

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

—
ÉCOLE

VÉGÉTAL-ENVIRONNEMENT-NUTRITION-AGRO-ALIMENTAIRE-MER

Année 2009

VALORISATION DE MATIÈRES PREMIÈRES MARINES DE FAIBLE VALEUR AJOUTÉE: APPLICATION AUX CO-PRODUITS DE THON

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Génie des procédés
Spécialité : Biotechnologie

Présentée

et soutenue publiquement par

NGUYEN THI MY HUONG

Le 30 octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Jacques MOREAU, Professeur, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT)

Corine BAYOURTHE, Professeur, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT)

Examineurs

Joël FLEURENCE, Professeur, Université de Nantes

Nathalie BOURGOUGNON, Professeur, Université de Bretagne Sud

Directeur de thèse :

Jean Pascal BERGÉ, Cadre de recherche, Institut Français de Recherche pour Exploitation de la Mer
(IFREMER)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du département des Sciences Techniques et Alimentaires Marines (STAM) de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) de Nantes, en France et à l'Université de Nha Trang, au Vietnam. Cette thèse est le résultat de trois années de recherche avec l'aide de plusieurs personnes que je voudrais remercier.

D'abord, je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur Jean-Pascal Bergé, Directeur de recherche à l'IFREMER, pour m'avoir fait découvrir le domaine de la recherche et pour sa responsabilité scientifique tout au long de ce travail. Ses conseils et son soutien ont contribué à la réalisation de cette thèse.

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

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Jean-Luc Vallet, Directeur du département STAM, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de l'IFREMER.

Je désire exprimer toute ma respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur Jacques Moreau et Madame Corinne Bayourthe, Professeure à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT), pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes et à Madame Nathalie Bourgougnon, Professeure à l'Université de Bretagne Sud pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Cette thèse a été réalisée grâce à un soutien financier de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Je tiens à adresser mes remerciements à cet organisme pour avoir financé la bourse de thèse ayant permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Nguyen Xuan Nam, Directeur de la société de transformation de fruits de la mer au Vietnam, pour sa collaboration et pour nous avoir fourni les co-produits de thon pour cette étude.

Je voudrais particulièrement remercier Monsieur Jean-Paul Gouygou pour son aide dans l'analyse des lipides. Je tiens à remercier Claire Donnay-Moreno de son aide pour la réalisation de nombreuses manipulations. Je remercie également Regis Baron, Christine Chopin, Jean-Yves Ragon, Sandrine Bruzac, Mireille Cardinal, Laetitia Kolypczuk et Sylvie Hurel pour leur aide au cours de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Christine Duffaud et Isabelle Adam pour leur aide. Je voudrais remercier toutes les personnes du centre IFREMER de Nantes pour leur sympathie.

Un merci en particulier à Monsieur le Docteur Le Anh Tuan, à la Faculté d'Aquaculture de l'Université de Nha Trang pour m'avoir donné les conditions nécessaires à l'élevage des crevettes. Je remercie également Monsieur le Docteur Nguyen Hoang Dung de l'Institut Polytechnique de Ho Chi Minh ville pour son aide.

Un grand merci à Monsieur le Docteur Ngo Dang Nghia, Directeur de l'Institut de Biotechnologie Environnementale pour la collaboration de recherche entre l'Institut et la Faculté de Transformation de l'Université de Nha Trang. J'adresse aussi mes sincères remerciements aux professeurs, chercheurs et mes collègues de l'Université de Nha Trang, pour leur aide et leurs encouragements.

Je souhaite remercier Raul Perez Galvez pour son amitié, son aide très précieuse et sa gentillesse. Un grand merci également à tous les thésards de l'IFREMER, Zo Randriamahatody, Khalifa Sylla, Emna Kechaou, Karine Le Roux, Christelle Kouakou et Papa-Abdoulaye Fall pour leur amabilité pendant ces trois années.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
SOMMAIRE.....	3
LISTE DE FIGURES.....	9
LISTE DE TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
NOMS USUELS ET TRIVIAUX DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS PRÉSENTÉS DANS CETTE ETUDE.....	15
INTRODUCTION	16
1. CONTEXTE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE	16
2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	17
CHAPITRE 1. GÉNÉRALITES.....	19
1. PRODUCTION MONDIALE DES PÊCHES ET DE L'AQUACULTURE.....	19
2. THON ET CONSOMMATION DU THON	20
2.1. Thon.....	20
2.2. Consommation du thon.....	21
3. CO-PRODUITS DE POISSON : DEFINITION ET VOIES DE VALORISATION	23
3.1. Définition.....	23
3.2. Différentes voies de valorisation des co-produits de poisson : produits dérivés	24
3.2.1. Farine et huile de poisson	24
3.2.2. Hydrolysats enzymatiques de poisson.....	25
3.2.2.1. Autolysats	26
3.2.2.2. Hétérolysats	26
3.2.3. Hachis congelé.....	31
3.2.4. Arômes	31
3.2.5. Autres produits dérivés à haute valeur ajoutée.....	32
3.2.5.1. Collagène et gélatine	32
3.2.5.2. Chondroïtine sulfate	32
3.2.5.3. Huile riche en acides gras oméga 3	33
3.2.5.4. Lécithine	33
4. HYDROLYSE.....	33
4.1. Hydrolyse chimique.....	34

4.2. Hydrolyse enzymatique	34
4.2.1. Principe de l'hydrolyse enzymatique	34
4.2.2. Paramètres influents sur l'hydrolyse enzymatique.....	35
4.2.2.1. Influence de la température	35
4.2.2.2. Influence du pH	35
4.2.2.3. Influence de la concentration en enzyme	36
4.2.2.4. Influence de la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs	36
5. CREVETTES	36
5.1. Production mondiale de crevettes.....	36
5.2. Besoins nutritionnels des crevettes.....	38
5.2.1. Besoin en protéines.....	38
5.2.2. Besoin en lipides.....	40
5.2.3. Besoin en glucides (hydrates de carbone)	41
5.2.4. Besoin en vitamines.....	42
5.2.5. Besoin en minéraux	43
5.3. Fabrication des aliments destinés aux crevettes	43
6. SAUCE DE POISSON	44
6.1. Introduction	44
6.2. Matières premières utilisées pour la production de sauce de poisson	46
6.3. Hydrolyse des protéines du poisson pendant la production de sauce de poisson.....	47
6.4. Influence de divers facteurs sur l'hydrolyse des protéines et la qualité de la sauce de poisson.....	48
6.4.1. Influence de la matière première	48
6.4.2. Influence de la concentration saline et de la composition du sel employé.....	48
6.4.3. Influence de la température	49
6.4.4. Influence du pH	49
6.5. Composition chimique de la sauce de poisson	49
6.5.1. Substances azotées.....	49
6.5.2. Substances volatiles.....	50
6.5.3. Autres substances	50
CHAPITRE 2. HYDROLYSE de LONGUE DURÉE DE LA TÊTE, LA QUEUE ET LES VISCÈRES DE THON	51
1. INTRODUCTION	51

2. MATERIELS ET METHODES	51
2.1. Matériels biologiques : co-produits de thon	51
2.1.1. Collecte des co-produits de thon	51
2.1.2. Homogénéisation	52
2.2. Matériel enzymatique	52
2.3. Hydrolyse enzymatique des co-produits de thon.....	52
2.4. Analyses biochimiques	53
2.4.1. Dosage de la teneur en eau	53
2.4.2. Dosage de la teneur en cendres.....	53
2.4.3. Analyse des lipides	54
2.4.3.1. Extraction des lipides.....	54
2.4.3.2. Fractionnement des lipides en chromatographie liquide sur colonne.....	55
2.4.3.3. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	56
2.4.4. Analyse des protéines	58
2.4.4.1. Dosage de l'azote total	58
2.4.4.2. Analyse des acides aminés	59
2.4.4.3. Analyse des poids moléculaires des peptides solubles par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	59
2.4.5. Détermination du degré d'hydrolyse de l'hydrolysat	60
2.4.6. Détermination de la récupération de l'azote.....	60
3. RESULTATS ET DISCUSSION	61
3.1. Caractérisation biochimique des co-produits de thon.....	61
3.2. Hydrolyse enzymatique des co-produits de thon.....	61
3.2.1. Degré d'hydrolyse	63
3.2.2. Distribution de la matière sèche dans les fractions obtenues après hydrolyse des co- produits de thon	66
3.2.3. Composition chimique des fractions obtenues après hydrolyse des co-produits de thon	67
3.2.4. Récupération de l'azote dans la fraction soluble	69
3.2.5. Distribution du poids moléculaire des peptides.....	71
3.2.6. Composition en acides aminés dans la fraction soluble obtenue après hydrolyse des têtes de thon	74
3.2.7. Distribution de lipides	76

3.2.8. Distribution des différentes classes de lipides des fractions obtenues après hydrolyse des têtes de thon.....	77
3.2.9. Composition en acides gras des fractions obtenues après hydrolyse des têtes de thon	78
4. CONCLUSION	80
CHAPITRE 3. HYDROLYSE DES TÊTES DE THON ET VALORISATION DES FRACTIONS RÉSULTANTES	82
1. INTRODUCTION	82
2. MATERIELS ET METHODES	83
2.1. Hydrolyse des têtes de thon.....	83
2.2. Production d'hydrolysats de têtes de thon.....	83
2.3. Analyses biochimiques	85
2.3.1. Dosage de la teneur en fibres brutes.....	86
2.3.2. Dosage de la teneur en extraits non azotés	86
2.4. Nutrition animale : alimentation des crevettes	87
2.4.1. Matériel biologique	87
2.4.2. Fabrication d'aliments	87
2.4.2.1. Fabrication de farine de têtes de thon.....	87
2.4.2.2. Formulation des aliments pour les crevettes.....	88
2.4.2.3. Fabrication des aliments pour les crevettes	89
2.4.3. Protocole d'élevage des crevettes.....	91
2.4.4. Détermination de l'efficacité des aliments	92
2.4.4.1. Taux de survie	92
2.4.4.2. Gain de poids.....	93
2.4.4.3. Perte de matière sèche et de protéines brutes des aliments dans l'eau	93
2.4.4.4. Aliment sec consommé (ASC)	93
2.4.4.5. Taux de conversion alimentaire (TCA).....	94
2.4.4.6. Coefficient d'efficacité protéique (CEP).....	94
2.5. Nutrition humaine : sauce de poisson.....	94
2.5.1. Matériel biologique : anchois	94
2.5.2. Protocole expérimental de fabrication de la sauce de poisson	95
2.5.3. Analyses physico-chimiques de la sauce de poisson.....	97
2.5.3.1. Dosage de l'azote total	97

2.5.3.2. Dosage de l'azote formol.....	97
2.5.3.3. Dosage de l'azote ammoniacal	98
2.5.3.4. Dosage de l'azote aminé.....	99
2.5.3.5. Dosage du chlorure de sodium	99
2.5.3.6. Détermination du pH	100
2.5.3.7. Détermination de l'histamine	100
2.5.4. Analyse sensorielle de la sauce de poisson	100
2.5.4.1. Echantillons	100
2.5.4.2. Préparation des échantillons	101
2.5.4.3. Méthode d'étude	101
2.6. Analyses statistiques.....	102
3. RESULTATS ET DISCUSSION	103
3.1. Hydrolyse des têtes de thon.....	103
3.1.1. Degré d'hydrolyse (DH).....	103
3.1.2. Récupération de l'azote dans la fraction soluble	104
3.1.3. Poids moléculaire des peptides dans les hydrolysats des têtes de thon	105
3.2. Nutrition animale : alimentation des crevettes	106
3.2.1. Composition des matières premières utilisées pour la fabrication des aliments ...	109
3.2.2. Ingrédients et composition chimique des aliments pour les crevettes.....	110
3.2.3. Composition en acides aminés des aliments pour les crevettes.....	113
3.2.4. Taux de survie	116
3.2.5. Gain de poids	119
3.2.6. Taux de conversion alimentaire (Indice de consommation).....	123
3.2.7. Coefficient d'efficacité protéique.....	124
3.2.8. Composition chimique de la chair des crevettes	128
3.3. Nutrition humaine : sauce de poisson.....	130
3.3.1. Composition biochimique des anchois.....	130
3.3.2. Evolution de la teneur en azote de la sauce de poisson lors du processus de fermentation.....	130
3.3.2.1. Azote total.....	131
3.3.2.2. Azote aminé.....	133
3.3.2.3. Azote ammoniacal	134
3.3.3. Caractéristiques physico-chimiques de la sauce de poisson.....	136

3.3.4. Composition en acides aminés de la sauce de poisson.....	140
3.3.5. Teneur en histamine de la sauce de poisson.....	144
3.3.6. Qualité sensorielle de la sauce de poisson.....	146
4. CONCLUSION	150
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	152
BIBLIOGRAPHIE.....	155
ANNEXE A	184
ANNEXE B	187
ANNEXE C	190

LISTE DE FIGURES

Figure 1. Production mondiale des pêches et de l'aquaculture (source FAO).....	19
Figure 2. L'utilisation mondiale de farine (a) et d'huile de poisson (b) (Schippe, 2008)	25
Figure 3. Schéma réactionnel de la libération de protons H ⁺ lors de l'hydrolyse enzymatique à pH>6,5	35
Figure 4. Production mondiale de crevettes (Josupeit, 2006).....	37
Figure 5. Carte du Vietnam	45
Figure 6. Sauce de poisson	46
Figure 7. Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) pendant 12 h à 45°C, sans contrôle de pH	63
Figure 8. Distribution de la matière sèche dans les fractions solubles et insolubles pour les têtes (a), viscères (b) et queues (c) de thon non hydrolysées et hydrolysées par Protamex (0,1%) pendant 12 h à 45°C, sans contrôle de pH.....	66
Figure 9. Récupération de l'azote au cours de l'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) pendant 12 h à 45°C, sans contrôle de pH.....	70
Figure 10. Profil de chromatographie des hydrolysats des viscères de thon après hydrolyses avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH	72
Figure 11. Distribution du poids moléculaire des peptides de l'hydrolysats de têtes de thon. L'hydrolyse est conduite avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH	72
Figure 12. Distribution du poids moléculaire des peptides de l'hydrolysats de viscères de thon. L'hydrolyse est conduite avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH	73
Figure 13. Distribution du poids moléculaire des peptides de l'hydrolysats de queues de thon. L'hydrolyse est conduite avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH	73
Figure 14. Distribution des différentes classes de lipides des fractions générées après 12h d'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C sans contrôle de pH	77
Figure 15. Production de poudre protéique soluble et de poudre protéique insoluble	84
Figure 16. Production du mélange de poudre protéique.....	85
Figure 17. Photographie des crevettes (<i>Penaeus vannamei</i>)	87
Figure 18. Procédé de fabrication de farine de têtes de thon.....	88
Figure 19. Processus de fabrication des aliments pour crevettes	90
Figure 20. Bacs d'élevage des crevettes.....	91

Figure 21. Plateau d'alimentation dans le bac d'élevage de crevettes	92
Figure 22. Photographie des anchois (<i>Stolephorus commersonii</i>)	94
Figure 23. Jarres utilisées pour la production du nuoc-mam.....	95
Figure 24. Processus de production du nuoc mam.....	95
Figure 25. Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,5%) pendant 8 h à 45°C, sans contrôle de pH	103
Figure 26. Récupération de l'azote au cours de l'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,5%) pendant 8 h à 45°C, sans contrôle de pH.....	105
Figure 27. Distribution des poids moléculaire des peptides dans les hydrolysats de têtes de thon (%)	106
Figure 28. Taux de survie des crevettes après 6 semaines d'élevage. La valeur du taux de survie est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)	116
Figure 29. Gain de poids relatif des crevettes. La valeur du gain de poids relatif est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$).....	121
Figure 30. Taux de conversion alimentaire chez les crevettes. La valeur du taux de conversion alimentaire est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)	123
Figure 31. Coefficient d'efficacité protéique chez les crevettes. La valeur du coefficient d'efficacité protéique est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$).....	125
Figure 32. Evolution de la teneur en azote total de la sauce de poisson durant la fermentation. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson contenant les hydrolysats de têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement.....	132
Figure 33. Evolution de la teneur en azote aminé de la sauce de poisson durant la fermentation. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson contenant les hydrolysats des têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement.....	133
Figure 34. Evolution de la teneur en azote ammoniacal de la sauce de poisson durant la fermentation. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson contenant les hydrolysats des têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement	135
Figure 35. Profils sensoriels des sauces de poisson	147
Figure 36. Surnageant.....	184

Figure 37. Lyophilisation des surnageants	184
Figure 38. Poudres protéiques solubles	184
Figure 39. Séchage du culot	185
Figure 40. Culot séché.....	185
Figure 41. Broyage du culot séché	185
Figure 42. Poudres protéiques insolubles	186
Figure 43. Mélange de poudres protéiques à partir de l'hydrolyse de tête de thon.....	186
Figure 44. Broyage des têtes de thon.....	187
Figure 45. Cuisson de têtes de thon.....	187
Figure 46. Pressage de têtes de thon cuit.....	187
Figure 47. Gâteau de pressage.....	188
Figure 48. Résidu de pressage avant et après séchage	188
Figure 49. Broyage des résidus de pressage séché	188
Figure 50. Farine de têtes de thon destinée aux crevettes	189
Figure 51. Matières premières utilisées pour la fabrication des aliments pour crevettes.....	190
Figure 52. Mélange de matières premières.....	190
Figure 53. Pressage du mélange	191
Figure 54. Cuisson à la vapeur des aliments	191
Figure 55. Séchage des aliments.....	191
Figure 56. Coupure des aliments	192
Figure 57. Tamisage des aliments	192
Figure 58. Aliments pour les crevettes	192

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1. Consommation mondiale des poissons (source FAO).....	20
Tableau 2. Capture de thon par espèce (1000 tonnes) (source FAO Globefish).....	21
Tableau 3. Exportations vietnamiennes de thon (source : Fisheries Information Center of Vietnam, WPEA OFM, 2009).....	23
Tableau 4. Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse des co-produits marins.....	28
Tableau 5. Teneur optimale en protéines dans l'aliment de certaines espèces de crevettes.....	39
Tableau 6. Teneur en acides aminés essentiels pour la croissance des crevettes.....	40
Tableau 7. Besoin en vitamines chez certaines espèces de crevettes.....	42
Tableau 8. Dénomination de la sauce de poisson selon les pays.....	45
Tableau 9. Solvants utilisés en fonction des classes de lipides en chromatographie liquide sur colonne ouverte.....	56
Tableau 10. Composition biochimique des co-produits de thon (<i>Thunnus albacares</i>).....	61
Tableau 11. Degrés d'hydrolyse maximaux obtenus sur des co-produits marins.....	65
Tableau 12. Composition chimique des fractions solubles et insolubles obtenues après 12h d'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH ...	68
Tableau 13. Composition en acides aminés dans la fraction soluble avant et après protéolyse des têtes de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH.....	75
Tableau 14. Distribution des lipides (% des lipides totaux) dans les fractions obtenues après 12h d'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH ...	76
Tableau 15. Composition en acides gras (% des acides gras totaux) des fractions obtenues après 12h d'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH.....	79
Tableau 16. Sauces de poisson évaluées sensoriellement.....	101
Tableau 17. Effets zootechniques d'une supplémentation de l'aliment aquacole en hydrolysats protéiques.....	108
Tableau 18. Caractéristiques chimiques des matières premières utilisées pour la fabrication d'aliments pour les crevettes.....	109
Tableau 19. Ingrédients des aliments expérimentaux pour les crevettes.....	111
Tableau 20. Composition chimique des aliments expérimentaux pour les crevettes.....	112
Tableau 21. Composition en acides aminés des aliments pour les crevettes.....	114
Tableau 22. Besoins en acides aminés essentiels de <i>Penaeus vannamei</i>	115

Tableau 23. Poids des crevettes avant et après élevage. La valeur du gain de poids absolu est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)	120
Tableau 24. Synthèse des résultats en terme de taux de survie, gain de poids relatif, taux de conversion alimentaire et coefficient d'efficacité protéique par comparaison avec l'aliment commercial AK	127
Tableau 25. Composition chimique de la chair des crevettes en début et en fin d'expérience. Les valeurs moyennes dans le même colonne accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)	128
Tableau 26. Composition chimique des anchois	130
Tableau 27. Caractéristiques physico-chimiques des sauces expérimentales et commerciales. Les valeurs moyennes dans la même colonne accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)	136
Tableau 28. Classification de sauces de poisson	139
Tableau 29. Composition en acides aminés libres de la sauce de poisson	141
Tableau 30. Teneurs en histamine dans la sauce de poisson. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson incorporant les hydrolysats de têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement	145
Tableau 31. Liste de descripteurs utilisés dans l'analyse sensorielle de la sauce de poisson	147

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAE	Acide Aminé Essentiel
AANE	Acide Aminé Non Essentiel
AGMI	Acide Gras Mono-Insaturé
ASC	Aliment Sec Consommé
AGPI	Acide Gras Poly-Insaturé
AGS	Acide Gras Saturé
AU	Anson Unit
AUF	Agence Universitaire de la Francophonie
CEP	Coefficient d'Efficacité Protéique
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
Da	Dalton
DH	Degré d'Hydrolyse
DHA	DocosaHexaenoic Acid
DNFB	DiNitroFluoroBenzene
EMAG	Ester Méthylique d'Acide Gras
ENSAT	Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse
EPA	EicosaPentaenoic Acid
E/S	Enzyme/substrat
FAO	Food and Agriculture Organisation
FID	Flamme ionisation detector (détecteur à ionisation de flamme)
g	Gramme
GL	GlycoLipides
h	Heure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)
IFREMER	Institut Français de recherche pour exploitation de la mer
l	Litre
LAPU	Leucine Amino Peptidase Units
LN	Lipides Neutres
min	Minute
mg	Milligramme
ml	Millilitre
PL	Phospholipides
rpm	Rotation par minute
STAM	Sciences Techniques et Alimentaire Marines
TCA	Taux de Conversion Alimentaire
WPEA OFM	West Pacific East Asia Oceanic Fisheries Management

NOMS USUELS ET TRIVIAUX DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS PRÉSENTÉS DANS CETTE ETUDE

	Nomenclature (acide)	Noms triviaux (acide) ou abréviations
C14 :0	tétradécanoïque	myristique
C15 :0	pentadécanoïque	pentadécylique
C16 :0	hexadécanoïque	palmitique
C17 :0	heptadécanoïque	margarique
C18 :0	octadécanoïque	stéarique
C24 :0	tétracosanoïque	lignocérique
C16 :1 c ω 7	cis-9 hexadécénoïque	palmitoléique
C18 :1 c ω 7	cis-11 octadécénoïque	vaccénique
C18 :1 c ω 9	cis-9 octadécénoïque	oléique
C20 :1 c ω 9	cis-11 eicosénoïque	gadoléique
C22 :1 c ω 9	cis-13 docosénoïque	érucique
C24 :1 c ω 9	cis-15 tétracosénoïque	nervonique
C18 :2 c ω 6	cis-9,12 octadécadiénoïque	linoléique
C18 :3 c ω 3	cis 9,12,15 octadécatriénoïque	linoléinique
C18 :4 c ω 3	cis-6,9,12,15 octadécatétraénoïque	stéaridonique
C20 :4 c ω 6	cis-5,8,11,14 eicosatétraénoïque	arachidonique (AA)
C22 :4 c ω 6	cis-7,10,13,16 docosatétraénoïque	docosatétraénoïque
C20 :5 c ω 3	cis-5,8,11,14,17 eicosapentaénoïque	EPA
C22 :5 c ω 3	cis-7,10,13,16,19 docosapentaénoïque	docosapentaénoïque
C22 :6 c ω 3	cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaénoïque	DHA

INTRODUCTION

1. CONTEXTE GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE

La production mondiale de poissons provenant des pêches et de l'aquaculture a été estimée à 143,6 millions de tonnes en 2006 (FAO, 2008). Une grande partie de ce tonnage fait l'objet d'une transformation pour être ensuite utilisée en alimentation humaine. Ces étapes de transformation génèrent une quantité importante de déchets estimée à 50% du volume total (Je *et al.*, 2007). Malgré leurs qualités intrinsèques, comme par exemple une grande richesse en protéines, très souvent ces déchets ne font l'objet d'aucun traitement spécifique et sont directement rejetés dans l'environnement, entraînant des problèmes de contaminations. Cependant, si certaines précautions sont prises, ces déchets peuvent devenir des co-produits qui se définissent comme étant les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Les co-produits usuels résultant de la transformation des poissons sont : les têtes, viscères, arêtes, queues, nageoires et peaux.

La valorisation de ces co-produits est une problématique de plus en plus actuelle car elle permet de compenser pour partie la raréfaction de la ressource et limite les frais de retraitement des déchets de plus en plus importants et qui le plus souvent sont à la charge de l'entreprise sous forme de taxe d'enlèvement. Les co-produits doivent donc maintenant être considérés comme d'autres sources de matières premières destinées à la production de substances destinées à l'alimentation, la nutrition animale et humaine, la cosmétique et la santé (antioxydants, antistress, anti-hypertensifs, collagènes, pigments...).

Le thon est une des espèces marines les plus importantes économiquement. En 2006, la capture mondiale était d'environ 5 millions de tonnes (Hoang, 2009) dont la quasi-totalité a fait l'objet de processus de transformations en usines (congélation, conserve,...). Les déchets principalement générés pendant ces processus sont considérables : tête, viscères, nageoires, arêtes, queue et reliquat de filetage. Ainsi, Soyiri *et al.*, (2003) ont estimé que, dans les conserveries de thon, de l'ordre de 60-70% du volume de poissons entrant se retrouvent comme déchets après la mise en conserve. Ces déchets de conserverie de thon sont une source de contamination environnementale importante obligeant les industriels à traiter leurs déchets avant de les rejeter. La non récupération et la non valorisation de ces déchets engendrent un coût économique (et environnemental) de plus en plus élevé à la charge des conserveries.

Cependant, au regard de leur composition, ces déchets s'avèrent relativement riches en

protéines, il semble donc intéressant d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines et de voir s'il est possible de les utiliser notamment comme ingrédients dans les produits alimentaires. Actuellement, quelques voies de valorisation de masse des co-produits de poissons existent dont principalement la transformation en farine et huile et la production d'ensilage. Parmi les procédés en émergence, la protéolyse contrôlée par utilisation d'enzymes exogènes, retient de plus en plus l'attention car c'est une des méthodes qui permet la récupération des protéines mais aussi des autres composés d'intérêt (comme les lipides par exemple) tout en respectant les propriétés intrinsèques des matières premières (Hoyle, 1994; Gildberg *et al.*, 2002, Daukšas *et al.*, 2005; Šližyte *et al.*, 2005).

2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le principal objectif de ce travail est la valorisation de co-produits de thon provenant de l'industrie de transformation du thon (conserverie). Cette étude se divise en 3 chapitres distincts :

1. Généralités.
2. Hydrolyse de longue durée sur 3 co-produits représentatifs des conserveries de thon au Vietnam.
3. Hydrolyse de tête de thon et recherche d'applications en nutrition animale et humaine.

Le premier chapitre est une revue bibliographique qui porte sur la situation mondiale de la pêche et de l'aquaculture en général avec une attention particulière sur le thon. Les différentes stratégies de valorisation des co-produits sont ensuite présentées et discutées puis le procédé de l'hydrolyse et notamment de l'hydrolyse enzymatique sur les matières premières marines est détaillé. Les deux dernières parties de ce chapitre présentent les secteurs d'applications qui vont être abordés lors de cette étude : la nutrition des crevettes et la fabrication de la sauce de poisson.

Le deuxième chapitre relate les expériences conduites en hydrolyse enzymatique, avec une protéase à large spectre, de 3 co-produits de thon issus de conserverie : têtes, viscères et queues. De très nombreux paramètres sont étudiés tels que : le degré d'hydrolyse, la solubilisation de la matière et notamment de l'azote, la composition biochimique des différentes fractions et le poids moléculaire des peptides solubles,... Les objectifs principaux de ces hydrolyses de longue durée (12h) sont d'établir les cinétiques de protéolyse des différents co-

produits, de connaître la composition proximale des différentes fractions résultantes et de déterminer les conditions qu'il conviendra d'appliquer pour permettre une valorisation de ces co-produits.

Le troisième chapitre porte sur l'hydrolyse enzymatique de la tête de thon en s'inspirant des résultats du chapitre précédent, et à rechercher à valoriser les fractions résultantes en alimentation animale et humaine. Pour cela des hydrolyses sont conduites avec une protéase à large spectre pendant une durée maximum de 8 heures à l'issue de quoi 2 fractions sont séparées par centrifugation : une phase soluble (hydrolysats) et une phase insoluble (culot). Dans une première partie, des essais de nutrition de la crevette *Penaeus vannamei* ont été conduits en bassin d'élevage. Pour cela, différentes formulations incorporant des fractions variables (soluble, insoluble, mélange) issues de la protéolyse de la tête de thon ont été évaluées. Différents paramètres zootechniques ont ainsi été mesurés : taux de survie, gain de poids, taux de conversion alimentaire, coefficient d'efficacité protéique... Dans une deuxième partie, l'effet d'une adjonction d'hydrolysats de tête de thon lors de la phase de maturation de la sauce de poisson vietnamienne (Nuoc mam) a été évalué. Différents paramètres physico-chimiques et sensoriels ont été mesurés afin d'évaluer les bénéfices éventuels d'un tel apport et la qualité des produits ainsi obtenus comparée à celle de sauces commerciales.

CHAPITRE 1. GÉNÉRALITES

1. PRODUCTION MONDIALE DES PÊCHES ET DE L'AQUACULTURE

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production halieutique mondiale a atteint 143,6 millions de tonnes en 2006 (FAO, 2008).

Depuis les années 90, il y a une stagnation des volumes capturés dans les océans (de l'ordre de 90 millions de tonnes par an) et ce malgré le perfectionnement des techniques et l'allongement des campagnes de pêche. Par contre, si les pêches de capture n'évoluent guère depuis 20 ans, les volumes produits par l'aquaculture ne cessent d'augmenter. D'un niveau inférieur à un million de tonnes au début des années 50, la production aquacole mondiale est montée à plus de 51 millions de tonnes en 2006. Cette aquaculture mondiale est largement dominée par la région Asie-Pacifique, qui a elle seule produit actuellement 89% de la production en volume. Cette domination est due essentiellement à l'énorme production de la Chine, qui représente 67% du volume (FAO, 2008).

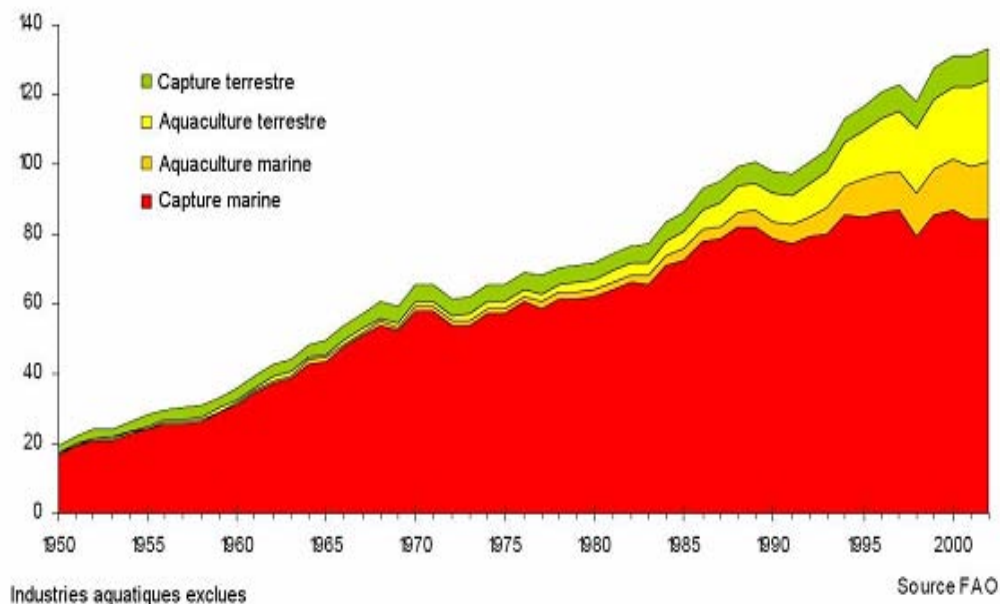


Figure 1. Production mondiale des pêches et de l'aquaculture (source FAO)

La finalité de ces biomasses marines, quelles soient sauvages ou issues de l'élevage est bien évidemment la nutrition humaine. Ainsi, près 75% de ces biomasses marines sont

directement destinés à la consommation, ce qui en 2006 a représenté environ 110 millions de tonnes. Le quart restant, soit 30 à 36 millions de tonnes selon les années, n'est pas directement destiné à des fins alimentaires bien que la plus grande part soit transformée en farine et huile pour la nutrition animale et particulièrement l'aquaculture.

Tableau 1. Consommation mondiale des poissons (source FAO)

	2002	2003	2004	2005	2006
Consommation humaine (Millions de tonnes)	100,7	103,4	104,5	107,1	110,3
Utilisation à des fins non alimentaires (Millions de tonnes)	32,9	29,8	36	35,6	33,3
Population (<i>milliards</i>)	6,3	6,4	6,4	6,5	6,6
Approvisionnements en poissons de consommation par habitant (<i>kg</i>)	16	16,3	16,2	16,4	16,7

La part de poissons* consommée par habitant est constante voire en légère hausse depuis plusieurs années et équivalait à 16,7kg/an en 2006. Ce poisson est soit consommé frais (48,5%) soit transformé. En 2006, 54% des poissons ont été transformés ce qui équivaut à 77 millions de tonnes (dont près de 30 millions transformés en huile et farine). En ce qui concerne la consommation humaine, la congélation est la première de ces méthodes de transformation (50% des poissons transformés pour la consommation humaine sont congelés), viennent ensuite la mise en conserve et le saurissage (FAO, 2008).

* Le terme poisson employé ici désigne en fait toutes les ressources marines consommées à savoir les poissons, les mollusques, les crustacés et les algues.

2. THON ET CONSOMMATION DU THON

2.1. Thon

Le thon est un des principaux produits de la mer faisant l'objet d'échanges internationaux. Il représente 5% des quantités pêchées dans le monde et destinées à l'alimentation humaine, mais compte pour plus de 10% dans la valeur des échanges internationaux (Paquette, 1999). Le thon est une des espèces marines les plus importantes économiquement. Les sept espèces principales pêchées et consommées sur le marché international sont la bonite (*Katsuwonus pelamis*), le thon

jaune (*Thunnus albacares*), le thon obèse (*Thunnus obesus*), le thon blanc (*Thunnus alalunga*), le thon rouge de l'Atlantique (*Thunnus thynnus*), le thon rouge du Sud (*Thunnus maccoyii*), le thon rouge du Pacifique (*Thunnus orientalis*) (Oceanic développement, 2005). La capture totale de ces espèces est passée de 2,5 millions de tonnes à 4,3 millions de tonnes entre 1998-2003 (Josupeit, 2005). En 2006, la production mondiale de thon était d'environ 5 millions de tonnes (Hoang, 2009).

Tableau 2. Capture de thon par espèce (1000 tonnes) (source FAO Globefish)

	1987	1991	1995	1999	2003
Bonite	1017	1693	1653	1968	2111
Thon jaune	847	955	1014	1213	1485
Thon obèse	263	277	374	432	425
Thon blanc	219	168	190	255	225
Thon rouge (de l'Atlantique, du Sud et du Pacifique)	58	45	72	57	52
Total	2404	3138	3303	3925	4297

En terme de volume, la bonite est l'espèce la plus abondante sur le marché international avec plus de 2 millions de tonnes débarquées soit environ 50% des captures mondiales de thon (Tableau 2). En termes de valeur marchande, par contre, le thon jaune est la première espèce de thon avec des volumes débarqués moindres que la bonite (1,5 millions de tonnes en 2003) mais un prix de vente supérieur (Josupeit, 2005).

Les principaux pays producteurs de thon sont le Japon, Taiwan, l'Indonésie, la Corée, les Philippines, les Etats-Unis, l'Espagne, la France et, dans une moindre mesure, le Vietnam (Josupeit, 2006). Les espèces de thon océanique principalement pêchées au Vietnam sont la bonite (*Katsuwonus pelamis*), le thon jaune (*Thunnus albacares*) et le thon obèse (*Thunnus obesus*). En 2007, la production de thon jaune et de thon obèse des 3 provinces de Khanh Hoa, Phu Yen et Binh Dinh était de 9 500 tonnes, représentant 56% de la production totale de thon (Hoang, 2009).

2.2. Consommation du thon

Sur le marché international, le thon est commercialisé sous 3 formes principales : frais (particulièrement pour la consommation sous forme de sashimi), congelé et en conserve

(Josupeit, 2006). C'est cette dernière forme qui est largement majoritaire puisque plus de 70% du thon pêché est transformé en conserve (Oceanic development, 2005). Les espèces de thon mis en conserve sont la bonite, le thon jaune et le thon blanc (ou germon). La bonite est l'espèce la plus utilisée en conserverie de thon tandis que le thon jaune (pêché par les senneurs) présente une qualité et un prix supérieurs. Quant au thon blanc, il occupe un marché de niche particulièrement aux Etats-Unis, en France et en Espagne.

Les principaux producteurs de thon en conserve sont la Thaïlande, l'Espagne et les Etats-Unis. Au niveau de l'Union européenne, les principaux pays producteurs de conserve de thon sont l'Espagne (251 000 tonnes en 2002), l'Italie (72 000 tonnes) et la France (43 000 tonnes). Sur le continent américain, les principaux producteurs de thon en conserve sont les Etats-Unis (248 100 tonnes en 2002) et le Mexique (71 800 tonnes). En Asie, la production de thon en conserve est concentrée en Thaïlande (269 400 tonnes), le plus grand producteur mondial, aux Philippines (80 000 tonnes) et au Japon (62 100 tonnes) (Oceanic development, 2005).

La consommation mondiale de thon en conserve a été de 0,48 kg/habitant en 2002 avec comme principaux pays consommateurs : l'Union européenne (35% de la consommation mondiale), les Etats-Unis, le Canada, le Japon, le Mexique et l'Iran. Les Etats-Unis sont les plus grands consommateurs de thon en conserve avec 25 à 28% de la consommation mondiale de ce type de produits (Hoang, 2009). Pour l'Europe, la consommation est estimée à environ 500 000 tonnes par an. Les quatre marchés principaux sont : l'Italie, l'Espagne, la France et le Royaume-Uni (Paquette, 1999). L'Espagne est le pays ayant la plus forte consommation par habitant : 2,22kg /habitant /an (Oceanic development, 2005). La Thaïlande est le principal fournisseur de thon en conserve avec 506 100 tonnes en 2008 (FAO globefish, 2009).

Les principaux pays exportateurs de thon frais ou congelé sont Taiwan, l'Espagne, la Corée, l'Indonésie, Singapour et la France. Les principaux pays importateurs de thon frais ou congelé sont le Japon, la Thaïlande, les Etats-Unis, l'Espagne et l'Italie. (Josupeit, 2006). Hormis pour le Japon, ces importations sont principalement destinées à l'industrie de la conserve. Le Japon a importé 38 012 tonnes de thon frais et 197 451 tonnes de thon congelé en 2007 (Globefish, FAO, 2008).

Le Japon, les Etats-Unis et l'EU sont les plus grands marchés pour le thon. Le Japon est de loin le plus grand consommateur de thon frais et congelé, consommant à lui seul 20-25% de la production mondiale de cette sorte de produits.

Aujourd'hui, le Vietnam a une position notable parmi les pays exportateurs de thon et voit sa production et ses exportations augmenter régulièrement depuis une dizaine d'années (Tableau 3). Le Vietnam a obtenu en 2008 quelques 188 millions de dollars d'exportations de thon, soit une augmentation de 25% par rapport à 2007 (Quang, 2009). Les pays importateurs de thon vietnamien sont de plus en plus nombreux passant de 20 en 2002 à 83 en 2008 (FAO, 2008). Ces principaux pays importateurs sont : les Etats-Unis (32,27% de la production vietnamienne), le Japon (11,6%), l'Allemagne (6,5%), la Hollande (5,34%), l'Espagne (5,02%), le Mexique (3,41%).

Tableau 3. Exportations vietnamiennes de thon (source : Fisheries Information Center of Vietnam, WPEA OFM, 2009)

Année	Masse (tonnes)	Chiffre d'affaire (Million USD)
2000	5 912	22,98
2001	14 476	58,59
2002	20 735	77,46
2003	17 362	47,72
2004	20 784	55,05
2005	30 208	82,24
2006	44 822	117,13
2007	52 584	150,36

Le thon jaune (*Thunnus albacares*) et le thon obèse (*Thunnus obesus*) sont les principales espèces exportées par le Vietnam principalement sous forme de thon frais ou de filets congelés (FAO globefish, 2008). Si le thon en conserve ou congelé domine encore largement le marché (intérieur ou à l'export), une diversification des produits est observée depuis quelques années avec aujourd'hui près de 42 catégories de produits de thon différents.

3. CO-PRODUITS DE POISSON : DEFINITION ET VOIES DE VALORISATION

3.1. Définition

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Il existe trois grand types de producteurs de co-produits:

les mareyeurs, les saleurs - saurisseurs et les conserveurs. Pendant la transformation de poisson pour la consommation humaine, des co-produits incluant les têtes, les viscères, la chute de parage (filetage), la peau, l'écaille, les arêtes et les queues sont générés. Dans un contexte de développement durable mais aussi et surtout dans un souci de rentabilité économique, ces co-produits font depuis plusieurs années l'objet de l'attention des industriels qui aimeraient en tirer bénéfices. L'analyse des compositions proximales de ces matières « secondaires » fait ressortir l'existence de très nombreuses molécules ou groupes de molécules potentiellement valorisables notamment des protéines, des fractions lipidiques, des vitamines, des minéraux mais aussi des composés bio actifs qui ont des propriétés bénéfiques pour la santé humaine et animale (Dumay, 2004, Shahidi, 2006).

3.2. Différentes voies de valorisation des co-produits de poisson : produits dérivés

Le produit dérivé est le produit commercial obtenu à partir d'un co-produit. Compte tenu de l'importance des co-produits, de nombreux efforts ont été réalisés pour les utiliser dans diverses applications: l'alimentation animale ou humaine, la diététique, la nutraceutique, la pharmaceutique, le cosmétique et d'autres applications. A partir d'un même type de co-produit (tête, viscères, arêtes, peau) il est possible d'obtenir différents produits dérivés.

3.2.1. Farine et huile de poisson

La production de farine et d'huile de poisson pour la nutrition animale est actuellement la valorisation de masse des co-produits la plus importante car tous peuvent être utilisés sans distinction. Ainsi, en 2006, environ 20,2 millions de tonnes de poisson et de co-produits ont été transformés en farines (FAO, 2008). En 2008, 2,6 millions de tonnes de farine ont ainsi été commercialisés avec près de 25% des matières utilisées qui étaient des co-produits issus de l'industrie de transformation du poisson (FAO Globefish, 2009).

Les principaux pays producteurs de farine et d'huile de poisson sont le Pérou, le Chili, le Danemark et la Norvège (FAO Globefish, 2009). La farine de poisson est la première source de protéines utilisée pour l'alimentation des animaux d'élevage en raison de ses hautes qualités nutritives. Une partie importante de ces farines est utilisée pour faire des aliments pour l'aquaculture de poissons et de crevettes. L'autre partie est utilisée pour l'alimentation des poulets et des porcs. Les farines contiennent en général de 65 à 67% de protéines et un maximum

de 12% de lipides. Elles possèdent de bonnes valeurs nutritives et une grande teneur en acides aminés essentiels mais sont peu solubles, possèdent peu de propriétés fonctionnelles et peuvent causer des inconvénients liés à leur forte teneur en sels minéraux (Denes, 2006).

L'utilisation mondiale de farine de poisson en 2002 est détaillée sur la Figure 2 (Schippe, 2008).

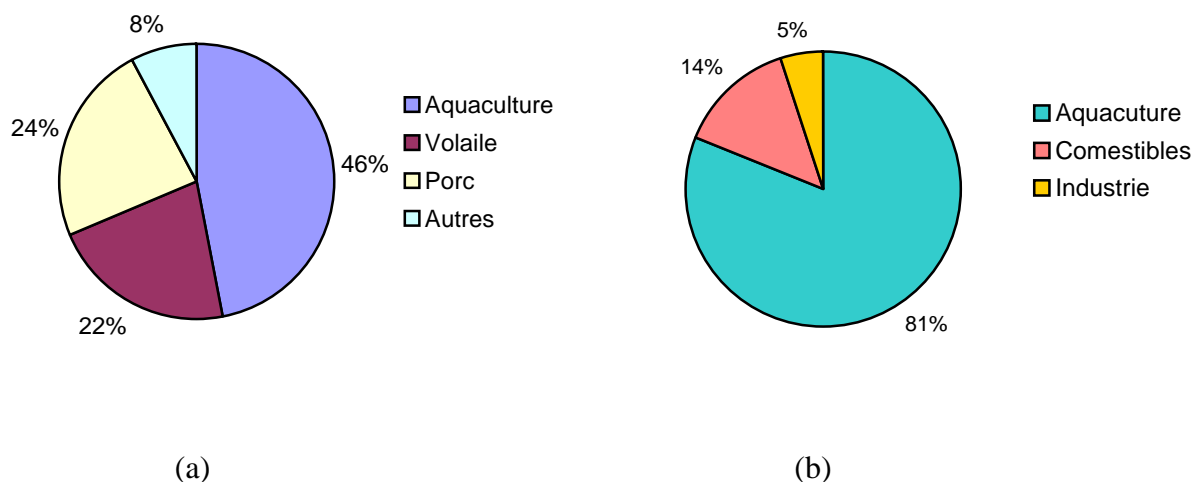


Figure 2. L'utilisation mondiale de farine (a) et d'huile de poisson (b) (Schippe, 2008)

Au Vietnam, la demande de farine de poisson est forte, principalement liée au développement de l'aquaculture. Selon les statistiques de l'Institut de Recherche Aquacole 2 de Ho Chi Minh ville, la demande de farine de poisson dans l'alimentation pour la volaille et l'aquaculture est évaluée à environ 800 000 tonnes par an. La production actuelle de farine de poisson répond approximativement au tiers de cette demande, soit 265 000 tonnes. Les quantités de farine de poisson utilisées comme aliment pour crevettes et poissons sont évaluées à environ 43 000 tonnes et 50 000 tonnes, respectivement (Dao *et al.*, 2005).

3.2.2. Hydrolysats enzymatiques de poisson

Les hydrolysats sont le résultat de la digestion partielle des protéines par hydrolyse protéolytique de poissons entiers ou de co-produits. Les hydrolysats sont des fractions à teneur protéique élevée obtenues soit par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) soit par hétérolyse (avec addition d'enzymes exogènes). Une fois séchés, ces hydrolysats ont un aspect identique à celui des farines.

3.2.2.1. Autolysats

Les autolysats sont obtenus principalement par l'action des enzymes protéolytiques endogènes du poisson, présentes dans le système digestif (pepsine, trypsine, chymotrypsine) ainsi que dans le tissu musculaire (cathepsines). Les bactéries naturellement présentes dans le mélange participent également à cette protéolyse. Les autolysats sont généralement liquides, assez visqueux, riches en acides aminés libres et en petits peptides. Ils constituent une nourriture idéale pour l'alimentation animale (Ravallec-Plé, 2000).

Les sauces de poisson sont un exemple d'autolysats issus de la fermentation de poissons fortement salés. Ce sont des produits traditionnels importants de l'alimentation pour certaines populations du sud-est asiatique et portent les dénominations de nuoc-mam (Vietnam), Nam-pla (Thaïlande) ou Shiokara (Japon)... La conservation de ces produits est assurée par leur forte teneur en sel marin. La fermentation est un moyen traditionnel utilisé pour conserver le poisson, puisqu'elle permet de limiter certaines proliférations bactériennes par addition de sel. L'activité des enzymes endogènes permet la maturation de la matière première et l'obtention du produit final. Dans ces mélanges complexes, la présence d'inhibiteurs naturels diminue l'activité des enzymes endogènes. La vitesse de l'autolyse est alors très lente, la durée des procédés est au minimum de 6 mois (Roy et Durand, 1997).

La pâte de poisson fermentée s'obtient par l'acidification des déchets de poisson grâce à l'ajout d'un acide organique, tel que l'acide formique. La pâte de poisson et de crevettes fermentée est très nutritive et est employée en général comme complément protéique pour les porcs, la volaille et l'aquaculture (Johnson, 2002). Elle est constituée de poissons autolysés notamment grâce à l'action des enzymes digestives des viscères.

3.2.2.2. Hétérolysats

Les hétérolysats sont des produits obtenus par l'action d'une enzyme ou d'un mélange d'enzymes additionné au milieu. Ce type d'hydrolyse enzymatique permet d'obtenir des produits protéiques solubles dotés de bonnes propriétés fonctionnelles et susceptibles d'être utilisés en alimentation humaine ou animale. Plusieurs paramètres influencent cette hydrolyse notamment la température, le pH, le ratio enzyme/substrat et le temps d'hydrolyse (Liaset *et al.*, 2000).

De très nombreuses enzymes peuvent être utilisées pour ce type d'hydrolyse. Les enzymes d'origine végétale les plus fréquemment employées sont la papaine et la bromélaïne.

