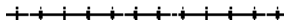


UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



ECOLE INTER - ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES
(E.I.S.M.V.)



ANNEE 2007

N° 23

**Contribution à l'étude de la valorisation des protéines
d'hydrolysats obtenues par hydrolyse enzymatique des
co-produits (tête, viscères) de la Sole tropicale (*Cynoglossus
senegalensis*) au Sénégal**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 06 juillet 2007 devant la faculté de
Médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie de Dakar pour obtenir le
grade de

DOCTEUR VETERINAIRE (DIPLÔME D'ETAT)

Par

Rose Eliane PENDA

Née le 03 décembre 1980 à Yaoundé (CAMEROUN)

Jury

Président :

M. Niama DIOP SALL

Professeur à la Faculté de Médecine, de
Pharmacie et d'Odonto – Stomatologie de Dakar

**Directeur et Rapporteur
de Thèse :**

M. Malang SEYDI

Professeur à l'EISMV de Dakar

Membres :

M. Germain Jérôme SAWADOGO

Professeur à l'EISMV de Dakar

M. Serge Niangoran BAKOU

Maître de Conférence Agrégé à l'EISMV de Dakar

Co-Directeurs de thèse :

Serigne khalifa Babacar Sylla

Attaché de recherches à l'E.I.S.M.V de Dakar

Bellancille Musabyemariya

Assistante à l'E.I.S.M.V de Dakar

DEDICACES

Je dédie ce travail

A **Dieu tout puissant**, le créateur et le pourvoyeur de toutes choses et de toutes œuvres humaines.

A mes **parents** PENDA Apollinaire et SAMI Marie qui m'ont donné la vie, l'amour, et la joie de vivre. Trouvez ici toute mon affection et mon respect pour l'éducation que vous m'avez donné. L'amour du travail, le sacrifice de soi et la persévérance quelque soit les épreuves et les embûches. Que ce travail soit une fierté pour vous

A **mes frères** : Penda Hervé ; Penda Elysé ; Penda apollinaireII et mon bébé Penda René et **mes sœurs** Essomba Daniel ; Tchamba Martial et Penda Christine qui m'ont encouragés et soutenus.

A **mon neveu** mon petit hamed

A **mes feu grands parents** : Yonkeu Charles et Nkou Christine je sais que de là haut vous veillez sur moi. Reposez en paix. Que DIEU ait pitié de vos âmes

A **mes grands parents** LITOUKE Léon et Ngo Penda Rose . Merci pour vos conseils et votre amour.

A mes **oncles**, mes **tantes**, mes **cousins** et mes **cousines**

A la **famille BILLONG EDIMA** vous m'avez prise comme votre fille. Je n'oublierais jamais votre gratitude et votre affection. Que la paix et la prospérité habitent toujours dans votre maison.

A la **famille NGOTTE**, je béni DIEU de vous avoir connu, je ne saurais vous remercier a travers les mots.

A mon Beau frère **Hubert Toudic** merci pour les sacrifices faits pour moi.

A **Siriël, Gaele, Eva, Elisabeth, Fabien, Junior, Natou, Wawa, Denis**. Nous avons passé de très bon moment à Dakar merci pour votre amitié.

A **M'sik Dounia** et **Andela Abessolo** votre amitié et votre soutien pendant ces 6 dernières années resteront à jamais dans ma mémoire. Merci pour votre affection.

A **Naomie Kenmogne**, malgré les épreuves notre amitié est resté intacte a travers se travail je te témoigne toute mon affection.

A **Moundjoa Christian**

A **Stella Abessolo, Sandrine Tene, Rachel Bend, Christelle Bobda, Doris Sadi, Mme Ichakou, Hermine Kwin, Nathalie, Laeticia, Sabine, Bouba**

A mes camarades

Salifou, Arouna, Hellow, Jean-Marc, Serge Mpouam, Ndam, kamanzi, Shyaka, Walbadet, Yapi, Doumbou, Mosus, zombou, Tcheuffo, Moctar

Natacha, Carine, Viviane

A mes proches relations et amis de Dakar et d'ailleurs, et à tous ceux que je ne saurais citer, car la liste est exhaustive, mais que je porte dans mon cœur.

A la CAVESTAS et à l'AEVD

A la promotion **SAMBA SIDIBE** (34^e promotion)

Au Cameroun ma chère patrie

Au Sénégal mon pays hôte

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer notre immense gratitude à l'endroit de tout ceux qui ont œuvrés de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail :

Professeurs Malang Seydi

Docteurs : K.S.B Sylla, Bellancille Musabemarya, Alain kamga Waladjo, Serge Bakou, Babacar Sene

Tout le personnel du service d'HIDAOA

Tout le personnel de l'EISMV de Dakar

Madame DIOUF de la bibliothèque de l'EISMV de Dakar

Tout le personnel du mini resto

A Clara Gregoire, Dr Gilles Hakou, Dr Ngoni Patrick, Samuel Zoumbou, Kassé Ndongu, Dr Ekoga Mve Daniel, Chancellin, Dr woukou Christian, Tcheuffo

Ma très chère patrie le Cameroun et le Sénégal mon pays d'accueil

Tous ceux que nous n'avons pas cités, et qui de près ou de loin ont rendu ce travail possible.

A tous, veuillez recevoir l'expression de notre profonde gratitude.

HOMMAGES A NOS MAITRES ET JUGES

A notre président de jury, Monsieur Niama Diop SALL, Professeur à la Faculté de Médecine, de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar. Vous nous faites l'insigne honneur, malgré vos multiples occupations de présider ce jury. Votre abord facile et la spontanéité avec laquelle vous avez répondu à notre sollicitation nous ont beaucoup marqué. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde et sincère gratitude.

A notre Directeur et Rapporteur de Thèse, Monsieur Malang SEYDI Professeur à l'EISMV de Dakar. Vous avez accepté d'encadrer et de diriger ce travail avec rigueur scientifique et pragmatisme. Nous avons été fasciné par votre abord facile et votre simplicité. Vos qualités scientifiques et humaines nous ont profondément marqué. Trouver ici l'assurance de notre profonde gratitude.

A notre Maître et Juge, Monsieur Germain Jérôme SAWADO Professeur à l'EISMV de Dakar. Nous sommes très sensible à l'honneur que vous faites en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Vous nous avez apporté une preuve supplémentaire de ce que nous pensons de vous. Vos qualités intellectuelles et humaines forcent respect et admiration. Trouvez ici l'assurance de notre profonde gratitude.

A notre Maître et Juge, Monsieur Serge Niangoran BAKOU Maître de conférences agrégé à l'EISMV de Dakar, vous nous faites un grand honneur de juger ce modeste travail. Vos qualités scientifiques, votre grand dynamisme et votre abnégation devant le travail suscite chaque jour l'admiration des étudiants et le respect de vos pairs. Veuillez recevoir maître nos sincères remerciements et profondes considérations. Vous êtes un model pour nous.

A mes Co-Directeurs de Thèse monsieur Khalifa Babacar Sérigne SYLLA et Madame Béllancille MUSABEYEMARIYA, Assistants à l'EISMV de Dakar. Ce travail est aussi le vôtre. Trouvez ainsi les assurances de notre sincère reconnaissance.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Nomenclature de la sole tropicale

Tableau II : classification systématique de la sole tropicale

Tableau III : Les 20 acides aminés

Tableau IV : Groupe d'aliments protéiques (IFN, 1997)

Tableau V : Principales activités biologiques des protéines de poisson

Tableau VI : Classification des protéases.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : carte des villages côtiers de pêche de la république du Sénégal
(source : direction des pêche maritimes, 2003)
- Figure 2** : *Cynoglossus senegalensis* (d'après SERET et OPIC, 1986)
- Figure 3** : Les principaux co-produits de *Cynoglossus senegalensis*
- Figure 4** : les produits dérivés des co-produits de la sole tropicale
- Figure 5** : Proportions des différentes voies de valorisation des co-produits
d'origine marine (ANDRIEUX, 2004).
- Figure 6**: Schéma réactionnel de la libération de protons H⁺ lors de l'hydrolyse
enzymatique
- Figure 7** : Influence de la température sur la réaction enzymatique
(CUVELLIER, 1999)
- Figure 8** : Variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du pH
(CUVELLIER, 1999).
- Figure 9** : Poids des deux parties obtenues après hydrolyse
- Figure 10** : Pourcentages de culot et de surnageant dans l'hydrolysate
- Figure 11** : Distribution de l'eau et de la matière sèche dans le culot
- Figure 12** : distribution de l'eau et de la matière sèche dans le surnageant
- Figure 13** : courbes des protéines du surnageant et du culot

LISTE DES ABREVIATIONS

DPM	: Direction des Pêches Maritimes
AA	: Acides Aminés
AAI	: Acide Aminés Indispensables
IFN	: Institut Français de Normalisation
EC	: Enzyme Classification
ATP	: Adénosine Triphosphate
pH	: Potentiel Hydrogène
°C	: Degré Celsius
FAO	: Food Agricultural Organisation
EISMV	: Ecole Inter-Etat des Sciences et Médecine Vétérinaires
HIDAOA	: Hygiène des Industries des Denrées Alimentaires d'Origine Animale
IFREMER	: Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer
INRA	: Institut Nationale de Recherche Agricole

LISTES DES PHOTOS

- Photo1** : tête et viscères de la sole tropicale
- Photo 2** : boîte contenant l'enzyme Protamex
- Photo 3** : Thermo-pH metre portable (HANNA instruments)
- Photo 4** : centrifugeuse
- Photo 5** : Bain marie pour l'inactivation de l'enzyme
- Photo 6** : Dispositif d'hydrolyse installé au laboratoire
- Photo 7** : hydrolysats dans les tubes Falcon

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE 1 : Généralités sur la pêche au Sénégal	5
1.1. Environnement naturel	5
1.2. Historique de la pêche au Sénégal	5
1.3. La production et les quantités débarquées	8
1.4. Contribution économique de la pêche.....	8
CHAPITRE 2: Etude de la sole tropicale : <i>Cynoglossus senegalensis</i>	9
2.1. Nomenclature	9
2.2. Classification systématique	9
2.3. Caractéristiques morphologiques	9
2.3.1. Caractéristiques générales des cynoglossidae	9
2.3.2. Caractéristiques de <i>Cynoglossus senegalensis</i>	10
2.4. Répartition géographique	10
CHAPITRE 3 : Les Co-produits de poisson : valorisation et utilisation	12
3.1. Définition et composition.....	12
3.2. Valorisation des co-produits : les produits dérivés	12
3.3. Les hydrolysats de poisson.....	15
3.3.1. Définition.....	15
3.3.2. Les avantages	15
3.3.3. Quelques intérêts des hydrolysats de poisson	16
3.3.3.1. En alimentation animale.....	16
3.3.3.2. Intérêts fonctionnels	17
3.4. Production de composés de haute valeur ajoutée : Les peptides	17

3.4.1. Généralités sur les protéines.....	17
3.4.1.1. Les différentes sources alimentaires et quelques fonctions des protéines .	19
3.4.1.2. Les protéines de poisson	20
3.4.1.2.1. La fraction myogène soluble	21
3.4.1.2.2. La fraction myofibrillaire	21
3.4.2. Les peptides	21
3.4.2.1. Les Sources azotées	21
3.4.2.2. Intérêts nutritionnelles des peptides	23
3.4.2.3. Activités biologiques des peptides	24
CHAPITRE 4 : ENZYMES ET HYDROLYSE ENZYMATIQUE	25
4.1. Les enzymes	25
4.1.1. Définition et propriétés.....	25
4.1.2. Nomenclature et classification	26
4.1.2.1. Nomenclature et classification fonctionnelle	26
4.1.2.2. Nomenclature et classification officielle	26
4.1.3. Les principales classes d'enzymes	28
4.2. L'hydrolyse enzymatique.....	29
4.2.1. Définition et principe	29
4.2.2. Pourquoi suivre l'évolution de l'hydrolyse	30
4.2.3. Les paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique.....	30
4.2.3.1. Influence de la température	31
4.2.3.2. Influence du pH.....	32
4.2.3.3. Effets des substances activatrices ou inhibitrices	33
Conclusion partielle.....	34

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE – DISCUSSION ET RECOMMANDATION

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES	36
1.1. Matériel	36
1.1.1. Matériel biologique	36
1.1.1.1. Préparation des co-produits de la sole tropicale.....	36
1.1.1.2. Constitution des lots	37
1.1.2. Matériel enzymatique	37
1.1.3. Matériel technique	38
1.1.3.1. Materiel de prélèvement.....	38
1.1.3.2. Matériel de laboratoire	38
1.2. Méthodes	39
1.2.1. Hydrolyse enzymatique.....	39
1.2.1.1. Suivi de la cinétique des hydrolyses.....	40
1.2.1.2. Hydrolyse courte durée	41
1.2.2. Filtration	41
1.2.3. Centrifugation	41
1.2.4. La matière sèche	42
1.3. Analyses biochimiques.....	42
1.3.1. Détermination de la teneur en eau.....	42
1.3.2. Dosage des protéines totales	43
1.3.2.1. Principe.....	43
1.3.2.2. Mode opératoire	43
1.3.2.3. Expression des résultats	44
CHAPITRE 2 : RESULTATS	45
2.1. Suivi de la cinétique de l’hydrolyse	45
2.2. Poids des hydrolysats et des arêtes.....	45

2. 3. Poids du culot et du surnageant.....	46
2.4. Poids matière sèche et poids en eau du culot et du surnageant	47
2.5. Les protéines du surnageant et du culot	48
CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS	49
3.1. Discussion	49
3.1.1. Discussion des résultats.....	49
3.1.1.1. La matière sèche	49
3.1.1.3. Les protéines.....	49
3.1.2. Discussion sur le matériel et les méthodes	50
3.1.2.1. L'hydrolyse enzymatique	50
3.1.2.2. La matière sèche	51
3.1.2.3. Le dosage des protéines.....	51
3.2. Recommandations	54
CONCLUSION GENERALE	56
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	58

INTRODUCTION

Les océans constituent une richesse alimentaire très diversifiée (poissons, algues, crustacés, coquillages, mollusques). Selon la FAO, plus de 130 millions de tonnes de poissons sont actuellement pêchés ou élevés chaque année dans le monde.

