

3rd Meeting of the I.C.E.S. Working Group on Mariculture, Brest, France, May 10-13, 1977.
Actes de Colloques du C.N.E.X.O., 4 : 13-20.

RECHERCHE D'UNE ALIMENTATION ARTIFICIELLE ADAPTEE
A L'ELEVAGE DES STADES LARVAIRES DES POISSONS.
I - COMPARAISON DE QUELQUES TECHNIQUES DESTINEES
A AMELIORER LA STABILITE A L'EAU DES ALIMENTS.

par

François-Joël GATESOUBE et Pierre LUQUET

Avec la collaboration technique de Martine MALAVAL

Laboratoire de Nutrition des Poissons, I.N.R.A. - C.N.R.Z., 78350 Jouy-en-Josas, France.

ABSTRACT.

The aim of the present work is to compare different methods employed for increasing the stability to water of diets used for feeding fish larvae.

The various methods of protection tested are :

- the addition of gelatin to the diet,*
- the encapsulation by synthetic (nylon) or natural (gelatin, zein) polymers,*
- the coating by zein.*

The water stability of the unprotected diet particles is very low : only 3 % of the diets are recovered by filtration after 4 hours in water. The addition of 10 % gelatin improves slightly this stability (13 to 25). While encapsulation with nylon considerably increases the water-standing capacity of diets (56 to 66 %), the best results are obtained with the particles encapsulated using natural polymers (74 to 79 %).

Though coating with zein offers lesser stability (35 %) this method is tentatively retained due : to the ease of operation, to the absence of risks of toxicity or loss of soluble elements during fabrication and also, due to the possibility of incorporating attractant substances.

RESUME.

Le travail présenté a pour objet de comparer différentes méthodes permettant de conférer une meilleure stabilité à l'eau des aliments destinés à l'alimentation des larves des poissons.

Les procédés de protection testés sont l'addition de gélatine au régime, l'encapsulation par des polymères synthétiques (nylon) ou naturels (gélatine, zéine), ainsi que l'enrobage par de la zéine.

La stabilité à l'eau des particules alimentaires non protégées est très faible : seulement 3 % de l'aliment sont récupérés par filtration au bout de 4 heures. L'addition de 10 % de gélatine améliore légèrement cette stabilité (13 à 25 %). Si l'encapsulation par le nylon améliore considérablement la teneur à l'eau des aliments (56 à 66 %), ce sont les procédés d'encapsulation par les polymères naturels qui confèrent les meilleures qualités technologiques aux particules (74 à 79 %).

Bien que l'enrobage à la zéine procure des résultats inférieurs (35 p. 100), cette méthode est provisoirement retenue en raison de sa facilité de mise en oeuvre, de l'absence de risques de toxicité ou de pertes d'éléments solubles en cours de fabrication et de la possibilité d'incorporation de substances appétentes.

INTRODUCTION.

La production intensive de poissons marins implique actuellement la distribution de proies vivantes au cours des stades larvaires. Si des travaux récents (BARAHONA-FERNANDES et GIRIN, 1976 ; METAILLER et GIRIN, 1976) ont permis de réduire la période d'utilisation de telles proies, les tentatives de suppression totale, effectuées depuis longtemps (voir revue de MAY, 1970), se sont généralement soldées par des échecs et ne permettent pas d'envisager, dès à présent, une production de masse. Il semble qu'un des principaux obstacles soit l'altération du milieu provoqué par la dégradation de l'aliment non ingéré qui s'accumule sur le fond des bassins (MAY, 1970 ; ADRON *et al.*, 1974).

Afin de résoudre ce problème, MEYERS *et al.* (1971) ont proposé l'application des techniques de microencapsulation. Les aliments encapsulés sont mieux protégés contre le déliement et, de plus, leur remise en suspension ainsi possible leur confère une meilleure disponibilité ce qui permet de réduire notablement la quantité à distribuer. Il semble, cependant, que les capsules actuellement disponibles ne donnent pas satisfaction (GABBOTT *et al.*, 1975).