Quant aux enzymes d'origine animale (porcine et bovine) les plus fréquentes sont la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine. Les enzymes microbiennes de loin les plus nombreuses dans ce type d'application présentent plusieurs avantages par rapport aux enzymes d'origine animale ou végétale: leurs types d'activité catalytique sont plus variés et leur stabilité face aux variations de température et de pH est meilleure. De ce fait, elles représentent aujourd'hui environ 90% des enzymes produites pour les procédés industriels. De plus en plus, les industriels du secteur, commercialisent leurs enzymes sous forme de complexes enzymatiques comme par exemple Alcalase, Protamex et Flavourzyme commercialisées par la société Novozymes.

Le Tableau 4 recense les principales protéases ou complexes enzymatiques et les conditions opératoires utilisés pour la fabrication d'hydrolysats de co-produits de poisson. Cette hydrolyse accélérée à l'aide d'enzymes exogènes présente par rapport aux autolysats de nombreux avantages tels que le contrôle de l'hydrolyse et des propriétés de l'hydrolysats, et l'utilisation d'une température de catalyse modérée (Diniz et Martin, 1996). Le plus grand intérêt réside cependant dans la possibilité de pouvoir diriger l'hydrolyse vers des peptides particuliers grâce à l'utilisation d'enzymes et de conditions opératoires spécifiques (température, pH, rapport Enzyme/Substrat (E/S), durée de l'hydrolyse...) (Liaset *et al.* 2000).

Tableau 4. Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse des co-produits marins

Enzyme	Substrat	Température (°C)	pH	Ratio enzyme/substrat	Références
Alcalase	Estomac de thon	50	8	0,2-3%	Guérard <i>et al.</i> , 2001
	Viscères de morue	50	8	0,05-0,5%	Šližyte <i>et al.</i> , 2005c
	Viscères de sardine	50	8	0,1%	Dumay,2006 ; Dumay <i>et al.</i> , 2006
	Viscères de seiche	50	8	0,1%	Kechaou <i>et al.</i> , 2009
	Muscle de requin	55	8,3	37g/kg	Diniz et Martin, 1997
	Tête de saumon	49-61	7-8	3,5-6,5	Gbogouri <i>et al.</i> , 2004
	Muscle de morue	30-60	7-8,2	0,25-2%	Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2000
	Arêtes de saumon et de morue	56-60	7,3-7,6	30 AU/kg protéine	Liaset <i>et al.</i> , 2000
	Tête d'hareng	50	8	0,5	Sathivel <i>et al.</i> , 2003
Protamex	Co-produits de morue	60	6	0,2%	Dumay <i>et al.</i> , 2004
	Viscères de sardine	50	8	0,1%	Dumay,2006 ; Dumay <i>et al.</i> , 2006
	Viscères de seiche	50	8	0,1%	Kechaou <i>et al.</i> , 2009
	Arêtes de saumon	36-50	5,4-7,7	30-90AU/kg protéine	Liaset <i>et al.</i> , 2002
	Arêtes de saumon	55	6,5	11,1 AU/kg protéine	Liaset <i>et al.</i> , 2003
	Viscères de morue	55	5,5-7,5	1%	Aspmo <i>et al.</i> , 2005
Neutrase	Viscères de morue	50	6,7-6,9	0,3%	Daukšas <i>et al.</i> , 2005
	Viscères de morue	50	6,7-6,9	0,3%	Šližyte <i>et al.</i> , 2005a, 2005b.
	Viscères de morue	55	5,5-7,5	1%	Aspmo <i>et al.</i> , 2005
	Capelan	50-55	7	30 AU/kg protéine	Shahidi <i>et al.</i> , 1995
	Arêtes de saumon et de morue	47-50	6,3-6,5	30 AU/kg protéine	Liaset <i>et al.</i> , 2000
Flavourzyme	Viscères de morue	50	6,7-6,9	0,1%	Daukšas <i>et al.</i> , 2005
	Viscères de morue	50	6,7-6,9	0,1%	Šližyte <i>et al.</i> , 2005a; 2005b.

	Co-produits de morue	50	6,5	0,25%	Dumay <i>et al.</i> , 2004
	Viscères de sardine	50	8	1,5%	Dumay,2006 ; Dumay <i>et al.</i> , 2006
	Viscères de seiche	50	8	1,5%	Kechaou <i>et al.</i> , 2009
Umamizyme	Estomac de thon	45	7	0,1-1,5%	Guérard <i>et al.</i> , 2002
Kojizyme	Arêtes de saumon et de morue	46-55	5,5-5,9	5000LAPU/kg protéine	Liaset <i>et al.</i> , 2000
Pepsine	Co-produits de poisson	37	2	1%	Batista <i>et al.</i> , 1995
	Raie	37	2,5	1%	Pastoriza <i>et al.</i> , 2003
	Arêtes de saumon et de morue	36-38	2,4-2,8	125 AU/kg protéine	Liaset <i>et al.</i> , 2000
Trypsine	Co-produits de poisson	37	8	1%	Batista <i>et al.</i> , 1995
Chymo-trypsine	Co-produits de morue	40	7,0	0,01%	Dumay <i>et al.</i> , 2004
Papaine	Co-produits de poisson	37	6	1%	Batista <i>et al.</i> , 1995
	Raie	65	6,3	1%	Pastoriza <i>et al.</i> , 2003
	Co-produits de morue	60	6,5	2%	Dumay <i>et al.</i> , 2004

De tels hétérolysats de poisson trouvent actuellement des applications dans de nombreux domaines tels que: la nutrition animale et humaine, la nutraceutique et la pharmaceutique.

- *Nutrition animale*

Les hydrolysats protéiques de poisson ont les avantages d'être très digestes et d'avoir une haute qualité nutritive. Ils sont largement utilisés en nutrition animale particulièrement en aquaculture où ils se substituent partiellement à la farine de poisson (Lian *et al.*, 2005., Kotzamanis *et al.*, 2007). Ce remplacement des farines par des hydrolysats de poisson augmenterait dans certains cas la croissance des poissons (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002; Refstie *et al.*, 2004, Tang *et al.*, 2008). Les procédés d'hydrolyse enzymatique permettent d'obtenir des peptides biologiquement actifs, dotés de propriétés immunostimulantes, stimulant

gastrique, anticancéreuses, anti-hypertensives, anti-oxydantes... La stimulation gastrique s'avère particulièrement intéressante en aquaculture car elle favorise la digestibilité de l'aliment.

- *Nutrition humaine*

Depuis une quarantaine d'années, les industriels s'intéressent aux hydrolysats de poisson pour leur intérêt nutritionnel et leur incorporation dans des régimes spécifiques (diététiques) en alimentation humaine. C'est pourquoi les propriétés fonctionnelles telle que la solubilité, la rétention d'eau, la capacité émulsifiante, le pouvoir moussant ont été étudiées afin de déterminer dans quelle mesure ces hydrolysats permettent de modifier les caractéristiques organoleptiques des aliments ou d'augmenter leur durée de stockage (Kristinsson et Rasco, 2000c; Sathivel *et al.*, 2003; Nabil *et al.*, 2007; Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008). D'une manière générale, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont liées aux conditions d'hydrolyse. Ainsi, en contrôlant ces conditions, il est possible d'orienter les propriétés fonctionnelles et donc de diversifier les applications alimentaires.

- *Nutraceutique et pharmaceutique*

Certains de ces composés de bioactive ont été identifiés comme possédant de posséder le potentiel pharmaceutique et nutraceutique qui est avantageux dans l'amélioration de santé humaine (Kim et Mendis, 2006). Des substances bioactives peuvent être issues de l'hydrolyse enzymatique de certains co-produits (viscère, têtes). De très nombreux auteurs se sont intéressés à la recherche de peptides bioactifs au sein d'hydrolysats (Benkajul et Morrissey, 1997, Ravallec-Plé *et al.*, 2001). Parmi les très nombreuses activités biologiques identifiées à ce jour, il convient de noter les suivantes à titre d'exemple: anti-oxydante (Jun *et al.*, 2004; Rajapakse *et al.*, 2005); Je *et al.*, 2007 Klompong *et al.*, 2007; Thiansilakul *et al.*, 2007; Šližyte *et al.*, 2009), immunostimulante (Gildberg *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2008), anti-hypertensive (Zhao *et al.*, 2007), anti-stress, stimulation gastrique, antiprolifératrice (Picot *et al.*, 2006), immuno-modulatrice (Duarte *et al.*, 2006).

Les secteurs de la nutraceutique et de la pharmacie sont très porteurs et demandeurs de nouveaux produits, c'est pourquoi il existe un certain engouement à l'heure actuelle pour la conduite de protéolyse ménagée de matières premières marines (dont les co-produits) en vue de produire des peptides bioactifs à forte valeur ajoutée.

- *Milieu de culture bactérienne*

Dans la culture de microorganismes (bactéries, champignons, levures), c'est le milieu de culture qui représente le plus gros investissement (Martone *et al.*, 2005). L'utilisation d'hydrolysats de poisson comme source de nutriments pour les microorganismes constitue donc une voie intéressante de valorisation. Cette utilisation permet conjointement d'augmenter la valeur des hydrolysats et de réduire le coût de production de la culture cellulaire. Plusieurs travaux ont ainsi mis en évidence une possible substitution des milieux de culture « traditionnels » par des hydrolysats de co-produits de poisson (Guérard *et al.*, 2001, Aspino *et al.*, 2005).

3.2.3. Hachis congelé

L'utilisation des co-produits sous forme de hachis congelés est très certainement celle qui nécessite le moins d'opérations de transformation. En effet, après un tri spécifique (les viscères et la peau sont éliminés tout comme les poissons cartilagineux), les co-produits sélectionnés sont broyés et filtrés, puis le hachis obtenu est congelé en blocs. Les hachis congelés sont une bonne source de protéines et ils sont utilisés par l'industrie du petfood (animaux de compagnie) et représentent en tonnage la 3^{ème} voie de valorisation des co-produits marins en France avec environ 30 000 tonnes par an (Andrieux 2004).

3.2.4. Arômes

Les extraits et les arômes marins sont de plus en plus demandés dans le monde notamment en Asie (Johnson, 2002). Deux principes de fabrication cohabitent : le premier qui vise à sécher la matière par cuisson puis à broyer le produit conduit à l'obtention d'une poudre aromatique peu soluble ; le deuxième au contraire consiste à mettre en contact la matière première et l'eau puis à récupérer cette eau et à concentrer puis sécher les matières organiques dissoutes afin d'obtenir un extrait soluble. De très nombreux produits d'origine marine sont ainsi produits à partir de saumon, de morue, des anchois, du thon, des crevettes, du homard, du crabe, du calmar, des pétoncles, des huîtres... Les co-produits peuvent ainsi être valorisés à la condition impérative qu'ils soient de qualité et propre à la consommation humaine.

3.2.5. Autres produits dérivés à haute valeur ajoutée

La marge bénéficiaire qu'engendre la production de farine et d'huile de poisson est minime et la viabilité des industries n'est assurée que par les très gros volumes qu'elles traitent. Depuis une cinquantaine d'années, les travaux des équipes de recherche laissent entrevoir d'autres possibilités de valorisation de ces co-produits avec, bien souvent, une plus forte valeur ajoutée: collagène, gélatine, chondroïtine sulfate, huiles riches en acides gras oméga 3, lécithines.

3.2.5.1. Collagène et gélatine

Le collagène qui est une glycoprotéine fibreuse est un des éléments les plus importants de la structure de la peau contribuant notamment à sa résistance physique et son élasticité. Le collagène agit généralement comme agent filmogène hydratant et restructurant du tissu cutané. Il contribue à l'élasticité de la peau et à améliorer l'état de surface cutanée et a un rôle important pour limiter le vieillissement de la peau (apparition des rides, rigidification de la peau). C'est un des ingrédients majeurs de l'industrie cosmétique.

Les co-produits de poisson et particulièrement la peau et les arêtes s'avèrent être une matrice de choix pour la production de collagène (Morimura *et al.*, 2002; Sadowska *et al.*, 2003; Kolodziejaska *et al.*, 2004; Muyonga *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2004).

La forme hydrolysée du collagène ou dénaturée par la chaleur est plus communément appelée gélatine. Tout comme le collagène, la gélatine est obtenue à partir de peaux, et d'arêtes mais aussi parfois à partir de nageoires et de vessies natatoires. Cette gélatine marine peut (sous certaines conditions) être utilisée dans l'industrie alimentaire en substitution des gélatines bovines ou porcines classiquement utilisées (comme gélifiant principalement).

3.2.5.2. Chondroïtine sulfate

La chondroïtine sulfate est une glycoprotéine constitutive des cartilages impliquée dans la tonicité des tissus de soutien. Les sources marines sont principalement les cartilages de raies et requin. Actuellement, cette chondroïtine est utilisée en tant qu'aliment fonctionnel pour réduire les douleurs articulaires, améliorer la fonction articulaire et assurer une protection structurelle de l'articulation chez les patients atteints d'arthrose.

3.2.5.3. Huile riche en acides gras oméga 3

L'intérêt nutritionnel des acides gras de la famille des oméga 3 n'est plus à démontrer notamment pour leur effet préventif sur les maladies cardiovasculaires et pour leur contribution au développement cérébral chez l'enfant. Parmi les différentes sources disponibles, les huiles de poissons sont privilégiées car elles sont riches en acides gras oméga 3 à longue chaîne et particulièrement en C20:5 ω 3 (acide eicosapentaénoïque ou EPA) et C22:6 ω 3 (acide docosahexaénoïque ou DHA). A l'aide d'étapes de filtration et de concentration, les acides gras de cette famille sont peu à peu concentrés. Ces concentrés sont encapsulés et commercialisés sous la forme de compléments alimentaires ou formulés dans des aliments dénommés « aliments fonctionnels » tels des boissons, des soupes, des céréales (Johnson, 2002).

3.2.5.4. Lécithine

Les phospholipides, trivialement appelés lécithines, sont un des constituants majeurs des membranes cellulaires. Ils possèdent de très nombreuses fonctionnalités qui leur confèrent un intérêt pour des applications dans les domaines de la nutraceutique, le médical, la cosmétique et l'agro-alimentaire. Dans la majeure partie des applications, ils sont principalement utilisés pour leurs propriétés émulsifiantes indépendantes de leur greffage en acides gras. Cependant, les lécithines marines présentent en plus la particularité d'être riches en acides gras oméga 3 et notamment en acides gras à longue chaîne de haut intérêt nutritionnel. C'est pourquoi depuis quelques années, il y a un regain d'intérêt pour ce type de produits issus du milieu marin et notamment de co-produits afin de réduire les coûts et d'assurer une disponibilité. Les œufs et la laitance de poissons sont des matrices de choix tout comme certaines têtes de poisson (thon, saumon...).

4. HYDROLYSE

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont perdues par les industries de transformation du poisson qui ne valorisent guère leurs co-produits ou déchets. L'hydrolyse des protéines est donc une des voies privilégiées de la valorisation de ces co-produits mais pour cela il convient d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines présentes afin de pouvoir les utiliser ultérieurement en nutrition humaine ou animale.

Cette hydrolyse des protéines, qui peut se faire par voie chimique ou enzymatique, conduit à une grande variété de produits.

4.1. Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique est la plus ancienne et peut être conduite en milieu acide (HCl ou H₂SO₄) ou en milieu alcalin (NaOH) dans des conditions drastiques telles que des températures de l'ordre de 100⁰C et des fortes concentrations de soude ou d'acide.

Dans le cas de l'hydrolyse acide, l'utilisation de l'acide chlorhydrique présente l'avantage, lors de la neutralisation par la soude, de produire du chlorure de sodium qui joue un rôle de conservateur pour le produit. Cependant cette hydrolyse acide a l'inconvénient de décomposer partiellement certains acides aminés et de détruire complètement le tryptophane. Il sera donc nécessaire de compléter l'hydrolysate acide par ces acides aminés.

L'hydrolyse alcaline par la soude provoque la destruction de la cystéine, la cystine, l'arginine et la méthionine. D'autre part, l'hydrolyse alcaline cause la racémisation des L-acides aminés en D-acides aminés non absorbés par l'homme, ce qui réduit la valeur alimentaire du produit, car seuls les L-acides aminés sont assimilables.

4.2. Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique présente l'avantage d'être plus facilement contrôlable que l'hydrolyse chimique. Elle permet également de préserver la valeur nutritionnelle de la matière première et ne nécessite pas de traitement chimique pour éliminer l'agent hydrolysant, l'enzyme étant simplement inactivée par un échauffement modéré.

4.2.1. Principe de l'hydrolyse enzymatique

Une enzyme est une protéine catalysant une réaction biochimique. Comme tout catalyseur, elle est retrouvée intacte à la fin de la réaction. Une enzyme est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation sur les mêmes corps chimiques.

Lors d'une hydrolyse enzymatique, les protéases vont briser les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi au moins deux peptides. L'hydrolyse des liaisons peptidiques va donc générer la libération des protons H⁺ (Figure 3). Cette libération de protons H⁺ va induire une acidification du milieu. Ce principe est valable pour les hydrolyses se déroulant à pH supérieur à 6,5, pour que le degré de dissociation

des ions $R-N^+H_3$ soit suffisant (Ravallec-Plé, 2000). Lorsque le pH est inférieur, la réaction s'inverse et ce seront des ions HO^- qui seront libérés.

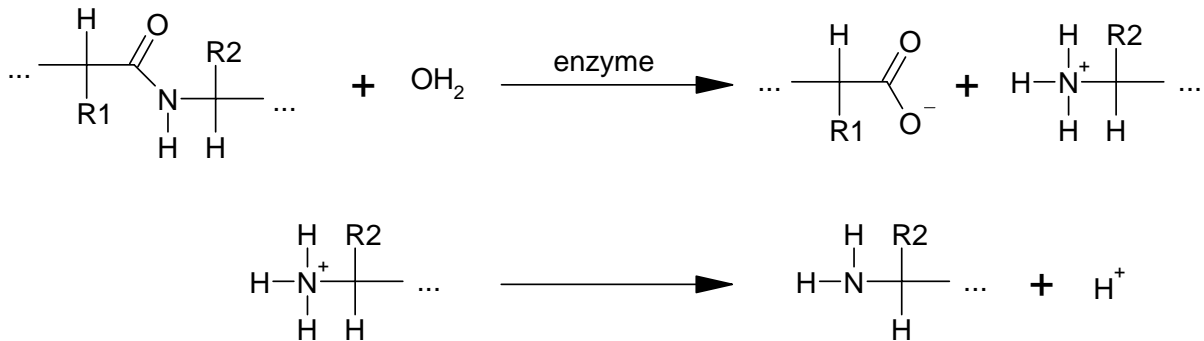


Figure 3. Schéma réactionnel de la libération de protons H^+ lors de l'hydrolyse enzymatique à $pH > 6,5$

4.2.2. Paramètres influents sur l'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des protéines peut être affectée par différents facteurs : la température, le pH, la concentration du substrat et de l'enzyme, la présence ou l'absence de substances inhibitrices et activatrices.

4.2.2.1. Influence de la température

L'enzyme qui est de nature protéique voit son activité modifiée par la température. Chaque enzyme possède sa propre gamme de température dans laquelle elle est active, cette gamme dépend du pH et de la nature du substrat. La plupart des enzymes présentent ainsi une activité maximale à des températures comprises entre 40 et 50°C et sont inactivées lorsque la température dépasse 70°C. Dans la gamme de température optimale, si la température s'élève de 10°C, la vitesse de l'hydrolyse augmente de 1,5 à 2 fois.

4.2.2.2. Influence du pH

Tout comme pour la température, l'enzyme est très sensible au changement de pH. Chaque enzyme est ainsi caractérisée par un pH optimum spécifique et une gamme de fonctionnement de pH relativement réduite. Plus le pH du milieu réactionnel est éloigné de ce pH optimal plus il y a de modifications de l'état d'ionisation de certains acides aminés situés sur le site actif pouvant empêcher la formation du complexe enzyme/substrat.

4.2.2.3. Influence de la concentration en enzyme

Comme dans toute réaction enzymatique, la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration en enzyme. Cependant, au-delà d'une certaine concentration en enzyme, la totalité du substrat se trouve complexé et la variation de la vitesse d'hydrolyse est négligeable. Il est donc préférable d'utiliser une concentration d'enzyme convenable pour des raisons d'efficacité maximale et de réduction de coût.

4.2.2.4. Influence de la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs

La vitesse d'une réaction et l'activité de l'enzyme peuvent être modifiées par la présence d'inhibiteurs ou activateurs. Les inhibiteurs sont des substances qui peuvent diminuer l'activité de l'enzyme quand ils sont présents. Ils peuvent être compétitifs, c'est-à-dire possédant une analogie de structure avec le substrat leur permettant d'aller se loger sur le site actif de l'enzyme à la place du substrat ou à l'inverse être non compétitifs et dans ce cas se fixer non pas sur le site actif mais sur d'autres sites de l'enzyme, modifiant ainsi sa structure tridimensionnelle et son activité.

5. CREVETTES

5.1. Production mondiale de crevettes

La production mondiale de crevettes (pêche et aquaculture) est estimée à environ 6 millions de tonnes dont 3,4 millions de tonnes capturés en 2005 (FAO, 2008). La production de crevettes est répartie dans toutes les zones géographiques. Cependant, l'Asie est la zone la plus importante pour la capture des crevettes. Dix pays réalisent à eux seuls les deux tiers de la production : la Chine, l'Inde, l'Indonésie, la Thaïlande, le Vietnam, le Canada, les États-Unis, le Groenland, la Malaisie et le Mexique. La Chine joue un rôle dominant, environ le tiers de la capture mondiale de crevettes est réalisé par ce pays (Gillett, FAO, 2008). En dehors de la Chine, les principaux pêcheurs de crevettes sont donc l'Inde, les États-Unis et la Thaïlande pour les crevettes d'eaux chaudes, le Groenland, la Norvège et l'Islande pour les crevettes d'eaux froides.

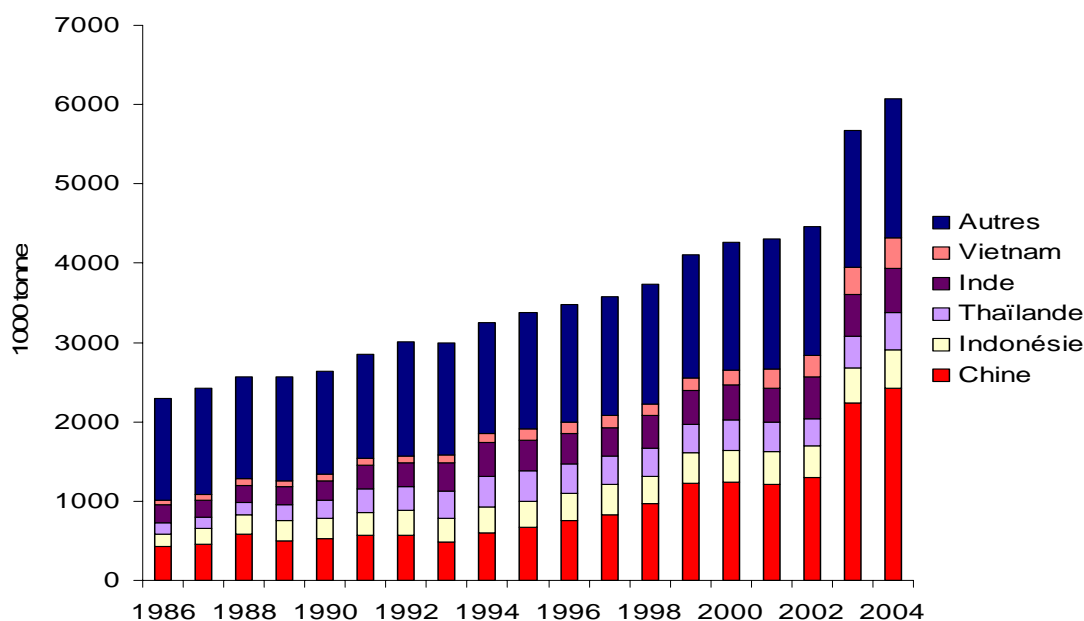


Figure 4. Production mondiale de crevettes (Josupeit, 2006)

En ce qui concerne l'aquaculture des crevettes, environ 40% de la production mondiale de crevettes en provient. L'aquaculture des crevettes s'est fortement accrue ces dernières années. La production mondiale de crevettes d'élevage a atteint 2,6 millions de tonnes en 2005 pour une valeur de 10,6 milliards de dollars (FAO, 2008). Près des trois quarts des crevettes d'élevage sont produits en Asie, particulièrement en Chine et en Thaïlande. Le dernier quart est produit principalement en Amérique latine, avec le Brésil comme premier producteur. En quelques années, l'élevage des crevettes est passé d'une activité traditionnelle à petite échelle (Asie du sud-est) à une industrie mondiale, les progrès technologiques permettant d'élever les crevettes avec des densités plus élevées. Actuellement, le premier producteur de crevettes d'élevage est la Chine, suivie par les autres pays asiatiques tels que la Thaïlande (490 000 tonnes en 2008), l'Indonésie (300 000 tonnes en 2008) (FAO Globefish. (2009)). La grande majorité des crevettes d'élevage appartient à la famille des *Penaeidae* où deux espèces, *Penaeus vannamei* (crevette à pattes blanches) et *Penaeus monodon* (crevette géante tigrée), dominant et représentent près de 80% de la production aquacole.

Les crevettes sont des matières premières les plus importantes d'échanges internationaux. La valeur des exportations annuelles de crevettes est actuellement de plus de 10 milliards de dollars. La Thaïlande est le premier exportateur avec une part de marché de plus de 30%, suivie par la Chine, l'Indonésie et l'Inde, avec environ 10% chacun. Les autres pays exportateurs

notables sont le Vietnam, le Bangladesh et l'Équateur. La Thaïlande exporte presque toute sa production, tandis qu'en Chine la production nationale est pour l'essentiel destinée au marché intérieur. Les Etats-Unis, le Japon et l'Union européenne sont les plus grands marchés de crevettes. En 2008, les Etats-Unis ont importé 564 000 tonnes, valant 4 093 millions de dollars (FAO, globefish, 2009). Le Japon importent environ 300 000 tonnes chaque année. Des pays asiatiques sont des fournisseurs majeurs tels que le Vietnam et l'Indonésie. De plus, des nations africaines, comme Madagascar et le Nigeria sont aussi des fournisseurs de crevettes pour le Japon (Gillet, FAO, 2008). L'Union européenne importe presque autant de crevettes que les États-Unis, avec l'Espagne comme marché principal, suivi par la France, le Royaume-Uni et l'Italie. En 2006, les six nations majeures d'approvisionnement en termes de volume étaient l'Islande, l'Equateur, l'Inde, le Canada, la Chine et le Brésil (Gillet, FAO, 2008).

5.2. Besoins nutritionnels des crevettes

5.2.1. Besoin en protéines

Le besoin en protéines des animaux aquatiques est plus élevé que celui des mammifères (Guillaume *et al.*, 1999). Ainsi, pour les crustacés ce besoin est de 30-55% selon l'espèce (voir Tableau 4). Cependant il varie aussi selon leur stade de développement et la source protéique utilisée. Si la teneur en protéines dans l'aliment est trop basse, le poids de l'animal diminuera car il utilisera ses propres protéines pour maintenir ses activités essentielles. A l'inverse, si la teneur en protéines dans l'aliment est trop élevée, seule une partie des protéines sera utilisée pour synthétiser les nouvelles protéines dans le corps, le reste sera transformé en énergie ou sera excrété. De tous les nutriments nécessaires à la crevette, les protéines sont de loin les mieux étudiées. La teneur en protéines brutes assurant une croissance optimale chez différentes espèces est présentée au tableau 5.

Tableau 5. Teneur optimale en protéines dans l'aliment de certaines espèces de crevettes

Espèces	Besoin (%)	Références
<i>P. aztecus</i>	40	Venkataramiah et al., 1975
<i>P. californiensis</i>	35	Colvin et Brand, 1977
<i>P. indicus</i>	43	Colvin, 1976
<i>P. japonicus</i>	45-55	Teshima et Kanazawa, 1984
	42	Koshio <i>et al.</i> (1993)
<i>P. merguensis</i>	50	Aquacop (1978)
	34-42	Sedgwick, 1979
<i>P. monodon</i>	40	Veronica et Chhorn (1983)
	40-44	Shiau <i>et al.</i> , 1991
	36-40	Shiau et Chou 1991
<i>P. setiferus</i>	30	Lee et Lawrence, 1985
<i>P. stylirostris</i>	35	Colvin et Brand, 1977
<i>P. vannamei</i>	36-40	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
	36	Smith <i>et al.</i> , 1985

Comme les vertébrés et nombre d'invertébrés, la crevette est incapable de synthétiser certains acides aminés qui doivent être obligatoirement apportés par l'aliment. Ces acides aminés sont qualifiés d'indispensables ou d'essentiels. Pour les crevettes 10 acides aminés sont essentiels: arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine (Tableau 6).

Tableau 6. Teneur en acides aminés essentiels pour la croissance des crevettes

Acides aminés essentiels	<i>Penaeus monodon</i>			<i>Penaeus vannamei</i>	
	Teneur		Références	Teneur (Akiyama <i>et al.</i> , 1992)	
	g/100g de protéines	g/100 g d'aliment		g/100g de protéines	g/100 g d'aliment
Arginine	5,3	1,85	Millamena <i>et al.</i> (1998)	5,8	2.32
	-	2,5	Chen <i>et al.</i> (1992)	-	-
Histidine	2,2	0,80	Millamena <i>et al.</i> (1999)	2,1	0,84
Isoleucine	2,7	1,01	Millamena <i>et al.</i> (1999)	3,5	1,40
Leucine	4,3	1,70	Millamena <i>et al.</i> (1999)	5,4	2,16
Lysine	5,2	2,08	Millamena <i>et al.</i> (1998)	5,3	2,12
Méthionine	2,4	0,89	Millamena <i>et al.</i> (1996a)	2,4	0,96
Phénylalanine	3,7	1,40	Millamena <i>et al.</i> (1999)	4,0	1,60
Thréonine	3,5	1,40	Millamena <i>et al.</i> (1997)	3,6	1,44
Tryptophane	0,5	0,20	Millamena <i>et al.</i> (1999)	0,8	0,32
Valine	3,4	1,35	Millamena <i>et al.</i> (1996b)	4,0	1,60

5.2.2. Besoin en lipides

Les lipides constituent une source importante d'énergie nutritionnelle, et sont présents sous forme de deux grandes classes, les lipides neutres et les phospholipides. Le besoin en lipides pour soutenir le développement des crevettes est de 6-7,5% et au maximum de 10% (Akiyama *et al.*, 1991). Une teneur en lipides trop élevée dans l'aliment peut diminuer la croissance des crevettes en raison du déséquilibre nutritionnel. Cependant, chez *Penaeus chinensis*, on n'observe pas de ralentissement de la croissance avec un régime contenant 15% de lipides (Guillaume *et al.*, 1999). Parmi les sources lipidiques appropriées aux crevettes, l'huile de poisson et l'huile de calmar sont les plus utilisées pour fabriquer les aliments.

Quatre acides gras s'avèrent particulièrement nécessaires au bon développement des crevettes : l'EPA et le DHA car ils interviennent comme composants des membranes cellulaires, l'acide linoléique (C18:2c ω 6) et l'acide linoléique (C18:3 c ω 3) (Glencross *et al.*, 2002).

Un autre aspect de la nutrition lipidique des crevettes concerne les phospholipides car ils constituent la structure des membranes cellulaires. D'une manière générale, les phospholipides

sont apportés à des teneurs de 0,5-3% des aliments (Guillaume *et al.*, 1999) en utilisant par exemple de l'huile de calmar.

Le cholestérol s'avère également essentiel pour obtenir un bon développement des crevettes notamment parce que c'est un constituant de la membrane cellulaire et qu'il sert de substrat pour la synthèse des hormones de mue. Le besoin en cholestérol dans l'aliment pour les crevettes est de 0,5% (Chen, 1993) à 2,1% (Deshimaru et Kuroki, 1974), teneur généralement apportée par l'utilisation d'huile et de farine de poisson dans la fabrication des aliments.

5.2.3. Besoin en glucides (hydrates de carbone)

Les hydrates de carbone constituent une source d'énergie peu onéreuse. Les hydrates de carbone dans l'aliment des animaux d'élevage se divisent en deux groupes: la fibre brute et l'extrait non azoté.

La fibre brute comprend principalement des polysaccharides non assimilables (la cellulose et la lignine). Une teneur élevée de l'aliment en cellulose perturbe la capacité digestive de l'animal. L'extrait non azoté (hydrates de carbone assimilables) comprend l'amidon et les sucres simples (mono ou disaccharides...).

La digestibilité des glucides est liée à la complexité de la molécule, l'efficacité de la digestion augmentant lorsque la masse moléculaire diminue. Ainsi, des sucres simples comme le glucose ou le saccharose ont une digestibilité plus élevée que l'amidon cru. Néanmoins dans la pratique, il n'est pas intéressant d'incorporer des sucres simples dans les aliments et les seuls glucides susceptibles de rentrer dans la formulation d'aliments composés sont des glucides végétaux de structure complexe comme les amidons de céréales (Guillaume *et al.*, 1999). Certains travaux ont par ailleurs montré que la survie et la croissance de crevettes nourries avec un aliment contenant de l'amidon étaient plus élevées que celles nourries avec un aliment contenant du glucose (Shiau et Peng., 1992). C'est pourquoi, dans les aliments pour crevettes, les amidons sont souvent incorporés à raison de 20 à 45%. Il s'agit d'amidons de blé, de riz, de maïs ou de manioc. En effet, contrairement aux poissons, à tendance carnivore, certaines crevettes tolèrent très bien une teneur en amidon élevée dans leur aliment, et ce même si ces amidons sont crus. Ainsi, chez *Penaeus vannamei* la digestibilité des amidons crus est de 70 à 90% et de 93-96% pour des amidons pré gélatinisés (Guillaume *et al.*, 1999). Cependant la digestibilité des glucides varie selon la source de glucides (Davis et Arnold, 1993) et est liée aux activités des

enzymes carbonhydrases spécifiques, en particulier des chitinases et des cellulases. Par exemple, les activités de l'alpha amylase et de la cellulase dans la glande et l'intestin de *Marcobrachium rosenbergii* sont beaucoup plus élevées que celles trouvées chez *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* et *Penaeus penicillatus* (Chuang *et al.*, 1985).

5.2.4. Besoin en vitamines

Les vitamines se répartissent en 2 groupes suivant leurs propriétés physiques: les 4 vitamines liposolubles (vitamine A, D, E et K) ou vitamines du groupe A, solubles dans les huiles et leurs solvants, et les 11 vitamines hydrosolubles que l'on assimile parfois à celles du groupe B (B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP, C, la biotine, l'acide folique, l'acide pantothénique, la choline et l'inositol). En fait au sens strict, ces dernières sont au nombre de 8, mais il s'y ajoute la vitamine C ainsi que la choline et l'inositol, également solubles dans l'eau (Guillaume *et al.*, 1999).

Pour avoir un développement correct, les crevettes ont besoin de vitamines, ces besoins dépendent de plusieurs facteurs tels que l'espèce et les conditions d'apport dans l'aliment (Tableau 7).

Tableau 7. Besoin en vitamines chez certaines espèces de crevettes

Espèces	Vitamines	Besoin (mg/kg d'aliment)	Références
<i>P. chinensis</i>	Inositol	4000	Liu <i>et al.</i> , 1993
<i>P. chinensis</i>	Choline	4000	Liu <i>et al.</i> , 1993
<i>P. monodon</i>	Thiamine (B1)	13-14	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>P. monodon</i>	Riboflavine (B2)	22,5	Chen and Hwang, 1992
<i>P. monodon</i>	Vitamine (B12)	0,2	Shiau et Lung, 1993
<i>P. monodon</i>	Niacin (PP)	7,2	Shiau et Suen, 1994
<i>P. monodon</i>	Vitamine D	0,1	Shiau et Hwang, 1994
<i>P. monodon</i>	Vitamine K	30-40	Shiau et Lieu, 1994
<i>P.vannamei</i>	Pyridoxine (B6)	80-100	He et Lawrence, 1991
<i>P.vannamei</i>	Acide ascorbique (C)	90-120	He et Lawrence, 1993
<i>P.vannamei</i>	Vitamine E	99	He et Lawrence, 1993

Les besoins en vitamines dépendent de plusieurs facteurs tels que l'espèce, les conditions de nourrissage...La vitamine E (α -tocophérol) et la vitamine C ont un rôle comme antioxydant biologique des acides gras.

5.2.5. Besoin en minéraux

Tout comme les vitamines, les minéraux se divisent en 2 groupes : les macroéléments et les oligo-éléments.

Pour les crevettes, les besoins en macroéléments sont de 100 à 250 mg/kg d'aliment sec. Ces macroéléments comprennent le calcium, le phosphore, le magnésium, le sodium, le potassium, le chlore et le soufre.

Les besoins en oligo-éléments des crevettes sont plutôt faibles mais nécessaires notamment en fer, cuivre, zinc, manganèse, sélénium, et iode...

Il faut cependant noter que les crevettes sont capables d'absorber le calcium, le phosphore et beaucoup d'autres éléments dissous dans l'eau de mer et que la présence d'une carapace ne semble pas diminuer cette capacité (Guillaume *et al.*, 1999). De plus, Davis *et al.*, (1993) ont démontré qu'une supplémentation de calcium dans l'aliment n'est pas exigée pour *Penaeus vannamei* et que le besoin de phosphore pour cette espèce est dépendant du contenu de calcium dans l'aliment. Ainsi, en absence de supplément de calcium, l'aliment contenant 0,35% phosphore est adéquat pour maintenir une bonne croissance de cette espèce. D'après ces travaux, il semble que le rapport calcium/phosphore optimal soit de 1/1 à 2/1.

5.3. Fabrication des aliments destinés aux crevettes

La fabrication d'un aliment composé consiste en une série d'opérations dont le but est d'associer plusieurs matières premières dans des proportions fixées à l'avance pour un objectif nutritionnel précis. Cette association est réalisée par mélange de composants sous forme solide (farines animales, tourteaux, produits céréaliers, minéraux, vitamines) ou sous forme liquide (huile de poissons ou huile de calmar). Un broyage préalable des composants solides les plus grossiers restreint l'hétérogénéité du produit et en accroît dans une certaine mesure l'utilisation digestive (Guillaume *et al.*, 1999).

Les ingrédients étant mélangés entre eux, l'aliment est ensuite mis en forme. Plus aisé à transporter et à manipuler, il est aussi plus facile à saisir par des animaux et permet de limiter la pollution des bassins. La texturation est l'opération clé permettant d'adapter l'aliment au comportement alimentaire de l'animal.

Les aliments destinés aux poissons et aux crustacés renferment des matières premières qui sont des co-produits d'autres industries (huilerie, amidonnerie, maïserie), ou des produits élaborés spécifiquement (farines de poissons, farines de sang, huiles). Toutes ces matières premières ont à des degrés divers, subi des traitements technologiques variés avant d'être associées dans un aliment composé. La diversité des présentations (miettes, granulés de différentes tailles) et des propriétés (résistance mécanique aux manipulations et au délitement dans l'eau, aptitude à se réhydrater, à couler, à flotter) demandée aux aliments pour animaux aquatiques impose des adaptations importantes des chaînes de fabrication existantes. La plupart du temps, les fabricants préfèrent concevoir des chaînes spécialisées qui associent, en les adaptant, des opérations particulières traditionnelles (broyage, dosage, mélange) et des opérations particulières plus spécifiques (pressage, extrusion, séchage, enrobage, émiettage) (Guillaume *et al.*, 1999).

6. SAUCE DE POISSON

6.1. Introduction

La sauce de poisson est un produit fermenté traditionnel très populaire dans de nombreux pays de la région asiatique, en particulier en Asie du sud-est. Il s'agit d'un produit fermenté à base de protéines de poisson, essentiellement constitué d'eau, de sel et de composés azotés solubles. Cette sauce n'est pas seulement utilisée en tant que condiment, mais aussi en tant qu'ingrédient pour la préparation de plats. Une sauce de poisson de bonne qualité se caractérise notamment par une teneur élevée en acides aminés essentiels ou semi-essentiels pour le corps humain (valine, leucine, isoleucine, thréonine, méthionine, lysine, phénylalanine, tryptophane, histidine, arginine). Selon les pays, cette sauce de poissons porte différentes dénominations (Tableau 8).

Tableau 8. Dénomination de la sauce de poisson selon les pays

Pays	Nom	Références
Birmanie	Nga-pya-ye	Hariono <i>et al.</i> , 2005
Chine	Yu-lu	Jiang <i>et al.</i> , 2007
Corée	Aek-jeot	Lopetcharat et Park, 2002
Indonésie	Bakasang	Ijong et Ohta., 1995
Japon	Shottsuru	Lopetcharat et Park, 2002
Malaisie	Budu	Hariono <i>et al.</i> , 2005
Philippines	Patis	Brillantes, 1999
Thaïlande	Nam pla	Brillantes, 1999
Vietnam	Nuoc-mam	Lopetcharat et Park, 2002

Au Vietnam, le nuoc-mam est une sauce épicée à base de poisson fermenté et préparée selon des méthodes traditionnelles. C'est un ingrédient indispensable de la cuisine vietnamienne. Les meilleurs nuoc mam proviennent de Phu Quoc, une île à 45 km de la côte sud-ouest du Vietnam et de la ville de Phan Thiet, à 250 km au nord-est de Ho Chi Minh ville (Figure 5).



Figure 5. Carte du Vietnam

Le nuoc-mam est obtenu par protéolyse enzymatique de poissons dans une saumure à forte concentration saline. Le procédé de fabrication de la sauce de poisson est simple: le poisson est mélangé avec du sel dans une cuve en bois ou un réservoir en béton et il y est maintenu immergé dans la saumure qui se crée. La fermentation du mélange se fait sans autre intervention à température ambiante. La durée de fermentation pour les petits poissons est plus courte que pour les grands poissons et varie de 6 à 12 mois (Hjalmarsson *et al.*, 2007).

Le produit résultant 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 (Figure 6).



Figure 6. Sauce de poisson

6.2. Matières premières utilisées pour la production de sauce de poisson

Les matières premières entrant dans la fabrication du nuoc-mam sont le poisson et le sel. Généralement, des petits poissons de peu de valeur sont utilisés. Ces poissons peuvent être d'eau douce ou d'eau salée, mais aujourd'hui, la majorité des sauces est élaborée à partir de poissons marins. Les poissons utilisés sont généralement les anchois, les harengs, les sardines, ...mais actuellement les sauces à base d'anchois (*Stolephorus spp*) ont la préférence des consommateurs.

Plusieurs études ont démontré que ces sauces traditionnelles pouvaient être élaborées avec d'autres matières premières tels que des déchets de filetage de la morue Atlantique ou du saumon Atlantique et de co-produits obtenus pendant la production de surimi de merlan du Pacifique (Gildberge, 1989, Gildberg, 2001). Les co-produits de thon issus des usines de transformation

peuvent être également utilisés. Ils possèdent en effet une haute teneur en protéines et sont donc considérés comme appropriés pour ce type de production (Cha et Cadwallader., 1998; Soyiri *et al.*, 2003; Dissaraphong *et al.*, 2006). Pour ces déchets de thon il a également été montré qu'une hydrolyse enzymatique contrôlée permettait d'obtenir un liquide ayant une composition chimique et des caractéristiques relativement semblables à la sauce de poisson avec notamment une haute teneur en azote total et en azote d'acides aminés (Dissaraphong *et al.*, 2006).

Certaines populations apprécient particulièrement ces sauces de poisson élaborées à partir de matières premières spécifiques. Ainsi, en Corée, la sauce de poisson produite à partir des branchies de morue est très recherchée.

6.3. Hydrolyse des protéines du poisson pendant la production de sauce de poisson

Le principe de la production de sauce de poisson repose sur l'hydrolyse enzymatique des protéines du poisson en présence de grandes quantités de sel.

Traditionnellement, la sauce de poisson est produite en mélangeant une partie de sel avec trois parties de poisson puis en laissant la fermentation se dérouler à la température tropicale ambiante. Ces proportions sel/poisson varient cependant d'un pays à l'autre.

Pendant la fermentation, la protéolyse s'effectue par les protéases endogènes du muscle de poisson et des organes digestifs mais aussi par les protéases produites par des bactéries halophiles (Gildberg et Thongthai, 2001; Rustad, 2003; Tungkawachara *et al.*, 2003). Cette hydrolyse est bien évidemment progressive :

Protéines → polypeptides → peptides à faible poids moléculaire → acides aminés.

Les protéases principalement impliquées sont : la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, et la cathepsine. Les fortes teneurs en sel des saumures diminuent l'activité des 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). Certains travaux visant à réduire la durée de ce processus de maturation ont montré que l'adjonction de viscères de poissons (Kim *et al.*, 1997 et Morioka *et al.*, 1999), l'ajout d'enzymes commerciales exogènes (Aquerreta *et al.*, 2002) ou la réduction de la concentration de sel sous les 20% (Gildberg et Thongthai, 2001; Morioka *et al.*, 1999) étaient efficaces.

6.4. Influence de divers facteurs sur l'hydrolyse des protéines et la qualité de la sauce de poisson

Comme l'élaboration des sauces de poissons résulte d'une protéolyse enzymatique, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influer sur la qualité du produit fini notamment : la température, le pH, la concentration en sel mais aussi sa pureté, la qualité des matières premières utilisées.

6.4.1. Influence de la matière première

La qualité des poissons à savoir leur composition chimique proximale, leur fraîcheur et leur taille sont des paramètres importants à considérer. Fort logiquement, plus les poissons utilisés sont riches en protéines plus la sauce de poisson résultante sera riche en acides aminés. Néanmoins, une trop forte teneur en lipides des poissons entraîne une diminution de qualité de la sauce à cause des phénomènes d'oxydation qui interviennent pendant la maturation.

Seule l'utilisation de poissons frais permet l'obtention de sauces ayant une odeur et un goût caractéristiques. Un mauvais état de fraîcheur comme par exemple une trop forte teneur en ammoniacque influence négativement la qualité de la sauce.

Enfin, plus les poissons sont de grande taille, plus long sera le processus de maturation.

Idéalement, il convient donc d'utiliser préférentiellement des poissons frais, de petite taille, riches en protéines mais pauvres en lipides (poissons maigres).

6.4.2. Influence de la concentration saline et de la composition du sel employé

Le sel est une matière première indispensable pour la fabrication de sauce de poisson car il contribue à la prévention de la détérioration des poissons. En effet, une haute concentration en sel (20% à 30%) freine la prolifération bactérienne et donc l'altération des poissons. Cependant, de trop fortes concentrations en sel peuvent s'avérer inhibitrices de l'activité enzymatique en général et particulièrement 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.*, 2006). Mais de trop faibles concentrations peuvent s'avérer néfastes car le développement bactérien n'est plus limité entraînant notamment l'apparition d'odeurs indésirables.

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.

Enfin, 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.

6.4.3. Influence de la température

Comme la maturation résulte d'un processus d'hydrolyse enzymatique, la température pendant le processus de maturation est donc un paramètre clé. Dans une certaine limite (de 30 à 50°C), la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à la température. Quand la température dépasse cette valeur haute, la vitesse d'hydrolyse non seulement n'augmente plus mais elle peut même diminuer par dénaturation thermique des enzymes. A l'inverse, en deçà d'une certaine valeur, la protéolyse sera plus longue.

6.4.4. Influence du 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 pepsines qui fonctionnent parfaitement au pH naturel de la chair du poisson.

6.5. Composition chimique de la sauce de poisson

6.5.1. Substances azotées

Les substances azotées sont les principaux composants des sauces de poisson sous forme d'acides aminés, de peptides, d'ammoniaque et d'autres substances azotées (notamment des acides nucléiques tels que l'inosine, l'hypoxanthine, l'inosinemonophosphate, l'adénosinemonophosphate). Les acides aminés sont largement majoritaires et représentent de l'ordre de 45-55% de la teneur totale en substances azotés. Ce sont eux qui vont déterminer la

valeur nutritive de la sauce de poisson et particulièrement les acides aminés essentiels. Cependant, il est rare que la protéolyse soit totale c'est pourquoi des peptides sont encore présents dans les sauces. Ainsi, pour la sauce de poisson, les dipeptides et tripeptides représentent encore de 5 à 15% de la teneur totale en substances azotées. De trop fortes teneurs en peptides de grands poids moléculaire sont toutefois préjudiciables car d'une part elles peuvent provoquer l'apparition d'amertume et d'autre part elles sont propices au développement bactérien.

Quelles que soient les précautions prises lors de la fabrication des sauces de poisson, l'ammoniaque sera toujours présent dans le produit final.

6.5.2. Substances volatiles

L'odeur et la saveur de la sauce de poisson sont principalement dues à des substances volatiles tels les acides volatils (l'acide acétique, acide propionique, acide butyrique, acide iso butyrique), les aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, propionaldéhyde...), les cétones, les amines...

Comme ce sont l'odeur et la saveur de la sauce qui influencent l'acceptabilité du produit par le consommateur, il convient de prendre en compte et de maîtriser ces différents composés volatils.

