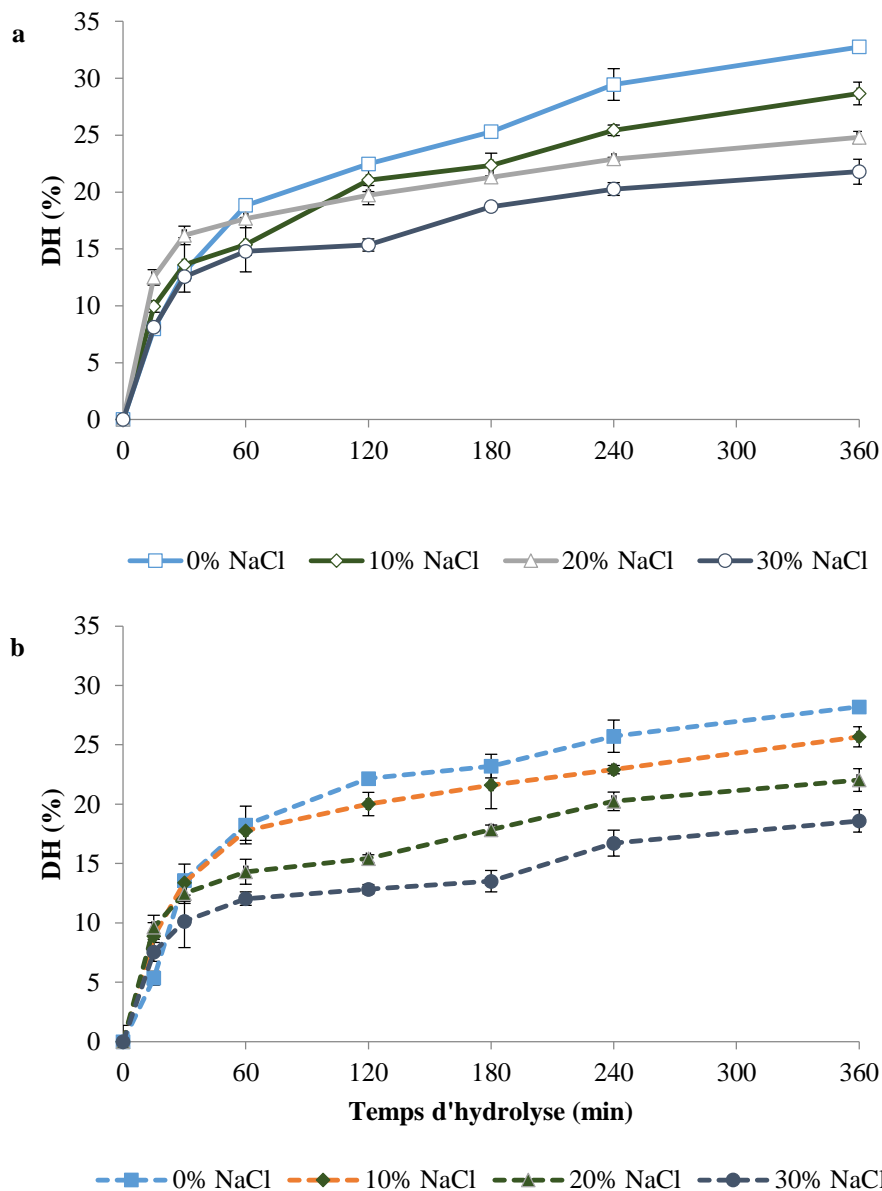
Les taux finaux de MO solubilisée sont présentés sur la Figure 2.23. L'effet négatif du sel y est bien visible puisque chaque augmentation de sa teneur entraîne une réduction conséquente du taux de solubilisation de la MO et ce pour les deux enzymes. Entre les lots témoins et les lots avec la teneur en sel maximale, ce sont près de 30% de MO en moins qui sont solubilisés après six heures d'expérimentation. Cet important effet négatif est néanmoins beaucoup moins marqué pour l'anchois que pour la sardine où la réduction était de -60%.

Par ailleurs, comme pour la sardine, aucune différence significative au seuil de 5% n'est observée pour les deux enzymes, le taux de MO solubilisé à six heures étant identique dans les deux cas. Néanmoins comme vu précédemment, il semble que Protex 51FP soit à même de conduire au même résultat, mais plus rapidement qu'avec Protamex.

#### **2.4.2.3. Mesure du degré d'hydrolyse de l'anchois**

La Figure 2.24a représente l'évolution du degré d'hydrolyse de l'anchois au cours du temps par Protex 51FP. Dans toutes les expériences, le DH a augmenté très rapidement en début de réaction puis ensuite plus progressivement sans pour autant ne jamais atteindre de phase plateau. Cela indique que même après six heures de réaction, et, quelle que soit la teneur en sel, Protex 51FP est encore capable d'hydrolyser les protéines de l'anchois. Par ailleurs, là encore l'effet négatif du sel est perceptible puisque le DH est systématiquement moindre quand la teneur en NaCl augmente. Ces constats avaient également été fait lors des expériences sur la sardine (cf. 2.1.3.3)

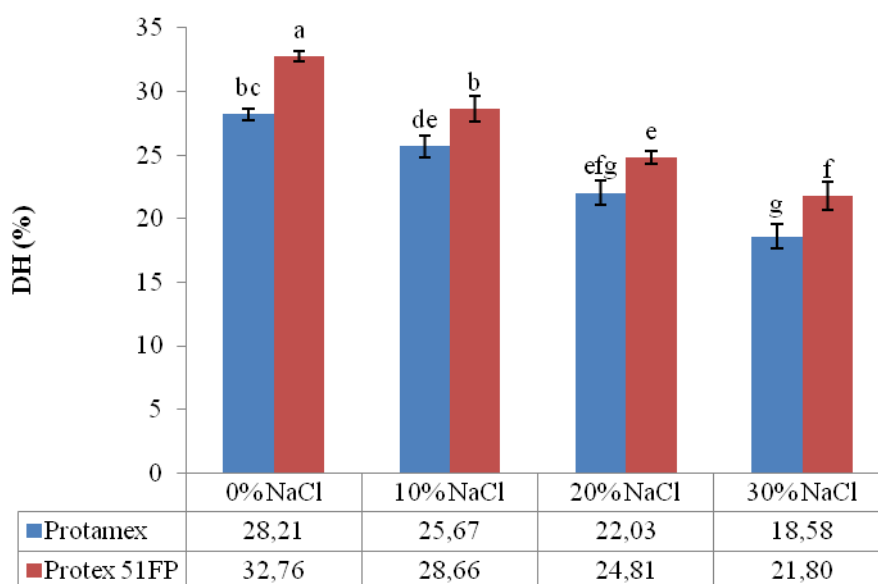
Les cinétiques observées avec Protamex sont du même type : hydrolyse initiale rapide puis ralentissement sans atteindre de plateau (Figure 2.24b). Tout comme Protex 51FP, Protamex est donc à même d'hydrolyser l'anchois même en présence de 30% de NaCl et ce pendant plus de six heures. Fort logiquement, là aussi l'effet inhibiteur du sel est très clairement visible, chaque augmentation de la teneur en NaCl entraînant un ralentissement conséquent de la cinétique de protéolyse.



**Figure 2.24 Evolution temporelle du degré d'hydrolyse de l'anchois par l'enzyme Protex 51FP (a) et Protamex (b) (température 30°C, pH libre, 360 min d'hydrolyse)**

Si l'on compare l'activité protéolytique des deux enzymes, il apparaît que Protex 51FP est à même d'hydrolyser plus rapidement et plus fortement les protéines d'anchois, quelle que soit la teneur en sel du milieu. En première approximation il semble même que la tolérance au sel des deux enzymes diffère de 10% en faveur de Protex 51FP. Cela se traduit ainsi par la quasi-superposition des courbes de DH entre Protex 51FP 30% et Protamex 20%, Protex 51FP 20% et Protamex 10%, Protex 51FP 10% et Protamex 0%.

La comparaison des valeurs de DH finales obtenues après six heures est présentée sur la Figure 2.25. Il est cependant important de préciser qu'ici, contrairement à la sardine (où des phases plateaux étaient observées), ces valeurs ne sont pas représentatives des maxima puisque l'hydrolyse semble pouvoir se poursuivre au-delà. Comme attendu la corrélation négative entre la teneur en NaCl et le DH final est bien observée avec des diminutions conséquentes des DH : -13, -24 et -33% pour Protex 51FP et -9, -22 et -34% pour Protamex par rapport au témoin quand 10, 20 à 30% sont ajoutés.



**Figure 2.25 Comparaison des degrés d'hydrolyse de l'anchois obtenus après 360 minutes en fonction des différentes conditions opératoires (p<0,05).**

À l'exception des essais conduits en l'absence de sel (témoin), pour lesquels il ne semble pas y avoir de différence significative, le DH final s'avère toujours plus élevé quand Protex 51FP est utilisé. Cela confirme bien la plus grande capacité de Protex 51FP à hydrolyser l'anchois. Dans une étude récente conduite sur de l'anchois avec plusieurs protéases, mais en l'absence de sel, les DH obtenus sont beaucoup plus élevés (30 à 55% dont 46% avec 1% de Protamex, après une heure) (Ovissipour *et al.*, 2013). Il est toutefois très difficile de s'y comparer, car les conditions utilisées diffèrent fortement ne serait-ce que par la différence de température (50°C au lieu de 30°C) et de la teneur en eau (2/1 au lieu de 0,2/1) qui sont deux paramètres parmi les plus influents sur les cinétiques d'hydrolyse.

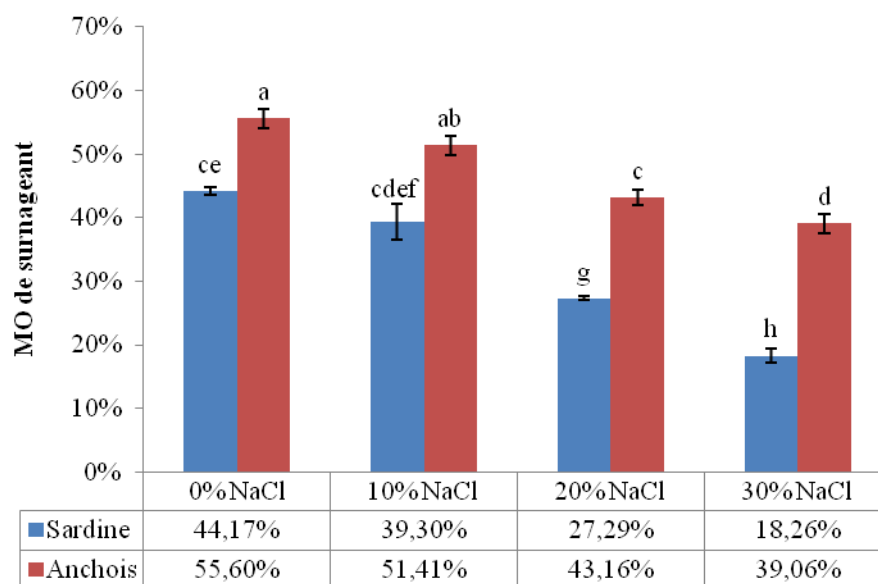
Comme pour les expérimentations sur la sardine, les enzymes endogènes n'ont pas été inactivées et contribuent donc à l'hydrolyse de l'anchois. Siringan *et al.*, (2006b) ont montré que cette activité protéolytique liée aux enzymes digestives, était réduite, mais maintenue même avec 25% de sel et ce pendant au moins 12 mois puisqu'ils les retrouvaient dans des échantillons commerciaux de sauce d'anchois. Il est donc certain que dans tous les essais conduits ici, ces protéases endogènes ont contribué à la liquéfaction de l'anchois. Néanmoins, il est également évident que si ces activités contribuent pour partie à la protéolyse, elles ne sont que faiblement influentes sur une durée aussi courte et n'expliquent pas les différences comportementales observées entre les deux enzymes.

## **2.5. Bilan des hydrolyses de la sardine et de l'anchois par les enzymes Protex 51FP et Protamex pendant six heures**

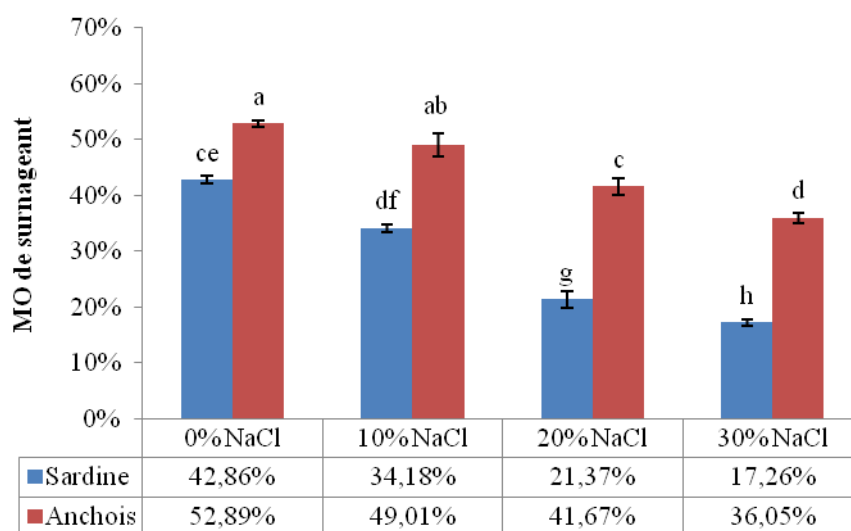
Avant de procéder à un essai de production de sauce de poisson et de voir si l'ajout d'une protéase exogène industrielle peut améliorer le procédé traditionnel, il est nécessaire de faire le bilan de toutes les expérimentations réalisées. Ceci permettra de choisir l'enzyme, mais aussi la matière première sur lesquelles conduire l'essai de production de sauce de poisson selon les contraintes du procédé traditionnel. Il conviendra dans un premier temps de regarder la solubilisation de la matrice qui doit être maximale afin d'assurer un bon rendement de production. Dans un deuxième temps, un taux d'hydrolyse maximal des protéines solubles sera recherché, car au final il faudra n'avoir qu'un mélange de petits peptides et d'acides aminés tels que dans les sauces commerciales.

Les degrés d'hydrolyse obtenus pour la sardine et l'anchois après six heures de protéolyse après ajout de 1% de Protex 51FP ou de Protamex sont indiqués sur les Figures 2.28 et 2.29. L'effet négatif du sel y est clairement visible sur les deux enzymes et pour les deux substrats.

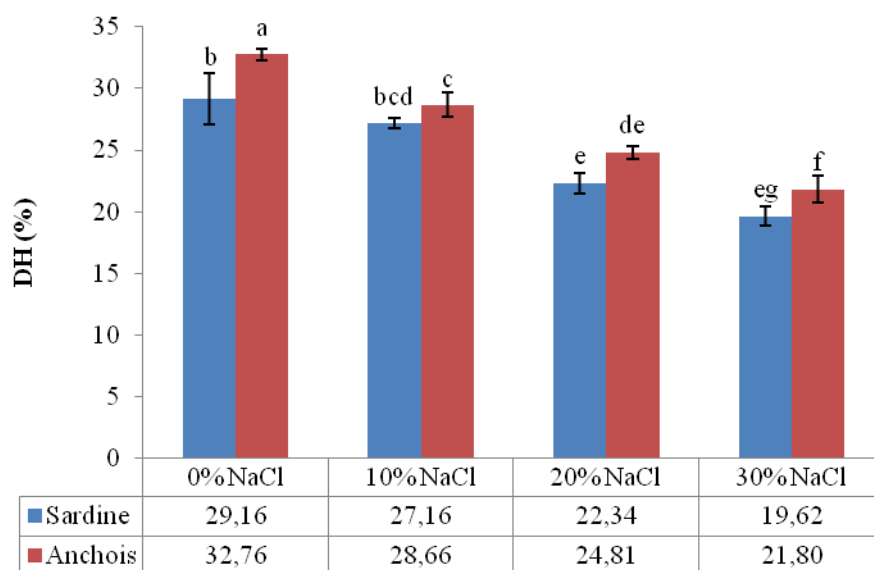
Une corrélation forte peut être établie entre le taux de solubilisation de la matière organique et le DH. Cela confirme bien le fait que la matière qui se solubilise est majoritairement constituée de protéines hydrolysées (peptides et acides aminés) sous l'action des protéases.



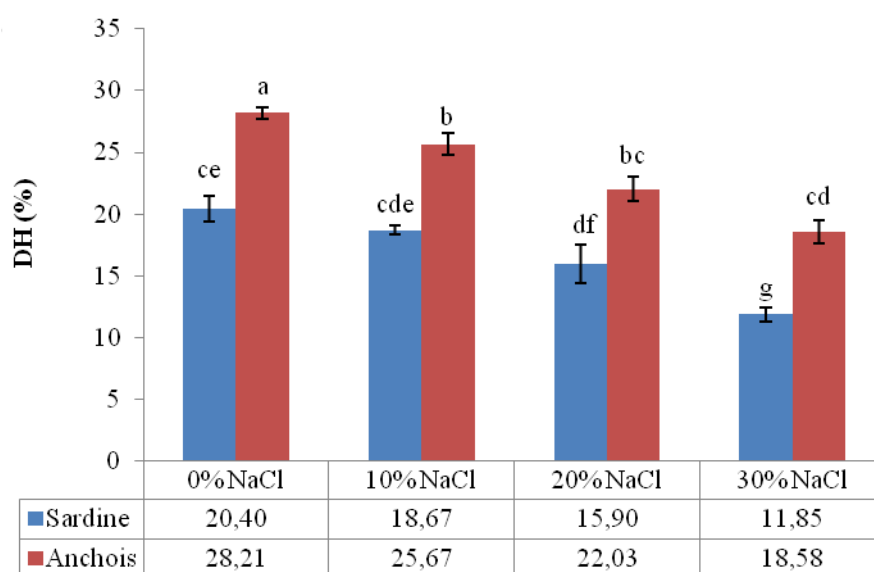
**Figure 2.26** Proportion de matière organique soluble de la sardine et de l’anchois après six heures d’hydrolyse par 1% de Protex 51FP



**Figure 2.27** Proportion de matière organique soluble de la sardine et de l’anchois après six heures d’hydrolyse par 1% de Protamex



**Figure 2.28** Degré d'hydrolyse de la sardine et de l'anchois après six heures d'hydrolyse par 1% de Protex 51FP



**Figure 2.29** Degré d'hydrolyse de la sardine et de l'anchois après six heures d'hydrolyse par 1% de Protamex

Comme pour la solubilisation de la matière organique, les valeurs de DH obtenues pour l'anchois sont quasiment toujours supérieures à celles de la sardine. L'écart est légèrement marqué pour Protex 51FP (+2 à 4%) avec parfois aucune différence significative (10 et 20%



NaCl). Il l'est plus fortement pour Protamex (+6 à 8%) où pour tous les essais une différence significative est observée., Cette apparente protéolyse plus marquée pour l'anchois que pour la sardine peut s'expliquer par les trois raisons évoquées lors de la comparaison de la solubilité de la matière organique : teneur en eau plus élevée, plus grande prévalence des sites de coupure et déstructuration plus grande des tissus à l'origine.