Les produits de la mer peuvent être consommés frais, congelés, séchés ou encore transformés. La politique environnementale actuelle incite de plus en plus les industriels à prendre en compte les déchets générés par tous procédés de transformation des poissons. C'est pourquoi, après l'exploitation des parties nobles des poissons, des chercheurs se sont intéressés aux co-produits. Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production.

Comme le montre le diagramme 1, la production de filet de la sole tropicale, est à l'origine de plusieurs sources de co-produits solides : têtes, viscères, carcasse et peaux. En effet, des études ont révélé que les co-produits de poissons sont particulièrement riches en molécules d'intérêt notamment, les protéines. Un des outils pour la récupération efficace des protéines des co-produits est l'hydrolyse enzymatique, elle est appliquée pour améliorer les propriétés fonctionnelles et alimentaires des protéines. Le but principal de l'hydrolyse des co-produits de poissons est d'obtenir le rétablissement possible et maximum de tous les composants valables tout en maintenant leurs qualités. Ainsi, le potentiel du procédé d'hydrolyse enzymatique contrôlée sur les co-produits (têtes, viscères) de la sole tropicale issus de la chaîne de transformation de la sole tropicale en filet de poisson va être étudié durant ce travail.



Diagramme 1 : Principales étapes de transformation de la sole tropicale en filet

Le but de ce travail est la libération et le dosage des protéines des co-produits de la sole tropicale. De cet objectif général, découle les objectifs spécifiques suivants :

- Hydrolyser les co-produits (têtes, viscères) à l'aide d'une protéase ;
- Séparer la phase soluble (surnageant) de la phase insoluble (culot) par centrifugation ;
- Obtenir la matière sèche de ces deux phases ;
- Doser les protéines totales à partir des matières sèches obtenues.

Pour répondre à ces objectifs, ce travail se déclinera en deux parties où des éléments de réponses apparaîtront. Une première partie portant sur l'étude bibliographique puis une deuxième partie présentant les analyses effectuées et les résultats obtenus. Faisant suite aux conclusions, des perspectives seront émises pour la conduite de futurs travaux.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : Généralités sur la pêche au Sénégal

1.1. Environnement naturel

Au large des côtes Sénégalaises, situées à l'extrémité ouest du continent africain se heurte le courant marin des canaries venu du Nord et des courants dérivés du courant du Golfe de Guinée. Des upwellings (remontée d'eau froides, riches en sels nutritifs, le long de la pente du plateau continental) remontent également de la couche d'eau profonde le long de la pente du plateau continental. La température de l'eau de mer en surface ne descend jamais en dessous de 15°C au cours de l'année. Les fleuves Sénégal, Gambie et Casamance se jettent dans l'océan atlantique et apportent des sels minéraux pendant l'hivernage. De plus, du sable riche en sels inorganiques est apporté du désert du Sahara par les vents. Le riche environnement naturel précité augmente la productivité de la mer, et crée les pêcheries classées parmi les plus riches d'Afrique. Des vents violents, qui soufflent au passage de l'hivernage à la saison sèche et au passage de la saison sèche à l'hivernage, rendent souvent la mer agitée, mais en général la zone maritime est calme, ce qui permet à la population de profiter en toute sécurité des bienfaits de la mer. (DPM ; CRODT, 2006)

1.2. Historique de la pêche au Sénégal

La pêche a pendant longtemps été une activité monopolisée par certaines ethnies :

- les Guet Ndariens de Saint-Louis, situé à l'embouchure du fleuve Sénégal
- les Lebous aux environs de Dakar
- les Nyominka vivant principalement au Saloum.

Ces ethnies ont utilisé des pêcheries côtières sur une longueur d'environ 2.000 km, allant des côtes de la Mauritanie au Nord à la côte de la Sierra Leone au Sud, en suivant le déplacement saisonnier des bancs de poissons. La pêche artisanale s'effectuait sur des pirogues avec pagaies ou de petites embarcations à

voile. Les captures étaient fournies aux habitants de l'intérieur du pays sous formes de produits fumés ou séchés. (DPM ; CRODT, 2006)

L'ancêtre de la pirogue sénégalaise remonterait au XVI^e siècle. Elle était constituée au départ d'un simple tronc évidé, propulsé à la pagaie. Vers le début du XVII^e siècle, on assiste à l'apparition de la voile. Les éperons faisant office de brise-lames et les bordes sont rajoutés au cours du siècle suivant. Enfin, le moteur hors-bord apparaît vers 1950.

On distingue deux saisons de production : une saison de faible capture de juin à octobre, où les volumes des produits diminuent et une saison de forte production, allant de novembre à juin. Les captures de la pêche artisanale sont principalement des espèces pélagiques, alors que les produits de la pêche industrielle sont des espèces benthiques.

Selon la direction des pêches maritimes (DPM, 1996) du ministère de l'économie maritime, en 1996, l'effectif de la flottille sénégalaise était le suivant : 11 600 pirogues, dont 9 300 motorisées (80%), 212 chalutiers, dont 60 chalutiers étrangers (28%), 6 sardiniers, dont 2 sardiniers étrangers (33%), 62 thoniers étrangers (97%). Les principales prises sont les petits pélagiques (sardinelles, chinchards, maquereaux) qui représentent 72% des prises. Le reste correspond à des espèces benthiques (crevettes, céphalopodes, rougets, dorades, soles...).

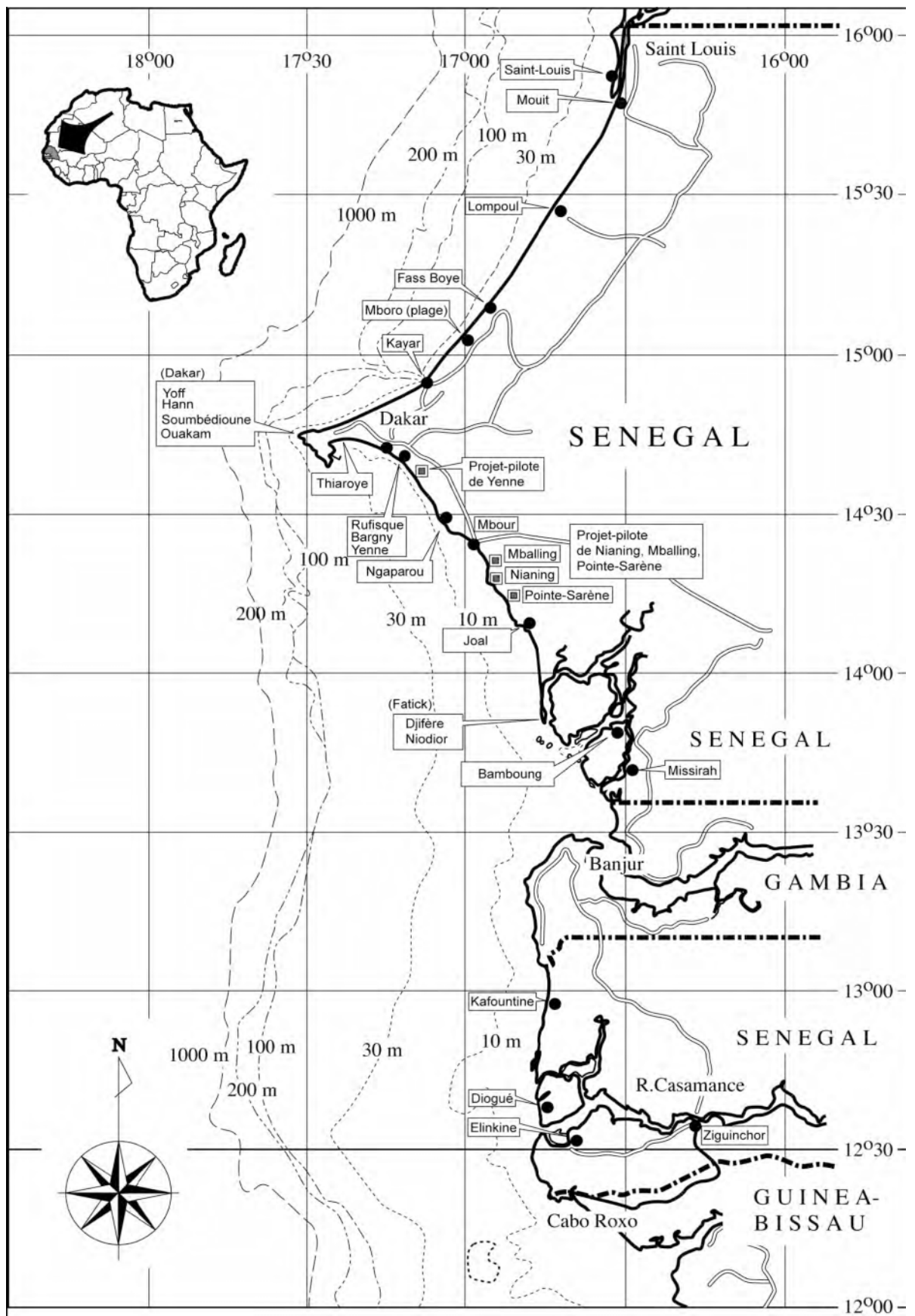


Figure1 : Carte des villages côtiers de pêche de la République du Sénégal (source : Direction des pêches maritimes 2003)

1.3. La production et les quantités débarquées

Depuis trois décennies, le secteur de la pêche a connu une forte croissance au Sénégal. Les captures ont été multipliées par huit en 32 ans. Les débarquements des flottilles sénégalaises et étrangères ont atteint en 1996 plus de 415 000 tonnes. En 1997, le volume débarqué est passé à 421 000 tonnes et en 1998 à 425 000 tonnes. Cette évolution étant principalement liée à l'augmentation des petits pélagiques mis à terre par la pêche artisanale.

(DPM, 2003)

1.4. Contribution économique de la pêche

Au Sénégal, la pêche maritime constitue un élément clé de l'économie, avec une production en valeur de 150 milliards de FCFA environ, soit 2% du PIB national et 16% du PIB du secteur primaire en 2003. Par ailleurs, la population active dans ce secteur est d'environ 600 000 personnes en comptant l'emploi direct et indirect, représentant environ 17% de la population active totale. Les exportations de produits halieutiques du pays étaient d'environ 2 milliards pour 130 000 tonnes en 2000, et même ultérieurement celles-ci continuaient de constituer la plus importante source d'acquisition de devises du pays. Ces exportations permettent actuellement de payer près de la moitié de la facture pétrolière.

(Ministère de l'économie et des finances direction de la démographie et des statistiques, 2005)

Grâce à leur disponibilité, les produits de la mer peuvent donc apparaître comme un apport nutritionnel très important : d'un point de vue alimentaire les produits halieutiques contribuent pour 60% à l'apport en protéine animales des populations. Au Sénégal, les produits de la pêche sont la principale source de protéines, couvrant 75% de leurs besoins. En 1997, la consommation moyenne annuelle de poisson au Sénégal, était de 26kg par habitant, pour une consommation mondiale de 13,5 kg par habitant **(NDOYE ET COLL., 2002)**

CHAPITRE 2: Etude de la sole tropicale : *Cynoglossus senegalensis*

2.1. Nomenclature

Tableau I : Nomenclature de la sole tropicale

Nom scientifique	Nom français	En vernaculaire (en wolof)	Nom F.A.O	Nom anglais
<i>Cynoglossus senegalensis</i>	Sole tropicale	Tapalé	Sole-langue Sénégalaise	tongue sole

(SERET, 1981).

