

## ESSAIS PRELIMINAIRES D'UTILISATION DES CRYOPROTECTEURS DANS LES PULPES DE POISSON

par Van Dan TRAN \* et Luçay HAN-CHING \*\*

### *Résumé*

Après avoir expliqué dans une synthèse bibliographique les phénomènes actuellement connus de dénaturation des protéines et les mécanismes intimes de cryoprotection, les auteurs étudient l'influence de certains cryoprotecteurs sur les protéines et la pulpe de poisson, en insistant particulièrement sur les dérivés des sucres à faible pouvoir sucrant.

### *Abstract*

The various ways of protein denaturation during frozen storage of fish and the theoretical chemical means of cryoprotection are described. Then the effects on protein solution and fish mince of several additives and binders are tested especially with low sweetness chemical agents produced by sugar industry.

### **Introduction.**

L'avènement des séparateurs mécaniques de chair a permis une utilisation valorisante des sous-produits de l'industrie de transformation des viandes. Appliquée aux produits de la pêche, cette technologie ouvre de nouvelles perspectives dans l'utilisation des ressources de la mer. Elle permet, d'une part, la récupération pour l'alimentation humaine de la chair résiduelle dans la transformation des espèces courantes et, de l'autre, la récupération de la chair des espèces de poissons qui, pour diverses raisons, sont à l'heure actuelle non utilisées ou sous-utilisées.

---

\* Direction générale des Pêches maritimes, Complexe scientifique de Sainte-Foy, 2700, rue Einstein, Québec, Qué. G1P 3W8, Canada.

\*\* Utilisation et Valorisation des Produits, I.S.T.P.M., B.P. 1049, 44037 Nantes Cedex.

Un des grands avantages de cette technologie, qui est par ailleurs assez souple et relativement peu coûteuse, est que le produit obtenu (hachis ou pulpe) possède encore les caractéristiques fonctionnelles de la chair du poisson. Les possibilités d'utilisation sont par conséquent plus grandes comparées à celles du « concentré de protéines de poisson » dont l'insuffisance fonctionnelle des protéines fut une cause de l'échec commercial. Malgré ces avantages sur le plan technologique et malgré une conjoncture mondiale caractérisée par une raréfaction des ressources marines, le désarêtage mécanique ne s'est pas imposé partout, excepté au Japon où cette technologie est utilisée sur une grande échelle. La pulpe de poisson sert à fabriquer un produit traditionnel et très estimé, une sorte de pâte (kamaboko) dont le principal critère de qualité est une certaine résilience. Cette résilience ne s'obtient qu'au prix de beaucoup d'efforts pour préserver la fonctionnalité des protéines du poisson.

La pulpe de poisson est une matière première relativement nouvelle en Europe et en Amérique. Les produits fabriqués à base de pulpe de poisson doivent se faire connaître et accepter, ou restent à inventer. Cela ne pourra se faire que dans la mesure où la qualité de la matière première sera assurée. Or la pulpe de poisson est une denrée fort fragile. Son altérabilité est d'abord celle du poisson, à laquelle il faut ajouter les risques que comportent les délais et les manipulations supplémentaires subis par le poisson avant et après le désarêtage. De plus, cette dernière opération peut être à l'origine de problèmes propres à la pulpe de poisson : présence des arêtes et de tissus non musculaires, couleur et broyage de la chair. En effet, au passage dans les désarêteuses, la chair de poisson est plus ou moins broyée, une proportion variable de cellules musculaires est éclatée. Elle acquiert une surface de contact accrue avec l'air environnant, autant de facteurs qui contribuent à la déstabilisation de ses propriétés physico-chimiques.

En fait, la pulpe de poisson brute ne se conserve sous congélation que pendant quelques semaines (voire quelques jours) alors que dans des conditions similaires, les filets de poisson ont une durée d'entreposage utile de quelques mois. Cette saisissante différence montre bien l'importance des recherches visant à améliorer la qualité de la pulpe de poisson. La solution japonaise, qui revient à réduire la chair de poisson à une masse de myofibrilles par un lavage intensif, n'est pas nécessairement la meilleure hors du Japon. Elle comporte cependant un élément intéressant, à savoir l'utilisation, avec un succès remarquable, des cryoprotecteurs. Il s'agit des sucres ou de polyalcools qui confèrent au produit un goût sucré, agréable à un palais japonais, mais discutable pour ceux qui préfèrent que les choses aient le goût de ce qu'elles sont. La question se pose dès lors de savoir s'il est possible de trouver des dérivés de sucres ou de polyalcools qui possèderaient un rapport « pouvoir cryoprotecteur/pouvoir sucrant » plus favorable.

## I. - La dénaturation des protéines dans le poisson congelé.

Dans la pratique, les aliments congelés sont entreposés industriellement aux alentours de  $-20^{\circ}\text{C}$ . A cette température, la croissance des microorganismes est complètement arrêtée. L'altération de la qualité des aliments, en particulier les aliments carnés, viandes, volailles et poissons, résulte alors de changements de nature purement physico-chimique. De ces changements, ceux qui s'opèrent dans les protéines myofibrillaires des aliments carnés peuvent constituer le facteur qui limite la durée d'entreposage utile de l'aliment. C'est souvent le cas du poisson entier en filets. C'est presque invariablement le cas du hachis de poisson maigre. A l'état natif, les protéines myofibrillaires existent sous forme de gel aqueux où les filaments de myosine s'arrangent en parallèle avec des filaments mixtes d'actine et de tropomyosine. Ces filaments baignent dans un milieu de force ionique relativement faible. Pendant l'entreposage congelé, les protéines myofibrillaires s'agglutinent et deviennent inextractibles. L'activité ATPasique de la myosine diminue, une partie de l'eau du gel musculaire est libérée.

SOUDAN *et al.* (1965) ont présenté l'état des connaissances en 1960 sur le sujet de la congélation du poisson. Plusieurs articles de synthèse ont été publiés récemment sur la dénaturation des protéines (CONNELL, 1966 ; LOVE, 1966 ; POWRIE, 1973 ; SIKORSKI *et al.*, 1976 ; MATSUMOTO, 1979 ; SIKORSKI, 1979). Les mécanismes de la dénaturation sont encore mal connus ; le phénomène est apparu comme étant très complexe. Il implique plusieurs agents, chacun agissant selon un mode différent, mettant en jeu des liaisons chimiques différentes.

**Dénaturation irréversible sous l'effet de la concentration de sel.**

Lorsque le poisson est congelé, l'eau tissulaire commence par se séparer sous forme de glace pure ; les solutés de liquide intersticiel et protoplasme se concentrent dans une phase liquide résiduelle dont la concentration osmolale est théoriquement prédite par l'équation :

$$m = \frac{273 - T}{1,9}$$

et la fraction d'eau non congelée, par l'équation :

$$q = \frac{Mo}{m} = \frac{1,9 Mo}{273 - T}$$

où Mo est la concentration osmolale initiale du tissu.

Selon STOREY (1979) quelques 8 % d'eau du poisson sont non congelables, étant fermement liés aux protéines, et, par conséquent, ne feraient pas partie de la phase liquide environnante, laquelle se comporte, jusqu'à  $-13^{\circ}\text{C}$ , comme une solution idéale, avec une déviation progressive jusqu'à 10 % à  $-20^{\circ}\text{C}$ . En admettant que Mo = 0,56 soit équivalente à 0,28 M NaCl (LONG, 1955), le facteur de concentration ( $f = \frac{1}{q}$ ) serait à peu près égal à la valeur absolue de la température (en degré C) d'entreposage sous congélation :

$$f = \frac{1}{q} = 273 - T$$

A  $-20^{\circ}\text{C}$ , la concentration de NaCl de 0.015 M atteindra 0.30 M et la force ionique de 0,28 passera à environ 5,6, à supposer qu'il n'y ait pas eu de précipitations eutectiques.

DUERR et DYER (1952) ont montré que la myosine de la chair de morue devient inextractible lorsque, trempée dans une solution saturée de NaCl, la chair acquiert une concentration saline aux alentours de 9 %, correspondant à une force ionique de 1,5. Cette force ionique serait théoriquement atteinte dans la chair de poisson congelé vers  $-5$  ou  $-6^{\circ}\text{C}$ . Or, c'est dans la zone de température entre  $-1$  et  $-5^{\circ}\text{C}$  que la dénaturation est la plus rapide dans la pratique. On serait tenté d'expliquer l'influence de la vitesse de congélation sur le taux de dénaturation par la durée plus ou moins longue d'exposition du poisson à l'effet dénaturant des sels.

Cependant, LOVE (1958) a montré que la vitesse de congélation n'a pas eu d'effet sur le taux de dénaturation des protéines de la morue immédiatement après la congélation. Il n'y aurait donc pas d'effet *dénaturant* des sels, à proprement parler. Selon LOVE, l'effet *solubilisant* des sels interviendrait : les protéines solubilisées pendant le passage du muscle, dans la zone des températures incluses entre  $-1$  et  $-5^{\circ}\text{C}$ , seraient plus susceptibles de dénaturation tardive, au cours de l'entreposage. Le mécanisme de cette dénaturation n'excluerait pas nécessairement l'effet des sels, qui pourrait bien représenter un des mécanismes communs à tous les poissons. Les différences dans le taux de dénaturation chez différentes espèces s'expliqueraient alors par l'entrée en jeu d'autres mécanismes.

L'effet dénaturant, observé par DUERR et DYER, est provoqué par une action indirecte des sels, dont l'augmentation de la concentration entraîne une modification de l'équilibre des forces responsables de la conformation native des protéines. Mais les sels pourraient aussi agir directement et spécifiquement en s'associant par couplage avec les groupes ionisés des protéines. Dépendant de la nature des ions, un tel couplage pourrait contribuer à augmenter ou au contraire à diminuer la stabilisation des protéines.