La distribution moyenne des peptides au sein des différents échantillons est assez large compte tenu des DH observés. Ainsi pour l'échantillon le moins hydrolysé, la taille moyenne des peptides sera de neuf acides aminés (DH= 11,8 pour la sardine avec 30% NaCl et Protamex), alors que pour l'expérimentation ayant le plus fort taux d'hydrolyse (DH=32,76 anchois sans sel avec Protex 51FP), celle-ci sera de l'ordre de 3 acides aminés, et ce en seulement six heures.

Il ressort de toute cette série d'essais que les quatre protéases industrielles testées sont à même d'hydrolyser la sardine et l'anchois, mais qu'elles sont toutes plus ou moins fortement affectées par la présence de sel. Lorsque l'on se place dans des conditions proches du procédé traditionnel, seules deux enzymes (Protex 51FP et Protamex) sur les quatre apparaissent intéressantes pour jouer le rôle d'auxiliaire technologique. Parmi ces deux enzymes, il ressort que Protex 51FP entraîne systématiquement, et ce à la fois sur la sardine et sur l'anchois, un plus fort taux d'hydrolyse des protéines et la solubilisation d'une plus grande part de matière organique. Protex 51FP semble donc être parmi les quatre, l'enzyme qu'il convient de garder pour la suite de l'étude, principalement pour son activité résiduelle importante même en présence de 30% de sel ainsi que pour sa capacité d'hydrolyse à basse température (30°C).

Il apparaît également qu'entre la sardine et l'anchois, c'est ce dernier qui se prête le mieux à des hydrolyses dans ces conditions. De meilleurs taux de solubilisation de la matière organique et des degrés d'hydrolyse plus élevés sont obtenus avec lui. Il faut néanmoins préciser l'effet important de la congélation/décongélation qui est intervenu dans tous les essais, mais uniquement pour cette matrice. À lui seul il peut fausser les résultats. Néanmoins comme il faut choisir, c'est cette matrice qui est retenue pour la suite.



## CHAPITRE 3 : UTILISATION DE PROTEX 51FP COMME ACCÉLÉRATEUR D'HYDROLYSE POUR LA FABRICATION DE NUOC-MAM À PARTIR D'ANCHOIS (*STOLEPHORUS COMMERSONII*)

### 3.1. Introduction

La production de sauce de poisson nécessite une fermentation de 6 à 24 mois (Lopetcharat *et al.*, 2001, Jung-Nim *et al.*, 2001), mais il faut un an minimum pour obtenir une hydrolyse complète des protéines de poisson et donc un bon rendement de produit de qualité. Une fermentation conduite uniquement pendant six mois permet l'obtention d'une sauce de qualité, mais dans une faible proportion, le reste incomplètement hydrolysé devant être remis à maturer pour donner au final une sauce de moindre qualité. Plusieurs pistes sont à l'étude pour accélérer ce processus tout en maintenant un bon rendement et une bonne qualité de produit. Néanmoins, diverses contraintes du procédé traditionnel sont à prendre en compte avec notamment la forte salinité (au moins 20% de NaCl) et les relativement basses températures (température ambiante soit 28-35°C)

Une concentration saline élevée est nécessaire pour prévenir la détérioration du mélange de poisson fermenté (Aspmoa *et al.*, 2005). Si cette forte teneur en NaCl empêche la prolifération des pathogènes et autres microorganismes d'altération, elle inhibe également fortement les activités enzymatiques et notamment les protéases endogènes (Fukami *et al.*, 2002) entraînant un allongement de la durée du processus. Les basses températures quant à elles sont bien souvent inférieures aux optima des protéases y compris des enzymes digestives des poissons qui fonctionnent donc au ralenti (Lopetcharat *et al.*, 2001 ; Lopetcharat et Park, 2002 ; Yongsawatdigul *et al.*, 2004).

Compte tenu de ces contraintes plusieurs stratégies différentes ont été envisagées pour réduire le temps de fabrication traditionnelle, toutes reposant sur le principe d'une augmentation de l'activité protéolytique globale (cf. 1.4) :

- l'apport de microorganismes sélectionnés pour leur aptitude à se développer dans ce type de milieu (Klomkiao *et al.*, 2006c ; Yongsawatdigul *et al.*, 2007

- l'apport indirect d'enzymes endogènes par enrichissement avec des extraits notamment de viscères (Gildberg, 2001 ; Yoshinaka *et al.*, 1983)
- l'apport direct d'enzymes endogènes par extraction purification (Klomklao *et al.*, (2006, a, b ; Klomklao *et al.*, (2008),
- l'apport de protéases extraites et purifiées à partir de souches microbiennes halophiles isolées dans les sauces de poisson (Toyokawa *et al.*, 2010 ; Udomsil *et al.*, 2011 ; Zaman *et al.*, 2011)
- l'apport d'enzymes exogènes de type protéase industrielle (Guevara *et al.*, 1972 ; Beddows et Ardeshir, 1979; Miyazawa *et al.*, 1979 ; Raksakulthai *et al.*, 1986 ; Chaveesuk *et al.*, 1993 ; Chaveesuk *et al.*, 1994 ; Aquerreta *et al.*, (2001 ; Xu *et al.*, 2008)

C'est cette dernière stratégie qui est retenue ici en étudiant l'intérêt d'une supplémentation en Protex 51FP (cf. 2.5) sur la fabrication de Nuoc-mam à partir d'anchois, et ce pendant six mois.

## **3.2. Matériels et méthodes**

### **3.2.1. Matériel biologique : Anchois**

Des anchois (*Stolephorus commersonii*) pêchés dans les zones maritimes de Nha Trang, Vietnam en avril 2013 ont été achetés (100 kg) au port, entreposés sous glace et transportés rapidement (1 heure) au laboratoire. Les poissons ont alors été broyés, conditionnés en sachet plastique et stockés en congélation à -20°C avant utilisation.

### **3.2.2. Matériel enzymatique**

Protex 51FP (cf. chapitre 2).



**Figure 3.1 Les anchois pour la production de la sauce de poisson**

### **3.2.3. Sauces Nuoc-mam commerciales**

Trois sauces vietnamiennes commerciales Ca-com 30, Ca-com 60 et Phu Quoc et une sauce thaïlandaise, Con-ca, ont été achetées afin d'être analysées et comparées aux sauces expérimentales.

### **3.2.4. Production expérimentale de Nuoc-mam**

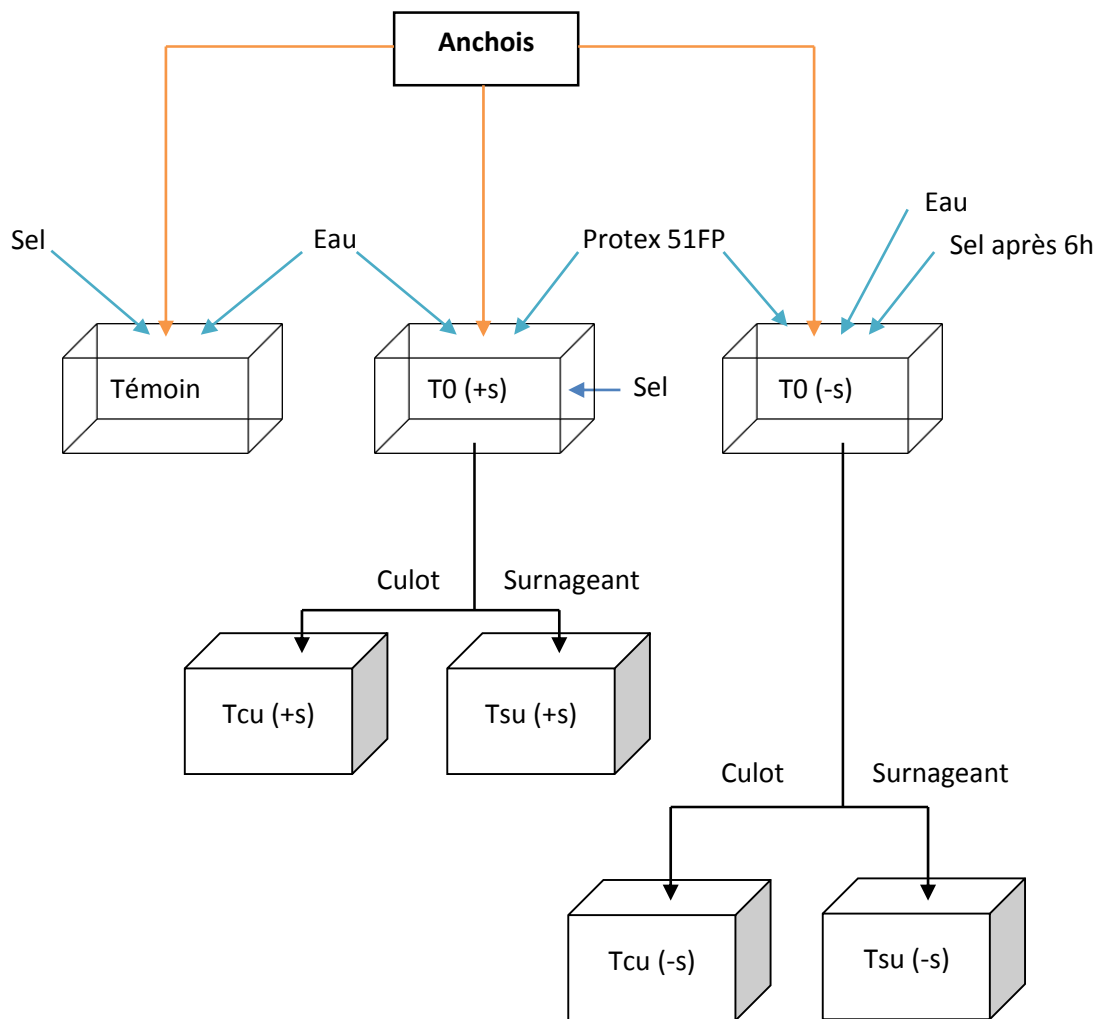
Les anchois ont été décongelés dans leur conditionnement sous sachet plastique à température ambiante. Plusieurs expérimentations ont été conduites sur une durée de six mois afin d'étudier l'effet de divers paramètres tels l'apport en Protex 51FP, une supplémentation différée (+6 heures) en sel et la séparation des phases solides et liquides à un stade précoce (6 heures). Pour tous ces essais, la fermentation a été conduite pendant six mois en flacon en verre de 10 litres contenant chacun un mélange de 5 kg d'anchois et 1000 ml (20%) d'eau (Figure 3.2).

Pour l'échantillon témoin qui servira de référence, le poisson est immédiatement mélangé avec du sel (1250g soit 25%) et mis à fermenter.

Pour deux échantillons, le poisson et le sel sont mélangés comme pour le témoin, mais additionnés de 1% de Protex 51FP. Un échantillon est mis à maturer (T0(+s)), l'autre est

centrifugé après six heures de réaction pour séparer deux phases : la phase liquide (Tsu(+s)) et la phase insoluble (Tcu(+s)). Les deux sont ensuite mises à maturer

Pour les deux derniers échantillons, le poisson est additionné avec 1% de Protex 51FP, mais en absence de sel. Au bout de six heures, le produit est alors mélangé avec du sel (dans les mêmes proportions que pour les autres essais). Un échantillon est alors mis à maturer (T0(-s)) tandis que l'autre est centrifugé. Les deux phases résultantes (Tsu (-s) et Tcu (-s)) sont ensuite mises à maturer.



**Figure 3.2**    **Processus de production du Nuoc-mam expérimental**

Au final, ce sont donc 7 sauces expérimentales qui vont être suivies pendant six mois. La maturation se fait à l'air libre, dans des flacons en verre avec une exposition au soleil variant de 10 à 14h sur toute l'étude (Figure 3.3). Une fois par mois, 50 ml de liquide ont été prélevés dans chaque flacon pour analyses.



**Figure 3.3 Les échantillons de fermentation du Nuoc-mam**

### **3.2.5. Analyses biochimiques**

Les sauces de poisson ont été diluées (1/25) avant analyse.

#### **3.2.5.1. Analyse de l'azote total (N<sub>T</sub>)**

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl. L'échantillon est minéralisé à l'aide d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentré en présence d'un catalyseur (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> - 5/2). L'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), et libéré ensuite sous forme d'ammoniac par la soude (NaOH) concentrée (10M). L'ammoniac fixé par l'acide borique est alors titré avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1N.

Les échantillons de sauce de poisson sont dilués au 25e avant analyse. Les solutions diluées (volume V = 5 ml) sont introduites dans des tubes à minéralisation. Une pastille de catalyseur de minéralisation et 20 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans chaque tube. Puis les tubes coiffés de leurs capteurs de fumée sont mis à chauffer progressivement

jusqu' à 450°C. Lorsque la solution est devenue vert pâle, la minéralisation est arrêtée. Après refroidissement des tubes, les capteurs de fumée sont rincés et l'eau récupérée dans les tubes. Le contenu des tubes est de mis en suspension avec 20 ml d'eau, puis installé dans l'unité de distillation.

Dans un erlenmeyer de 250 ml, 20 ml de solution d'acide borique à 4% contenant un indicateur coloré (vert de bromocrésol et rouge de méthyle) sont versés. L'erlenmeyer est ensuite installé dans l'unité de distillation en prenant bien soin à ce que la tige plonge dans la solution.

L'échantillon minéralisé est neutralisé à l'aide de soude 10N de façon à obtenir un volume total de 80 ml. La distillation est réalisée et stoppée lorsque le volume de distillat atteint 150 ml. Le titrage de l'azote par l'acide chlorhydrique 0,1N est alors réalisé. Le volume ajouté est noté V (en ml). La teneur en azote total a été exprimée en gramme N/l.

La teneur en azote total est donnée par la formule :

$$N_T (gN/l) = \frac{0,0014 \times V_{HCl} \times F \times 1000}{V}$$

$N_T$  : Azote total

$V_{HCl}$  : Volume en ml de HCl 0,1N

V : Volume d'échantillon introduit dans le tube.

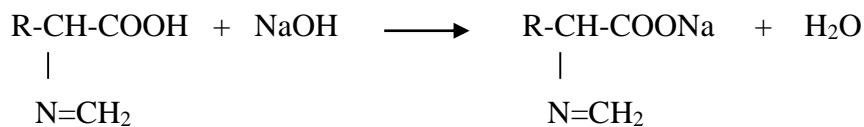
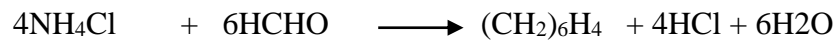
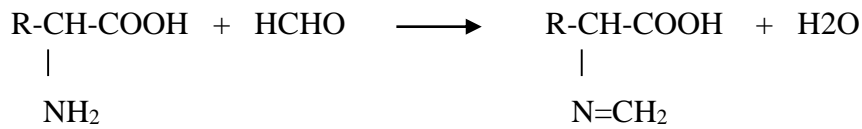
F : Coefficient de dilution

### 3.2.5.2. Analyse de l'azote formaldéhyde ( $N_F$ )

La teneur en azote formaldéhyde est un index du degré d'hydrolyse protéique, elle est déterminée en utilisant la méthode de Sorensen (Jodi, 1926) et exprimée en gramme N/l.

Le formaldéhyde réagit sur les acides aminés en bloquant leur fonction amine (-NH<sub>2</sub>) et permet ainsi le titrage de leur fonction acide (-COOH) avec de l'hydroxyde de sodium en présence de phénolphthaléine. La teneur en azote formaldéhyde est calculée sur la base de la consommation d'hydroxyde de sodium.





Dans une fiole jaugée de 100ml, sont versés successivement : 50 ml de Nuoc-mam dilué au 1/25, 1ml de phénophtaléine (solution à 1% dans l'alcool), 2g de chlorure de baryum (BaCl<sub>2</sub>), ensuite une quantité de solution saturée de Ba(OH)<sub>2</sub> dans le méthanol est ajoutée jusqu'à obtention d'une solution rosée, puis 5 ml d'hydroxyde de baryum afin de précipiter les sels de phosphate et de carbonate. La fiole est complétée avec de l'eau distillée, agitée vigoureusement, puis laissée au repos 15 minutes. Le contenu de la fiole est ensuite filtré sur filtre papier.

25 ml de filtrat sont versés dans un bécher et l'acide chlorhydrique 0,1N est ajouté jusqu'à pH=7, mesuré au pH mètre, puis 10ml de formaldéhyde neutralisé sont ajoutés. Le bécher est agité et le titrage est effectué à l'aide de NaOH 0,1N jusqu'à pH=9.

La teneur en azote formaldéhyde est donnée, en grammes par litre de Nuoc-mam, par la formule :

$$N_F (\text{gN/l}) = \frac{0,0014 \times A \times F \times 100 \times 1000}{V \times 25}$$

N<sub>F</sub> : Azote formaldéhyde

0,0014 : Représente la quantité d'azote (en gramme) équivalent à 1ml NaOH 0,1N

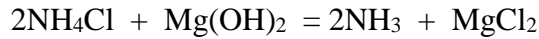
À : Volume en ml de NaOH 0,1N utilisé dans le titrage.

F : Coefficient de dilution

V : Volume de la solution diluée utilisée pour l'analyse

### 3.2.5.3. Analyse de l'azote ammoniacal ( $N_{NH_3}$ )

L'ammoniac, déplacé par du carbonate de magnésium, est entraîné par un courant de vapeur d'eau. Le distillat est recueilli dans une solution d'acide borique. Après cela, le titrage est effectué directement à l'aide d'acide chlorhydrique 0,1N.