C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris le travail faisant l'objet du présent article, qui a pour objectif de comparer différentes techniques d'encapsulation. L'application des techniques retenues à l'alimentation des larves de bar et de sole fera l'objet d'une deuxième publication.

MATERIEL ET METHODES.

Principe général de l'encapsulation.

On réalise une suspension du produit à encapsuler dans un solvant contenant le matériel de la paroi de la future capsule. On provoque ensuite une modification physique ou chimique du milieu afin d'isoler, par précipitation ou polymérisation, ce matériel en une troisième phase qui se dépose, par le jeu des tensions superficielles, à l'interface du solvant et de la phase interne. Les capsules ainsi formées sont durcies et séparées du solvant.

Formulation des régimes.

Les substances encapsulées peuvent indifféremment être de nature liquide ou solide. Cependant, comme la réalisation d'une formule alimentaire complète et équilibrée dans la seule phase interne d'une émulsion est problématique (JONES *et al.*, 1974 ; JONES et GABBOTT, 1976), nous avons utilisé des particules alimentaires solides dont les formules sont rapportées dans le tableau 1.

- L'aliment semi-synthétique P, à base de concentré de protéines de poisson (CPSP 80) et d'amidon de maïs pré-gélatinisé (amigel) renferme environ 60 p. 100 de protéines et 9 p. 100 de lipides.

- L'aliment C, de nature plus complexe, renferme, en outre, de l'autolysat de poisson, de la farine de sang, des levures de distillerie et du germe de blé : ce mélange représente environ 45 p. 100 de protéines et 15 p. 100 de lipides.

.../...

| Dénomination de l'aliment Composant | P | PG | C | CG |
|--|-----|-----|----|----|
| CPSP 80 | 78 | 78 | 30 | 30 |
| Autolysat | - | - | 10 | 10 |
| Farine de sang | - | - | 5 | 5 |
| Levure de distillerie | - | - | 5 | 5 |
| Germe de blé | - | - | 20 | 20 |
| Vitamines ⁽¹⁾ | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Minéraux ⁽²⁾ | 1 | 1 | 2 | 2 |
| Huile de soja | 2,5 | 2,5 | 6 | 6 |
| Huile de foie de morue | 2,5 | 2,5 | 6 | 6 |
| Gélatine | - | 10 | | 10 |
| Amigel. | 14 | 4 | 14 | 4 |

TABLEAU 1 : Composition centésimale des aliments destinés à être encapsulés (g p. 100 g de M.S.).

(1) HALVER, 1969

(2) LUQUET, 1971

Une première variante technologique a consisté en la substitution de 10 p. 100 d'amigel par de la gélatine. Celle-ci a été ajoutée selon le procédé décrit par ADRON et al. (1974) ; la dénomination des aliments correspondants est PG et CG.

Après broyage et tamisage, la fraction granulométrique comprise entre 400 et 630 microns a été retenue pour réaliser les essais d'encapsulation.

Techniques d'encapsulation.

Il existe de très nombreuses techniques d'encapsulation (GUTCHO, 1972 ; NIXON, 1976). Notre choix a été guidé par la nature du polymère constitutif de la paroi qui, compte tenu de l'utilisation à des fins alimentaires, doit, d'une part être non toxique, et d'autre part pouvoir être rompu dans le tube digestif par voie mécanique ou enzymatique.