Enfin, la nature des sels en présence dans la chair de poisson pourrait influencer le volume définitif de la phase liquide résiduelle de la chair de poisson à la suite de leur précipitation eutectique aux différentes températures. SNOW (1950) démontre que la myosine dispersée dans une solution monospécifique de sel ne se dénature qu'au-dessous de son point cryohydratique, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a plus de phase liquide. L'étude de l'influence de la température dans la pratique semble montrer que le phénomène d'eutexie n'a pas d'importance réelle dans la dénaturation des protéines dans le poisson congelé. Entre  $-50^{\circ}\text{C}$ , par exemple, et le point de

congélation du poisson, le taux de dénaturation est pour l'essentiel une fonction croissante monotone de la température. Ce taux est probablement le résultat non seulement de la réaction de l'agrégation des protéines proprement dites, mais aussi de celles conduisant à la formation de nouveaux agents dénaturants qui n'existaient pas encore dans le poisson frais. Apparemment, aux très basses températures, l'effet de ralentissement des réactions exercé par la température et la réduction de la mobilité des particules prédomine sur l'effet d'accélération de la concentration des réactifs. Mais l'existence d'une température correspondant à une dénaturation maximale attribuable à la précipitation eutectique est parfois observable dans les extraits de protéines de poisson (CONNELL, 1957 ; BUTTKUS, 1970, annexe p. 234).

#### **Réactions impliquant les groupes sulfhydriles.**

A l'état natif, la myosine ne possède que des groupes sulfhydriles libres (BUTTKUS, 1970). Certains de ces groupes sulfhydriles sont très réactifs et s'oxydent facilement pour former des liaisons disulfures, la réaction étant catalysée par des ions polyvalents (fer, cuivre, manganèse...). Au cours de l'entreposage congelé, la teneur en groupes SH titrables a tendance à baisser (KHAN *et al.*, 1963 ; CHU et STERLING, 1970). La variation apparemment erratique trouvée par d'autres auteurs serait attribuable à la précision insuffisante des méthodes de dosage. Par ailleurs, CONNELL (1959) et plus tard BUTTKUS (1970) suggèrent un mécanisme par lequel la myosine se polymérise sans que le nombre de groupes SH du système soit nécessairement changé. TSUCHIYA *et al.* (1979) ont montré que la présence d'un mercaptan favorise la redissolution de la myosine et de l'actomyosine après une période d'entreposage congelé. Mais la preuve la plus convaincante de la polymérisation des protéines myofibrillaires via les liaisons disulfures est donnée par l'analyse électrophorétique sur gel polyacrylamide, en présence de dodécylsulfate de sodium, cette technique permettant la séparation des protéines selon leur poids moléculaires ou leur degré de polymérisation.

L'importance du mécanisme de dénaturation par liaison disulfure demeure difficile à évaluer. Il reste à vérifier si le mécanisme contribue significativement à la dénaturation dans les espèces grasses, ou à l'intérieur d'une même espèce, dans le muscle rouge plus significativement que dans le muscle blanc.

#### **Réaction des protéines avec les produits de dégradation des lipides.**

Au cours de l'entreposage congelé, les lipides se dégradent par hydrolyse et par auto-oxydation. Dès 1959, DYER et FRASER remarquent une corrélation entre l'augmentation des acides gras libres et la diminution d'extractibilité des protéines dans la chair du cabillaud congelé. L'effet insolubilisant des acides linoléique et linolénique est démontré par KING *et al.* (1962). ANDERSON et RAVESI (1969, 1970) suggèrent une réaction entre la chaîne hydrocarbonée des acides gras et les groupes hydrophobes de la myosine. Mais la perte de solubilité des protéines pourrait aussi bien être initiée par une fixation ionique des acides gras (POWRIE, 1973). Dans des essais *in vitro*, l'agrégation du mélange protéines myofibrillaires/acide linoléique est presque instantanée.

Les lipides oxydés donnent lieu à la naissance de radicaux libres, aldéhydes, aldéhydes-acides, dialdéhydes et acides gras libres à courte chaîne. L'addition des lipides oxydés provoque une insolubilisation rapide des protéines (NARAYAN et KUMEROV, 1958 ; JARENBACK et LILJEMARK, 1975). SIKORSKI (1979) indique diverses réactions possibles entre les produits d'oxydation des lipides avec les protéines. La réaction du malonaldéhyde avec les protéines et les acides aminés a été étudiée par BUTTKUS (1967), KWON *et al.* (1965), CHIO et TAPPEL (1969) et LINDELÖV (1976).

Bien qu'il soit impossible d'isoler l'effet dénaturant les produits d'oxydation des lipides, le caractère très insaturé, c'est-à-dire facilement oxydable, de ces derniers dans le cas du poisson, suggère que ce mécanisme pourrait jouer un rôle non négligeable.

#### **Réaction avec le formaldéhyde.**

Dans la chair de poisson, le formaldéhyde peut se former selon une réaction enzymatique ou non enzymatique, à partir de l'oxyde de triméthylamine (SOUDAN, 1959, 1961 ; TOKUNAGA, 1964, 1970 ; AMANO et YAMADA, 1965). L'enzyme responsable de ce clivage du TMA-O est particuliè-

rement actif dans les gadidés où il se concentre dans le tissu de la rate. Son activité expliquerait pour une bonne part les différences observées dans le taux de dénaturation de diverses espèces. Cependant, le processus de formation enzymatique du formaldéhyde demeure mal connu. L'enzyme requiert, pour être actif, la présence de cofacteurs non identifiés qui existent dans le muscle du poisson. D'autre part, après une désactivation par un traitement à la chaleur, l'enzyme redevient actif lorsqu'il est mis en présence de la fraction dialysable de la chair de poisson (SVENSSON, 1979).

L'étude *in vitro* démontre que le formaldéhyde, dans l'intervalle de concentration comparable à celui trouvé dans la chair de poisson, peut causer une insolubilisation complète des protéines. La réaction est accélérée par la congélation. Étant très réactif, le formaldéhyde peut réagir avec plusieurs groupes latéraux des protéines (amines, amides, hydroxyles, thiols, etc.). De telles réactions provoqueraient la modification des structures secondaires et tertiaires des protéines. En milieu concentré, comme dans le muscle congelé, les protéines ainsi modifiées peuvent se polymériser et deviennent encore plus insolubles. La preuve de cette polymérisation dans la chair de poisson congelé réside dans le fait qu'une partie des protéines des poissons ne sont plus extractibles dans un solvant contenant à la fois le dodécylsulfate et un mercaptan (SIKORSKI, 1979). Le fait qu'un pH légèrement acide et une force ionique élevée favorisent la réaction de polymérisation des protéines est compatible avec l'hypothèse de la formation d'un complexe intermédiaire protéine-formaldéhyde, qui aura acquis les caractères d'un polyanion à la suite de la fixation du formaldéhyde aux groupes aminés libres, réaction favorisée par un pH alcalin.

### Conclusion.

La dénaturation des protéines dans le poisson congelé est un phénomène complexe où sont mises en jeu probablement des liaisons ioniques, hydrogène, hydrophobes, covalentes. Le taux de dénaturation observé dépend par conséquent autant de la composition de la chair de poisson à l'origine que des conditions de sa congélation et de son entreposage. Il semble peu probable que l'on puisse trouver un moyen pour éliminer complètement la dénaturation, à moins d'abaisser radicalement la température d'entreposage, ce qui est économiquement impensable. Il reste que, dans l'état actuel de la connaissance du phénomène de dénaturation des protéines, plusieurs méthodes pourraient être envisagées pour en minimiser l'importance. Dans le cas de la pulpe de poisson, l'élimination, par lavage, des agents dénaturants est possible et constitue en fait un pas nécessaire dans la fabrication de la pulpe de poisson au Japon. Une deuxième approche consiste en l'utilisation des substances cryoprotectrices.

## II. - Cryoprotection et cryoprotecteurs.

Étant donnée la multiplicité des réactions pouvant conduire à la dénaturation des protéines dans le muscle congelé, il n'est pas surprenant qu'il existe plusieurs modes de cryoprotection. On pourrait les regrouper selon quatre types d'action :

Type I. — L'action protectrice est exercée par les substances qui forment des liaisons avec les protéines myofibrillaires en les rendant moins vulnérables à la dénaturation : le produit résultant de la réaction doit nécessairement posséder la même, ou une meilleure fonctionnalité que les protéines avant la réaction.

Type II. — Les substances qui forment des liaisons avec les dénaturants, les empêchent de réagir avec les protéines myofibrillaires.

Type III. — L'action est exercée par toutes substances qui détournent, retardent ou inhibent les réactions conduisant à la formation des dénaturants dans le muscle de poisson congelé.

Type IV. — La solubilité des substances, aux basses températures, contribue à augmenter le volume de la phase liquide résiduelle dans le système congelé, c'est-à-dire à diminuer la concentration des sels et autres réactifs dans cette phase liquide et, par conséquent, à diminuer leur effet dénaturant ou ralentir leur réaction. Théoriquement, l'effet de ralentissement par la dilution est d'autant plus significatif que l'ordre de la réaction est plus élevé, le rapport des taux de réaction initiaux à 273° K et après la congélation (à  $T < 273^\circ \text{K}$ ) étant approximativement :

$$r = Q_{10}^{\frac{T - 273}{10}} \cdot \left[ \frac{273 - T}{1,9 Mo} \right]^{n-1}$$

où n est l'ordre de la réaction, et  $Q_{10}$  son coefficient de température.

Pour une réaction bimoléculaire ( $n = 2$ ), le rapport des taux de réaction devient :

$$r = Q_{10}^{\frac{T - 273}{10}} \cdot \frac{273 - T}{1,9 Mo} \quad (\text{voir annexe p. 234})$$

soit, approximativement, inversement proportionnel à la concentration osmolale initiale (Mo). Une telle réaction est accélérée par la congélation aux faibles concentrations osmolales du système. La polymérisation des protéines myofibrillaires sous l'effet du formaldéhyde ou du malonaldéhyde est accélérée lorsque le système est congelé (SIKORSKI, 1979, et LINDELOV, 1976).

Le nombre de cryoprotecteurs qui sont actuellement utilisés dans la pratique est très restreint, bien que le nombre des substances capables d'exercer un type d'action cryoprotectrice soit assez élevé. Certaines d'entre elles pourraient exercer plus d'un type d'action, d'où une certaine difficulté à les classer.

### Les polyphosphates.

Les polyphosphates (hexamétaphosphate, tripolyphosphate, pyrophosphate) sont très utilisés dans la technologie alimentaire pour augmenter la capacité d'hydratation des aliments protéiques. Ils peuvent réduire les pertes par exsudation de la viande et des poissons en filet (MAHON, 1962 ; MONOVAR *et al.*, 1973). Ils peuvent retarder la perte de solubilité des protéines (YASUI *et al.*, 1964) et possèdent une propriété texturisante (DENG et TOMASZEWSKI, 1979).