2.2. Classification systématique

Cynoglossus senegalensis est classé comme indiqué dans le tableau ci-dessous

Tableau II : classification systématique de la sole tropicale

Classe	Ostéichtyens
Ordre	Pleuronectiformes
Famille	Cynoglossidae
Genre	<i>Cynoglossus</i>
Espèce	<i>senegalensis</i>

(SERET, 1981)

2.3. Caractéristiques morphologiques

2.3.1. Caractéristiques générales des cynoglossidae

Ce sont des poissons marins à corps plat, diminuant progressivement de largeur vers l'arrière. Les deux yeux, assez petits, sont situés sur le côté gauche. Le museau est arrondi. La bouche est petite infère plus au moins arquée. Le bord du pré-opercule n'est pas libre et est recouvert par la peau et des écailles. Il n'y a pas de rayons épineux à la dorsale et à l'anale. La dorsale débute en avant de l'œil dorsal. Les rayons de la dorsale et de l'anale sont confluent avec ceux de

la caudale qui se termine en pointe. Les nageoires pectorales sont absentes ou rudimentaires. Seule la pelvienne de la face oculée est présente ; elle est située sur la ligne médiane. Le corps est recouvert par des écailles cténoïdes ou cycloïdes. (SERET, 1981)

2.3.2. Caractéristiques de *Cynoglossus senegalensis*

Le corps est plat et allongé ; les nageoires dorsale et anale rejoignent la caudale qui se termine en pointe. Les yeux, situés sur le côté gauche du corps ont un espace assez large entre eux. Le museau est largement arrondi, le crochet rostral, plutôt court, s'étend jusqu'au niveau de la narine antérieure. La bouche s'étend au-delà de l'œil ventral. La nageoire dorsale compte 119-125 rayons, l'anale 93-99 rayons et la caudale 12 rayons. On compte 124-138 écailles tubulées le long de la ligne margino-dorsale. Une ligne latérale médiane est visible sur la face aveugle.

Sur la face oculée, le corps est plus ou moins uniformément brun plus ou moins foncé, avec des reflets verdâtres visibles sur le vivant ; la région de l'opercule est souvent noirâtre. La face aveugle est blanchâtre

(SERET, 1981)

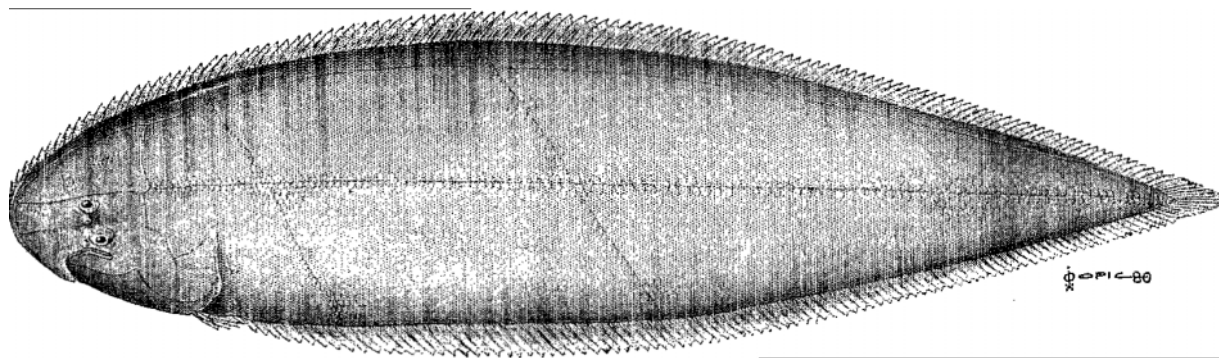


Figure 2 : *Cynoglossus senegalensis* (d'après SERET et OPIC, 1986)

2.4. Répartition géographique

Cynoglossus senegalensis est une espèce très côtière, par rapport aux autres espèces de la famille des cynoglossidae. Elle fréquente les zones sablo vaseuses côtières entre 10 et 110 mètres ; mais les prises maximales sont réalisées entre 5 et 15 mètres de profondeur. Elle est connue de la Mauritanie à l'Angola. Les répartitions bathymétriques de cette espèce, observées au Sénégal, Togo-Benin au Congo et au Cameroun sont similaires.

(SERET, 1981)

CHAPITRE 3 : Les Co-produits de poisson : définition, valorisation et utilisation

3.1. Définition et composition

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérable lors des opérations traditionnelles de production.

Les principaux co-produits de poisson rencontrés sont : la tête, la peau, les chutes de filetage, les arêtes centrales, les viscères, le foie et selon les périodes de pêche, les éléments reproducteurs tels que les œufs ou la laitance (figure3)

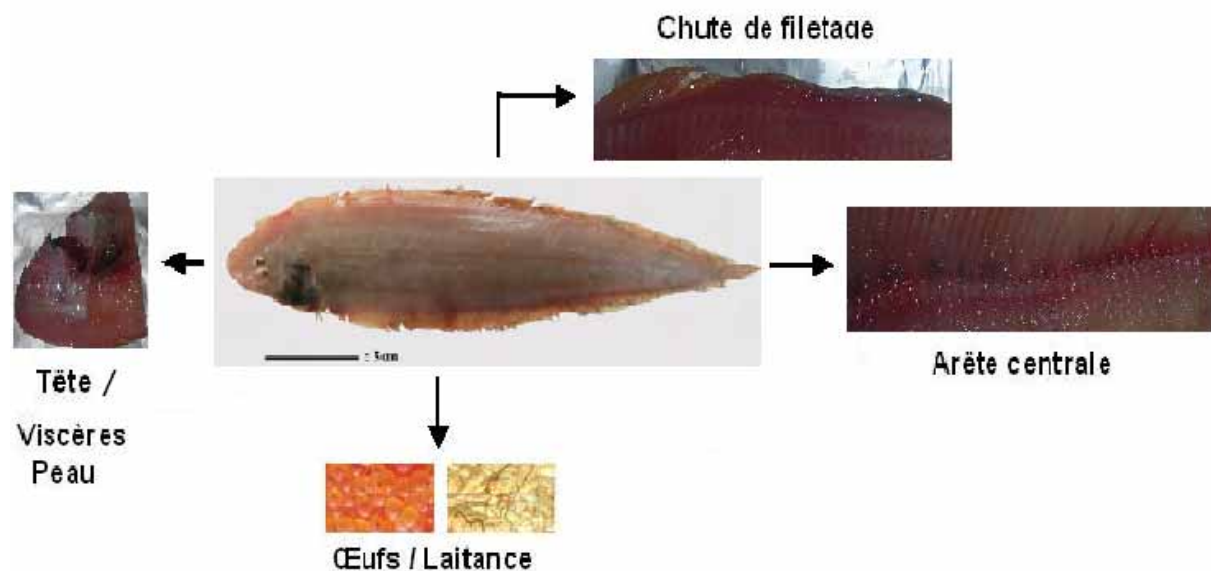


Figure 3 : Les principaux co-produits de *Cynoglossus senegalensis*

En vue d'une valorisation, les co-produits sont traités selon le même protocole de conservation que les parties destinées à la production alimentaire, garantissant ainsi leur absence d'altération.

3.2. les voies de valorisation des co-produits : les produits dérivés

Le produit dérivé est le produit commercial obtenu à partir d'un co-produit. Un co-produit pourra donner plusieurs produits dérivés (figure4). Ainsi,

- la tête de poisson pourra être valorisée en tant que farine de poisson, huile ou destinée à la nutrition
- la chair sur les arêtes en farine de poisson, la chair hachée et huile ;

- la peau en farine de poisson, collagène, gélatine, cuir ;
- les viscères en farine de poisson, huile, vitamines ;
- la carcasse en farine de poisson, collagène, gélatine, minéraux.

(GUERARD et Coll., 2004)

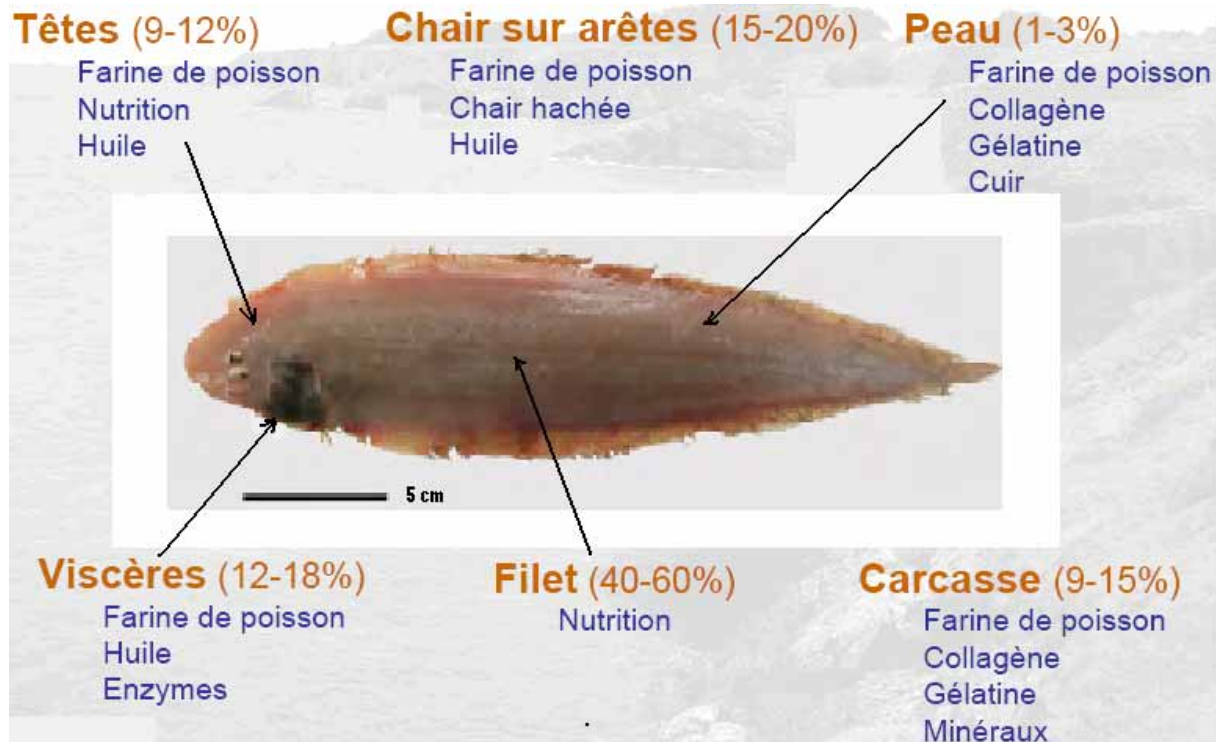


Figure 4 : les produits dérivés des co-produits de la sole tropicale

Ces produits sont qualifiés de produits dérivés et non de produits finis, car ils sont généralement commercialisés sous forme d'ingrédients, c'est-à-dire sous forme de produits intermédiaires pour la nutrition humaine, animale, pour la diététique, la cosmétique. Néanmoins, certains co-produits (foies, œufs) peuvent être vendus à l'état brut aux consommateurs. Mais cette tendance est faible et ils sont (foies, œufs) plus utilisés par les industries de conserverie et de saurisserie.

(ANDRIEUX, 2004)

On peut distinguer quatre (4) catégories de produits dérivés, en fonction de leur destination :

- l'utilisation en nutrition humaine ou en alimentation animale
- l'utilisation en diététique ou nutraceutique

- l'utilisation en cosmétique
- utilisation plus restreinte et spécifique d'un seul type de produit dérivé

Il existe plusieurs applications possibles des co-produits (figure5) parmi lesquelles on peut citer :

- **les farines et huiles de poisson**

Cette valorisation est actuellement la plus importante, car tous les co-produits peuvent être utilisés sans distinction. Aucun tri n'est nécessaire, seule la distinction co- produits issus de poissons sauvages ou d'élevage doit être faite.

- **les hachis**

Les co-produits sont broyés et filtrés, puis le hachi obtenu est congelé en bloc. Les co-produits viscères sont exclus de cette valorisation. Les hachis sont destinés à la fabrication d'aliments pour animaux domestiques essentiellement les chats. Ils sont souvent commercialisés sous forme congelée et sont une bonne source de protéines.