50 ml de Nuoc-mam dilués au 1/25 sont introduits dans un ballon à distiller avec 100 ml d'eau. De 3 à 4 gouttes de la solution de phénolphtaléine à 1% sont ajoutées, puis 3 g de carbonate de magnésium. La distillation est effectuée et le distillat est recueilli dans l'acide borique à 4% comme pour l'azote total. Ensuite, le titrage est effectué directement avec l'acide chlorhydrique 0,1N. La quantité d'azote ammoniacal en grammes par litre de Nuoc-mam est donnée par la formule :

$$N_{NH_3} (gN/l) = \frac{0,0014 \times V_{HCl} \times F \times 1000}{V}$$

$N_{NH_3}$  : azote ammoniacal

0,0014 : Représente la quantité d'azote (en gramme) équivalent à 1ml HCl 0,1N

$V_{HCl}$  : Volume en ml de HCl 0,1N utilisé dans le titrage

F : Coefficient de dilution

V : Volume de la solution diluée utilisée pour l'analyse

### 3.2.5.4. Analyse de l'azote des acides aminés ( $N_{AA}$ )

La teneur en azote des acides aminés en grammes par litre est donnée par la formule (Codex stan 302-2011):

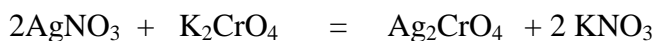
$$N_{AA} = N_F - N_{NH_3}$$

$N_F$  : Teneur en azote formaldéhyde

$N_{NH_3}$  : Teneur en azote ammoniacal

### 3.2.5.5. Analyse du chlorure de sodium

Les chlorures sont titrés par la méthode de Mohr (Kaoru *et al.*, 2006). Les chlorures sont précipités par une solution de nitrate d'argent ( $AgNO_3$ ) dans une solution neutre en présence de chromate de potassium comme indicateur coloré. Après réaction, il ne reste plus d'ion  $Cl^-$  en solution. Les ions  $Ag^+$  versés en excès réagissent avec les ions  $CrO_4^{2-}$  pour produire le précipité rouge  $Ag_2CrO_4$ . L'apparition de la couleur rouge brique marque la fin du dosage des ions  $Cl^-$  par les ions  $Ag^+$ .



Dans une fiole conique de 250 ml, on introduit 5ml de Nuoc-mam dilué aux 1/25, et 5 gouttes de phénolphtaléine. Si la solution est incolore ( $pH < 7$ ), on utilise  $NaHCO_3$  0,1N pour neutraliser. Si la solution est rose ( $pH > 7$ ), on utilise  $CH_3COOH$  0,01N pour neutraliser. Ensuite, 5 gouttes de solution de  $K_2CrO_4$  10% sont ajoutées. Le titrage est réalisé avec la solution de  $AgNO_3$  0,1N jusqu'à l'apparition de la couleur rouge brique stable.

La teneur en chlorure de sodium en grammes par litre est donnée par :

$$\frac{0,00585 \times A \times F \times 1000}{V}$$

0,00585 représente la quantité (en gramme) de NaCl équivalent à 1 ml de  $AgNO_3$  0,1N

À: Volume de  $AgNO_3$  0,1N utilisé dans le titrage (ml)

F: coefficient de dilution

V: volume d'échantillon dilué utilisé pour le titrage

### **3.2.5.6. Détermination de la valeur de pH**

La valeur du pH de la sauce de poisson a été déterminée par mesure directe au pH-mètre électronique (Codex stan 302-2011).

### **3.2.5.7. Composition en acides aminés**

La méthode utilisée est la suivante : i) hydrolyse acide, ii) dérivation des hydrolysats à l'aide du kit EZ : faast<sup>®</sup>, iii) dosage par chromatographie en phase gazeuse (CPG-FID). Dix milligrammes d'échantillons préalablement lyophilisés sont hydrolysés avec 200 µl de HCl 6N sous une atmosphère d'azote à 118°C pendant 18h. Les échantillons sont ensuite complètement séchés sous une atmosphère d'azote et dilués dans 2,5 ml d'eau. L'analyse des acides aminés est réalisée en utilisant le système EZ: Procédure de faast<sup>™</sup> (Phenomenex, USA) consistant en une étape d'extraction sur phase solide suivie d'une étape de dérivation puis d'une extraction liquide/liquide. La phase organique est analysée sur un système GC-FID (Perkin Elmer Autosystem XL). La température de l'injecteur est maintenue à 250°C tandis que la détection a lieu à 320°C. La séparation est réalisée en utilisant une colonne Zebron ZB-AAA GC (10 m x 0,25 mm) avec une température du four à augmentation linéaire de 110 à 320°C à 32°C/min. Le gaz porteur, l'hélium est à un débit constant de 1,5 ml/min. Les acides aminés sont quantifiés par leurs facteurs de réponse relatifs à ceux de l'étalon interne, la norvaline, à une concentration de 200 µmol/l.

### **3.2.5.8. Détermination de la masse moléculaire des peptides**

La répartition des masses moléculaires des peptides dans le Nuoc-mam a été analysée par chromatographie en gel filtration. Les fractions ont été séparées en utilisant un chromatographe liquide à haute pression (HPLC) équipé d'une colonne d'exclusion de taille moléculaire 100 Da - 7000 Da (Superdex Peptide 10/300 GL, GE Healthcare UK Ltd, Chalfont, UK) et d'un spectromètre UV (détection à 205 nm). La phase mobile est composée d'une solution aqueuse en acétonitrile (70:30) et contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique, le débit est de 0,5 ml/min. La colonne a été calibrée avec 5 étalons : la ribonucléase A (13700 Da), l'aprotinine (6500 Da), la rénine (1760 Da), la vasopressine (1084 Da) et la leucine (294 Da). Les masses moléculaires des différentes fractions sont basées sur les temps de rétention déterminés à partir de la gamme d'étalonnage.

### **3.2.5.9. L'évaluation sensorielle**

L'analyse sensorielle a été réalisée sur les 7 lots expérimentaux de sauce élaborés lors de cette étude et d'une sauce commerciale de poisson en provenance du Phu Quoc, Vietnam.

Les experts ont évalué sensoriellement ces sauces sur la base des caractéristiques des produits traditionnels vietnamiens et de l'acceptation par le consommateur. Quatre critères ont été utilisés : la transparence, la couleur, le goût et l'odeur. Chaque critère a été noté sur 100 points. 20 ml d'échantillons ont été introduits dans une tasse en verre fermée par une feuille d'aluminium, laissée à température ambiante (environ 25°C) pendant 30 minutes avant l'évaluation sensorielle.

Les membres du panel (5 personnes) ont évalué l'odeur à l'ouverture du récipient, puis la saveur par dégustation d'environ 0,5 ml d'échantillons de sauce de poisson prélevée à l'aide d'une cuillère. Ils se sont rincé la bouche à l'eau potable entre chaque échantillon.

## **3.3. Résultats et discussion**

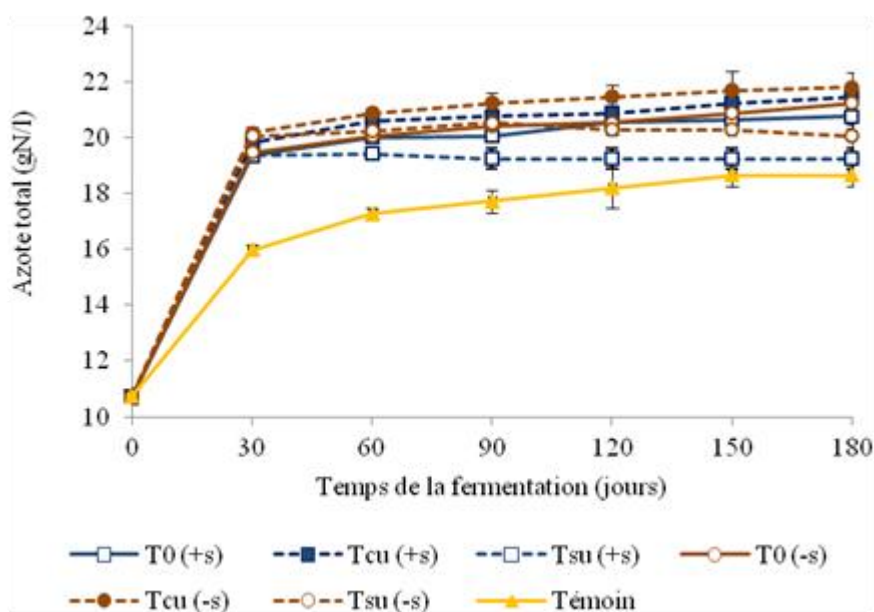
### **3.3.1. Variations quantitatives et qualitatives de l'azote au cours de la maturation**

Les analyses des différentes d'azote dans la sauce de poisson permettent de suivre l'évolution de la protéolyse du poisson et d'appréhender sa valeur nutritive. L'azote total ( $N_T$ ) indique la quantité totale d'azote par unité de volume présente dans la sauce de poisson, l'azote ammoniacal ( $N_{NH_3}$ ) reflète la quantité azote présente sous forme d'ammoniac et l'azote des acides aminés ( $N_{AA}$ ) indique la quantité d'azote présente dans les sous forme d'acides aminés libres.

#### **3.3.1.1. L'azote total**

La teneur en azote total ( $N_T$ ) est un paramètre clé des sauces de poisson, servant notamment à établir leur classification et leur valeur commerciale (Lopetcharat et Park., 2002). La Figure 3.4 illustre l'évolution de l'azote total ( $N_T$ ) dans les échantillons au cours du temps. Pour tous les échantillons, cette teneur augmente au cours du temps et très fortement lors du premier mois. Ces observations sont conformes aux attentes. Ainsi, Lopetcharat et Park (2002),

notaient que lors des 10 premiers jours de fermentation la teneur en azote total d'une sauce de merlu du pacifique nord (*Merluccius productus*) passait de 6,40 à 15,7 g/l. Brillantes *et al.*, (2002) ont eux rapporté que  $N_T$  augmentait de façon spectaculaire lors de quatre premiers mois de fermentation d'anchois frais puis ensuite restait relativement constante. Enfin dans une étude conduite sur de l'anchois indien (*Stolephorus indicus*), Yongsawatdigul *et al.*, (2004) ont noté que cette teneur augmentait en début de fermentation, pour ensuite atteindre un plateau à 25 semaines et rester relativement constante jusqu'à la 52e semaine.



**Figure 3.4** Contenu de l'azote total dans les échantillons de Nuoc-mam

D'après la Figure 3.4, la quantité d'azote total augmente les 30 premiers jours de près de 50% pour le témoin et de l'ordre de 80% pour les autres échantillons. L'effet positif de l'enzyme est donc très clairement visible sur cette phase initiale. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes telle celle de Beddows *et al.* (1979) qui obtiennent, après 21 jours de fermentation à une température de 33°C, 18,8 g/l avec de la ficine, 21,1g/l avec de la papaine, et même 22,1g/l avec de la bromélaïne.

Passé le premier mois, l'augmentation de la teneur en azote total dans tous les échantillons est moins marquée. Pour le témoin, elle se poursuit néanmoins pendant 5 mois avant de se stabiliser pour atteindre au final une valeur de 19g/l soit une augmentation de près de 60% par rapport à la valeur initiale. Pour les autres échantillons, le ralentissement est beaucoup plus notable et précoce avec cependant des comportements différents selon les lots.

Ainsi pour l'échantillon Tsu(+s) une phase plateau est atteinte dès le premier mois, pour tous les autres il faut attendre environ quatre mois avant d'atteindre un plateau. De telles allures de cinétique ont déjà été observées malgré des conditions expérimentales différentes (Brillantes *et al.*, 2002 ; Klomklao *et al.*, 2006c ; Taira *et al.*, 2007).

L'apport de la protéase Protex 51FP est donc très clairement visible sur la solubilisation des matières azotées, particulièrement en début d'expérimentation avec au final un gain d'au moins 10% par rapport au témoin (sauf pour l'échantillon Tsu(+s)). Ces résultats corroborent parfaitement de précédentes études sur les effets d'une supplémentation en protéases (Guevara *et al.*, 1972 ; Beddows *et al.*, 1979 ; Ooshiro *et al.*, 1981; Nakano *et al.*, 1986; Raksakulthai *et al.*, 1986). Très vraisemblablement cela est dû à un degré d'hydrolyse plus élevé, car les composés azotés de la sauce de poisson sont essentiellement des protéines et leurs dérivés (acides aminés, peptides) et quelques composés plus minoritaires (nucléotides, ammoniacque, urée) (Klomklao *et al.*, 2006c).

Il ressort également que dans tous les cas, l'apport différé en sel (+6 heures) ne modifie pas significativement le taux d'azote total à six mois : 20,77/21,23g/l pour T0 ; 21,47/21,82 g/l pour Tcu et 19,25/20,00g/l pour Tsu (Tableau 3.1). Cela est vraisemblablement dû à la longue période de maturation qui finit par compenser les différences initiales.

Par ailleurs, en ce qui concerne la séparation ou non des phases après six heures, il ne semble pas y avoir un effet très notable si ce n'est un léger excédent d'azote total dans le culot et une légère déficience dans les surnageants ; l'intérêt étant toutefois très modeste.

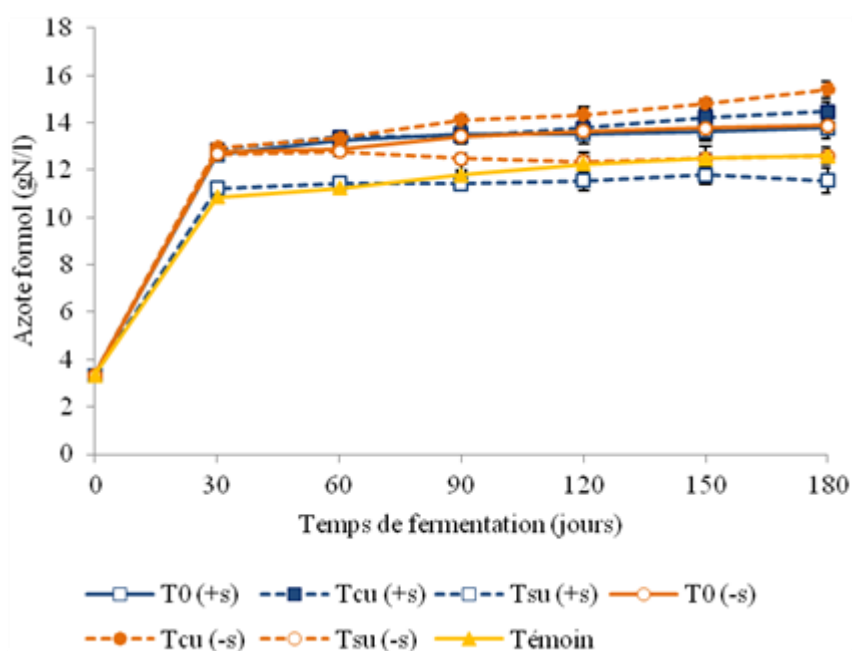
Protex 51FP même dans des conditions peu favorables (25% de sel et température inférieure à 30°C) s'avère donc être un auxiliaire technologique intéressant pour accélérer la liquéfaction des anchois surtout pendant le premier mois, conduisant au final à une légère augmentation de la teneur en azote total de la sauce.

### **3.3.1.2. L'azote formaldéhyde**

L'évolution de la concentration en azote formaldéhyde lors des fermentations expérimentales est similaire à celle de l'azote total (Figure 3.5). Ainsi, lors du premier mois une très forte augmentation peut être observée pour tous les échantillons : +220% pour le témoin et Tsu(+s) et +280% pour tous les autres. Après, l'augmentation est beaucoup plus faible pour finalement se

stabiliser pour la majorité des sauces. Ainsi un plateau est-il atteint à 30 jours pour les deux sauces sur les surnageants (Tsu(-s) et Tsu(+s)), à 90 jours pour les deux sauces non séparées (T0(-s) et T0(+s)) et à 150 jours pour le témoin. Seules les deux sauces faites à partir de culot (Tcu(-s) et Tcu(+s)) ne semblent pas voir leur teneur en azote formaldéhyde se stabiliser au bout de six mois de fermentation.

En fin de fermentation les taux d'azote formaldéhyde diffèrent significativement ( $p < 0,05$ ) entre eux avec Tcu (-s)=15,40 g/l supérieur à Tcu (+s)=14,47 g/l supérieur à T0 (+/-s)=13,8g/l (non différents entre eux) supérieur à Tsu (-s) et le témoin (12,6g/l, non statistiquement différents) supérieur à Tsu(+s)= 11,7g/l.



**Figure 3.5 Contenu d'azote formaldéhyde dans les échantillons de Nuoc-mam**

Le formaldéhyde réagit avec les acides aminés, aussi la mesure de la teneur en azote formaldéhyde est-elle utile pour estimer la teneur en acides aminés libres. Ce critère est donc fréquemment utilisé comme une évaluation du degré d'hydrolyse (Chaveesuk *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent qu'à l'exception des sauces faites à partir des surnageants, l'addition de Protex 51FP a entraîné une meilleure hydrolyse de l'anchois et qu'une telle enzyme peut aider à la solubilisation de l'azote. Ce constat est en accord avec plusieurs travaux incluant une



supplémentation en protéase (Beddows & Ardeshir, 1979; Miyazawa *et al.*, 1979; Chaveesuk *et al.*, 1993; Raksakulthai *et al.*, 1986).

### 3.3.1.3. L'azote ammoniacal

La teneur en azote ammoniacal renseigne sur la conversion des protéines solubles et des peptides en azote volatil et acides aminés libres (Chaveesuk *et al.*, 1993; Lopetcharat *et al.*, 2001). L'évolution de sa cinétique dans les différentes sauces expérimentales est indiquée sur la Figure 3.6. Une évolution régulière tout au long de l'expérimentation peut être observée et ce quel que soit l'échantillon sauf T0(+s) qui marque un ralentissement à 90 jours. Au final, l'échantillon témoin a un taux final d'azote ammoniacal significativement plus faible (2,89) que celui des échantillons supplémentés en Protex 51FP (3,08-3,55) (cf. Tableau 3.1). De tous, c'est l'échantillon T0 (-s) supplémenté après 6 heures qui a le taux le plus élevé (3,55 g/l). Aucune corrélation ne peut cependant être établie entre cette valeur et le fait de différer l'apport de sel.