Encapsulation par un polymère synthétique : le nylon

a) Procédé de CHANG et al., 1966

Cinq grammes de particules PG sont mises en suspension, par agitation constante, dans un bécher contenant 40 ml de chloroforme, 10 ml de cyclohexane et 0,1 ml de Span 80. On ajoute successivement 170 µl de chlorure sébacique, 5 ml d'une solution d'hexaméthylène diamine 0,4 M, d'acide 44' diamino 22' biphenyl disulfurique 0,006 M et de tampon carbonate-bicarbonate de sodium 0,45 M ; après 3 minutes d'agitation, les capsules sont centrifugées et lavées dans une solution à 50 p. 100 de Tween 20, puis rincées trois fois à l'eau. Après lyophilisation, les capsules sont tamisées, la fraction 400-630 étant retenue pour les essais ultérieurs. La dénomination des capsules ainsi élaborées est : aliment PNE.

.../...

b) Procédé de SUZUKI *et al.* (1968)

Dans un bécher de 2 litres, on réalise une suspension d'aliment PG dans 225 ml de chloroforme, 75 ml de cyclohexane et 3 ml de Span 80. Sont ensuite ajoutés successivement, 4 ml d'éther dichloroéthylique et 100 ml de la solution complexe d'héxaméthylène diamine précédemment détaillée. Les centrifugations ont été remplacées par de simples filtrations et la lyophilisation par un séchage aux solvants : après 3 minutes d'agitation, la suspension est lavée par une solution de Tween 20 et d'éthanol 50/50, puis par du chloroforme et enfin par de l'éther diéthylique. L'aliment ainsi obtenu après un séchage rapide à 30° C est broyé et tamisé. La dénomination retenue pour ces capsules est aliment PEE.

Encapsulation par des polymères naturels :

L'exigence d'obtenir une capsule insoluble dans l'eau réduit considérablement le choix quant aux polymères naturels facilement utilisables : ce sont essentiellement des protéines.

a) Encapsulation par la gélatine

La gélatine est le polymère le plus couramment employé ; pour rendre les capsules insolubles, il est nécessaire de les traiter avec un aldéhyde.

Nous avons retenu le procédé de GREEN et SCHLECHER (1957) qui joue sur l'incompatibilité des solutions de gélatine et de gomme arabique : à concentration égale, il existe une dilution limite au-dessus de laquelle il se forme un précipité complexe des deux substances.

Dans la cuve d'un broyeur-mélangeur Stéphan de 25 litres, maintenue à 50° C sous agitation constante, on dissout 125 g de gomme arabique dans 2 litres d'eau ; on met en suspension 1 kg de particules d'aliment P. Une solution de 125 g de gélatine dans 1 litre d'eau à 50° C est alors ajoutée. Pour provoquer l'encapsulation, on dilue lentement avec 10 litres d'eau à 50° C (débit approximatif : 10 ml/sec). On insolubilise les parois de la capsule en ajoutant 200 ml de glutaraldéhyde. La gélatine est durcie en abaissant rapidement la température à 10° C, l'agitation étant maintenue encore pendant 10 minutes. L'ensemble des opérations déjà décrites dure une heure environ. Ensuite, la phase solide est récupérée par centrifugation, lyophilisée et tamisée. L'aliment ainsi obtenu est dénommé : aliment PGE.

b) Encapsulation par la zéine

- Méthode de BRYNKO et BAKAN, 1963

Dans un bécher de 5 litres, on ajoute à 1 350 ml d'eau, soumise à une agitation constante, 50 ml d'une solution de soude 0,3 N. Le pH d'environ 11,5 permet de dissoudre 28 g de zéine. On ajoute ensuite une suspension de 140 g d'aliment PG dans 420 ml de soude 0,3 N (ou dans 500 ml pour l'aliment CG qui est plus acide). Après une dilution lente par 2 380 ml d'eau, le pH est lentement abaissé à 4 par 200 ml d'une solution d'acide acétique à 10 p. 100 en poids. La phase solide est ensuite recueillie par centrifugation et tamisée. Les aliments ainsi préparés sont dénommés : aliments PZH et CZH.