- **les hydrolysats** (cf. 3.3)

- **la production de composés de haute valeur ajoutée** (protides, lipides)

La production de farine et d'huile de poisson représente toujours en tonnage, la voie de valorisation la plus importante des co-produits de la pêche (figure 5). Mais la faible valeur ajoutée obtenue avec ces produits incite les industriels à rechercher des débouchés plus rentables : productions de sauces de poisson, d'aromes, de protéines musculaires (surimi), sont autant de valorisation alternative vers l'industrie agro-alimentaire. (**CHING, 1999**).

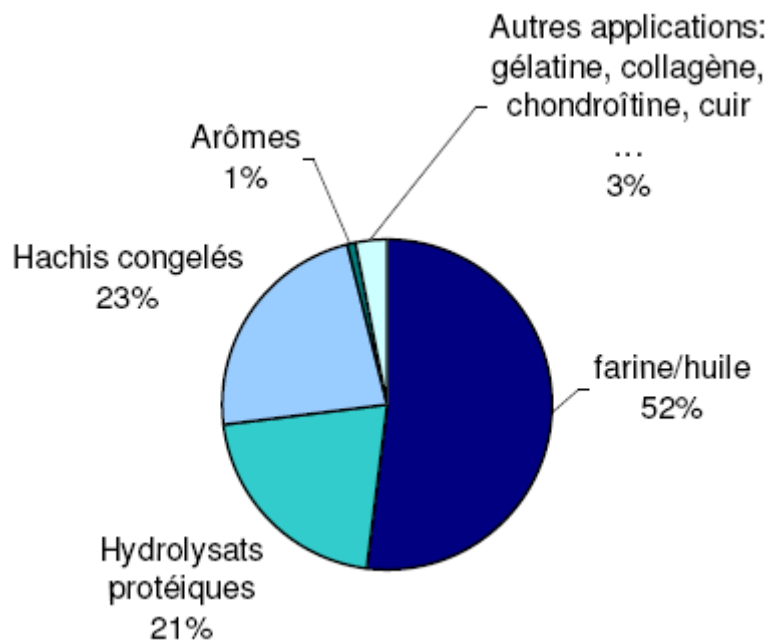


Figure 5 : Proportions des différentes voies de valorisation des co-produits d'origine marine (ANDRIEUX, 2004).

3.3. Les hydrolysats de poisson

3.3.1. Définition

Les hydrolysats sont des fractions à teneur protéique élevée (73 à 85%) obtenus par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) ou hétérolyses (ajout d'enzymes exogènes). Cependant, la proportion en éléments minéraux est assez faible, car les arêtes osseuses non hydrolysables ont été retirées. Les hydrolysats ont donc l'avantage d'être digeste et d'avoir une haute qualité nutritive.

3.3.2. Les avantages

Les hydrolysats présentent les mêmes avantages que les matières premières d'origine animale pour l'aquaculture, sans en avoir les nombreux inconvénients (LARBIER et LECLERCQ, 1992 ; ANDERSON et coll., 1993). En effet, ce sont des protéines hydrolysées, les acides aminés essentiels libérés sont donc plus facilement disponibles et assimilables pour les animaux. De plus, ils constituent un produit très appétant et parfaitement accepté grâce à l'arôme de

poisson et présente une granulométrie fine facilitant la fabrication d'aliments suivant des procédés tels que la microparticulation (**JONES, 1995**). Enfin, les hydrolysats comportent en général peu de minéraux et ne risquent donc pas de polluer les eaux des élevages aquacoles, leur bonne qualité microbiologique étant assurée par la stérilisation au cours de la fabrication.

3.3.3. Quelques intérêts des hydrolysats de poisson

3.3.3.1. En alimentation animale

Les hydrolysats de poisson sont utilisés comme substitut du lait pour les bovins et les ovins. En comparaison avec la caséine, les animaux nourris avec les hydrolysats de poisson gras, après un début de croissance plus lent, arrivent au même poids au bout de quelques semaines (**ØRSKOV *et Coll.*, 1982; RITCHIE et MACKIE, 1982**). De plus, une étude économique a montré les intérêts des peptides de poisson en tant que substituts du lait (**MERRITT, 1982**). Pour le bétail adulte, l'ensilage obtenu à partir d'herbe peut être également remplacé par des hydrolysats de poisson (**OUELLET *et Coll.*, 1997**).

Mais c'est dans le domaine de l'aquaculture que ces hydrolysats sont les plus valorisés. En effet, en aquaculture, la charge récurrente la plus importante est la source protéique apportée aux animaux. Les protéines de poisson hydrolysées, en plus de leur faible coût, sont d'une grande digestibilité. De plus, de nombreuses études ont montré que certains hydrolysats de poisson possèdent des propriétés nutraceutiques. Ainsi, le remplacement des farines de poisson par des hydrolysats de poisson augmenterait la croissance des crevettes et des larves de poisson (**CORDOVA-MUREATA et GARCIA-CARRENO, 2002**).

3.3.3.2. Intérêts fonctionnels

En plus de leurs qualités nutritionnelles maintenant établies, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats de poisson ont été étudiées. En effet, pour pouvoir entrer dans la composition des aliments, les hydrolysats doivent avoir des propriétés particulières, concernant l'hydrophobicité, les facultés d'émulsion (et leur stabilité) ou de formation de mousse, la capacité à retenir l'eau. D'une manière générale, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont liées aux conditions d'hydrolyse. Ainsi, en contrôlant ces conditions, il est possible d'obtenir les propriétés fonctionnelles voulues, ce qui permettrait de trouver des applications variées dans les domaines alimentaires, comme dans l'élaboration de vinaigrettes ou de saucisses industrielles (**SLIZYTE et Coll., 2005**).

3.4. Valorisation des protéines d'hydrolysat de poisson

3.4.1. Les différentes sources alimentaires et quelques fonctions des protéines

Les protéines sont des macromolécules polypeptidiques résultant de l'association d'un nombre élevé d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques.

Les protéines se trouvent dans un grand nombre d'aliments, mais en quantité très variable. Leur valeur nutritionnelle est différente d'un aliment à l'autre. On ne peut se passer d'aucune source alimentaire de protéines (animales et végétales). (Voir tableau III)

Les protéines d'origine animale sont très proches de celles de l'être humain ; du fait de leur bon équilibre en acides aminés. Au regard des besoins de l'homme, elles sont de bonnes qualités biologiques. Pour obtenir une alimentation en protéines de bonne qualité à l'aide de protéines végétales, il est nécessaire d'associer différentes sources alimentaires. Chacune d'entre elles n'étant pas parfaitement équilibrée au regard des besoins de l'homme, la complémentation va permettre d'augmenter la valeur biologique des protéines végétales.

Tableau III : Groupe d'aliments protéiques (IFN, 1997)

Groupes d'aliments	I	II	III	IV	V	VI
Produits	Viande Poissons Œufs	Lait Produits laitiers	Concentrés et isolats obtenus à partir du groupe IV	Graines de légumineuses	Graines de céréales	Légumes frais Tubercules fruits
%Protéines	13 à 22	3,5 à 26	65 à 98	16 à 30	6 à 13	0,5 à 5

Les protéines constituent l'une des trois (3) grandes familles de nutriments énergétiques, avec les glucides et les lipides. Elles assurent de nombreuses fonctions dans le corps humain :

- elles jouent un rôle structural et participent au renouvellement des tissus musculaires, des phanères (cheveux, ongles, poils), de la matrice osseuse, de la peau.
- elles assurent de nombreuses fonctions physiologiques, par exemple sous la forme d'enzymes digestives, d'hémoglobine, d'hormones, de récepteurs et d'immunoglobulines. Par ailleurs, elles constituent l'unique source d'azote de l'organisme.

3.4.2. Les protéines de poisson

Le poisson est une source de protéines aussi importante que la viande. Les protéines du poisson peuvent être classées en deux groupes :

- **Les protéines extracellulaires** appelées également protéines du stroma, sont insolubles dans les solutions salines. Ce sont le collagène, l'élastine, la kératine, la réticuline et la connectine. Elles semblent plus fragiles chez les poissons que chez les mammifères.
- **Les protéines intracellulaires** se subdivisent en deux fractions :
 - La fraction myogène hydrosoluble, désignée plus simplement sous le nom de myogène. Elle est obtenue par pression de la chair ou par extraction en solution faiblement ionique. Cette fraction comprend les protéines

sarcoplasmiques (myoglobine, albumines, globulines) et les protéines des granules obtenues par centrifugation.

- La fraction myofibrillaire, peu soluble, comprend les protéines dites de structure qui constituent la majeure partie des protéines intracellulaires. Ce sont la myosine, l'actine, l'actomyosine (complexe des deux) et les protéines régulatrices : la tropomyosine, les troponines, les actines, les protéines de la strie M et les protéines C.

3.4.2.1. La fraction myogène soluble

L'essentiel de cette fraction protéique est constitué de protéines sarcoplasmiques. Ces protéines sarcoplasmiques ont de nombreuses propriétés communes : ce sont des protéines globulaires, de faible viscosité et de poids moléculaire relativement bas. Elles sont solubles dans les solutions faiblement ioniques. Généralement mêlées aux protéines de la fraction myofibrillaire dans le sarcoplasme, elles représentent de 15% à 22% des protéines totales. Plus diversifiées chez les poissons que les mammifères, les protéines sarcoplasmiques semblent caractéristiques des espèces. La myoglobine n'existe pas dans les muscles blancs.

3.4.2.2. La fraction myofibrillaire

La myosine représente 55 à 60% des protéines myofibrillaires du muscle. Il y'a analogie dans les compositions en aminoacides de la myosine a des teneurs particulièrement élevées en acide aspartique, acide glutamique, lysine et leucine. L'actine est la deuxième protéine importante du muscle.

3.4.3. Les peptides

Lorsqu'elles subissent une hydrolyse enzymatique avec des protéases. Les protéines sont alors clivées en peptides. L'action des enzymes sur la formation des peptides est prépondérante puisqu'elle va jouer sur la taille et la fonction des

peptides générés lors de l'hydrolyse. De nombreuses voies de valorisation des peptides issus des hydrolyses de co-produits marins sont citées dans la littérature.

3.4.3.1. Les Sources azotées

Les sources azotées peuvent être définies comme étant des composés non protéiques, de faible poids, solubles dans l'eau et contenant de l'azote. Cette fraction représente 9 à 18% de l'azote total des téléostéens.

Les muscles du poisson sont parmi ceux des vertébrés les plus riches en substances azotées extractives. Les fractions les plus importantes de l'azote extractif dans les muscles du poisson sont constituées par l'azote basique. Les constituants majeurs de cette fraction sont les bases volatiles telles que l'ammoniac, l'oxyde de triméthylamine, la créatine, les acides aminés libres, les nucléotides et les bases puriques. (**F.A.O., 1998**)

Dans la culture d'organismes microbiens (bactéries, champignons, levures), la source de nutriments représente le plus gros investissement (**MARTONE et Coll., 2005**).

L'utilisation d'hydrolysats de poisson comme source de nutriments pour ces organismes, constitue une bonne voie de valorisation. Cette utilisation permettrait conjointement d'augmenter la valeur des hydrolysats et de réduire le coût de production de la culture cellulaire. Une étude menée en 1989 indique que des hydrolysats de compost de poisson amélioreraient la seconde partie de la croissance d'un champignon acide, *Scytalidium acidophilum*, valorisant ainsi le compost de poisson jusque là difficilement utilisable du fait de la forte odeur dégagée (**MARTIN et CHINTLAPATI, 1989**). Plus récemment, des travaux ont validé le remplacement d'un milieu de croissance commercial par des hydrolysats provenant de viscères de morue ou de thon pour la croissance de bactéries, de levures et de champignons (**GUERARD et Coll., 2001; ASPMO et Coll., 2005**). De façon similaire, une étude menée sur 3 bactéries différentes

et sur une archéobactérie (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli* et *Halobacterium salinarum*) montre qu'un hydrolysats de hareng contenant 80% de protides et peu d'acides aminés libres permet une culture identique à celle obtenue avec un milieu de référence, à condition que la salinité et le pH de l'hydrolysats soient identiques (MARTONE et Coll., 2005). Les peptides contenus dans ces hydrolysats permettent ainsi la croissance non sélective d'organismes microbiens (bactéries gram+, gram- ou archéobactéries poussent avec le même hydrolysats). (DUMAY, 2006)

3.4.3.2. Intérêts nutritionnels des peptides

La digestibilité des protéines de poisson hydrolysées présente un avantage pour la nutrition de personnes dont le système digestif est en dysfonctionnement. En effet, des régimes adéquats en fonction des pathologies peuvent être élaborés par synthèse mais ces productions sont très coûteuses. Depuis les années 70, les recherches se sont tournées vers les hydrolysats de poisson, montrant que les intérêts nutritionnels et la composition de ces produits pouvait être incorporés en alimentation humaine dans des régimes spécifiques. En effet, le taux de protides solubles est important et la composition en acides aminés équilibrée.