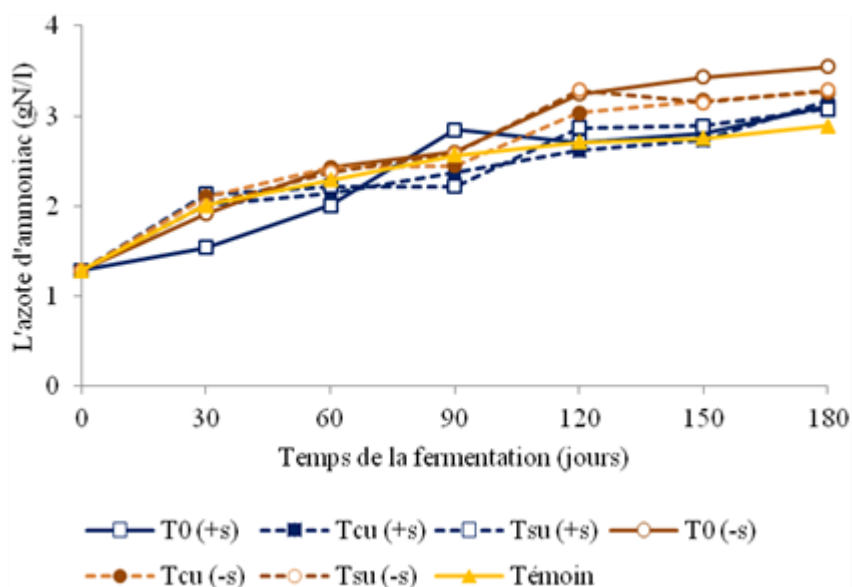


Figure 3.6 Contenu d'azote ammoniacal dans les échantillons de Nuoc-mam

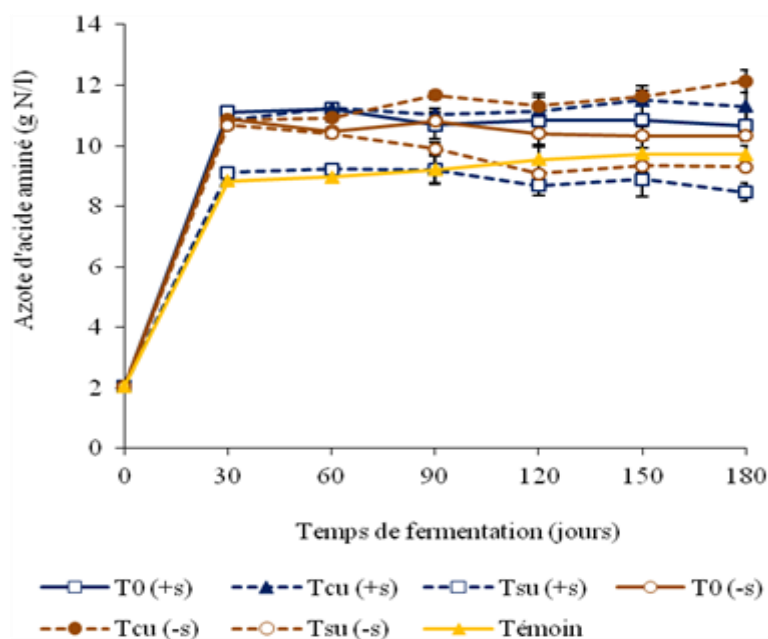
Protex 51FP a très certainement joué un rôle tout comme les protéases endogènes sur ce paramètre en augmentant la protéolyse des protéines et des peptides. Beddows *et al.*, (1980) suggèrent à ce titre que l'augmentation de la teneur en azote ammoniacal durant les premiers jours doit être due à l'action des enzymes de poissons, efficaces durant les premiers stades de fermentation. Klomklao *et al.* (2006) ont eux noté que l'augmentation de la teneur en azote ammoniacal au cours de la fermentation était plus importante avec un ajout de protéase de rate de listao.

Tous les essais ayant été conduits avec 25% de sel, l'augmentation de l'ammoniaque et des composés volatils ne peut être attribuée aux microorganismes d'altération, ceux-ci ne pouvant se développer au-delà de 10% de NaCl (Beddows *et al.*, 1979). Selon plusieurs auteurs (Ravipim *et al.*, 1993 ; Lopetcharat *et al.*, 2001) la dégradation des protéines solubles et des peptides produit des acides aminés libres et de l'azote volatil ; l'azote ammoniacal a donc pu se former par un processus de désamination.

Si dans la plupart des études de fermentation, l'azote ammoniacal fini par diminuer avec le temps, ce n'est pas le cas ici. Cette diminution très souvent observée serait multifactorielle. Elle est vraisemblablement due à sa lente volatilisation dans l'air, mais aussi à la possible formation de base de Schiff due à la réaction d'amines avec un groupement aldéhyde ou cétone (Wade, 1991), ou la formation de réactifs de Maillard (Klomklao *et al.*, 2006c). Ici toutes les fermentations ont été conduites dans des flacons de verre, matériaux non poreux, qui plus est fermés par des bouchons. Dans ces conditions, la volatilisation de l'azote ammoniacal n'a pas pu se faire expliquant pourquoi aucune diminution de l'azote ammoniacal n'a pu être observée.

#### **3.3.1.4. L'azote aminé**

Le taux d'azote aminé constitue un indice important, et est directement lié à la qualité de la sauce de poisson. La variation de ce taux dans les différentes sauces expérimentales est présentée sur la Figure 3.7.



**Figure 3.7** Contenu de l'azote des acides aminés des échantillons de Nuoc-mam

Ces cinétiques sont en tout point comparables à celles des autres études où de fortes analogies étaient observées entre azote total et azote aminé suggérant que les composés azotés étaient hydrolysés en acides aminés au cours de la fermentation (Ooshiro *et al.*, 1981; Nakano *et al.*, 1986; Klomklao *et al.*, 2006c).

À l'exception des sauces faites à partir des surnageants (Tsu) toutes les autres ont une valeur finale en azote aminé significativement supérieure à celle du témoin à la fin de l'expérimentation (cf. Tableau 3.1). Ce sont dans les sauces réalisées à partir des culots que les valeurs sont les plus importantes (11,29-12,13 g/l). Il semble donc qu'ici le mode de préparation des sauces soit influent (culot > mélange > surnageant).

L'ajout de l'enzyme en début de fermentation a clairement induit une augmentation des taux d'azote total et d'azote des acides aminés, surtout en début d'expérimentation. Cependant, il s'avère qu'après six mois, les différences observées sont faibles par rapport au témoin non supplémenté. De plus, aucun effet notable quant à l'apport différé de sel n'est observé.

Tous ces résultats suggèrent qu'à ce stade, une supplémentation en enzyme exogène telle que Protex 51FP a accéléré le processus de liquéfaction de l'anchois en augmentant le taux de protéolyse conduisant à des taux plus importants pour toutes ces formes d'azote à l'exception

notable des sauces faites à partir de surnageant. Néanmoins, il faut noter que ces différences tendent à s'atténuer au cours de la maturation, les valeurs finales étant au bout du compte relativement proches.

### **3.3.2. Composition biochimique : comparaison entre les sauces expérimentales et commerciales**

#### **3.3.2.1. Contenus azotés**

Les valeurs finales de  $N_T$  et  $N_{AA}$  des échantillons expérimentaux sont inférieures à celles des échantillons commerciaux vietnamiens de bonne qualité (Phu Quoc et Ca-com 60), mais légèrement supérieurs à celles des sauces de Nuoc-mam vietnamienne Ca-com 30 et thaïlandaise Con-ca qui sont de qualité inférieure (Tableau 3.1)

Les essais de fermentation ont été effectués à une température moyenne de 26,5°C pendant 6 mois. Ces conditions n'ont pas permis d'obtenir une sauce de qualité supérieure selon les normes en vigueur. La température un peu faible et temps de fermentation relativement court n'ont pas conduit à un niveau suffisant d'hydrolyse et de fermentation. Une augmentation de la température et/ou de la durée de fermentation aurait vraisemblablement favorisé la protéolyse et amélioré la qualité des produits.

Plusieurs normes ont été établies pour qualifier les sauces de poisson selon différents paramètres : TCVN 5107 (Vietnam, 2003), Food and Drug Administration (FDA Thaïlande, 2003), TISI (Institut de Standards Industriels Thaïlandais), Codex 302-2011 (Codex alimentarius, 2011). Les principaux critères de classification sont indiqués dans le Tableau 3.2.

À l'exception du pH de la sauce témoin, tous les autres paramètres mesurés pour les sauces expérimentales sont au-delà des exigences requises. Toutes ces sauces expérimentales, bien que n'ayant six mois de maturation auraient donc pu être étiquetées « sauce de poisson » et mises sur le marché.

En ce qui concerne la teneur en azote totale ( $N_T$ ), toutes seraient étiquetées « 1<sup>ère</sup> classe » selon la norme TVCN 5107, mais seules les deux sauces T0 et les deux faites à partir de culot (Tcu) auraient droit à cette appellation selon la norme ISI. Par comparaison avec les sauces commerciales, les différentes productions expérimentales se situent, pour ce critère, entre les

saucés considérées comme étant de première catégorie et vendues comme telles (Phu Quoc et Ca com 60) et celles de seconde catégorie (Ca com 30 et Con ca) étant néanmoins plus proches de ces dernières.

En ce qui concerne le ratio  $N_{NH3}/N_T$ , toutes les saucés expérimentales et commerciales répondent au critère maximal d'exigence et pourraient être qualifiées de «extraordinaire» selon la norme Vietnamiéne TCVN 5107. Il semble que l'apport différé de sel ait eu un effet négatif sur ce critère, principalement parce que l'azote ammoniacal mesuré au bout de six mois était systématiquement plus élevé pour ces échantillons. Néanmoins, les valeurs obtenues sont relativement proches les unes des autres et du même ordre que celles des saucés commerciales.

Le taux d'azote aminé ( $N_{AA}$ ) permet pour sa part de bien catégoriser les saucés selon la norme TISI. Ainsi, seuls les lots expérimentaux T0 et Tcu pourraient avoir le droit de bénéficier de l'appellation 1<sup>ère</sup> classe (au même titre que les saucés commerciales Phu Quoc et Ca com 60). Tous les autres à savoir le témoin et les Tsu seraient catégorisées 2e classe comme les saucés commerciales Ca com 30 et Con ca.

Fort logiquement le ratio  $N_{AA}/N_T$  est donc lui aussi discriminant, mais dans une moindre mesure. Si tous les lots répondent aux exigences minimales (>40%), certaines catégories différentes sont identifiables selon la norme TVCN 5107. Ainsi, la sauce Tcu(-s) peut-elle être considérée comme « extraordinaire » et à ce titre supérieure à toutes les autres y compris les saucés commerciales. Les saucés Témoin, T0(+s) et Tcu(+s) appartiennent quant à elles à la catégorie « Surfine » et surclassent également les saucés commerciales. Enfin les lots faits à partir de surnageant ainsi que le T0(-s) sont classés comme « 1<sup>ère</sup> classe » au même titre que l'ensemble des saucés commerciales.

**Tableau 3.1** Caractéristiques biochimiques des échantillons de Nuoc-mam expérimentaux et commerciaux

| <b>Sauce de poisson</b> | <b>N<sub>T</sub></b><br>(g/l) | <b>N<sub>NH3</sub></b><br>(g/l) | <b>N<sub>AA</sub></b><br>(g/l) | <b>N<sub>AA</sub>/N<sub>T</sub></b><br>(%) | <b>N<sub>NH3</sub>/N<sub>T</sub></b><br>(%) | <b>NaCl</b><br>(g/l) | <b>Humidité</b><br>(%) | <b>pH</b> |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|---|----------------------|------------------------|-----------|
| <b>Témoin</b>           | 18,67 <sup>ef</sup>           | 2,89 <sup>fg</sup>              | 9,71 <sup>d</sup>              | 52,00 <sup>abc</sup>                       | 15,50 <sup>acd</sup>                        | 231,24               | 71,19                  | 6,82      |
| <b>T0 (+s)</b>          | 20,77 <sup>ad</sup>           | 3,10 <sup>de</sup>              | 10,66 <sup>bc</sup>            | 51,35 <sup>abd</sup>                       | 14,94 <sup>df</sup>                         | 223,84               | 69,82                  | 6,11      |
| <b>T0 (-s)</b>          | 21,23 <sup>abc</sup>          | 3,55 <sup>a</sup>               | 10,34 <sup>c</sup>             | 48,68 <sup>be</sup>                        | 16,70 <sup>a</sup>                          | 218,53               | 66,46                  | 6,07      |
| <b>Tsu (+s)</b>         | 19,25 <sup>de</sup>           | 3,08 <sup>def</sup>             | 8,47 <sup>f</sup>              | 44,00 <sup>fg</sup>                        | 16,00 <sup>abc</sup>                        | 196,53               | 69,83                  | 5,86      |
| <b>Tsu (-s)</b>         | 20,00 <sup>d</sup>            | 3,29 <sup>b</sup>               | 9,31 <sup>de</sup>             | 46,40 <sup>ef</sup>                        | 16,40 <sup>ab</sup>                         | 201,84               | 70,93                  | 6,09      |
| <b>Tcu (+s)</b>         | 21,47 <sup>ab</sup>           | 3,17 <sup>bd</sup>              | 11,29 <sup>ab</sup>            | 52,61 <sup>ab</sup>                        | 14,78 <sup>dg</sup>                         | 197,48               | 70,71                  | 6,05      |
| <b>Tcu (-s)</b>         | 21,82 <sup>a</sup>            | 3,27 <sup>bc</sup>              | 12,13 <sup>a</sup>             | 55,61 <sup>a</sup>                         | 14,97 <sup>de</sup>                         | 213,37               | 68,77                  | 6,10      |
| <b>Phu Quoc</b>         | 33,32                         | 5,10                            | 14,82                          | 44,48                                      | 15,31                                       | 210,47               | 60,60                  | 5,44      |
| <b>Ca com 60</b>        | 30,80                         | 4,75                            | 13,17                          | 42,76                                      | 15,42                                       | 197,80               | 63,58                  | 5,25      |
| <b>Ca com 30</b>        | 19,60                         | 3,10                            | 8,14                           | 41,53                                      | 15,82                                       | 197,98               | 68,96                  | 5,88      |
| <b>Con ca</b>           | 19,32                         | 2,68                            | 7,86                           | 40,68                                      | 13,87                                       | 202,78               | 72,07                  | 5,11      |

**Tableau 3.2 Principaux paramètres de classification des sauces de poisson selon différentes normes**

|                           | <b>N<sub>T</sub></b><br><b>(g/l)</b>  | <b>N<sub>NH3/N<sub>T</sub></sub></b><br><b>(%)</b>  | <b>N<sub>AA</sub></b><br><b>(g/l)</b>             | <b>N<sub>AA/N<sub>T</sub></sub></b><br><b>(%)</b>   | <b>pH</b> | <b>NaCl</b><br><b>(g/l)</b> |
|---------------------------|---|---|---|---|-----------|-----------------------------|
| <b>TCVN 5107</b>          | Extraordinaire >30<br>25> Surfine >30<br>15> 1 <sup>ère</sup> classe >25<br>10> 2e classe >15 | Extraordinaire <20<br>20< Surfine <25<br>25< 1 <sup>ère</sup> classe <30<br>30< 2e classe <35 |   | Extraordinaire >55<br>50> Surfine >55<br>40> 1 <sup>ère</sup> classe >50<br>35> 2e classe >40 | 4,5>X>6,5 | > 200                       |
| <b>FDA Thaïlande</b>      | >9  |   |   | 40> X >60   |           |                             |
| <b>TISI</b>               | 1 <sup>ère</sup> classe >20<br>15> 2e classe >20  |   | 1 <sup>ère</sup> classe >10<br>7,5> 2e classe >10 |   |           |                             |
| <b>Codex alimentarius</b> | >10   |   |   | >40   | 4,5>X>6,5 | > 200                       |

### 3.3.2.2. Taux d'humidité et teneur en sel

Le taux d'humidité de la sauce de poisson est inversement proportionnel à la quantité de matière soluble, un faible taux indiquant une quantité élevée de matière soluble (organique et minérale). La teneur en sel impacte elle aussi directement sur le taux d'humidité, plus elle est élevée plus le taux d'humidité est faible.

Seule la norme établie par le Codex et TCVN 5107 fait explicitement mention de la teneur en sel qui doit être supérieure à 200g/l. D'après cette norme, deux productions expérimentales (Tsu(+s) et Tcu(+s)) ne pourraient être appelées sauces de poisson. Néanmoins cela serait aussi le cas pour deux sauces commerciales dont une de premier choix (Ca com 60 et Cam com 30).

Bien que relativement proches les uns des autres, il semble que la supplémentation en Protex 51FP a contribué à faire baisser le taux d'humidité dans les lots. De tous les lots expérimentaux, c'est dans le T0(-s) que le taux d'humidité est le plus faible (66,5%) et dans le témoin qu'il est le plus élevé (71,2%). Cependant, toutes les sauces expérimentales possèdent un taux d'humidité supérieur à celui observé pour les sauces commerciales, notamment par rapport à celles dites de 1<sup>ère</sup> catégorie. Dans des études conduites sur plusieurs sauces commerciales de poisson, Jung-Nim *et al.*, (2001, 2002) ont trouvé un taux moyen d'humidité de 65,9%, avec des valeurs plus élevées dans les échantillons laotiens et moindres pour les produits thaïlandais et vietnamiens qui possédaient des taux d'azote total plus élevés.

Le taux de matière organique dans la sauce peut être estimé en soustrayant de la masse du produit, les teneurs en eau et en sel. Il s'avère que sur ce critère les sauces apparaissent très différentes les unes des autres. Le classement correspondant est le suivant : Témoin(6%) < Con ca (8%) ≤ T0(+s) (8%) < Tsu (-s) (9%) < Tcu (+s) (10%) ≤ Tcu (-s) (10%) < Tsu (+s) (11%) ≤ Ca com 30 (11%) < T0(-s) (12%) < Ca com 60 (17%) < Phu Quoc (18%). Ainsi c'est dans le témoin que la valeur minimale est trouvée (6%) et dans la sauce commerciale Phu Quoc qu'il y a le maximum (18%) soit un facteur 3 entre les deux. Le meilleur lot expérimental (T0(-s)) se révèle sur ce critère très en deçà des sauces commerciales de 1<sup>er</sup> choix (12/17-18%). Sur cette base, il s'avère qu'à l'exception du témoin (très en deçà), les lots expérimentaux sont comparables aux sauces commerciales de seconde catégorie. Aucune conclusion ne peut cependant être tirée quant à un quelconque effet d'un apport différé en NaCl ou d'une séparation de phase.