6.5.3. Autres substances

La sauce de poisson est très riche en sels minéraux d'importance en nutrition humaine. En plus des 240 à 280 g de chlorure de sodium par litre qu'elle contient, des ions chlore et sodium, du phosphore (300mg/l), du calcium (350 mg/l) du magnésium (1,3 g/l), du soufre (environ 2g de soufre minéral par litre) sont également présents.

CHAPITRE 2. HYDROLYSE DE LONGUE DURÉE DE LA TÊTE, LA QUEUE ET LES VISCÈRES DE THON

1. INTRODUCTION

Ce chapitre est dédié à la conduite d'hydrolyses enzymatiques de co-produits de thon jaune (*Thunnus albacares*) issus de l'industrie de transformation vietnamienne à savoir la tête, la queue et les viscères. L'objectif principal de cette étude est de déterminer si, par le biais de l'hydrolyse enzymatique, il est possible de générer des fractions potentiellement valorisables par la suite.

Les expérimentations sont toutes conduites en laboratoire mais toujours en gardant à l'esprit une transposition éventuelle à l'échelle industrielle. L'enzyme retenue est ainsi une protéase à large spectre (Protamex) utilisée dans de très nombreux procédés industriels. Le choix d'une protéase s'est imposé car les matrices étudiées sont riches en protéines. La volonté de récupérer le maximum de matière dans les phases solubles a orienté la sélection d'une protéase non spécifique capable de couper le plus grand nombre de liaisons peptidiques mais sans entraîner trop d'amertume (pénalisante pour des applications alimentaires).

Les hydrolyses ont été réalisées sur une très longue durée (12h) sans commune mesure avec ce qui se pratique à grande échelle. Cependant, l'intérêt était ici de borner le domaine d'étude en établissant notamment les cinétiques des degrés d'hydrolyse, de solubilisation de la matière et d'établir les compositions biochimiques (protéines, lipides, cendres) des fractions résultantes (phases solubles et insolubles). Certaines analyses d'ordre plus qualitatif ont même été conduites à savoir la distribution du poids moléculaire des peptides solubles, leur composition en acides aminés, le profil en acides gras.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Matériels biologiques : co-produits de thon

2.1.1. Collecte des co-produits de thon

Les thons jaunes (*Thunnus albacares*) ont été pêchés dans l'Océan Pacifique et apportés à la société de transformation des produits halieutiques de Hai Vuong de Nha Trang, dans la zone

industrielle de Suoi Dau de la province de Khanh Hoa, au Vietnam (voir la carte Figure 5). Les thons ont été filetés manuellement. A l'issue de cette étape de transformation, les têtes, viscères et queues (une vingtaine de kg) ont été récupérées séparément, congelées et transportées vers l'IFREMER de Nantes.

2.1.2. Homogénéisation

Chaque co-produit, pris séparément, a été coupé congelé en petits morceaux, puis décongelé et broyé. Le broyage des co-produits a été réalisé à l'aide d'un Blender (Waring Commercial, USA) pendant environ 10 minutes. Chaque aliquote de 500g a été placée dans un sac sous vide et conservée à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.2. Matériel enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des co-produits de thon a été réalisée à l'aide de la protéase Protamex qui est une enzyme industrielle produite par génie génétique par Novozymes AS (Bagsvaerd, Danemark). Cette enzyme est, en fait, 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'hydrolyse sont faibles. Protamex correspond à un mélange des enzymes Alcalase et Neutrase. Aussi possède-t-elle les numéros enzymatiques suivants : EC3.4.21.62 et EC3.4.24.28.

Protamex est standardisée par le fournisseur en unités Anson par g (AU/g). L'activité déclarée de Protamex est de 1,5 AU /g. Les conditions optimales de son fonctionnement sont une température comprise entre 35°C et 60°C et un pH compris entre 5,5 et 7,5. Protamex peut être inactivée à 85°C pendant 10 minutes lorsque le pH est de 8.

2.3. Hydrolyse enzymatique des co-produits de thon

Avant les opérations d'hydrolyse, la matière première est mise à décongeler toute une nuit dans un réfrigérateur à 4°C. Elle est ensuite introduite dans un réacteur à double enveloppe et homogénéisée avec un volume égal d'eau distillé (agitation continue à 300 rpm). Lorsque la température intérieure du réacteur atteint 45°C, l'enzyme Protamex est ajoutée à raison de 0,1% du poids de la matière première. L'hydrolyse est alors réalisée pendant 12 heures sous agitation en maintenant une température de 45°C mais en laissant libre le pH (le pH initial mesuré a été de

6,3 à 6,5). Des prélèvements réguliers (120 ml) toutes les heures sont alors effectués et immédiatement portés à 95⁰C pendant 15 minutes afin de procéder à l'arrêt de la protéolyse par dénaturation thermique de l'enzyme. La solution est alors centrifugée (10 000g, 4⁰C, 30 minutes) afin de récupérer d'une part le surnageant (fraction protéique soluble) et le culot (fraction insoluble). Ces fractions sont ensuite lyophilisées et conservées à 4°C pour analyse.

2.4. Analyses biochimiques

2.4.1. Dosage de la teneur en eau

La teneur en eau des échantillons est déterminée par dessiccation à l'étuve à 105⁰C ± 2°C selon le mode opératoire suivant:

Une coupelle métallique est séchée environ 30 minutes à 105⁰C ± 2°C et refroidie dans un dessiccateur. Elle est ensuite tarée à 0,5 mg près. 3g d'échantillon sec (ou 10 g d'échantillon humide) sont pesés dans cette coupelle et placés dans l'étuve à 105⁰C pendant 6 heures minimum. La coupelle est ensuite déposée dans un dessiccateur jusqu'à son retour à température ambiante puis pesée sur une balance de précision à 0,5mg près, L'échantillon est séché jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La teneur en eau de l'échantillon est calculée par la formule suivante :

$$X = \frac{(G_1 - G_2).100}{G_1 - G}(\%)$$

X : Teneur en eau (%).

G : La masse de la coupelle (g)

G₁: La masse de la coupelle et de l'échantillon avant séchage (g)

G₂: La masse de la coupelle et de l'échantillon après séchage (g)

2.4.2. Dosage de la teneur en cendres

La teneur en cendres a été déterminée en incinérant des échantillons dans un four à 600⁰C.

Un creuset en porcelaine est tout d'abord séché dans une étuve à 105⁰ C ± 2°C pendant environ 30 minutes puis refroidi dans un dessiccateur. Ce creuset est ensuite taré soigneusement à 0,5 mg près. 3g d'échantillon sec ou 10 g d'échantillon humide sont pesés précisément dans ce creuset. Le tout est alors introduit dans un four à 600°C ± 5°C et incinéré jusqu'à l'obtention de

endres blanches ou gris clair (en moyenne 4 à 5h). Le creuset contenant les cendres est alors placé dans un dessiccateur pour retour à température ambiante puis pesé.

La teneur en cendre de l'échantillon est calculée par la formule suivante:

$$X = \frac{(G_2 - G) \cdot 100}{G_1 - G} \%$$

X: Teneur en cendres (%).

G: Masse du creuset à vide (g).

G₁: Masse du creuset et de l'échantillon (g)

G₂: Masse du creuset et de la cendre blanche (g)

2.4.3. Analyse des lipides

2.4.3.1. Extraction 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.

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

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

M_0 : Masse d'échantillon (g)

M_1 : Masse du ballon vide (g).

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

Les lipides sont repris dans un certain volume de chloroforme afin d'obtenir la concentration désirée. Ils sont ensuite stockés à l'abri de la lumière à - 20 °C.

2.4.3.2. Fractionnement des lipides en chromatographie liquide sur colonne

Les lipides totaux sont fractionnés en différentes classes (lipides neutres, glycolipides et phospholipides) en fonction de leur polarité par chromatographie solide/liquide sur colonne ouverte. Cette méthode est basée sur la différence de degré d'adsorption de composés lipidiques sur des phases mobiles et fixes. Dans le cas présent, les composés lipidiques vont réagir différemment en fonction de la polarité du solvant d'élution.

Dans une colonne (diamètre interne: 8 -10 mm, longueur: 20 cm) contenant de la laine de verre est introduite de la silice activée (une nuit à 100°C). La quantité de silice introduite est calculée de façon à ce que le rapport silice/extrait lipidique soit de 30/1. Le gel de silice est introduit dans la colonne à l'aide de chloroforme. Ce gel est ensuite drainé avec une faible quantité de chloroforme afin de le rincer et de stabiliser la colonne. Le solvant récupéré lors de cette étape est jeté. L'extrait lipidique est ensuite introduit dans la colonne en utilisant le chloroforme comme éluant. Différents éluants sont ensuite introduits dans la colonne en générant ainsi un gradient de polarité négatif (du plus polaire au moins polaire). Les fractions correspondant à l'élution de ces solvants sont ensuite récupérées et quantifiées par évaporation du solvant. Les fractions sont ensuite conservées dans un volume connu de chloroforme et stockées à -20°C. Les solvants, les classes de lipides associées et les volumes utilisés sont consignés dans le Tableau 9.

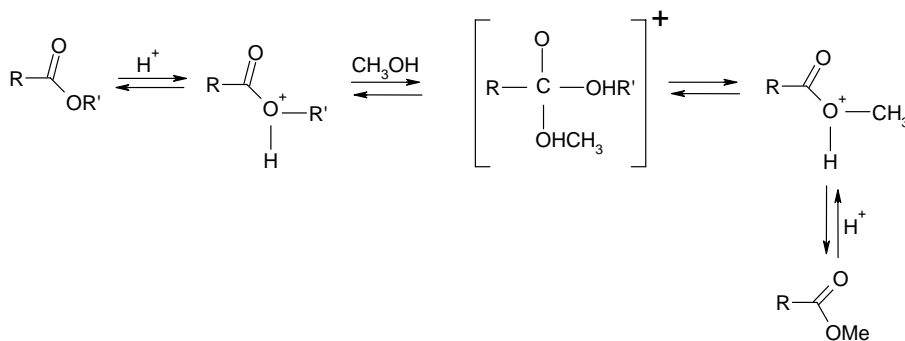
Tableau 9. Solvants utilisés en fonction des classes de lipides en chromatographie liquide sur colonne ouverte

Classe de lipides	Solvant	Ratio solvant / extrait lipidique (ml/mg)
Lipides neutres (LN)	Chloroforme	1,5
Glycolipides (GL)	Acétone/méthanol (9/1, v/v)	1,5
Phospholipides (PL)	Méthanol	1

2.4.3.3. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

**Dérivation des acides gras*

Pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse, les acides gras doivent être dérivés. Plusieurs dérivations sont possibles, différant selon le type de résidu greffé sur la fonction ester de l'acide gras. Ces transformations vont nécessiter des coûts, des installations, des durées de préparation et d'analyse différents. Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont aisés à préparer et à analyser, et possèdent de plus l'avantage de pouvoir être analysés avec plusieurs types de détection. La méthode de dérivation utilisée ici est une méthylation par le méthanol sulfurique avec une hydrolyse acide des lipides par l'acide sulfurique et une méthylation des acides gras par le méthanol. Le schéma réactionnel de cette réaction est le suivant:



L'acide margarique (C17:0, Sigma, France) est ajouté comme standard interne afin de s'affranchir des pertes occasionnées pendant la dérivation et l'injection. Les échantillons destinés à la méthylation sont placés dans les tubes (400 µg de lipides totaux). 100 µl (40 µg) d'acide

margarique (C17 :0, 400 µl/ml) sont ajoutés à chaque échantillon comme standard interne. Le solvant est évaporé sous azote, puis 5 ml d'une solution de méthanol anhydre contenant 2% d'acide sulfurique concentré sont ajoutés et les tubes sont fermés hermétiquement. Après une nuit à 50°C et refroidissement, 1 ml d'eau distillée puis 2 ml d'hexane sont ajoutés. Le système est alors biphasique. Après agitation du mélange et décantation, la phase hexanique (phase supérieure) est prélevée pour être soumise à une chromatographie en phase gazeuse.

**Analyse des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) par chromatographie en phase gazeuse (CPG)*

L'objectif est de séparer et quantifier les acides gras méthylés à l'aide d'une colonne capillaire très polaire.

Les échantillons (phase supérieure de la transméthylation directe des lipides) sont introduits dans les tubes. Ces tubes sont bouchés hermétiquement et placés sur le plateau du chromatographe en phase gazeuse. L'appareillage utilisé est un chromatographe en phase gazeuse Perkin Elmer Autosystem. La détection à ionisation de flamme (FID) est utilisée. Le système d'injection est un système à large volume d'injection. Avec cet équipement, les volumes injectés peuvent varier de 0,1 à 50 µl suivant les seringues utilisées. Les échantillons sont injectés dans une chambre de mélange maintenue à 55°C. Cette chambre est sous la forme d'un liner de longueur 8,5 cm et de diamètre interne de 2 mm comprenant de la laine de verre sylanisée pour permettre l'homogénéisation de l'échantillon lors de sa vaporisation et avant son entrée dans la colonne.

La colonne est une colonne capillaire très polaire (BPX 70, SGE) de 60 m de long et avec un diamètre interne de 0,25 mm. Le gaz vecteur circulant à l'intérieur de la colonne est l'hélium et la pression en tête de colonne est de 1,72 bar. La température du détecteur placé en sortie de colonne est de 300°C et reste fixe pendant toute la durée de l'élution. Le détecteur est relié à un système d'acquisition et de traitement du signal. Les profils chromatographiques sont traités à l'aide du logiciel Galaxie dans lequel sont calibrés 45 acides gras standard rencontrés fréquemment dans les matières premières marines. De cette façon, les quantités d'acides gras pourront être déterminées par rapport à la quantité totale d'acides gras présents.

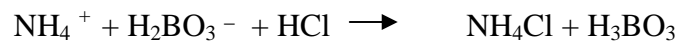
2.4.4. Analyse des protéines

2.4.4.1. Dosage de l'azote total

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl (Crooke et Simpson (1971)).

- Principe de la méthode Kjeldahl:

L'échantillon est minéralisé à l'aide d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré en présence d'un catalyseur ($\text{K}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$, 5/2). L'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 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) 1M.



- Mode opératoire :

Environ 1 g de matière sèche (MS), ou 4 g 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 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 10 M de façon à obtenir un volume total de 80 ml. La distillation est réalisée et stoppée lorsque le volume de distillat atteint 150 ml. La titration de l'azote par l'acide chlorhydrique 1N est alors réalisée. Le volume ajouté est noté V (en ml).

La teneur en azote total est donné par la formule : $\%N = (1,4 * V) / M$

V : Le volume de HCl 1N

M : La masse d'échantillon introduite dans le tube.

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.

2.4.4.2. Analyse des acides aminés

La composition en acides aminés est analysée par chromatographie en phase gazeuse (CPG-FID). 10mg d'échantillons lyophilisés sont hydrolysés à l'aide de 200 µl de HCl 6N dans des ampoules scellées sous vide, 24h à 110°C dans un bain à sec. Les échantillons hydrolysés sont ensuite séchés sous azote et dilués en ajoutant 2,5 ml d'eau distillée. L'analyse des acides aminés a été réalisée en utilisant la procédure EZ:Faast (Phenomenex, des Etats-Unis) consistant en une étape d'extraction de phase solide suivie d'une dérivatisation et de l'extraction liquide/liquide. Une aliquote de la phase organique qui contient les acides aminés dérivés est analysé sur un système CPG-FID (Perkin Elmer Autosystem XL). Les acides aminés sont identifiés par leurs temps de rétention, et quantifiés par une courbe d'étalonnage et leur facteur de réponse par rapport au standard interne (la norvaline ajoutée à une concentration de 200µmol/l dans chaque échantillon).

2.4.4.3. Analyse des poids moléculaires des peptides solubles par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Le profil de distribution du poids moléculaire des hydrolysats protéiques de co-produits de thon est déterminé par chromatographie d'exclusion moléculaire à haute performance. La séparation a été obtenue à l'aide d'une colonne (Superdex peptide 10/300GL). La colonne a été calibrée à l'aide des standards suivants: Ribonuclease (13700 Da), Aprotinin (6500 Da), Renin (1760 Da), Vasopressine (1084 Da) et Leucine (294 Da).

L'échantillon (50 µl d'une solution à 2mg/ml) est élué par une phase mobile constituée d'un tampon NaCl 50 mM contenant 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Le débit d'élution est de 0,5 ml/min et les composés sont détectés par une lecture de la densité optique à 214 nm. Les données sont ensuite traitées sous MATLAB.

2.4.5. 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. A 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 au cours de l'hydrolyse, le surnageant est dilué au 1/200 ème. 1ml de surnageant dilué est ajouté à 1ml de solution de tetraborate de sodium (2%). Après agitation, 0,25 ml de solution de 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB/ethanol : 0,013/1, v/v) sont ajoutés. Les échantillons sont chauffés à 60°C pendant 10 minutes. Après le refroidissement, 2 ml d'acide hydrochlorique 10 N 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):

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

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

2.4.6. Détermination de la récupération de l'azote

La récupération de l'azote des co-produits de thon dans la fraction soluble a été calculée selon la formule suivante (Benjakul et Morrissey, 1997):

$$NR (\%) = \frac{\text{Azote total dans la fraction soluble}}{\text{Azote total dans le co-produit}} \times 100$$

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Caractérisation biochimique des co-produits de thon

La composition biochimique des différents co-produits de thon est présentée dans le Tableau 10.

Tableau 10. Composition biochimique des co-produits de thon (*Thunnus albacares*)

Co-produits de thon	Eau (%)	Protéine (%)	Lipide (%)	Cendre (%)
Tête	59,0 ± 1,1	14,8 ± 0,1	13,5 ± 0,1	11,8 ± 1,1
Viscères	77,4 ± 0,1	16,0 ± 0,2	3,7 ± 0,5	1,9 ± 0,2
Queue	58,2 ± 2,0	17,4 ± 0,2	3,3 ± 0,4	20,5 ± 0,4

A la lecture de ces résultats il ressort que tous les co-produits contiennent une grande quantité d'eau (58-77%) et une quantité moyenne de protéines de 15-17%. Ils diffèrent surtout par leur teneur en lipides et en cendres. En effet, si les viscères et les queues ne contiennent pas plus de 4% de lipides, les têtes semblent être au moins 3 fois plus riches (13%). En ce qui concerne les teneurs en cendres les différences sont plus marquées: elles varient de 2% (viscères) à 20% (queues).

Les teneurs en lipides des têtes et des viscères trouvées ici sont du même ordre que celles trouvées par Vlieg et Murray (1988) dans les têtes et les viscères du thon *Thunnus alalunga* (13,6 et 4,1%, respectivement). Par contre, la tête de thon *Thunnus alalunga* présentait une teneur en protéines plus élevée (19,5%) et une teneur en cendres plus faible (5,7%) que celles notées dans cette étude. Ceci confirme bien la variabilité du vivant et notamment la variabilité biochimique.

3.2. Hydrolyse enzymatique des co-produits de thon

Ces dernières années, de très nombreux travaux ont porté sur l'hydrolyse des co-produits de poisson (Aspmo *et al.*, 2005; Daukšas *et al.*, 2005; Sathivel *et al.*, 2005a ; Gbogouri *et al.*, 2006 ; Dumay *et al.*, 2006, Dumay 2006; Souissi *et al.*, 2007; Dumay *et al.*, 2009 ; Kechaou *et al.*, 2009).

Comme toutes matières premières biologiques, les co-produits de thon possèdent des activités enzymatiques et notamment des activités protéolytiques. Ainsi, les principales protéases identifiées dans ces matrices marines sont de type protéase acide (pepsine), protéase sérique

(trypsine, chymotrypsine, élastase), protéase cystéique (calpaïne) et métallo protéase (collagénase) (Dumay, 2006). Cependant, il convient de préciser que c'est majoritairement dans les viscères que ce type d'activité protéolytique a été identifié et que, à notre connaissance, très peu d'études ont mentionné d'activité de ce genre dans la tête ou la queue de poisson. En ce qui concerne le thon, les principales enzymes digestives identifiées sont la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine (Klomklao *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2007; Nalinanon *et al.*, 2008).

Dans cette étude, les co-produits de thon n'ont pas été chauffés avant l'hydrolyse, les enzymes endogènes étaient donc toujours actives. Il a été établi que les conditions d'activité optimale de la trypsine et de la chimotrypsine isolées à partir des viscères de thon étaient obtenues pour des $\text{pH} > 8$ et pour une température de l'ordre de 55°C (Klomklao *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2007). Quant à la pepsine, son activité est maximale à un pH de 2 et une température de 50°C (Nalinanon *et al.*, 2008). Les conditions expérimentales retenues pour cette étude (pH de l'ordre de 6,4, température de 45°C) ne permettent donc pas une activité optimale des enzymes endogènes des viscères de thon. Cependant, à l'exception notable de la pepsine qui, compte tenu de son pH de fonctionnement, est vraisemblablement inactivée, les autres enzymes impliquées (à savoir la trypsine et la chimotrypsine) ont vraisemblablement participé à la protéolyse générale des viscères. Il convient néanmoins de relativiser l'importance que peuvent avoir ces enzymes endogènes. En effet, des travaux précédents, effectués au laboratoire, (Dumay, 2006, Kechaou *et al.*, 2009) ont révélé qu'une inactivation préalable de ces enzymes n'entraînait pas de modification considérable de la cinétique d'hydrolyse des viscères de sardine ou de seiche par l'enzyme Protamex.

Enfin, il est important de signaler ici que l'inactivation thermique des enzymes endogènes entraîne des changements de conformation des protéines et donc de la cinétique de protéolyse par des enzymes exogènes. Comme l'objectif de ce travail est de proposer, à terme, un procédé simple et économique transférable à l'industrie pour la valorisation de ces déchets, l'inactivation préalable des enzymes endogènes n'a pas été retenue.

Parallèlement à l'activité des enzymes endogènes, le problème de la contamination bactérienne susceptible d'intervenir au cours d'une telle hydrolyse (12h, 45°C) s'est posé car aucun « traitement » antibactérien n'a été utilisé. Cependant, 45°C est une température modérée, nécessaire à la conduite de l'hydrolyse mais suffisante pour maintenir à un minimum le potentiel de croissance des bactéries.

Les composés microbiens qui peuvent se former pendant le processus d'hydrolyse affectent l'odeur des produits (en raison des mélanges complexes de composés volatils comme

des composés de type carbonyle non saturé et des alcools avec 6, 8 ou 9 atomes de carbone). Cependant, même au bout de 12h de réaction et quelque soit les co-produits hydrolysés, aucune modification significative de l'odeur globale n'a été perçue, confirmant ainsi une prolifération bactérienne réduite dans nos conditions opératoires.

3.2.1. Degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH) exprimé en pourcentage permet d'évaluer de façon globale l'action des enzymes sur le substrat et l'efficacité du procédé d'hydrolyse. Il est en effet le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques coupées lors de l'hydrolyse et le nombre de liaisons peptidiques totales du substrat. Il renseigne donc de manière indirecte sur la longueur des peptides résultants et donc sur leurs propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et sensorielles (Kristinsson et Rasco, 2000a; Klompong *et al.*, 2007).

Les co-produits de thon étudiés ici peuvent être divisés en 2: des co-produits dits « mous » à savoir les viscères et des co-produits « durs » telles la queue et la tête qui sont constitués de matériel plus résistant à la protéolyse à savoir les os. Cependant, quelque soit le co-produit hydrolysé, sous l'action de l'enzyme, une liquéfaction des matrices s'opère conduisant à l'apparition d'un liquide brunâtre. L'évolution du degré d'hydrolyse (DH) obtenu lors de l'hydrolyse des têtes, viscères et queues de thon est indiquée sur la Figure 7.

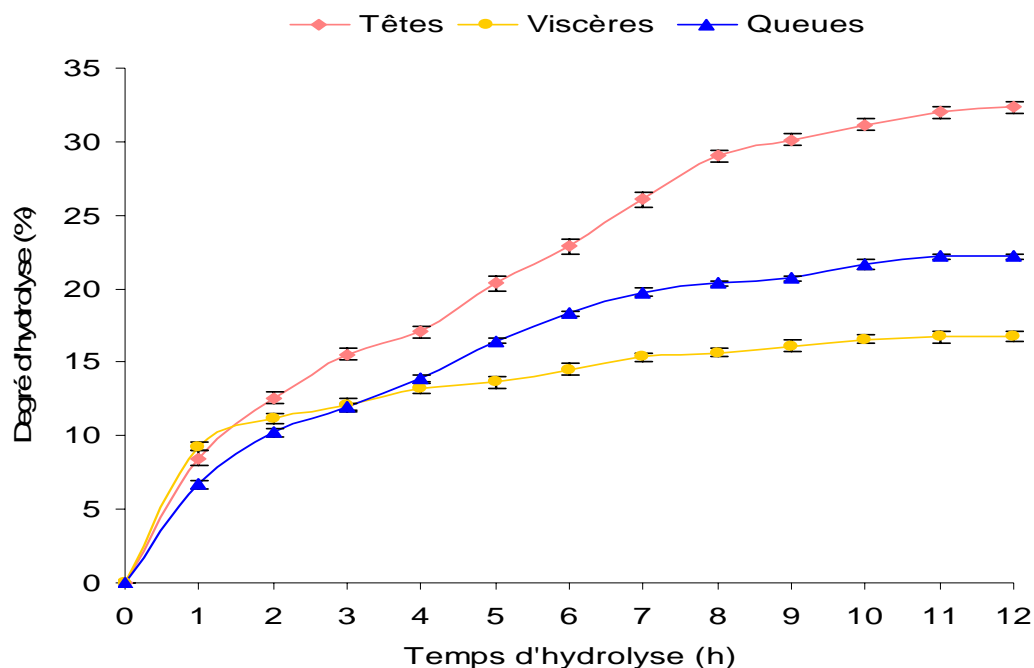


Figure 7. Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) pendant 12 h à 45°C, sans contrôle de pH

Fort logiquement, le degré d'hydrolyse augmente avec le temps d'hydrolyse mais de manière différente selon les co-produits. Ainsi, si toutes les courbes traduisent une augmentation rapide initiale du DH suivie d'un ralentissement, la phase stationnaire n'est pas atteinte en même temps. En effet, si un plateau est observé après 9 heures d'hydrolyse pour les viscères, il faut respectivement 10h et 11h de réaction pour les queues et les têtes pour obtenir cette phase stationnaire.

L'allure générale de ces cinétiques est classique et s'apparente à celles décrites dans la littérature notamment pour des produits et co-produits marins: estomacs de thon (Guérard *et al.*, 2001; Guérard *et al.*, 2002), têtes et muscles de harengs (Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999; Sathivel *et al.*, 2003), muscles de saumon (Kristinsson et Rasco, 2000a; Kristinsson et Rasco, 2000b), têtes de saumon (Gbogouri *et al.*, 2004; Sathivel *et al.*, 2005a), muscles de morue (Ravallec-Plé *et al.*, 2000), têtes et viscères de sardine (Dumay, 2006; Souissi *et al.*, 2007; Kechaou *et al.*, 2009). Cette cinétique en 3 temps s'explique par le fait que, dans une première phase, la vitesse de réaction est rapide et correspond à la rupture des liaisons peptidiques accessibles facilement, la seconde étape (ralentissement) correspond à l'hydrolyse de protéines plus compactes, la troisième phase (plateau) traduit le fait que l'enzyme n'est plus capable de couper de liaisons peptidiques. Cependant, d'autres paramètres peuvent influencer sur cette cinétique. Par exemple l'augmentation de la teneur en peptides solubles dans le milieu réactionnel, peptides qui sont susceptibles d'agir comme des inhibiteurs de la réaction de protéolyse (Shahidi *et al.*, 1995; Souissi *et al.*, 2007); mais aussi, une inactivation partielle de l'enzyme Protamex au cours du temps n'est pas à exclure (Guérard *et al.*, 2002).

Les degrés d'hydrolyse maximaux obtenus au bout de 12h de réaction ne sont pas identiques selon les co-produits, ce qu'avaient déjà montré plusieurs travaux précédents (voir Tableau 11). Dans cette étude, pour les têtes, un maximum de 32,3% est obtenu après 12h, tandis que pour les queues, ce maximum est de 22,2%. Par contre, en ce qui concerne les viscères, le DH maximal n'est que de 17%. Il y a donc une « sensibilité » du substrat à la protéolyse et notamment une différence entre les co-produits mous et durs. Les tissus de type viscères semblent plus résistants à l'action des enzymes protéolytiques exogènes, ce qu'avaient déjà illustré certains auteurs (Ravallec Plé *et al.*, 2001; Dumay 2006; Kechaou *et al.*, 2009). De telles variations entre les DH maximaux observés traduisent bien une forte influence de la nature du substrat, principalement par la nature protéique de leurs tissus.

Tableau 11. Degrés d'hydrolyse maximaux obtenus sur des co-produits marins

Enzyme	Substrat	Température (°C)	pH	Ratio enzyme/substrat	Temps d'hydrolyse (h)	DH maximal obtenu (%) [DH maximal obtenu après inactivation des enzymes endogènes]	Références
Alcalase	Estomac de thon	50	8	0,2-3%	5,5	23%	Guérard <i>et al.</i> , 2001
	Viscères de sardine	50	8	0,1%	24	3% [11%]	Dumay, 2006
	Viscères de seiche	50	8	0,1%	24	7%	Kechaou <i>et al.</i> , 2009
	Viscères et têtes de sardine	40	8	5%	2	11%	Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2001
	Muscle de morue	40	8	1,0%	2	24,3%	Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2000
	Hareng	50	8	0,5%	1	36%	Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999
	Truite	58	8	1,0%	2	7,8%	Al-Sayed Mahmoud <i>et al.</i> , 2008
	Têtes de sardine	50	8	0,1%	24	15%	Dumay, 2006
	Têtes de saumon	50	8	0,5%	0,8	10,5% [8,8%]	Sathivel <i>et al.</i> , 2005a
Protamex	Viscères de sardine	50	8	0,1%	24	3% [6%]	Dumay, 2006
	Viscères de seiche	50	8	0,1%	24	3%	Kechaou <i>et al.</i> , 2009
	Truite (40g)	40	6	0,7g	2	2,3%	Al-Sayeed Mahmoud <i>et al.</i> , 2008
	Têtes de sardine	50	8	0,1%	24	20%	Dumay, 2006
Flavourzyme	Viscères de sardine	50	8	1,5%	24	2% [6%]	Dumay, 2006
	Viscères de seiche	50	8	1,5%	0	7%	Kechaou <i>et al.</i> , 2009
	Têtes de sardine	50	8	1,5%	24	17%	Dumay, 2006
Neutrase	Truite	50	7,5	1,0%	2	3,2%	Al-Sayeed Mahmoud <i>et al.</i> , 2008
Umamizyme	Estomac de thon	45	7	1,5%	4	22,55%	Guérard <i>et al.</i> , 2002
Pepsine	Raie	37	2,5	1,0%	2	15,88%	Pastoriza <i>et al.</i> , 2003
Papaine	Raie	65	6,3	1,0%	2	15,59%	Pastoriza <i>et al.</i> , 2003

3.2.2. Distribution de la matière sèche dans les fractions obtenues après hydrolyse des co-produits de thon

La distribution de la matière sèche au sein des fractions solubles et insolubles obtenues après centrifugation et lyophilisation est représentée sur la Figure 8.

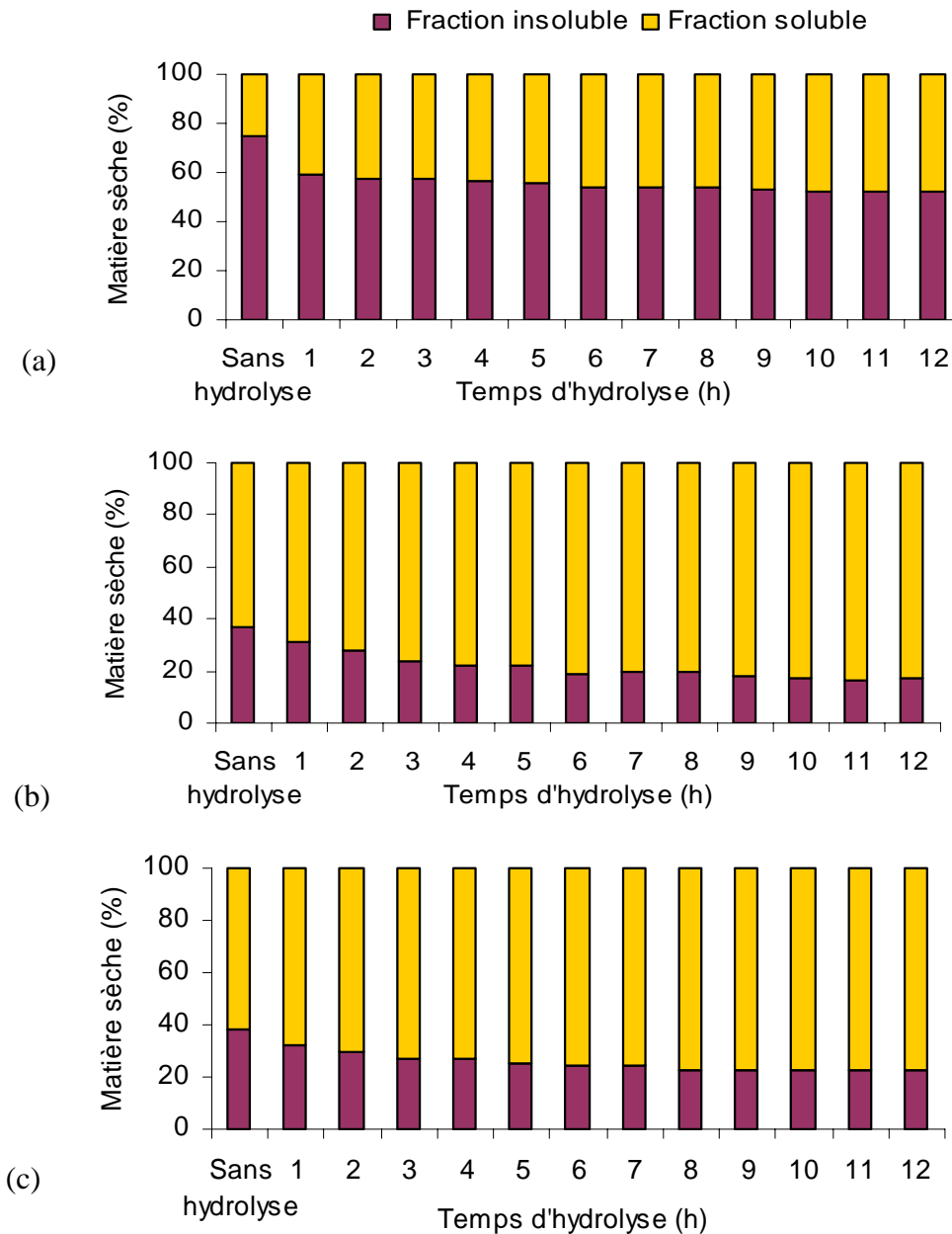


Figure 8. Distribution de la matière sèche dans les fractions solubles et insolubles pour les têtes (a), viscères (b) et queues (c) de thon non hydrolysées et hydrolysées par Protamex (0,1%) pendant 12 h à 45°C, sans contrôle de pH

Avant même l'hydrolyse, de grandes disparités sont observées selon les co-produits. Ainsi pour les têtes de thon, seuls 25% de la matière sèche sont retrouvés dans la fraction soluble (75% restent dans le culot) alors que pour les viscères et les queues, une grande partie de la matière sèche est retrouvée dans la fraction soluble avant hydrolyse: 63 et 61,4% respectivement.

Fort logiquement, le taux de matière sèche dans la fraction soluble augmente avec l'avancement de la protéolyse. Ainsi, au bout des 12 heures d'hydrolyse, le taux de matière soluble a presque doublé pour les têtes (48,2%) et a fortement augmenté pour les viscères et les queues (83,1 et 77,7%). Le premier effet de Protamex est donc de permettre comme attendu une liquéfaction des matrices et une solubilisation de la matière.

Comme l'enzyme utilisée est une protéase, la matière première solubilisée doit être majoritairement des protéines que l'on va retrouver sous forme de peptides voire d'acides aminés libres. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus précédemment au laboratoire (Dumay *et al.*, 2004; Dumay *et al.*, 2006; Dumay, 2006; Kechaou *et al.*, 2009) mais aussi par d'autres équipes (Aspmo *et al.*, 2005). Il est toutefois remarquable qu'après 12h de protéolyse, plus de la moitié de la matière constitutive des têtes de thon (52%) reste insoluble. Cela s'explique en partie par la présence d'os et de tissus conjonctifs peu sensibles à l'action de Protamex (Dumay, 2006).

3.2.3. Composition chimique des fractions obtenues après hydrolyse des co-produits de thon

Le Tableau 12 présente la composition chimique des fractions solubles et insolubles après 12 heures d'hydrolyse.

Comme attendu, quels que soient les co-produits hydrolysés, les fractions solubles sont majoritairement constituées de protéines (72 à 83%). Par contre, ils apparaissent pauvres voire très pauvres en lipides (1 à 3,4%). Ces résultats illustrent donc l'efficacité de Protamex sur l'hydrolyse de protéines mais aussi son « inefficacité » sur la récupération des lipides (les lipides sont restés dans les fractions insolubles). Ces valeurs sont semblables à celles obtenues dans des études précédentes où la teneur en protéines des fractions solubles étaient de 62,3 à 91,6 % (Sathivel *et al.*, 2003; Gbogouri *et al.*, 2004; Sathivel *et al.*, 2005a; Sathivel *et al.*, 2005b; Šližyte *et al.*, 2005a; Šližyte *et al.*, 2005b; Šližyte *et al.*, 2005c) et la teneur en lipides était de 1,6 % pour les arêtes de saumon (Liaset *et al.*, 2003) et de 0,4 à 1,5 % pour les co-produits de hareng

(Sathivel *et al.*, 2003). Cependant, ces résultats diffèrent de certains obtenus au laboratoire sur des viscères de sardine où des teneurs en lipides plus élevées (21%) ont été trouvées dans la fraction soluble (Dumay, 2006). La composition du substrat (composition proximale, nature des tissus,...) influence donc fortement le processus de protéolyse et donc la composition des fractions résultantes.

Tableau 12. Composition chimique des fractions solubles et insolubles obtenues après 12h d'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

Fractions	Co-produits	Composition chimique (% par rapport à la matière sèche)		
		Protéines	Lipides	Cendres
Solubles	Tête	72,1 ± 1,1	1,5 ± 0,2	23,7 ± 0,3
	Viscère	82,8 ± 1,0	3,4 ± 0,5	5,8 ± 0,1
	Queue	82,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	14,7 ± 0,1
Insolubles	Tête	23,6 ± 0,8	63,1 ± 0,9	8,6 ± 0,1
	Viscère	47,7 ± 0,2	42,7 ± 0,9	7,3 ± 0,2
	Queue	46,2 ± 0,2	31,6 ± 0,5	17,2 ± 0,2

Dans notre étude, la teneur en protéines a augmenté tandis que la teneur en lipides a diminué dans la fraction soluble par comparaison avec les matières premières initiales non hydrolysées. En effet, la protéolyse a conduit à un enrichissement par un facteur 2 de la teneur en protéines pour la fraction soluble des têtes de thon (36g de protéines par 100 g de têtes sèches et 72,1g de protéines par 100 g de fraction soluble sèche) et une réduction par 22 de la teneur en lipides (33g de lipides par 100 g de têtes sèches et 1,5g de lipides par 100 g de fraction soluble sèche). Des résultats semblables ont été obtenus pour l'hydrolyse des queues de thon où un enrichissement par 2 de la teneur en protéines (42 à 82,7%) et une réduction par 8 de la quantité de lipides (7,8 à 1%) ont été observés. Cependant, ce n'était pas le cas des viscères où seule une légère augmentation de la teneur en protéines a pu être observée (de 71 à 82,8%) mais la grande réduction de lipides a été confirmée (de 16,5 à 3,4%). Ces résultats sont conformes à ceux présentés précédemment dans la littérature (Shahidi *et al.*, 1995; Benjakul et Morrissey, 1997; Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999; Gbogouri *et al.*, 2004).

Si la teneur élevée en protéines dans les fractions solubles est un résultat de la solubilisation des protéines pendant l'hydrolyse (Benjakul *et Morrissey*, 1997), la faible teneur en lipides malgré la déstructuration des tissus peut être due à une « exclusion des lipides avec les protéines insolubles » lors des processus de centrifugation (Nilsang *et al.*, 2005).

Les teneurs en cendres des fractions solubles obtenues après hydrolyses des co-produits de thon varient de 5,8% (viscères) à 23,7% (têtes) ce qui est logique et fortement lié à la composition proximale des matrices (Liceaga-Gesualdo *et al.*, 1999; Kristinsson *et al.*, 2000b; Sathivel *et al.*, 2003; Sathivel *et al.*, 2004; Sathivel *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les fractions insolubles (culots) obtenues après hydrolyses des co-produits, elles s'avèrent relativement riches en lipides (31,6-63,1%) avec des teneurs moyennes en protéines (23,6-47,7%) et en cendres (8,6-17,2%). Ce fort enrichissement en lipides par rapport au matériel initial peut être du à la formation de complexes entre ces lipides et certaines protéines ou peptides de grande taille (Liaset *et al.*, 2003). D'autre part, pendant l'hydrolyse, les membranes cellulaires des muscles ont tendance à se regrouper et à former des vésicules insolubles qui vont former des « boulettes » lors de la centrifugation et se retrouver dans le culot (Shahidi *et al.*, 1995, Benjakul *et Morrissey*, 1997).

Compte tenu de la grande variabilité de composition biochimique de ces fractions, de nombreuses applications peuvent être envisagées comme par exemple l'alimentation humaine ou animale (Yu *et Tan*, 1990; Yu *et Kaur*, 1992; Cahu *et al.*, 1999; Oliva-Teles *et al.*, 1999; Refstie *et al.*, 2004) ou encore mettre à profit leur richesse en azote pour la croissance des bactéries (Dufossé *et al.*, 1997; Guérard *et al.*, 2001, Martone *et al.*, 2005) ou pour l'agriculture (Kurbanoglu *et al.*, 2002).

3.2.4. Récupération de l'azote dans la fraction soluble

Le degré d'hydrolyse est utilisé comme l'indice de clivage des liaisons peptidiques tandis que la récupération de l'azote (solubilisation de l'azote ou protéines) reflète le taux des protéines qui peuvent être « récupérées » (sous entendu dans la fraction soluble) au cours d'une hydrolyse (Benjakul *et Morrissey*, 1997). Ce taux de solubilisation de l'azote est un des principaux paramètres étudiés lors de processus de protéolyse (Shahidi *et al.*, 1995; Benjakul *et Morrissey*, 1997; Kristinsson *et Rasco*, 2000a; Liaset *et al.*, 2002; Guerard *et al.*, 2002; Pastoriza *et al.*,

2003; Sathivel *et al.*, 2005a; Aspino *et al.*, 2005). La Figure 9 illustre ce taux de récupération pour les 3 co-produits étudiés.

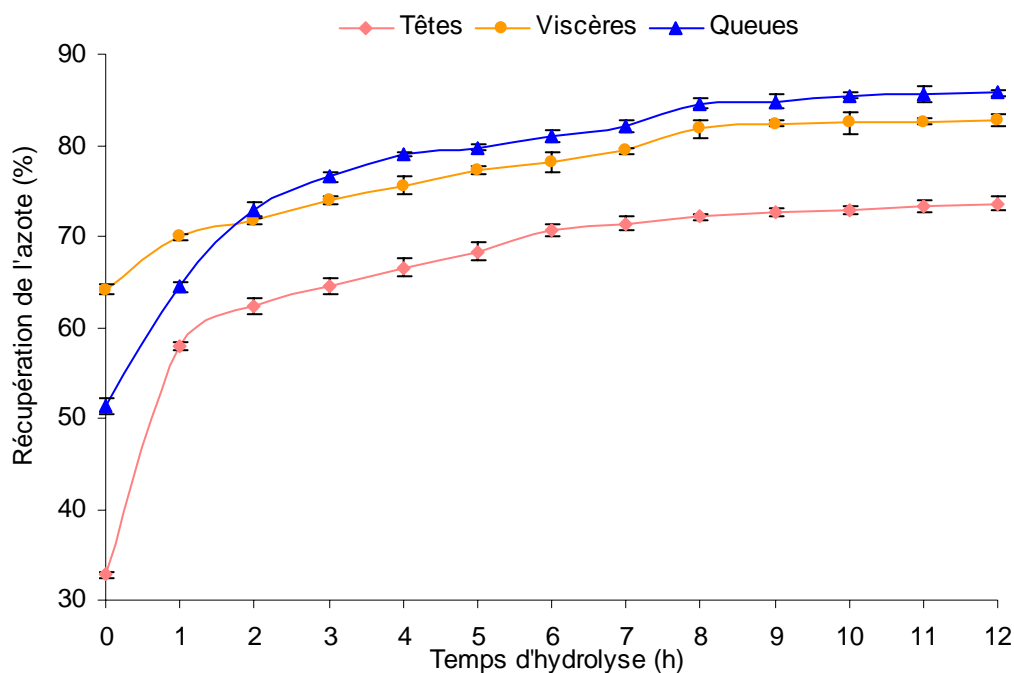


Figure 9. Récupération de l'azote au cours de l'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) pendant 12 h à 45°C, sans contrôle de pH

Comme attendu, la récupération de l'azote dans les fractions solubles augmente lorsque la protéolyse progresse et ce quelles que soient les matrices étudiées. Cependant, avant que ne démarre l'hydrolyse, une fraction non négligeable de l'azote se trouve (déjà) dans la fraction soluble : 32,8%, 64,2% et 51,3%, pour les têtes, viscères et queues respectivement. Le fort taux obtenu pour les viscères est très certainement lié à la grande richesse en enzymes endogènes de cette matrice et a déjà été observé pour des viscères de seiche et de sardine (Kechaou *et al.*, 2009).

Pour les 3 co-produits l'augmentation de l'azote soluble intervient principalement au cours des 8 premières heures de l'hydrolyse pour atteindre 72,1% pour les têtes, 81,8 % pour les viscères et 84,6% pour les queues. Les 4 dernières heures ne permettent qu'une très légère augmentation du taux de récupération : +1,5% pour les têtes, +0,9% pour les viscères et 1,2% pour les queues. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus lors d'études précédentes sur des co-produits de poisson (Liaset *et al.*, 2002; Pastoriza *et al.*, 2003; Aspino *et al.*, 2005). A chaque fois, il est observé une réaction initiale rapide qui voit le clivage des chaînes polypeptidiques

« lâches » puis dans une deuxième phase, les protéines plus « compactes » sont digérées (Diniz et Martin, 1997; Aspmo *et al.*, 2005).

La nature du substrat influe bien évidemment sur la récupération de l'azote au cours de l'hydrolyse. Ainsi, comme indiqué précédemment (Aspmo *et al.*, 2005, Šližyte *et al.*, 2005a), les matrices riches en tissus conjonctifs seront moins sensibles à cette protéolyse. Cependant, comme indiqué par Šližyte *et al.* (2005b), la teneur en lipides du substrat semble également influencer; ainsi, plus le taux de matière grasse sera élevé moins le rendement de solubilisation de l'azote sera bon.

Dans cette étude, la récupération de l'azote intervient principalement au cours des 8 premières heures de l'hydrolyse. Ensuite, malgré une augmentation continue du degré d'hydrolyse, la solubilisation de l'azote (donc des protéines) n'évolue guère. Ceci traduit donc le fait que Protamex n'est plus capable de solubiliser les protéines des 3 co-produits mais reste active en coupant des liaisons peptidiques de protéines déjà solubilisées, entraînant ainsi une diminution de la taille moyenne des peptides des surnageants.

3.2.5. Distribution du poids moléculaire des peptides

Les hydrolysats protéiques des co-produits de thon ont été séparés en utilisant la chromatographie d'exclusion moléculaire à haute performance pour comparer la composition de taille des peptides. La Figure 10 présente un exemple de profil de chromatographie (viscères). La distribution du poids moléculaire des hydrolysats des têtes, des viscères et des queues de thon sont représentés sur les Figures 11, 12 et 13.