Les hydrolysats de morue (LALASIDIS et Coll., 1978), de tilapia (ABDULLHMID et Coll., 2002), de saumon (LIASET et Coll., 2003) ont montré leurs grandes valeurs nutritionnelles, parfois supérieures à celles des régimes synthétiques. Un hydrolysats provenant d'un poisson de mer de faible valeur, *Saurida elongata*, a également montré des propriétés anti-anémiantes (DONG et Coll., 2005). En plus de leur intérêt nutritionnel, les hydrolysats de poisson peuvent conférer aux produits auxquels ils sont associés une augmentation du rendement de la cuisson (en diminuant les pertes en eau et en protéines occasionnées) et des propriétés anti-oxydantes (SHAHIDI et Coll., 1995).

L'amertume des peptides générés lors de l'hydrolyse est un frein pour l'utilisation des hydrolysats en alimentation humaine (KRISTINSSON et

RASCO, 2000). Cette apparition est due à la libération des acides aminés hydrophobes, qui sont nativement compris à l'intérieur des chaînes peptidiques (**MACKIE, 1982; LIASET *et Coll.*, 2000**). Certaines protéases sont particulièrement utilisées pour la réduction de l'amertume. Ces enzymes peuvent être utilisées dès le début de l'hydrolyse, comme Protamex (**NOVOZYMES, 2001**) et Alcalase (**HOYLE et MERRIT, 1994**), ou à la suite d'une hydrolyse, comme Flavourzyme (**NOVOZYMES, 2001**) et la pancréatine (**LALASIDIS *et Coll.*, 1978**).

3.4.3.3. Activités biologiques des peptides

De nombreux articles portent sur les activités biologiques des peptides issus d'hydrolyses protéolytiques. Les peptides marins ne font pas exception. Une revue récente sur les composés marins bio-actifs liste les différentes activités des peptides. Ainsi, ces derniers peuvent avoir des effets anti-hypertenseurs, anti-thrombotiques, immuno-modulateurs, antioxydants, anti-coagulants... (**KIM et MENDIS, 2006**). Les peptides marins interviennent dans le traitement de l'ostéoporose, de l'arthrite, des maladies cardiovasculaires, du diabète, de l'obésité ou encore du cancer (**GILDBERG *et Coll.*, 2002; KIM et MENDIS, 2006**).

Le tableau ci-dessous précise quelques exemples de ces activités.

Tableau IV : Principales activités biologiques des protéines de poisson

Espèces	Activités	Références
Merlu	réparation du tissu épithélial	Fitzgerald <i>et coll.</i> , 2005
Sole	anti oxydante	Rajapakse <i>et coll.</i> , 2005
Sole	Hypotensive	Jun <i>et coll.</i> , 2004
Morue	secretagogue immunomodulatrice anti proliférative	Ravallec-Plé et VanWormhoudt, 2003 Gildberg <i>et coll.</i> , 1996 Picot <i>et coll.</i> , 2006
Maquereau	Oxydante	Picot <i>et coll.</i> , 2006
Merlan	anti proliférative	Picot <i>et coll.</i> , 2006
Saumon	anti proliférative	Picot <i>et coll.</i> , 2006
Sardine	comportement hormonal	Picot <i>et coll.</i> , 2006 Rousseau <i>et coll.</i> , 2001

CHAPITRE 4 : ENZYMES ET HYDROLYSE ENZYMATIQUE

4.1. Les enzymes

4.1.1. Définition et propriétés

Les enzymes sont des protéines ou complexes de protéines permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire. Les enzymes agissent à faible concentration et elles se retrouvent intactes en fin de réaction: ce sont des catalyseurs biologiques. Comme tout catalyseur, elle n'intervient pas dans le processus réactionnel et 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.

Les propriétés des enzymes :

- ce sont des protéines, de masse moléculaire élevée, thermolabiles, biocatalyseurs des réactions métaboliques
- elles agissent à des concentrations très faibles (par exemple, pour l'anhydrase carbonique, $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$, une molécule d'enzyme peut hydrater 100 000 molécules de $\text{CO}_2 \Rightarrow 10^{-5} \text{mol/s}$)
- elles possèdent deux types de spécificité :
 - spécificité étroite ou lâche avec le substrat. Exemple : la phosphatase alcaline est capable d'hydrolyser des esters phosphoriques en milieu alcalin.
 - Spécificité d'un type de réaction
- elles augmentent la vitesse des réactions (jusqu'à 10^{11}), en respectant les lois de la thermodynamique (sans modifier leur état d'équilibre) : elles diminuent l'énergie d'activation.
- elles doivent être régénérées à la fin de la réaction ou de la séquence des réactions. L'enzyme ne crée pas de réaction
- elles peuvent convertir un type d'énergie en un autre

4.1.2. Nomenclature et classification

4.1.2.1. Nomenclature et classification fonctionnelle

Elle est très utilisée. Elle prend en compte le nom du substrat, de l'enzyme et le type de réaction catalysée. Pour désigner une enzyme, on indique :

- d'abord le nom du **substrat** ;
- puis, le **type de réaction catalysée** ;
- on ajoute enfin le suffixe **ase**.

Par exemple

- Glucose- 6- phosphatase isomerase
- Isocitrate lyase

Lorsque l'enzyme utilise 2 substrats on les désigne tous les deux en indiquant :

- Le **substrat donneur** de radicaux ;
- Puis le **substrat accepteur** du radical libéré ;
- Le **radical** échangé ;
- Le **type de réaction**, on ajoute enfin **ase**.

Par exemple

- Aspartate aminotransferase
- UDP glucose – fructose glucosyltransferase

4.1.2.2. Nomenclature et classification officielle

Depuis 1961, l'Union Internationale de Biochimie a codifié la nomenclature et la classification des enzymes sous une nomenclature dite officielle. Toutes les enzymes actuellement connues sont répertoriées sous un numéro portant 4 chiffres séparés par des points et précédés de EC (Enzyme Classification) soit (EC x1.x2.x3.x4). La signification des chiffres est la suivante :

- **X1** : Le premier chiffre pouvant varier de 1 à 6 indique le type de réactions

- Oxydoréductases (transfert d'électrons, d'atomes d'hydrogène ou fixation d'oxygène)
 - Transférases (transfert d'atomes ou de groupes d'atomes autres que de 1)
 - Hydrolases (Coupure des liaisons avec fixation de radicaux H et OH issus de l'eau)
 - Lyases (Coupure des liaisons par d'autres modes autres que l'hydrolyse).
 - Isomérases (réaction conservant la formule brute du composé)
 - Ligases (formation des liaisons entre C et un autre métalloïde en utilisant l'énergie de l'ATP)
- **X2** : Le deuxième désigne la sous-classe de l'enzyme qui est définie suivant son mécanisme d'action. Dans le cas des oxydoréductases on distingue les déshydrogénases, les monooxygénases et les dioxygénases.
 - **X3** : Le troisième chiffre désigne la nature de la molécule qui sert d'accepteur, lorsqu'il s'agit d'un transfert d'électrons.
 - **X4** : Le quatrième chiffre est un numéro d'ordre dans le groupe et dans le sous-groupe. Lorsqu'une enzyme se termine par 99, cela signifie qu'elle est incomplètement caractérisée.

Cette classification officielle précise et complète la nomenclature fonctionnelle. Dans un rapport ou une publication, le nom fonctionnel continue à être utilisé mais ce dernier est toujours suivi entre parenthèses, par son numéro dans la nomenclature officielle.

4.1.3. Les principales classes d'enzymes

Contrairement aux autres composés biochimiques, la classification des enzymes est basée sur la réaction catalysée et non sur la composition de l'enzyme.

Les enzymes sont réparties en six groupes :

- les oxydoréductases (EC 1),
- les transférases (EC 2),
- les hydrolases (EC 3),

- les lyases (EC 4),
- les isomérasés (EC 5),
- les ligases (EC 6).

Dans notre étude, l'enzyme utilisée est une hydrolase (EC 3) et elle appartient plus spécifiquement au groupe des protéases (EC 3.4) en s'attaquant aux liaisons peptidiques.

4.2. L'hydrolyse enzymatique

4.2.1. Définition et principe

L'hydrolyse enzymatique est une réaction chimique, catalysée par des enzymes du type hydrolase, au cours de laquelle intervient obligatoirement une molécule d'eau et qui aboutit à la scission d'un composé.

L'hydrolyse enzymatique permet de couper les protéines en peptides. Les protéines hydrolysées ont une mauvaise réputation due à leur amertume. Cependant, elles sont utilisées pour conférer à des aliments, des propriétés nutritionnelles ou fonctionnelles particulières.

Lors d'une hydrolyse enzymatique, les protéases vont cliver 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 6). 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, 2000**). Lorsque le pH est inférieur, la réaction s'inverse et ce seront des ions HO^- qui seront libérés.

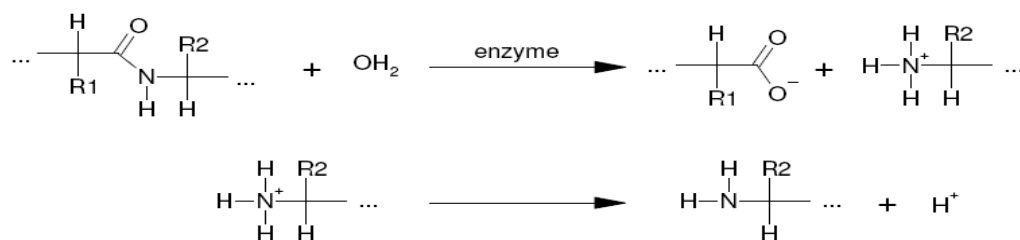


Figure 6: Schéma réactionnel de la libération de protons H⁺ lors de l'hydrolyse enzymatique

4.2.2. Pourquoi suivre l'évolution de l'hydrolyse

Le suivi de l'hydrolyse est une préoccupation majeure lors de la mise en place de procédés enzymatiques. En effet, l'activité des enzymes ne s'arrête que lorsque le substrat est totalement hydrolysé, ou que les conditions du milieu ne sont plus adéquates pour l'enzyme.

Il est donc important de suivre l'hydrolyse en fonction des produits désirés, l'hydrolyse totale ne conduisant pas, dans la majeure partie des cas, aux produits les plus intéressants. De nombreux protocoles ont été mis en place pour le suivi de cette hydrolyse. Un des procédés les plus simples est de mesurer les modifications de pH induites par l'hydrolyse. Cette mesure peut être effectuée directement à l'aide d'un ph-mètre plongé dans le milieu réactionnel, mais pas ce biais, l'hydrolyse ne peut être poussée très loin, l'activité de l'enzyme étant très sensible aux variations de pH. La mesure peut également être lue de manière indirecte. Pour permettre une action plus longue de l'enzyme, le milieu peut être neutralisé par ajout de soude (lors de libération de H⁺) ou d'acide (libération HO⁻). Le volume versé est directement proportionnel à la quantité de liaisons peptidiques coupées. Cette méthode est la méthode dite du pHstat (en référence à l'appareil utilisé) (ADLER et NISSEN, 1986).

4.2.3. Les paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique

Différents facteurs peuvent affecter l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des protéines : la température, le pH, la concentration du substrat et de l'enzyme, la

force ionique, la présence ou l'absence de substances inhibitrices/activatrices, la quantité d'eau ajoutée.

Nous traiterons ici uniquement des principaux facteurs, à savoir la température, le pH et brièvement, de l'effet des substances inhibitrices ou activatrices.

4.2. 3.1. Influence de la température

L'étude de la vitesse initiale en fonction de la température fait apparaître deux phases bien distinctes (Figure 7). La température accélère d'une part les vitesses des réactions en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière d'énergie d'activation ; mais au-delà d'une certaine température, une modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme se produit entraînant progressivement sa dénaturation et sa désactivation. La résultante de ces deux effets se traduit par une courbe généralement dissymétrique passant par une valeur maximale pour une température optimale. Certaines enzymes, avec une masse faible et une structure simple ou stabilisée (à l'aide de ponts disulfures par exemple), se révèlent particulièrement stables à la chaleur. Une mutation peut conférer à une enzyme une thermo sensibilité différente de celle de l'enzyme native, très utile pour conférer une meilleure stabilité à des enzymes utilisées à haute température.