Le mécanisme d'action des polyphosphates est mal connu, parce que très probablement leur action est multiple. Par leur pouvoir séquestrant, ils favoriseraient la dépolymérisation des protéines musculaires en leur ôtant les cations divalents (HAMM, 1971). Le pyrophosphate provoque la dissociation de l'actomyosine en actine et myosine (WEINER *et al.*, 1969). Dans le muscle non congelé, la dépolymérisation et la dissociation de l'actomyosine auront pour effet d'augmenter la capacité d'hydratation du muscle. D'autre part, il ne peut être exclu que des polyphosphates forment une liaison plus ou moins stable avec les groupes guanidines des protéines (LEWIN, 1974). Une telle réaction augmente les charges électriques négatives des molécules protéiques et réduit leur tendance à s'agréger. Dans cette hypothèse, les polyphosphates seraient d'autant plus efficaces que leur degré de polymérisation est élevé. Enfin, la contribution des polyphosphates à l'osmolalité totale du muscle et leur pouvoir séquestrant des ions métalliques polyvalents pourraient en faire des cryoprotecteurs de type III et IV.

### *Chlorure de sodium.*

L'action du sel commun est de type I. L'ion chlorure s'associe aux protéines en neutralisant les charges positives. La première conséquence est l'augmentation de la charge électrique. Une deuxième conséquence possible serait une protection relative des fonctions aminés libres, par exemple contre l'attaque des dénaturants, les aldéhydes en particulier. Le chlorure de sodium montre un effet synergique avec les polyphosphates, probablement parce que les ions chlorure ouvrent la voie à la pénétration des polyphosphates dans les myofibrilles. Quant à l'effet pro-oxydant du sel commun, qui pourrait conduire à la dénaturation des protéines, il proviendrait des impuretés (cations polyvalents) plutôt que du chlorure de sodium lui-même.

### *Les acides carboxyliques et leurs dérivés.*

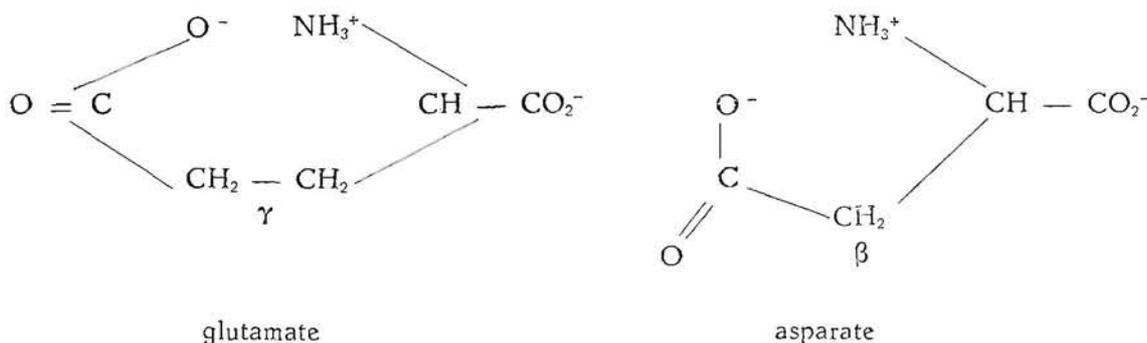
Dans la zone du pH normal du muscle, les acides carboxyliques existent sous forme de l'anion carboxylate. Ils sont susceptibles de former une liaison ionique plus ou moins stable avec les groupes ammonium et guanidinium des protéines. L'influence de cette réaction sur la stabilité des protéines dépendra de la nature du radical de la molécule de l'acide. D'une part, il y a l'augmentation de la charge nette négative des protéines, ce qui tend à les stabiliser aux

pH se situant au-delà de leur point iso-électrique. D'autre part, si le radical de l'acide est hydrophobe, l'effet stabilisateur des charges négatives sera atténué, comme c'est le cas des acides acétique, propionique et butyrique. A partir de l'acide en C5, l'effet de la chaîne aliphatique devient prédominant et les acides se comportent comme des dénaturants. On a précédemment mentionné l'effet insolubilisant des acides linoléique et linoléinique : TAKAMA *et al.* (1972) trouvaient que l'acide caproïque était le plus dénaturant des acides gras dérivés de l'oxydation des lipides. Si, au contraire, le radical de l'acide est hydrophyle, l'effet stabilisateur des charges négatives sera renforcé et l'acide possède alors, en général, un pouvoir cryoprotecteur. C'est le cas des hydroxy-acides connus : acides glycolique, lactique, malique, tartrique, citrique, gluconique. Le pouvoir cryoprotecteur de ces acides a été démontré dans les essais *in vitro* de NOGUCHI et MATSUMOTO (1975 b). Ces auteurs ont aussi étudié les propriétés cryoprotectrices des acides dicarboxyliques, des acides aminés et des peptides.

Dans le cas des acides dicarboxyliques de formule générale  $\text{HOOC} - (\text{CH}_2)_n \text{COOH}$ , l'acide malonique ( $n = 1$ ), l'acide glutarique ( $n = 3$ ) et l'acide adipique ( $n = 4$ ) sont des cryoprotecteurs, alors que l'acide oxalique ( $n = 0$ ), l'acide succinique ( $n = 2$ ) sont légèrement dénaturants. Ces derniers se trouvent être moins solubles dans l'eau et possèdent un point de fusion plus élevé, ce qui indique que l'absence d'effet cryoprotecteur résulterait du peu d'affinité avec l'eau des ions oxalate et succinate, plutôt que de quelque exigence d'ordre structural dans le site de la réaction sur la molécule des protéines. De la même manière, le comportement de l'acide maléique (forme *cis*, très soluble et cryoprotecteur) et de son isomère géométrique, l'acide fumarique (forme *trans*, peu soluble et non protecteur) pourrait simplement refléter leur différence d'affinité avec l'eau. Toutefois, il reste que l'acide oxalique, l'acide fumarique et l'acide succinique, à cause de la contrainte structurale de leur molécule, seraient plus aptes que ne le sont les autres diacides à faire un pont entre deux molécules protéiques, ce qui favorise leur rapprochement et par conséquent la formation des ponts disulfures, lesquels à leur tour conduisent à l'insolubilisation des protéines.

#### Les acides aminés et les peptides.

NOGUCHI et MATSUMOTO (1970, 1971, 1974) ont démontré par des tests *in vitro* la capacité de certains acides aminés et peptides à retarder la perte de solubilité de l'actomyosine de la carpe. Les acides aminés les plus efficaces sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la lysine, la proline et la cystéine. Certains acides aminés deviennent cryoprotecteurs lorsque le groupe aminé est acétylé ou remplacé par un groupe hydroxyle. Chez les peptides, le pouvoir cryoprotecteur reflète en général celui des acides aminés qui les composent. En particulier, le tripeptide glutathion (glutamylcystéylglycine) possède un pouvoir cryoprotecteur remarquable. Les auteurs ont suggéré que le pouvoir cryoprotecteur est lié au nombre des groupes fonctionnels tels que :  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$  et à leur position sur la molécule.



Comme ces groupes déterminent le comportement du cryoprotecteur vis-à-vis à la fois des protéines et du milieu aqueux, son action pourrait être à la fois de types I et IV. Cependant, le fait que l'acétylation du groupe  $\alpha$ -aminé renforce le pouvoir protecteur des acides est compatible avec l'hypothèse d'une liaison ionique stabilisée entre le groupe carboxyle de l'acide aminé et un

groupe ammonium ou guanidinium des protéines. Ainsi l'acide aspartique est cryoprotecteur, mais si l'on substitue à son groupe  $\beta$ -carboxyle un groupe carboxamide, on obtient l'asparagine, qui n'est plus cryoprotecteur. Si par la suite, on bloque par acylation le groupe  $\alpha$ -aminé de l'asparagine, le pouvoir cryoprotecteur est restauré. Le même phénomène s'observe avec l'acide glutamique. Tout se passe comme si chez l'acide aspartique et l'acide glutamique, le groupe  $\beta$  ou  $\gamma$ -carboxyle était capable de neutraliser, intramoléculairement, le groupe  $\alpha$ -aminé.

De cette façon l'anion  $\alpha$ -carboxylate de l'aspartate ou du glutamate serait plus fermement attaché aux protéines. A cet égard, il serait intéressant de vérifier le pouvoir cryoprotecteur des lactames correspondantes. Il est à noter que dans le cas de la cystéine et du glutathion, NOGUCHI et MATSUMOTO suggèrent qu'ils réagissent avec les protéines par leur groupe —SH. Parmi les acides aminés naturels, le glutamate présente beaucoup d'intérêt, parce qu'il est actuellement utilisé comme exhausteur de goût dans les aliments. A la concentration usuelle de 0,2 % à 0,5 %, son effet cryoprotecteur est négligeable. A concentration plus élevée, de 3 à 5 %, il durcit considérablement la texture du poisson (RODGER *et al.*, 1979 ; NOGUCHI *et al.*, 1975).

#### **Les $\alpha$ -cétoacides.**

TRAN (1974) et LUONG (1975) ont montré que certains  $\alpha$ -cétoacides sont capables d'améliorer la capacité d'hydratation et minimiser l'exsudat de la chair de poisson congelé. Ces mêmes  $\alpha$ -cétoacides préviennent *in vitro* la perte de solubilité des protéines. Parmi les cétoacides essayés, les plus efficaces sont l'acide oxaloacétique, l'acide pyruvique et l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique. TRAN (1975) montre plus tard que le pyruvate rend les protéines myofibrillaires solubles dans une solution de force ionique très faible, inférieure à 0,1. Les solutions de protéines ainsi modifiées paraissent stables à 4° C. Le dosage des groupes aminés libres des protéines indique la participation de ces derniers dans la formation d'une liaison covalente (base de Schiff) avec le groupe cétone des cétoacides. Mais la formation des liaisons acétal ou thioacétal sont également possibles.

En fait, on pourrait considérer le traitement aux cétoacides comme une modification *in situ* des protéines du poisson. L'amélioration remarquable de la fonctionnalité des protéines vient du fait que pour chaque base de Schiff formée, les protéines acquièrent deux ou trois charges électriques négatives nettes. Moins labiles que les liaisons ioniques, les bases de Schiff sont toutefois moins stables que les liaisons amides, esters et thioesters résultant de l'acylation des protéines (GRONINGER, 1972). La qualité des protéines traitées aux cétoacides reste donc intacte.