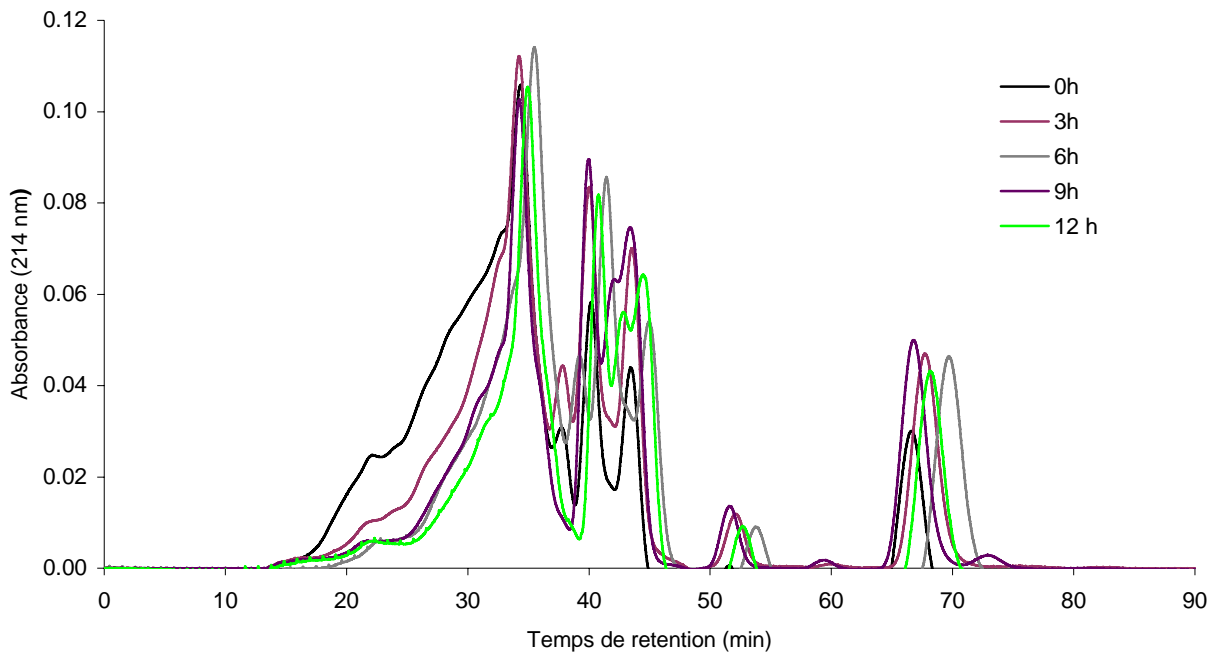


Figure 10. Profil de chromatographie des hydrolysats des viscères de thon après hydrolyses avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

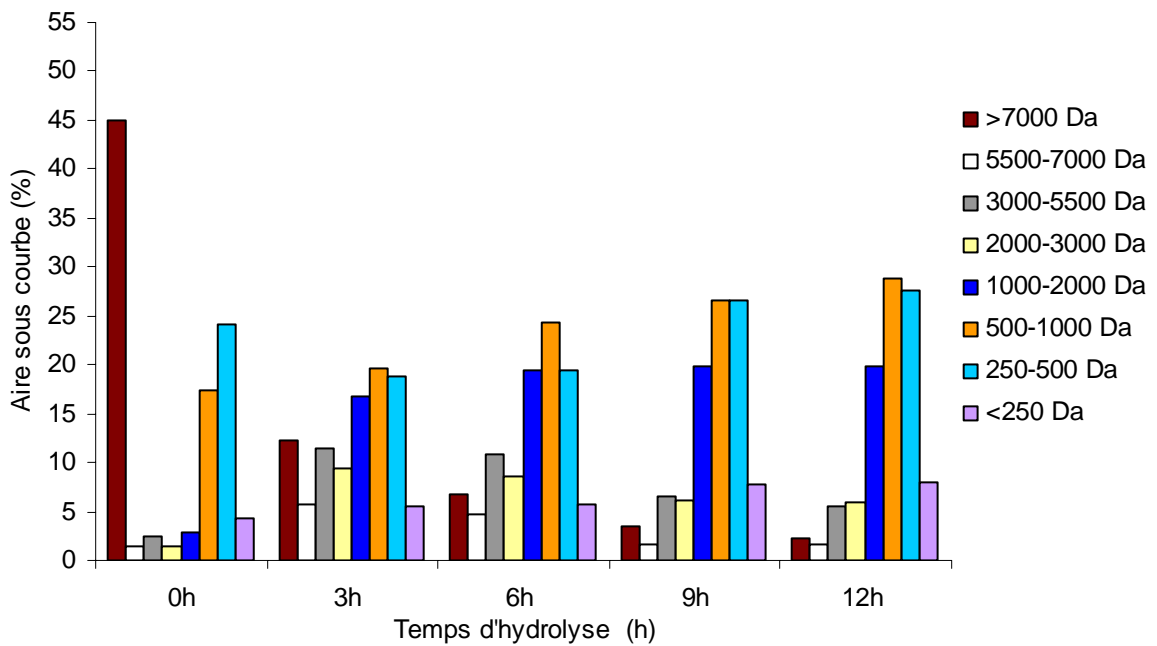


Figure 11. Distribution du poids moléculaire des peptides de l'hydrolysat de têtes de thon. L'hydrolyse est conduite avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

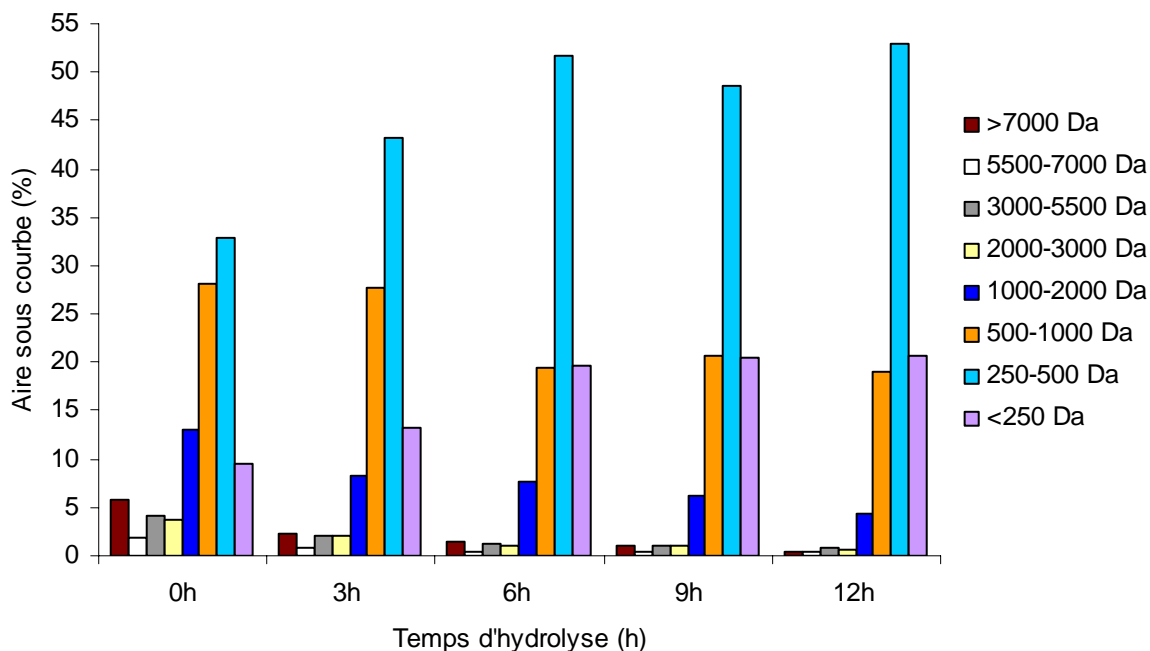


Figure 12. Distribution du poids moléculaire des peptides de l'hydrolysate de viscères de thon. L'hydrolyse est conduite avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

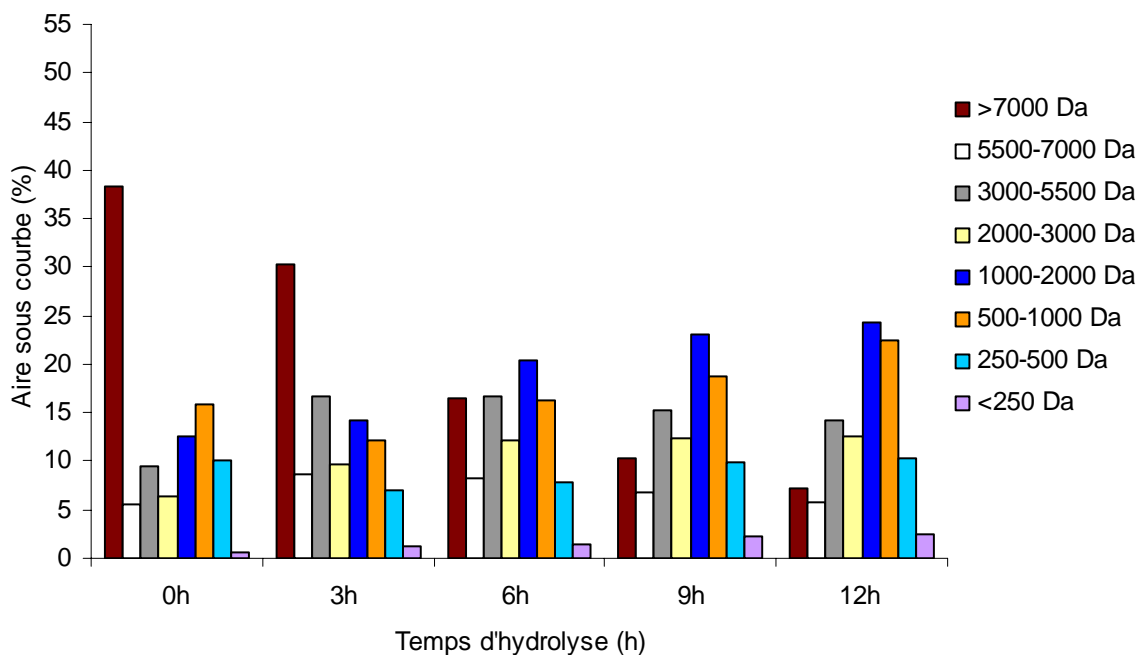


Figure 13. Distribution du poids moléculaire des peptides de l'hydrolysate de queues de thon. L'hydrolyse est conduite avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

Comme attendu, plus la protéolyse est longue, plus les peptides sont petits. En effet, la protéolyse en rompant les liaisons peptidiques a non seulement contribué à la solubilisation des protéines mais elle a aussi généré des peptides de plus en plus petits. Avant l'hydrolyse 45% et 38,3% des peptides contenus dans les surnageants de tête et de queue respectivement ont des poids moléculaires supérieurs à 7000 Dalton (Da) alors qu'ils ne représentent que 5,8% des peptides de viscères (84% étaient inférieurs à 2000 Da). Au cours de l'hydrolyse, quel que soit le co-produit, la teneur des peptides supérieurs à 3000 Da dans les hydrolysats a diminué. Ainsi, après 12h d'hydrolyse, de tels peptides ne représentent plus que 10% des peptides totaux dans l'hydrolysats des têtes de thon et moins de 2% dans l'hydrolysats des viscères mais 27,3% dans l'hydrolysats des queues. En ce qui concerne les hydrolysats de viscères, ceux-ci au bout de 12h sont constitués à 92,5% de peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 Da.

La distribution moléculaire des peptides d'un hydrolysats permet d'appréhender les voies de valorisation potentielles. En effet, une corrélation est très souvent observée entre cette taille et les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de ces hydrolysats: solubilité, stabilité thermique, capacité de rétention d'eau...Les propriétés biologiques éventuelles des ces hydrolysats (antioxydante, antihypertensive, immunomodulante, antiprolifératrice...) sont aussi dépendantes de la taille moyenne des peptides mais aussi de leur composition en acide aminés (Ravallec-Plé *et al.*, 2001; Je *et al.*, 2005; Kim et Mendis, 2006; Picot *et al.*, 2006; Benjakul *et Morrissey*, 1997, Je *et al.*, 2007, Guérard *et al.*, 2001; Guérard *et al.*, 2002; Aspino *et al.*, 2005).

Ces résultats confirment bien l'intérêt de combiner plusieurs analyses tels le degré d'hydrolyse, le taux de récupération de l'azote et la distribution des poids moléculaires pour caractériser un hydrolysats.

3.2.6. Composition en acides aminés dans la fraction soluble obtenue après hydrolyse des têtes de thon

La composition en acides aminés des fractions solubles avant et après protéolyse n'a été établie que pour les têtes de thon; elle est présentée dans le Tableau 13.

Fort logiquement, d'un point de vue quantitatif, la protéolyse permet d'augmenter fortement la teneur en acides aminés totaux dans les fractions solubles : 2,18 mmol/g de matière sèche avant réaction, 4,89 mmol /g de matière sèche après 6h, et 5,46 mmol/g de matière sèche après 12h d'hydrolyse.

Tableau 13. Composition en acides aminés dans la fraction soluble avant et après protéolyse des têtes de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

Acides aminés (mmol/g de matière sèche)	Avant protéolyse	Après protéolyse	
		6 h	12 h
Alanine	0,31	0,55	0,67
Acide aspartique	0,14	0,38	0,42
Cystine	0	0,01	0,01
Acide glutamique	0,25	0,6	0,53
Glycine	0,65	1,33	1,52
Histidine	0,07	0,08	0,13
Isoleucine	0,05	0,12	0,18
Leucine	0,11	0,23	0,3
Lysine	0,06	0,16	0,18
Méthionine	0,04	0,12	0,11
Ornithine	0	0	0,08
Phénylalanine	0,04	0,12	0,13
Proline	0,21	0,52	0,54
Serine	0,08	0,23	0,17
Thréonine	0,08	0,22	0,19
Tyrosine	0,01	0,03	0,06
Valine	0,08	0,19	0,24
Acides aminés essentiels (AAE)	0,53	1,24	1,46
Acides aminés total (AAT)	2,18	4,89	5,46
AAE/AAT (%)	24,3	25,4	26,8

Au niveau qualitatif, tous les acides aminés n'ont pas « augmenté » de manière identique. Cette augmentation est particulièrement sensible pour l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine et la valine qui sont des acides aminés essentiels pour l'homme. Avant l'hydrolyse, la teneur en acides aminés essentiels dans la fraction soluble était de 0,53 mmol/g matière sèche (ce qui représente 24,3% des acides aminés totaux quantifiés). Sous l'action de l'enzyme Protamex, cette teneur a atteint 1,24 mmol/g matière sèche (représentant

25,4% des acides aminés totaux) après 6 h d'hydrolyse et 1,46 mmol/g matière sèche (représentant 26,8% des acides aminés totaux) après 12h d'hydrolyse.

Il est intéressant de constater qu'avant l'hydrolyse seuls 15 acides aminés ont été détectés dans la fraction soluble, mais ils sont 16 après 6h d'hydrolyse (apparition de la cystine) et 17 au bout de 12h (apparition de l'ornithine).

Les acides aminés majoritaires dans la fraction soluble après 12h de réaction sont : la glycine (27,8%), l'alanine (12,3%), et la proline (9,9%) et l'acide glutamique (9,7%).

L'enrichissement des surnageants en acides aminés essentiels au cours d'une protéolyse n'est pas nouveau. Ainsi cela a été déjà observé lors de l'hydrolyse de co-produits de calmar et de sardine (Lian *et al.*, 2005, Kechaou *et al.*, 2009). Il a même été établi que la durée de l'hydrolyse avait un effet notable sur la libération de certains acides aminés et donc sur les activités biologiques éventuelles des hydrolysats (Wu *et al.*, 2003).

Ces aminogrammes mettent en évidence la bonne valeur nutritionnelle des hydrolysats obtenus après 6 ou 12h d'hydrolyse et laissent augurer de leur potentiel en alimentation humaine ou animale notamment aquacole.

3.2.7. Distribution de lipides

La distribution des lipides dans les fractions obtenues après hydrolyses enzymatiques des co-produits de thon est représentée dans le Tableau 14.

Tableau 14. Distribution des lipides (% des lipides totaux) dans les fractions obtenues après 12h d'hydrolyse des co-produits de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

Fractions	Têtes	Viscères	Queues
Soluble	2,1 ± 0,2	20,4 ± 1,6	10,2 ± 0,2
Insoluble	97,9 ± 1,4	79,6 ± 1,5	89,8 ± 1,1

Quelle que soit la matrice étudiée, après 12h d'hydrolyse, les lipides sont majoritairement retrouvés dans les fractions insolubles (environ 98, 80 et 90% des lipides totaux pour les têtes, les viscères et les queues respectivement). Cette profonde modification de la distribution des lipides

est l'effet le plus notable des hydrolyses conduites ici. Ces données confirment certains résultats obtenus après hydrolyse d'arêtes de saumon et de viscères de morue où les lipides ont été retrouvés à une très large majorité dans les fractions insolubles (Liaset *et al.*, 2003, Daukšas *et al.*, 2005). Cependant, de précédents travaux effectués au laboratoire avec la même enzyme et portant sur la protéolyse de co-produits de morue et de sardine avaient montré qu'une grande quantité de lipides pouvaient être récupérée dans les fractions solubles (Dumay *et al.*, 2004; Dumay *et al.*, 2006; Dumay, 2006; Dumay *et al.*, 2009). Un travail récent a même confirmé que la rupture des tissus suite à une protéolyse pouvait conduire à une libération des lipides dans la fraction soluble (Kechaou *et al.*, 2009). Il semble que ce ne soit pas le cas ici et que la distribution des lipides après hydrolyse soit fortement dépendante de la matrice étudiée et de sa composition de protéines et lipides.

3.2.8. Distribution des différentes classes de lipides des fractions obtenues après hydrolyse des têtes de thon

Tout comme pour les acides aminés, seules les fractions résultantes de l'hydrolyse de la tête de thon ont été analysées pour établir la répartition des lipides en classe. Cette distribution est présentée sur la Figure 14.

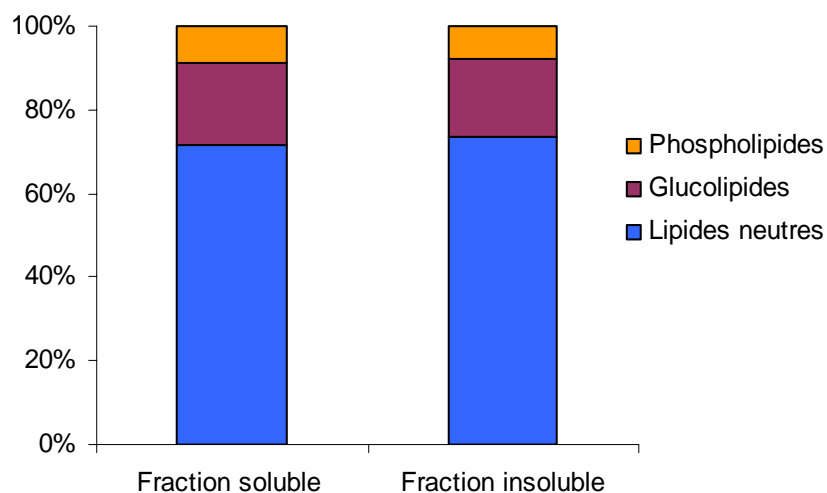


Figure 14. Distribution des différentes classes de lipides des fractions générées après 12h d'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C sans contrôle de pH

L'analyse des résultats révèle que la protéolyse n'a pas modifié profondément la distribution des classes de lipides et que le surnageant et le culot, après 12h d'hydrolyse, ont comme lipides majoritaires des lipides neutres (71 à 74%), viennent ensuite les glycolipides (18,5 à 19,7%) tandis que les phospholipides ne représentent pas plus de 9% (7,9 à 8,9%).

Ces résultats contredisent certaines études où il avait été montré que la protéolyse affectait la répartition en classe des lipides au sein des différentes fractions (Liaset *et al.*, 2003, Dumay, 2006; Daukšas *et al.*, 2005). Cependant, il convient de signaler que pour ces études, une quantité non négligeable de lipides avait pu être récupérée dans les surnageants, ce qui n'est pas le cas ici.

3.2.9. Composition en acides gras des fractions obtenues après hydrolyse des têtes de thon

Les compositions en acides gras des lipides des deux fractions solubles et insolubles générées après 12h d'hydrolyse des têtes de thon ont été établies (Tableau 15).

Les acides gras sont majoritairement de type saturé quelle que soit la fraction étudiée : 44,6% pour le surnageant, 49,6% pour le culot tandis que les acides gras possédant une double liaison représentent 31,8 et 35,4% respectivement. Cependant si les acides gras polyinsaturés sont minoritaires ils comptent quand même pour 23,6% des lipides du surnageant et 15% des lipides du culot.

L'acide palmitique (C16:0) est l'acide gras majoritaire dans les 2 fractions et représente près du tiers des acides gras quantifiés (29 et 33,3%). L'acide oléique (C18:1c ω 9) est le deuxième acide gras le plus abondant (18 et 20,3%).

Tableau 15. Composition en acides gras (% des acides gras totaux) des fractions obtenues après 12h d'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,1%) à 45°C, sans contrôle de pH

Acides gras	Fraction soluble	Fraction insoluble
C14:0	2,7	3,0
C15:0	1,1	1,4
C16:0	29,0	33,3
C18:0	10,2	10,9
C24:0	1,6	1,0
Σ AGS (%)	44,6	49,6
C16:1 c w 7	4,8	5,6
C18:1 c w 9	18,0	20,3
C18:1 c w 7	3,7	4,1
C20:1 c w 9	2,3	2,5
C22:1 c w 9	1,6	1,6
C24:1 c w 9	1,4	1,3
Σ AGMI (%)	31,8	35,4
C18:2 c w 6	1,6	1,7
C18:3 c w 4	0,6	0,7
C18:4 c w 3	0,9	0,9
C20:4 c w 6	1,7	1,2
C22:4 c w 6	0,0	0,6
C20:5 c w 3	2,7	1,6
C22:5 c w 3	0,9	0,5
C22:6 c w 3	15,2	7,8
Σ AGPI (%)	23,6	15,0

En ce qui concerne les acides gras de la famille des ω 3, c'est le DHA (C22:6 ω 3) qui prédomine pour atteindre même 15,2% des acides gras totaux du surnageant, l'EPA (C20:5 ω 3) ne représentant que 1,6 à 2,7% des acides gras totaux. C'est pour cette famille (ω 3) que les différences les plus notables sont observées avec quasiment près du double quantifié en plus dans la fraction soluble (20% par rapport à 11%) et ce principalement à cause des teneurs en EPA et en DHA qui sont très différentes. Ces deux acides gras ont été largement étudiés pour leur fonction

biologique. Ainsi, l'EPA contribue à diminuer le taux de cholestérol et a un rôle protecteur contre les maladies cardio-vasculaires tandis que le DHA joue un rôle important dans le développement des tissus nerveux du cerveau.

Les teneurs élevées en DHA trouvées ici étaient attendues car les lipides orbitaux de thon sont connus pour en être une excellente source (Yazawa *et al.*, 1991, Chantachum *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs (Stansby *et al.*, 1990, Ando *et al.*, 1996, Shimada *et al.*, 1997) ont même constaté que la teneur en DHA dans les huiles des espèces de thon était souvent considérablement plus haute que celles de la plupart d'autres espèces et que la teneur en DHA excédait de beaucoup celle en EPA. La hiérarchisation acide palmitique, acide oléique, DHA est aussi conforme pour ce type de matériel biologique (Chantachum *et al.*, 2000; Al-Sayed Mahmoud *et al.*, 2008).

4. CONCLUSION

La conduite d'hydrolyses longue durée (12h) à l'aide d'une protéase à large spectre telle Protamex confirme la forte influence de la nature du substrat sur le processus de protéolyse, entraînant des degrés d'hydrolyse, une récupération de l'azote soluble et une distribution des lipides très différentes selon les matrices.

Comme attendu, plus la protéolyse avance plus la matière est liquéfiée. Les cinétiques d'hydrolyse traduisent toutes une réaction initiale rapide (augmentation du degré d'hydrolyse) suivi d'un ralentissement puis d'un arrêt de la solubilisation de la matière (degré d'hydrolyse constant). La protéolyse sur ces co-produits a conduit à une grande solubilisation de la matière sèche, surtout les protéines. La solubilisation des protéines est principalement arrivée durant la première période du processus d'hydrolyse. La majorité des protéines des co-produits de thon a été récupérée dans la fraction soluble après 8h d'hydrolyse par 0,1% de Protamex (72%). La réalisation d'une telle protéolyse a entraîné une augmentation du degré d'hydrolyse mais a aussi conduit à une diminution des poids moléculaires des peptides dans les hydrolysats. La majorité des peptides générés après protéolyse avaient de petits poids moléculaires (inférieurs à 3000 Da).

En ce qui concerne la composition biochimique, la composition des substrats initiaux a influencé la composition chimique des fractions résultantes. La protéolyse des têtes de thon entraîne une augmentation de la teneur en acides aminés dans la fraction soluble avec surtout une

hausse de la proportion en acides aminés essentiels. L'étude de la distribution des différentes classes de lipides révèle que les lipides neutres sont les composants principaux (71-74%) des lipides totaux dans les fractions obtenues après protéolyse des têtes des thon tandis que les phospholipides sont moins présents (8-9%). Cependant, il est intéressant de constater que ces fractions ont une teneur élevée en acides gras insaturés notamment les acides gras DHA et EPA. La protéolyse des co-produits de thon apparaît donc utile pour produire des fractions intéressantes: une fraction riche en protéines, relativement pauvre en lipides (fraction soluble) et une fraction riche en lipides et minéraux mais avec une quantité non négligeable de protéines (fraction insoluble). Ces fractions possèdent donc à priori une bonne valeur nutritionnelle et peuvent être utilisées comme des sources protéiques de bonne qualité dans un but alimentaire.

Parmi les trois co-produits de thon étudiés ici, la tête est le substrat le plus 'prometteur' en termes de valorisation potentielle. Une protéolyse de 8 heures semble en effet suffisante pour solubiliser ce qui peut l'être par 0,1% de Protamex dans les conditions opératoires utilisées ici. Ce temps d'hydrolyse peut néanmoins vraisemblablement être réduit par une augmentation du ratio enzyme/substrat (voir chapitre suivant). Les fractions résultantes (culot et surnageant) de part leur grande richesse en protéines devraient pouvoir être valorisées en alimentation humaine et/ou animale (voir chapitre suivant).

CHAPITRE 3. HYDROLYSE DES TÊTES DE THON ET VALORISATION DES FRACTIONS RÉSULTANTES

1. INTRODUCTION

Les résultats d'hydrolyse du chapitre précédent font ressortir que la tête de thon est la matrice à privilégier parmi les 3 étudiées.

Dans ce chapitre et en tenant compte des résultats du chapitre précédent, les hydrolyses sur la tête de thon uniquement vont être conduites mais en augmentant le ratio enzyme/substrat (ici 0,5% de Protamex) et sur un temps plus court (8 heures au maximum). Comme précédemment, plusieurs prélèvements seront effectués afin de caractériser la réaction d'hydrolyse et les fractions résultantes (degré d'hydrolyse, récupération de l'azote).

L'objectif de ce travail est d'étudier ici 2 voies principales de valorisation de la tête de thon après une protéolyse : l'alimentation des crevettes d'élevage tout d'abord et l'incorporation des hydrolysats dans la sauce de poisson (alimentation humaine) ensuite.

Le Vietnam est, en effet, à l'heure actuelle un des 5 plus grands pays producteurs de crevettes d'élevage (FAO, 2008). L'aquaculture s'y développe rapidement, en particulier celle de l'espèce *Penaeus vannamei* qui connaît un essor fulgurant ces dernières années. Cette forte expansion nécessite d'important besoins en farine de poisson, uniquement couverts au 1/3 par la production actuelle (Dao *et al.*, 2005). La recherche de substituts ou de compléments protéiques à cette farine est donc d'un intérêt majeur pour l'aquaculture vietnamienne. Ce travail vise ainsi à évaluer la possibilité d'incorporer des hydrolysats protéiques de tête de thon dans des aliments pour crevettes et à comparer les performances zootechniques obtenus ainsi (taux de survie, gain de poids des crevettes, taux de conversion alimentaire et coefficient d'efficacité protéique) avec celles d'élevages plus conventionnels.

L'Asie du Sud Est produit traditionnellement des sauces de poisson fermentées qui constituent un des éléments de base de la cuisine de cette région. L'évolution des goûts et la mondialisation font, qu'à l'heure actuelle, ce type de sauce est utilisé sur tous les continents et que la demande est croissante. Parmi toutes ces sauces, le nuoc-mam vietnamien est réputé pour sa qualité et donc largement exporté. Le travail présenté ici vise à étudier si les valeurs nutritionnelles et économiques d'une telle sauce peuvent être augmentées par adjonction

d'hydrolysats protéiques lors de la phase de maturation. En effet, la qualité, et donc la valeur, d'une sauce de poisson, est liée en grande partie à sa teneur en azote et particulièrement en azote aminé. Il semble donc intéressant de voir si une supplémentation en protéines de poissons plus ou moins hydrolysées peut contribuer à augmenter le taux d'acides aminés sans trop perturber les propriétés organoleptiques finales du produit. Ce travail présente donc l'étude de l'influence de l'incorporation de 3 hydrolysats de têtes de thon sur la qualité de la sauce de poisson. Les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles de ces sauces de poisson sont déterminées et comparées à celles relevées pour des sauces commerciales.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Hydrolyse des têtes de thon

Les têtes de thon broyées et décongelées sont placées dans un réacteur double enveloppe et homogénéisées avec un volume égal d'eau distillée sous une agitation constante de 300 rpm. Lorsque la température intérieure du réacteur atteint 45⁰C, l'enzyme Protamex est ajoutée à raison de 0,5% du poids de la matière première. Des hydrolyses sont alors réalisées pendant 8 heures sous agitation en maintenant une température de 45⁰C mais en laissant libre le pH (le pH initial mesuré a été de 6,3 à 6,5).

Des prélèvements réguliers (toutes les heures) de 30 ml sont effectués et immédiatement portés à 95⁰C pendant 15 minutes pour inactiver l'enzyme. La solution est alors centrifugée (10.000g, 4⁰C, 30 minutes) afin de récupérer d'une part le surnageant (fraction protéique soluble) et le culot (fraction insoluble). Ces fractions sont ensuite lyophilisées et conservées à 4⁰C pour analyse.

2.2. Production d'hydrolysats de têtes de thon

Des hydrolyses sont réalisées pendant 2, 3 et 6h. L'hydrolyse de 8 heures ne sert qu'à établir les cinétiques du degré d'hydrolyse et de la récupération de l'azote. Une vue globale du procédé est présentée sur la Figure 15 (voir Annexe A).

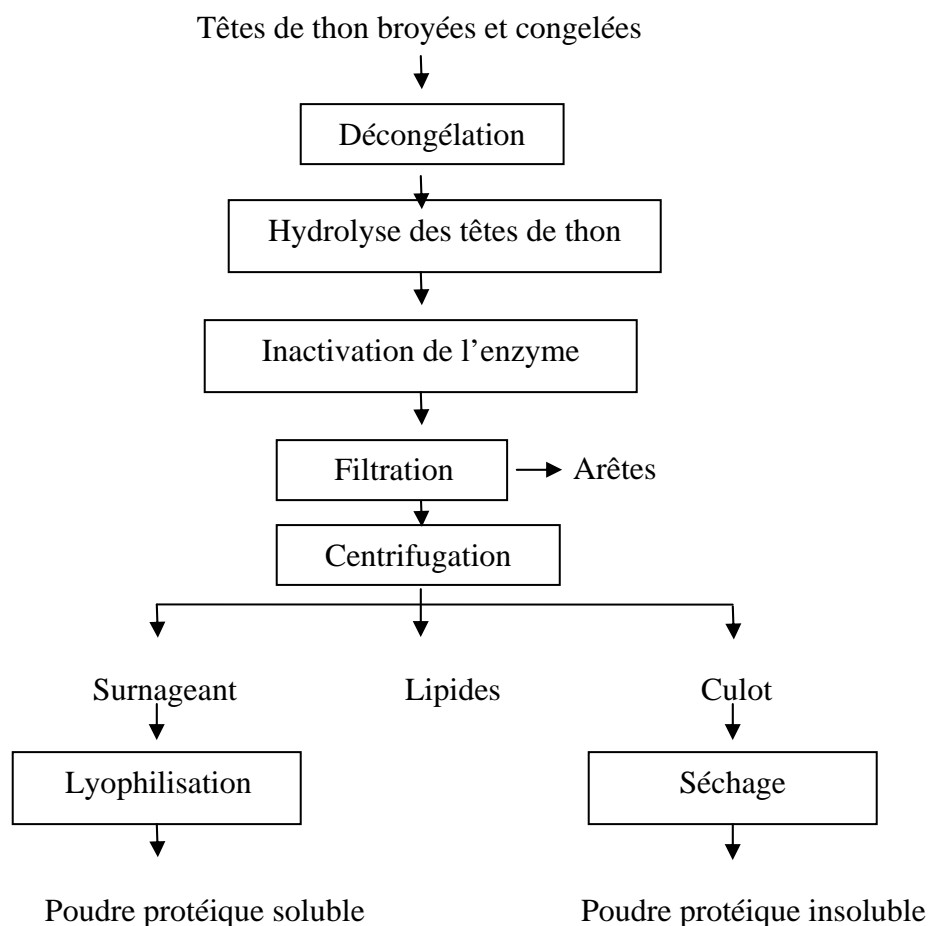


Figure 15. Production de poudre protéique soluble et de poudre protéique insoluble

Au terme de l'hydrolyse de têtes de thon avec Protamex (0,5%, 45°C, pH libre), l'enzyme est inactivée thermiquement (15min à 95°C). Le mélange est ensuite filtré sur un tamis métallique afin de séparer les arêtes. La solution (filtrat) est alors centrifugée (10 000g, 4°C, 30 minutes) conduisant à la séparation du culot (fraction insoluble) et du surnageant (fraction soluble). La lyophilisation du surnageant conduit alors à l'obtention de la poudre protéique soluble. La poudre protéique insoluble est obtenue par séchage du culot (à 40°C) puis broyage. Les 3 hydrolyses réalisées (2, 3 et 6 heures) conduisent donc aux produits suivants :

- S2, S3, S6 : Poudres protéiques solubles obtenues à partir de l'hydrolyse des têtes de thon pendant 2h, 3h et 6h, respectivement.
- C2, C3, C6 : Poudres protéiques insolubles obtenues à partir de l'hydrolyse des têtes de thon pendant 2 h, 3 h, et 6 h, respectivement.

Trois hydrolyses complémentaires ont été réalisées dans les mêmes conditions mais cette

fois il n'y a pas eu de centrifugation après l'étape de filtration (Figure 16). Le culot et le surnageant ne sont donc pas séparés comme précédemment. Le tout est lyophilisé et conduit à l'obtention de 3 « mélanges » de poudres protéiques :

- M2 : le mélange de poudre protéique obtenu à partir de l'hydrolyse des têtes de thon pendant 2h.
- M3 : le mélange de poudre protéique obtenu à partir de l'hydrolyse des têtes de thon pendant 3h
- M6 : le mélange de poudre protéique obtenu à partir de l'hydrolyse des têtes de thon pendant 6h.

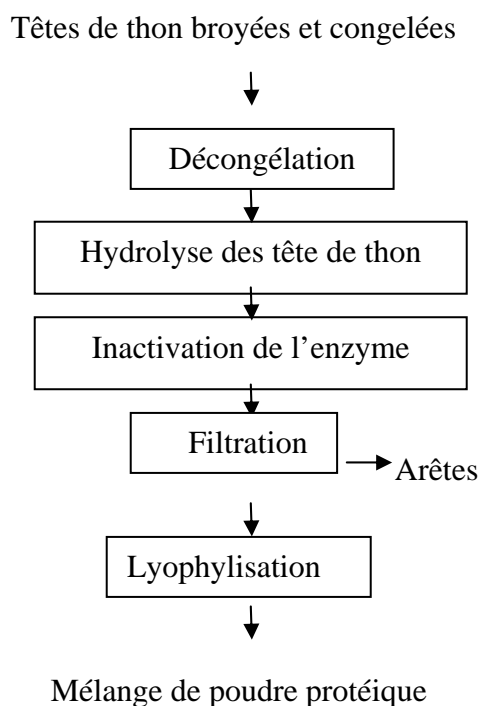


Figure 16. Production du mélange de poudre protéique

2.3. Analyses biochimiques

Les dosages de la teneur en eau, cendres, protéines et lipides sont réalisés comme mentionnés précédemment au chapitre 2. La teneur en fibres brutes et en extraits non azotés (hydrates de carbone assimilables) de l'aliment pour les crevettes est estimée selon les protocoles suivants:

2.3.1. Dosage de la teneur en fibres brutes

Principe:

Les fibres brutes sont des matières organiques restantes insolubles après le traitement de l'échantillon en milieu acide et en milieu alcalin. L'échantillon est traité successivement par des solutions bouillantes d'acide sulfurique et d'hydroxyde de sodium. Le résidu est séparé par filtration, lavé, séché, pesé et calciné à 600°C. La perte de poids résultant de la calcination correspond à la fibre brute de la prise d'essai.

Mode opératoire:

Peser 3 g de l'échantillon dans le ballon de 500 ml, à 1 mg près, ajouter 200 ml d'acide sulfurique de 1,25% et quelques gouttes d'émulsion d'antimousse dans le ballon. Porter rapidement à ébullition et laisser bouillir pendant 30 minutes exactement. Filtrer sous vide sur un filtre d'amiante. Laver le résidu par l'eau très chaude. Transférer le résidu dans le ballon. Ajouter 200 ml de solution d'hydroxyde de sodium de 1,25%. Porter rapidement à ébullition et laisser bouillir pendant 30 minutes exactement. Filtrer sous vide sur un nouveau filtre d'amiante. Laver le résidu à l'aide d'eau très chaude jusqu'à neutralité des eaux de lavage (essai au papier de tournesol). Transférer le résidu dans un creuset à incinération et sécher dans l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant. Laisser refroidir en dessiccateur et peser. Introduire ensuite le creuset dans le four et laisser calciner durant 30-60 minutes à 600 °C. Laisser refroidir en dessiccateur et peser.

La teneur en fibre brute est donnée par la formule:

$$FB (\%) = \frac{(Gd - Gc).100}{G}$$

Gd : masse après séchage (g)

Gc : masse après calcination (g)

G : Masse de l'échantillon (g)

2.3.2. Dosage de la teneur en extraits non azotés

La teneur en extraits non azoté (% par rapport à la matière sèche) de l'aliment pour crevettes peut être calculée par la formule suivante (Sudaryono *et al.*, 1996; Shapawi *et al.*, 2007):

$$\text{Extrait non azoté (\%)} = 100 - (\% \text{ protéine} + \% \text{ lipide} + \% \text{ cendre} + \% \text{ fibre brute})$$

2.4. Nutrition animale : alimentation des crevettes

2.4.1. Matériel biologique

Les crevettes utilisées pour l'expérimentation d'élevage sont des *Penaeus vannamei* de poids moyen de 4,3g, elles ont été fournies par le Centre de Recherche Appliquée à l'Aquaculture de l'Université de Nha Trang, au Vietnam (Figure 17).

Ces crevettes ont été transportées vers le laboratoire d'aquaculture à l'Université de Nha Trang.



Figure 17. Photographie des crevettes (*Penaeus vannamei*)

2.4.2. Fabrication d'aliments

2.4.2.1. Fabrication de farine de têtes de thon

Afin de valider l'intérêt de substituer tout ou partie des protéines animales dans l'aliment par des hydrolysats, des essais comparatifs sont effectués par rapport à un aliment témoin. Dans celui-ci, de la farine de tête de thon est utilisée à la place des hydrolysats. Cette farine est élaborée selon la méthode du pressage humide telle que décrite par Johnson (2002). Les têtes de thon broyées sont tout d'abord cuites à 100⁰C pendant 20 minutes dans un cuiseur à vapeur, puis pressées afin de séparer le jus de presse et le gâteau de presse. Le jus de presse (qui contient de l'eau, de l'huile, des protéines dissoutes, des vitamines, des minéraux...) est alors centrifugé pendant 10 minutes à 6000 tours par minute afin de permettre la séparation de l'huile. Le jus « maigre » résultant est ensuite concentré à l'aide d'un évaporateur jusqu'à réduire le volume de

moitié. Le concentré obtenu est ensuite remélangé avec le gâteau de presse puis séché à 40°C pendant environ 10h et broyé à l'aide d'un broyeur. Le broyat est ensuite tamisé à l'aide d'un tamis de 1mm de maille. C'est cette farine qui est ensuite employée comme témoin dans la fabrication d'aliments pour les crevettes.

Une vue globale de ce procédé est présentée sur la Figure 18 (voir Annexe B).

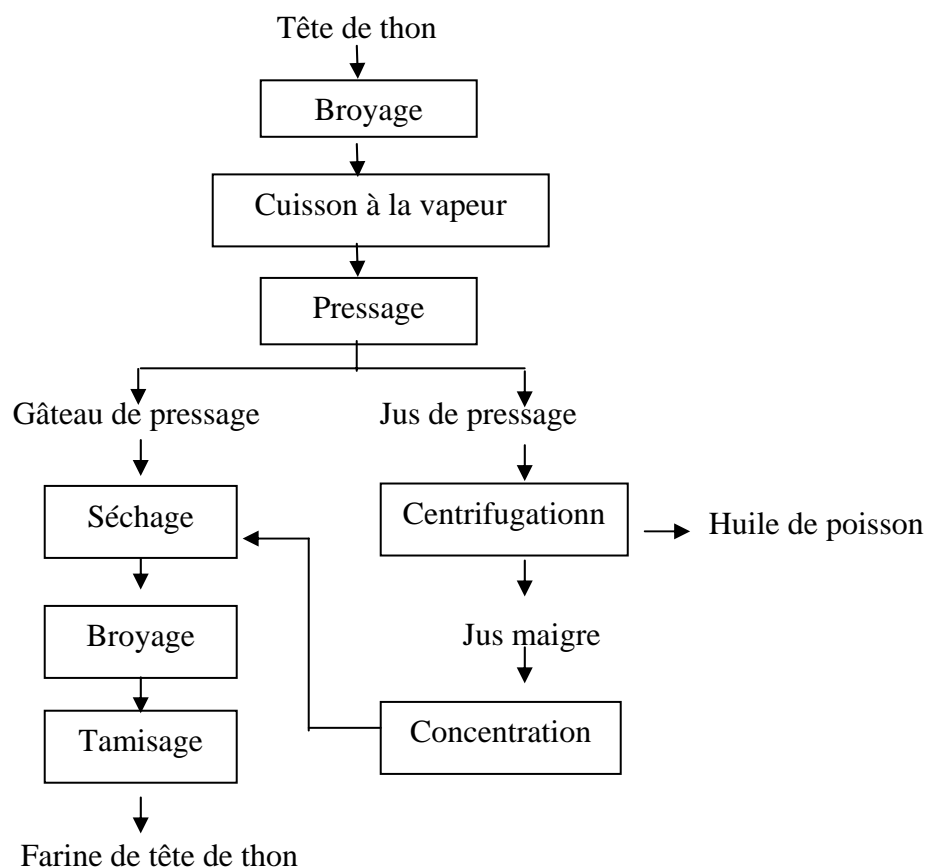


Figure 18. Procédé de fabrication de farine de têtes de thon

2.4.2.2. Formulation des aliments pour les crevettes

Quels que soient les essais réalisés au cours de cette étude, les aliments utilisés étaient constitués des éléments suivants : farine de tête de thon, tourteau de soja, son de riz, farine de blé, huile de calmar, mélange minéral et vitaminique. Outre ces matières premières, certains aliments contenaient des hydrolysats de tête de thon en substitution de 50% de la farine de tête.

Le tourteau de soja, le son de riz et la farine de blé ont été fournis par la société « Long

Hiep » (Nha Trang, Vietnam) qui produit des aliments pour crevettes. L'huile de calmar et le mélange vitaminique et minéral ont été achetés dans un magasin d'aliment destiné aux crevettes à Nha Trang. La composition du mélange vitaminique et minéral est la suivante (pour 1kg):

Vitamine A (*Rétinol*):1000000 UI, Vitamine D3 (cholécalférol): 300000 UI, Vitamine E: 2000 mg, Vitamine K3 (ménadione): 500 mg, Vitamine B1 (*thiamine*): 500 mg, Vitamine B2 (*riboflavine*): 320 mg, Vitamine B3 (*niacine*): 2000 mg, Vitamine B6 (*thiamine*): 500 mg, vitamine B7 (*inositol*): 10000 mg, vitamine B8 (*Biotine*):20mg, vitamine B9 (*Acide folique*): 200 mg, D-Calpan (vitamine B5):2500, Vitamine C (acide ascorbique): 10000 mg, Phosphore : 10000 mg, Calcium : 8000mg, Zinc :5000mg, Manganèse: 2000 mg, Magnésium: 750 mg, Choline chlorure : 5000 mg, Cobalt: 50 mg, Sélénium : 50 mg, Iode : 20 mg.

Au total, 10 aliments ont été formulés (1 aliment témoin avec la farine de tête de thon et 9 aliments contenant un des 9 hydrolysats en substitution à 50% de la farine de tête de thon). Ces 10 aliments ont été élaborés de façon à être isoprotéiques (40% de protéines par rapport à la matière sèche).

- L'aliment AT contenait uniquement de la farine de tête de thon
- Les aliments AS2, AS3 et AS6 ont été élaborés avec les surnageants d'hydrolyse, respectivement S2, S3 et S6.
- Les aliments AC2, AC3 et AC6 ont été élaborés avec les culots d'hydrolyse, respectivement C2, C3 et C6.
- Les aliments AM2, AM3 et AM6 ont été élaborés avec les mélanges surnageant/culot d'hydrolyse, respectivement M2, M3 et M6.

2.4.2.3. Fabrication des aliments pour les crevettes

Le processus global de fabrication des aliments pour crevettes est présenté sur la Figure 19 (voir Annexe C).

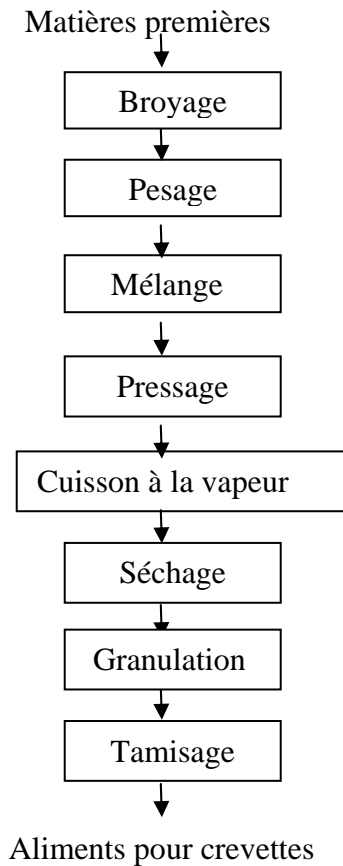


Figure 19. Processus de fabrication des aliments pour crevettes

Toutes les matières premières (sauf l'huile de calmar) entrant dans la composition des aliments sont préalablement filtrées sur tamis métallique de 1mm de maille. Elles sont ensuite pesées et mélangées entre elles à l'aide d'un mixeur pendant 10 minutes puis l'huile est ajoutée. De l'eau est ensuite incorporée au mélange afin d'atteindre une cohésion appropriée permettant le pressage. Ce pressage est une opération simple qui consiste à forcer le passage du mélange au travers des orifices (2mm de diamètre) d'un disque perforé. Les filaments résultants sont ensuite cuits à la vapeur pendant 7 minutes. Cette cuisson est nécessaire car elle améliore la stabilité à l'eau de l'aliment. Les filaments ainsi cuits sont ensuite séchés à 35⁰C pendant 14 heures puis coupés en granulés à l'aide d'un couperet dans un mixeur. Ces granulés sont ensuite calibrés à l'aide d'un tamis métallique (2mm de diamètre de maille) ce qui permet également d'éliminer les éventuelles poussières formées lors du découpage (précaution nécessaire pour éviter la pollution des eaux d'élevage). Le produit final se présente sous la forme de granulés de 2mm de diamètre et de 2mm de longueur. Les aliments ainsi obtenus sont stockés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

2.4.3. Protocole d'élevage des crevettes

La durée des essais de nutrition en bassins a été de 6 semaines. Les bacs utilisés avaient un volume total de 150 litres (50 x 60 x 50 cm). La circulation de l'eau dans ces bacs a été maintenue, pendant toute la durée de l'étude, à un débit moyen de 1,5 l/min. Avant son introduction dans les bassins, cette eau a été filtrée sur filtre biologique. La Figure 20 illustre le montage expérimental.



Figure 20. Bassins d'élevage des crevettes

Dans chaque bassin expérimental, 30 individus juvéniles de *Penaeus vannamei* d'un poids moyen de 4,3g ont été répartis au hasard. L'effet nutritionnel de 11 aliments (1 contenant la farine de thon, 1 aliment commercial de la société Uni-President Vietnam**, 9 contenant des hydrolysats ou mélanges d'hydrolysats) a ainsi pu être évalué. Chaque aliment a été testé sur 3 bacs, la ration journalière distribuée correspondant à 5% du poids vif des crevettes. La distribution de l'aliment a été effectuée manuellement à raison de 2 distributions par jour (à 8h et à 17h). Au bout de 3 semaines d'expérimentation, une pesée de contrôle a été réalisée afin de procéder à un réajustement de la quantité d'aliment à distribuer. Lors de la distribution d'aliment, les granulés ont été déposés sur un plateau d'alimentation de diamètre de 30cm (voir Figure 21). Trois heures après le dépôt, les plateaux étaient enlevés, l'aliment résiduel récupéré et stocké à -20°C. À la fin de l'expérimentation, les aliments résiduels de chaque bac ont été récupérés, séchés à 105°C jusqu'à un poids constant et la masse correspondante a alors été relevée. Chaque jour, les bacs étaient nettoyés en siphonnant des matières accumulées.

** Code de l'aliment commercial : V994 ; l'adresse de la société Uni-President Vietnam : 16-18 rue de DT 743, zone industrielle Song Than 2, Di An, Binh Duong, Vietnam.