### 3.3.2.3. pH

Après six mois de fermentation, les échantillons expérimentaux ont des valeurs de pH comprises entre 5,86 (Tsu(+s)) et 6,82 (Témoin), ces valeurs sont plus élevées que celles mesurées sur les produits commerciaux (de 5,11 à 5,88). D'après le codex, TCVN 5107 et sur ce critère uniquement, lot Témoin excepté, tous les autres pourraient bénéficier de l'appellation « sauce de poisson »

En règle générale, le pH des sauces de poisson oscille entre 5 et 6 (Jung-Nim *et al.*, 2002, Ravigim *et al.*, 1993), mais des taux supérieurs peuvent parfois être observés comme le note Jung-Nim *et al.* (2001) avec 6,11 pour une sauce chinoise et 6,23 pour une sauce du Myanmar. Selon Frans et Yoshiyuki (1996) le pH d'une sauce est lié à son taux de sel, un faible taux de sel (100 g/kg) induisant un pH plus faible qu'un taux traditionnel (environ 200 g/kg). Comme les teneurs en sel sont relativement semblables entre les lots, les différences de pH observées ici sont certainement liées au taux d'acides aminés libres. Un allongement au-delà des 6 mois du processus de fermentation devrait conduire à une diminution notable du pH.

### 3.3.3. Profils des acides aminés totaux et masse moléculaire des peptides des sauces Nuoc-mam

#### 3.3.3.1. Teneur en acides aminés totaux

Les profils et les quantités des acides aminés totaux (AA<sub>T</sub>, solubles) contenus dans les échantillons expérimentaux et commerciaux de sauce de poisson sont présentés dans le Tableau 3.3.

La quantité totale d'acides aminés quantifiés apparaît très différente selon les sauces. Ainsi pour les lots expérimentaux, les teneurs les plus faibles sont trouvées pour les sauces faites à partir de surnageant (Tsu) qui s'avèrent même inférieure au lot Témoin (-9% environ), toutes les autres lui étant supérieures. Par contre, que ce soit pour les sauces faites à partir de culot (Tcu) ou sans mélange de phases (T0), les différences entre elles apparaissent relativement minimales sur ce critère (+2 à +6% par rapport au témoin). Ceci confirme bien les observations précédentes portant sur la matière organique des échantillons, essentiellement constituée de matériel protéique qui sous l'action des protéases (endogènes et Protex 51FP) s'est transformé en acides aminés libres. Les valeurs trouvées ici (7137 à 8233 mg/100ml) sont du même ordre

que celles trouvées lors d'études comparables (6000 à 9800 mg/100ml, Jung-Nim *et al.* 2001 ; Taira *et al.*, 2007 ; Youngsawatdigul *et al.*, 2007).

La teneur en acides aminés dans les sauces commerciales est très variable et en accord avec leur renommée. Ainsi pour les sauces de premier choix (Phu Quoc et Ca-com 60) les valeurs trouvées (15475,66 et 13040,41 mg/100ml respectivement) sont près de deux à trois fois supérieures à celles des sauces de qualité moindre (6522,72 mg/100ml pour Ca-com 30 et 4433,25 mg/100ml pour Con-ca).

### **3.3.3.2. Composition en acides aminés**

Dix-sept acides aminés ont été identifiés dans les différentes sauces expérimentales et commerciales. Parmi ceux-ci certains sont dans tous les cas minoritaires tels l'hydroxyproline, la tyrosine et Cys-Cys, qui à eux trois ne représentent jamais plus de 0,85% de la totalité des acides aminés quantifiés. À l'inverse, l'acide glutamique et l'alanine sont toujours très présents et quantifiés parmi les 3 acides aminés les plus représentés ; à eux deux ils représentent de 23 à 41% du contenu en acides aminés de toutes les sauces.

Les sauces expérimentales sont riches en alanine (800-1400 mg/100ml), acide glutamique (840-1320ml/100ml), leucine (700-820 mg/100ml), glycine (640-840 ml/100ml), acide aspartique (460-870 mg/100ml), valine (550-750 mg/100ml), isoleucine (510-680 mg/100ml) et proline (420-530ml/100ml). À eux huit, ces acides aminés contribuent à hauteur de 71 à 82% de la teneur totale en acides aminés selon les sauces. Toutefois, les taux de ces acides aminés sont plus faibles pour i) les échantillons Tsu (+/-s), ce qui s'explique par le fait que ces échantillons résultent de la fermentation de surnageant appauvri en substrat protéique, et ii) pour l'échantillon Témoin produit selon la méthode traditionnelle, sans enzyme protéolytique ajouté, donc avec un taux d'hydrolyse inférieur.

Si les compositions en acides aminés des sauces expérimentales s'avèrent relativement identiques (en valeur relative) dans les sauces expérimentales, elles apparaissent très différentes de celles des sauces commerciales et particulièrement de celles de première catégorie dans lesquelles la leucine et dans une moindre mesure l'isoleucine sont beaucoup moins présentes (environ 3% et 4% respectivement). Pour ces deux acides aminés, les productions expérimentales se rapprochent nettement plus des sauces de seconde catégorie (Ca com 30 et

Con ca). Dans les sauces commerciales, ce sont l'alanine, l'acide glutamique, la glycine, la leucine, la valine, l'isoleucine qui prévalent.

Ces différences de composition en acides aminés libres sont susceptibles de modifier leurs caractéristiques sensorielles comme le mentionne Jung-Nim *et al.*, (2002) pour qui l'acide glutamique et l'alanine, mais aussi la thréonine, la tyrosine, l'histidine et la méthionine constituent les composants caractéristiques du goût de la sauce Nuoc-mam .

### **3.3.3.3. Acides aminés essentiels (AA<sub>E</sub>) et ratio AA<sub>E</sub>/AA<sub>T</sub>**

La valeur nutritionnelle d'une protéine et à fortiori d'un hydrolysate de protéines telle la sauce de poisson est en grande partie conditionnée par sa teneur en acides aminés essentiels et par le ratio de ceux-ci sur les acides aminés totaux.

Pour tous les lots expérimentaux, supplémentés ou non en Protex 51FP, la teneur en acides aminés essentiels varie de 3,4 à 3,8g/100 ml soient quasiment 1,5 fois plus que dans les sauces commerciales de seconde catégorie (2,3 pour Cam com 30 et 2,1 pour Con ca), mais près de 1,5 fois moins que celles des sauces de première catégorie (4,6 pour Cam com 60 et 5,9g/100ml pour Phu Quoc). Sur d'autres sauces commerciales indonésiennes de type bakasang, Frans et Yoshiyuki (1995) ont signalé des taux d'acides aminés essentiels entre 4236 et 4665 mg/100ml. Ceci n'est finalement pas très différent des remarques formulées lors de l'analyse des teneurs en acides aminés totaux. Il convient néanmoins de regarder le ratio AA<sub>E</sub>/AA<sub>T</sub> afin de voir si un quelconque bénéfice d'une supplémentation en Protex 51FP est perceptible.

Dans les lots expérimentaux supplémentés, ce ratio varie de 0,43 à 0,48, le témoin ayant pour sa part un ratio de 0,46. Le partage de phase intervenu après six heures de protéolyse a influé sur ce ratio. Ainsi, les valeurs les plus élevées ont-elles été obtenues pour les sauces faites à partir de surnageant (Tsu), mais ceci est à contrebalancer avec leur faible teneur en acides aminés totaux. Par comparaison avec le Témoin non supplémenté, aucun effet notable de l'ajout de Protex 51FP n'est perceptible sur ce critère.

Les sauces commerciales présentent des ratios très variables. Curieusement, le plus élevé (0,48) est obtenu pour la sauce Con ca considérée comme étant de moindre qualité. Tout comme pour les échantillons Tsu cela est à mettre en relation avec sa faible teneur en acides aminés totaux. Pour l'autre sauce de seconde catégorie (Ca com 30), le taux relevé est très faible

et ne peut être expliqué par sa richesse en acides aminés totaux. Elle peut donc être considérée comme la sauce ayant la moins bonne valeur nutritionnelle entre toutes (peu d'acides aminés essentiels et peu d'acides aminés totaux). Pour les deux sauces à plus forte valeur marchande, si elles sont considérées comme riches en acides aminés totaux, il n'en est rien quant à leur valeur nutritionnelle basée sur le ratio  $AA_E/AA_T$  contenu en acides aminés essentiels. Celui-ci s'avère très inférieur à celui obtenu pour les productions expérimentales (0,35-0,38). Ces sauces apparaissent donc riches en acides aminés, mais relativement pauvres en proportion d'acides aminés essentiels.

#### **3.3.3.4. Profil moléculaire des peptides**

La répartition des masses moléculaires des peptides contenus dans les échantillons expérimentaux et commerciaux est présentée dans le Tableau 3.4.

Pour tous les échantillons (expérimentaux et commerciaux), plus de 90% des peptides ont une masse moléculaire inférieure à 600Da (soit 4 à 8 acides aminés), plus de 70% sont inférieurs à 360 Da (soit 3 à 4 acides aminés) et plus de 10% sont sous forme d'acides aminés libres. Cela illustre bien le fort degré de protéolyse à l'issue de la maturation des matières premières. Cela conforte également la renommée des sauces de poisson, réputées comme très digestes. En effet, de tels peptides de taille si réduite franchissent aisément la barrière intestinale sans nécessité de processus de digestion.

De tous les lots expérimentaux, il s'avère que c'est pour le Témoin, que les peptides sont en moyenne les plus gros, avec une plus grande proportion de peptides supérieurs à 200 Da (55%) et à 360Da (27%). À l'inverse, c'est dans l'échantillon non séparé et avec un ajout de sel dès le début (T0(+s)) que la protéolyse a été la plus intense avec moins de 20% des peptides dont la masse excède 360Da. Néanmoins, les différences entre les productions expérimentales supplémentées sont faibles. Cela illustre encore l'action positive de Protex 51FP sur la protéolyse, conduisant non seulement à la solubilisation des protéines, mais aussi à leur plus forte fragmentation en petits éléments (peptides ou acides aminés libres).

La répartition moléculaire des peptides dans les sauces commerciales est globalement similaire à l'exception toutefois notable de l'absence de composés supérieurs à 1300Da et à la plus faible proportion de peptides supérieurs à 900Da dans les deux sauces de première catégorie.

Ceci illustre bien la qualité de leur fabrication et notamment de leur temps de maturation très long (12 mois et plus) justifiant en partie leur cout plus élevé.

Le résultat le plus important de cette analyse est lié à l'absence de composés de poids supérieur à 2500Da. Cela signifie donc que les enzymes de type protéases, endogènes ou non, de poids largement supérieurs, ont été dénaturées. Cette analyse permet donc d'affirmer que Protex 51FP a été hydrolysée au cours des six mois de maturation. Il n'est donc pas nécessaire de procéder à son inactivation et son utilisation telle que pratiquée ici entre donc dans la réglementation des auxiliaires technologiques. À ce titre, aucune obligation de mentionner sa présence ou son utilisation sur l'étiquette du produit fini ne peut donc être exigée.

**Tableau 3.3 Profil des acides aminés libres des sauces de poisson expérimentales et commerciales (mg/100ml)**

| <b>Echantillons</b> | <b>Témoïn</b>  | <b>T0 (+s)</b> | <b>T0 (-s)</b> | <b>Tsu (+s)</b> | <b>Tsu (-s)</b> | <b>Tcu (+s)</b> | <b>Tcu (-s)</b> | <b>Phu Quoc</b> | <b>Ca com<br/>60</b> | <b>Ca com<br/>30</b> | <b>Con ca</b>  |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------|
| Isoleucine          | 548,80         | 658,20         | 565,18         | 530,80          | 519,17          | 686,36          | 610,10          | 582,01          | 477,04               | 380,27               | 380,55         |
| Leucine             | 698,83         | 811,11         | 753,57         | 784,52          | 824,36          | 776,32          | 751,72          | 524,76          | 381,63               | 380,27               | 536,67         |
| Lysine              | 331,65         | 452,10         | 578,88         | 397,27          | 266,60          | 546,42          | 337,73          | 1082,91         | 871,67               | 351,30               | 240,69         |
| Méthionine          | 240,84         | 279,24         | 246,62         | 247,04          | 238,54          | 249,89          | 217,89          | 233,76          | 143,11               | 119,51               | 123,60         |
| Thréonine           | 533,00         | 73,13          | 321,98         | 273,75          | 508,65          | 109,95          | 497,52          | 1097,23         | 836,98               | 278,87               | 217,92         |
| Phénylalanine       | 398,77         | 352,37         | 376,78         | 320,48          | 347,28          | 366,50          | 403,10          | 529,53          | 429,33               | 220,92               | 191,90         |
| Valine              | 647,50         | 708,06         | 698,76         | 600,91          | 554,25          | 743,00          | 708,15          | 1178,33         | 1032,13              | 459,95               | 318,75         |
| Histidine           | 240,84         | 126,32         | 236,35         | 203,64          | 182,41          | 153,27          | 232,42          | 667,88          | 403,31               | 134,00               | 136,61         |
| <b>Total AAE</b>    | <b>3640,21</b> | <b>3460,53</b> | <b>3778,12</b> | <b>3358,41</b>  | <b>3441,26</b>  | <b>3631,72</b>  | <b>3758,62</b>  | <b>5896,40</b>  | <b>4575,20</b>       | <b>2325,10</b>       | <b>2146,69</b> |
| Alanine             | 947,56         | 1333,02        | 1404,38        | 864,64          | 806,82          | 1002,89         | 886,09          | 1865,28         | 1504,83              | 604,82               | 383,80         |
| Acide aspartique    | 686,98         | 468,72         | 482,97         | 694,38          | 627,92          | 862,95          | 875,20          | 1703,09         | 1478,81              | 517,90               | 354,53         |
| Acide glutamique    | 1172,61        | 1323,05        | 1219,41        | 904,70          | 841,90          | 1246,11         | 1314,61         | 2418,67         | 2172,68              | 2089,69              | 933,49         |
| Glycine             | 714,62         | 791,17         | 842,63         | 711,08          | 638,44          | 826,30          | 693,62          | 1607,68         | 1890,79              | 503,41               | 305,74         |
| Hydroxyproline      | 27,64          | 26,59          | 34,25          | 23,37           | 24,56           | 26,65           | 29,05           | 100,18          | 69,39                | 25,35                | 22,77          |
| Tyrosine            | 11,84          | 19,95          | 13,70          | 3,34            | 10,52           | 19,99           | 14,53           | 9,54            | 8,67                 | 7,24                 | 6,51           |
| Proline             | 481,68         | 531,88         | 524,07         | 457,36          | 424,46          | 533,10          | 522,94          | 1097,23         | 871,67               | 289,73               | 182,14         |
| Serine              | 173,72         | 53,19          | 68,51          | 106,83          | 333,25          | 63,31           | 69,00           | 758,52          | 459,69               | 141,24               | 97,58          |
| Cys-Cys             | 23,69          | 23,27          | 17,13          | 13,35           | 10,52           | 19,99           | 7,26            | 19,08           | 8,67                 | 7,24                 | 0,00           |
| <b>Total AANE</b>   | <b>4240,34</b> | <b>4570,82</b> | <b>4607,05</b> | <b>3779,05</b>  | <b>3718,38</b>  | <b>4601,29</b>  | <b>4412,29</b>  | <b>9579,26</b>  | <b>8465,21</b>       | <b>4186,62</b>       | <b>2286,55</b> |
| <b>Total</b>        | <b>7880,55</b> | <b>8031,35</b> | <b>8385,17</b> | <b>7137,46</b>  | <b>7159,64</b>  | <b>8233,02</b>  | <b>8170,92</b>  | <b>15475,66</b> | <b>13040,41</b>      | <b>6511,72</b>       | <b>4433,25</b> |
| <b>AAE/total</b>    | <b>46,19%</b>  | <b>43,09%</b>  | <b>45,06%</b>  | <b>47,05%</b>   | <b>48,06%</b>   | <b>44,11%</b>   | <b>46,00%</b>   | <b>38,10%</b>   | <b>35,08%</b>        | <b>35,71%</b>        | <b>48,42%</b>  |

**Tableau 3.4 Répartition des masses moléculaires des peptides (exprimée en %) des sauces expérimentales et commerciales**

| <b>Echantillon</b> | <b>PM&gt;2500D</b> | <b>2500D&gt;PM&gt;1300D</b> | <b>1300D&gt;PM&gt;900D</b> | <b>900D&gt;PM&gt;600D</b> | <b>600D&gt;PM&gt;360D</b> | <b>360D&gt;PM&gt;200D</b> | <b>200D&gt;PM&gt;130D</b> | <b>PM&lt;130D</b> |
|--------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| <b>Témoin</b>      | 0                  | 0,16                        | 1,43                       | 6,38                      | 18,79                     | 27,51                     | 32,18                     | 13,10             |
| <b>T0 (+s)</b>     | 0                  | 0,03                        | 0,77                       | 3,91                      | 14,42                     | 28,49                     | 38,45                     | 13,51             |
| <b>T0 (-s)</b>     | 0                  | 0,09                        | 1,18                       | 4,81                      | 15,55                     | 25,69                     | 38,90                     | 13,35             |
| <b>Tsu (+s)</b>    | 0                  | 0,004                       | 0,50                       | 4,12                      | 15,67                     | 28,57                     | 39,85                     | 10,84             |
| <b>Tsu (-s)</b>    | 0                  | 0,07                        | 1,20                       | 5,43                      | 17,79                     | 26,72                     | 36,26                     | 12,09             |
| <b>Tcu (+s)</b>    | 0                  | 0,07                        | 1,24                       | 4,82                      | 16,49                     | 30,11                     | 33,31                     | 13,50             |
| <b>Tcu (-s)</b>    | 0                  | 0,002                       | 0,89                       | 4,99                      | 16,37                     | 26,41                     | 37,34                     | 13,57             |
| <b>Phu Quoc</b>    | 0                  | 0,000                       | 0,29                       | 4,34                      | 20,20                     | 32,33                     | 32,47                     | 10,01             |
| <b>Ca-com 60</b>   | 0                  | 0,000                       | 0,68                       | 4,56                      | 20,12                     | 32,13                     | 31,44                     | 10,65             |
| <b>Ca-com 30</b>   | 0                  | 0,07                        | 1,18                       | 4,87                      | 17,72                     | 32,11                     | 32,33                     | 11,30             |
| <b>Con-ca</b>      | 0                  | 0,12                        | 1,54                       | 6,54                      | 18,18                     | 25,70                     | 33,84                     | 13,74             |

### 3.3.4. Valeur sensorielle de la sauce de poisson

La valeur sensorielle des sauces de poisson a été estimée par une analyse qualitative de la couleur, de l'odeur et de la saveur respectant les normes en vigueur (TCVN 5107 : 2003 - Codex stan 302-2011), les résultats sont présentés dans la Figure 3.8.