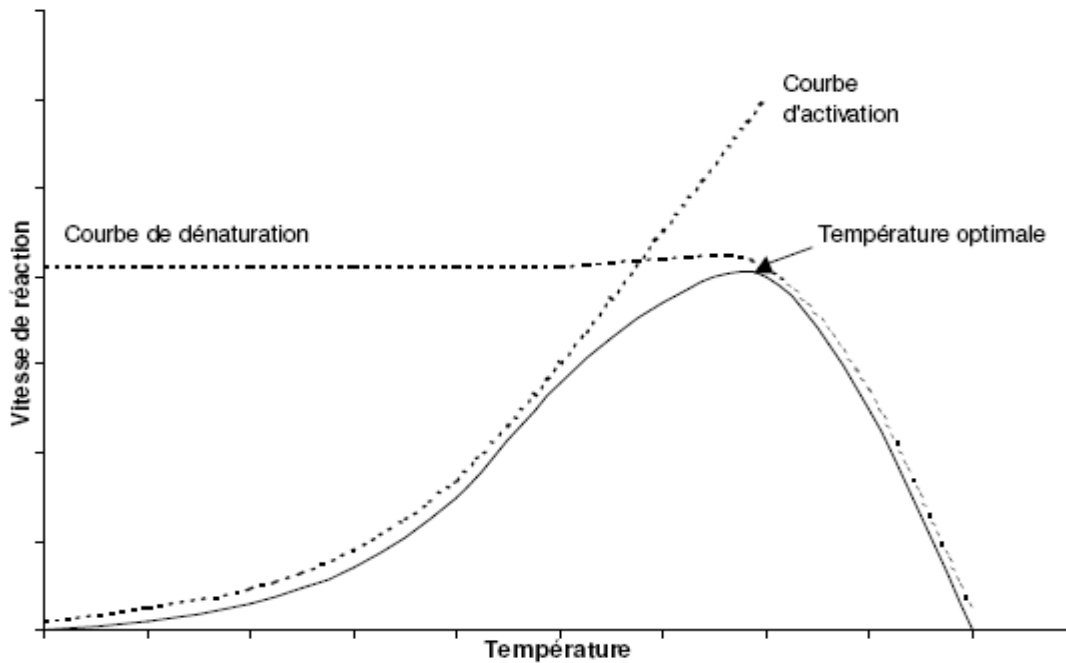


Figure7 : Influence de la température sur la réaction enzymatique (CUVELLIER, 1999)

Quoi qu'il en soit, la température est spécifique pour chaque enzyme (souvent indiquée par le fournisseur) et il est important de travailler dans la plage de température indiquée. En biotechnologie, l'inactivation de l'enzyme est très souvent réalisée par traitement thermique, souvent moins dénaturant pour la récupération des produits obtenus qu'une variation de pH.

4.2.3.2. Influence du pH

La variation du pH peut avoir des conséquences sur l'enzyme en provoquant des modifications de l'état d'ionisation de certains acides aminés situés sur le site actif ou sur la zone permettant le maintien de la conformation tridimensionnelle native de la protéine. Le substrat peut aussi subir une modification de son degré d'ionisation, pouvant permettre ou empêcher la formation du complexe enzyme / substrat. Le pH optimum sera défini en fonction de la transformation enzymatique d'un substrat dans un milieu de composition donnée.

Comme le montre la Figure8, la vitesse d'une réaction décroît généralement rapidement lorsque l'on s'éloigne du pH optimum jusqu'à devenir négligeable (à

± 2 unités de pH). Ce pH optimum varie beaucoup selon les enzymes. Certaines protéases ont des pH optimaux variant de 2 (pepsine) à 10 (alcalase).

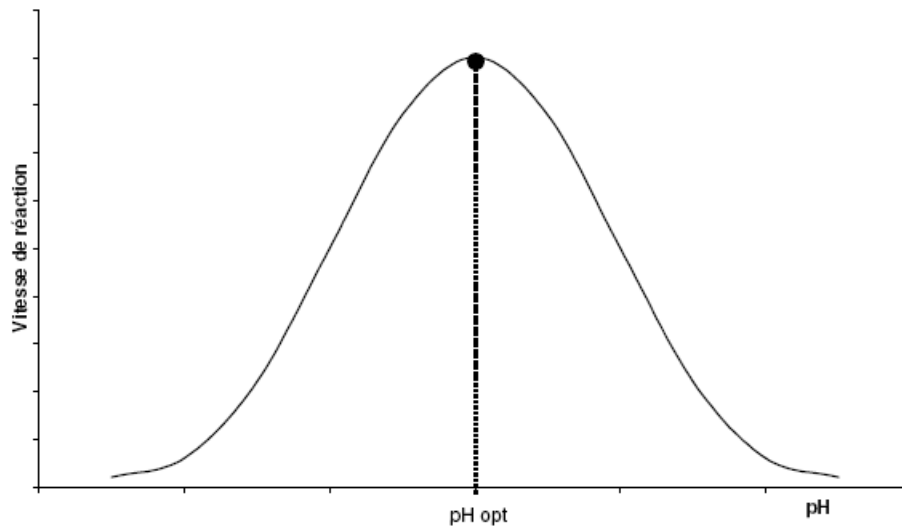


Figure8 : Variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du pH (CUVELLIER, 1999).

4.2.3.3. Effets des substances activatrices ou inhibitrices

La vitesse d'une réaction et l'activité de l'enzyme peuvent être modifiées par la présence de composés autres que le substrat ; ce sont des effecteurs qui jouent un rôle important dans les phénomènes de régulation. Ces effecteurs peuvent avoir un effet inhibiteur ou activateur.

Les inhibiteurs peuvent être compétitifs, c'est-à-dire qu'ils possèdent une analogie de structure avec le substrat et qui peuvent aller se loger sur le site actif de l'enzyme à la place du substrat. A l'inverse, certains inhibiteurs peuvent être non compétitifs. Ces composés ne vont pas se fixer sur le site actif spécifique du substrat, mais sur un autre site de l'enzyme, modifiant ainsi sa structure tridimensionnelle et son activité. Cette deuxième sorte d'inhibition est tout de

même assez rare. Les co-produits marins, comme toute matrice vivante, possèdent un grand nombre de ces substances (**GILDBERG, 1993**).

Conclusion partielle

Les eaux Sénégalaises sont les plus poissonneuses de l'Afrique de l'ouest. La pêche est une composante essentielle du développement économique et sociale du Sénégal ; elle contribue ainsi de manière non négligeable à la croissance de l'économie nationale.

Les produits de la pêche sont la principale source de protéines des sénégalais, couvrant ainsi 75% de leurs besoins.

Parmi les produits halieutiques des eaux Sénégalaises, on a la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) qui est un poisson plat de la famille des Cynoglossidae. Lors de sa transformation en filets de poisson, on obtient des co-produits (tête, peau, viscères, arête centrale), qui selon des chercheurs, sont particulièrement riches en molécules d'intérêt, notamment les protéines.

Parmi ces co-produits nous allons nous intéressés à la tête et aux viscères pour notre étude ; ceci en procédant à une hydrolyse enzymatique à l'aide d'une protéase, dans le but de les valoriser.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES

L'étude expérimentale, à savoir l'hydrolyse enzymatique et le dosage des protéines totales, s'est faite dans le laboratoire de chimie alimentaire du service d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (HIDAOA) de l'E.I.S.M.V et dans le laboratoire de Bromatologie de l'E.S.P durant la période de Janvier à Mars 2007.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

1.1.1.1. Préparation des co-produits de la sole tropicale

Les soles utilisées pour notre étude provenant de l'usine 'La pirogue bleue' ont été pêchées dans la zone FAO N° 34 en Décembre 2006.

Les poissons sont filetés à l'usine et les co-produits sont collectés séparément puis congelés et stockés à -20° C.

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérable lors d'opération traditionnelles de production. Ces co-produits ont été traités selon le même protocole de conservation que les parties destinées à la consommation humaine afin d'éviter leur altération. Les co-produits de soles utilisés dans cette étude sont : la tête et les viscères (photo1).

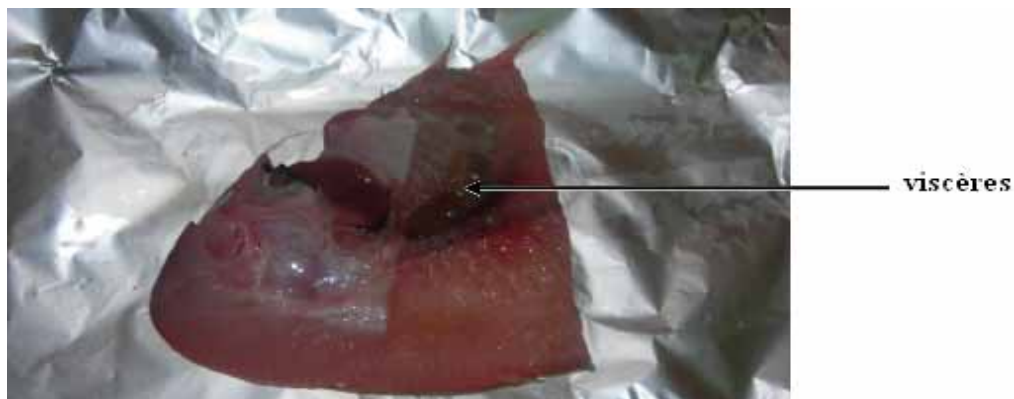


Photo1 : tête et viscères de la sole tropicale

1.1.1.2. Constitution des lots

Pour chaque hydrolyse, des lots de 100g de carcasse sont âpretés, puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

1.1.2. Matériel enzymatique

L'enzyme utilisée est le Protamex. C'est une enzyme industrielle produite par génie génétique par la société 'Novozymes SA'. Le Protamex est un complexe peptidique de la classe des hydrolases développé par plusieurs espèces de *Bacillus*, pour l'hydrolyse des protéines alimentaires. Protamex possède les numéros de classification enzymatique suivants : EC 3.4.21.62 et EC 3.4.24.28. Contrairement à d'autres endoprotéases, protamex a été élaboré de façon à ne pas générer de peptides amers, même lorsque les degrés d'hydrolyses sont faibles. Protamex est standardisée d'après le fournisseur en unité Anson par g (AU/g). Les conditions optimales de travail sont atteintes pour un pH compris entre 5,5 et 7,5 et une température comprise entre 35 et 60°C.

Protamex peut être inactivé par chauffage à 85°C pendant 10min lorsque le pH est de 8. (Voir annexe)



Photo 2: boîte contenant l'enzyme Protamex

1.1.3. Matériel technique

1.1.3.1. Matériel de prélèvement

- Glacière
- Carboglace

1.1.3.2. Matériel de laboratoire

- Verreries et accessoires
- Matériel utilisé pour les prises d'essais : couteaux, ciseaux, balance électronique.
- Matériel utilisé pour l'hydrolyse enzymatique : plaque chauffante, agitateur magnétique, papier aluminium, entonnoir, thermo- pH mètre portable (photo 3).
- Centrifugeuse (photo 4), bain-marie (photo 5), tube Falcon, étuve
- Matériel utilisé pour la minéralisation : hotte, capteur de fumée, bloc de minéralisation
- Une unité de distillation pour le dosage des protéines.



Photo 3: Thermo-pH metre portable (HANNA instruments)



Photo 4 : centrifugeuse



Photo 5 : Bain marie pour l'inactivation de l'enzyme

1.2. Méthodes

1.2.1. Hydrolyse enzymatique

Le but de cette étude est de déstructurer les matières par le biais de protéase de façon à libérer les protéines en vue d'une valorisation. Il est donc important de travailler dans les conditions précises et contrôlées de température et de pH adaptés à l'enzyme utilisée.

100g de carcasse (têtes et viscères) découpées en morceaux et 100ml d'eau distillée sont introduits dans un erlenmeyer. Le chauffage se fait avec une plaque électrique jusqu'à obtention des conditions d'utilisation de l'enzyme c'est-à-dire, un PH de 6,30 et une température de 50°C ; 0,1ml d'enzyme est alors ajouté à la solution.

L'hydrolyse dure 1h de temps. Pendant l'hydrolyse, la stabilité du pH et de la température est contrôlée par le thermo-pHmètre portable.



Photo 6: Dispositif d'hydrolyse installé au laboratoire

1.2.1.1. Suivre de la cinétique des hydrolyses

Plusieurs paramètres sont influents lors de la conduite de l'hydrolyse enzymatique :

- La concentration du substrat et de l'enzyme
- Le pH
- La température
- La force ionique
- La présence ou l'absence de substances inhibitrices ou activatrices

Lors de notre étude, seuls la température et le pH seront optimisées.

Chaque hydrolyse est suivie à temps réel. Pendant l'hydrolyse la stabilisation du pH et de la température est contrôlée. Toutes les 5min le pH et la température sont notés à l'aide du thermo-pH mètre (photo 6)

1.2.1.2. Hydrolyse courte durée

Les hydrolyses ont été conduites pour chaque échantillon durant 1h suivant les conditions optimales déterminées pour l'enzyme utilisée, de façon à observer le comportement des matrices en contact avec l'enzyme.