#### **Les polyalcools et les sucres.**

L'effet cryoprotecteur du glycérol a été découvert par POLGE *et al.* (1949) au cours de leur étude sur la congélation des organismes vivants. LOVELOCK (1954) démontre que l'effet cryoprotecteur du glycérol provient de sa contribution à la concentration osmolale du système (action de type IV). LOVE (1966) traitait les filets de poisson avec du glycérol avant de les congeler. Il trouvait que la proportion d'eau transformée en glace diminuait et qu'il y avait aussi diminution de la dénaturation des protéines par comparaison aux filets non traités. D'autres polyalcools, incluant éthylène glycol, propylène glycol, possèdent la même propriété, quoiqu'à un degré moindre. Récemment il est devenu pratique courante au Japon d'utiliser 4 % de sorbitol et 4 % de sucrose dans la fabrication du kamaboko.

L'effet hydratant du sucrose sur la viande est bien connu. HAMM (1960) montre que le trempage dans une solution isotonique de sucrose provoque un gonflement du muscle. Ajouté à la viande, le sucrose protège celle-ci contre la dénaturation des protéines au cours de la lyophilisation et de l'entreposage congelé (YASUI et HASHIMOTO, 1966). Le mécanisme d'action du sucrose est encore mal connu. Dans les expériences avec des cellules vivantes, MAZUR *et al.* (1969) ont montré que le sucrose peut protéger les cellules animales sans y pénétrer, ce qui pourrait indiquer que le sucrose agit au niveau de la membrane extérieure des cellules. Toutefois, l'action de dilution peut toujours avoir lieu si l'on admet une diffusion des électrolytes, et d'autres réactifs, de la cellule vers la partie de la phase liquide résiduelle induite par le sucrose à l'extérieur de la cellule. On pourrait peut-être même aller plus loin, en disant que dans

certains cas, l'effet cryoprotecteur est renforcé parce que la partie diffusée des dénaturants est spatialement séparée des protéines intracellulaires. On peut signaler, à ce sujet, que le sucrose à 0,35 M protège mieux les cellules vivantes du hamster que le glycérol à 0,5 M (MAZUR, 1970). Ce résultat pourrait aussi s'expliquer par la différence de normalité des groupes OH, dans le sucrose (2,8 N) et le glycérol (1,5 N).

La relation entre l'efficacité d'un cryoprotecteur et sa pénétration à l'intérieur de la fibre musculaire ne semble pas avoir été étudiée dans le cas des oligosaccharides et des polysaccharides. Elle pourrait expliquer l'écart, quand il existe, entre les résultats obtenus dans les essais *in vitro* avec un extrait de protéines et ceux obtenus dans les essais faits sur la chair plus ou moins intacte. A l'inverse, on pourrait s'attendre à ce que le broyage de la chair permette d'utiliser certains cryoprotecteurs que leur poids moléculaire élevé rendrait moins efficace dans les traitements de la chair intacte. Cette remarque pourrait être intéressante car, d'une part, il existe un problème d'excès de pouvoir sucrant qui limite la concentration admissible des sucres et des polyalcools, d'autre part le choix du degré de broyage de la chair pendant le procédé de désaigreurage est technologiquement possible.

#### **Conclusion.**

La plupart des cryoprotecteurs connus sont soit de type I ou de type IV. Ces deux types de cryoprotecteurs exigent une concentration assez élevée pour être efficaces, généralement trop élevée pour ne pas poser de problèmes d'acceptabilité du produit traité. L'utilisation d'un mélange de plusieurs cryoprotecteurs, chacun à faible dose, pourrait constituer une approche plausible. A la limite, le produit traité peut être considéré non pas comme un aliment, mais une matière première composite, qui ne doit servir qu'à la fabrication des aliments finis. Dans ce cas, le problème deviendra celui de la proportion de la matière première, pulpe de poisson par exemple, à utiliser pour que la concentration finale des cryoprotecteurs soit réduite à une valeur acceptable dans le produit fini, croquette de poisson par exemple.

De toute manière la liste des cryoprotecteurs connus s'allongera certainement, en particulier ceux de types II et III. Par exemple, lorsque les réactions conduisant à la formation du formaldéhyde seront mieux connues il sera peut-être facile de leur trouver un inhibiteur. On pourrait aussi s'orienter vers la recherche d'un récupérateur des aldéhydes, une substance qui, par sa réactivité, fixerait immédiatement les aldéhydes au fur et à mesure de leur formation, ou une substance qui, sans être particulièrement réactive, mais grâce à son innocuité, pourrait être utilisée à une concentration suffisamment élevée pour concurrencer efficacement les autres groupes actifs des protéines. Il serait intéressant à cet égard de déterminer les conditions sous lesquelles les groupes hydroxyles des sucres formeront des liens acétal avec les aldéhydes.

### **III. - Essais de certains cryoprotecteurs sur les protéines et sur la pulpe de poisson.**

La pulpe de poisson est une matière première extrêmement intéressante à plus d'un titre ; son prix, sa valeur nutritive, sa qualité technologique, le potentiel de sa production sont des atouts considérables. Mais son utilisation est actuellement limitée par la perte relativement rapide de sa qualité, en particulier texturale. Il ne fait pas de doute qu'une solution à ce problème donnera une grande impulsion au développement de l'industrie de la pulpe de poisson. Il se trouve que la pulpe de poisson, grâce à son grand rapport surface/volume, se prête bien à un traitement aux cryoprotecteurs, ce qui encourage la recherche dans ce domaine. Or, il existe dans la transformation des féculents une très grande variété de produits susceptibles de montrer une capacité cryoprotectrice. Le glucose et son produit d'hydrogénation, le sorbitol, n'en sont que les plus connus. L'étude de ces produits peut être intéressante sur le plan scientifique, mais aussi et surtout, sur le plan appliqué où leur utilisation comme additif alimentaire ne poserait pas de problème de salubrité.

#### **Etudes *in vitro*.**

L'objectif principal de ces études est de faire une première sélection des divers cryoprotecteurs pour des essais ultérieurs avec de la pulpe de poisson. Il s'agit de comparer le pouvoir cryopro-

tecteur des divers polyalcools, sucres et saccharides. Etant données les différences dans le poids moléculaire, la structure et la solubilité de ces composés dans l'eau, il paraît raisonnable de supposer qu'il existe des différences dans leur pouvoir cryoprotecteur. Si tel était le cas, il serait intéressant de mesurer ultérieurement et le plus précisément possible le rapport pouvoir cryoprotecteur/pouvoir sucrant.

#### Matériel et méthodes.

On prépare les solutions de protéines myofibrillaires du poisson en broyant de la chair de lieu avec 10 fois son poids d'eau distillée. L'homogénat est centrifugé, on recueille les myofibrilles, les lave et les disperse dans une solution de NaCl à 5 %. A la solution de protéines myofibrillaires, on ajoute divers polyalcools, sucres et polysaccharides pour obtenir une concentration finale de 5 %. Une série faite avec d'autres additifs est aussi préparée. Les solutions finales contenant les protéines et les additifs sont congelées en parties aliquotes de 1 ml dans un tube de polypropylène et stockées à  $-20^{\circ}$  C.

Périodiquement, pendant 8 semaines, les solutions congelées (1 ml) sont décongelées, puis diluées avec 4 ml de solution de NaCl 5 %. On centrifuge et mesure l'absorbance à 275 nm après avoir dilué 1 ml de solution de protéines avec 3 ml de NaCl 5 % ou de l'eau distillée, auquel cas on aura effectué une centrifugation avant l'analyse spectrophotométrique. Ces mesures représentent respectivement l'indice des protéines solubles totales et celui des protéines sarcoplasmiques. Leur différence représente donc l'indice des protéines myofibrillaires extractibles. Cette double lecture a été introduite pour éliminer d'autres sources éventuelles d'absorbance à 275 nm. Cependant, l'expérience ayant montré qu'une telle éventualité ne s'était pas produite, seul l'indice de protéines solubles totales est utilisé dans le calcul de la solubilité relative (s) (s au temps zéro du témoin = 100).

#### Résultats et discussion.

Les résultats obtenus avec quatre séries d'additifs sont présentés dans les tableaux 1 à 4.

Polyalcool	Durée d'entreposage (semaine)			
	1	3	6	8
Témoin	102	96	83	50
Ethyléneglycol	98	99	97	89
Glycérol	102	95	93	90
Erythréitol	95	94	88	80
Xylitol	99	100	98	88
Sorbitol (a)	100	94	93	80
Sorbitol (b)	99	97	93	85
Mannitol	98	92	80	70
Maltitol	97	94	90	80
Lycasin	100	93	96	85

(a) Neosorb poudre.  
(b) Neosorb 70/07 M (liquide).

TABLE. 1. — Effet de divers polyalcools sur la solubilité relative des protéines myofibrillaires du poisson en entreposage à  $-20^{\circ}$  C.

On remarque que le taux de dénaturation n'est pas toujours le même pour le témoin. Cette différence provient évidemment de celle qui existe dans la matière première, parce qu'il nous a été impossible de contrôler « l'histoire » des poissons utilisés. On ne peut pas comparer les résultats de deux séries différentes, les comparaisons sont toujours cependant valables à l'intérieur de chaque série.

Sucres	Durée d'entreposage (semaine)		
	1	6	8
Témoin	96	62	56
Xylose	97	94	94
Glucose	99	99	95
Fructose	98	100	97
Maltose	98	100	88
Lactose	100	102	91
Saccharose	94	100	92
Maltotriose	99	99	95
Raffinose	99	94	82
Stachyose	99	100	93

TABLE 2. — *Effet de divers sucres et oligosaccharides sur la solubilité relative des protéines myofibrillaires du poisson en entreposage à -20° C.*

Dérivés de glucose	Durée d'entreposage (semaines)		
	1	6	8
Témoin	90	80	68
Glucose	93	95	89
$\alpha$ Méthylglucoside	93	88	89
Glucamine	94	89	85
Lab 230	101	91	93
Sirop 38 DE	99	—	—
Sirop Flolys	95	92	91
Sirop Roclys	93	87	98
Maltodextrine 01	40	33	23
Maltodextrine 05	98	—	37

TABLE 3. — *Effet des divers dérivés du glucose sur la solubilité relative des protéines myofibrillaires du poisson en entreposage à -20° C.*

Dans la série des polyalcools (tabl. 1), l'indice de solubilité du témoin tombe à 50 après 8 semaines pendant que celui des solutions contenant un polyalcool se situe entre 70 (mannitol) et 90 (glycérol). L'effet cryoprotecteur est significatif comme l'on pouvait s'y attendre: il tend à aller en diminuant de l'éthylène glycol au maltitol, ce qui montre bien que, dans ce cas, la cryoprotection est fonction croissante de la concentration molale. L'influence de la structure se traduit par des valeurs de solubilité de protéines faibles en présence d'érythritol et surtout de mannitol. Il est intéressant de noter que le mannitol est moins sucré et moins soluble que le sorbitol. Le problème de la relation entre la structure, la solubilité, le pouvoir sucrant et le pouvoir cryoprotecteur chez les polyalcools isomères mériterait d'être examiné de plus près.