Par comparaison avec la sauce commerciale Phu Quoc, le panel de gouteurs a trouvé que les échantillons expérimentaux avaient un globalement le même goût, mais que la couleur différait fortement. Les échantillons supplémentés en Protex 51FP sont apparus plus bruns, plus foncés que l'échantillon commercial ou le Témoin, qui eux présentaient une teinte plus rougeâtre caractéristique de la sauce Nuoc-mam. Cette coloration brune plus intense pourrait être due à la couleur de l'enzyme ou plus vraisemblablement à une réaction de mélanose, à savoir une oxydation de la tyrosine produisant de la mélanine. D'après Zentaro *et al.*, (1982) et Youngsawatdigul *et al.*, (2007) les sauces de poisson sont généralement de couleur ambre/jaune durant les deux premiers mois de fermentation, puis elles s'obscurcissent progressivement.

L'odeur des échantillons expérimentaux, y compris celle du Témoin, est apparue moins intense que celle de la sauce commerciale. Cette faiblesse d'intensité pourrait être la conséquence d'une durée de fermentation restreinte (6 mois au lieu de 12), mais ceci va à l'encontre des travaux de Youngsawatdigul *et al.*, (2007) qui rapportent que l'odeur d'échantillons expérimentaux démarrés par différentes cultures était après 4 mois de fermentation, équivalente à celle de sauces traditionnelles ayant fermenté 12 mois. La faible température moyenne lors des essais (26,4°C en moyenne au lieu de 30-35°C) pourrait expliquer cette moindre formation de composés odorants.

Frans et Yoshiyuki, (1995) ont suggéré que le développement de l'arôme était lié à la concentration en sel et que la saveur "balasang" (saveur typique d'une sauce indonésienne) pouvait être attribuée à l'acide glutamique, mais cet acide aminé est très largement présent dans les différences sauces expérimentales (Tableau 3.3). En 2002, Jung-Nim *et al.*, ont identifié onze composés, à l'aide de tests d'omission et d'addition, comme étant les composants gustatifs actifs du Nuoc-mam : l'acide glutamique, l'acide aspartique, la thréonine, l'alanine, la valine, l'histidine, la proline, la tyrosine, la cystine, la méthionine et l'acide pyroglutamique. Selon ces auteurs les composés les plus efficaces pour recréer la saveur Nuoc-mam caractéristique sont l'acide glutamique, l'acide pyroglutamique et l'alanine.



Le manque de typicité observé ici pourrait donc être lié à une formation restreinte de composés durant la fermentation, mais aussi à des différences de ratio entre les diverses molécules à l'origine de la sapidité.

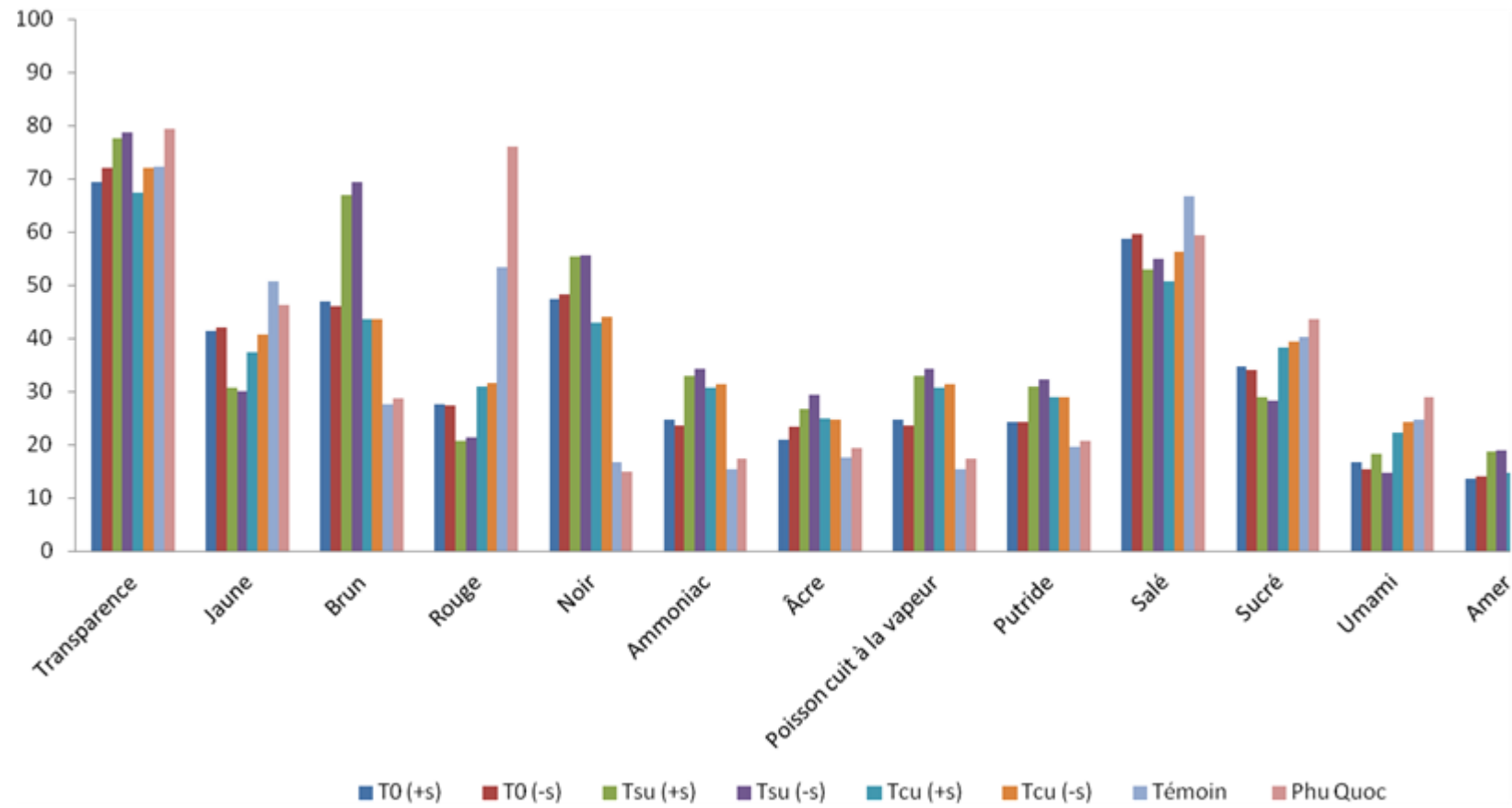
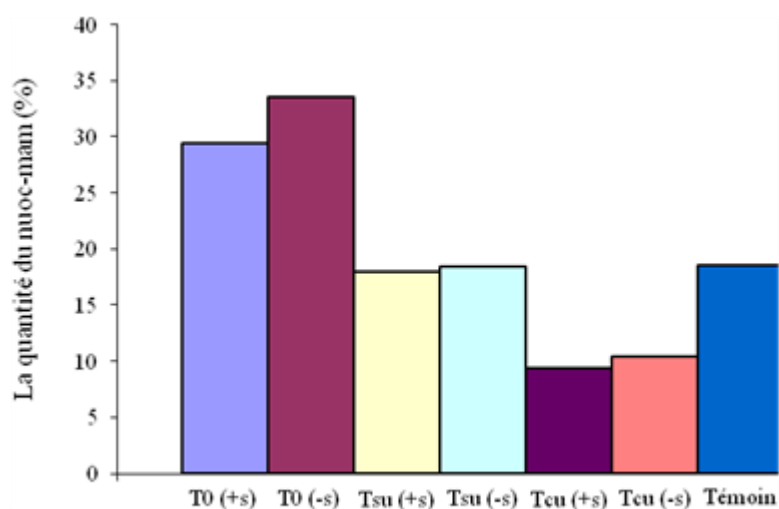


Figure 3.8 Valeur sensorielle de la sauce de poisson

### 3.3.5. Les rendements de production

À l'issue des six mois de maturation, les quantités de sauce produites ont été quantifiées par pesée (Tableau 3.5). Les rendements de production correspondants sont calculés en fonction des matières premières mises en œuvre : anchois (5kg), sel (1,25 kg) et eau (1kg), selon la formule [rendement = sauce (kg) x 100 / 7,250]. Ils sont présentés sur Figure 3.9.

Les rendements de production des différents essais montrent que les fermentations en mélange donnent des résultats supérieurs à ceux des essais réalisés après la séparation culots/surnageants, l'essai en mélange avec incorporation tardive de sel (T0 (-s) étant le plus concluant (33,49%). La fermentation des culots de filtration conduit aux rendements les plus faibles [Tcu (+s) 9,34%], celle des surnageants a des valeurs intermédiaires, de l'ordre de 18%, similaires à celle du témoin (18,6%).



**Figure 3.9 Rendement de production des sauces de poisson après 6 mois de fermentation**

Le fait d'ajouter le sel après 6 heures de fermentation accroît légèrement les rendements, toutefois les différences observées ne sont pas toujours significatives (les différences entre les essais sur les surnageants ne le sont pas).

Les rendements de production des essais de fermentation en mélange en présence de Protex 51FP, T0 (-s) et T0 (+s), sont respectivement 1,8 et 1,6 fois supérieurs à celui de l'échantillon Témoin.

Les quantités d'azote récupéré dans les sauces expérimentales (Tableau 3.5) dépendent du procédé de production. Les fermentations en mélange [T0 (+/-s)] permettent de récupérer des quantités d'azote nettement supérieures aux fermentations des culots [Tcu (+/-s)], des surnageants [Ts (+/-s)], et même du Témoin. Le meilleur taux de récupération étant obtenu lors du T0 (-s) avec 60,69 g N/5kg poisson.

**Tableau 3.5 Quantité de sauce de poisson et azote récupérable**

| <b>Fish sauce</b> | <b>Sauce (kg)</b>         | <b>g N récupérable</b>    |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| T0 (+s)           | 2,13 <sup>b</sup> ±0,036  | 50,18 <sup>b</sup> ±0,98  |
| T0 (-s)           | 2,48 <sup>a</sup> ±0,037  | 60,69 <sup>a</sup> ±1,16  |
| Tsu (+s)          | 1,30 <sup>ce</sup> ±0,044 | 34,85 <sup>de</sup> ±0,52 |
| Tsu (-s)          | 1,34 <sup>cd</sup> ±0,062 | 35,07 <sup>c</sup> ±0,63  |
| Tcu (+s)          | 0,68 <sup>g</sup> ±0,021  | 18,00 <sup>g</sup> ±0,31  |
| Tcu (-s)          | 0,77 <sup>f</sup> ±0,015  | 19,13 <sup>f</sup> ±0,47  |
| Témoin            | 1,35 <sup>c</sup> ±0,040  | 29,01 <sup>d</sup> ±0,56  |

L'ajout de Protex 51FP dans les fermentations en mélange (T0 (+/-s)) a induit une augmentation forte de la quantité d'azote récupéré, à savoir 1,7 à 2,1 fois plus importante que dans l'échantillon Témoin.

Ces résultats prouvent que l'addition de l'enzyme Protex 51FP accroît fortement le rendement de production de sauce et que le fait de retarder l'ajout de sel a un effet potentialisateur secondaire. Ceci confirme en partie les travaux de Zentaro *et al.*, (1982) qui notaient qu'une addition tardive de sel (dans les 24 heures), une température de fermentation élevée, 50°C et un broyage préalable du poisson étaient des facteurs susceptibles d'augmenter les rendements de production .

### 3.4. Conclusion

Après six mois de fermentation, les sauces de poisson issues des échantillons supplémentés en enzyme protéolytique Protex 51FP ont présenté des taux d'azote total supérieurs à ceux des échantillons obtenus selon la méthode traditionnelle, attestant de l'efficacité de l'enzyme. Cependant, les essais réalisés sur les culots de filtration ont conduit à des rendements et des taux d'azote récupérés très faibles, de l'ordre du tiers des valeurs obtenues par une fermentation en mélange avec ajout d'enzyme. Ceux réalisés sur les surnageants ont conduit à des rendements comparables à ceux de la méthode traditionnelle, soit environ de 50% inférieurs aux essais en mélange. Les fermentations en mélange sont donc nettement plus efficaces que celles réalisées sur phases séparées.

Le fait de différer de 6 heures l'apport de sel augmente les rendements de production, les taux d'azote total et d'acides aminés de la sauce.

Toutefois, la qualité sensorielle des sauces supplémentées est légèrement inférieure à celle de la sauce Nuoc-mam traditionnelle, en particulier la couleur qui est moins rouge caractéristique, plus brune, l'odeur un peu plus ammoniaquée et âcre, et la saveur umami y est moins prononcée.

Suite à des contraintes pratiques, les essais ont été réalisés à des températures inférieures de 5 à 10°C aux températures usuelles. Une fermentation à des températures plus classiques aurait vraisemblablement conduit à une protéolyse plus importante et peut être aussi à une modification des propriétés organoleptiques de la sauce suite à une maturation plus intense à l'origine des molécules conférant à la sauce Nuoc-mam ses caractéristiques sensorielles particulières. D'autre part, les essais ont été effectués dans des flacons en verre non poreux alors que traditionnellement la production de Nuoc-mam est réalisée soit dans des jarres en terre pour des petits volumes (20 à 50 l) ou des cuves en bois ou en bétons pour des volumes supérieurs. Cette absence de porosité n'a certainement pas permis l'adsorption de ferments et d'arômes susceptibles de conférer au produit fermenté des caractéristiques sensorielles spécifiques.

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La sauce de poisson est produite de façon traditionnelle dans la plupart des pays d'Asie. Chaque pays possède sa propre technique pour créer une multitude de produits aux propriétés nutritionnelles et sensorielles variées. Les méthodes de production sont souvent « standardisées » au sein d'une même région, mais il y a de très nombreuses variations selon les traditions et les espèces de poisson. Les méthodes de production reposent néanmoins toutes sur le principe d'un mélange de poisson entier et de sel et d'une fermentation à température ambiante pendant 5 à 24 mois.

Les sauces de poissons vietnamiennes sont les plus réputées d'entre toutes, particulièrement pour leur qualité gustative et se vendent un peu partout dans le monde. Le gouvernement vietnamien, conscient de l'intérêt et de l'importance économique, souhaite contrôler un peu plus les productions en les standardisant et en augmentant la production, tout en maintenant une haute qualité des produits finis. C'est dans ce contexte qu'intervient ce travail qui a porté sur l'intérêt d'une supplémentation en protéase exogène notamment pour accélérer le processus de fabrication.

La première partie de ce travail a consisté à étudier l'action de protéases industrielles à large spectre sur la protéolyse de deux espèces de poissons intervenant dans la fabrication de sauce de poissons : l'anchois et la sardine.

Quatre enzymes répondant aux critères fixés (haute salinité, pH libre, température ambiante) ont été tout d'abord étudiées sur la sardine. Pour toutes les enzymes testées, la même tendance a été observée à savoir qu'une augmentation de la concentration en sel influençait négativement l'activité et entraînait une diminution de l'efficacité de l'hydrolyse. Sur la base du degré d'hydrolyse (DH), deux enzymes ont été retenues pour la suite de l'étude; Protex 51 FP et Protamex ; ces deux enzymes s'avérant être les plus à même d'hydrolyser les protéines de la sardine dans les conditions fixées. Une deuxième série d'expériences a été conduite afin d'étudier plus en détail la protéolyse de la sardine pendant 6 heures en présence ou non de ces deux enzymes. Il ressort que l'adjonction de ces deux enzymes favorise l'hydrolyse de la sardine et permet ainsi la solubilisation d'une plus grande quantité de matière. Néanmoins,

l'action de ces deux enzymes est affectée par la forte concentration en sel, les DH relevés ayant diminué de 33% pour Protex 51FP et de 42 pour Protamex lorsque la concentration en NaCl passe de 0 à 30%. Entre ces deux enzymes, c'est Protex 51FP qui s'est avérée la plus performante et qui a donc été utilisée pour la dernière série d'expériences sur la sardine simulant les conditions de production traditionnelle (30°C, 25% de NaCl). À l'issue de toutes ces séries d'expérimentations sur la sardine, il ressort que c'est avec Protex 51FP que les meilleurs résultats sont obtenus, son activité résiduelle à 30°C, même avec 30% de NaCl, s'avérant encore très intéressante. Même dans les conditions les plus défavorables (30°C et 30% NaCl l), l'ajout de 1% de cette enzyme permet en 3 heures d'avoir un ¼ de matériel solubilisé en plus avec un doublement du degré d'hydrolyse des protéines.

Sur la base des travaux de laboratoire conduits sur la sardine, l'efficacité des enzymes Protex 51FP et Protamex a été évaluée sur la production de sauce d'anchois. Il apparaît que, comme avec la sardine, l'adjonction de ces protéases permet une meilleure liquéfaction du poisson et une accélération du processus. Là aussi, il ressort que parmi les deux, c'est Protex 51FP qui se révèle être la plus efficace avec au final un degré d'hydrolyse plus élevé et une meilleure solubilisation de la matière, quelles que soient les concentrations en sel dans le milieu.

Une comparaison entre ces séries d'expériences conduites pendant 6 heures, avec Protex 51FP et 30% de NaCl, sur la sardine d'une part et sur l'anchois d'autre part, révèle que, c'est ce dernier qui se prête le mieux à des hydrolyses dans les conditions retenues. En effet, c'est avec l'anchois que systématiquement les indices mesurés sont les plus élevés : taux de solubilisation de la matière organique (39/18%), DH (22/20).

À l'issue de cette première partie, ce sont donc la protéase Protex 51FP et l'anchois qui ont été retenus comme agent biologique et comme matrice biologique pour la suite de l'étude.

La deuxième partie de ce travail entièrement réalisée au Vietnam visait à étudier le bénéfice d'une adjonction de 1% de Protex 51FP sur le processus traditionnel de fabrication de Nuoc mam. Pour ce faire, plusieurs productions de sauce ont été conduites sur la base de 5kg d'anchois additionnés de 25% de NaCl (1,25 kg) et de 20% d'eau (1 kg). La maturation des sauces a été réalisée en flacon de verre de 10 litres et en extérieur. La durée de l'expérimentation

a été de 6 mois avec des prélèvements mensuels pour suivre l'évolution du processus de maturation. En complément d'une éventuelle action à long terme de l'enzyme, l'effet d'un apport différé en sel (6 heures après) et d'une séparation de phases (culot/surnageant après 6 heures) ont été évalués. Pour ce faire, ce sont donc sept sauces expérimentales qui ont été suivies et comparées entre elles : un Témoin et 6 sauces additionnées avec 1% de Protex 51FP. A l'issue des 6 mois il ressort que sans aucun doute l'ajout de Protex 51FP a un effet positif sur le processus, mais que cet effet est plus ou moins marqué selon les conditions de production des sauces.