- Utilisation du diagramme de solubilisation dans l'éthanol (MOSSE, 1961)

Dans un bécher de 5 litres, on ajoute lentement 24 g de zéine à 340 ml d'eau et 120 ml d'éthanol à 95° B (soit un degré d'alcool final de l'ordre de 75). On réalise la suspension de 120 g d'aliment PG ou CG, puis on ajoute lentement 3 litres d'eau : le degré alcoolique tombe à environ 25 et l'encapsulation se réalise. Les aliments dénommés PZA ou CZA sont alors centrifugés, lyophilisés puis tamisés.

Enrobage par la zéine et le gluten de maïs :

Les propriétés de solubilité de la zéine dans l'alcool permettent, en outre, de procéder à un simple enrobage : 10 g de zéine sont dissous dans 25 ml d'alcool à 60° B. Cette solution est mélangée lentement à 90 g d'aliment P ou G ; les particules enrobées sont grossièrement désagrégées, puis séchées à l'étuve à 30° C (aliments PZR et CZR).

Un procédé dérivé du précédent consiste à placer une enceinte fermée sous agitation constante à 55° C pendant une heure, 10 g de farine de gluten de maïs, tamisée à 200 µ. Après refroidissement, cette solution alcoolique permet de procéder à l'enrobage de la même façon qu'avec la solution de zéine ainsi que décrit précédemment (aliments PGR, CGR).

Méthode de mesure de la stabilité à l'eau des aliments.

La mesure de la stabilité à l'eau des aliments a été effectuée de façon suivante : 1 g d'échantillon, de granulométrie comprise entre 400 et 630 µ est placé dans un erlenmeyer contenant 50 ml d'eau de mer. L'erlenmeyer est soumis, pendant 4 heures, à une agitation permanente sous la forme de déplacements linéaires de 4 cm alternatifs à la fréquence de 90 va-et-vient à la minute. Les particules sont ensuite recueillies dans un entonnoir en verre fritté de porosité comprise entre 90 et 150 µ. Ces résultats sont exprimés en grammes de matière sèche restante par 100 g d'aliment sec, sur une moyenne de 4 mesures.

RESULTATS.

Le tableau 2 résume l'ensemble des essais réalisés et les résultats correspondants, quant à la stabilité à l'eau des aliments obtenus.

L'aliment non traité présente une stabilité à l'eau très faible (3 p. 100) quelle que soit la formulation : aliments P ou C.

L'addition de 10 p. 100 de gélatine par dissolution dans l'eau à 50° C améliore sensiblement la stabilité à l'eau, puisqu'au bout de 4 heures, 13 p. 100 (aliment CG) à 25 p. 100 (aliment PG) demeurent encore disponibles. Le dépôt de capsules de polymères synthétiques permet une nouvelle amélioration de la qualité physique recherchée, puisque les valeurs moyennes de 56 p. 100 et 66 p. 100 ont été trouvées respectivement pour les aliments PNE et PEE.

| Code de l'aliment | Traitement | Référence | Stabilité à l'eau g/100 g | Risques prévisibles | |
|-------------------|--|--|---------------------------|---------------------|---------------------------|
| | | | | Toxicité | Parts d'éléments solubles |
| P | Témoin | - | 3 | - | - |
| C | Témoin | - | 3 | - | - |
| PG | [Addition de 10 % de gélatine dissoute dans de l'eau à 50° C | ADRON et al. (1974) | 25 | 0 | 0 |
| CG | | | 13 | 0 | 0 |
| PNE | Encapsulation au nylon | JONES et al. (1974) CHANG et al. (1966) | 56 | ? | + |
| PEE | Encapsulation à partir de l'éther dichloroéthylique | SUZUKI et al. (1968) | 66 | ++ | + |
| PGE | Encapsulation de la gélatine avec tannage au glutaraldéhyde | GREEN et SCHLEICHER (1957) | 74 | + | ++ |
| PZH | [Encapsulation à la zéine (variation de pH) | BRYNKO et BAKAN (1963) | 79 | ? | ++ |
| CZH | | | 79 | | |
| PZA | [Encapsulation à la zéine (solution alcoolique) | MOSSE (1961) | 79 | 0 | +++ |
| CZA | | | 75 | 0 | +++ |
| PZR | [Enrobage à la zéine | MOSSE (1961) | 34 | 0 | 0 |
| CZR | | | 36 | 0 | 0 |
| PCR | [Enrobage au gluten | MOSSE (1961) | 14 | 0 | 0 |
| CCR | | | 21 | 0 | 0 |