1.2.2. Filtration

Au bout d'une heure, l'hydrolyse est considérée comme terminée. L'hydrolysats obtenu est filtré afin de séparer les arêtes. On arrête la réaction enzymatique en plaçant le mélange dans un bain-marie à 85°C pendant 10mn pour inactiver l'enzyme.

1.2.3. Centrifugation

L'hydrolysats est reparti dans les tubes Falcon de 40ml, puis centrifugé à 6000tr/mn pendant 20mn.



Photo7 : hydrolysats dans les tubes Falcon

Ainsi, trois (3) phases sont récupérées (photo8) :

- la phase huileuse, contenant majoritairement les lipides.

NB : Cette phase est négligeable car *Cynoglossus senegalensis* est un poisson maigre.

- la phase soluble, correspondant au surnageant, comportant les protéines, les peptides en solution et autres composés solubles.
- la phase insoluble, correspondant au culot, contenant les protéines et les fractions non solubles.

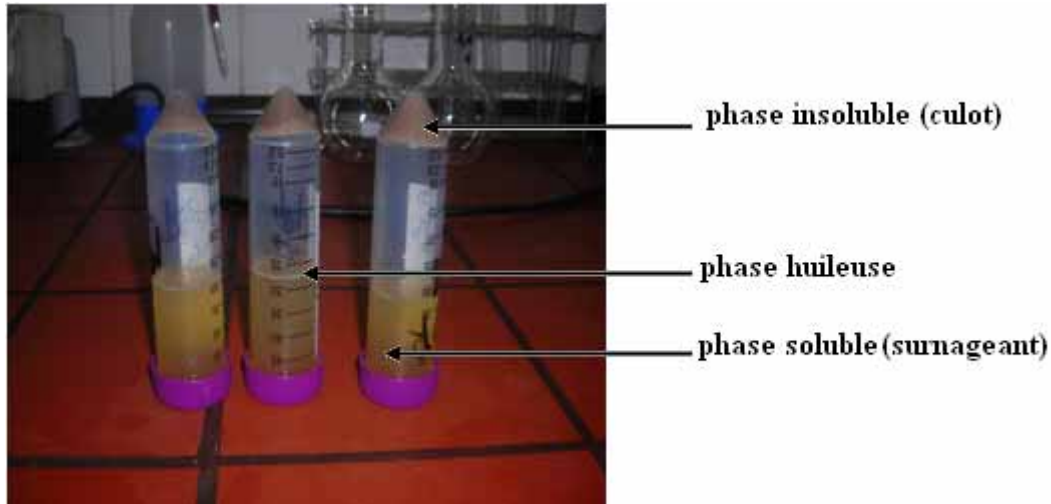


Photo8 : hydrolysate après centrifugation

1.2.4. La matière sèche

Après centrifugation, le culot et le surnageant sont mis dans l'étuve à 100°C pendant 48h. Puis la matière sèche est récupérée pour des analyses biochimiques.

1.3. Analyses biochimiques

1.3.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau des 2 fractions (culot et surnageant) est déterminée par pesée après 48h dans l'étuve. Pour cela, le culot et le surnageant sont placés dans des coupelles préalablement tarées qui seront ensuite disposées dans l'étuve à 100°C. Après refroidissement à température ambiante, les coupelles sont à nouveau pesées.

La détermination de la teneur en eau a été réalisée de façon identique pour toutes les 2 fractions.

La teneur en matière sèche est donnée par la formule suivante :

Teneur en matière sèche = $\frac{\text{masse de la coupelle pleine} - \text{masse de la coupelle vide}}{\text{masse de l'échantillon}}$

1.3.2. Dosage des protéines totales

Les protéines totales sont estimées à partir du taux d'azote dosé par minéralisation selon la méthode de **Kjeldhal. (Lynch et coll., 1998)**

1.3.2.1. Principe

L'azote totale est dosé par minéralisation à l'acide sulfurique, l'ammoniac obtenue est déplacé par une solution concentré d'hydroxyde de sodium, recueillie dans une solution tampon d'acide borique titré.

1.3.2.2. Mode opératoire

Minéralisation

Environ 1g de matière sèche de l'échantillon pesé est placé dans un tube à minéraliser, ainsi qu'une pastille de catalyseur et 20ml d'acide sulfurique concentré.

Sous la hotte et le capteur de fumée mis en route, le tube est introduit dans le bloc de minéralisation. On chauffe à 450°C environ jusqu'à obtention d'une solution très visqueuse de teinte blanchâtre. Le temps nécessaire varie de 2 à 4h. Après refroidissement, le capteur de fumée est rincé avec environ 5ml d'eau que l'on recueille dans le tube. Le culot et le surnageant sont alors remis en suspension dans l'eau en prenant les précautions d'usage (20ml en tout suffisent).

Le dosage de l'azote total se fait sur cette solution.

Entraînement à la vapeur d'eau

Dans une fiole conique de 250ml, 20ml d'acide borique avec indicateur coloré y sont placés.

Cette fiole est ensuite adaptée à l'extrémité du réfrigérant de l'unité de distillation de telle sorte que l'allonge plonge dans la solution d'acide borique.

On branche le tube sur l'unité de distillation et on neutralise par 80ml de soude (4 fois le volume d'acide sulfurique utilisé).

L'entraînement à la vapeur d'eau se fait en 6min. Cela correspond à un volume de 150ml de distillat sur les 20ml d'acide borique. On obtient une solution de couleur verte.

Titration

On titre directement dans la fiole conique par l'acide chlorhydrique 1N jusqu'à l'obtention d'un virage à la couleur rose.

1.3.2.3. Expression des résultats

La teneur en azote total noté N en g pour 100g de l'échantillon est égal à :

$$N = 1,4 \times V / M$$

Avec V = Volume en ml de l'acide chlorhydrique utilisé

M = Masse en g de la prise d'essai.

La teneur en peptides noté P est obtenue grâce à la formule suivante :

$$P = N \times 6,25$$

On parlera ainsi de peptides et non de protéines.

CHAPITRE 2 : RESULTATS

2.1. Suivi de la cinétique de l'hydrolyse

Les délais de temps ont été respectés pour toutes les hydrolyses, à savoir 1h.

Le pH se situe dans l'intervalle [6,20 à 6,31] avec une moyenne de 6,24. La température présente une fourchette de [55 °C à 56,7°C] avec une moyenne de 55,65°C. (Voir annexes)

Ces résultats montrent que les conditions d'utilisation de l'enzyme Protamex ont été respectées au cours de notre expérimentation.

2.2. Poids des hydrolysats et des arêtes

La figure 9 ci-dessous montre qu'après hydrolyse, on a un dépôt d'arêtes représentant 3% du poids de départ. Cela se justifie par le fait que les arêtes ne sont pas digérées par le Protamex.

Le poids de l'hydrolysat peut aller jusqu'à 97% de la masse initiale (100g de carcasse + 100 ml d'eau). Le poids de l'hydrolysat est largement supérieur à celui des arêtes. L'hydrolyse de courte durée (1h) a permis une bonne séparation des arêtes, qui ont été nettoyées de toute matière organique. Ces résultats prouvent que l'enzyme a bien facilité la digestion de toute la chaire attachée à la tête. Ces résultats témoignent donc d'une bonne activité enzymatique du Protamex.

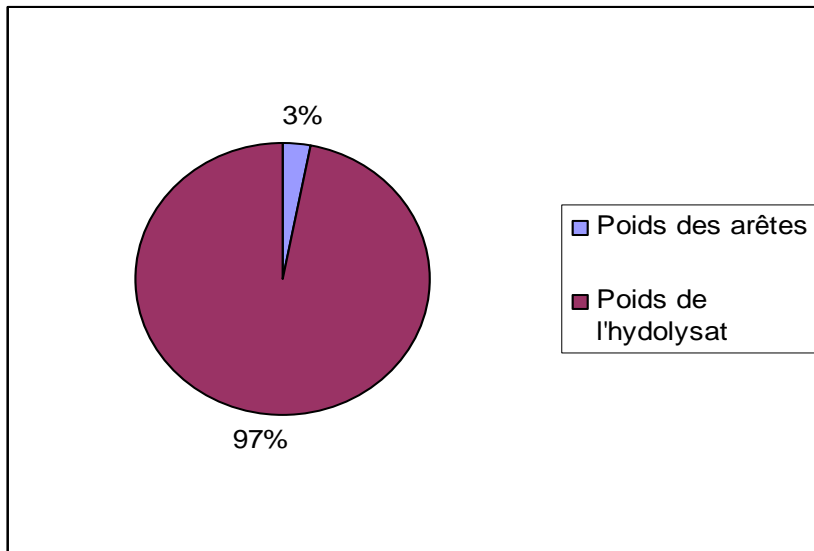


Figure 9 : Poids des deux parties obtenues après hydrolyse

2. 3. Poids du culot et du surnageant

A travers la figure 10, on remarque qu'après centrifugation de l'hydrolysate, la phase soluble (surnageant) est la plus abondante. Elle représente 91% de l'hydrolysate contre 9% pour la partie insoluble (culot).

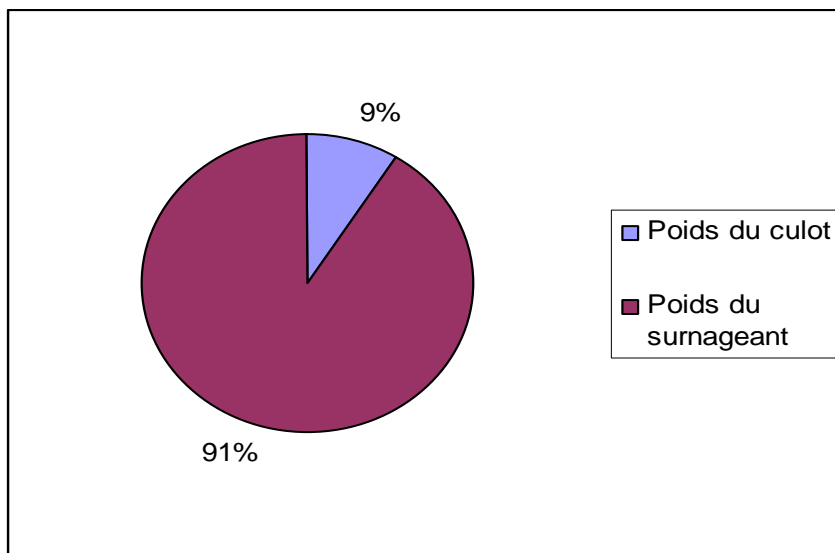


Figure 10 : Pourcentages de culot et de surnageant dans l'hydrolysate

Ceci est un indicateur de l'importance des protéines solubles dans l'hydrolysate obtenu.

2.4. Poids matière sèche et poids en eau du culot et du surnageant

En comparant les résultats des figures 11 et 12, on se rend compte que le surnageant est constitué à majorité d'eau, jusqu'à 93% par rapport au culot dont la teneur en eau est 15% moins. Ceci s'explique par le fait que le surnageant étant la phase aqueuse, elle est beaucoup plus riche en eau.

Quant aux matières sèches, c'est le contraire qu'on observe. En effet, il est logique que la matière sèche soit plus abondante dans le culot car il contient à majorité les fractions insolubles de l'hydrolysate.