Dans la série des sucres (tabl. 2), le taux d'abaissement de solubilité des témoins est à peu près le même que dans la série des polyalcools ( $s = 56$ ) alors que celui des solutions contenant les cryoprotecteurs varie entre 82 (raffinose) et 97 (fructose). La molalité ne semble pas exercer une influence très marquée, car entre le tétraose stachyose ( $s = 93$ ) et le glucose ( $s = 95$ ), la différence paraît minime. Même si cela reste à vérifier dans une expérience où la durée d'entreposage serait plus longue, ces résultats sont en accord avec ceux de NOGUCHI *et al.* (1976).

Le tableau 3 montre les résultats obtenus avec la série des dérivés du glucose. Dans cette série, la dénaturation des protéines paraît plus lente chez le témoin ( $s = 68$  à 8 semaines). La glucamine et le méthylglucoside possèdent à peu près le même pouvoir cryoprotecteur que le glucose ( $85 \leq s \leq 89$ ). De même, il n'y a pas de différence entre les trois sirops de glucose ( $91 \leq s \leq 98$ ). Par contre, les maltodextrines Mo1 et Mo5 se sont comporté comme des dénaturants ( $s = 23$  et  $37$ , respectivement). Ces derniers résultats doivent cependant être considérés avec réserve. Les valeurs très basses obtenues pourraient bien résulter d'une manipulation imparfaite (temps de dissolution trop long, présence de bulles d'air dans la solution de protéines et de maltodextrine, non ajustement du pH).

Parmi les autres substances essayées (tabl. 4), seuls le pyruvate (0,5 %) et l'EDTA trisodique (0,15 %) possèdent un pouvoir cryoprotecteur supérieur à celui du sorbitol. Le gluconate et le glutamate n'ont pratiquement pas d'effet à la concentration utilisée (0,5 %).

Additifs	Concentration %	Durée d'entreposage (semaines)				
		0	2	4	6	8
Bisulfite	0,50	42	3	4	4	4
Pyrophosphate	1,50	93	76	79	18	14
Gluconate	0,50	95	77	41	24	13
Sulfure	0,15	100	17	20	17	10
Carbonate	1,50	100	35	34	15	15
Phosphate	1,50	82	76	49	27	11
Glutamate	0,50	92	69	62	15	18
Pyruvate	0,50	113	56	120	98	106
EDTA	0,15	108	93	114	82	99
Sorbitol	5,00	96	95	103	22	22
Témoin		100	93	17	16	17

TABL. 4. — Effet des substances diverses sur la solubilité relative des protéines myofibrillaires du poisson (*Pollachius virens*) en entreposage à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

L'effet insolubilisant du chlore et du fer est démontré dans un essai résumé au tableau 5. Dans ce cas, l'indice de protéines solubles est basé sur le dosage de protéines par la méthode au biuret. Le chlore accélère la dénaturation des protéines, son action dénaturante est rapide. Elle est plus forte aux températures supérieures au point de congélation, et moins forte dans l'extrait du muscle que dans l'extrait des myofibrilles. Le sarcoplasme paraît posséder un certain pouvoir anti-dénaturant vis-à-vis du chlore. A la concentration de  $5 \times 10^{-5}$  M, l'ion ferrique paraît favoriser la dénaturation des protéines. A la même concentration, l'ion ferreux est dénaturant dans l'extrait des myofibrilles mais anti-dénaturant dans l'extrait du muscle. Ces résultats démontrent l'importance de la qualité de l'eau lorsqu'elle est utilisée dans le lavage de la pulpe de poisson.

Traitement	Durée d'entreposage (semaines)			
	0 *	1	2	4
<i>Extrait des myofibrilles</i>				
Témoin	100	85	76	32
Chlore (120 ppm)	39	46	47	24
Chlore (600 ppm)	4	27	26	25
FeCl <sub>3</sub> ( $5 \times 10^{-5}$ M)	65	70	66	37
FeCl <sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-5}$ M)	64	61	58	30
<i>Extrait du muscle **</i>				
Témoin	100	118	107	56
Chlore (120 ppm)	96	75	76	47
Chlore (600 ppm)	25	65	61	42
FeCl <sub>3</sub> ( $5 \times 10^{-5}$ M)	83	72	92	52
FeCl <sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-5}$ M)	75	100	103	85

TABLE. 5. — Evolution de la solubilité relative des protéines de lieu noir en stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ ; effet de la présence du chlore et du fer; \* dosages effectués après 24 h d'attente à  $+4^{\circ}\text{C}$  (méthode au biuret); \*\* solution surnageante d'un homogénat de muscle dans 10 fois son volume de NaCl 5%.

Cette étude a permis de tirer certaines conclusions qualitatives en ce qui concerne le pouvoir cryoprotecteur des substances essayées. Une étude quantitative exigerait une définition précise de ce pouvoir cryoprotecteur; par exemple en mesurant la constante cinétique apparente de la réaction de dénaturation assimilée à une réaction monomoléculaire (CONNELL, 1957). Elle exigerait aussi un substrat-standard qu'il paraît difficile d'obtenir, les extraits de protéines myofibrillaires ne se dénaturant pas toujours à la même vitesse. Il reste que l'effet cryoprotecteur a été bien démontré pour les polyalcools et les sucres de poids moléculaire élevé tels le maltitol, le lycasin, les sirops de glucose, les oligosaccharides. Dans le cas de ces derniers, le fait que l'effet cryoprotecteur est presque indépendant du poids moléculaire semble prometteur en ce sens qu'il pourrait exister, chez les produits d'hydrolyse de l'amidon, un poids moléculaire correspondant à un rapport pouvoir cryoprotecteur/pouvoir sucrant optimal.

#### **Etudes sur la pulpe de poisson.**

Pour faire l'essai des cryoprotecteurs sur la pulpe de poisson, on a choisi la pulpe obtenue de l'arête centrale de lieu noir et du chinchard, deux espèces qui diffèrent par les caractéristiques

de la chair et par leur transformation. Le lieu est un poisson blanc, de grande taille, maigre, qui est traité généralement en filets, alors que le chinchard est une espèce de petite taille, peu consommée en France, assez gras et à chair rose. Les deux espèces ont en commun leur grand potentiel comme source possible de pulpe de poisson.

Ce travail est une étude préliminaire dont le but principal est de vérifier l'efficacité de certains cryoprotecteurs sur la pulpe de poisson. Certaines variations dans les paramètres technologiques (grattage, lavage) ne sont prises en compte que dans la mesure où ils affectent l'efficacité des cryoprotecteurs. De même, il n'a pas été dans les objectifs de ce travail de mesurer exactement la durée de conservation utile des différents échantillons traités aux cryoprotecteurs. Un tel objectif est pour l'instant hors de portée avec les critères utilisés dans ce travail (indice de protéine soluble et indice texturométrique).

#### Matériels et méthodes.

Pour préparer la pulpe de poisson on se sert d'une Baader 694, équipée d'un cylindre aux perforations de 0,5 cm de diamètre. Les poissons utilisés proviennent du Marché d'intérêt national (M.I.N.) de Nantes. Le lieu noir est mis en filets au laboratoire, ses résidus sont utilisés soit tels quels, soit après avoir été lavés et grattés avec une brosse pour les débarrasser des tissus de la rate qui se trouvent collés à la colonne vertébrale. Le chinchard est utilisé après éviscération et lavage. Le lavage de la chair désarêtée, quand il est effectué, consiste à mélanger une part de chair dans quatre parts d'eau de ville, additionnée éventuellement d'EDTA trisodique (0,03 %) ou d'hypochlorite (chlore résiduel : 5 ppm), à agiter doucement le mélange pendant 5 mn et à procéder à l'égouttage sur tamis jusqu'à l'obtention du poids initial.

Les traitements aux cryoprotecteurs se font comme suit : à 600 g de chair, on ajoute 30 g d'une solution aqueuse contenant 18 g de sucre ou polyalcool et éventuellement 1,8 g de pyruvate de sodium ainsi que 0,18 g d'EDTA trisodique. La chair traitée est divisée en quatre parties égales, congelée à  $-30^{\circ}\text{C}$  dans des barquettes en aluminium fermées et entreposées normalement à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

On détermine périodiquement l'indice de solubilité des protéines totales et l'indice texturométrique des échantillons pendant une durée de stockage allant jusqu'à 8 semaines. L'indice de solubilité des protéines est défini comme l'absorbance à 275 nm de l'extrait obtenu en homogénéisant 3 g de chair dans 120 ml NaCl 5 %, la lecture étant faite après centrifugation et dilution (1 : 4) de l'extrait avec NaCl 5 %. L'indice texturométrique est obtenu en formant un cylindre de pulpe (20 g) dans un bêcher standardisé ( $\varnothing$  3 cm), le faisant cuire ( $100^{\circ}\text{C}$  pendant 20 mn) et, après refroidissement (température de la chambre) et égouttage, en le soumettant à un test de compression. On détermine graphiquement la hauteur L (cm) du cylindre de poisson cuit et la résistance F (newton) du cylindre à sa mi-hauteur. L'indice texturométrique est défini par la formule :

$$E \cdot 10^{-3} = \frac{M'}{FLp} \quad (\text{cm}^2/\text{newton})$$

où  $M'$  = poids (g) après cuisson et égouttage,

$p$  = densité du cylindre  $\approx 1 + \frac{2}{M'}$  ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) (NECIBI, 1982).

On remarque que dans les conditions idéales,  $E \cdot 10^{-3}$  représente le module d'élasticité de la pulpe de poisson cuite. La formule a été utilisée de préférence, par exemple, à la résistance F, afin de tenir compte de la variation de  $M'$  au cours de l'entreposage.

#### Résultats et discussion.

Les résultats des essais sont résumés dans les tableaux 6 à 9 pour le lieu noir et les tableaux 10 et 11 pour le chinchard. La qualité initiale du lieu noir est inégale, étant parfois très bonne (tabl. 8 et 9), parfois très médiocre (tabl. 6 et 7), ce qui rend les comparaisons difficiles. On peut cependant tirer certaines conclusions.