TABLEAU 2 : Comparaison des différents procédés utilisés. Résultats des tests de stabilité à l'eau (en g pour 100 g) et estimation des risques (0 risque nul, + existence d'un risque).

Ce sont les miettes encapsulées par précipitation de polymères naturels qui présentent les meilleurs résultats (74 à 79 p. 100). La gélatine et la zéine, quel que soit le mode de précipitation utilisé pour cette dernière, donnent des résultats équivalents.

La technique d'enrobage à la zéine donne encore des résultats satisfaisants (35 p. 100), tandis que la protection réalisée à partir du gluten de maïs est moindre ; elle est cependant équivalente à celle réalisée par le procédé de ADRON *et al.* (1974).

DISCUSSION.

Une des difficultés rencontrées dans cette étude a consisté dans le choix d'une méthode d'estimation de la stabilité à l'eau des particules. D'une part, il n'existe aucune méthode de mesure standardisée, d'autre part, la plupart des tests réalisés, jusqu'à l'heure, l'ont été sur des granulés de plus grande taille et non des miettes de quelques centaines de microns de diamètre.

Le principe en est toujours d'agiter les particules dans de l'eau et de récupérer la fraction qui reste à une taille granulométrique donnée ; le mode et la durée de l'agitation sont très variables : par exemple COMBS et BURROWS (1958) placent les granulés 3 minutes dans un mixer, tandis que FORSTER (1972) les immerge durant 16 heures sur un filet et les agite doucement par des bulles d'air.

La méthode que nous allons utiliser est donc intermédiaire. Le choix de 100 - 150 microns comme taille des particules minimales à retenir lors de la filtration est basé sur le

.../...

fait qu'il s'agit d'une taille de particule susceptible d'être absorbée par les larves de poissons. Quoi qu'il en soit, il faut bien préciser que ce test n'a qu'une valeur comparative, pour permettre de différencier les effets des divers modes de protection des particules. On ne saurait attribuer aux résultats une valeur absolue quant à leur signification biologique.

Le choix définitif d'une méthode devra s'appuyer sur des essais *in vivo*. Cependant, dès à présent, il est possible d'évaluer les risques inhérents à chacune des méthodes utilisées (tableau 2).

La microencapsulation par les polymères de synthèse possède l'avantage de s'effectuer à froid ce qui diminue les risques de dénaturation ou de perte de substances thermolabiles. Par contre, c'est là un risque commun à toutes les méthodes d'encapsulation en milieu liquide, il existe des risques de pertes d'éléments solubles. Deux autres inconvénients méritent également d'être signalés, le coût élevé du chlorure sébacique et la toxicité éventuelle de la méthode d'encapsulation à partir de l'éther dichloréthyle faisant intervenir des lavages aux solvants organiques.

Bien que les polymères naturels utilisés (gélatine et zéine) soient constitués par des protéines alimentaires médiocres, leur rôle nutritionnel doit être mentionné. Si les risques de toxicité sont plus faibles que dans le cas précédent, mis à part le risque dû à l'utilisation du glytaraldéhyde lors du tannage de la gélatine, en revanche, les risques de pertes d'éléments solubles sont très élevés notamment avec la technique d'encapsulation par la zéine en milieu alcoolique.

La technique d'enrobage permet d'éliminer ces risques, elle permet en outre, par son principe même, d'ajouter à la capsule des substances destinées à améliorer l'appétence. C'est donc la méthode d'enrobage que nous avons retenue pour la plupart des essais d'application à l'élevage des larves, essais faisant l'objet d'une publication séparée.