Le premier effet particulièrement notable, quelles que soient les sauces, est une accélération du processus de liquéfaction par augmentation de la protéolyse, particulièrement lors du premier mois. Ceci se traduit au final par une augmentation de l'ordre de 10% de la teneur en azote total dans les sauces supplémentées par rapport au Témoin (22-22/19gN/l) ; l'effet d'un apport différé en sel ou d'une séparation de phase ne semblant pas très marqué pour ce critère. Le suivi de l'azote aminé conforte ces observations avec une forte accélération lors du premier mois pour les échantillons supplémentés en enzyme et des valeurs à 6 mois supérieures à celles du Témoin (sauf pour les surnageants). Ces résultats suggèrent donc que la supplémentation des milieux avec 1% de Protex 51FP, dès le début de la maturation, a permis d'accélérer la liquéfaction par augmentation de la protéolyse conduisant à une augmentation de toutes les formes azotées (à l'exception des sauces faites à partir de surnageant). Compte tenu de la longue durée de la maturation, le bénéfice d'une séparation des phases ou d'un apport différé en sel ne semble pas évident sur les valeurs finales.

Le deuxième effet particulièrement notable concerne le rendement de production de sauce de poisson. En effet, la quantité de sauce récupérée par unité de poisson est, à l'exception des expériences conduites sur les culots, supérieure au Témoin lorsque 1% de Protex 51FP a été ajouté au mélange. Pour les sauces sans séparation de phase et donc les plus proches du Témoin, les rendements obtenus à 6 mois ont été 1,6 à 1,8 fois supérieurs selon que l'ajout de sel ait été différé ou non. Ces résultats prouvent que Protex 51FP est à même d'accroître très fortement les rendements de production et que l'apport différé en NaCl peut avoir un effet potentialisateur non négligeable.

La classification sur des critères biochimiques des différentes sauces expérimentales par le biais des normes en vigueur a été établie (TVCN 5107, FDA Thaïlande, TISI, Codex



alimentarius). Sur ces critères, ces sauces ont également été comparées à des sauces commerciales.

Sur la base de leur teneur en azote total, toutes ces sauces expérimentales, y compris le Témoin peuvent prétendre à l'appellation « Sauce de poisson » puisque dans toutes il est retrouvé au minimum 18gN/l.

Quatre des sept sauces expérimentales, (le Témoin, un surnageant et un culot exceptés), répondent aux exigences minimales pour prétendre à l'appellation « sauce de poisson » à savoir une teneur en azote total supérieure à 10gN/l (minimum 18gN/l pour le Témoin), une teneur en azote aminé supérieure à 7,5g/l (minimum 8,5), un rapport  $N_{AA}/N_T$  supérieur à 40% (minimum observé 44% pour un surnageant), un pH compris entre 4,5 et 6,5 (minimum 5,86, maximum 6,11 ; 6,86 pour le Témoin) et une teneur en NaCl supérieure à 200g/l (196 pour un surnageant et 197 pour un culot). D'après la norme vietnamienne TVCN 5107, toutes les sauces y compris le témoin pourraient être catégorisées « 1<sup>ère</sup> classe », mais seules celles n'ayant pas eu de séparation de phase le seraient selon la norme thaïlandaise TISI. En prenant en compte toutes ces normes, il ressort que les sauces supplémentées en Protex 51FP et non séparées en phase répondent à toutes les exigences requises pour prétendre à l'appellation « sauce de poisson de 1<sup>ère</sup> classe ». Ceci est relativement remarquable compte tenu du temps très court de maturation à savoir 6 mois, bien inférieur aux pratiques usuelles (12 à 24 mois).

*Remarque : l'analyse des sauces commerciales révèle que 2 ne répondent pas aux exigences minimales en ce qui concerne la teneur en sel avec des taux de 198g/l (Cam com 60 et Cam com 30). Si l'on excepte ce critère, c'est donc la totalité des sauces expérimentales additionnées de Protex 51FP qui peuvent donc prétendre à l'appellation « sauce de poisson »*

L'analyse de la valeur nutritionnelle de ces sauces expérimentales a été évaluée en mesurant leur teneur en acides aminés essentiels et particulièrement en établissant le ratio acides aminés essentiels/acides aminés totaux ( $AA_E/AA_T$ ). Il ressort que les taux d'acides aminés totaux sont comparables à ceux de sauces commerciales (notamment ceux de 2<sup>de</sup> catégorie) et que l'apport de Protex 51FP contribue à l'augmenter. Le ratio  $AA_E/AA_T$  se trouve amélioré quand l'enzyme est ajoutée au mélange contribuant ainsi à renforcer la valeur nutritionnelle des sauces résultantes (qui se retrouve supérieure à la majorité des sauces commerciales étudiées ici).

L'analyse du profil moléculaire peptidique des sauces révèle que celles-ci sont dépourvues de composés de poids moléculaire supérieurs à 2500Da et confirment donc que l'enzyme Protex 51FP n'est plus présente dans les mélanges après 6 mois de maturation. Ce résultat est d'importance, car il s'avère que l'enzyme ne doit pas être inactivée dans le produit final et que son utilisation relèvera du règlement des auxiliaires technologiques (non-obligation de la mentionner sur l'étiquette du produit final). L'ajout de cette protéase dans le mélange réactionnel a conduit à l'obtention de peptides de taille plus réduite que pour le témoin, certainement par l'action d'une protéolyse plus poussée. Protex 51FP contribue ici également à améliorer la valeur nutritionnelle de la sauce en augmentant sa digestibilité, les petits peptides et acides aminés libres franchissant plus aisément la barrière intestinale que les gros.

Pour finir, l'évaluation sensorielle des sauces de poisson expérimentales a été réalisée. Globalement pour tous les critères, le panel de goûteurs a jugé ces sauces comme étant de qualité moindre que la sauce de 1<sup>ère</sup> catégorie utilisée comme référence. Ainsi ces sauces sont apparues plus brunes et foncées sans présenter la couleur rougeâtre caractéristique du Nuoc mam. L'odeur est apparue globalement moins intense et le goût peu marqué. Ce manque de typicité est certainement dû au temps très court de maturation (6 mois), mais aussi vraisemblablement aux basses températures lors de la fermentation (26°C) et à l'utilisation de contenants non poreux limitant fortement les échanges pourtant nécessaires au développement des arômes caractéristiques de ce type de produit.

En conclusion, l'utilisation de Protex 51FP comme auxiliaire technologique dans des procédés de fabrication de sauce de poisson de type Nuoc mam s'avère très intéressante à plus d'un titre. Le temps de production est notablement réduit, les rendements de production sont augmentés et la valeur nutritionnelle des produits est non seulement conservée, mais améliorée. Les qualités sensorielles de ce type de produit doivent cependant être renforcées et améliorées afin de retrouver la typicité des sauces de poisson. Il conviendrait pour cela d'étendre la phase de maturation au-delà des 6 mois, de la réaliser dans des contenants poreux tel que cela est usuellement pratiqué et si possible de la conduire lorsque la température ambiante est plus élevée (entre avril et septembre par exemple).

Chaque année, au Vietnam, ce sont plusieurs centaines de milliers de tonnes de poisson qui sont convertis en sauce de type Nuoc mam selon le procédé traditionnel. L'utilisation d'une telle enzyme permettrait d'augmenter les rendements de production et de raccourcir notablement la phase de maturation sans bouleverser les pratiques en vigueur. Les produits ainsi obtenus conserveraient les propriétés nutritionnelles et gustatives qui font la renommée des sauces de poissons vietnamiennes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achinewhu S.C. and Oboh C.A. (2002). Chemical, Microbiological, and Sensory Properties of Fermented Fish Products from *Sardinella* sp. in Nigeria. *J. Aqua. Food Pro. Techno.*, 11(2), 53 – 59.
- Achinewhu S.C., Amadi E.N., Barimalaa I.S. and Eke J. (2004). Microbiology of Naturally Fermented Fish (*Sardinella* sp.). *J. Aqua. Food Pro. Techno.* 13 (1), 47-53
- Adler-Nissen J. (1976). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1256- 1262.
- Akolkar A.V., Durai D. and Desai A.J. (2010). *Halobacterium* sp. SP1 (1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. *J. Appli. Microbi.*, 109, 44–53.
- An H., Weerasinghe V., Seymour T.A. and Morrissey M.T. (1994). Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. *J. Food Sci.* 59(5), 1013-1017.
- Anihouvi V.B., Sakyi-Dawson E., Ayernor G.S. and Hounhouigan J.D. (2007). Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for lanhouin production, *Inter. J. Food Microbi.*, 116, 287 – 291.
- Aquerreta Y., Astiasarán I. and Bello J. (2001). Use of exogenous enzymes to elaborate the Roman fish sauce ‘garum’. *J. Sci. Food and Agri.*, 82, 107-112.
- Ásgeirsson B., Fox J.W. and Bjarnason J.B. (1989). Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm gadus morhua. *Eur. J. Biochem.*, 180, 85–94.
- Aspmoa S.I, Horn S.J and Eijsink V.G.H. (2005). Enzymatic Hydrolysis of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Viscera. *Proce. Biochem.*, 40 (5), 1957- 1966.
- Ayumi F., Yasuyuki H., Kei-ichi S., Ken-ji Y., Masataka S. and Masataka S. (2014). Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus epidermidis* TYH1 isolated from Japanese fish-miso. *Fish Sci.*, 80, 93–101
- Batista I., Ramos C., Mendonça R. and Nunes M.L. (2009). Enzymatic Hydrolysis of Sardine (*Sardina pilchardus*) By-products and Lipid Recovery. *J. Aqua. Food Prod. Technolo.*,

18, 120–134.

- Beddows C.G. (1985). Fermented fish and fish products. In *Microbiology of Fermented Foods*, 2, 1-39.
- Beddows C.G. and Ardeshir A.A. (1979a). The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. No I. The use of added enzymes. *J. Food Technol.*, 14, 603-612.
- Beddows C.G. and Ardeshir A.A. (1979b). The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. No II. The use of acids at ambient temperature. *J. Food Technol.*, 14, 613-623.
- Beddows C.G., Ardeshir A.A. and Bin Daud W.J. (1979). Biochemical Changes occurring during the manufacture of budu. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 1097-1103.
- Beddows C.G., Ardeshir, A.A. and Bin Daud W.J. (1980). Development and origin of the volatile fatty acids in budu. *J. Sei. Food Agric.*, 31, 86-92.
- Bersamin S.V and Napudan R.S.J. (1962). Preliminary studies on the comparative chemical composition of the different commercial brands of ‘patis’ in the Philippines, *Proc. Indopacif. Fish. Coun*, 9 (2), 105.
- Bougatef A., Balti R., Nasri R., Souissi N., Barkia A. and Nasri M. (2010). Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: smooth hound (*Mustelus mustelus*). *J. Agric. Food Chem.* 58, 5763 - 5769.
- Boury M. (1952). Les hydrolysats de poisson. Un rapport présenté au Congrès des Pêches dans l'Union Française d'Oulre-Mer, Inspecteur général à l'Office des Pêches Maritimes
- Brillantes S., Paknoi S. and Totakien A. (2002). Histamine Formation in Fish Sauce Production. *J. Food Sci.*, 67(6), 2090–2094.
- Castillo-Yanez F.J., Pacheco-Aguilar R., Garcia-Carreno F.L., Navarrete-Del Toro M., Felix Lopez M. (2006). Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chem.*, 99, 252–259

- Castro-Ceseña A.B, Sánchez-Saavedra M.D. and Márquez-Rocha F.J. (2012). Characterization and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food Chemistry*, 135, 583–589
- Chaveesuk R., James P. Smith & Benjamin K. S. (1994). Production of Fish Sauce and Acceleration of Sauce Fermentation Using Proteolytic Enzymes. *J. of Aquatic Food Prod. Technolo.*, 2 (3), 59-77.
- Chaveesuk R., Smith J.P. and Simpson B.K. (1993). Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. *J. of Aquatic Food Prod. Technolo.*, 2(3), 59-77.
- Chayovan S., Rao R.M., Liuzzo J.A. and Khan M.A. (1983a). Fatty acids and sensory acceptance of a dietary sodium-potassium fish sauce. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 14-17.
- Chayovan S., Rao R.M., Liuzzo J.A. and Khan M.A. (1983b). Chemical characterization and sensory evaluation of a dietary sodium-potassium fish sauce. *J. Agrie. Food Chem.*, 31, 859-863.
- Chong A.S.C., Hashim R., Chow-Yang L. and Ali A.B. (2002). Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquacul.*, 203, 321- 333.
- Choorit W. and Prasertsan P. (1992). Characterization of proteases produced by newly isolated and identified proteolytic microorganisms from fermented fish (Budu). *World J. Microbi. and Biotechno.*, 8, 284-286.
- Codex Stan 302-2011 (2011). Standard for fish sauce.
- Dagoon J. (2000). Agriculture and Fishery technology III. Rex Bookstore. Inc. pp. 242–243. ISBN 978-971-23-2822-0.
- Del-Rosario R.R., and Maldo S.M. (1984). Biochemistry of “patis” formation 1. Activity of cathepsins in “patis” hydrolysates. *Philippine Agriculturist*, 67, 167–175.
- Dimes L.E., Garcia-Carreno F.L. and Haard N.F. (1994). Estimation of protein digestibility: III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comparative Bioch. and Physiol.*, 109, 349-360.

- Dissaraphong, S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura (2006). The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. *Bioresource Technolo.*, 97, 2032–2040
- Dumay J., Donnay-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P. and Bergé J.P. (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochem.*, 41, 2327–2332,
- FAO, (1971). Rapports sur les pêches, no 100
- FAO, (1990). Utilization of tropical foods : animal products : compendium on technological and nutritional aspects of processing and utilization of tropical foods, both animal and plant, for purposes of training and field reference. FAO, Food and nutrition paper 47/8.
- Finne G. (1992). Non-protein nitrogen compounds in fish and shellfish. In: Flick JG, Martin RE, editors. Advances in seafood biochemistry, composition and quality. Lancaster, Pa., *Technomic Publishing.*, 393-401.
- Folch J., Lees M. and Sloane Stanley G.H. (1957). A Simple Method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. 497-509
- Frans G. I. and Yoshiyuki O. (1995). Amino Acid Compositions of Bakasang, A Traditional Fermented Fish Sauce from Indonesia. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technol.*, 28, 236-237
- Frans G.I and Yoshiyuki O. (1996). Physicochemical and Microbiological Changes Associated with Bakasang Processing - A Traditional Indonesian Fermented Fish Sauce. *J. Sc. Food Agric.*, 71, 69-74.
- Fukami K., Funatsu Y., Kawasaki K. and Watabe S. (2004). Improvement of Fish-sauce Odor by Treatment with Bacteria Isolated from the Fish-sauce Mush (*Moromi*) Made from Frigate Mackerel. *J. Food Sci.*, 69 (2), 45 – 49.

- Fukami K., Ishiyama S., Yaguramaki H., Masuzawa T., Nabeta Y., Endo K. and Shimoda M. (2002). Identification of Distinctive Volatile Compounds in Fish Sauce. *J. Agricul. Food and Chemi.*, 50, 5412-5416.
- Garcia-Carreno F.C. and Haard N.F. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.*, 17, 97-113.
- Gildberg A. and Thongthai C. (2001). The effect of reduced salt content and addition of halophilic Lactic acid bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat. *Aquatic Food Product Techno.*, 10, 77-88.
- Gildberg A. (2001). Utilization of male Arctic capelin and Atlantic cod intestines for fish sauce production-evaluation of fermentation conditions. *Bioresource Technol.*, 76, 119-123.
- Gildberg A., Espejo-Hermes E. and Orejana F.M. (1984). Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. *J. Sei. Food Agric.*, 35, 1363-1369.
- Gildberg A., Olsen R.L. and Bjannasson J.B. (1990). Catalytic properties and chemical composition of pepsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology.*, 69, 323-330.
- Goodwin J.F. (1968). The colorimetric estimation of plasma amino nitrogen with DNFB. *Clinical Chem.*, 14: 1080-90.
- Guevara G., Matias V.C. and Delta-Pena P.O. (1972). Fish fermentation with the use of papain, Philipp. *J. Fish.*, 10, 30-38.
- Guo H., Kouzuma Y. and Yonekura M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chem.*, 113, 238-245.
- Haard N.F. (1994). Protein hydrolysis in seafoods. In *Seafood chemistry. Processing Technology and Quality*, F. Shahidi and J.R. Botta, editors. Chapman & Hall, New York, 10- 33.
- Hamm W.S. and Clague J.A. (1950). Temperature and salt purity effects on the manufacture of fish paste and sauce. Research Report No.24. Fish and Wildlife Service, U.S. Dept. of Interior.