#### Influence du grattage.

Le lieu noir appartient à la famille des gadidés, dont la rate contient l'enzyme responsable du clivage de TMA-O en DMA et formaldéhyde. Le grattage de l'arête centrale a effectivement

Traitement	Durée de stockage à $-20^{\circ}\text{C}$ (semaines)							
	Indice texturométrique				Indice de protéines solubles			
	0	2.5 *	3.5	5	0	2.5 *	3.5	5
<i>Pulpe lavée</i>								
Témoin	146	138	71	58	0.64	0.25	0.16	0.12
Dextrose	102	162	128	55	0.61	0.40	0.33	0.23
Lab 230	110	172	156	56	0.58	0.39	0.33	0.18
Maltodextrine M 05	110	198	189	76	0.56	0.45	0.30	0.16
Glycérol	136	147	84	89	0.59	0.56	0.32	0.25
Sorbitol	121	166	173	75	0.56	0.53	0.38	0.29
Lycasin	120	167	80	70	0.60	0.61	0.36	0.26
EDTA	130	142	143	69	0.67	0.27	0.14	0.12
Pyruvate	128	165	141	92	0.63	0.29	0.18	0.14
Sorbitol + Pyruvate + EDTA	133	190	92	83	0.63	0.59	0.35	0.29

Traitement	Dure de stockage à $-20^{\circ}\text{C}$ (semaines)					
	Indice texturométrique			Indice de protéines solubles		
	0	2	4	0	2	4
<i>Pulpe non lavée</i>						
Témoin	151	77	98	0.84	0.31	0.39
EDTA (100 ppm)	146	102	88	0.91	0.47	0.36
EDTA (300 ppm)	176	82	79	0.82	0.33	0.31
EDTA (1 000 ppm)	126	87	87	0.75	0.40	0.31
Sorbitol	149	92	88	1.02	0.74	0.37
Maltodextrine M 05	96	79	91	0.86	0.56	0.32
Sorbitol + EDTA	120	116	88	0.78	0.42	0.33
Malto. + EDTA	90	96	96	0.82	0.51	0.35
<i>Pulpe lavée</i>						
Témoin	68	97	74	0.67	0.27	0.19
Sorbitol	78	88	84	0.83	0.52	0.21
EDTA (300 ppm)	63	92	83	0.78	0.27	0.30
Sorbitol + EDTA	76	96	75	0.78	0.33	0.21

TABL. 6. — Evolution de l'indice texturométrique et de l'indice des protéines solubles de la pulpe de lieu noir obtenue de résidu de filetage lavé et gratté, en stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ ; effet de diverses substances cryoprotectrices; \* décongélation accidentelle. TABL. 7 (en bas). — Effet de l'EDTA, du sorbitol et du maltodextrine M 05.

Traitement	Durée de stockage à $-20^{\circ}\text{C}$ (semaines)						
	Indice texturométrique				Indice de protéines solubles		
	0	2	4	8	0	2	4
<i>Pulpe non lavée</i>							
Témoin	286	137	112	74	1,25	0,50	0,41
Lab 265 (2 %)	378	199	192	115	1,15	0,53	0,41
Maltodextrine (M 01)	334	122	120	76	1,47	0,47	0,36
Lab 230	273	132	129	115	1,27	0,55	0,36
Dextrose	343	118	111	88	1,15	0,68	0,39
<i>Pulpe lavée</i>							
Témoin	269	129	94	78	0,85 *	0,47	0,21
Lab 265 (2 %)	372	239	128	142	0,71	0,47	0,27
Maltodextrine (M 01)	296	139	89	72	0,95	0,87	0,35
Lab 230	275	152	105	107	0,90	0,96	0,34
Dextrose	245	161	94	95	0,75	0,84	0,38

TABLE 8. — Evolution de l'indice texturométrique et de l'indice de protéines solubles dans la pulpe de lieu noir obtenue de résidu de filetage non lavé et non gratté, en stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ ; effet des hydrates de carbone d'intérêt industriel; \* estimé.

Traitement	Durée de stockage à $-20^{\circ}\text{C}$ (jours)			
	0	5 *	18	42
<i>Pulpe non lavée</i>				
Témoin	1,24	1,25	0,75	0,78
Traité **	1,24	1,44	0,92	1,06
<i>Pulpe lavée à l'eau</i>				
Témoin	1,02	0,55	0,25	0,13
Traité **	1,04	0,78	0,50	0,55
<i>Pulpe lavée à l'hypochlorite</i>				
Témoin	1,08	0,39	0,16	0,18
Traité **	1,08	0,64	0,48	—
<i>Pulpe lavée à l'EDTA</i>				
Témoin	1,02	0,37	0,29	0,29
Traité **	1,02	0,63	0,52	0,52

TABLE 9. — Evolution de l'indice des protéines extractibles totales de pulpe de lieu noir obtenu de résidu de filetage lavé et gratté, en stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ ; effet du lavage et du traitement aux cryoprotecteurs; \* décongélation accidentelle; \*\* le traitement consiste à ajouter 3 % de sorbitol et 0,03 % d'EDTA sodique.

Traitement	Durée de stockage à -20° C (semaines)						
	Indice texturométrique				Indice de protéines solubles		
	0	2	4	7	0	2	4
Pulpe non lavée	177	139	159	148	2,56	1,70	1,82
Pulpe lavée à ClONa	107	110	53	63	1,50	1,39	1,26
+ cryoprotecteurs *	—	88	96	83	—	1,26	1,33
Pulpe lavée à l'EDTA	170	76	65	63	1,40	1,37	1,25
+ cryoprotecteurs **	—	126	138	110	—	1,26	1,32
Pulpe lavée à l'eau	102	72	56	57	1,57	1,49	1,44
+ dextrose	—	76	68	77	—	1,28	1,22
+ Lab 230	—	69	85	69	—	1,20	1,32
+ maltodextrine M05	—	88	71	78	—	1,40	1,40
+ glycérol	—	91	83	57	—	1,35	1,34
+ sorbitol	—	95	75	57	—	1,26	1,28
+ lycasin	—	71	70	57	—	1,27	1,32
+ pyruvate	—	74	70	46	—	1,55	1,35
+ cryoprotecteurs *	—	105	88	88	—	1,22	1,38

TABLE 10. — Evolution de l'indice texturométrique et de l'indice de protéines solubles de la pulpe de chinchard en stockage à -20° C; effet du lavage de la pulpe et de divers cryoprotecteurs; \* mélange de sorbitol, EDTA et pyruvate; \*\* mélange de sorbitol et pyruvate.

Traitement	Durée de stockage à -20° C (semaines)							
	Indice texturométrique				Indice de protéines solubles			
	0	2	4	8	0	2	4	8
<i>Pulpe non lavée</i>								
Témoin	193	192	117	134	1,46	1,56	1,58	1,36
Pyruvate	—	179	137	181	1,39	1,51	1,19	1,44
EDTA	—	180	114	148	1,53	1,60	1,64	1,26
Sorbitol	—	226	153	186	1,33	1,51	1,40	1,41
Pyruvate + sorbitol	—	217	165	136	1,30	1,48	1,43	1,39
EDTA + Sorbitol	—	192	141	148	1,33	1,60	1,66	1,28
EDTA + Pyruvate	—	159	133	122	1,28	1,68	1,54	1,27
EDTA + Pyruvate + Sorbitol	214	219	145	198	1,41	1,42	1,27	1,60
<i>Pulpe lavée</i>								
Témoin	182	98	69	45	1,33	1,38	1,25	1,53
EDTA + Pyruvate + Sorbitol	182	101	69	—	1,18	1,20	1,16	—

TABLE 11. — Evolution de l'indice texturométrique et de l'indice de protéines solubles de la pulpe de chinchard en stockage à -20° C; effet du sorbitol, du pyruvate et de l'EDTA.

diminué le taux de dénaturation des protéines comme le montre une comparaison entre les indices de solubilité de protéines des témoins (chair non lavée) ; mais le bénéfice du grattage disparaît, si la pulpe de lieu est lavée après extraction (tabl. 12). Le grattage a aussi pour effet de blanchir énormément la pulpe de lieu (NECIBI, 1982).

Semaines d'entreposage	0	1	2	2,5	4	6
Chair non lavée non grattée	1,25	—	0,50	—	0,41	—
grattée	1,24	1,25	—	0,75	—	0,78
Chair lavée non grattée	0,85	—	0,47	—	0,21	—
grattée	1,02	0,55	—	0,25	—	0,13

TABLE. 12. — Influence du lavage de la pulpe de lieu noir.

*Influence du lavage de la pulpe.*

Le lavage dans les conditions utilisées rend la chair plus blanche, mais il peut être source d'inconvénients à plusieurs égards. Il y a tout d'abord une perte inévitable de chair sous forme de fines particules, jusqu'à 18-20 %. La chair lavée dans nos essais contient donc un excès d'eau, qui sera dégorgée à la cuisson. Cela pourrait constituer un inconvénient technologique si l'on ne le corrigeait pas par l'adjonction d'un agent hydratant. Au point de vue organoleptique, le lavage affadit la chair de poisson, en particulier dans le cas du chinchard qui possède une saveur caractéristique.

Mais le plus sérieux inconvénient, c'est que le lavage provoque un durcissement rapide de la texture de la pulpe de poisson. Dans le cas du lieu noir, le durcissement de la texture s'accompagne de perte de solubilité des protéines (tabl. 9) et est plus sévère lorsque la qualité de la matière première est médiocre (tabl. 6 et 7). Dans le cas du chinchard, le durcissement est aussi très sévère, mais l'indice de solubilité des protéines varie peu (tabl. 10 et 11). Cela s'expliquerait en partie par l'imprécision de la méthode spectrométrique UV dans le cas du chinchard causée par la présence de micelles de lipides dans l'extrait. Une autre possibilité serait que les protéines sont modifiées au cours de la congélation d'une manière telle qu'elles demeurent solubles à la décongélation (4° C), mais qu'elles se dénaturent rapidement aux hautes températures, pendant la préparation des échantillons pour le test texturométrique. On note enfin que dans le cas du lieu, le lavage de la pulpe contribue à retarder la dénaturation des protéines par rapport à la pulpe non lavée, lorsque la qualité initiale du lieu est bonne et que les carcasses de poisson sont désarêtées sans avoir été grattées (tabl. 8).