Figure 21. Plateau d'alimentation dans le bac d'élevage de crevettes

Au cours des 6 semaines d'expérimentation, plusieurs paramètres ont été mesurés quotidiennement :

- la température de l'eau qui a oscillé entre 27 et 29⁰C,
- le pH qui est resté compris entre 7,0 et 8,0
- la concentration en oxygène dissous qui a varié de 5 à 6,5 mg/l
- la salinité de l'eau évoluant de 23 à 26‰.
-

2.4.4. Détermination de l'efficacité des aliments

Après 6 semaines d'élevage, le taux de survie, le gain de poids, le ratio de conversion alimentaire et le coefficient d'efficacité protéique ont été déterminés pour chaque bac comme suit (Cruz-Suárez *et al.*, 2007):

2.4.4.1. Taux de survie

$$\text{Taux de survie} = \frac{\text{Nombre de survivants}}{\text{Nombre initial de crevettes}} \times 100$$

2.4.4.2. Gain de poids

La croissance pondérale des crevettes a été déterminée en pesant les crevettes.

Gain de poids absolu (g) = Poids moyen final - Poids moyen initial

Gain de poids relatif (%) = $\frac{\text{Poids moyen final} - \text{Poids moyen initial}}{\text{Poids moyen initial}} \times 100$

2.4.4.3. Perte de matière sèche et de protéines brutes des aliments dans l'eau

La perte de matière sèche (PMS %) et la perte de protéines brutes (PPB%) pendant le temps où l'aliment était dans l'eau ont été déterminés pour tous les aliments. Pour ce faire, 5g d'aliments pesés exactement ont été immergés dans des bouteilles en plastique contenant 200ml d'eau de mer. Après 3h d'agitation (30 rpm, 28°C), les échantillons ont été filtrés sur un filet (maille de 1mm de diamètre) puis séchés à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Ils ont ensuite été refroidis dans un dessiccateur et pesés afin de déterminer la perte de matière sèche et de protéines brutes.

Le taux de perte de matière sèche et de protéines brutes des aliments ont été déterminés en utilisant les formules suivantes (Cruz-Suárez *et al.*, 2001):

$$\text{PMS (\%)} = \frac{\text{Masse d'aliment avant immersion} - \text{masse d'aliment après immersion}}{\text{Masse d'aliment avant immersion}} \times 100$$

$$\text{PPB (\%)} = \frac{\% \text{ protéines avant immersion} \times 100 - \% \text{ protéines après immersion} \times (100 - \% \text{ PMS})}{\% \text{ protéines avant immersion}}$$

2.4.4.4. Aliment sec consommé (ASC)

La consommation d'aliment sec a été déterminée en soustrayant la masse de l'aliment sec résiduel de la masse de l'aliment sec donné (Refstie *et al.*, 2004).

$$\text{ASC} = \text{Masse de l'aliment sec donné} - \text{masse de l'aliment sec résiduel}$$

Cependant, pour tenir compte de la perte en matière sèche de l'aliment, il convient de calculer une valeur ajustée à savoir (Hernández *et al.*, 2008) :

$$\text{ASC}_{\text{adj}} = \text{ASC} \times (1 - \text{PMS}/100)$$

2.4.4.5. Taux de conversion alimentaire (TCA)

Le taux de conversion alimentaire est la quantité d'aliment sec consommé par unité de gain de poids absolu (Hernández *et al.*, 2008).

$$RCA = ASC_{adj} / \text{gain de poids absolu}$$

2.4.4.6. Coefficient d'efficacité protéique (CEP)

Le coefficient d'efficacité protéique est le gain de poids absolu par unité de protéines brutes consommées.

$$CEP = \text{Gain de poids absolu} / \text{protéines brutes consommées ajustées}$$

Pour tenir compte de la perte en protéines brutes, il est nécessaire de calculer une valeur ajustée à savoir :

$$\text{Protéines brutes consommées ajustées} = \text{Protéines brutes consommées} \times (1 - \text{PPB}/100)$$

2.5. Nutrition humaine : sauce de poisson

2.5.1. *Matériel biologique : anchois*

Pour cette étude, des anchois (*Stolephorus commersonii*) pêchés dans la région maritime de Khanh Hoa (Vietnam) et d'une longueur moyenne de 7 à 8 cm ont été utilisés (voir Figure 22). Ces poissons ont été achetés sur le port de Nha Trang.



Figure 22. Photographie des anchois (*Stolephorus commersonii*)

2.5.2. Protocole expérimental de fabrication de la sauce de poisson

Le matériel de base est constitué de jarres en terre cuite munies d'un robinet (Figure 23). Dans la jarre sont successivement introduits une couche de calcaires coralliens (jusqu'au niveau du robinet), puis une couche de sel (environ 1-2cm épaisseur).



Figure 23. Jarres utilisées pour la production du nuoc-mam

Le processus de fabrication du nuoc-mam est présenté sur la Figure 24.

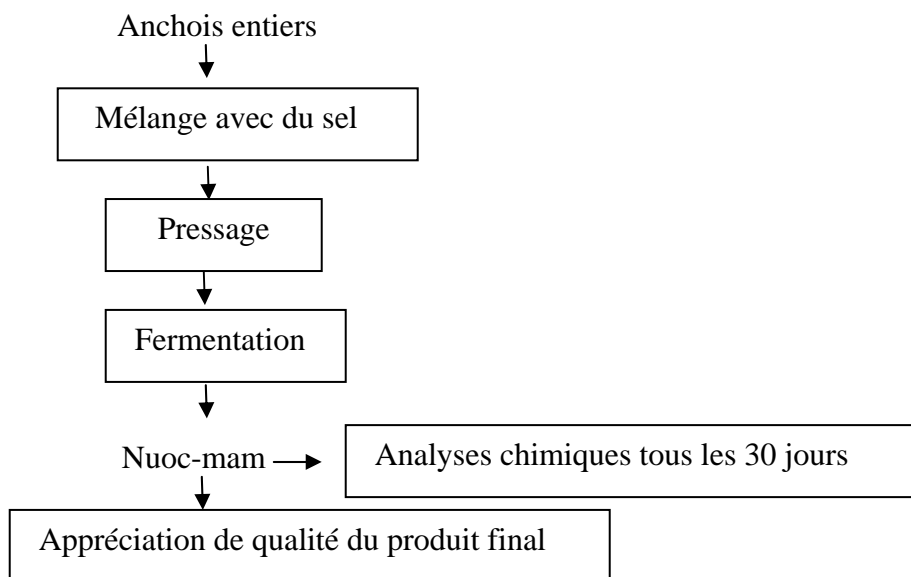


Figure 24. Processus de production du nuoc mam

Pour chaque essai, 3 kg d'anchois sont mélangés avec 0,8 kg de sel (mélange manuel). Ce mélange est ensuite introduit dans la jarre puis recouvert d'une couche de sel (0,2 kg). Toutes les jarres sont alors closes hermétiquement et le processus de maturation commence.

Après 3 jours de contact, le robinet est ouvert pour qu'une solution saline presque saturée appelée 'nuoc-boi' puisse s'écouler. Ce soutirage entraîne inévitablement un affaissement du mélange sel/poisson qui reste dans la jarre. Un pressage est alors effectué : une pièce plastique polyéthylène est mise au contact du mélange, cette pièce est alors recouverte de claies en bambou elles même recouvertes de pierres. Sous ce poids, une nouvelle fraction de solution saline est alors récoltée tandis que le mélange sel/poisson devient progressivement une masse compacte et résistante. Lorsque la solution saline ne coule plus, le robinet est fermé et la solution est reversée dans la jarre par le dessus de manière à recouvrir complètement le mélange. Le poisson est alors laissé en macération sous cette couche protectrice de solution saline. Au bout de 30 jours, le robinet est ouvert afin de récupérer la sauce en maturation. Des aliquotes sont alors prélevés afin de procéder aux analyses biochimiques (teneurs en azote total, en azote aminé et en azote ammoniacal).

L'incorporation des poudres protéiques tests (hydrolysats lyophilisés) intervient le lendemain, à raison de 5% par rapport à la solution (poids/volume), après dissolution des poudres dans la sauce de poisson, celle-ci est réintroduite dans les jarres.

Quatre lots sont ainsi préparés :

- Lot témoin dans lequel aucun hydrolysat n'a été incorporé.
- Lot NS2 : incorporation de la poudre protéique soluble obtenue après 2 heures d'hydrolyse (S2).
- Lot NS3 : incorporation de la poudre protéique soluble obtenue après 3 heures d'hydrolyse (S3).
- Lot NS6 : incorporation de la poudre protéique soluble obtenue après 6 heures d'hydrolyse (S6).

Selon le même protocole de prélèvement que ci-dessus, des aliquotes sont prélevées aux 60^{ème}, 90^{ème}, 120^{ème}, 150^{ème}, 180^{ème} jours de maturation. A l'issue de 6 mois les jarres sont entièrement vidées et les sauces récupérées pour permettre leur évaluation selon des critères chimiques et sensoriels.

2.5.3. Analyses physico-chimiques de la sauce de poisson

Les analyses chimiques de la sauce de poisson sont effectuées sur une dilution au 1/25 avec de l'eau distillée.

2.5.3.1. Dosage de l'azote total

L'azote total est dosé par la méthode de Kjeldahl : 10 ml de nuoc-mam dilué au 1/25 sont introduits dans un tube à minéralisation. Après minéralisation et distillation (voir chapitre précédent), le titrage est effectué directement à l'aide d'acide chlorhydrique 0,1N.

La quantité d'azote total en grammes par litre de nuoc-mam est donnée par la formule:

$$N_{\text{total}} = \frac{0,0014 \times N \times F \times 1000}{V}$$

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

N : Nombre de ml HCl 0,1N utilisés pour le titrage (ml)

F : Coefficient de dilution (F=25)

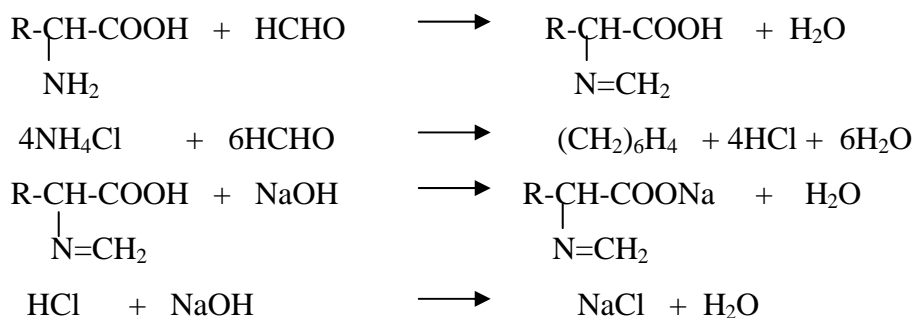
V : Volume de la solution diluée utilisée pour l'analyse (V = 10 ml)

2.5.3.2. Dosage de l'azote formol

L'azote formol est déterminé par la méthode de Sorensen, modifié par Effront (Aldrin *et al.*, 1969).

Principe :

Le formol réagit sur les acides aminés en bloquant leur fonction amine (-NH₂) et permet ainsi la titration de leur fonction acide (-COOH) avec la soude en présence de phénolphtaléine. La teneur en azote formol est calculée sur la base de la consommation de soude.



Mode opératoire:

Dans une fiole jaugée de 100ml, sont versés successivement:

+ 50 ml de nuoc-mam dilué au 1/25.

+ 1ml de phénophtaléine à 1% dans l'alcool à 50°.

+ 2g de chlorure de baryum (BaCl₂)

+ Une quantité de solution saturée de baryte (Ba(OH)₂) dans l'alcool méthylique jusqu'à l'obtention d'une solution rosé. Ensuite, 5 ml d'hydroxyde de baryum sont ajoutés pour 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 formol neutralisé sont ajoutés. Le bécher est agité et le tirage est effectué à l'aide de NaOH 0,1N jusqu'à pH=9.

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

$$N_{\text{formol}} = \frac{0,0014 \times N \times F \times 100 \times 1000}{V \times 25}$$

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

N : Nombre de ml NaOH 0,1N utilisés dans le titrage.

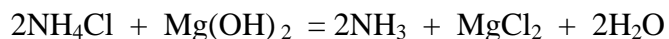
F : Coefficient de dilution (V= 25)

V : Volume de la solution diluée utilisée pour l'analyse (V= 50 ml)

2.5.3.3. Dosage de l'azote ammoniacal

Principe:

L'ammoniac, déplacé par magnésie, 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 de l'acide chlorhydrique 0,1N.



Mode opératoire:

50 ml de nuoc-mam dilués au 1/25 sont introduits dans un ballon à distiller avec 100 ml d'eau. 3-4 gouttes de la solution de phénolphtaléine à 1% sont ajoutées, puis 3 g de magnésie. 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 :

$$N_{\text{NH}_3} = \frac{0,0014 \times N \times F \times 1000}{V}$$

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

N: Nombre de ml HCl 0,1N utilisés dans le titrage (ml).

F : Coefficient de dilution (F=25)

V : Volume de la solution diluée utilisée pour l'analyse (V= 50 ml)

2.5.3.4. Dosage de l'azote aminé

La teneur en azote aminé en grammes par litre est donnée par la formule (Dissaraphong *et al.*, 2006):

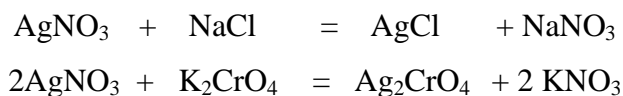
Teneur en azote aminé = Teneur en azote formol- Teneur en azote ammoniacal

2.5.3.5. Dosage du chlorure de sodium

Les chlorures sont titrés par la méthode de Mohr (Indoh *et al.*, 2006).

Principe :

Les chlorures sont précipités par une solution de nitrate d'argent (AgNO₃) 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 CrO₄⁻² pour produire le précipité rouge Ag₂CrO₄. L'apparition de la couleur rouge brique marque la fin du dosage des ions Cl⁻ par les ions Ag⁺.



Mode opératoire:

Dans une fiole conique de 250 ml, on introduit 5ml de nuoc-mam dilué aux 1/25, et 5 gouttes de phénolphaléine. Si la solution est incolore (pH<7), on utilise NaHCO₃ 0,1N pour neutraliser. Si la solution est rose (pH>7), on utilise CH₃COOH 0,01N pour neutraliser. Ensuite, 5 gouttes de solution de K₂CrO₄ 10% sont ajoutées. Le titrage est réalisé avec la solution de AgNO₃ 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 AgNO₃ 0,1N

A: Nombre de ml de AgNO₃ 0,1N utilisés dans le titrage (ml)

F: coefficient de dilution

V: volume d'échantillon dilué utilisé pour le titrage (V= 5ml).

2.5.3.6. Détermination du pH

Le pH de la sauce de poisson a été déterminé par la mesure directe sur les échantillons de sauce de poisson avec le pH mètre.

2.5.3.7. Détermination de l'histamine

L'histamine dans la sauce de poisson a été déterminé par chromatographie liquide à haute performante (HPLC) comme décrit par Brillantes *et al.* (2002).

2.5.4. Analyse sensorielle de la sauce de poisson

2.5.4.1. Echantillons

Pour l'analyse sensorielle en complément des 4 lots de sauce de poisson élaborés lors de cette étude, 5 sauces commerciales de poisson en provenance du Vietnam et de la Thaïlande et achetées dans un supermarché d'Ho Chi Minh ville sont également évaluées (Tableau 16).

Tableau 16. Sauces de poisson évaluées sensoriellement

N°	Sauces de poisson	Emballage	Origine
1	Témoin	Bouteille en plastique, 300ml	Vietnam
2	NS2	Bouteille en plastique, 300ml	Vietnam
3	NS3	Bouteille en plastique, 300ml	Vietnam
4	NS6	Bouteille en plastique, 300ml	Vietnam
5	Nuoc mam 'Phan Thiet'	Bouteille en verre, 500ml	Vietnam
6	Nuoc mam 'Phu Quoc'	Bouteille en verre, 500ml	Vietnam
7	Nam pla 'poisson'	Bouteille en verre, 300ml	Thaïlande
8	Nam pla 'crevettes'	Bouteille en verre, 300ml	Thaïlande
9	Nam pla 'calmar'	Bouteille en verre, 300ml	Thaïlande

NS2, NS3 et NS6 : Sauces de poisson contenant des hydrolysats des têtes de thon préparés après 2h, 3h et 6h d'hydrolyse, respectivement.

2.5.4.2. Préparation des échantillons

L'analyse sensorielle des sauces de poisson a été effectuée dans le laboratoire d'analyse sensorielle de l'Institut Polytechnique de Ho Chi Minh ville.

Tous les échantillons sont conservés et analysés à une température de 22-25⁰C. Une quantité d'échantillon de 20 ml est versée dans un verre transparent pour évaluer l'aspect (transparence et couleur) et l'odeur de la sauce de poisson. Afin d'évaluer la saveur, une quantité d'échantillon de 5 ml est versée dans un petit verre. Une baguette en verre est utilisée pour goûter la sauce de poisson. Chaque échantillon est codé par 3 chiffres aléatoires.

2.5.4.3. Méthode d'étude

Une analyse sensorielle descriptive est effectuée pour déterminer les propriétés sensorielles des sauces de poisson. L'objectif de cette analyse est la description puis la comparaison des propriétés sensorielles des 9 sauces de poisson. L'analyse sensorielle descriptive est effectuée selon les étapes suivantes:

- *Le choix des descripteurs et l'entraînement du jury*: Douze personnes (juges) ont participé à l'étape de sélection des descripteurs permettant de décrire la couleur, l'odeur et la saveur des produits étudiés. Ainsi, pour chaque sauce de poisson, les juges devaient évaluer et décrire l'apparence, l'odeur et la saveur. A l'issue d'une discussion générale une liste commune des termes permettant de caractériser au mieux les produits a été établie. Les juges ont ensuite été entraînés sur la base des termes retenus. Lors de cette phase d'entraînement, il leur a été demandé de hiérarchiser les échantillons de sauce selon une intensité croissante et ce pour tous les descripteurs retenus, puis de noter ces descripteurs sur une échelle de 0 à 100. Les performances des 12 juges ont ensuite été évaluées et 10 d'entre eux ont été sélectionnés pour l'évaluation finale des produits (sur la base de la différence de note inférieure ou égale à 10 entre la valeur moyenne et valeur donnée par chaque juge).
- *L'évaluation des produits* : 10 juges ont évalué 9 produits. Les conditions d'évaluation sont celles décrites précédemment. L'intensité de chaque descripteur est notée sur une échelle de 0 à 100. L'évaluation des produits a été réalisée 2 fois (2 séances de 3h). Après chaque dégustation, les juges se rinçaient la bouche avec de l'eau et mangeaient des concombres.

2.6. Analyses statistiques

Pour chaque donnée il est procédé à une analyse de variance (ANOVA). Le test de Duncan est aussi utilisé pour déterminer si des différences significatives ont existé entre les traitements (Tang, 2008). Un seuil de signification de 95% ($P < 0,05$) est retenu. Ces analyses statistiques sont effectuées à l'aide du programme SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Hydrolyse des têtes de thon

A chaque fois que cela est possible, les résultats obtenus lors des hydrolyses des têtes de thon avec Protamex (0,1%) conduites pendant 12h (chapitre précédent) sont également rappelés et comparés.

3.1.1. Degré d'hydrolyse (DH)

Les têtes de thon ont été hydrolysées avec Protamex à raison de 0,5% pendant 8h. L'évolution du degré d'hydrolyse obtenue est indiquée sur la Figure 25.

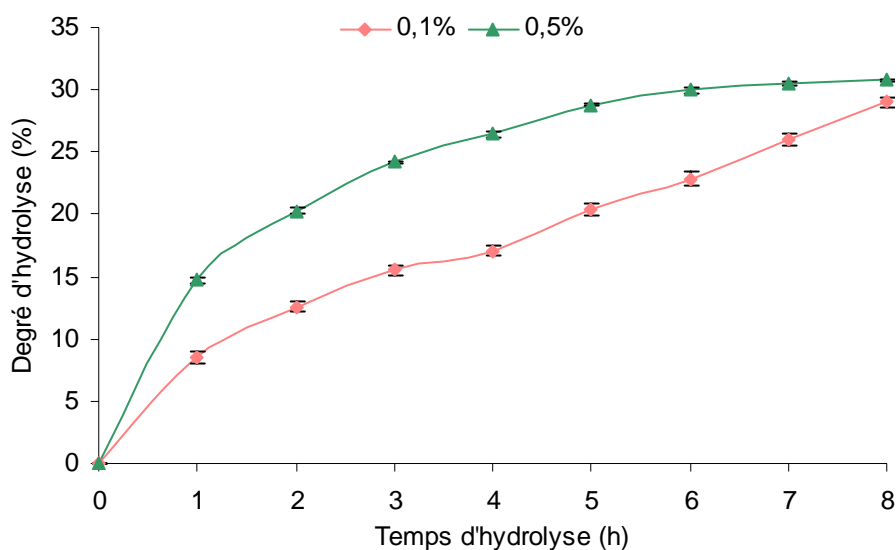


Figure 25. Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,5%) pendant 8 h à 45°C, sans contrôle de pH

Comme lors de l'hydrolyse précédente (avec 0,1% de Protamex, voir chapitre précédent), le DH augmente au cours du temps avec 3 phases distinctes : une augmentation rapide lors des 3 premières heures, un ralentissement graduel (de 3 à 6 heures) puis une phase de plateau pendant laquelle le DH n'évolue plus ou guère (de 6 à 8 heures). La valeur maximale de DH atteinte ici a été de 30% (au bout de 6 heures)

En revanche, l'effet du ratio enzyme/substrat est très notable sur le DH notamment lors de la première phase, comme illustré sur la figure 25. Ainsi, pour un temps donné, il y a beaucoup plus de liaisons peptidiques coupées quand il y a plus d'enzyme (Benjakul et Morrissey, 1997;

Guérard *et al.*, 2002) :

- après 1 heure de protéolyse, 9% de DH avec 0,1%, 15% avec 0,5% d'enzyme
- après 3 heures de protéolyse, 15% de DH avec 0,1%, 24% avec 0,5% d'enzyme

Cependant, cette phase initiale pendant laquelle le DH augmente rapidement est d'une durée plus courte lorsque l'enzyme est en forte concentration (inflexion au bout de 3 heures). L'écart entre les degrés d'hydrolyse obtenus avec les 2 concentrations d'enzyme tend donc à se réduire dès lors que l'hydrolyse se prolonge. Ainsi, au bout de 8 heures de protéolyse, cet écart n'est plus que de l'ordre de 1% (d'après les résultats du chapitre précédent, un DH de 30% est atteint au bout de 9h avec 0,1% d'enzyme).

L'augmentation du ratio enzyme/substrat permet donc d'accélérer la cinétique de protéolyse mais ne conduit pas, dans cette étude, à l'obtention d'un degré d'hydrolyse maximal supérieur. En multipliant par 5 la quantité d'enzyme dans le réacteur, le gain de temps a été de l'ordre de 3h : pour un DH d'environ 30% il faut 6h avec 0,5% d'enzyme et 9h avec 0,1%. Seule une étude technico-économique au cas par cas permettrait de trancher en faveur de l'une ou l'autre des solutions à savoir : augmenter le temps de procédé ou augmenter la quantité d'enzyme pour obtenir le même résultat. C'est ce type de réflexions qui sont conduites lorsque de tels procédés sont transférés à plus grande échelle.

3.1.2. Récupération de l'azote dans la fraction soluble

La récupération de l'azote des têtes de thon dans la fraction soluble après hydrolyse avec 0,5% Protamex est représentée sur la Figure 26.

Comme pour le DH, le taux de récupération de l'azote augmente au cours du temps avec une cinétique en 3 phases : - une augmentation rapide (pendant 1 à 2 heures), - un ralentissement graduel (jusqu'à 5 heures), - une phase plateau (de 5 à 8 heures). Ainsi au bout de 2 heures de réaction près de 70% de l'azote total peut être récupéré dans le surnageant, cette valeur atteint 85% après 5 heures.

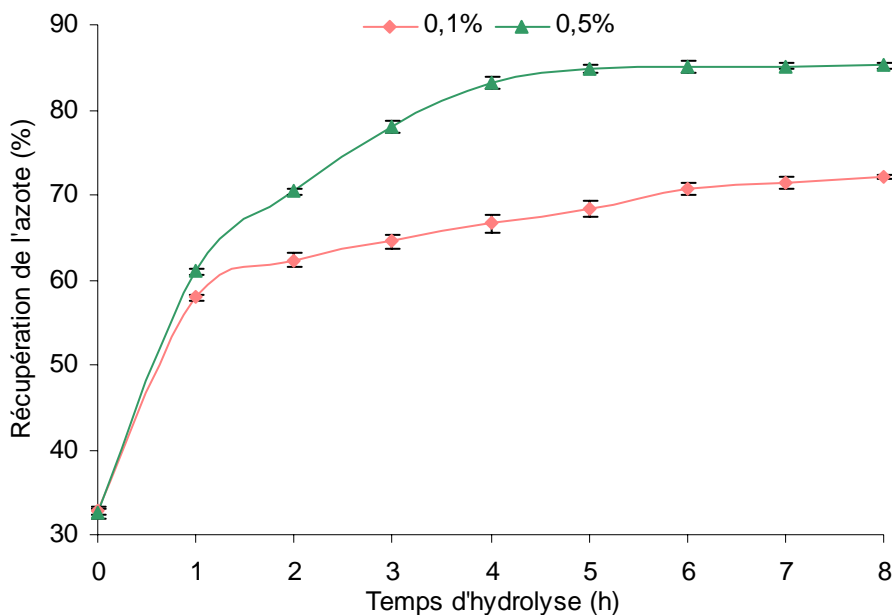


Figure 26. Récupération de l'azote au cours de l'hydrolyse des têtes de thon avec Protamex (0,5%) pendant 8 h à 45°C, sans contrôle de pH

L'augmentation du ratio enzyme/substrat conduit là aussi à une accélération de la cinétique mais contrairement à ce qui a été observé pour le DH, il semble que la valeur maximale « atteignable » soit ici augmentée. Ainsi, si au bout de 12 heures de protéolyse par 0,1% de Protamex, près de 74% de l'azote se retrouvait dans le surnageant, de l'ordre de 85% de l'azote sont récupérés dès 5 heures d'hydrolyse avec 5 fois plus d'enzyme. Des résultats semblables ont été observés lors d'études sur l'hydrolyse des viscères de morue, des estomacs de thon et des arêtes de saumon (Benjakul *et* Morrissey, 1997; Guérard *et al.*, 2002; Liaset *et al.*, 2002; Aspino *et al.*, 2005).

Il apparaît donc clairement que dans de telles conditions, l'augmentation du ratio enzyme/substrat a permis d'accroître la quantité d'azote soluble et d'accélérer la coupure des liaisons peptidiques sans pour autant permettre l'obtention d'un degré d'hydrolyse supérieur quand la protéolyse se poursuit.

3.1.3. Poids moléculaire des peptides dans les hydrolysats des têtes de thon

Comme pour les hydrolyses précédentes (chapitre 2), la distribution moléculaire des peptides solubles a été établie (Figure 27).

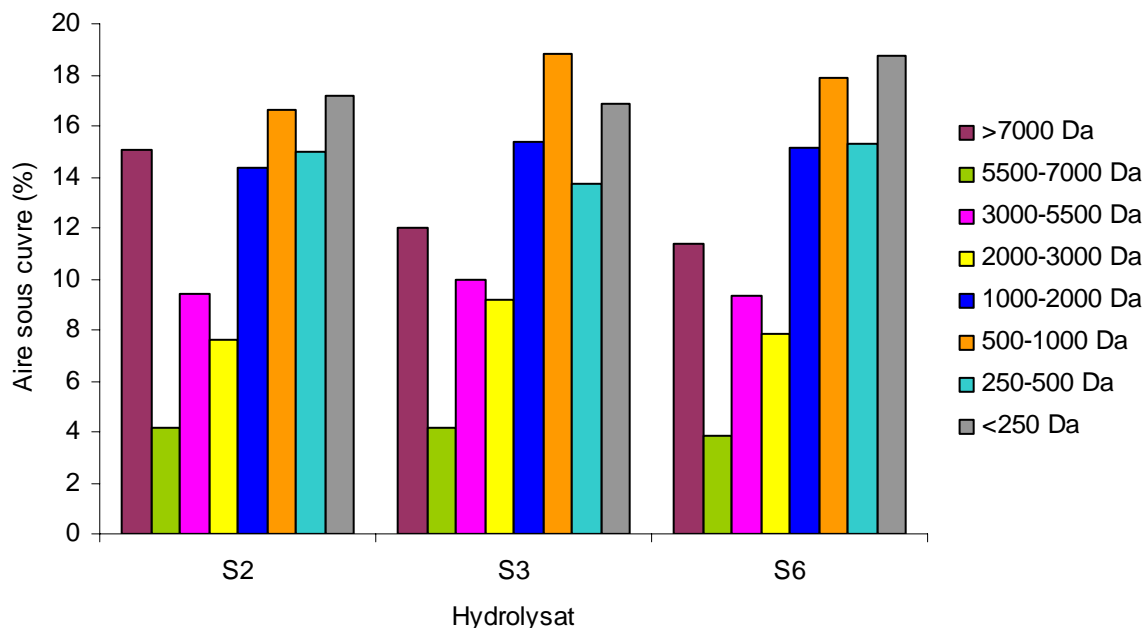


Figure 27. Distribution des poids moléculaire des peptides dans les hydrolysats de têtes de thon (%)

Dans une première approche il apparaît que la distribution des peptides résultant des 3 hydrolyses est similaire quelque soit le temps d'hydrolyse. Ainsi, les 3 surnageants sont ils à plus de 60% composés de peptides dont la taille est inférieure à 2000Da (et à plus de 70% inférieurs à 3000Da). La part d'acides aminés libres et de dipeptides représente même de l'ordre de 17% dans ces fractions. Néanmoins, quelques différences peuvent être observées. Ainsi, le taux de peptides supérieurs à 7000Da diminue-t-il avec l'avancement de la protéolyse (15% au bout de 2h, 11% après 6h) traduisant ainsi la coupure de liaisons peptidiques. A l'inverse, une augmentation des acides aminés libres et des dipeptides survient (17% à 2h, 19% à 6h). Cependant, ces écarts de composition entre les 3 lots sont minimes et ces fractions peuvent donc être considérées comme possédant la même distribution moléculaire de peptides.

3.2. Nutrition animale : alimentation des crevettes

La majeure partie des travaux portant sur les effets nutritionnels d'un apport d'hydrolysats de protéines de poisson dans l'alimentation aquacole concerne le poisson : le saumon Atlantique (*Salmo salar* - Lall, 1991 ; Parrish *et al.*, 1991 ; Heras *et al.*, 1994 ; Berge and Storebakken,

1996 ; Refstie *et al.*, 2004), la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss* - Aksnes *et al.*, 2006), le poisson rouge (*Carassius auratus* - Szlaminska *et al.*, 1991), sur le tilapia (*Oreochromis niloticus* - Lapie et Biqueras-Betinez, 1992; Fagbenro *et al.*, 1994), les larves de bar (*Dicentrarchus labrax* - Carvalho *et al.*, 1995), la carpe (*Cyprinus carpio* - Carvalho *et al.*, 1997), le bar du Japon (*Lateolabrax japonicus* - Liang *et al.*, 2006), la perche barramundi (*Lates calcarifer* - Tantikitti *et al.*, 2007), et le tambour à gros yeux (*Larimichthys crocea*, Tang *et al.*, 2008) par exemple. Quelques unes de ces d'études relativement complètes rapportant des bénéfices zootechniques sont plus détaillées dans le tableau 17.

En ce qui concerne les bénéfices nutritionnels de tels apports en hydrolysats protéiques pour l'élevage de crevettes, les travaux sont beaucoup moins nombreux et rarement aussi complets que ceux sur le poisson (Chen *et al.*, 1985; Cruze-Ricque *et al.*, 1987; Córdova-Murueta et García-Carreño, 2002).

Que ce soit sur le poisson ou sur la crevette, si les résultats d'une supplémentation de l'aliment en protéines prédigérées (hydrolysat) sont quelquefois contradictoires, il semble cependant que, dans certaines conditions spécifiques et propres à chaque animal, des bénéfices notables en termes de croissance soient observés principalement dus à une augmentation de la digestibilité et donc de l'adsorption intestinale de ces peptides. Par ailleurs, une amélioration de l'appétence de l'aliment (Hardy, 1991 ; Smith *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2006; Grey *et al.*, 2009) et un renforcement du système immunitaire de l'animal (Kotzamanis *et al.*, 2007 ; Tang *et al.*, 2008) sont également parfois observés.

Il semble donc intéressant de voir comment une substitution partielle de la farine de poisson par des hydrolysats de tête de thon, dans des aliments, peut moduler les performances zootechniques d'un l'élevage de crevettes.

Tableau 17. Effets zootechniques d'une supplémentation de l'aliment aquacole en hydrolysats protéiques

Animal	Lots	Matière première	Enzymes	DH (%)	Taux d'incorporation (%)	Taux de survie (%)	Gain de poids absolu (g)	Gain de poids relatif	Références
Tambour	Témoin				0	ND	83,55	51,60%	Tang <i>et al.</i> , 2008
	FPH	muscle de colin	Alcalase	45,50%	5	ND	91,05	55,84%	
	FPH	muscle de colin	Alcalase	45,50%	10	ND	101,9	62,41%	
	FPH	muscle de colin	Alcalase	45,50%	15	ND	93,24	58,06%	
Larve de bar	Témoin				-	39%	6mg		Cahu <i>et al.</i> , 1999
	FPHc	NP	NP	ND	25	47%	6mg		
Larve de bar	FPHc	NP	NP	ND	0	44,9	21,6mg		Cahu <i>et al.</i> , 2004
	FPHc	NP	NP	ND	14	40,7	19,7 mg		
	FPHc	NP	NP	ND	46	29,2	5,6mg		
	Amidon				17,7 (amidon)	38,8	9,5mg		
Larve de bar	FPHc	NP	NP	61,40%	10	43%			Kotzamanis <i>et al.</i> , 2007
	FPHc	NP	NP	61,40%	19	38%			
	Silage	Sardine		46,50%	10	33%			
	Silage	Sardine		46,50%	19	36%			
Larve de bar	Témoin				-	32%			Zambonino <i>et al.</i> , 1997
	FPH	NP	Protéase serine	ND	20	40%			
Larve de flétan	Témoin				0	57%			Kvåle <i>et al.</i> , 2002
	FPH	Muscle de morue et calmar (9:1)	Pepsine	ND	10	67%			
Larve de flétan	FPH	Muscle de morue	Pepsine	ND	0	56,60%	1,217		Kvåle <i>et al.</i> , 2008
	FPH	Muscle de morue	Pepsine	ND	12	ND	1,230		
	FPH	Muscle de morue	Pepsine	ND	24	ND	0,437		
	FPH	Muscle de morue	Pepsine	ND	36	24,40%	0,741		
Larve de morue	FPH	Fillet de colin et de calmar (9:1)	Pepsine	ND	0	7%	0,303		Kvåle <i>et al.</i> , 2008
	FPH	Fillet de colin et de calmar (9:1)	Pepsine	ND	8	ND	0,292		
	FPH	Fillet de colin et de calmar (9:1)	Pepsine	ND	16	ND	0,282		
	FPH	Fillet de colin et de calmar (9:1)	Pepsine	ND	24	ND	0,377		
	FPH	Fillet de colin et de calmar (9:1)	Pepsine	ND	32	18%	0,301		
Saumon	Témoin				0	ND	323		Refstie <i>et al.</i> , 2004
	FPHc	co-produits de colin	Protamex	ND	5	ND	350		
	FPHc	co-produits de colin	Protamex	ND	10	ND	362		
	FPHc	co-produits de colin	Protamex	ND	15	ND	377		
Sole	Témoin				0	42,5			Day <i>et al.</i> , 1997
	FPH	NP	NP	ND	26,6	60,5			
	FPH	NP	NP	ND	53,3	69,0			
	FPH	NP	NP	ND	80,0	75,5			

3.2.1. Composition des matières premières utilisées pour la fabrication des aliments

Afin de pouvoir comparer les effets nutritionnels des aliments et notamment des hydrolysats, il convient au préalable d'établir la composition biochimique proximale des différentes matières premières utilisées (Tableau 18). Ces données permettent ensuite de formuler des aliments isoprotéiques qui seront alors évalués.

Tableau 18. Caractéristiques chimiques des matières premières utilisées pour la fabrication d'aliments pour les crevettes

Matières premières	Matière sèche (%)	Composition chimique (en % de la matière sèche)		
		Protéines	Lipides	Cendres
Farine de têtes de thon (FT)	90,2 ± 0,3	63,4 ± 0,8	12,3 ± 0,4	21,3 ± 0,1
Hydrolysats de protéines S2	91,8 ± 0,4	87,1 ± 0,8	1,4 ± 0,3	8,6 ± 0,3
Hydrolysats de protéines S3	91,5 ± 0,4	87,7 ± 0,7	1,3 ± 0,2	8,2 ± 0,4
Hydrolysats de protéines S6	91,7 ± 0,3	88,2 ± 0,9	1,4 ± 0,3	8,3 ± 0,4
Hydrolysats de protéines C2	90,6 ± 0,3	59,1 ± 0,4	28,4 ± 0,6	7,1 ± 0,1
Hydrolysats de protéines C3	91,3 ± 0,2	57,0 ± 0,6	29,9 ± 0,5	7,2 ± 0,2
Hydrolysats de protéines C6	90,2 ± 0,5	52,5 ± 0,8	33,7 ± 0,3	7,4 ± 0,1
Hydrolysats de protéines M2	90,9 ± 0,3	44,4 ± 0,7	44,8 ± 0,5	7,5 ± 0,2
Hydrolysats de protéines M3	90,4 ± 0,5	45,7 ± 0,4	44,5 ± 0,6	7,4 ± 0,2
Hydrolysats de protéines M6	90,9 ± 0,2	47,9 ± 0,9	43,5 ± 0,4	7,0 ± 0,3
Farine de soja	90,9 ± 0,2	43,5 ± 0,4	3,4 ± 0,2	7,4 ± 0,4
Son de riz	89,9 ± 0,3	12,6 ± 0,7	9,8 ± 0,3	11,9 ± 0,5
Farine de blé	89,6 ± 0,2	14,4 ± 0,5	1,8 ± 0,3	1,0 ± 0,1

S2, S3, S6: Poudres protéiques solubles obtenues à partir des surnageants d'hydrolyse des têtes de thon pendant 2h, 3h et 6h respectivement.

C2, C3, C6: Poudres protéiques insolubles obtenues à partir des culots d'hydrolyse des têtes de thon pendant 2h, 3h et 6h.

M2, M3, M6: Mélanges de poudres protéiques obtenues à partir des hydrolyses (pas de séparation entre les culots et les surnageants) des têtes de thon pendant 2h, 3h et 6h.

Ce sont les poudres protéiques solubles qui apparaissent les plus riches en protéines (87,1 à 88,2%), vient ensuite la farine de tête de thon (63,4%) puis les poudres protéiques insolubles (52,5 à 59,1%) et enfin les mélanges de poudres protéiques (inférieurs à 50%). En ce qui concerne les teneurs en lipides, la hiérarchisation est inversée puisque ce sont les mélanges protéiques qui en contiennent le plus (plus de 40%), viennent ensuite les culots d'hydrolyse (de l'ordre de 30%), puis la farine de thon (12%) et enfin les poudres protéiques solubles (légèrement plus que 1%). Enfin pour le taux de cendres, il apparaît clairement que la farine de tête est la plus riche (plus de 21%) tandis que les poudres obtenues après hydrolyse en contiennent près de 3 fois moins (entre 7 et 8,6%).

Ces résultats sont logiques et ont été détaillés notamment lors de la discussion sur la distribution de la matière entre les différents fractions, culot et surnageant (voir chapitre précédent). Ainsi, les lipides ne « passant pas en solution » il est logique d'en retrouver plus dans les poudres insolubles.

3.2.2. Ingrédients et composition chimique des aliments pour les crevettes

En tenant compte de la composition biochimique des matières premières, 10 aliments isoprotéiques ont donc été formulés (Tableau 19) avec :

- AT aliment témoin contenant la farine de tête de thon comme une source protéique principale
- AS2, AS3, AS6 formulés avec les poudres protéiques solubles S2, S3, S6
- AC2, AC3, AC6 formulés avec les poudres protéiques insolubles C2, C3, C6
- AM2, AM3 et AM6 formulés avec les mélanges de poudres M2, M3 et M6.

**Tableau 19. Ingrédients des aliments expérimentaux pour les crevettes
(% de la matière sèche)**

Ingrédients	Aliments expérimentaux pour les crevettes									
	AT	AS2	AS3	AS6	AC2	AC3	AC6	AM2	AM3	AM6
Farine de têtes de thon	44,6	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
Farine de soja	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Son de riz	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Farine de blé	27,4	32,3	32,4	32,5	25,3	24,1	21,0	12,8	14,8	17,1
Mélange minéraux et vitaminique	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Huile de calmar	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0
Hydrolysats S2	0	15,4	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydrolysats S3	0	0	15,3	0	0	0	0	0	0	0
Hydrolysats S6	0	0	0	15,2	0	0	0	0	0	0
Hydrolysats C2	0	0	0	0	24,4	0	0	0	0	0
Hydrolysats C3	0	0	0	0	0	25,6	0	0	0	0
Hydrolysats C6	0	0	0	0	0	0	28,7	0	0	0
Hydrolysats M2	0	0	0	0	0	0	0	36,9	0	0
Hydrolysats M3	0	0	0	0	0	0	0	0	34,9	0
Hydrolysats M6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32,6

La composition chimique de ces aliments expérimentaux ainsi que celle de l'aliment commercial (AK) a ensuite été établie (Tableau 20).

Tableau 20. Composition chimique des aliments expérimentaux pour les crevettes

		Aliments expérimentaux pour les crevettes										
		AT	AS2	AS3	AS6	AC2	AC3	AC6	AM2	AM3	AM6	AK
Matière sèche (%)		90,6	90,5	90,7	91,2	90,8	91,1	90,4	90,8	91,1	91,4	90,1
Composition chimique (en % de la matière sèche)	Protéines brutes	40,0	40,1	40,2	40,0	40,1	39,8	40,2	39,8	40,0	40,2	40,0
	Lipides	7,5	7,0	7,1	7,1	11,5	12,3	14,2	21,1	20,0	18,8	6,8
	Cendres	13,8	10,2	10,1	10,2	10,4	10,6	10,8	10,7	10,4	10,1	14,2
	Fibres brutes	2,2	2,3	2,3	2,3	2,2	2,2	2,1	2,0	2,0	2,1	2,3
	Extrait non azoté (glucide)	36,5	40,4	40,3	40,4	35,8	35,1	32,7	26,4	27,6	28,8	36,7

Comme attendu, la teneur en protéines de ces 11 aliments avoisine les 40%. En revanche, de fortes différences existent en ce qui concerne les teneurs en lipides et en cendres. Ainsi, si les teneurs en lipides de l'aliment témoin, des aliments AS2, AS3, AS6 et de l'aliment commercial sont de l'ordre de 7%, elles sont plus élevées dans les aliments AC2, AC3 et AC6 (11,5-14,2%) et encore plus fortes pour les aliments AM2, AM3 et AM6 (18,8-21,1%). En ce qui concerne la teneur en cendres, de plus faibles variations sont observées avec, pour l'aliment témoin et l'aliment commercial, un taux de cendres quasi identique (13,8 et 14,2%) mais légèrement inférieur pour les autres aliments (environ 10%). La teneur en fibres brutes est relativement standardisée (2-2,3%) ce qui n'est pas le cas pour la teneur en extrait non azoté (26,4-40,4%). Malgré ces différences notables, la conservation de la teneur en protéines brutes dans les aliments est conservée.

L'étude de la composition d'aliments commercialisés pour l'élevage de crevettes révèle que tous contiennent une teneur en eau inférieure à 11%, un taux de protéines variant de 36 à

43%, une teneur en lipides de 6 à 8%, une teneur en cendres inférieure à 16%, moins de 3% de fibres brutes (Le et Huynh, 2007). A l'exception notable de la teneur en lipides (qui est ici supérieure), tous les aliments formulés pour cette étude (Tableau 20) sont conformes à cette composition type et autorisent donc des essais en nutrition.

3.2.3. Composition en acides aminés des aliments pour les crevettes

Afin de compléter les analyses biochimiques et donc la caractérisation de ces aliments, un profil en acides aminés a été réalisé pour les 11 aliments.

La teneur en acides aminés totaux des 11 aliments est relativement bien conservée et est comprise entre 30 et 33g pour 100g. Pour tous ces aliments, la part d'acides aminés essentiels pour la crevette (voir Tableau 21) est relativement constante (16,5 à 17,8%) et élevée puisqu'elle représente plus de la moitié des acides aminés totaux (54-55%). Pour tous, la glycine et l'alanine sont des acides aminés majoritaires tandis que l'hydroxyproline et la méthionine sont eux minoritaires.

Cependant, certaines différences de composition apparaissent au regard de cette analyse. Le fait le plus notable concerne l'aliment commercial qui apparaît très pauvre en proline (0,24g/100g, soit près de 7 fois moins que les autres aliments) mais relativement riche en acide aspartique (1,5g/100g soit presque le double) par rapport aux 10 autres aliments formulés. La teneur en lysine est légèrement supérieure dans les 3 aliments contenant les poudres protéiques insolubles (AC) tandis que les aliments incorporant les surnageants (AS) apparaissent plus riches en hydroxyproline.

Un effet « temps d'hydrolyse » semble également exister puisque, pour une même catégorie d'aliments, des différences sont observées. Ainsi, pour les aliments de type AC, le taux de sérine a-t-il tendance à augmenter avec la durée de l'hydrolyse (1,18 → 1,81). C'est également le cas, mais dans une moindre mesure, pour la méthionine et la lysine. Pour les aliments de type AM, ce sont les teneurs en hydroxyproline et en isoleucine qui augmentent au cours de l'hydrolyse tandis que le taux de phénylalanine ne cesse de décroître.

Tableau 21. Composition en acides aminés des aliments pour les crevettes

Acides aminés (g/100g de la matière sèche)	Aliments expérimentaux pour les crevettes										
	AT	AS2	AS3	AS6	AC2	AC3	AC6	AM2	AM3	AM6	AK
Arginine	1,77	2,08	2,03	1,85	1,74	1,8	1,88	1,98	2,01	1,98	2,05
Histidine	0,91	0,95	0,94	0,93	0,88	0,90	0,88	0,89	0,94	0,98	0,91
Isoleucine	1,60	1,70	1,60	1,56	1,65	1,59	1,28	1,33	1,66	1,79	1,66
Leucine	2,88	2,86	2,60	2,70	2,72	2,24	2,39	2,40	2,40	2,29	2,59
Lysine	2,37	2,12	2,16	2,35	2,97	3,02	3,24	2,15	1,94	1,91	1,98
Méthionine	0,75	0,74	0,73	0,80	0,66	0,80	0,84	0,55	0,70	0,71	0,72
Phénylalanine	2,22	2,50	3,27	3,00	2,78	2,88	2,46	3,2	2,81	2,65	2,74
Thréonine	2,80	2,82	2,78	2,79	2,51	2,44	2,22	2,53	2,61	3,11	3,09
Valine	1,45	1,68	1,74	1,74	1,42	1,47	1,62	1,48	1,45	1,63	1,59
Acides aminés essentiels (AAE)	16,75	17,45	17,85	17,72	17,33	17,14	16,81	16,51	16,52	17,05	17,33
Alanine	3,36	3,80	3,88	3,74	3,96	3,91	3,63	3,56	3,46	3,85	3,44
Aspartique	0,82	0,81	0,75	0,92	0,87	0,93	0,79	0,84	0,50	0,48	1,47
Glutamique	2,38	1,99	1,57	1,54	1,56	1,58	1,55	1,85	1,61	1,82	1,31
Glycine	3,90	3,80	4,05	3,95	3,26	2,97	3,21	3,36	3,78	3,59	3,88
Hydroxyproline	0,57	0,95	1,10	1,14	0,57	0,55	0,44	0,55	0,67	0,70	0,67
Proline	1,23	1,40	1,32	1,51	1,48	1,49	1,33	1,43	1,48	1,42	0,24
Serine	0,75	0,87	0,76	0,79	1,18	1,33	1,81	1,13	0,88	1,16	1,95
Tyrosine	1,21	1,22	1,51	1,47	1,21	1,27	1,33	1,29	1,28	1,24	1,22
Acides aminés essentiels (AANE)	14,22	14,84	14,94	15,06	14,09	14,03	14,09	14,01	13,66	14,26	14,18
Acides aminés totaux (AAT)	30,97	32,29	32,79	32,78	31,42	31,17	30,9	30,52	30,18	31,31	31,51

Généralement, les 11 aliments étudiés présentent une teneur en acides aminés et notamment en acides aminés essentiels relativement identique. Cependant, des variations qualitatives sont observées qui peuvent expliquer d'éventuels écarts d'efficacité nutritionnelle.