- Hariono I., Yeap S.E., Kok T.N. and Ang G.T. (2005). Use of Koji and proteqse in fish sauce fermentation. *Singapore J. Pri. Ind.* 32: 19-29.
- Hathwar S.C., Bijinu B., Rai A.K. and Narayan B. (2011). Simultaneous Recovery of Lipids and Proteins by Enzymatic Hydrolysis of Fish Industry Waste Using Different Commercial Proteases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 164, 115–124.
- Ijong F.G. and Ohta Y. (1996). Physicochemical and microbiological changes associated with bakasang processing, a traditional Indonesian fermented fish sauce. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 69-74.
- Ing-Lung S., Lien-Guei C., Ton-Shi Y., Wen-Teish C. and San-Lang W. (2003). Microbial reclamation of fish processing wastes for the production of fish sauce. *Enzyme and Microbial Technol.*, 33, 154–162.
- Ishida M., Niizeki S. and Nagayama F. (1994). Thermostable proteinase in salted anchovy muscle. *J. Food Sci.*, 59, 781–785.
- Jae-Hyung M. and Han-Joon H. (2009). Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). *Food Chemistry*, 114, 168–173.
- Jesebel R.B. and Erlinda I.D. (2012). Influence of Salt Concentration on Histamine Formation in Fermented Tuna Viscera (*Dayok*). *Food and Nutrition Sci.*, 3, 201-206
- Jia J., Zhou Y., Lu J., Chen A., Li Y. and Zheng G. (2010). Enzymatic hydrolysis of Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. *J. Sci. Food Agric.*, 90, 635–640.
- Jodidi S. L. (1926). The Formol Titration of Certain Amino Acids. *J. American Chemical Society*, 48 (3), 751–753.
- Jung-Nim P., Yuki F., Eriko F., Tadayoshi T., Takuya W., Soichiro O., Tetsuji S., Katsuko W.e and Hiroki A. (1999). Chemical Composition of Fish Sauces Produced in Southeast and East Asian Countries. *J. of food compos. and analys.* 14, 113 -125

- Jung-Nim P., Yuki F., Eriko F., Tadayoshi T., Takuya W., Soichiro O., Tetsuji S., Katsuko W. and Hiroki A. (2001). Chemical Composition of Fish Sauces Produced in Southeast and East Asian Countries, *J. Food Compos. And analy.*, 14, 113 -125.
- Jung-Nim, P., Takehiko, W., Ken-ichi, E., Katsuko W. and Hiroki A. (2002). Taste-active components in a Vietnamese fish sauce. *Fisheries Sci.*, 68, 913–920.
- Kang I.S. and Lanier T.C. (2000). Heat-induced softening of surimi gels by proteinases. In: Park JW, editor. Surimi and surimi seafood. New York: Marcel Dekker. 445-74
- Kaoru I., Sadao N., Ken K., Kiwamu S. and Toshihide N. (2006). Comparison of Characteristics of Fermented Salmon Fish Sauce Using Wheat Gluten Koji with those Using Soy Sauce Koji. *Food Sci. Technol. Res.*, 12 (3), 206-212.
- Kawashima K and Yamanaka H. (1996). Free amino acids responsible for the browning of cooked scallop adductor muscle. *Fisheries Sci.*, 62(2), 293-296.
- Kechaou E.S., Dumay J., Donnay-Moreno C., Jaouen P., Gouygou J.P., Bergé J.P. (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. Bioeng.*, 107, 158–164.
- Kechaou E.S., Jaouen P., Amar R.B., Bergé J.P. (2012). Influence of hydrolysis time on protein recovery and amino acid composition of hydrolysates from *Sepia officinalis* viscera. *Sci. Research Reporter*, 2 (2), 115-129.
- Kilinc B., Cakli S., Tolasa S., Dincer T. (2006). Chemical, microbiological and sensory changes associated with fish sauce processing. *Eur Food Res. Technol.*, 222, 604-613.
- Kim J.H, Ahn H.J, Yook H.S., Kim K.S, Rhee M.S., Ryu G.H. and Byun M.W. (2004). Color, flavor, and sensory characteristics of gamma-irradiated salted and fermented anchovy sauce. *Radiation Physics and Chemi.*, 69, 179–187.
- Klomklao S., Benjakul S. and Visessanguan W. (2004). Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. *J. Food Biochem.*, 28, 355-372.

- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. and Simpson B.K. (2006b). Proteolytic degradation of sardine (*Sardinella gibbosa*) proteins by trypsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. *Food Chem.*, 98, 14–22.
- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. and Simpson B.K. (2006a). Purification and characterization of trypsin from the spleen of tonggol tuna (*Thunnus tonggol*). *J. Agric. Food Chem.*, 54, 5617 – 5622.
- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., Simpson B.K. and Saeki H. (2006). Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnusalbacores*) spleen: Purification and characterization. *Comparative Biochem. and Physiol.*, 144, 47–56.
- Klomklao S., Kishimura H. and Benjakul S. (2008). Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chem.*, 107, 213–220.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Benjamin K. S. (2006c). 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.
- Lafont R. (1950). L'industrie du Nuoc Mam au Cambodge. Bulletin Economique Reprint: Saigon
- Lee E.H. and Sung N.J. (1977). The taste compounds of fermented squid. *Korean J. Food Sei. Teehnol.*, 9, 255-263.
- Liaset B., Julshamn K. and Espe M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex TM. *Process Biochem.*, 38 (12), 1747-1759.
- Ling G., Kyeung H.C. and Jong-Hoon L. (2011). Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol.*, 28, 101-113.
- Lopetcharat K., Choi Y.J., Park J.W. and Daeschel M.D. (2001). Fish sauce products and manufacturing – a review. *Food Reviews International*, 17(1), 65–88.

- Lopetcharat, K. and Park, J. W. (2002). Characteristics of Fish Sauce Made from Pacific Whiting and Surimi By-products During Fermentation Stage. *Food Chem. and Toxicol.*, 76 (2), 511-516.
- Mahmoudreza O., Rasco B., Setareh G.S., Maryam M., Sanaz G. and Mahrokh N. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *J. Sci. Food Agric.*, 93, 1718–1726.
- Majumdar R.K. and Basu S. (2010). Characterization of the traditional fermented fish product *Lona ilish* of Northeast India. *Indian J of Traditional Knowledge*, 9 (3), 453-458.
- Martínez-Montaña E., Peña E., Focken U., Viana M.T. (2010). Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): In vitro uptake of amino acids using hydrolysed sardine muscle at three different concentrations. *Aquacul.*, 299, 134–139
- McIver R.C., Brooks R.I. and Reineccius G.A. (1982). Flavor of fermented fish sauce. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 1017-1020.
- Miyazawa K., Van Le C., Ito K. and Matsumoto F. (1979). Studies on fish sauce. *J. Fac. Appl. Biol. SeL, Hiroshima Univ.*, 18, 55-63.
- Murayama S., Calvez D.L. and Nitayachin P. (1962). Study on the production of fish sauce-I Effect of commercial proteolytic enzyme on the production of fish sauce. *Bull. Tokai. Reg. Fish. Lab.*, 32, 155-162.
- Nakano T., Watanabe H., Hata M., Qua D.V. and Miura T. (1986). An application of protease produced by a moderately; lalophilic marine bacterium to fish sauce processing. *Bull. Jpn. Soc. Sei. Fis.*, 52, 1581-1587.
- Nielsen P.M. (1997). Functionality of protein hydrolysates. In: Damodaran S, Paraf A, editors. Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker Inc. 443-472
- Noda M. and Murakami, K. (1981). Studies on proteinases from the digestive organs of sardine-II, Purification and characterization of two acid proteinases from the stomach. *Biochimicaet Biophysica Acta.*, 658, 27–34.

- Noda M., Vo Van T., Kusakabe I. and Murakami K. (1982). Substrate specificity and salt inhibition of five proteinases isolated from the pyrolic caeca and stomach of sardine. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1565-1569.
- Ok T., Matsukura T., Ooshiro Z., Hayashi S. and Itakura T. (1982). Study on the use of halophilic bacteria in production of fish sauce. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 29, 623-627.
- Ooshiro Z., Ok T., Une H., Hayashi S. and Itakura T. (1981). Study on use of commercial proteolytic enzymes in production of fish sauce. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 30, 383-394.
- Orejana F.M. (1983). Fermented fish products. In Handbook of Tropical Foods. Harvey, T. and Chan, J.R. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 255-295.
- Orejana F.M. and Liston J. (1981). Agents of proteolysis and its inhibition in patis (fish sauce) fermentation. *J. Food Sci.*, 47, 198-203.
- Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S., & Nemati, M. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *J. Sci Food and Agriculture*, 93(7), 1718-1726.
- Paulsen M.T., Næs T., Ueland Ø., Rukke E.O. (2013). Food Quality and Herslent M. Preference mapping of salmon–sauce combinations: The influence of temporal properties. *Food Quality and Prefere.*, 27, 120–127.
- Quaglia G.B. and E. Orban (1987). Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*sardina pilchardus*) by commercial proteases. *J. Sci. Food Agric.*, 38 (3), 263–269.
- Raksakulthai N., Lee Y.Z. and Haard N.F. (1986). Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce from male capelin *Mal/orus villosus*. *Cano Inst. Food Sci. Technol. J.*, 19, 28-33
- Rao S.G.N. (1967). Fish processing in the Indo-Pacific area. Regional Studir.s No.4. FAO Regional Office for the Asia and Far East, Bangkok, Thailand.

- Ravallec-Plé R., Gilmartin L., Van Wormhoudt A. and Le Gal Y. (2000). Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus mohrua*) muscle. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 2176–2180.
- Ravipim, C., James P. Smith & Benjamin K. S. (1993). Production of Fish Sauce and Acceleration of Sauce Fermentation Using Proteolytic Enzymes. *J. Aquatic Food Product Technol.*, 2 (3), 59-77.
- Rodtong S., Nawong S. and Yongsawatdiul J. (2005). Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Microbiol.*, 22, 475-483.
- Saisithi P (1994). Traditional fermented fish: fish sauce production. In: Martin AM, editor. Fisheries processing biotechnological application. London: Chapman and Hall, 111–131
- Saisithi P., Kasemsarn B., Liston J. and Dollar A.M. (1966). Microbiology and chemistry of fermented fish. *J. Fond Sci.*, 31, 105-110.
- Sanceda N. G., Suzuki E. and Kurata T. (2001). Development of normal and branched chain volatile fatty acids during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. *J. Sci. Food and Agricul.*, 81, 1013 – 1018.
- Sanceda N.G., Kurata T. and Arakawa N. (1983). Volatile compounds in the acidic fraction of the steam distillate of Philippine fish sauce (patis), *Phil. Agr.*, 66, 176-182.
- Sanceda N.G., Kurata T. and Arakawa N. (1984). Fractionation and distillation of volatile compounds in patis, a Philippine fish sauce. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 3047-3052.
- Sanceda N.G., Kurata T. and Arakawa N. (1986). Formation of volatile acids in the various stages of fish sauce fermentation. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 33, 285-290.
- Sanceda N.G., Suzuki E. and Kurata T. (1999). Formation of Volatile Acids During Fermentation of Fish Sauce. *Flavor Chemi. Ethnic Foods*, 41-53.
- Sanchez P.C. (2008). Philippine fermented foods: principles and technology. UP Press., 424.
- Sankar T.V, Anandan R, Suseela Mathew, Asha K.K, Lakshmanan P.T, Jones Varkey, Aneesh P.A and Mohanty B.P (2013). Chemical composition and nutritional value of Anchovy (*Stolephorus commersonii*) caught from Kerala coast, India. *European J. Experim. Biol.*,

3(1), 85-89.

- Shahidi F., Han X.Q. and Synowiecki J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemi.*, 53, 285- 293.
- Simpson B.K. (2000). Digestive proteinases from marine animals. In *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, N.F. Haard and B.K. Simpson, editors. Marcel Dekker, New York., 531-540.
- Simpson B.K. (2000). Digestive proteinases from marine animals. In *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, N.F. Haard and B.K. Simpson, editors. Marcel Dekker, New York., 531-540.
- Siringan P., Raksakulthai N. and Yongsawatdigul J. (2006a). Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Chemi.*, 98, 678–684.
- Siringan P., Raksakulthai N. and Yongsawatdigul J. (2006b). Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus* spp.) during fish sauce fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 1970–1976.
- Šližytė R., Daukšas E., Falch E., Storrø I., Rustad T. (2005). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemi.*, 40, 2021–2033.
- Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y. and Nasri M. (2007). Biochemical and Functional Properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) By-Product Hydrolysates. *Food Technol. Biotechnol.*, 45 (2), 187–194.
- Stauffer C.E. (1989). *Enzyme assays for food scientists*. New York: Van Nostrand Reinhold. p 317.
- Taira W., Funatsu Y., Satomi M., Takano T. and Abe H. (2007). Changes in extractive components and microbial proliferation during fermentation of fish sauce from underutilized fish species and quality of final. *Fisheries Sci.*, 73, 913–923
- TCVN 5107 (2003). Nuoc-mam, Ha Noi, Vietnam, 11pp.

- Torrissen K.R. (1984). Characterization of proteases in the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 77, 669-674.
- Toyokawa Y., Takahara H., Reungsang A., Fukuta M., Hachimine Y., Tachibana S. and Yasuda M. (2010). Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 1867–1875.
- Tungkawachara S., Park J.W. and Choi Y. J (2003) Biochemical Properties and Consumer Acceptance of Pacific Whiting Fish Sauce. *J of food science*, 68 (3), 2003.
- Udomsil N., Rodtong S., Choi Y. J, Hua Y. and Yongsawatdigul J. (2011). Use of *Tetragenococcus halophilus* as a Starter Culture for Flavor Improvement in Fish Sauce Fermentation. *J. Agricul. and Food Chem.*, 59, 8401–8408.
- Uhe B., Schuhmann W., Janker G., Schmidt H.L., Janata J. (1995). Enzyme chronopotentiometry. *Electroanalysis*, 6 (7), 543-552.
- Vo Van T., Kusakabe I. and Murakami K. (1983). Purification and some properties of two aminopeptidase from sardine, *Agrie. Biol. Chem.*, 47, 2453-2459.
- Wachirattanapongmetee K., Thawornchinsombut S., Pitirit T., Yongsawatdigul J., Park J.W. (2009) Functional properties of protein hydrolysates prepared from alkali-aided protein extraction of hybrid catfish frame. *Trends Research in Science and Technology*, 1, 71-81.
- Wade L.G. (1991). Amines In: *Organic Chemistry*. 2de Ed. New Jersey. Prentice-Hall. 823-878
- Wichaphon J., Thongthai C., Assavanig A. and Lertsiri S. (2011). Volatile aroma components of Thai fish sauce in relation to product categorization. *Flavour and Fragrance J.* 27 (2), 149–156.
- Xu W., Yu G., Xue C., Xue Y. and Ren Y. (2008). Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce. *Food Chemi.*, 107, 1597–1604.



- Yongsawatdigul J., Choi Y. S. and Udornporn S., (2004). Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J. Food Sci.*, 69 (4), 312–319.
- Yongsawatdigul J., Rodtong S., Raksakulthai N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *J. Food Sci.*, 72 (9) 382-390.
- Yoshikawa S., Kurihara H., Kawai Y., Yamazaki K., Tanaka A., Nishikiori T. and Ohta T. (2010a). Effect of Halotolerant Starter Microorganisms on Chemical Characteristics of Fermented Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Sauce. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 6410–6417
- Yoshikawa S., Yasokawa D., Nagashima K., Yamazaki K., Kurihara H., Ohta T. and Kawai Y. (2010b). Microbiota during fermentation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) sauce mash inoculated with halotolerant microbial starters: Analyses using the plate count method and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.*, 27, 509-514.
- Yoshinaka, R., Sato, M., Tsuchiya, N. and Ikeda, S. (1983). Production of fish sauce from sardine by utilization of its visceral enzymes. *Bull. Jpn. Soc. Sei. Fish.* 49,463- 469.
- Youngsawatdigul J., Rodtong S. and Raksakulyhai N. (2007). Acceleration of Thai Fish Sauce Fermentation Using proteases and Bacterial Starter Cultures. *J. Food Sci.*, 72 (9), 382-390.
- Yuen S.K, Fook C. Yee and Anton A. (2009). Microbiological characterization of Bubu indigenous Malaysian fish sauce. *Borneo sci.*, 24, 25-35.
- Zaman M.Z, Bakar F.A., Selamat J., Bakar J., Ang S.S. and Chong C.Y. (2014). Degradation of histamine by the halotolerant *Staphylococcus carnosus* FS19 isolate obtained from fish sauce. *Food Control*, 40, 58 – 63.
- Zaman M.Z., Bakar F.A., Jinap S. and Bakar J. (2011). Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *Inter. J. Food Microbiol.*, 145, 84 – 91.
- Zentaro, O., Taing, O., Toshiyuki, M., Seiichi, H. & Takao, I. (1982). Growth Characteristics and Enzyme Activities of Halophilic Bacteria Isolated from Fish Sauce. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 31, 251-257.

## **Résumé**

Les sauces de poisson sont un aliment traditionnel dans la plupart des pays d'Asie. Quel que soit le mode de fabrication, le principe reste le même à savoir une autolyse du poisson en présence de sel suivie par une phase de fermentation. Pas moins de 18 mois sont nécessaires pour obtenir le produit final à savoir une sauce brune très salée et très riche en acides aminés. Ce travail de thèse vise à déterminer si un apport en protéases peut accélérer le procédé sans altérer les caractéristiques sensorielles et nutritionnelles de la sauce. Le premier chapitre présente les caractéristiques des sauces de poisson et les paramètres clés des procédés utilisés. Dans le deuxième chapitre, plusieurs protéases industrielles sont comparées entre elles pour leur capacité à liquéfier du poisson en condition hyper salines. Les cinétiques de protéolyse et les caractéristiques biochimiques des hydrolysats résultants sont ensuite établies permettant une hiérarchisation des protéases étudiées. Dans le dernier chapitre de ce mémoire, une étude comparative est menée sur la production de sauce d'anchois avec ou sans apport de l'enzyme Protex 51FP sélectionnée comme étant la plus performante. Il ressort que l'ajout d'une telle protéase augmente les rendements de production et contribue à améliorer plusieurs paramètres qualitatifs tels les teneurs en azote total et azote aminée et conduit à la formation de peptides de taille plus réduite. Cette étude confirme donc que malgré un milieu hyper-salin, des protéases industrielles peuvent faciliter la liquéfaction des matières premières et donc réduire considérablement le temps de production des sauces de poisson traditionnelles

**Mots clés** : Sauce de poisson, Hydrolyse, Enzyme, Protéase, Sardine, Anchois

## **Abstract**

Fish sauces are traditionally used in most Asian countries. Whatever the process, the principle is the same i.e. a fish autolysis in saline media followed by a fermentation step. Not less than 18 months are needed to obtain a brown liquid rich in salt and amino acids. This PhD work aims to determine if an addition of proteases can speed up the process while keeping the nutritional and sensorial properties. The first chapter presents the characteristics of fish sauces and the key parameters of the processes used. In the second chapter, several industrial proteases are compared each other for their capacity to liquefy the fishes in hyper saline conditions. Kinetics of proteolysis and biochemical characteristics of the resulting hydrolysates are established allowing the ranking of the proteases. In the last chapter, a comparative study is conducted on the production of anchovy sauce with or without an addition of Protex 51FP retained as the most effective enzyme. It appears that addition of such protease increase the production yield and contributes to improve several qualitative parameters such as contents in nitrogen and amino nitrogen and leads to the recovery of smaller peptides. This study confirms that despite a hyper saline media, industrial proteases may help the liquefaction of raw material and thus considerably reduce the duration of the production of traditional fish sauces.

**Key words** : Fish sauce, Hydrolysis, Enzyme, Protease, Sardine, Anchovy