La présence du chlore (5 ppm) et de l'EDTA trisodique (0,03 %) dans les solutions de lavage ne semble pas affecter beaucoup l'évolution de la qualité de la pulpe par rapport au lavage à l'eau. Mais lorsque le lavage à l'EDTA est suivi de l'addition des cryoprotecteurs (sorbitol ou sorbitol + pyruvate), la dénaturation et le durcissement de la texture sont moins sévères par rapport au cas du lavage à l'eau ordinaire suivi de l'addition des mêmes cryoprotecteurs (tabl. 9 et 10).

*Influence des cryoprotecteurs.*

On a essayé les cryoprotecteurs suivants :

- pour les sucres : le dextrose, le Lab 230, les maltodextrines M 01 et M 05 et le Lab 265 ;
- pour les polyalcools : le glycérol, le sorbitol et le lycasin.

A l'exception du glycérol, les substances testées proviennent de l'industrie de transformation des féculents. Le Lab 230 est un sirop à haute teneur en maltose. Les maltodextrines M 01 et M 05 sont constituées respectivement de 98,5 et 90 % de polysaccharides (trisaccharides et

au-delà). Le lycasin est un sirop de glucose hydrogéné contenant 50 à 55 % de maltitol et 35 à 45 % de polysaccharides hydrogénés. Le Lab 265 est une pulpe de pomme de terre (cellulose et hémicellulose) séchée et réduite en poudre.

Le tableau 6 résume les résultats d'une expérience sur la pulpe de lieu noir lavée. Les sucres et les polyalcools essayés démontrent tous un effet cryoprotecteur, selon les indices utilisés. Il est à remarquer que selon l'indice des protéines solubles, le sorbitol et le lycasin sont plus efficaces que le dextrose et le Lab 230, mais cette différence ne se traduit pas d'une manière nette par les indices textuométriques. L'efficacité de la maltodextrine M 05 est inférieure à celle du sorbitol, mais comparable à celle du dextrose et du Lab 230 (tabl. 7). La maltodextrine M 01 par contre est moins efficace que le Lab 230 (tabl. 8).

Le Lab 265 ne se comporte pas comme un cryoprotecteur, comme le montrent les indices de protéines solubles (tabl. 8), mais il a une propriété texturisante remarquable: il donne du volume à la pulpe de poisson à la cuisson et par ce biais, lui donne une texture plus tendre. Il semble cependant qu'il favorise le développement d'une odeur rance dans le poisson cru.

Les essais sur la pulpe de chinchard lavée ne donnent pas de résultats concluants, en ce qui concerne le pouvoir cryoprotecteur des sucres et des polyalcools, parce que d'une part l'indice des protéines se maintient à un niveau élevé et que d'autre part l'indice textuométrique baisse considérablement, et cela même avant l'entreposage congelé (tabl. 10). Lorsqu'elle n'est pas lavée, la pulpe de chinchard se conserve mieux que celle du lieu. En présence du sorbitol, du pyruvate ou du mélange sorbitol + pyruvate + EDTA, les indices textuométriques de la pulpe de chinchard non lavée n'ont pas diminué d'une manière significative (tabl. 11). Le cas de l'EDTA est très curieux. On se rappelle qu'à la concentration de 0,15 %, il exerce un grand pouvoir cryoprotecteur, dans les tests *in vitro* avec l'extrait des myofibrilles. Dans les essais avec la pulpe de poisson, l'EDTA à la concentration de 0,03 à 0,1 % n'a aucun effet, ou exerce plutôt un effet dénaturant. Dans les combinaisons binaires, l'EDTA tend à diminuer le pouvoir cryoprotecteur du sorbitol et du pyruvate. Cependant, en présence du sorbitol et du pyruvate, la présence de l'EDTA semble augmenter l'effet cryoprotecteur du mélange. En fait, là où elle est essayée, la combinaison pyruvate + sorbitol + EDTA donne toujours les meilleurs résultats en ce qui concerne l'indice textuométrique, pour chaque type de pulpe. Ceci est vrai aussi lorsque l'EDTA est ajouté au lavage de la pulpe.

## Conclusion.

D'une manière générale, les résultats de ce travail confirment la fragilité de la pulpe de poisson, mais il est évident que celle du lieu noir est plus vulnérable que celle du chinchard. Cela tient probablement à la fois aux caractéristiques de l'espèce et au fait que dans le cas du lieu, il s'agit de la pulpe récupérée à partir de résidus, qui ont été exposés à l'air et à l'eau à des températures bien supérieures à 0° C. Sauf dans le cas du lieu non gratté, le lavage exerce un effet négatif sur la texture de la pulpe. Cet effet peut s'expliquer: 1° par la perte des solutés naturels de la chair qui auraient agi normalement comme cryoprotecteurs; 2° par l'exposition de la pulpe à des températures défavorables (supérieures à 15° C); 3° par la contamination possible de la pulpe par des métaux lourds contenus dans l'eau de lavage. Si on ajoute d'autres inconvénients tels que la perte de goût, de valeur nutritive, de rendement, la pollution de l'eau, le coût supplémentaire de l'opération, etc., le lavage de la pulpe ne semble pas se justifier.

Ces essais montrent que les sucres et les polyalcools, y compris les maltodextrines, possèdent un pouvoir cryoprotecteur certain. La concentration utilisée dans ces expériences (3 %) ne peut retarder la dénaturation complète des protéines, dans le cas du lieu, que de quelques semaines parfois moins. Des taux d'utilisation allant jusqu'à 10 % pour les maltodextrines et les sirops de glucose devraient être envisagés dans les essais futurs. Il serait aussi intéressant de vérifier l'efficacité des combinaisons de maltodextrines avec d'autres additifs, tels les phosphates, les citrates, le chlorure de sodium, etc. De telles combinaisons auront de fortes chances d'offrir le maximum d'effet cryoprotecteur avec un minimum de goût sucré.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le cadre du programme d'échange de fonctionnaires entre la France et le Québec. L'un des auteurs a séjourné à l'I.S.T.P.M. pendant l'année 1981.

*Manuscrit remis le 5 août 1982.*

ANNEXE

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE, DE L'ÉNERGIE D'ACTIVATION, DE L'ORDRE DE LA RÉACTION, DU VOLUME MOLAL MOYEN DES SOLUTÉS ET DE L'OSMOLALITÉ DU MILIEU RÉACTIONNEL SUR LA VITESSE DE RÉACTION DANS LE SYSTÈME CONGELÉ.

Considérons la réaction d'ordre  $n = x + y + z + \dots$   
 $x\text{A} + y\text{B} + z\text{C} + \dots \rightarrow \text{P} + \dots$

Le taux initial ( $t = 0$ ) de formation du produit P à 273° K est :

$$\left( \frac{dP}{dt} \right)_{t=0} = V \frac{d(P)}{dt} = V \cdot k \cdot (A)^x \cdot (B)^y \cdot (C)^z \dots$$

V : volume du milieu réactionnel à 273° K. Lors de la congélation à  $T < 273^\circ \text{K}$  tous les réactifs se retrouvent dans le volume  $V'$  de la phase liquide résiduelle.

Le taux initial de formation du produit devient :

$$\left( \frac{dP'}{dt} \right)_{t=0} = V' \frac{d(P')}{dt} = V' \cdot k' \cdot (A')^x \cdot (B')^y \cdot (C')^z \dots$$

le rapport  $r$  entre les deux taux de réaction est donc :

$$r = \frac{\left( \frac{dP'}{dt} \right)_{t=0}}{\left( \frac{dP}{dt} \right)_{t=0}} = \frac{V'}{V} \cdot \frac{k'}{k} \cdot \frac{(A')^x}{(A)^x} \cdot \frac{(B')^y}{(B)^y} \cdot \frac{(C')^z}{(C)^z} \dots$$

$$\text{or, } \frac{V}{V'} = \frac{(A')}{(A)} = \frac{(B')}{(B)} = \frac{(C')}{(C)} = \dots$$

$$\text{d'où, } r = \frac{k'}{k} \cdot \left[ \frac{V}{V'} \right]^{x+y+z+\dots-1} = \frac{k'}{k} \cdot \left( \frac{V}{V'} \right)^{n-1}$$

Selon Arrhenius,  $\frac{k}{k'}$  est relié à l'énergie d'activation  $\Delta \text{Ha}$  selon :

$$\frac{k'}{k} = e^{-\frac{\Delta \text{Ha} (273 - T)}{273 RT}} \approx e^{-\frac{\Delta \text{Ha} (273 - T)}{15\,000}}$$

$$\text{ou } \frac{k'}{k} = Q_{10}^{-\frac{273 - T}{10}}$$

$Q_{10}$  étant le coefficient de température de la réaction ( $Q_{10} = e^{\frac{\Delta \text{Ha}}{15\,000}}$ ).

D'autre part, on peut exprimer le rapport  $\frac{V}{V'}$  en fonction des concentrations osmolales  $M_0$  du système non congelé, et  $m$  du système congelé et du volume molal moyen  $\bar{\omega}_s$  des solutés comme suit :

$$\frac{V}{V'} = \frac{m}{M_0} \cdot \frac{1 + \bar{\omega}_s M_0 \cdot 10^{-3}}{1 + \bar{\omega}_s m \cdot 10^{-3}}$$

La concentration osmolale  $m$  s'obtient en combinant l'équation de Clausius-Clapeyron et la loi de Raoult ( $\Delta H_f$  étant la chaleur de fusion de l'eau) :

$$m = \frac{273 - T}{K_f} \quad \text{où } K_f = \frac{\Delta H_f}{1,987 \times 273 \times T + \Delta H_f} \times 1000 \approx 1,9$$

On obtient donc :

$$r = e^{-\frac{\Delta Ha (273 - T)}{273 RT}} \cdot \left[ \frac{273 - T}{K_f M_0} \cdot \frac{1 + \bar{\omega}_s M_0 \cdot 10^{-3}}{1 + \bar{\omega}_s \frac{(273 - T)}{K_f} \cdot 10^{-3}} \right]^{n-1}$$

$$\text{comme : } \frac{1 + \bar{\omega}_s M_0 \cdot 10^{-3}}{1 + \bar{\omega}_s m \cdot 10^{-3}} \approx 1$$

$$r \approx Q_{10}^{-\frac{273 - T}{10}} \cdot \left[ \frac{273 - T}{1,9 M_0} \right]^{n-1}$$

Ainsi simplifiée, la fonction  $r$  possède un maximum à la température  $T_M$  telle que :

$$T_M = 273 - \frac{10 (n - 1)}{\text{Log } Q_{10}} = 273 - \frac{1,5 \times 10 (n - 1)}{\Delta Ha}$$

Par exemple, pour  $n = 2$  et  $\Delta Ha = 15\,000$  calories/mole,  $T_M = 263^\circ \text{K}$ .