Plusieurs études, parfois contradictoires, ont établi les besoins nutritionnels en acides aminés de *Penaeus vannamei* (Tableau 22). Il semble que malgré ces quelques contradictions, tous les aliments utilisés ici ne soient pas suffisamment riches en Arginine et peut être en Méthionine (déficient d'après Akiyama *et al.*, 1992 mais corrects d'après Fox *et al.*, 2006). Les aliments AC2, AC3, AM2 et AM3 sont pauvres en Valine, les aliments AC6 et AM2 semblent insuffisamment riches en Isoleucine et enfin une carence en Lysine semble exister pour les aliments AM3 et AM6.

Tableau 22. Besoins en acides aminés essentiels de *Penaeus vannamei*

	Teneur en acides aminés essentiels		Références
	g/100g de protéines	g/100 g d'aliment	
Arginine	5,8	2,32	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Histidine	2,1	0,84	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Isoleucine	3,5	1,40	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Leucine	5,4	2,16	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Lysine	5,3	2,12	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Lysine	4,67	–	Fox <i>et al.</i> , 1995
Méthionine	2,4	0,96	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Méthionine	–	0,40	Fox <i>et al.</i> , 2006
Phénylalanine	4,0	1,60	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Thréonine	3,6	1,44	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Tryptophane	0,8	0,32	Akiyama <i>et al.</i> , 1992
Valine	4,0	1,60	Akiyama <i>et al.</i> , 1992

3.2.4. Taux de survie

Les crevettes ont été nourries avec ces 11 aliments pendant 6 semaines. Après ces 6 semaines d'élevage, le taux de survie des crevettes a été déterminé (Figure 28).

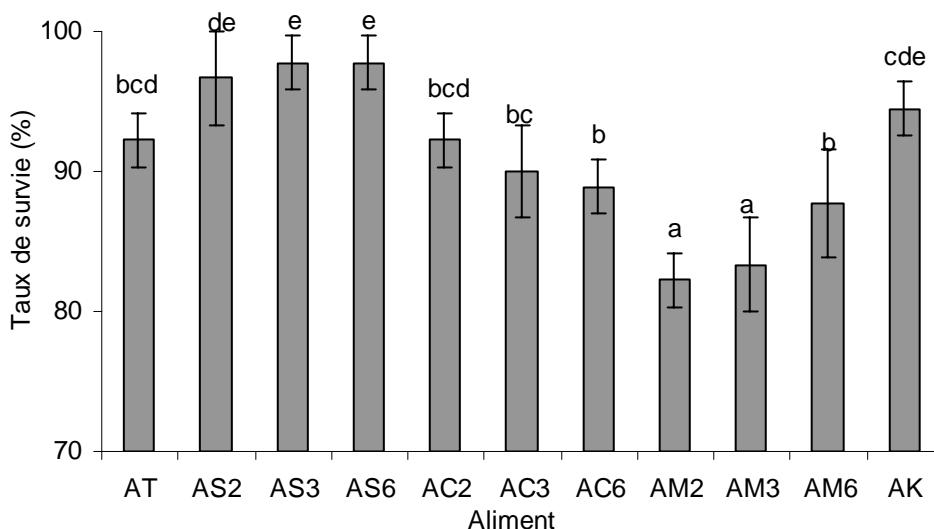


Figure 28. Taux de survie des crevettes après 6 semaines d'élevage. La valeur du taux de survie est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

Il est connu que la survie et la croissance des crevettes sont étroitement liées à la qualité de l'aliment distribué et, en particulier, à la source protéique (Cruz-Suárez *et al.*, 1992 ; Cahu et Zambonino-Infante, 2001 ; Sudaryono *et al.*, 1995 ; Sudaryono *et al.*, 1996). Ici, quelque soit l'aliment distribué, le taux de survie des crevettes au bout des 6 semaines est relativement élevé (plus de 82%) indiquant que les exigences nutritionnelles ont été satisfaites par ces aliments (Ezquerria *et al.*, 1998, Córdova-Murueta et García-Carreño, 2002).

Les meilleurs taux de survie sont obtenus avec les aliments de type AS (ceux contenant les surnageants de l'hydrolyse) avec des taux supérieurs à 96,7%. A l'inverse, une plus forte mortalité est observée lorsque les crevettes ont été nourries avec les aliments de type AM avec un taux de survie d'uniquement 82,2% pour l'aliment AM2. Quant aux aliments de type AC, ils donnent des résultats intermédiaires avec près de 90% de taux de survie.

Une analyse de la composition proximale de ces catégories d'aliment révèle que le taux de lipides peut en partie expliquer ces résultats. En effet, il semble que plus l'aliment soit riche en

matière grasse, moins bon soit le taux de survie résultant. Ainsi, l'aliment AM2 est le plus gras (21,1%) et n'autorise que 82,2% de taux de survie. Une relation inverse est ainsi observée entre le taux de lipides des granulés et le taux de survie obtenu avec ceux-ci après 6 semaines d'élevage. Pour la crevette d'élevage *Penaeus monodon*, il a été démontré que la teneur optimale en lipides des aliments se situait entre 6 et 7,5% et qu'il ne fallait pas dépasser 10% sous peine d'entraîner une augmentation de la mortalité et des baisses de croissance (Akiyama *et al.*, 1992). Par contre, pour la crevette *Penaeus chinensis*, des taux de lipides supérieurs à 15% dans l'aliment n'ont pas entraîné de ralentissement de croissance (Guillaume *et al.*, 1999). Il semble donc que selon les espèces, les besoins nutritionnels des crevettes diffèrent mais il est certain qu'une teneur trop élevée en lipides dans l'aliment peut conduire à une déséquilibration nutritionnelle et une diminution de digestibilité de l'aliment (Aranyakananda et Lawrence., 1994). Cependant, un aspect qualitatif est certainement à prendre en compte, comme par exemple le taux d'acides gras saturés, le taux d'acides gras de la famille des oméga 3. Bald *et al.* (2004) ont en effet démontré que, chez les poissons, si la proportion en acides gras saturés est trop importante, il s'ensuit des perturbations métaboliques affectant fortement la croissance. A la lecture des résultats obtenus ici, il semble bien que le taux de lipides dans l'aliment soit influent mais que, seul, il ne permette pas d'expliquer les variations des paramètres de croissance (taux de survie notamment). Comme indiqué par D'Abramo (1997), la qualité des lipides mais aussi vraisemblablement la quantité et la qualité de toutes les autres sources d'énergie dans l'aliment sont à considérer dans ce type d'étude.

L'intérêt d'hydrolyser les têtes de thon plutôt que de les transformer directement en farine est illustré en comparant les taux de survie des aliments expérimentaux par rapport à l'aliment témoin. Il ressort de cette analyse, qu'à l'exception des aliments AM2 et AM3, tous les autres conduisent à un taux de survie égal ou supérieur à celui obtenu avec l'aliment témoin. Il semble donc que la déstructuration de la matrice par coupure des liaisons peptidiques ait un effet positif sur le taux de survie des crevettes. Ceci peut s'expliquer par une taille moyenne plus réduite des protéines (hydrolysées en peptides) qui présentent généralement une meilleure digestibilité (Cissé *et al.*, 1995 ; Ouellet *et al.*, 1997). Cependant, ce raisonnement ne s'applique principalement que pour les aliments de type AS qui contiennent les protéines solubles hydrolysées (les aliments de type AC contiennent, eux, les protéines insolubles). Un effet négatif de la cuisson peut également être mis en avant. En effet, lors de l'élaboration de la farine de tête de thon (comme pour toutes

les farines animales) une étape de cuisson est effectuée. Or, il est bien connu que la cuisson, non seulement dénature les protéines, mais les rend également moins digestes (Oliva-Teles *et al.*, 1999, Refstie *et al.*, 2004). Le fait que les hydrolyses aient été réalisées à des températures beaucoup plus basses n'entraînant pas la coagulation des protéines peut également en partie expliquer de tels résultats. Néanmoins, il ressort très clairement de cette comparaison que les aliments contenant les protéines hydrolysées solubles sont les plus intéressants en termes de mortalité.

Le taux de survie des crevettes nourries avec les aliments comprenant des hydrolysats S2, S3 et S6 est supérieur à celui des crevettes nourries avec l'aliment témoin. Ces résultats corroborent ceux obtenus dans d'autres études où la survie de l'animal était améliorée quand un hydrolysate de protéines était ajouté dans l'aliment. Ainsi, l'incorporation de 10% d'hydrolysate de muscle de morue et de calmar dans l'aliment a entraîné un taux de survie de 67% des larves de flétan par comparaison aux 57% obtenus avec un lot témoin non supplémenté en hydrolysate (Kvåle *et al.*, 2002). Dans le même ordre de grandeur, la substitution de 25% de la farine de poisson par un hydrolysate de protéines de poisson a permis d'augmenter le taux de survie de larves de bar (47% contre 39%, Cahu *et al.*, 1999).

L'intérêt de procéder à la séparation des fractions solubles et insolubles à l'issue de l'hydrolyse est lui aussi clairement démontré. Tous les aliments incorporant les fractions protéiques solubles entraînent une plus faible mortalité des crevettes à l'issue des 6 semaines d'expérimentation par rapport aux aliments contenant les protéines insolubles (AC) ou les solubles et les insolubles (AM). C'est d'ailleurs pour cette dernière catégorie d'aliment que les plus faibles taux de survie sont observés. Il semble donc que même les protéines insolubles résultantes d'une hydrolyse soient plus « efficaces » pour la crevette que les mélanges de protéines solubles et insolubles (statistiquement seuls AC6 et AM6 sont identiques). La séparation des phases par centrifugation semble donc une étape incontournable pour la valorisation des hydrolysats de tête de thon en aquaculture de crevette.

En ce qui concerne la durée de l'hydrolyse, il semble aussi que celle-ci soit influente sur le taux de survie. Ainsi, si statistiquement tous les aliments de type AS sont identiques, une hydrolyse de 6 heures entraînera un plus faible taux de survie chez les crevettes nourries avec les fractions insolubles (AC6 < AC2) mais le phénomène inverse sera observé avec les mélanges de

protéines (AM6 > AM2). Ainsi, en fonction des fractions que l'on cherche à valoriser en nutrition des crevettes, il conviendra de moduler le temps de la protéolyse.

Si l'intérêt de l'hydrolyse et du fractionnement des phases résultantes vient d'être démontré, par comparaison avec un aliment de type farine incorporant les mêmes matières premières, il convient de procéder à la comparaison de ces aliments expérimentaux avec un aliment commercial largement utilisé en aquaculture de crevettes. Statistiquement, 5 aliments expérimentaux (6 avec AT) présentent des taux de survie au moins équivalents à celui obtenu avec l'aliment commercial (AK) : AS2, AS3, AS6, AC2 et AC3. Il semble donc que dans de telles conditions expérimentales, ces 5 aliments puissent se substituer à l'aliment commercial avec même une plus faible mortalité pour AS3 et AS6.

3.2.5. Gain de poids

Les poids des crevettes au début de l'élevage et après 6 semaines d'élevage sont présentés dans le Tableau 23. A la lecture de ce tableau, il ressort que les aliments ont une influence significative sur le gain de poids. Comme pour le taux de survie, il est possible de catégoriser les aliments. Ainsi les aliments de type AS sont ceux pour lesquels le gain de poids maximal est observé (de +5,78 à +6,22g). A l'inverse, les aliments de type AM sont ceux qui ont entraîné la plus faible augmentation de masse corporelle (de +4,15 à +5,07g). Quant aux aliments de type AC, ils donnent des gains de poids intermédiaires (de +5,29 à +5,71g). Cette catégorisation des aliments est la même que celle observée pour le taux de survie des crevettes.

Là encore, l'intérêt d'hydrolyser les têtes et de séparer les phases solubles et insolubles est démontré puisque les aliments de type AS et de type AC permettent un gain de poids absolu supérieur à celui obtenu avec l'aliment témoin AT. Si les têtes sont hydrolysées mais les phases ne sont pas séparées par centrifugation (aliments AM), les résultats sont statistiquement moins bons au seuil de 5%.

Tableau 23. Poids des crevettes avant et après élevage. La valeur du gain de poids absolu est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,05)

Aliments	Poids moyen initial (g)	Poids moyen final (g)	Gain de poids absolu (g)
AT	4,30 ± 0,09	9,46 ± 0,09	5,16 ^c ± 0,08
AS2	4,31 ± 0,11	10,09 ± 0,13	5,78 ^{ef} ± 0,07
AS3	4,27 ± 0,05	10,27 ± 0,14	6,00 ^{fg} ± 0,11
AS6	4,22 ± 0,09	10,44 ± 0,13	6,22 ^g ± 0,08
AC2	4,36 ± 0,08	10,07 ± 0,24	5,71 ^e ± 0,18
AC3	4,35 ± 0,08	9,84 ± 0,08	5,49 ^d ± 0,12
AC6	4,35 ± 0,07	9,64 ± 0,12	5,29 ^{cd} ± 0,14
AM2	4,40 ± 0,04	8,55 ± 0,14	4,15 ^a ± 0,11
AM3	4,17 ± 0,08	8,72 ± 0,22	4,55 ^b ± 0,19
AM6	4,28 ± 0,04	9,35 ± 0,17	5,07 ^c ± 0,15
AK	4,44 ± 0,08	10,37 ± 0,16	5,93 ^{ef} ± 0,15

L'effet « temps d'hydrolyse » identifié lors de l'étude du taux de survie est aussi notable. Ainsi, plus l'hydrolyse est longue, meilleur sera le gain de poids absolu pour les crevettes nourries avec la poudre protéique soluble (AS) ou avec le mélange de poudres (AM). Par contre ce résultat sera inverse avec les aliments contenant les poudres protéiques insolubles (AC).

Par comparaison avec l'aliment commercial, 4 aliments expérimentaux autorisent un gain de poids absolu au moins équivalent : AS2, AS3, AS6 et AC2. L'aliment AS6 faisant même mieux que cet aliment commercial.

Le calcul du gain de poids relatif permet de préciser ces observations tout en s'affranchissant des variations de poids des crevettes en début d'expérimentation (Figure 29).

Le « classement » des aliments par type est identique à ceux établis précédemment (taux de survie et gain de poids absolu) à savoir : AS > AC > AM. La teneur en lipides des granulés peut en partie expliquer la catégorisation des aliments (voir la discussion sur le taux de survie) mais d'autres facteurs nutritionnels entrent également en jeu.

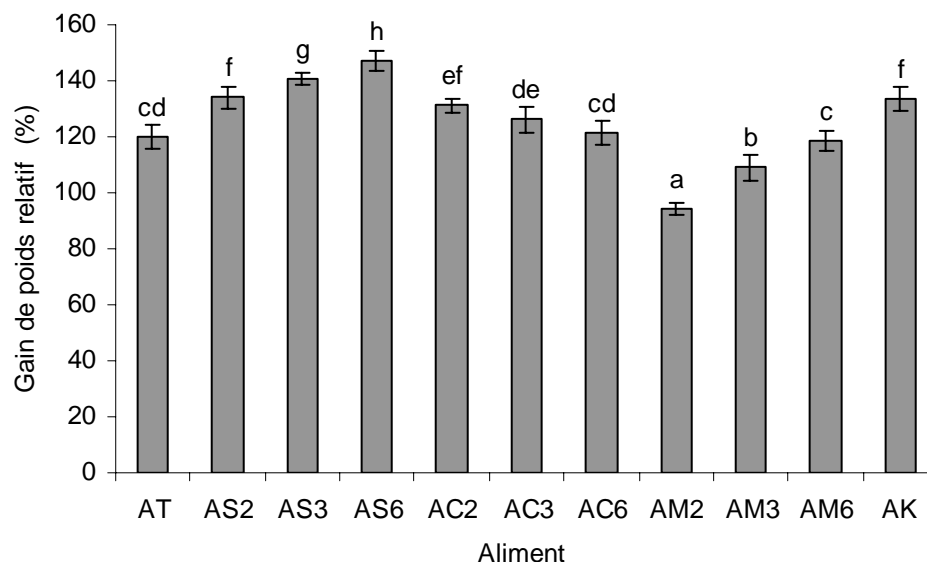


Figure 29. Gain de poids relatif des crevettes. La valeur du gain de poids relatif est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

Ainsi, avec cet indice de gain de poids relatif, l'influence de la « durée de l'hydrolyse » est parfaitement illustrée. En effet, dès lors que l'aliment contient de la poudre protéique soluble (seule ou en mélange), une corrélation positive est observée entre le temps de l'hydrolyse et le gain de poids relatif (AS6=147,4% > AS3=140,6% > AS2=134,2% ; AM6=118,5% > AM3=109,1% > AM2=94,3%). La corrélation inverse est observée lorsque les aliments sont enrichis avec la phase insoluble (AC2=131,1% > AC3=126,3% > AC6=121,4%). Comme la composition proximale des aliments d'un même type est sensiblement la même, il ne peut s'agir que d'un effet « peptide » à savoir leur distribution moléculaire et la composition en acide aminés des fractions.

L'analyse des poids moléculaires n'a pas fait ressortir de grosses différences au cours du temps si ce n'est une légère diminution des peptides de grande taille et, comme corollaire une augmentation des dipeptides et des acides aminés libres. Cependant, ceci peut expliquer de tels écarts. Zambonino Infante *et al.* (1997) ont montré que si l'hydrolysate de poisson incorporé à l'aliment possédait une teneur importante en dipeptides et tripeptides, le taux de croissance et de survie des larves de bar étaient améliorés. Ceci semble logique car, plus les peptides sont petits, mieux ils sont absorbés et assimilés par l'organisme (Espe *et al.*, 1993). Cependant, d'après Carvalho *et al.* (2004), il semble qu'il existe un seuil maximal en di et tripeptides au-delà duquel

la supplémentation de l'aliment en hydrolysats aura des effets délétères. Néanmoins, il semble que le phénomène soit un peu plus complexe que cela. Une étude a ainsi montré qu'un même hydrolysats promouvait plus fortement la croissance des larves de bar s'il était majoritairement constitué de peptides compris en 500 et 2500Da que s'il contenait plutôt des peptides de 200 à 500 Da (Kotzamanis *et al.*, 2007). La distribution moléculaire des peptides ne suffit donc pas à elle seule à expliquer de tels écarts mais elle y contribue.

L'analyse de la composition en acides aminés des aliments a permis de mettre en évidence certaines fluctuations (voir ci-dessus). Si tous les acides aminés essentiels ne sont à priori pas apportés en quantité suffisante par l'aliment, une forte proportion de crevettes a survécu et a même grossi lors des 6 semaines d'expérimentation (voir ci-dessus). Les « carences » identifiées ne sont donc pas si préjudiciables que cela. Néanmoins, des différences entre les paramètres zootechniques sont observées et les variations de composition en acides aminés des aliments doivent certainement y contribuer. Ainsi, parmi tous les acides aminés quantifiés dans cette étude, l'hydroxyproline semble très clairement influente car ses variations sont parfaitement corrélées aux fluctuations de la masse corporelle des crevettes. En effet, au cours du temps la teneur en hydroxyproline augmente dans les aliments AS et AM alors qu'elle diminue dans les aliments AC. Une telle influence de cet acide aminé sur le gain de poids des crevettes est relativement nouvelle car jamais décrite dans la littérature. D'autres acides aminés influent aussi vraisemblablement mais pas avec autant d'évidence que l'hydroxyproline et certainement en interaction avec d'autres composés. Des analyses statistiques (de type ACP) ne font cependant pas franchement ressortir de corrélations probantes.

Sept des 9 aliments contenant des hydrolysats permettent un gain de poids relatif similaire ou supérieur à celui obtenu avec l'aliment témoin, seuls AM2 et AM3 font « moins bien ». L'excès de matière grasse dans ces 2 aliments explique certainement en partie ces « mauvais » résultats (voir ci-dessus). De plus, la teneur en méthionine (plus faible dans l'aliment AM2) peut aussi expliquer la lente croissance des crevettes nourries avec cet aliment. Néanmoins, au travers de ces expérimentations, le bénéfice de l'hydrolyse est encore clairement démontré tout comme la nécessité de fractionner les phases résultantes par centrifugation.

Par comparaison avec l'aliment commercial (+134% de gain de poids), 4 aliments expérimentaux ont permis d'obtenir un résultat au moins équivalent (AS2, AS3, AS6 et AC2). Là

encore l'aliment AS6 permet même d'obtenir un meilleur gain. (+147,4%). De tels résultats positifs sont à rapprocher de ceux préalablement observés chez le poisson lors d'une supplémentation de l'aliment en protéines prédigérées (voir Tableau 17).

3.2.6. Taux de conversion alimentaire (Indice de consommation)

Le taux de conversion alimentaire (RCA) est déterminé comme le poids d'aliment sec consommé par gramme de gain de poids. Plus ce taux est bas, meilleure est l'efficacité de l'aliment. Les taux de conversion alimentaire chez les crevettes nourries avec les aliments expérimentaux sont indiqués sur la Figure 30.

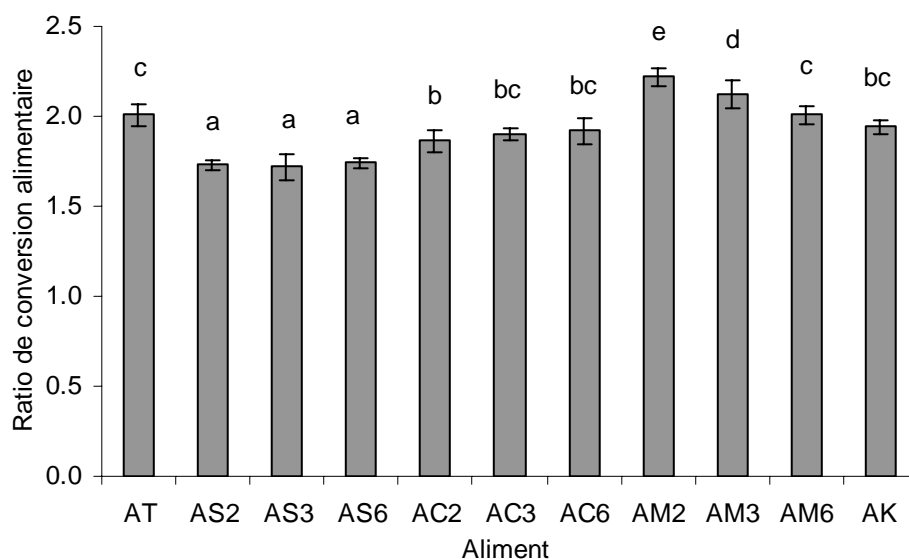


Figure 30. Taux de conversion alimentaire chez les crevettes. La valeur du taux de conversion alimentaire est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

Après 6 semaines d'élevage, les taux de conversion alimentaire varient de 1,72 à 2,22 pour les 9 aliments expérimentaux issus de l'hydrolyse et sont de 2,01 et 1,94 pour l'aliment témoin et l'aliment commercial respectivement.

Comme pour les autres paramètres déjà étudiés (voir ci-dessus), la hiérarchisation des aliments par typologie est possible avec $AS > AC > AM$ (le même classement que pour les autres paramètres). Ainsi, il faut environ 1,7g d'aliment de la catégorie AS pour obtenir 1g de crevette supplémentaire tandis que 2,22g d'aliment AM2 sont nécessaires pour ce même gain de poids.

De tels écarts de taux de conversion ont déjà été observés chez les crevettes nourries avec différents aliments : de 1,60 à 1,97 dans l'étude de Ezquerro *et al.* (1998) et de 1,27 à 2,32 dans les travaux de Cruz-Suárez *et al.* (1993).

Par rapport à l'aliment témoin, seuls 2 aliments expérimentaux (AM2 et AM3) présentent des taux de conversion inférieurs (2,22 et 2,12 par rapport à 2,01), l'hydrolyse des têtes semble donc préférable à la fabrication de farine. La séparation par centrifugation est aussi bénéfique puisque les granulés formulés soit avec les surnageants (AS) soit avec les culots (AC) sont mieux convertis en masse corporelle de crevette que ceux formulés avec les mélanges de poudres (AM). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Córdova-Murueta et García-Carreño (2002) où une supplémentation de l'aliment par 4, 12, 20% d'hydrolysats de poissons améliorerait le taux de conversion par *Panaeus vannamei* (2,6; 2,6 et 2,9 respectivement par rapport à 3,2 pour l'aliment non supplémenté).

L'impact de la durée de l'hydrolyse sur le taux de conversion n'est pas clairement identifié ici. En effet, à l'exception des aliments de type AM pour lesquels plus l'hydrolyse est poussée, meilleur est le taux de conversion, aucune différence significative n'est observée entre des granulés d'une même série (AS et AC). Il semble donc que pour ce paramètre d'élevage, la distribution moléculaire des peptides et la composition en acides aminés ne soient pas très influentes (tout du moins dans les conditions expérimentales utilisées ici).

Tous les aliments de type AS et AC et AM6 autorisent des taux de conversion statistiquement au moins équivalents à celui obtenu avec l'aliment commercial (AK = 1,94).

Il faut cependant remarquer que si l'intérêt d'avoir un bas de taux de conversion semble évident, cela ne l'est pas forcément d'un point de vue économique où le prix de revient de l'aliment doit être pris en compte afin de voir si finalement l'économie est bien réelle.

3.2.7. Coefficient d'efficacité protéique

Le coefficient d'efficacité protéique est déterminé comme étant le gain de poids par gramme de protéine consommé. Plus ce ratio est élevé, meilleure est l'efficacité des protéines de l'aliment. Les coefficients d'efficacité protéiques des aliments expérimentaux sont présentés sur la Figure 31.

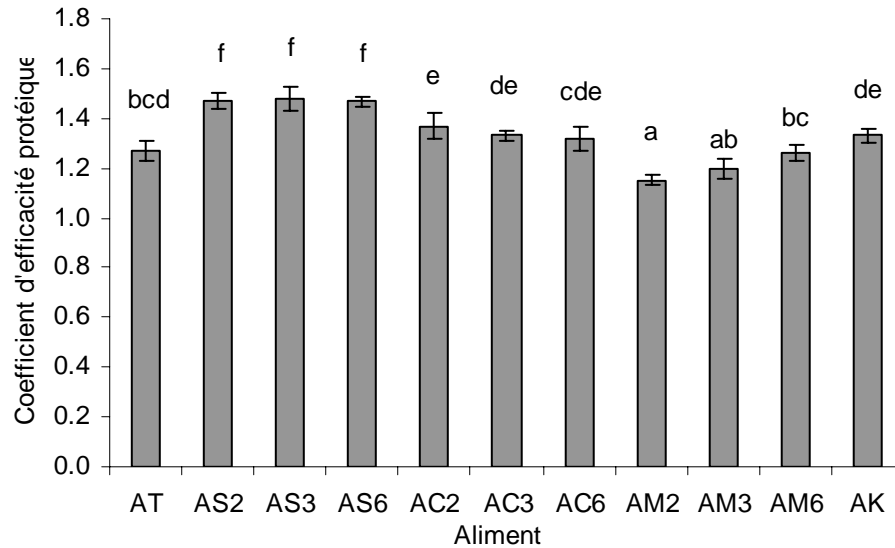


Figure 31. Coefficient d'efficacité protéique chez les crevettes. La valeur du coefficient d'efficacité protéique est la moyenne des trois valeurs. Les valeurs moyennes accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

Encore une fois, le classement des aliments par type est le même à savoir $AS > AC > AM$. Ainsi 1g de protéine permet de gagner de 1,46 à 1,48g de masse corporelle de crevette pour les aliments AS, de 1,32 à 1,37g pour les aliments AC mais uniquement de 1,15 à 1,26g pour les aliments AM.

Là encore, l'hydrolyse et le fractionnement des phases par centrifugation permettent d'obtenir une bonne efficacité des aliments par rapport à la farine traditionnelle. En effet, à l'exception de l'aliment AM2, tous les autres présentent des coefficients d'efficacité protéique au moins équivalents à celui de l'aliment témoin ($AT=1,27$) et 4 lui sont supérieurs (AS2, AS3, AS6 et AC2). Une teneur trop élevée en lipides dans l'aliment AM2 peut conduire à une déséquilibration nutritionnelle et une diminution de digestibilité de l'aliment (Aranyakananda et Lawrence, 1994).

L'influence du temps d'hydrolyse n'est pas clairement illustrée ici puisqu'il n'y a pas de différences statistiques au seuil de 5% entre les aliments de type AS ou AC.

Les protéines contenues dans les aliments AS2, AS3, AS6 et AC2 sont mieux converties en masse corporelle de crevette que celles de l'aliment commercial AK (1,33) tandis que celles des aliments AC3 et AC6 leur semblent équivalentes. Ainsi, 4 aliments expérimentaux fabriqués

ici possèdent un meilleur coefficient d'efficacité protéique que l'aliment commercial traditionnellement utilisé pour l'élevage de ce type de crevette (et 2 autres font aussi bien).

Les protéines sont des substances nutritives indispensables à la croissance des crevettes, un approvisionnement continu en protéines ou en leurs dérivés (peptides ou acides aminés libres) est donc nécessaire (Shiau, 1998). La qualité des protéines distribuées conditionne le coefficient d'efficacité protéique en général. Si tous les aliments étudiés ici (expérimentaux et commerciaux) permettent aux crevettes de survivre et dans une majorité des cas de se développer (gain de poids) pendant les 6 semaines d'expérimentation c'est qu', apparemment, aucun n'est carencé en éléments vitaux (notamment en acides aminés essentiels, voir ci-dessus). Cependant, les différences de croissance et de coefficient d'efficacité protéique observées dans cette étude montrent que les aliments ne sont pas égaux entre eux d'un point de vue qualitatif et que certaines performances zootechniques s'en ressentent. Le coefficient d'efficacité protéique est, comme il s'entend, dépendant de la qualité des protéines ingérées. Les performances de croissance des crevettes sont liées non seulement à la teneur en protéines mais aussi à leur nature comme l'ont démontré plusieurs études (Rajyalakshmi *et al.*, 1986; Sudaryono *et al.*, 1995; Kureshy et Allen Davis, 2002). D'après Sudaryono *et al.* (1995), la qualité de ces protéines prévaut même sur leur quantité et donc sur leur provenance.

La forte pression exercée par l'aquaculture sur la farine de poisson ainsi que les fluctuations de production de celle-ci lors des aléas météorologiques (phénomène de El niño notamment) fait que la recherche de substituts protéiques a pris une grande importance ces dernières années. Si de nombreux essais de remplacement partiel ou total par des protéines de sources variées ont été conduits particulièrement chez le poisson, il semble qu'une teneur minimale en protéines animales existe en deçà de laquelle les performances de croissance s'en ressentent. Chez la crevette, quelques études ont également été menées visant à évaluer les performances d'aliments élaborés avec des sources protéiques telles que la farine de crabe (Goytortua-Bores *et al.*, 2006), la farine de seiche (Cruz-Ricque *et al.*, 1987), la farine de co-produits de crevettes (Cruz-Suárez *et al.*, 1993), la farine de co-produit de volailles (Allen Davis et Arnold, 2000; Cruz-Suárez *et al.*, 2007), la farine de co-produits de poisson (Hernandez *et al.*, 2004). Bien que beaucoup moins nombreuses que pour le poisson, les performances nutritionnelles d'hydrolysats protéiques ont également été évaluées chez la crevette avec du

poisson (Anggawati *et al.*, 1990; Córdova-Murueta et García-Carreño, 2002), du krill (Córdova-Murueta et García-Carreño, 2002).

L'étude conduite ici est donc d'intérêt car elle permet de valider l'idée d'une substitution partielle de la farine animale traditionnellement utilisée dans les aliments, par des hydrolysats protéiques de co-produits de poisson. Tous les résultats de cette étude sont synthétisés dans le Tableau 24.

Tableau 24. Synthèse des résultats en terme de taux de survie, gain de poids relatif, taux de conversion alimentaire et coefficient d'efficacité protéique par comparaison avec l'aliment commercial AK

	AT	AS2	AS3	AS6	AC2	AC3	AC6	AM2	AM3	AM6	AK
Taux de survie (%)	=	=	=	=	=	=	-	-	-	-	94,4
Gain de poids relatif (%)	-	=	+	+	=	-	-	-	-	-	133,8
Taux de conversion alimentaire	=	+	+	+	=	=	=	-	-	=	1,94
Coefficient d'efficacité protéique	=	+	+	+	=	=	=	-	-	-	1,33

+ : mieux que l'aliment commercial AK ; = : identique à l'aliment AK ; - : moins bien que l'aliment AK

Il ressort que l'aliment témoin formulé avec la farine de tête de thon fait aussi bien que l'aliment commercial sauf en ce qui concerne le gain de poids relatif qui est statistiquement inférieur au seuil de 5%. Les crevettes nourries avec les aliments contenant les surnageants d'hydrolyse (AS) présentent des caractéristiques d'élevage identiques voire supérieures à celles nourries avec l'aliment commercial AK, sur tous les critères étudiés. L'aliment AS6 permet même d'avoir à chaque fois de meilleurs résultats. Les aliments de la série AC présentent, quant à eux, des résultats mitigés. L'aliment AC2 est statistiquement équivalent à l'aliment commercial et semble donc pouvoir lui être substitué. Par contre, l'aliment AC3 est moins bon en terme de gain de poids relatif tout comme l'aliment AC6 qui entraîne également un moins bon taux de survie.

Enfin les aliments formulés avec les mélanges de poudres ne soutiennent pas la comparaison puisqu'à chaque fois ils sont moins bons (une seul fois équivalent) que l'aliment commercial.

Les têtes de thon hydrolysées par Protamex, pendant 2, 3 ou 6 heures semblent donc pouvoir être avantageusement incorporées dans des granulés pour crevette plutôt que d'être cuites et transformées en farine. Cependant, il conviendra de fractionner par centrifugation ces hydrolysats et de ne formuler que les surnageants ou alors le culot obtenu à 2 heures si l'on veut obtenir des résultats au moins équivalents à ceux de l'aliment commercial de référence.

3.2.8. Composition chimique de la chair des crevettes

Pour terminer cette étude, la composition chimique des crevettes en début et en fin d'expérience a été déterminée (Tableau 25).

Tableau 25. Composition chimique de la chair des crevettes en début et en fin d'expérience. Les valeurs moyennes dans le même colonne accolées à des lettres différentes sont significativement différentes (P<0,05)

		Composition chimique des crevettes (% du poids frais)			
		Eau	Protéines	Lipides	Cendres
Au début de l'élevage		79,5 ^c ± 0,2	15,8 ^a ± 0,1	1,4 ^a ± 0,1	1,6 ^a ± 0,1
A la fin de l'élevage	AT	77,7 ^{ab} ± 0,2	17,6 ^{bc} ± 0,1	1,6 ^{ab} ± 0,1	2,0 ^b ± 0,1
	AS2	77,1 ^a ± 0,1	18,2 ^d ± 0,1	1,6 ^{abc} ± 0,1	1,9 ^{ab} ± 0,1
	AS3	77,6 ^{ab} ± 0,4	18,3 ^d ± 0,1	1,5 ^{ab} ± 0,1	1,9 ^{ab} ± 0,1
	AS6	77,6 ^{ab} ± 0,4	18,2 ^d ± 0,2	1,6 ^{ab} ± 0,1	1,8 ^{ab} ± 0,1
	AC2	77,8 ^{ab} ± 0,2	17,8 ^c ± 0,1	1,6 ^{ab} ± 0,2	1,8 ^{ab} ± 0,1
	AC3	77,4 ^{ab} ± 0,2	17,7 ^{bc} ± 0,2	1,7 ^{abc} ± 0,3	1,8 ^{ab} ± 0,1
	AC6	77,8 ^{ab} ± 0,6	17,5 ^{bc} ± 0,2	1,6 ^{ab} ± 0,1	1,9 ^b ± 0,1
	AM2	77,9 ^b ± 0,1	17,5 ^{bc} ± 0,1	1,9 ^{bc} ± 0,1	1,9 ^{ab} ± 0,1
	AM3	77,5 ^{ab} ± 0,3	17,4 ^b ± 0,1	2,0 ^c ± 0,2	1,9 ^{ab} ± 0,2
	AM6	77,7 ^{ab} ± 0,1	17,6 ^{bc} ± 0,1	1,9 ^{bc} ± 0,1	1,8 ^{ab} ± 0,1
	AK	77,3 ^{ab} ± 0,1	17,8 ^c ± 0,1	1,7 ^{abc} ± 0,1	2,0 ^b ± 0,1

Quelque soit l'aliment, la teneur en eau des crevettes diminue au cours de la croissance (79,5% au début, 77,7% en moyenne après 6 semaines). Par contre, aucune différence significative de teneur en eau n'est observée entre les crevettes nourries avec les différents aliments.

A l'inverse, la teneur en protéines tend à s'accroître, de 15,8 % au début à 17,4-18,3% après les essais d'alimentation. Au seuil de 5%, les aliments de la série AS semblent entraîner une plus forte teneur finale en protéines tandis que cette teneur est la plus faible de toutes chez les crevettes nourries avec l'aliment AM3. Pour tous les autres granulés (AC, AM2, AM6, AT et AK) aucune différence significative n'est observée. L'apport de protéines hydrolysées solubles tel que pratiqué avec les aliments de la série AS semble donc bénéfique pour la synthèse protéique chez la crevette ce qui confirme les travaux de Córdova-Murueta et García-Carreño, (2002).

Pendant les 6 semaines d'élevage, la teneur en matière grasse chez les crevettes tend à augmenter. Au seuil de 5% seules les crevettes nourries avec les granulés de la série AM (les plus gras, voir composition proximale ci-dessus) ont un taux de lipides différent des crevettes initiales (teneur finale de 1,9 à 2,0%). Il semble donc que, dans nos conditions expérimentales, pour que le taux de matière grasse augmente significativement, la teneur en lipides du granulé doit se situer entre 14% (teneur en lipides des granulés AC6) et 21,1% (teneur en lipides des granulés AM2). En deçà de 14% aucune augmentation du taux de matière grasse ne sera perceptible.

Le taux de cendres semble également dépendant du type d'aliment distribué. Ainsi, ce taux est inchangé (au seuil de 5%) après 6 semaines d'expérimentation pour les aliments AS2, AS3, AS6, AC2, AC3, AM2, AM3 et AM6 (1,8 à 1,9%). Seul l'aliment témoin (AT), l'aliment commercial (AK) et l'aliment AC6 entraînent une augmentation du taux de cendres chez les crevettes.

Par comparaison avec l'aliment commercial, les crevettes nourries avec les aliments AS sont légèrement plus riches en protéines mais équivalentes sur les autres paramètres biochimiques mesurés ici. Les crevettes nourries avec les granulés AC, AM2 et AM6 présentent la même composition biochimique que les crevettes élevées avec l'aliment AK. Seules celles nourries avec AM3 semblent moins riches en protéines.

Il ressort de cette étude que sous certaines conditions, la substitution partielle de la farine animale dans l'aliment par des hydrolysats protéiques issus de co-produits de thon puisse déboucher sur une amélioration de certains paramètres zootechniques sans modifier la composition proximale des crevettes à l'issu de 6 semaines d'élevage.

3.3. Nutrition humaine : sauce de poisson

3.3.1. Composition biochimique des anchois

La composition biochimique des anchois *Stolephorus commersonii* utilisés pour la fabrication de sauce de poisson est présentée dans le tableau 26.

Tableau 26. Composition chimique des anchois

Eau (%)	Protéines (%)	Lipides (%)	Cendres (%)
77,7 ± 0,2	18,4 ± 0,3	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,2

Comme pour tous les poissons, le taux d'humidité avoisine 80% (77,7%). Les protéines sont l'élément majoritaire avec près de 18,4% de la matière fraîche tandis que les lipides et les cendres sont sensiblement équivalents (1,7 et 1,5% respectivement).

3.3.2. Evolution de la teneur en azote de la sauce de poisson lors du processus de fermentation

La sauce de poisson est un produit traditionnel de plusieurs pays de la région asiatique et peut être produite à partir des différentes espèces de poisson mises à fermenter. Pendant ce processus de fermentation, un liquide se forme dont la teneur en azote soluble total augmente grâce à l'hydrolyse par les protéases endogènes telles celles du muscle de poisson et du système digestif ainsi que par les protéases produites par les bactéries halophiles (Orejana et Liston, 1982; Gildberg et Thongthai, 2001; Rustad, 2003; Tungkawachara *et al.*, 2003, Shih *et al.*, 2003,

Hjalmarsson *et al.*, 2007). Les protéases du poisson jouent un rôle très important dans le processus de protéolyse et la solubilisation des protéines (Orejana et Liston, 1982). C'est le cas notamment de la cathepsine, de la pepsine et de la trypsine qui sont responsables de la solubilisation des protéines du poisson en particulier lors de la phase de maturation (Tungkawachara *et al.* 2003, Klomklao *et al.*, 2006; Orejana et Liston, 1982). Cependant, ce processus de protéolyse peut être accéléré par adjonction d'enzymes exogènes (Beddows et Ardeshir, 1979; Aquerreta *et al.*, 2002, Hariono., 2005; Yongsawatdigul *et al.*, 2007) ou l'ajout de viscères de poisson (Kim *et al.*, 1997; Morioka *et al.*, 1999; Gildberg et Thongthai, 2001; Klomklao *et al.*, 2006).

Si dans la grande majorité des cas, les sauces sont produites à partir de poissons entiers, le procédé peut être appliqué sur des portions de poissons tels des co-produits. Ainsi, en ce qui concerne les co-produits de thon, de précédents travaux ont montré que les têtes, les viscères et les arêtes résultants de la transformation du thon pour sa mise en conserve, pouvaient être utilisées comme matière première pour la fabrication de sauce de poisson (Lee et Woo., 1992; Jao., 2002; Kim et Ha., 1995). Il semble donc intéressant de voir si des hydrolysats de co-produits peuvent également être utilisés dans ce type d'application.

3.3.2.1. Azote total

Le principal indice de qualité de la sauce de poisson est sa teneur en azote total utilisée notamment pour établir les normes de qualité des sauces mais aussi leur prix de vente au consommateur (Lopetcharat et Park, 2002). Cette teneur en azote total des sauces est liée à la teneur en azote des acides aminés, en azote peptidique, en azote ammoniacal et à la teneur en azote d'autres substances telles que l'urée, l'oxyde de triméthylamine et les nucléotides (Finne, 1992; Shahidi *et al.*, 1994; Tungkawachara *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2007). L'évolution de la teneur en azote total de la sauce de poisson au cours des 180 jours de fermentation est présentée sur la Figure 32.

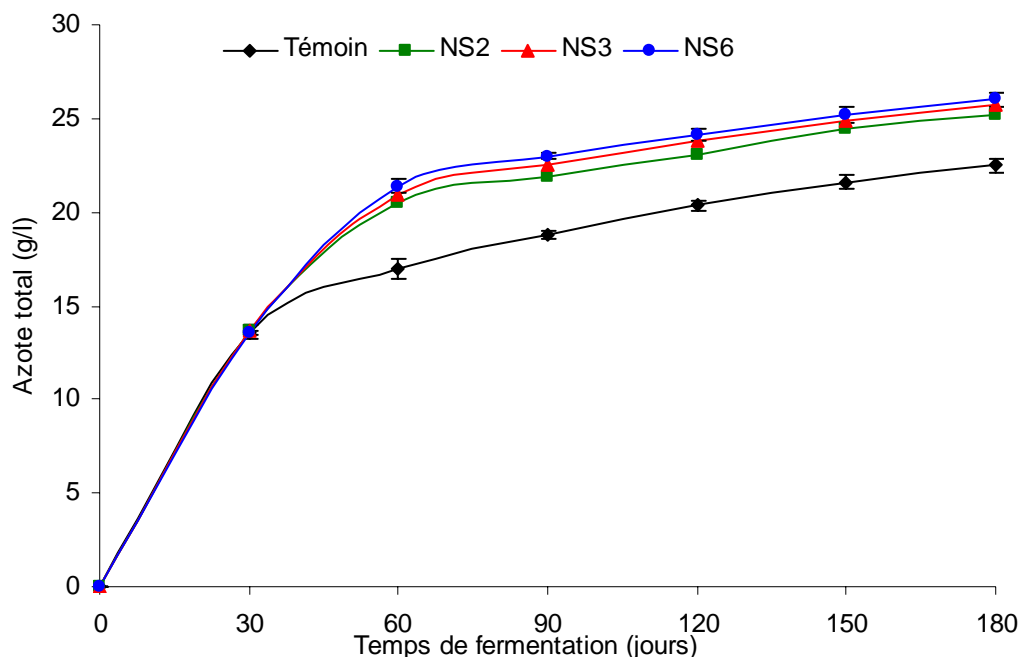


Figure 32. Evolution de la teneur en azote total de la sauce de poisson durant la fermentation. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson contenant les hydrolysats de têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement

Au cours du premier mois de maturation, la teneur en azote total des sauces augmente très fortement puis un ralentissement est observé sans pour autant atteindre une phase de plateau. La teneur en azote total des 4 sauces ne cesse donc d'augmenter pendant ces 6 mois de maturation. Ces résultats étaient attendus, ils reflètent ce qui est traditionnellement observé lors de la phase de maturation des sauces de poissons telles la sauce de poisson traditionnelle indonésienne (Ijong et Ohtay (1996), la sauce de poisson traditionnelle chinoise (Jiang *et al.*, 2007), la sauce de poisson produite à partir de sardines (Klomklao *et al.*, 2006), de saumons (Indoh *et al.*, 2006) et des viscères de thon (Dissaraphong *et al.*, 2006).

Fort logiquement, la supplémentation en hydrolysats contribue à augmenter significativement la teneur en azote total des sauces. Cependant, il semble que plus l'hydrolyse a été poussée, meilleur est le gain en azote total. Ainsi au bout de 180 jours, la sauce NS6 contient 26g/l d'azote total, tandis que les sauces NS3 et NS2 n'en contiennent que 25,7 et 25,2g/l respectivement. Quant à la sauce témoin qui n'a pas été enrichie en hydrolysats, elle contient seulement 22,5g/l d'azote total.

Il apparaît donc très clairement un effet positif de la supplémentation en hydrolysats sur le taux d'azote total des sauces. Plus l'hydrolyse a été longue, plus ce bénéfice est notable.

3.3.2.2. Azote aminé

Au cours du processus de maturation du poisson les protéines sont peu à peu hydrolysées en peptides puis en acides aminés libres. La teneur en acides aminés libres dans la sauce augmente donc au cours du temps comme le confirme la Figure 33.

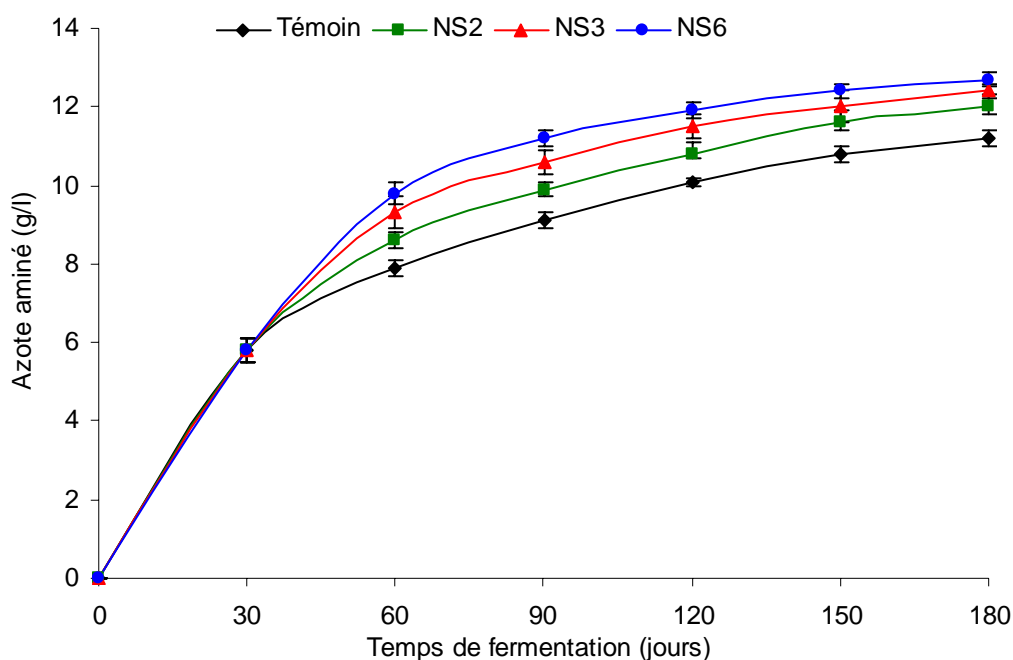


Figure 33. Evolution de la teneur en azote aminé de la sauce de poisson durant la fermentation. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson contenant les hydrolysats des têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement

L'allure générale de ces courbes est très proche de celle obtenue pour l'azote total. Une phase d'augmentation rapide (pendant les 30 à 60 premiers jours) est suivie d'un ralentissement progressif sans pour autant atteindre une phase de plateau même après 6 mois de fermentation. La protéolyse se déroule donc sans interruption dès le premier jour mais il semble que le processus de maturation ne soit pas encore achevé et que toutes les protéines n'ont pas été entièrement hydrolysées même après 6 mois de traitement.

Comme précédemment, l'ajout d'hydrolysats à 30 jours entraîne une augmentation de la teneur en azote aminé : 11,2g/l sans apport, 12g/l ou plus avec ajout. Ceci était attendu car les hydrolysats sont constitués quasi exclusivement de peptides solubles sensibles à la protéolyse. Là encore, un effet de la durée d'hydrolyse est observé, plus celle-ci a été poussée, plus élevé est le taux d'azote aminé relevé à 180 jours : 12g/l pour 2 heures d'hydrolyse, 12,4g/l pour 3h et 12,7g/l pour 6 h.