REMERCIEMENTS.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide financière du C.N.E.X.O. (contrat 75-1294). Nous remercions également cet organisme pour les facilités expérimentales qu'il nous a accordées.

BIBLIOGRAPHIE.

- ADRON, J.W., A. BLAIR and C.B. COWEY, 1974. Rearing of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae to metamorphosis using an artificial diet. Fish. Bul., 72 (2) : 353-357.
- BARAHONA-FERNANDES, M.H. et M. GIRIN, 1976. Preliminary tests on the optimal pellet adaptation age for sea bass larvae (*Pisces, Dicentrarchus labrax* L. 1758). Aquaculture, 8 (3) : 283-290.
- BRYNKO, C. and J.A. BAKAN, 1963. US Pat. 3, 116, 206, December 31.

- CHANG, T.M.S., F.C. McINSTOSH and S.C. MASON, 1966. Semi permeable aqueous microcapsules. I.- Preparation and properties. Can J. Physiol. Pharmacol., 44, 115-128.
- COMBS, B.D. and R.E. BURROWS, 1958. An evaluation of bound diets. Prog. Fish. Cult., 124-128.
- FORSTER, J.R.M., 1972. Some methods of binding prawn diets and their effects on growth and assimilation. J. Cons. int. explor. mer., 34 (2) : 200-216.
- GABBOTT, T.A., D.A. JONES, D.H. NICHOLLS, R.W. LANGTON and M.M. HELM, 1975. Studies on the design and acceptability of microcapsulated diets for marine particulate feeders. II.-Bivalve molluscs and fish larvae. Presented at 10th Eur. Symp. Mar. Biol. Ostend, Sept. 1975.
- GREEN, B.K. and L. SCHLEICHER, 1957. U.S. Pat. 2, 800, 457, July 23.
- GUTCHO, M., 1972. Capsule technology and microencapsulation, 369 pp. Noyes Data Corporation, Noyes Building Park Ridge, New-Jersey 07656, U.S.A.
- HALVER, J.E., 1969. In Neuhaus O.W. and HALVER J.E., Fish in Research, 209-232. Academic Press New-York, London.
- JONES, D.A. and P.A. GABBOTT, 1976. In Nixon J.R., Microencapsulation, 77-91, Marcel Dekker Inc., New-York and Basel.
- JONES, D.A., J.G. MUNFORD and P.A. GABBOTT, 1974. Microcapsules as artificial food particles for aquatic filter feeders. Nature, 247 : 233-235.
- LUQUET, P., 1971. Efficacité des protéines en relation avec leur taux d'incorporation dans l'alimentation de la truite arc-en-ciel. Ann. Hydrobiol., 2 (2) : 175-186.
- MAY, R.C., 1970. Feeding larval marine fishes in the laboratory : a review. Calif. Mar. Res. Comm. Calcofi Rep., 14, 76-83.
- MEYERS, S.P., D.P. BUTLER and G.F. SIRINE, 1971. Encapsulation : a new approach to larval feeding. The American Fish Farmer, Jul. 1971, 15-20.
- METAILLER, R. et M. GIRIN. Croissance de jeunes soles (*Solea solea*) nées en laboratoire et conditionnées à l'aliment composé (à paraître).
- MOSSE, J., 1961. Monographie sur une protéine du maïs : la zéine. Ann. Physiol. Veg., 3 (2) : 105-139.
- NIXON, J.R., 1976. Microencapsulation. 215 pp. Marcel Dekker Inc., New-York, and Basel.
- SUZUKI, S., T. KONDO and S.G. MASON, 1968. Studies on microcapsules. I.- Preparation of polyurethane and polyphenolester microcapsules. Chem. pharmacol. Bull., 16 (8) : 1629-1631.