#### BIBLIOGRAPHIE

- AMANO (K.) et YAMADA (K.), 1965. — The biological formation of formaldéhyde in codflesh. — The technology of fish utilization. — London : Fishing News Books, 73-78.
- ANDERSON (M.L.) et RAVESI (E.M.), 1970. — On the nature of the association of protein in frozen stored cod muscle. — *J. Food. Sci.*, 35 : 551-558.
- BUTTKUS (H.), 1967. — The reaction of myosin with malonaldehyde. *J. Food Sci.*, 42 : 432-434.
- 1970. — Accelerate denaturation of myosin in frozen solution. — *Ibid.*, 35 : 558-562.
- 1974. — On the nature of the chemical and physical bonds which contribute to some structural properties of protein foods : A hypothesis. — *Ibid.*, 39 : 484-489.
- CHIO (K.S.) et TAPPEL (A.L.), 1969. — Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. — *Biochemistry*, 8 : 2821-2827.
- CHU (G.H.) et STERLING (C.), 1970. — Parameters of texture changes in processed fish : Myosin denaturation. — *J. Text. Studies*, 1 : 214.
- CONNELL (J.J.), 1957. — Some aspects of the texture of dehydrated fish. — *J. Sci. Food. Agri.*, 8 : 526-537.
- 1959. — Aggregation of cod myosin during frozen storage. — *Nature*, 183 : 664-665.
- 1968. — In : Low temperature Biology of foodstuff. — Ed. J. Hawthorn and E.J. Roffe. Oxford. Pergamon Press : 333-358.
- DENG (J.C.) et TOMASZEWSKI (F.B.), 1979. — The use of reponse surface methodology to determine the effects of salt, tripolyphosphate and sodium alginate on the quality of fish patties prepared from minced fish, croaker. — *Advances in fish science and technology*. — London : Fishing News Books, 218-223.
- DUERR (J.P.) et DYER (W.J.), 1952. — Proteins in fish muscle. IV. Denaturation by salt. — *J. Fish. Res. Bd Canada*, 8 : 325-331.

- DYER (W.J.) et FRASER (D.I.), 1959. — Proteins in fish muscle. XIII. Lipid hydrolysis. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 16 : 43-52.
- GRONINGER (H.S.), 1973. — Preparation and properties of succinylated fish myofibrillar protein. — *J. Agri. Food Chem.*, 21 : 978-981.
- HAMM (R.), 1960. — Biochemistry of meat hydration. — *Adv. Food Res.*, 10 : 355-463.
- 1971. — In Symposium: phosphates in food processing. *AVI Publ.*, Westport, Conn., J.M. de Man and P. Melny chyn eds ; 65-82.
- JARENBACK (K.L.) et LILJEMARK (A.), 1975. — Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua*). II. Effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxides on myofibrillar proteins. — *J. Food Technol.*, 10 : 437-452.
- KHAN (A.W.), 1966. — *Cryobiology*, 13 : 224.
- KING (F.J.), ANDERSON (M.L.) et STEINBERG (M.A.), 1962. — Reaction of cod actomyosin with linoleic and linolenic acid. — *J. Food Sci.*, 27 : 363-366.
- KWON (T.W.), MENZEL (D.B.) et OLCOTT (H.S.), 1965. Reactivity of malonaldehyde with food constituents. — *J. Food Sci.*, 30 : 808-813.
- LAWRIE (R.A.), 1968. — Chemical changes in meat due to processing: a review. — *J. Sci. Food Agri.*, 19 : 223-240.
- LEWIN (S.), 1974. — Displacement of water and its control of biochemical reactions. — London, Academic Press.
- LINDELOV (F.), 1976. — Reactions in frozen foods. IIR Meeting of Comissons C2, D1, D2, D3, E1 Melbourne : 181-188.
- LONG (R.A.K.), 1955. — Some thermodynamic properties of fish and their effect on the rate of freezing. — *J. Sci. Food Agri.*, 6 : 621-633.
- LOVE (R.M.), 1958. — Studies on the north sea cod. I. Muscle cell dimensions. — *J. Sci. Food Agri.*, 9 : 195-198.
- 1966. — In: *Cryobiology*. Meryman H.T. ed. — New York: Academic Press, 317-405.
- LOVELOCK (J.E.), 1954. — The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. — *Biochem. J.*, 56 : 265-270.
- LUONG (C.P.), 1976. — Inhibitory effect of ketoacids on muscle protein denaturation. — Thesis Mc GILL University-Montréal.
- MAHON (J.M.), 1962. — « Preservation of fish ». — U.S. Patent, 3.036.926.
- MANOHAR (S.V.), RIGBY (D.L.) et DUGAL (L.C.), 1973. — Effect of sodium tripolyphosphate on thaw drip and taste of fillets of some freshwater fish. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 30 : 685-688.
- MATSUMOTO (J.), 1979. — Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. In: Behaviour of proteins at low temperature. — Ed. O. FENNEMA. Advances in chemistry series, American chemical society, Washington D.C.
- MAZUR (P.), FARRANT (J.), LEIBO (S.P.) et CHU (E.H.Y.), 1969. — Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing. Interactions between protective solutes and cooling and warming rates. — *Cryobiology*, 6 : 1-9.
- MAZUR (P.), 1970. — *Cryobiology: the freezing of biological systems*. — *Science*, 168 : 939-949.
- NARAYAN (K.A.) et KUMEROV (F.A.), 1958. — *J. am. Oil Chem. Soc.*, 35 : 52.
- NECIBI (M.), 1982. — Essais d'utilisation des cryoprotecteurs: Application au hachis de poisson. Mémoire de fin d'études de spécialisation (halieutique). — I.N.A. Tunis et I.S.T.P.M. février 1982.
- NOGUCHI (S.) et MATSUMOTO (J.), 1970. — Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during the frozen storage. I. Preventive effect of Na-glutamate. — *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36 : 1078-1087.
- 1971. — Studies on the control of denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. II. Preventive effect of amino acids and related compounds. — *Ibid.*, 37 : 1115-1122.
- 1975 a. — Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during the frozen storage. III. Preventive effect of some amino acids, peptides, acetylamino acids and sulphur compounds. — *Ibid.*, 41 : 243-249.
- 1975 b. — Studies on the control of the denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. IV. Preventive effect of carboxylic acids. — *Ibid.*, 41 : 329-335.
- NOGUCHI (S.), OOSAWA (K.) et MATSUMOTO (J.), 1975. — Studies on the control of denaturation on fish muscle proteins during frozen storage. V. Technological application of cryoprotective substances on frozen minced fish meat. — *Ibid.*, 41 : 779-786.
- 1976. — Studies on the control of denaturation on fish muscle proteins during frozen storage. VI. Preventive effect of carbohydrates. — *Ibid.*, 42 : 77-82.
- POLGE (C.), SMITH (A.U.) et PARKES (A.S.), 1949. — Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. — *Nature*, 164 : 666.
- POWERIE (W.D.), 1973. — Low temperature preservation of food and living matter. — New York: Dekker, p. 210.
- RODGER (G.), WEDDLE (R.B.) et CRAIG (P.), 1979. — Effect of time, temperature, raw material type, processing and use of cryoprotective agents on mince quality. — Advances in fish science and technology. — London: Fishing News Books, 199-217.

- SIKORSKI (Z.E.), 1978. — Protein changes in muscle foods due to freezing and frozen storage. — *Inter. J. Refrig.*, 1: 173-180.
- SIKORSKI (Z.E.), OLLEY (J.) et KOTUCH (S.), 1976. — Protein changes in frozen fish. — *Critical reviews in food science and nutrition*, 8: 97-129.
- SNOW (J.M.), 1950. — Proteins in fish muscle. III. Denaturation of myosin by freezing. — *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 7: 599-607.
- SOLDAN (F.), 1959. — Le microdosage du formol dans les produits marins. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 23: 203-210.
- 1961. — Le formol dans els produits marins. Influence du traitement par l'anhydride sulfureux. — *Ibid.*, 25: 407-412.
- SOLDAN (F.), ANQUEZ (M.) et BENEZIT (A.), 1965. — La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques. — Paris: Ballières et fils.
- STOREY (R.M.), 1979. — Modes of dehydration of frozen fish flesh. — *Advances in fish science and technology*. — London: Fishing News Books, 498-502.
- SVENSSON (S.), 1979. — Stabilization of fish mince from gadoid species by pre-treatment of the fish. — *Ibid.*, 226-232.
- TAKAMA (K.), ZAMA (K.) et IGARASHI (H.), 1972. — Changes in the flesh lipids of fish during frozen storage. III. Relation between rancidity in fish flesh and protein extractibility. — *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38: 607-612.
- TOKUNAGA (T.), 1964. — Studies on the developement of dimethylamine and formaldehyde in Alaska pollock muscle during frozen storage. — *Bull. Hokkaido Reg. Fish. Res. Lab.*, 29: 108-122.
- 1970. — Trimethylamine oxide and its decomposition in the bloody muscle of fish. I. TMAO, TMA and DMA contents in ordinary and bloody muscles. — *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36: 502-509.
- TRAN (V.D.), 1974. — L'effet préventif de l'acide pyruvique et d'autres acides acétoniques sur la dénaturation des protéines dans le poisson congelé. — *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.*, 7: 203-208.
- 1975. — Solubilization of cod myofibrillar proteins at low ionic strength by sodium pyruvate during frozen storage. — *J. Fish. Res. Bd Canada*, 32: 1629-1632.
- TSUCHIYA (Y.), TSUCHIYA (T.) et MATSUMOTO (J.J.), 1979. — The nature of the cross-bridges constituting aggregates of frozen stored carp myosin and actomyosin. — *Advances in fish science and technology*. — London: Fishing News Books, 434-438.
- WEINER (P.D.), PEARSON (A.M.) et SCHWEIGERT (B.S.), 1969. — Turbidity, viscosity and ATP ase activity of fibrillar protein extracts of rabbit muscle. — *J. Food Sci.*, 34: 303-305.
- YASUI (T.), SAKANICHI (M.) et HASHIMOTO (Y.), 1964. — Effect of inorganic polyphosphates on the solubility and extraction of myosin B. — *J. Agri. Food Chem.*, 12: 392-399.