Ce qui influence le plus fortement sur les teneurs en azote total et azote aminé des sauces de poissons sont l'espèce de poisson utilisée et sa composition chimique proximale (Tungkawachara *et al.*, 2003). En général, plus les poissons utilisés sont riches en protéines plus la sauce de poisson résultante sera riche en acides aminés. Par contre, les espèces de poisson ayant une teneur élevée en eau donnent souvent les sauces de poisson contenant une teneur faible en azote total (Aldrin *et al.*, 1969).

Les paramètres tels la température de la fermentation et la concentration en sel sont, eux aussi, très influents (Hjalmarsson *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2008). Ainsi, une légère augmentation de la température accélère le déroulement de l'autolyse. C'est le cas par exemple, de la sauce de sardines dont les teneurs en azote total et en acides aminés ont atteint 19,5g/l et 11,9 g/l respectivement après seulement 32 jours de fermentation à 38°C alors qu'il a fallu, 59 jours pour obtenir des teneurs équivalentes avec une maturation à température ambiante (Aldrin *et al.*, 1969). La saison à laquelle se déroule la maturation est, elle aussi, d'importance. Ainsi, par exemple, après 250 jours de fermentation, les sauces de poisson mûries en été possédaient 20,3g/l d'azote total contre seulement 9g/l pour celles mûries en hiver (Hjalmarsson *et al.*, 2007). En ce qui concerne la concentration en sel, plusieurs études ont démontré l'action inhibitrice du sel sur la protéolyse, notamment quand les teneurs excèdent 25% (Gildberg *et al.*, 1984; Gildberg, 1989, Klomklao *et al.*, 2006) ce qui est le cas ici (27% en moyenne). Il est donc vraisemblable que les quantités d'azote total et d'azote aminé des sauces expérimentales auraient pu être plus élevées avec une teneur moindre en sel.

3.3.2.3. Azote ammoniacal

Si la protéolyse intervenant pendant le processus de maturation entraîne une augmentation de la teneur en acides aminés libres, la teneur en ammoniac ou azote ammoniacal augmente également (Figure 34).

Le même type de cinétique est encore une fois observé (augmentation initiale rapide puis ralentissement mais pas de plateau). L'adjonction d'hydrolysats entraîne également une augmentation de la teneur en azote ammoniacal, augmentation sensiblement plus forte lorsque l'hydrolyse a été poussée (mais effet moins perceptible que précédemment) : 3,1g/l sans apport, 3,4g/l pour NS2 et NS3, 3,5g/l pour NS6.

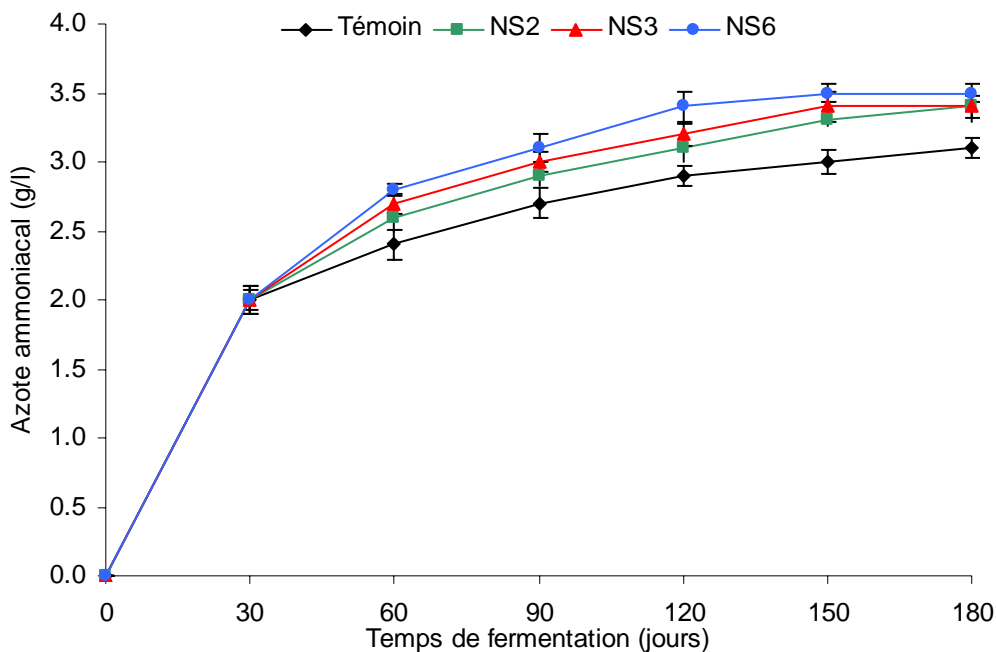


Figure 34. Evolution de la teneur en azote ammoniacal de la sauce de poisson durant la fermentation. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson contenant les hydrolysats des têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement

L'ammoniac est un des composants principaux des bases volatiles donnant l'odeur ammoniacal (Dougan et Howard, 1975). Cet ammoniac est toujours présent dans les sauces de poisson car c'est un des produits de dégradation des substances azotées, en particulier des acides aminés (Lopetcharat et Parc., 2002). Son augmentation lors du processus de maturation est même tout à fait logique (Beddows *et al.*, 1980).

La teneur en ammoniac dans la sauce de poisson dépend de la qualité initiale du poisson mais est également dépendante de la concentration en sel et inversement proportionnelle (Klomklao *et al.*, 2006)

3.3.3. Caractéristiques physico-chimiques de la sauce de poisson

A l'issu des 180 jours de maturation, les caractéristiques physico-chimiques des 4 sauces de poisson expérimentales et commerciales ont été déterminées (Tableau 27).

Tableau 27. Caractéristiques physico-chimiques des sauces expérimentales et commerciales. Les valeurs moyennes dans la même colonne accolées à des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

Sauce de poisson	Azote total (AT) (g/l)	Azote aminé(AA) (g/l)	Azote ammoniacal (AAM) (g/l)	AA/AT (%)	AAM/AT (%)	NaCl (g/l)	pH
Témoin	22,5 ^b ± 0,4	11,2 ^c ± 0,2	3,1 ^c ± 0,1	49,8 ^d ± 0,7	13,7 ^{bc} ± 0,3	272,5 ^{bc} ± 3,1	5,8 ^{ab} ± 0,1
NS2	25,2 ^c ± 0,4	12,0 ^d ± 0,2	3,4 ^d ± 0,1	47,7 ^{bc} ± 1,5	13,4 ^{bc} ± 0,4	274,5 ^{bc} ± 3,7	5,7 ^a ± 0,1
NS3	25,7 ^c ± 0,6	12,4 ^{de} ± 0,4	3,4 ^d ± 0,1	48,3 ^{cd} ± 1,8	13,2 ^b ± 0,2	271,1 ^b ± 4,5	5,7 ^a ± 0,1
NS6	26,0 ^c ± 0,4	12,7 ^e ± 0,2	3,5 ^{de} ± 0,1	48,9 ^{cd} ± 0,8	13,7 ^{bc} ± 0,3	273,5 ^{bc} ± 3,9	5,7 ^a ± 0,1
<i>Nuoc-mam</i> Phan Thiet 'Hon me'	30,2 ^d ± 0,6	14,3 ^f ± 0,4	3,5 ^{de} ± 0,2	47,4 ^{bc} ± 0,8	11,6 ^a ± 0,5	277,7 ^c ± 1,5	5,7 ^a ± 0,1
<i>Nuoc-mam</i> Phu Quoc 'Thanh Ha'	35,1 ^e ± 0,5	16,8 ^g ± 0,2	3,7 ^e ± 0,1	47,9 ^{bc} ± 1,0	10,5 ^a ± 0,4	274,3 ^{bc} ± 2,5	5,7 ^a ± 0,1
<i>Nam pla</i> 'poisson'	18,4 ^a ± 0,5	8,5 ^b ± 0,3	2,9 ^{bc} ± 0,1	46,3 ^b ± 0,5	15,8 ^d ± 1,1	263,3 ^a ± 3,5	5,8 ^{ab} ± 0,1
<i>Nam pla</i> 'crevette'	18,3 ^a ± 0,5	8,4 ^b ± 0,4	2,7 ^b ± 0,3	46,0 ^b ± 1,0	14,8 ^{cd} ± 1,2	275,7 ^{bc} ± 2,5	5,9 ^b ± 0,1
<i>Nam pla</i> 'calmar'	17,7 ^a ± 0,5	7,7 ^a ± 0,2	2,4 ^a ± 0,2	43,6 ^a ± 0,2	13,7 ^c ± 1,6	274,7 ^{bc} ± 2,5	5,9 ^b ± 0,1

NS2, NS3 et NS6 sont les sauces de poisson comprenant des hydrolysats de têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement.

Nuoc-mam Phan Thiet 'Hon me' et Nuoc-mam Phu Quoc 'Thanh Ha' sont les sauces de poisson commerciales vietnamiennes.

Nam pla 'poisson', Nam pla 'crevette' et Nam pla 'calmar' sont les sauces de poisson commerciales thaïlandaises

Par rapport au lot témoin, les sauces expérimentales enrichies en hydrolysats sont plus riches en azote total (de 25,2 à 26,0 g/l par rapport à 22,5g/l), en azote aminé (de 12,0 à 12,7g/l par rapport à 11,2) et en azote ammoniacal (de 3,4 à 3,5g/l par rapport à 3,1g/l). L'effet de la durée d'hydrolyse n'est perceptible que pour les teneurs en azote aminé qui semblent augmenter avec le temps d'hydrolyse (NS6>NS3>NS2). Ainsi, il semble que plus les peptides sont petits (hydrolyse de plus en plus longue), plus leur adjonction dans les sauces en maturation contribue à augmenter la teneur de celles-ci en azote aminé mais reste sans effet sur les teneurs en azote total et ammoniacal. La supplémentation en hydrolysat ne semble pas modifier la teneur globale en NaCl (271 à 274g/l) ni le pH (5,7 à 5,8).

Les 4 sauces expérimentales ont des teneurs en azote total intermédiaires par rapport aux sauces commerciales. Elles sont en effet plus riches que les sauces thaïlandaises (Nam pla, 17,7 à 18,4g/l) mais plus pauvres que les sauces vietnamiennes (Nuoc-mam, 30,2 à 35,1g/l). Il en est de même pour les teneurs en azote aminé : de 7,7 à 8,5g/l pour les Nam pla, 14,3 à 16,8g/l pour les nuoc-mam. Pour l'azote ammoniacal, si la même tendance est observée, l'écart est cependant moins marqué ; les sauces expérimentales présentant des teneurs proches de celles mesurées pour les sauces vietnamiennes (3,4 à 3,5 contre 3,5 à 3,7g/l).

Le ratio azote aminé/azote total est classiquement utilisé comme un indicateur du degré d'hydrolyse ; plus la maturation est longue, plus élevé est ce ratio (Gildberg, 2001). Les sauces d'origine thaïlandaise sont celles qui présentent les plus faibles ratios (de 43,6 à 46,3%) et semblent donc être les « moins hydrolysées ». Viennent ensuite les sauces vietnamiennes et la sauce expérimentales NS2 (47,4 à 47,9%) qui posséderaient donc un taux d'hydrolyse moyen. Enfin les sauces NS3, NS6 et la sauce témoin (non enrichie) sont celles qui présentent les ratios les plus élevés (48,3 à 49,8%). L'hydrolyse a donc été plus forte pour ces 3 sauces, ce qui n'est pas étonnant pour NS3 et NS6 supplémentées en peptides de petite taille et en acides aminés libres mais plus surprenant pour la sauce témoin. Une inhibition des protéases, intervenant dans le processus de maturation, par les hydrolysats n'est pas à exclure et pourrait expliquer ces

résultats. Il a en effet été montré dans de très nombreux travaux des effets inhibiteurs de cocktails peptidiques sur l'action de telles enzymes et même sur la croissance bactérienne (Dumay, 2006).

Au regard du ratio azote ammoniacal/azote total, les sauces expérimentales (13,2 à 13,7%) ont une position intermédiaire à savoir entre les sauces vietnamiennes (ratio compris entre 10,5 et 11,6%) et thaïlandaises (ratio variant de 13,7 à 15,8%).

Enfin, en ce qui concerne les teneurs en NaCl et le pH des sauces à l'issue des 6 mois, peu de différences sont notables, seule la sauce Nam pla 'poisson' apparaît légèrement moins salée que les autres (263,3g/l par rapport à 271-278g/l), le pH restant compris entre 5,7 et 5,9.

Plusieurs normes ont été établies pour qualifier les sauces de poisson. Ainsi, d'après la norme vietnamienne 5107 (2003) qui est la plus contraignante, les sauces de poisson ayant un teneur en azote total supérieur à 30 g/l sont identifiées comme « classe extraordinaire », si cette teneur est comprise entre 25 et 30 g/l la sauce est classée « surfine », « première classe » pour des teneurs variant de 15 à 25g/l et « deuxième classe » pour des teneurs comprises 10 et 15g/l. Cependant avant de classer les sauces d'après cette norme, il convient également de regarder la proportion d'azote aminé par rapport à l'azote total. Ainsi, il faut que cette proportion représente au moins 55% pour la classe « extraordinaire », 50% pour la classe « surfine », 40% pour la « première classe » et 35% pour la « deuxième classe ». Enfin, toujours selon cette norme, l'azote ammoniacal ne doit pas excéder 20, 25, 30 et 35% de l'azote total pour les classes « extraordinaire », « surfine », « première classe » et « deuxième classe » respectivement.

Parallèlement à cette norme il en existe d'autres, moins exigeantes, telle celle FDA thaïlandaise (Food and Drug Administration Standard) établie en 2003 qui stipule que les sauces de poisson ne doivent pas avoir une teneur en azote total inférieure à 9g/l et l'azote aminé doit représenter au moins 40-60% de cet azote total (Lopetcharat *et al.*, 2001). Enfin, d'après la norme de l'Institut de Standards Industriels Thaïlandais (TISI), les sauces de poisson ayant des teneurs en azote total et en azote aminé supérieures à 20g/l et à 10g/l respectivement peuvent être considérées comme « première classe », par contre si ces teneurs sont comprises entre 15-20g/l et 7,5 et 10g/l respectivement, elles sont alors de « seconde classe »

La classification, selon ces différentes normes, des sauces de poissons étudiées ici, est présentée dans le tableau 28.

Tableau 28. Classification de sauces de poisson

	Sauces de poisson expérimentales				Sauces de poisson commerciales vietnamiennes		Sauces de poisson commerciales thaïlandaises		
	Témoin	NS2	NS3	NS6	'Phan Thiet'	'Phu Quoc'	Nam pla 'Poisson'	Nam pla 'Crevette'	Nam pla 'Calmar'
Norme 5107 (AT)	Première classe	Surfine			Extraordinaire		Première classe		
Norme 5107 (AA/AT)	Première classe				Première classe				
Norme 5107 (AAM/AT)	Extraordinaire				Extraordinaire				
Norme 5107 (bilan)	Première classe				Première classe				
FDA (AT)	OK				OK				
FDA (AA/AT)	OK				OK				
TISI	Première classe				Première classe		Deuxième classe		

AT: Azote total ; AA: Azote aminé ; AAM: Azote ammoniacal ;

FDA: Food and Drug Administration Standard ; TISI : Institut de Standards Industriels Thaïlandais.

Au vu de ces résultats, il ressort que toutes les sauces ne sont pas de qualité identique selon les différentes normes.

Les sauces vietnamiennes sont réputées car elles sont élaborées à partir d'anchois de très haute qualité ce qui contribue normalement à élever la teneur en azote total et en azote aminé par rapport à d'autres sauces tout en leur confinant une odeur et une saveur caractéristiques. D'après la norme vietnamienne 5107, ces sauces sont en effet classées comme « extraordinaire » pour leur teneur en azote total (ce sont d'ailleurs les seuls classés comme tel dans cette étude). Cependant, elles n'obtiennent « que » la classification « première classe » au regard de leur proportion en azote aminé ce qui fait que selon cette norme ces sauces sont catégorisées « première classe »

tout comme les autres sauces étudiées ici. La norme vietnamienne 5107 bien qu'exigeante, ne permet pas de différencier les sauces entre elles.

Toutes les sauces sont déclarées conformes selon la norme FDA de Thaïlande et seule la norme TISI permet de discriminer certaines d'entre elles à savoir les sauces commerciales thaïlandaises catégorisées « deuxième classe » tandis que les autres sont « première classe ».

Il ressort de cette analyse, qu'aucune amélioration de la qualité (selon les 3 normes étudiées) ne ressort de ces essais de supplémentation en hydrolysats lors du processus de maturation. Cependant, la durée de la fermentation diffère fortement entre les sauces. Ainsi, les sauces commerciales sont généralement collectées après 9 à 12 mois de maturation (plus de 12 même pour la sauce Phu Quoc) alors que la maturation n'a duré que 6 mois pour les sauces expérimentales (témoin, NS2, NS3 et NS6). L'hypothèse d'une amélioration de la qualité des sauces expérimentales avec l'allongement de la durée de fermentation peut donc être formulée car les teneurs en azote total et en azote aminé auraient été augmentées (voir figures 32 et 33 où les teneurs augmentent régulièrement au cours du temps). Il conviendrait donc de refaire ces essais sur une durée plus longue (9 à 12 mois de maturation) pour confirmer cela.

Les teneurs élevées en sel étaient attendues car le sel est utilisé pour, d'une part, inhiber les activités des bactéries et prévenir la détérioration des poissons et, d'autre part, il contribue activement à la saveur des sauces de poisson. Des teneurs supérieures à 10% inhibent les bactéries « normales » mais le développement des bactéries halophiles perdure même lorsque les teneurs excèdent 12%. Les fortes teneurs observées ici (de l'ordre de 27%) sont celles classiquement observées dans ce type de produit (McIver *et al.*, 1982).

La diminution du pH lors du processus de maturation est elle aussi logique (Gildberg et Thongthai, 2001; Tungkawachara *et al.*, 2003) et est notamment due à l'apparition de composés tels l'acide lactique et l'acide acétique (Itoh *et al.*, 1993; Funatsu *et al.*, 2000; Michihata *et al.*, 2000a). Plusieurs auteurs ont trouvé des valeurs du même ordre et généralement comprises entre 5,2 et 6,5 (Dissaraphong *et al.*, 2006; Ijong et Ohta, 1996; Lopetcharat, 1999).

3.3.4. Composition en acides aminés de la sauce de poisson

Les compositions en acides aminés des différentes sauces sont indiquées dans le Tableau 29.

Tableau 29. Composition en acides aminés libres de la sauce de poisson

Acides aminés (g/100ml)	Sauces expérimentales				Sauces commerciales vietnamiennes		Sauces commerciales thaïlandaises		
	Témoin	NS2	NS3	NS6	Phan Thiet	Phu Quoc	Nam pla "poisson"	Nam pla "crevette"	Nam pla "calmar"
Isoleucine	1,71	1,78	1,83	1,72	1,22	1,75	0,66	0,37	0,38
Leucine	1,44	1,62	1,71	1,72	1,42	0,90	0,88	0,65	1,44
Lysine	0,30	0,29	0,26	0,31	0,66	0,79	0,45	0,40	0,43
Méthionine	0,03	0,04	0,06	0,12	0,36	0,31	0,04	0,03	0,02
Phénylalanine	1,13	1,20	1,40	1,45	1,58	1,27	0,76	0,74	0,71
Thréonine	0,19	0,15	0,14	0,21	0,66	0,69	0,28	0,86	0,46
Tryptophane	0,11	0,10	0,11	0,10	0,33	0,11	0,07	0,07	0,09
Valine	0,52	0,5	0,42	0,63	0,10	0,13	0,16	0,02	0,20
Acides aminés essentiels ***(AAE)	5,43	5,68	5,93	6,26	6,33	5,95	3,3	3,14	3,73
Alanine	0,16	0,27	0,20	0,23	0,22	0,66	0,78	0,93	0,89
Arginine	0,10	0,10	0,11	0,14	0,15	0,17	0,09	0,19	0,12
Aspartique	0,06	0,05	0,04	0,06	0,12	0,03	0,01	0,02	0,01
Glutamique	0,40	0,44	0,53	0,47	0,45	0,58	0,38	0,35	0,33
Glycine	0,34	0,37	0,38	0,33	1,33	0,74	0,44	0,44	0,39
Histidine	0,39	0,34	0,50	0,26	0,03	1,40	0,70	0,33	0,14
Hydroxyproline	0,07	0,08	0,07	0,10	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
Proline	0,50	0,56	0,34	0,45	0,52	0,05	0,04	0,01	0,02
Serine	1,79	1,90	1,85	1,95	1,82	1,64	0,78	1,02	0,66
Tyrosine	0,27	0,26	0,28	0,24	0,07	0,42	0,11	0,15	0,18
Acides aminés non essentiels (AANE)	4,08	4,37	4,30	4,23	4,73	5,70	3,35	3,45	2,75
TOTAL	9,51	10,05	10,23	10,49	11,06	11,65	6,65	6,59	6,48

***L'utilisation du terme "essentiels" pour ces 8 acides aminés est simplement due au fait qu'ils ne peuvent pas être synthétisés par l'homme ce qui implique qu'ils doivent être apportés par l'alimentation. Cependant, il existe un acide aminé particulier connu sous le nom d'histidine qui est souvent considéré comme essentiel pour des enfants mais pas pour des adultes.

L'analyse de ces résultats montre que les sauces commerciales d'origine thaïlandaise sont beaucoup moins riches en acides aminés libres que toutes les autres (de l'ordre de 6,5g/100ml par rapport à 9,5g/100ml pour le témoin et 11,6g/100ml pour la sauce Phu Quoc). Ces résultats sont conformes à ceux publiés par Park *et al.* (2001) qui montraient que les sauces vietnamiennes étaient plus riches en acides aminés libres (9,83 g/100ml) que les sauces japonaises (7,53g/100ml), elles mêmes plus riches que les sauces thaïlandaises (6,73g/100ml).

Comme escompté, l'adjonction d'hydrolysat permet d'augmenter significativement la teneur en acides aminés libres après 6 mois de maturation (jusqu'à 1g/100ml de plus par rapport au témoin pour la sauce NS6). Cependant, dans cette étude, les sauces vietnamiennes restent malgré tout plus riches avec de 0,5 à 1g/100ml d'acides aminés libres supplémentaires. Il ressort également que, plus l'hydrolyse a été longue, plus la teneur en acides aminés libres est élevée (NS6>NS3>NS2) ce qui semble logique car les surnageants plus fortement hydrolysés sont censés être plus riches en petits peptides et acides aminés libres.

Néanmoins, cette analyse est à nuancer en ce qui concerne la proportion en acides aminés essentiels. Si les sauces thaïlandaises sont, là encore, les plus pauvres (3,1 à 3,7g/100ml soit presque 2 fois moins que les autres sauces), l'écart entre les sauces expérimentales supplémentées en hydrolysats et les sauces vietnamiennes n'est plus aussi flagrant. La sauce expérimentale NS6, et, dans une moindre mesure, la sauce NS3 apparaissent même équivalentes aux sauces vietnamiennes pour leur teneur en acides aminés essentiels. L'effet de la supplémentation est encore une fois notable avec une augmentation allant jusqu'à 0,8g/100ml en acides aminés essentiels (soit 15% d'augmentation par rapport au témoin pour la sauce NS6). Comme précédemment, plus l'hydrolyse a été longue, plus cette augmentation est sensible (NS6>NS3>NS2>témoin). Le calcul du ratio AAE/AANE conforte ces observations et confirme la valeur nutritionnelle des sauces expérimentales. En effet, ces dernières, supplémentées ou non, présentent un ratio supérieur à celui des autres sauces avec un minimum de 1,3 pour la sauce NS2 et un maximum de 1,48 pour NS6. Pour 3 des sauces commerciales (Phu Quoc, Nam pla poisson et Nam pla crevette) ce ratio est proche de 1 voire inférieur à 1, tandis qu'il est de 1,34 et 1,36 pour les sauces Phan Thiet et Nam pla calmar. L'effet « durée » de l'hydrolyse est bien illustré par le fait que ce ratio augmente avec le temps d'hydrolyse (1,3 pour 2 heures, 1,48 pour 6 heures).

La composition détaillée en acides aminés des différentes sauces illustre bien les différences entre les sauces, liées notamment à l'origine de la matière première et au processus de fabrication notamment le temps de maturation. Pour toutes les sauces expérimentales (supplémentées ou non), 4 acides aminés dont 3 essentiels sont majoritaires : la sérine > l'isoleucine > la leucine > la phénylalanine. Pour ces 4 acides aminés, les concentrations trouvées excèdent 1,1g/100ml. Ces sauces sont par contre très pauvres en méthionine < acide aspartique < hydroxyproline.

Dans la sauce Phan Thiet d'origine vietnamienne, 5 acides aminés sont majoritaires: la sérine > la phénylalanine > la leucine > la glycine > l'isoleucine avec des concentrations supérieures à 1,2g/100ml. La glycine y est ici détectée dans des proportions près de 4 fois supérieures à celles des sauces expérimentales (1,33g/100ml contre 0,34 à 0,38g/100ml), 3 fois plus que dans les sauces thaïlandaises et 2 fois plus que dans la sauce Phu Quoc. Les acides aminés minoritaires de la sauce Phan Thiet sont : l'hydroxyproline < l'histidine < le tyrosine. Cette sauce contient au moins 10 fois moins d'histidine (0,03g/100ml) que les autres sauces et près de 4 fois moins de tyrosine (0,07g/100ml) que les sauces expérimentales. Cette sauce vietnamienne peut donc être caractérisée par sa richesse en Glycine et sa faible teneur en histidine. Dans la sauce Phu Quoc, 4 acides aminés sont présents à plus de 1,2g/100ml : Isoleucine > Sérine > Histidine > Phénylalanine. Les acides aminés minoritaires sont l'hydroxyproline < l'acide aspartique < la proline. Ainsi, bien que cette sauce et la précédente soient toutes deux d'origine vietnamienne elles se différencient par de forts écarts de teneur en Histidine (0,03g/100ml pour le Phan Thiet et 1,4g/100ml pour le Phu Quoc). Hormis, sa grande richesse en histidine qui semble caractéristique, cette sauce s'apparente aux sauces expérimentales présentées ci-dessus. Les sauces thaïlandaises se différencient peu entre elles au niveau de leur composition en acides aminés. Pour toutes les trois, la leucine, l'alanine, la phénylalanine et la sérine sont des acides aminés majoritaires, à noter que la sauce « crevette » est également riche en thréonine. La présence de l'alanine dans ce « classement » est nouveau mais la leucine et la phénylalanine ont déjà été identifiées pour toutes les autres sauces. Les acides aminés minoritaires sont eux aussi « classiques » des sauces de poisson à savoir l'hydroxyproline, l'acide aspartique et la proline.

Ces analyses révèlent donc des constances dans la composition en acides aminés libres des sauces de poisson étudiées ici à savoir : une prédominance de la phénylalanine, de la sérine et

dans une moindre mesure de la leucine. A l'inverse, l'hydroxyproline et l'acide aspartique sont toujours détectés en faibles concentrations. Cependant, il semble que les processus de fabrication et les matières premières utilisées puissent modifier profondément cette hiérarchie. Ainsi, pour Cha et Cadwallader (1998), l'acide glutamique, la leucine, la lysine, la valine, l'arginine, et l'alanine sont les acides aminés les plus abondants identifiés dans la sauce de thon. Pour Jiang *et al.*, (2007) ce sont l'acide glutamique, la leucine, la lysine et la valine qui sont majoritaires dans la sauce traditionnelle chinoise Yu-lu. Enfin d'après Ijong et Ohta (1995), la sauce traditionnelle indonésienne est riche en acide glutamique, lysine, isoleucine, valine et alanine.

Les sauces expérimentales et la sauce Phu Quoc apparaissent relativement semblables au niveau de leur composition en acides aminés libres à l'exception de la concentration en histidine qui est beaucoup plus élevée dans la sauce commerciale. Les sauces thaïlandaises sont assez homogènes entre elles et hormis une plus faible teneur en Isoleucine, elles peuvent être apparentées aux sauces expérimentales et à la sauce Phu Quoc en ce qui concerne leur composition en acides aminés libres. La sauce Phan Thiet se différencie des autres principalement par sa richesse en Glycine et ses faibles teneurs en Histidine et Tyrosine.

Au niveau de l'intérêt nutritionnel, les sauces expérimentales supplémentées en hydrolysats sont remarquables car elles possèdent des teneurs élevées en acides aminés avec une forte proportion en acides aminés essentiels. Plus l'hydrolyse a été longue plus la sauce est riche en acides aminés et particulièrement en acides aminés essentiels.

3.3.5. Teneur en histamine de la sauce de poisson

L'histamine est une amine biogène produite après la mort du poisson sous l'action de certaines bactéries qui vont, par voie enzymatique à l'aide de l'histidine décarboxylase, décarboxyler l'histidine (acide aminé) en histamine (Yoshinaga et Frank, 1982; Kimura *et al.*, 2001).

L'ingestion d'histamine peut entraîner des infections alimentaires. Ces intoxications par l'histamine sont généralement peu graves, mais elles sont prises très au sérieux dans les problèmes de sécurité alimentaire et à échanges internationaux. Ainsi la teneur en histamine des produits de la pêche transformés ou non peut devenir un frein à l'exportation vers l'Europe, les Etat Unis et le Canada. Par exemple, l'Agence d'Inspection de Poisson Canadienne a établi une

limite maximale pour la teneur en histamine dans les sauces de poisson à 200 mg/l tandis que la Food and Drug Administration des Etats-Unis (FDA-US) a fixé cette limite maximale à 500mg/l (Dissaraphong *et al.*, 2006).

Les teneurs en histamine des sauces de poisson étudiées ici sont présentées dans le Tableau 30.

Tableau 30. Teneurs en histamine dans la sauce de poisson. NS2, NS3 et NS6: Sauces de poisson incorporant les hydrolysats de têtes de thon S2, S3 et S6, respectivement

	Témoin	NS2	NS3	NS6
Histamine (mg/l)	164	177	182	186

Les teneurs en histamine dans les sauces de poisson produites dans cette étude sont faibles (inférieures à 200 mg/l), ce qui est en partie dû à la grande fraîcheur des matières premières utilisées à savoir les anchois et les thons (Brillantes, 1999). Au regard des limites légales exposées ci-dessus, toutes les sauces expérimentales sont en deçà des valeurs maximales. Il apparaît également que les sauces enrichies voient leur teneur en histamine augmenter et que cette augmentation semble d'autant plus forte que l'hydrolyse a été longue.

La formation d'histamine dans le poisson et des produits issus du poisson est liée à l'espèce de poisson, la teneur en histidine libre dans le muscle de poisson, la présence de l'histidine décarboxylase et les conditions environnementales favorables ou non à la croissance des bactéries productrices d'histamine (Lehane et Olley, 2000). Plusieurs bactéries productrices d'histamine ont été isolées à partir des produits de poissons salés tels que les sardines salées, les anchois salés et la sauce de poisson à savoir des bactéries des genres *Staphylococcus*, *Vibrio* et *Pseudomonas* (Yatsunami et Echigo, 1991), *Bacillus* (Hernandez-Herrero *et al.*, 1999; Rodriguez-Jerez *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 2006).

Brillantes *et al.* (2002) ont étudié la formation d'histamine au cours de la fabrication d'une sauce de poisson thaïlandaise et montré que les taux d'histamine augmentent pendant la fermentation mais qu'ils sont liés à la qualité de la matière première (notamment les teneurs en histidine, précurseur de l'histamine) et au procédé de fabrication. En général, la formation d'histamine par les bactéries augmente à une température élevée (Sanceda *et al.*, 1996; Kim *et*

al., 2000) ainsi les sauces de poisson produites à partir de poissons stockés sans glace sont plus riches en histamine que celles produites avec des poissons stockés sous glace (Brillantes *et al.*, 2002). Le sel peut également inhiber la formation d’histamine en freinant le développement des bactéries productrices d’histamine telles *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus morgani* (Taylor et Woychik., 1982; Taylor et Speckhard., 1984, Sanceda *et al.*, 1999).

Dans une étude, Tsai *et al.* (2006) ont constaté que la majorité (66,7%) des échantillons de sauces de poisson de Taïwan avaient une teneur en histidine comprise entre 50 et 499 mg/l. Sanceda *et al.* (1996) ont rapporté une teneur en histamine de 430 mg/l dans une sauce de poisson thaïlandaise et 1380 mg/l dans une sauce de poisson coréenne. Enfin, une enquête réalisée par le service d’inspection des produits de la pêche de Thaïlande montre que 75% des échantillons présentaient une teneur en histamine supérieure à 200 mg/l, avec la majorité des valeurs se situant entre 600 et 1000 mg/l (Brillantes, 1999). Les sauces expérimentales produites pour cette étude sont largement en deçà de ces valeurs d’histamine de différentes sauces commerciales, ce qui confirme encore une fois leur potentiel.

3.3.6. Qualité sensorielle de la sauce de poisson

Le jury a défini 13 descripteurs permettant de décrire l’aspect (transparence, couleur), l’odeur et la saveur des produits étudiés. La liste de descripteurs est présentée dans la Tableau 31.

Tableau 31. Liste de descripteurs utilisés dans l'analyse sensorielle de la sauce de poisson

N°	Critère	Descripteurs
1	Apparence	Transparence
2	Couleur	Jaune
		Brun
		Rouge
		Noir
3	Odeur	Ammoniac
		Âcre
		Poisson cuit à la vapeur
		Putride
4	Saveur	Salé
		Sucré
		Umami
		Amer

Les profils sensoriels des sauces de poisson basés sur une analyse descriptive et quantitative sont présentés sur la Figure 35.

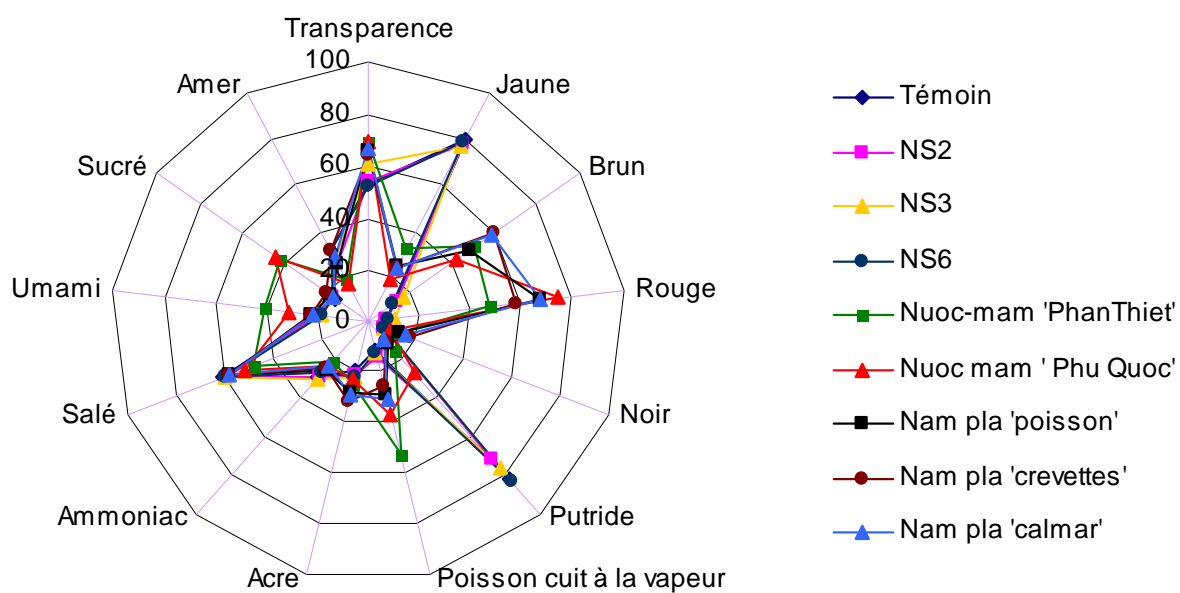


Figure 35. Profils sensoriels des sauces de poisson

Une analyse sensorielle de tous les échantillons montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les 9 échantillons de sauce de poisson pour les descripteurs d'odeur ammoniacal et d'odeur d'âtre. Par contre, ces échantillons sont très différents pour les autres descripteurs. En effet, les résultats ont montré que les sauces de poisson ont des couleurs (jaune, brun, rouge, noire), des odeurs (poisson cuit à la vapeur, putride) et des saveurs (salé, sucré, umami et amer) différentes.

Cette analyse révèle qu'il n'y a pas de différence significative d'aspect (transparence, couleur), d'odeur, de saveur entre les sauces de poisson contenant les hydrolysats de têtes de thon et la sauce de poisson témoin. Les sauces de poisson commerciales vietnamiennes avaient une saveur d'umami et une saveur sucrée plus marquée que celles des autres sauces de poisson.

En ce qui concerne la couleur de la sauce de poisson, les résultats indiquent que les sauces de poisson produites dans cette étude sont caractérisées par une couleur jaune et les sauces de poisson commerciales vietnamiennes et thaïlandaises sont caractérisées par une couleur brune et rouge.

La qualité de la sauce de poisson est estimée non seulement par la teneur en azote total et en azote aminé mais aussi par son odeur, sa saveur et sa couleur, (Hjalmarsson *et al.*, 2007). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative pour l'odeur 'ammoniac' et 'âtre' entre les 9 produits mais qu'il existe des différences sur d'autres propriétés telles que l'odeur de poisson cuit à la vapeur, l'odeur putride, la saveur sucrée, la saveur d'umami, la saveur salée, la saveur amère, la couleur jaune, brune, rouge, noir et la transparence.

L'odeur et la saveur caractéristiques de la sauce de poisson sont principalement dues à la dégradation de protéines et de lipides par des enzymes autolytiques et bactériennes pendant la fermentation (Saisithi *et al.*, 1966; Beddows *et al.*, 1976). Comme précédemment indiqué (voir ci-dessus), les bactéries jouent un rôle très important dans le processus de fermentation de la sauce de poisson et de très nombreuses études ont montré que l'activité bactérienne contribuait au développement des composés d'odeur et de saveur dans les sauces de poissons (Dogan and Howard, 1975; Beddow *et al.*, 1980; Sanceda *et al.*, 1992; Saisithi, 1994; Peralta *et al.*, 1996). C'est pourquoi une sauce de poisson produite aseptiquement n'a ni l'odeur caractéristique ni de fortes teneurs en acides gras volatils (Beddows *et al.*, 1979). Plusieurs microorganismes ont ainsi été identifiés comme contribuant à l'odeur et à la saveur des sauces de poissons : *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Coryneformes* et *Streptococcus* (Saisithi *et al.*, 1966 ; Norberg et

Hofsten., 1968; Sands et Crisan 1974; Thongthai *et al.*, 1992 ; Ijong and Ohta, 1996 ; Lopetcharat et Park., 2002).

L'odeur de la sauce de poisson est généralement décrite comme étant un mélange d'odeur ammoniacale, d'odeur de fromage et d'odeur de viande (Dougan et Howard, 1975; Beddows *et al.*, 1976). Si l'odeur ammoniacale est principalement due à la présence d'ammoniac et de triméthylamine (Uyenco *et al.*, 1953; Beddows *et al.*, 1979), de très nombreux composés volatils ont également été identifiés dans les sauces de poisson : acides, alcools, composés contenant de l'azote ou du soufre, phénols, carbonyles, esters, hydrocarbures,... (Sanceda *et al.*, 1984; Sanceda *et al.*, 1986; Peralta *et al.*, 1996; Triqui et Reineccius, 1995; Cha *et al.*, 1997; Triqui et Guth. 1997; Cha et Cadwallader, 1998 ; Shih *et al.*, 2003). Ces composés volatils formés pendant la fermentation contribuent progressivement à l'apparition de l'odeur de la sauce de poisson (Saisithi *et al.*, 1966, Beddows *et al.*, 1980, Sanceda *et al.*, 1983; Sanceda *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2008). Parmi ceux-ci, il semble que les acides éthanoïque, propanoïque, iso-butanoïque, n-butanoïque, 2 méthyl butanoïque, 2 éthyl butanoïque, n-pentanoïque, le méthanol, éthanol, 2 méthyl propanol, glycerol, butanol, 2 méthyl butanol, hexanol, heptanol, formol, éthanal, propional, 2 méthyl propanal, butanal, 2 méthyl butanal soient les plus caractéristiques de ce type de produit (Sanceda *et al.*, 1984; Sanceda *et al.*, 2001).

La saveur de la sauce de poisson est influencée par la teneur en acides aminés libres. Par exemple, l'acide glutamique est responsable de la saveur 'umami' (Liu, 1989, Komata, 1990; Sanceda *et al.*, 1990); glycine, alanine, lysine, serine et thréonine donnent la saveur sucrée (Kato *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2001; Tungkawachara *et al.*, 2003) tandis que arginine, leucine, méthionine, proline, donnent l'amertume (Shih *et al.*, 2003). L'acide glutamique semble cependant se différencier des autres de part sa contribution à la saveur générale (Sanceda *et al.*, 1996; Tungkawachara *et al.*, 2003). Cependant, il est certain que tous les acides aminés libres identifiés dans les sauces de poissons contribuent à la saveur finale du produit particulièrement parce qu'ils se combinent avec des oligopeptides et des acides organiques (Michihata *et al.*, 2000b; Park *et al.*, 2002a ; Park *et al.*, 2002b). Parmi les autres composés affectant la saveur, le sel joue également un rôle (Ijong et Ohta, 1995).

Le caractère sucré discrimine les sauces vietnamiennes des autres dans cette étude. Cela est certainement du pour partie à leurs teneurs plus élevées en glycine, lysine et thréonine. Par

contre aucune différence significative entre les 9 sauces n'est notée par le jury en ce qui concerne la saveur salée.

La couleur d'une sauce de poissons est pour partie dépendante de l'espèce qui est maturée mais aussi à l'apparition de produits de la réaction de Maillard qui survient pendant la phase de maturation (Lopetcharat *et al.*, 2001; Lopetcharat et Park, 2002). Celle-ci fait intervenir un sucre réducteur et un acide aminé libre qui vont tout d'abord former des produits intermédiaires et puis au final des pigments bruns (Van Boekel, 1998). Dans cette étude, les sauces commerciales vietnamiennes et thaïlandaises ont une couleur brune plus foncée que celle des sauces de poisson expérimentales. Ceci est certainement lié à des intensités variables de la réaction de Maillard mais aussi aux différences de matières premières utilisées, conditions de fermentation (température) de durée de fermentation,... (Sumaya - Martinez *et al.*, 2005). Cette dernière beaucoup plus courte (6 mois) pour les sauces expérimentales que pour les sauces commerciales (9 à 12 mois) est vraisemblablement la principale raison des différences de couleur notées par le jury.

4. CONCLUSION

Notre travail de recherche, concernant l'utilisation d'hydrolysats de têtes de thon en tant que complément alimentaire en alimentation aquacole, a permis d'observer le bénéfice d'une préhydrolyse des têtes de thon sur la survie et la croissance des crevettes. L'incorporation des hydrolysats de têtes de thon dans l'alimentation des crevettes s'est avérée particulièrement intéressante. Les poudres de protéines solubles (S2, S3 et S6) et les poudres de protéines insolubles après 2h d'hydrolyse de têtes de thon (C2) permettent d'améliorer significativement la croissance et la survie des crevettes ainsi que le ratio de conversion alimentaire et le coefficient d'efficacité protéique. Globalement, plus l'hydrolyse est poussée meilleurs sont les aliments élaborés à partir des poudres de protéines solubles. Il semble donc que 2 heures d'hydrolyse soient suffisantes et que les fractions résultantes (phases solubles et insolubles) puissent servir à l'élaboration d'aliments pour *Penaeus vannamei*.

La deuxième partie de cette étude visait à étudier l'effet d'un apport en protéines solubles dans des sauces de poisson en maturation. Au final, il ressort de cette étude que la supplémentation en hydrolysat de co-produits de thon, si elle ne modifie pas ou guère les

propriétés organoleptiques des sauces, permet cependant d'en améliorer significativement la teneur en azote total et en azote aminé en augmentant notablement les teneurs en acides aminés essentiels. Les qualités nutritionnelles des sauces ainsi enrichies s'en trouvent améliorées. Néanmoins, la courte durée des essais de fermentation (6 mois) ne permet pas de faire « changer de classe » ces sauces selon les normes en vigueur (norme vietnamienne 5107, norme FDA thaïlandaise, norme TISI). Il conviendrait donc de prolonger la phase de maturation afin d'acquérir un avantage économique certain que procurerait une classification supérieure. Enfin, parmi les 3 sauces enrichies, aucune ne semble se distinguer des autres. Un temps d'hydrolyse de 2h semble donc suffisant aussi n'est il pas utile de prolonger l'hydrolyse des têtes de thon au-delà pour ce type d'application.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

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

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

La première partie expérimentale de ce travail a ainsi consisté à étudier les cinétiques de la protéolyse de 3 co-produits représentatifs de l'industrie de transformation du thon : la tête, la queue et les viscères. Pour ce faire, des hydrolyses ont été conduites pendant 12h en utilisant une protéase à large spectre (Protamex) autorisant une solubilisation maximale de la matière par déstructuration des tissus. L'influence très nette du substrat se traduit par des cinétiques distinctes et conduit à l'obtention de degrés d'hydrolyse, de récupération de l'azote soluble et à une distribution des lipides entre les phases fort différents. L'enzyme étant une protéase, ce sont les protéines qui sont solubilisées dès le début de la réaction suivant une cinétique assez rapide. Au bout de 8h de réaction, la majorité des protéines se retrouve ainsi solubilisée sous forme de peptides de faibles poids moléculaires. Les phases solubles résultantes sont ainsi enrichies en acides aminés, particulièrement en acides aminés essentiels pour l'homme. Comme corollaire de cette protéolyse, les lipides se voient distribués différemment selon les phases. S'ils restent majoritairement concentrés dans les culots, les phases solubles ainsi dégraissées contiennent cependant des proportions plus élevées en EPA et DHA. L'action de telle protéase permet donc de liquéfier partiellement les matrices conduisant à l'obtention de 2 fractions très distinctes : - un surnageant riche en protéines hydrolysées solubles avec une bonne proportion d'acides aminés essentiels mais relativement pauvre en matière grasse ; - un culot riche en lipides et en minéraux mais contenant néanmoins des quantités appréciables de protéines insolubles.

La deuxième partie de ce travail a porté sur la recherche d'applications alimentaires pour les fractions résultantes de la protéolyse de tête de thon. Ce substrat a été choisi au regard des résultats de la première partie qui montraient que la tête de thon était un substrat de choix.

La première application étudiée a été l'incorporation de fractions protéiques dans des aliments pour l'élevage de la crevette *Penaeus vannamei*. Il ressort de ces essais de nutrition que les poudres de protéines solubles, obtenues après 2, 3 et 6h de protéolyse de tête de thon par 0,5% de Protamex, ainsi que la fraction insoluble obtenue après 2h de réaction enzymatique, permettent d'améliorer significativement la croissance et la survie des crevettes ainsi que le ratio de conversion alimentaire et le coefficient d'efficacité protéique. Une protéolyse de 2h permet donc d'obtenir des fractions protéiques à même d'être avantageusement incorporées en substitution partielle de la traditionnelle farine de poisson dans les aliments pour crevettes. Cependant, il convient de procéder à une séparation physique (centrifugation) de ces 2 phases et non de les distribuer ensemble car sinon aucun bénéfice n'est notable.

La deuxième application consistait à voir si une adjonction d'hydrolysats dans des sauces de poisson en maturation permettait d'en améliorer les qualités physico-chimiques et organoleptiques et donc d'en tirer un bénéfice commercial. Il ressort qu'un ajout d'hydrolysats produits après 2,3 ou 6h de protéolyse de tête de thon par 0,5% de Protamex ne modifiait en rien les perceptions organoleptiques d'un jury d'analyse sensorielle. Néanmoins, cet apport augmente significativement la teneur en azote total et en azote aminé avec une croissance notable de la teneur en acides aminés essentiels. Ces essais conduits pendant 6 mois ne permettent cependant pas une maturation suffisante des sauces et donc d'en augmenter sensiblement la classification selon les standards en vigueur. Aucune des sauces enrichies ne se différencient des autres malgré les temps d'hydrolyse différents. Il semble donc que là aussi, 2h de protéolyse soient suffisantes pour ce type d'application alimentaire.

En conclusion de ce travail, il ressort que l'hydrolyse des co-produits de thon est une méthode de choix pour la valorisation de ces biomasses et particulièrement de la tête. Ainsi 2h de réaction enzymatique par 0,5% de Protamex permettent d'obtenir une fraction soluble utilisable en alimentation aquacole et en nutrition humaine tandis que la fraction insoluble peut être incorporée dans des aliments pour crevette. Un même procédé conduit donc à l'obtention de 2 produits aux finalités différentes mais de valeurs ajoutées certaines.

Ces travaux débouchent donc sur des perspectives encourageantes pour les usines de transformation de thon. En effet, cette valorisation des co-produits issus de la chaîne de transformation du thon, au travers de la production d'hydrolysats, s'est avérée simple, peu coûteuse et les résultats obtenus à l'aide de nombreuses expérimentations laissent envisager un avenir prometteur à ces produits. Ces voies de valorisation ne sont cependant pas les seules perspectives envisageables. Il conviendrait en effet de s'intéresser également à la fraction grasse potentiellement récupérable et notamment le DHA dont les têtes de thon sont riches. La transposition de ce procédé d'hydrolyse enzymatique à plus grande échelle devrait permettre cela notamment par la récupération de l'huile qui ne manquera pas de surnager à l'issue de la centrifugation. En cas de succès, 3 fractions intéressantes seraient ainsi disponibles pour une valorisation à partir d'une matrice qui, pour l'instant, est plutôt considérée comme un déchet et ne possède donc aucune valeur marchande.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Akiyama D.M., Dominy W.G., Lawrence A.L. (1992) - Penaeid shrimp nutrition. In: Fast A.W., Lester L.J. (Eds). *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Developments in aquaculture and fisheries science, *Elsevier*, 23: 535-68.
- Aksnes A., Hope B., Jönsson E., Björnsson B.T., Albrektsen S. (2006) - Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture* 261: 305-17.
- Al-Sayed Mahmoud K., Linder M., Fanni J., Parmentier M. (2008) - Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extraction from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe. *Process biochem.*, 43: 376-83.
- Aldrin J.F., Briand Y., Verger. (1969) - Etude sur les nuoc-mam de poissons de mer en Côte-d'Ivoire. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 22: 249-70.
- Allen Davis D., Arnold C.R. (2000) - Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 185(3): 291-8.
- Ando Y., Ota T., Matsuhira Y., Yazawa K. (1996) - Stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols in docosahexaenoic acid-rich fish oils. *J.Am.Oil Chem Soc*, 73: 483-7.
- Andrieux G. (2004) - La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture: état des lieux et analyse. *Etudes de l'Ofimer*, 63 pp.
- Anggawati A.M., Murtini J.T., Heruwati E.S. (1990). The use of hydrolyzed protein concentrate in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. *Research Report. Research Institute for Fish Technology*. Palmerah Jakarta, 12 pp.
- Aquacop. (1978) - Study of nutritional requirements and growth of *Penaeus merguensis* in tanks by means of purified and artificial diets. *Proc. 9th Annu. Meeting World Mariculture Soc.*,

225-33.

Aquerreta Y, Astiasarán I., Bello J. (2002) - Use of exogenous enzymes to elaborate the Roman fish sauce 'garum'. *J Sci Food Agric* 82 (1): 107-112.

Aranyakananda P., Lawrence A.L. (1994) - Effects of ingestion rate on dietary protein and energy requirements of *Penaeus vannamei* and the optimal protein to energy ratio. *Memorias 2 Simposio en Nutricion Acuicola*. Monterrey, México, 1-19.

Aspmo S.I., Horn S.J., Eijsink V.G.H. (2005) - Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem.*, 40: 1957-66.

B

Bald C., Aurrekoetxea G., Perera N., Gartzia I., Aguirre P., Boujard T., Kaushik S. (2004) - Essai d'utilisation de déchets de thons pour la fabrication d'aliments pour poissons. *Les Dossiers de l'environnement de l'INRA*, 26: 25-30.

Batista I., Nunes M.L. (1995) - Preparation of enzymatic hydrolysates from fish wastes. *International Seafood Conference on the occasion of the 25th anniversary of the WEFTA*, 13-16 November, 1995 Noordwijkerhout, The Netherlands.

Beddows C.G., Ardeshtir A.G., Daud W.J. (1979) - Biochemical changes occurring during the manufacture of Budu. *J Sci. Food Agric.*, 30: 1097-103.

Beddows C.G., Ardeshtir A.G., Daud W.J. (1980). Development and origin of the volatile fatty acids in Budu. *J Sci. Food Agric.*, 31: 86-92.

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

Benjakul S., Morrissey M.T. (1997) - Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. *J Agric. Food Chem.*, 45: 3423-30.

Berge G.M., Storebakken T. (1996) - Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon

(*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 145(1-4): 205-212.

Brillantes S. (1999) - Histamine in fish sauce - health and safety considerations. *Infofish International* 4: 51-6.

Brillantes S., Baknoi S., Totakien A. (2002) - Histamine formation in fish sauce production. *Food Sc.*, 67(6): 2090-4.

C

Cahu C., Rønnestad I., Grangier V., Zambonino Infante J.L. (2004) - Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture*, 238: 295-308.

Cahu C.L., Zambonino-Infante J (2001) - Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 61-180.

Cahu C.L., Zambonino Infante J.L., Quazuguel P., Le Gall M.M. (1999) - Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171(1-2): 109-19.

Carvalho A.P., Escaffre A.M., Oliva Teles A., Bergot P. (1997)- First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture International*,5: 361-7.

Carvalho A.P., Ferreira M.L., Oliva-Teles A., Bergot P. (1995) - Utilisation of a fish protein hydrolysate in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) post-larvae. In Orvay F.C., Reig A.C (Eds), *Actas V Congr. Nac. Acuicult.* University of Berceclona, Spain, 415-9.

Carvalho A.P., Sá R., Oliva-Teles A., Bergot P. (2004) - Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture* 234 (1-4): 319-33.

Cha Y.J., Lee, G.H., Cadwallader, K.R. (1997) - Aroma-active compounds in salt-fermented anchovy. In: Shahidi F, Cadwallader, K.R (eds). *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*. American Chemical Society, Washington, DC, 131-47.

- Cha Y.J., Cadwallader K. R. (1998) - Aroma-active compounds in skipjack tuna sauce. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1123-8.
- Chantachum S., Benjakul S., Sriwirat N. (2000) - Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chem* 69: 289-94.
- Chen H.Y. (1993) - Requirements of marine shrimp, *Penaeus monodon*, juveniles for phosphatidylcholine and cholesterol. *Aquaculture*, 109: 165-76
- Chen H.Y., Hwang G. (1992) - Estimation of the dietary riboflavin required to maximize tissue riboflavin concentration in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Nutr.*, 122: 2474-8.
- Chen H.Y., Leu Y.T., Roelants I. (1992) - Quantification of arginine requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon*, using microencapsulated arginine. *Marine Biology*, 114: 229-33.
- Chen H.Y., Wu F.C., Tang S.Y. (1991) - Thiamin requirement of juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Nutr*, 121: 1984-9.
- Chen H Y, Zein-Eldin Z P, Aldrich David V. (1985) - Combined effects of shrimp size and dietary protein source on the growth of *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *World Maricult. Soc.*, 16: 288-96
- Chuang J.L., Le M.F., Jenn J.S. (1985) - Comparison of digestive activities of five species of shrimp cultured in Taiwan. *Fish. Soc.Taiwan*, 12: 43-53.
- Cissé A., Luquet P., Etchian A (1995) - Utilisation par *Chrysichthys nigrodigitatus* (Bagridae) d'ensilage chimique ou biologique de poisson. *Aquat. Living Resour.*, 8: 373-77.
- Colvin P.M. (1976) - Nutritional studies on penaeid prawns: protein requirements in compounded diets for juveniles *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 7: 315-326.
- Colvin L.B., Brand C.W. (1977) - The protein requirement of penaeid shrimp at various life cycle stages in controlled environment systems. *Proc. 8th Annu. Meeting World Maricult. Soc.*, 821-40.

- Córdova-Murueta J.H., García-Carreño F.L. (2002) - Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, 210 (1-4): 371-84.
- Crooke W.M., Simpson W.E. (1971) - Determination of ammonium in Kjeldhal digests of crops by an automated procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 1256-62.
- Cruz-Ricque L.E., Guillaume J., Cuzon G (1987) - Squid protein effect on growth of four penaeid shrimp. *World Aquacult. Soc.*, 18: 209-17.
- Cruz-Suárez L.E., Nieto-López M., Guajardo-Barbosa C., Tapia-Salazar M., Scholz U., Ricque-Marie D. (2007) - Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture*, 272(1-4): 466-76.
- Cruz- Suárez L.E., Ricque D., Aquacop. (1992) - Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juveniles reared in pond pens and tanks. *Aquaculture*, 106: 293-9.
- Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Martinez-Vega J.A., Wesche-Ebeling, P (1993) - Evaluation of two shrimp by-product meals as protein sources in diets for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 115 (1-2): 53-62.
- Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., McCallum I.M., Hickling, D., 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisumsativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopennaeus stylirostris*). *Aquaculture* 196: 87-104.

D

- D'Abramo L.R., Conklin D.E., Akiyama D.M. (1997). Triacylglycerol and fatty acids. In: D'Abramo, L.R., Conklin D.E., Akiyama D.M (Eds), Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, vol 6. *World Aquacult Soc.*, Baton Rouge, LA, USA.71-84.
- Dao M.S., Dang V.T., Huynh N.D.B. (2005) - Some information on low value and trash fish in Vietnam. Regional workshop on low value and “trash fish” in the Asia-Pacific region. Hanoi, Viet Nam, 7-9 June 2005.

- Daukšas E., Falch E., Šližyte R., Rustad T. (2005) - Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem*; 40: 2659-70.
- Davis D. A., Arnold C.R. (1993) - Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 114: 285–292.
- Davis D. A., Lawrence A.L., Gallin D.M. (1993) - Reponse of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium: phosphorus ratio. *World Aquacult. Soc.*, 24: 504-15.
- Day O.J., Howell B.R., Jones D.A.(1997) - The effect of dietary hydrolyzed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and after weaning. *Aquacult. Res.*, 28: 911-21.
- Denes A. (2006) - Etude comparée de l'effet de deux protéases sur la production d'hydrolysats dotés d'activités antioxydante et antiradicalaire. *Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes*. 45pp.
- Deshimaru O., Kuroki K. (1974) - studies on purified diet for prawn: II. Optimum contents of cholesterol and glucosamine in the diet. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 47: 421-4.
- Diniz F.M. et Martin A. M. (1996) - Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 31: 419-26.
- Diniz F.M. et Martin A. M. (1997) - Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm. U. Technol.*, 30: 266-72.
- Dissaraphong S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. (2006) - The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. *Bioresour Technol.*, 97(16): 2032-40.
- Dougan J., Howard G.E. (1975) - Some flavoring constituents of fermented fish sauce, *J Sci. Food Agric.*, 26: 887-94.

- Duarte J., Vinderola G., Ritz B., Perdigón G., et Matar C. (2006) - Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology*, 211: 341-50.
- Dufossé L., De La Broisse D., Guerard F. (1997) - Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite production. *Research Development Microbiol.*, 1: 365-81.
- Dumay J. (2006) - Extraction de lipides en voie aqueuse par bioreacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: Application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). *Thèse de doctorat de l'Université de Nantes*. 305 pp
- Dumay J., Allery M., Donnay-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P., Carbonneau M.E., Bergé J.P. (2009) - Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: Enhancement of lipid and phospholipid extraction. *J Sci Food Agric.*, 89: 1599-1606
- Dumay J., Barthomeuf C., Bergé J.P. (2004) - How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: Enhancement of fat extraction. *J Aquatic Food Product Technol.*, 13(2): 69-84.
- Dumay J., Donnay-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P., Bergé J.P. (2006) - Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochem.*, 41: 2327-32..

E

- Espe M; Liet E; Torrissen K.R. (1993)- Changes in plasma and muscle free amino acids in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolysed cod. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105 (3): 555-62.
- Ezquerria J.M., Garcia-Carreño F.L., Carrillo O. (1998). In vitro digestibility of protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 163: 123-36.

F

- Fagbenro O, Jauncey K., Haylor G. (1994) - Nutritive value of diet containing dried lactic acid fermented fish silage and soybean meal for juvenile *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. *Aquat. Living Resour* 7: 79-85.
- FAO (2008) - Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO - Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture Rome, 2008, 92 pp.
- FAO Globefish. (2008) - Tuna market report - Asia. March 2008.
- FAO Globefish. (2009) - Fishmeal market report - May 2009.
- FAO Globefish. (2009) - Fish oil market report - January 2009.
- FAO Globefish. (2009) - Shrimp Market Report, US, May 2009.
- FAO Globefish. (2009) - Tuna Thailand Market Report, US, August 2009.
- FAO Globefish. (2009) - Shrimp Market Report , Asian Markets , September 2009.
- FDA, (2001) - Scombrototoxin (histamine) formation. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance* (third ed.), Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC, pp. 83-102.
- Finne G. (1992) - Non-protein nitrogen compounds in fish and shellfish. In Flick.J.G., Martin R.E (Eds), *Advances in seafood biochemistry, composition and quality*. Lancaster: Technomic Publishing. 393-401.
- Folch J., Lees N., Sloan-Stanley G.H. (1957) - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497- 509.
- Fox J.M; Allen Davis D; Wilson M; Lawrence A.L. (2006) - Current status of amino acid requirement research with marine Penaeid shrimp. In Cruz-Suárez L.E; Marie D.R; Salazar M.T; Nieto Lopez M.G; Villarreal Cavazos; D.A (Eds). *Avances en Nutricion Acuicola*.

Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, México. 182-96.

Fox J.M., Lawrence A.L., Li-Chan E. (1995) - Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture* 131: 279-90.

Funatsu Y., Sunago R., Konagaya S., Imai T., Kawasaki K., Takeshima F. (2000) - A comparison of extractive components of a fish sauce prepared from frigate mackerel using soy sauce Koji with those of Japanese - made fish sauce and soy sauce. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, 66 (6): 1036-45.

G

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

Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J., Parmentier M. (2006) - Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *Euro J. Lipid Sci. Tech.*,108: 766-75.

Gildberg A. (1989) - Accelerate fish sauce fermentation by initial alkaline at low salt concentration. In: Miyachi S., Karube J., Ishida Y., (Eds), Current topic in marine biotechnology, *Fuji Technol., Press*, Tokyo. 101-4.

Gildberg A. (2001) - Utilization of male Arctic capelin and Atlantic cod intestines for fish sauce production - evaluation of fermentation conditions, *Bioresour Technol.*, 76: 119-23.

Gildberg A., Arnesen J.A, Carlehög M. (2002) - Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.*, 38: 475-80.

Gildberg A., Bogwald J., Johansen A., Stenberg E. (1996) - Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 11: 97-101.

Gildberg A., Espejo-Hermes J., Magno-Orejana F. (1984) - Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. *Sci. Food Agric.*, 35: 1363-9.

- Gildberg, A., 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 Technology*, 10(1): 77-88.
- Gillett R, FAO (2008) - Global study of shrimp fisheries. *FAO fisheries technical paper 475*, Rome, 2008, 331pp.
- Glencross B.D., Smith D.M., Thomas M.R., Williams K.C. (2002) - Optimising the essential fatty acid in the diet for weight gain of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 204: 85-99.
- Goodwin J.F. (1968) - The colorimetric estimation of plasma amino nitrogen with DNFB. *Clinical Chem.*, 14: 1080-90.
- Goytortúa-Bores E., Civera-Cerecedo R., Rocha-Meza S., Green-Yee A. (2006) - Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*, 256 (1-4): 414-22.
- Grey M, Forster I, Dominy W, Ako H, Giesen A F. (2009). Validation of a feeding stimulant bioassay using fish hydrolysates for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *World Aquacult. Soc.*, 40: 547-555.
- Guérard F., Dufossé L., De La Broise D., Binet A. (2001) - Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *J Mol Catal B-Enzym.*, 11: 1051-9.
- Guérard F., Guimas L., Binet A. (2002) - Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B-Enzym.*, 19-20: 489-98.
- Guillaume J., Kaushik S., Bergot P, Métailler R. (1999) - Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. *INRA, IFREMER, France*: 489pp.

H

- Hardy R.W. (1991) - Fish hydrolysates: production and use in aquaculture feeds. In: Akiyama D.M., Tan R.K.H (Eds.). *Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*. American Soybean Association, Singapore, 109-15.
- Hariono I., Yeap S.E, Kok T.N., Ang G.T. (2005) - Use of koji and protease in fish sauce fermentation. *Singapore J Pri Ind* 32: 19-29.
- He H., Lawrence A.L. (1991) - Estimation of dietary pyridoxine requirement for the shrimp *Penaeus vannamei*. Paper presented at the 22 nd Annual Conference, World Aquacult. Soc., San Jun, Puerto Rico, June 16-20, 1991.
- He H., Lawrence A.L. (1993) - Vitamine C requirement of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 114: 305-16.
- Heras H., McLeod., C.A., Ackman R.G. (1994) - Atlantic dogfish silage vs. herring silage in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): growth and sensory evaluation of fillets. *Aquaculture* 125: 93- 106.
- Hernández C., Olvera-Novoa M.A., Aguilar-Vejar K, González-Rodríguez B., Abdo de la Parra I. (2008) - Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 277: 244-50.
- Hernández C., Sarmiento-Pardo J., González-Rodríguez B., Abdo Parra de la I. (2004) - Replacement of fish meal with co-extruded wet tuna viscera and corn meal in diets for white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Aquaculture*, 35: 1153-1157.
- Hernandez-Herrero M.M., Roig-Sagues A.X., Rodriguez-Jerez J.J., Mora-Ventura M.T. (1999) - Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies. *J. Food Protection*, 62: 509-14.
- Hjalmarsson G.H., Park J.W., Kristbergsson K. (2007) - Seasonal effects on the physicochemical characteristics of fish sauce made from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chem*, 103(2): 495-504.

Hoang T. (2009) - Ocean tuna fishing and marketing in Viet Nam. *Vietfish*, 6(1): 56-59. Jan/Feb 2009.

Hoyle N.T., Merritt J.H. (1994) - Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Food Sci.*,59(1): 76-9.

I

Indoh K., Nagata S., Kanzaki K., Shiiba K., Nishimura T. (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): 206-12.

Ijong F.G., Ohta Y. (1995) - Amino acid composition of Bakasang, a traditional fermented fish sauce from Indonesia. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 28(2): 236-7.

Ijong F.G., Ohta Y. (1996) - Physicochemical and microbiological changes associated with Bakasang processing: A traditional Indonesian fermented fish sauce. *Sci Food Agric.*, 71(1): 69-74.

Itoh H., Tachi H., Kikuchi S. (1993) - Fish fermentation in Japan. In: Lee C.H., Steinkraus K.H., Reilly P.J.A , (Eds). *Fish fermentation technology*. Tokyo, Japan: United Nations Univ. Press. 177-86.

J

Jao C.L., Ko W.C. (2002) - Utilization of cooking juice of young tuna processed into canned tuna as condiments effect of enzymatic hydrolysis and membrane treatment *Fisheries Science* 68(6): 1344-51.

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

Je J.Y., Qian Z J., Byun H.G., Kim S.K. (2007) - Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process*

biochem., 42: 840-6.

Jiang J.J., Zeng Q.X., Zhu Z.W., Zhang L.Y. (2007) - Chemical and sensory changes associated *Yu-lu* fermentation process - A traditional Chinese fish sauce. *Food chem.*, 104(4): 1629-34.

Johnson H.M. (2002) - Perspectives de marché dans le secteur international du poisson et des fruits de mer. Autres produits/usages et questions de salubrité alimentaire. *Bureau du Commissaire au développement de l'aquaculture*. 43pp.

Josupeit H. 2005 - Global world tuna markets. *Infofish/CFC. Seminar on tuna marketing*. Maldives, May 2005. FAO. Rome.

Josupeit H. 2006 - Commodity Trade: shrimp, groundfish, tuna and cephalopods. *Regional Seminar of TCP/3011/RAS*, June 2006.

Jun S.Y., Park P.J., Jung W.K., Kim S.K. (2004) - Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Euro Food Research Tech.*, 219: 20-26.

K

Kato H., Rhue M.R., Nishimura T. (1989) - Role of free acids and peptides in food taste. In Teranishi R., Buttery R.G., Shahidi F, (Eds). *Flavor chemistry: Trends and developments*. ACS Symposium Series 388. Washington, DC: American Chemical Society. 158-74.

Kechaou E.S., Dumay J., Donnay-Moreno C., Jaouen P., Gougou J.P., Bergé J.P., Amar R.B. (2009) - Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pichardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *J Biosci Bioeng.*, 107(2): 158-64.

Kim S., Jeon Y., Byeun H., Kim Y., Lee C. (1997) - Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. *Fish. Sci.* 63: 421-7.

Kim S.H., Ben-Gigirey B., Barros-Velazquez J., Price R.J., An H. (2000) - Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused

- albacore. *J. Food Protect*, 63: 244-51.
- Kim S.K. et Mendis E. (2006) - Bioactive compounds from marine processing by-products - A review. *Food Res. Int.*, 39: 383-93.
- Kim S.M., Ha J.U. (1995) - Utilization of the protein hydrolysates of skipjack tuna viscera. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27: 141-6.
- Kimura B., Konagaya Y., Fujii T (2001) - Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. *International journal of Food Microbiology*, 70: 71-7.
- Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Shahidi F. (2007) - Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.*, 102: 1317-27.
- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W. (2004) - Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. *Food Biochem.*, 28: 355-72.
- Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., Simpson B.K. (2006) - 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: 440-52.
- Kolodziejska I., Kaczorowski K., Piotrowska B., et Sadowska M. (2004) - Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chem.*, 86: 203-9.
- Komata Y. (1990) - Umami taste of seafoods. *Food Rev Int.*, 6(4): 457-87.
- Koshio S., Teshima S.I., Kanazawa A., Watase T. (1993) - The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 113: 101-14.

- Kotzamanis Y.P., Gisbert E., Gatesoupe F.J., Zambonino Infante J., Cahu C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative biochemistry and physiology*, 147: 205-14.
- Kristinsson H.G., Rasco B.A. (2000a) - Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochem.*, 36: 131-9.
- Kristinsson H.G, Rasco B.A. (2000b) - Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Agri. Food Chem.*, 48: 657-66.
- Kristinsson H.G. et Rasco B. A. (2000c) - Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*, 40: 43-81.
- Kurbanoglu E.B, Algur O.F. (2002) - The influence of ram horn hydrolysate on the crop yield of the mushroom. *Agaricus bisporus*. *Sci Hort.*, 94(3-4): 351-7.
- Kureshy N., Allen Davis D. (2002) - Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204: 125-43.
- Kvåle A., Harboe T., Espe M., Næss T., Hamre K. (2002) - Effect of predigested protein on growth and survival of Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquac. Res.*, 33(5): 311-21.
- Kvåle A., Harboe T., Mangor-Jensen A., Hamre K. (2008) - Effects of protein hydrolysate in weaning diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquacult. Nutr* 15: 218-27.

L

- Lall S.P. (1991) - Nutrition value of fish silage in salmonid diets. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* 91: 63-74.

- Lapie L.P., Biqueras-Benitez C.M. (1992) - Feed studies on tilapia (*Oreochromis* sp.) using fish silage. *FAO Fish. Rep.* 470: 165-77.
- Le Thanh Hung, Huynh Pham Viet Huy. (2007) - Analysis of feeds and fertilizers for sustainable aquaculture development in Viet Nam. In M.R. Hasan, T. Hecht, S.S. De Silva and A.G.J. Tacon (eds). Study and analysis of feeds and fertilizers for sustainable aquaculture development. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 497. Rome, FAO. pp.331-61.
- Lee P.G., Lawrence A.L. (1985) - Effect of diet and size on growth, feed digestibility, and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus*. *Proc. World Maricult. Soc.*, 16: 275-87.
- Lee S.C., Woo K.L. (1992) - A study on development of effective utilization method of skipjack tuna viscera. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 86-91.
- Lehane L., Olley J. (2000) - Histamine fish poisoning revisited. *Int J. Syst. Microbiol.*, 58: 1-37.
- Lian P.Z., Lee, C.M., Park E. (2005) - Characterization of squid-processing by-product hydrolysates and its potential as aquaculture feed ingredient. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5587-92.
- Liang M., Wang J., Chang Q., Mai K. (2006) - Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquac. Res.*, 37: 102-6.
- Liaset B., Julshamn K., Espe M. (2003) - Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymatic hydrolysis of salmon frames with Protamex. *Process Biochem.*, 38: 1747-59.
- Liaset B., Lied E., Espe M. (2000) - Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J. Sci Food Agric.*, 80: 581-9.
- Liaset B., Nortvedt R., Lied E., Espe M. (2002) - Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex protease. *Process Biochem.*, 37: 1263-9.

- Liceaga-Gesualdo A.M, Li-Chan E.C.Y. (1999) - Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *J Food Sci.*, 64(6): 1000-4.
- Liu P.Z. (1989) - The umami of Yu-lu, *Food Science (Chinese)* 4: 37- 40.
- Liu, T. B., Li A.J., Zhang, J.M. (1993) - Studies on vitamin nutrition for the shrimp *Penaeus chinensis*: 10 studies on the choline chloride and inositol requirements in the shrimp *Penaeus chinensis*. *Ocean Univ. Qingdao - Qingdao Haiyang daxue Xuebao* 23(4): 67-74.
- Lopetcharat K. (1999) - Fish sauce: The alternative solution for Pacific whiting and its by products. [MSc thesis]. *Corvallis, OR: Oregon State Univ.* 114 pp.
- Lopetcharat K., Choi Y.J., Park J.W., Daeschel M.A. (2001) - Fish sauce products and manufacturing: A review. *Food Reviews International*, 17: 65-88.
- Lopetcharat K., Park J.W. (2002) - Characteristics of fish sauce made from Pacific whiting and surimi by-products during fermentation storage. *Food Sci.*, 67(2): 511-6.

M

- Martone C.B., Borla O.P., Sanchez J.J. (2005) - Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technol.*, 96: 383-7.
- Matsuhita S., Kobayashi M., Nitta Y.(1970) - Inactivation of enzymes by linoleic acid hydroperoxides and linoleic acid. *Agric. Biol. Chem.*, 34(6): 817-24.
- McIver R.C., Brooks R.I., Reineccius G.A. (1982) - Flavor of fermented fish sauce. *Agric. Food Chem.*, 30: 1017-20.
- Michihata T., Sado Y., Yano T., Enomoto T. (2000a) - Preparation of Ishiru (fish sauce) by a quick ripening process and changes in the composition of amino acids, oligopeptides and organic acids during processing. *J Jap Soc Food Sci Technol- Nipp Shok Kag Kog Kai* 47(5): 369-77.
- Michihata T., Sado Y., Yano T., Enomoto T. (2000b) - Free amino acids, oligopeptides, organic

- acids and nucleotides of Ishiru (fish sauce). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.*, 47: 241-8.
- Millamena O.M., Bautista M.N., Kanazawa A. (1996a). Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture* 143: 403-10.
- Millamena O.M., Bautista, M.N., Kanazawa A. (1996b) - Valine requirement of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquacult. Nutr.*, 2: 129-132
- Millamena O.M., Bautista M.N., Reyes O.S., Kanazawa A. (1997) - Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 151: 9-14.
- Millamena O.M., Bautista-Teruel M.N., Reyes O.S. Kanazawa A. (1998) - Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. *Aquaculture*, 164: 95-104.
- Millamena O.M., Teruel M.B., Kanazawa A., Teshima S. (1999) - Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture*, 179: 169-79.
- Morimura S., Nagata H., Uemura Y., Fahmi A., Shigematsu T., Kida K. (2002) - Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochem.*, 37: 1403-12.
- Morioka K., Fujii S., Iton Y., Chengchu L., Obatake A. (1999) - Recovery of amino acid from protein in the head and viscera of frigate mackerel by autolysis. *Fish. Sci.*, 65: 588-91.
- Muyonga J.H., Cole C. G. B., et Duodu K. G. (2004) - Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloid.*, 18: 581-92.

N

- Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. (2008) - Tuna pepsin: characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threagfin bream

(Nemipterus ssp). *J Food Sci.*, 73(5): 413-9.

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

Norberg P., Hofsten B.V. (1968) - Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J Gen Microbiol.*, 55: 251-6.

Norme vietnamienne 5107. (2003) - Nuoc-mam, Ha Noi, Vietnam, 11pp.

Novozymes. (2001) - Protamex. *Product sheet*.

Nunes A.J.P., Marcelo V.C. Sá, Andriola-Neto F.F., Lemos D. (2006) - Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 260 (1-4): 244-54.

O

Oceanic Development. (2005) - La filière thonière européenne. Bilan économique, perspectives et analyse des impacts de la libéralisation des échanges. Convention spécifique SC 12, rapport final, 331p.

Ogawa M., Portier R. J., Moody M. W., Bell J., Schexnayder M. A., Losso J. N. (2004) - Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargum probatocephalus*). *Food Chem.*, 88: 495-501.

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

Orejana F. M., Liston J. (1982) - Agents of proteolysis and its inhibition in Patis (fish sauce) fermentation. *Food Sci.*, 47: 198-203.

Ouellet D.R; Seoane J. R; Veira D.M; Proulx J.G. (1997) - Effects of supplementation with fish

meal or fish protein hydrolysate on growth, nutrient digestibility and rumen fermentation of growing cattle fed grass silage. *Animal Feed Science Technology* 68: 307-26.

P

Pacheco-Aguilar R., Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Suárez J.C. (2008) - Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109(4): 782-789.

Paquotte P. (1999) - La situation du marché du thon. *Ofimer*, 12: 6-9.

Park J.N., Fukumoto Y., Fujita E. (2001) - Chemical composition of fish sauces produced in Southeast and East Asian countries, *Food Composition and Analysis*, 14: 113-25.

Park J.N., Ishida K., Watanabe T., Endoh K.I., Watanabe K., Murakami M., Abe H. (2002a) - Taste effects of oligopeptides in a Vietnamese fish sauce. *Fisheries Science*, 68(4): 921-8.

Park J.N., Watanabe T., Endoh K.I., Watanabe K., Abe H. (2002b) - Taste-active components in a Vietnamese fish sauce. *Fisheries Science*, 68(4): 913-20.

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

Parrish C.C., Li H., Indrasena W.M., Ackman R.G. (1991) - Silage feeds in Atlantic salmon farming: flavour volatiles and lipid composition, feeding trials, and taste panels. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* 91: 75-84.

Pastoriza L., Sampedro G., Cabo M.L., Herrera J.J.R., Bernardez M. (2003) - Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. *J Sci Food Agric*, 84: 83-8.

Peralta R.R., Shimoda M., Osajima Y. (1996) - Further identification of volatile compounds in fish Sauce. *Agric. Food Chem.*, 44 (11): 3606-10.

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

Plascencia-Jatomea M., Olvera-Novoa M.A., Arredondo-Figueroa J.L., Hall G.M., Shirai K. (2002) - Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Sci. of Food and Agricult.*, 82: 753-9.

Q

Quang T. (2009) - Vers une marque de thon vietnamienne. Agence vietnamienne d'information. Le courrier du Vietnam. Septembre, 2009. Jeudi 10 septembre 2009.

R

Rajyalakshmi T., Pillai S.M., Roy A.K., Verghese P.U. (1986) - Feeds and nutrition of the prawn *Penaeus monodon*. *Environ. Ecol.* 4: 415-22.

Rajapakse N., Mendis E., Byun H.G., Kim S. K. (2005) - Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 562-9.

Ravallec-Plé R. (2000) - Valorisation d'hydrolysats d'origine marine: optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, 171 pp.

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

Ravallec-Plé R., Charlot C., Pires C., Braga V., Batista I., Van Wormhoudt A., Le Gal Y., et Fouchereau-Péron M. (2001) - The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.*, 81: 1120-5.

- Refstie S., Olli J.J., Standal H. (2004) - Feed intake, growth and protein utilization by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, 239: 331-49.
- Rodriguez-Jerez J.J. Mora-Ventura M.T., Lopez-Sabater E.I., Hernandez-Herrero M.M. (1994) - Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in spanish salted semi-preserved anchovies. *Food Protection*, 57: 784-7.
- Roy P., Durand P. (1997) - Les enzymes dans la fabrication d'aliments à base de produits de la mer. In Larreta-Garde (Eds). *Enzymes en agroalimentaire. Tec et Doc, Lavoisier*, Paris: 95-120.
- Rustad T. (2003). Utilisation of marine by-products. *Electron J Environ, Agric Food Chem.*, 2(4): 458-63.

S

- Sadowska M., Kolodziejaska I., et Niecikowska C. (2003) - Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.*, 81: 257-62.
- Saisithi P. (1994) - Traditional fermented fish: fish sauce production. In: Martin A.M., (Eds), *Fisheries processing*, Chapman & Hall, London 111-31.
- Saisithi P., Kasemsarn B.O., Liston J., Dollar A.M. (1966) - Microbiology and chemistry of fermented fish, *Food Science* 31: 105-10.
- Sanceda N., Kurata T., Arakawa N. (1983) - Volatile acids in the steam distillate of Patis, a Philippine fish sauce. *The Philippine Agriculturist*, 66: 176-82.
- Sanceda N., Kurata T., Arakawa N. (1984) - Fractionation and identification of volatile compounds in Patis, a Philippine fish sauce. *Agric. Biol. Chem.*, 48(12): 3047-52.
- Sanceda N., Kurata T., Arakawa N. (1986) - Study on the volatile compounds of fish sauce, Shottsuru, Nampla and nuocmam. *Agric. Biol. Chem.*, 50: 1201-8.

- Sanceda N., Kurata T., Arakawa N. (1990) - Overall quality and sensory acceptance of a lysine-fortified fish sauce. *Food Sci.*, 55: 983-8.
- Sanceda N.G., Kurata T., Suzuki Y., Arakawa N. (1992) - Oxygen effect on volatile acids formation during fermentation in manufacture of fish sauce. *Food Sci.*, 57: 1120-2.
- Sanceda N.G., Kurata T., Arakawa N. (1996) - Accelerated fermentation process for the manufacture of fish sauce using histidine. *Food Sci.*, 61: 220-5.
- Sanceda N.G., Suzuki E., Ohashi M. (1999) - Histamine behavior during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. *Agricultural and Food Chemistry* 47: 3596-600.
- Sanceda N.G., Suzuki E., Kurata T. (2001) - Development of normal and branched chain volatile fatty acids during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. *Sci Food Agric (81)*: 1013-8.
- Sanceda N., Suzuki E., Kurata T. (2003) - Quality and sensory acceptance of fish sauce partially substituting sodium chloride or natural salt with potassium chloride during the fermentation process. *International Journal of Food Science and Technology.*, 38(4): 435-43.
- Sands A, Crisan E. V. (1974) - Microflora of fermented Korean seafoods. *J Food Sci*; 39(5): 1002-5.
- Sathivel S., Bechtel P.J. (2006) - Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *International J. Food Sci. Tech.*, 41: 520-29
- Sathivel S., Bechtel P.J., Babbitt J., Prinyawiwatkul W., Negulescu II, Reppond K.D. (2004) - Properties of protein powders from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) and herring (*Clupea harengus*) by-products. *Agric Food Chem.*, 52(16): 5040-6.
- Sathivel S., Bechtel P.J., Babbitt J., Prinyawiwatkul W., Patterson M. (2005b) - Functional, nutritional, and rheological properties of protein powders from arrowtooth flounder and their application in mayonnaise. *Food Sci.*, 70(2): 57-63.
- Sathivel S., Bechtel P.J., Babbitt J., Smiley S., Crapo C., Reppond K.D, Prinyawiwatkul W.

- (2003) - Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Food Sci.*, 68: 2196-200.
- Sathivel S., Smiley S., Prinyawiwatkul W., Bechtel P.J. (2005a) - Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Food Sci.*, 70(6): 401-6.
- Schipp G. (2008) - Is the use of fishmeal and fish oil in aquaculture diets sustainable? Department of Primary Industry - Fisheries and Mines. Northern Territory Government. *Technote 124*, 15p.
- Sedgwick R.W. (1979) - Influence of dietary protein and energy on growth, food consumption and food conversion efficiency in *Penaeus merguensis* de Man. *Aquaculture 16*: 7-30.
- Shahidi F. (2006) - Maximising the value of marine by-products. Memorial University of Newfoundland, Canada, 560 pp.
- Shahidi F., Sikorski, Z.E., Pan B.S. (1994). Proteins from seafood processing discards. In *Sea food protein*. New York: Chapman and Hall, 171-93.
- Shahidi F., Han X.Q, Synowieck J. (1995) - Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem*, 53: 285-93.
- Shiau S.Y. (1998) - Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture 164*: 77-93
- Shiau S.Y., Chou B.S. (1991) - Effects of dietary protein and energy on growth performance of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 2271-6.
- Shiau S.Y., Hwang J.Y. (1994) - The dietary requirement of juvenile grass shrimp (*Penaeus monodon*) for vitamine D. *J. Nutr 124*: 2445-50
- Shiau S.Y., Kwok C.C., Chou B.S. (1991) - Optimal dietary protein level of *Penaeus monodon* reared in seawater and brackish water. *Nippon Suisan Gakkaishi 57*: 711-6.
- Shiau S.Y., Liu J.S. (1994) - Quantifying the vitamin K requirement of juvenile marine Shrimp (*Penaeus monodon*) with Menadione. *J. Nutr*, 124: 277-82

- Shiau S. Y., Lung C.Q., (1993) - Estimation of the vitamin B12 requirement of the grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 117(2): 157-63.
- Shiau S.Y., Peng. C.Y. (1992) - Utilisation of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*, reared in seawater. *Aquaculture* 101: 241-250.
- Shiau S.Y., Suen G.S. (1994) - The dietary requirement of juvenile grass shrimp (*Penaeus monodon*) for niacin. *Aquaculture*, 125: 139-45.
- Shih L.I., Chen L.G., Yu Ton-Shi., Chang W.T., Wang S.L. (2003) - Microbial reclamation of fish processing wastes for the production of fish sauce. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(2-3): 154-62.
- Shimada Y., Maruyama K., Sugihara A. Moriyama S., Tominaga Y. (1997) - Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two-step enzymatic method: hydrolysis and selective esterification. *JAOCS*, 74: 1441-6.
- Šližyte R., Dauksas E., Falch E., Storro I., Rustad T. (2005a) - Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.*, 40: 1415-24.
- Šližyte R., Dauksas E., Falch E., Storro I., Rustad T. (2005b) - Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.*, 40: 2021-33.
- Šližyte R, Mozuraitytė R, Martínez-Alvarez O, Falch E, Fouchereau-Peron M, Rustad T. (2009) - Functional, bioactive, antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus Mohua*) backbones. *Process Biochem*, 44(6): 668-77.
- Šližyte R., Rustad T., Storro I. (2005c) - Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochem.*, 40: 3680-92.
- Smith L. L., Lee P.G., Lawrence A.L., Strawn K. (1985) - Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source.

Aquaculture, 46 (2): 85-96.

Smith D.M., Tabrett S.J., Barclay M.C., Irvin S.J. (2005) - The efficacy of ingredients included in shrimp feeds to stimulate intake. *Aquacult. Nutr.*, 11: 263-272

Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y., Nasri. (2007) - Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Tech. Biotech*, 45(2): 187-94.

Soyiri I.N., Tano-Debrah K., Amoa-Awuah W.A. (2003) - Physico-chemical and quality characteristics of fish sauce produced from tuna processing wastes. 2nd *International Workshop. Food-based approaches for a healthy nutrition*. Ouagadougou, 23-28/11/2003.

Stansby M.E., Schlenk H., Gruger E.H. (1990) - Fatty acid composition of fish. In Stansby M.E, *Fish oil in nutrition*. 6-39. New York: Van Nostrand Reinhold.

Sudaryono A., Hoxey M.J., Kailis S.G., Evans L.H. (1995) - Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 134: 313-23.

Sudaryono A., Tsvetnenko E., Evans L.H. (1996) - Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 143: 331-40 .

Sumaya-Martinez M.T., Thomas S., Linard B., Binet A., Guerard F. (2005) - Effect of Maillard reaction conditions on browning and antiradical activity of sugar-tuna stomach hydrolysate model system. *Food Research International*, 38: 1045-50.

Szlaminska M., Escaffre, A.M., Charlon, N., Bergot, P., 1991. Preliminary data on semisynthetic diets for goldfish (*Carassius auratus*) larvae. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.). *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, 24-27 June 1991. INRA, Paris, Les Colloques, 61, pp. 607-12.

T

Tang H.G., Wu T.X., Zhao Z.Y., Pan X.D. (2008) - Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *Zhejiang Univ Sci B.*, 9: 684-90.

- Tankititti C., Mahankij S., Sophanodora P., Maeros A. (2007) - Seafood processing by-products as fishmeal replacer in diets for Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch). *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 29(5): 1321-40.
- Taylor S.L., Speckhard M.W. (1984) - Inhibition of bacterial histamine production by sorbate and other antimicrobial agents. *Food Prot.*, 47: 508-11.
- Taylor S.L., Woychik N.A. (1982) - Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae. *Food Prot* 45(8): 747-51.
- Teshima S., Kanazawa A. (1984) - Effect of protein, lipid, and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of the prawn larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50: 1709-15.
- Thai Industrial Standard Institute. (1983). Local fish sauce standard. Departement of Industry, Bangkok, Thailand.
- Thiansilakul Y., Benjakul S., Shahidi F. (2007) - Composition, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem.*, 103: 1385-94.
- Thongthai C., McGenity T.J., Suintanalert P., Grant W.D. (1992) - Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from traditionally fermented Thai fish sauce (nam pla). *Lett. Appl. Microbiol.*, 14: 111-4.
- Triqui R., Guth H. (1997) - Determination of potent odorants in ripened anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) by aroma extract dilution analysis and by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. In: Shahidi F, Cadwallader K.R (Eds). *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*. American Chemical Society, Washington, DC, 31-8.
- Triqui R., Reineccius G.A. (1995) - Flavor development in the ripening of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). *Agric. Food Chem.*, 43 (2): 453-8.
- Tsai Y.H., Lin C.Y., Chien L.T., Lee T.M., Wei C.I., Hwang. D.F. (2006) - Histamine contents of fermented fish products in Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. *Food Chem.*, 98: 64-70.

Tungkawachara S., Park J.W., Choi Y.J. (2003) - Biochemical properties and consumer acceptance of Pacific whiting fish sauce, *Food Sci.*, 68(3): 855-60.

U

Uyenco V., Lawas I., Brioles P.R., Taruc R.S. (1953). Mechanics of Bagoong (fish paste) and Patis (fish sauce) processing. In Robert T.A, Skinner F.A, (Eds). *Food microbiology advances and prospects*. London, U.K.: Academic Press. 152-68.

V

Van Boekel M.A.J.S. (1998) - Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem*, 62: 403-14.

Venkataramiah, A, Lakshmi, G.J., Guter, G., 1975. Effect of protein level and vegetale matter on growth and food conversion efficiency of brown shrimp. *Aquaculture* 6: 115-25.

Veronica R. A., Chhorn L. (1983) - The quantitative dietary protein requirements of *Penaeus monodon* juveniles in a controlled environment. *Aquaculture*, 30: 53-61.

Vlieg P et Murray T, 1988. (1988) - Proximate composition of albacore tuna, *Thunnus alalunga*, from the temperate South Pacific and Tasman Sea. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 22: 491-496.

W

Wu H.C., Chen H. M., et Shiau C. Y. (2003) - Free amino acids and peptides as related to antioxydant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.*, 36: 949-57.

Y

Yang Y.F., Chen S.R., Ni H., Ye X.Q. (2008) - Analysis of volatile components in a Chinese fish

- sauce, Fuzhou Yulu, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9(12): 977-81.
- Yatsunami K., Echigo T. (1991) - Isolation of salt tolerant histamine-forming bacteria from commercial rice-bran pickle sardine. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 57: 1723-8.
- Yazawa K.K., Watanabe C., Ichikawa C., Kondo K.(1991) - Docosahexaenoic acid in the orbital fat of marine fishes. *INFORM*, 2: 336.
- Yongsawatdigul J., Rodtong S., Raksakulthai N. (2007) - Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *Food Sci.*, 72 (9): 382-90.
- Yoshinaga D.H., Frank H.A. (1982) - Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamia*). *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 447-52.
- Yu G., Xue C., Xue Y., Ren Y. (2008). Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce. *Food Chem* 107(4): 1597-1604.
- Yu S.Y; Kaur R (1992) - Development of fish biscuits from Round Scad (*Decapterus russelli* Rupp.) *Tropical Sci.*,32: 289-94.
- Yu S.Y, Tan L. (1990) - Acceptability of crackers ('keropok') with fish protein hydrolysate. *International J Food Sci. Tech.*, 25: 204-8.

Z

- Zambonino-Infante J.L., Cahu C.L., Péres, A. (1997). Partial substitution of di-and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 127: 608-14.
- Zhao Y., Li B., Liu Z., Dong S., Zhao X., Zeng M. (2007) - Antihypertensive effect, purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochem.*, 42(12): 1586-91.

ANNEXE A

PRODUCTION D'HYDROLYSATS PROTEIQUES DE TETE DE THON



Figure 36. Surnageant



Figure 37. Lyophilisation des surnageants

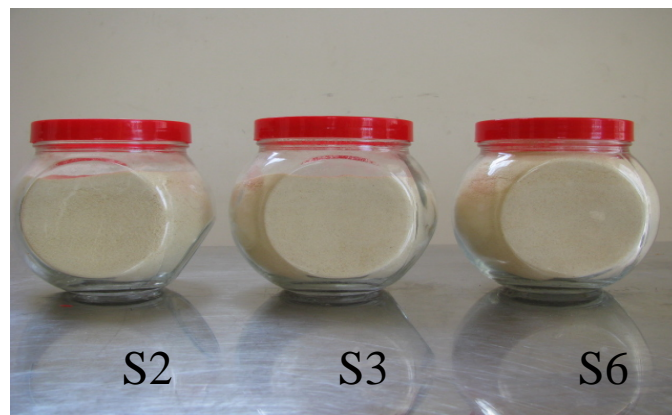


Figure 38. Poudres protéiques solubles



Figure 39. Séchage du culot



Figure 40. Culot séché



Figure 41. Broyage du culot séché

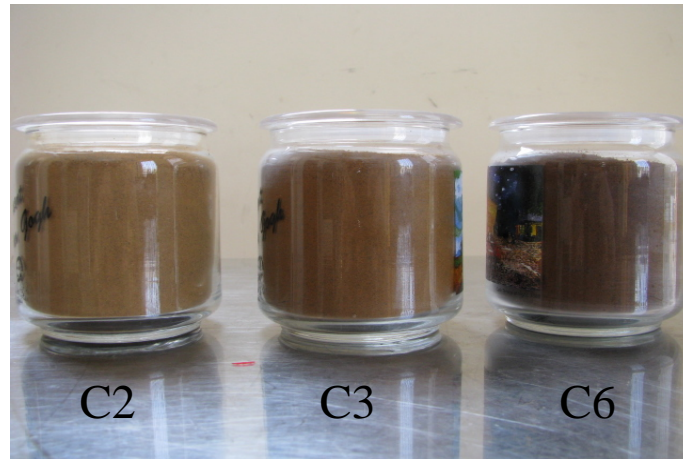


Figure 42. Poudres protéiques insolubles



Figure 43. Mélange de poudres protéiques à partir de l'hydrolyse de tête de thon

ANNEXE B

PRODUCTION DE FARINE DE TETE DE THON



Figure 44. Broyage des têtes de thon



Figure 45. Cuisson de têtes de thon



Figure 46. Pressage de têtes de thon cuit



Figure 47. Gâteau de pressage



Figure 48. Résidu de pressage avant et après séchage



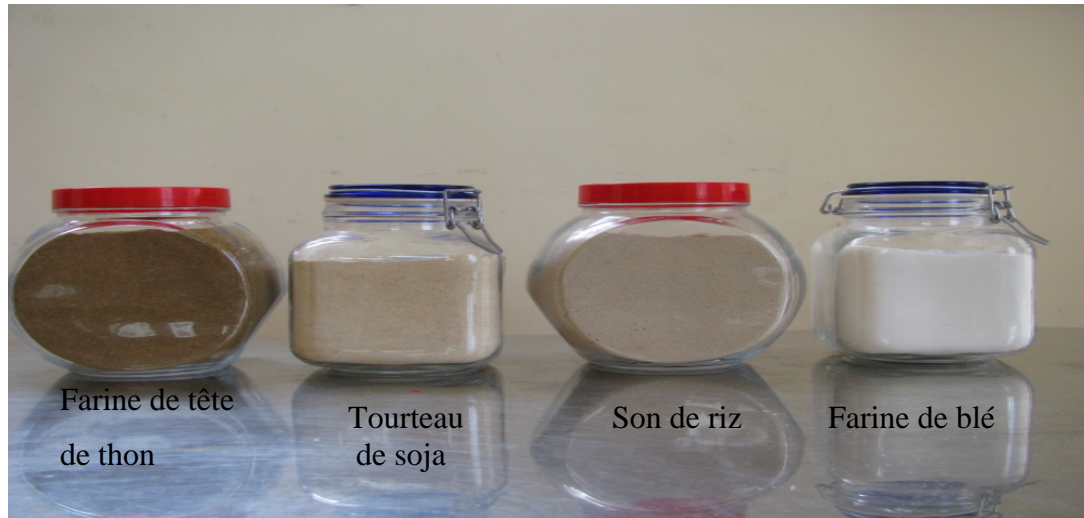
Figure 49. Broyage des résidus de pressage séché



Figure 50. Farine de têtes de thon destinée aux crevettes

ANNEXE C

PRODUCTION DES ALIMENTS POUR LES CREVETTES



Mélange minéral et vitaminique



Huile de calmar

Figure 51. Matières premières utilisées pour la fabrication des aliments pour crevettes



Figure 52. Mélange de matières premières



Figure 53. Pressage du mélange



Figure 54. Cuisson à la vapeur des aliments



Figure 55. Séchage des aliments



Figure 56. Coupure des aliments



Figure 57. Tamisage des aliments



Figure 58. Aliments pour les crevettes