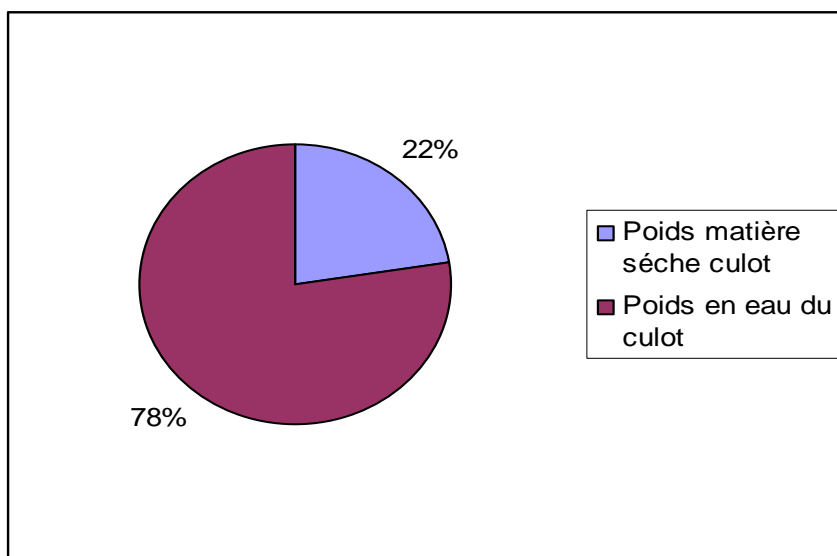


Figure 11 : Distribution de l'eau et de la matière sèche dans le culot

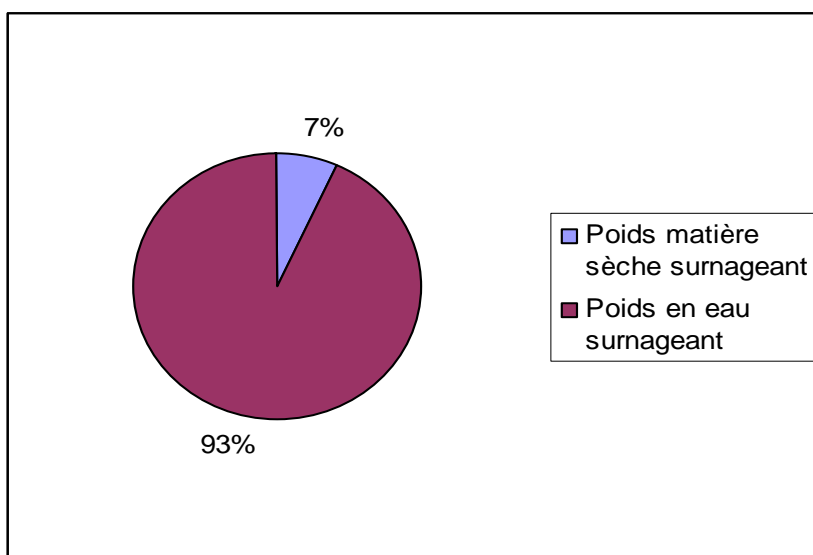


Figure 12 : distribution de l'eau et de la matière sèche dans le surnageant

2.5. Les protéines du surnageant et du culot

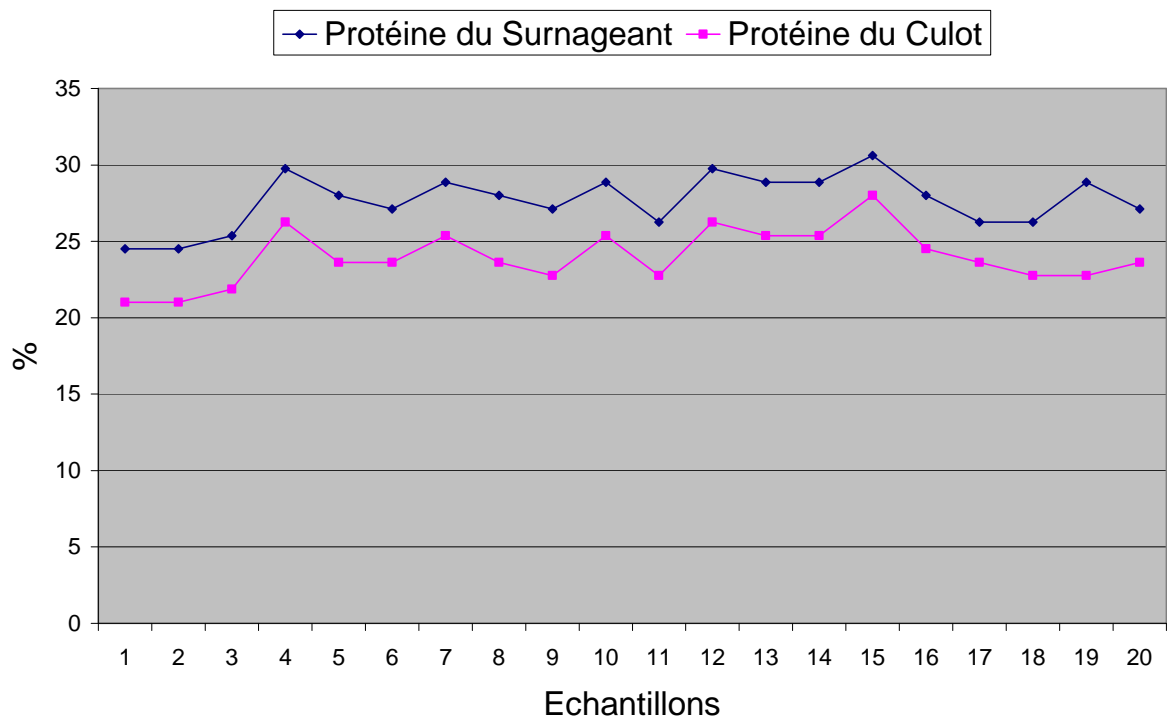


Figure 13 : courbes des protéines du surnageant et du culot

La figure 13 montre que le taux de protéines est plus élevé dans le surnageant, avec une moyenne de 27,65% contre une moyenne de 23,97% dans le culot. C'est en effet dans le surnageant qu'on retrouve un grand nombre de protéines en solution. Toutefois, nous notons un taux minimal de protéines supérieur à 20% dans les deux cas.

L'hydrolyse des co-produits de la sole notamment de la tête et des viscères par le Protamex donne d'assez bons résultats pour être exploité. Le surnageant peut avoir un potentiel en tant que composants bioactifs dans les aliments fonctionnels ou les nutraceutiques. Et le culot employé pour la production de l'alimentation animale et de l'aquaculture.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS

3.1. DISCUSSION

3.1.1. Discussion sur le matériel et les méthodes

3.1.1.1. L'hydrolyse enzymatique

Pour une bonne hydrolyse, il est important de travailler dans des conditions précises, c'est-à-dire : le matériel et la méthode doivent être de bonne qualité et adaptés aux opérations effectuées.

Pour notre étude, un pH mètre portable nous a permis de surveiller à temps réel, toutes les 5 min, pendant 1h, le pH et la température. En effet, l'utilisation d'un appareil de type pH stat aurait donné des résultats plus précis et stables. Le principe de cet appareil (pH stat TIM 854 TITRATION MANAGER) est de contrôler les hydrolyses, assisté par le logiciel Titra Master 85 (Radiometer analytical) permettant de suivre la température et de réguler le pH à l'aide d'une solution de NaOH 2N. A partir du volume de soude versé, le Degré d'Hydrolyse (DH) peut être calculé.

Une enzyme de type protéase produit par génie génétique par la firme Novozymes (Danemark) a été utilisée pour notre étude. Il s'agit du Protamex® qui est une endopeptidase c'est-à-dire une enzyme qui coupe les liaisons peptidiques située à l'intérieur des molécules. Par ailleurs, Protamex® est l'enzyme qui permet d'obtenir le plus haut degré d'hydrolyse comme l'ont montré les travaux de **Quaglia** et **Orban** en 1990. Ces deux auteurs ont eu à comparer Protamex® avec d'autres enzymes protéolytiques telles que l'alcalase et le Flavourzyme. De leurs résultats, il ressort que de hauts degrés d'hydrolyse d'environ 20% ont été obtenus avec le Protamex®. Contrairement aux deux autres enzymes qui ont un degré d'hydrolyse de 12%.

Pour notre étude nous avons utilisés une plaque chauffante réglée à 55°C pour mener nos hydrolyses. Cependant, plusieurs auteurs qui ont eu à travailler sur

l'hydrolyses des co-produits ont utilisés un système beaucoup plus moderne composé d'un bio réacteur couplé à un pH stat qui permet de réguler le pH du milieu. En effet, l'utilisation d'un bio-réacteur enzymatique est préférable pour réaliser les hydrolyses : les échantillons sont placés dans un réacteur à double enveloppe avec un volume d'eau distillée. Le système est mis en agitation (300 rpm pour les viscères et 700 rpm pour les têtes) et est amené à la température voulue à l'aide de la circulation d'éthylène glycol dans la double enveloppe du réacteur. La température à l'intérieur du système est mesurée à l'aide de la sonde de température du pH stat. Le pH initial est mesuré puis l'ajout manuel de soude (1 ou 2M) est réalisé jusqu'à l'obtention du pH voulu pour réaliser l'hydrolyse. L'enzyme est ajoutée après stabilisation du système et le pH est contrôlé par l'électrode et régulé par la pointe d'addition.

3.1.1.2. La matière sèche

La matière sèche des échantillons est obtenue après passage à l'étuve à 100°C. Mais nous avons rencontré des limites au niveau du surnageant qui, en séchant, devient collant (comme du caramel), rendant ainsi difficile les manipulations. Il aurait été préférable de déterminer la teneur en matière sèche des échantillons après lyophilisation. En effet, Les matières sèches obtenues se trouvent alors sous forme de poudre.

3.1.1.3. Le dosage des protéines

Les protéines sont composées d'acides aminés. Dans le cadre de leur dosage, de nombreuses méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés ont été mises au point.

Pour cette étude le dosage des protéines a été fait par la méthode de **Kjeldahl**. Cette méthode consiste à mesurer la quantité d'azote organique d'un échantillon. Il faut évidemment savoir, pour l'échantillon analysé, quelle est la relation entre

la quantité d'azote et celle de protéines. Elle requiert un équipement coûteux et complexe. On ne l'applique qu'à des échantillons difficiles à homogénéiser.

Pour éviter les inconvénients de la méthode de **Kjeldahl**, d'autre méthode telle que la méthode de **Lowry** et la méthode du biuret, peuvent être utilisées.

La méthode de **Lowry** peut être utilisée pour le dosage des protéines, afin de suivre l'évolution de la quantité de protéines au cours de l'hydrolyse (**Lowry et coll., 1951**). Cette méthode a été développée par **Lowry et coll.** qui ont combiné une réaction du biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les AA : tyrosines et tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. La grande sensibilité de la méthode de Lowry est sa principale qualité.

La Méthode du biuret a été développée par **Gornall et al (1949)**. Cette réaction du biuret est la formation d'un complexe pourpre entre le biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) et deux liens peptidiques consécutifs en présence de cuivre en milieu alcalin. Le complexe de coordination résultant absorbe fortement dans le bleu. Même si cette méthode est peu sensible (1-20 mg) elle est relativement rapide. Sa principale qualité est d'avoir une absorption égale pour toutes les protéines. Par contre, son défaut est sa sensibilité à certains interférents comme les peptides, le saccharose, le tris, le glycérol.)

La méthode de Lowry, a été tellement utilisée que l'article original de **Lowry** est un des articles scientifiques les plus cités au monde. Encore aujourd'hui on publie de nouvelles variantes de cette méthode.

(Gauthier, 2006)

Il aurait été aussi intéressant de doser les protéines solubles par la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**). Ce dosage est basé sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage

protéique très sensible. C'est donc une méthode sensible et rapide. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes de dosage des protéines. En effet, des études publiées par **Hoyle et Merrit** (1994), **Liaset et coll.** (2000), **Guérard et coll.** (2002), **Wu et coll.** (2003) et indiquent que plus les composés issus de l'hydrolyse sont solubles plus sera important la valeur ajoutée des molécules obtenues.

3.1.2. Discussion des résultats

3.1.2.1. La matière sèche

Nos résultats, ont révélé une différence importante de matière sèche (MS) dans le culot et le surnageant. En effet nous avons trouvé 7% de MS dans le surnageant, alors que le culot en contient 22%.

Ces résultats pourraient être particulier à la sole tropicale car les travaux d'**AUBERTIN** en 2003 sur la morue ont révélé des teneurs identique (7%) de MS dans le culot et le surnageant. Ceux de **DUMAY** en 2006 sur la sardine ont révélé une teneur de 9% de MS pour le culot et 80% pour le surnageant. Les différences observées entre nos résultats et ceux des autres auteurs pourraient être le fait soit de l'espèce de poisson utilisé, soit des différentes méthodes de détermination de la matière sèche utilisées (lyophilisation, étuvage).

3.1.2.2. Les protéines

A notre connaissance, aucune étude antérieure n'a porté sur les analyses des protéines des co-produits de la sole tropicale au Sénégal, rendant ainsi difficile toute comparaison de nos résultats. Néanmoins, si nous comparons nos résultats avec ceux du tableau N°4 (cf. étude bibliographique), le taux de protéines totales obtenu lors de notre travail avec une moyenne de 27,65 % pour le surnageant et 23,97 % pour le culot, nous montre que la sole tropicale à un taux de protéines sensiblement égal à ceux de la viande pour le culot et à ceux des produits laitiers

pour le surnageant. Quant à celui des légumes frais, tubercules, fruits et graines de céréales, le taux de protéines du culot et du surnageant est largement supérieur.

Les travaux de **DUMAY J.** (2006) ont révélé des teneurs relativement élevées lors de l'étude des différentes fractions issues d'un procédé de fabrication de surimis (protéines musculaires de poisson) à partir de sardines. La teneur en protéines des différentes fractions représente en moyenne 38,1% de la matière sèche. Nous pouvons donc dire que les co-produits des soles sont moins riches en protéines que les sardines.

3.2. Recommandations

La valorisation des co-produits de la sole tropicale par hydrolyse enzymatique est une technique qui devrait être exploitée et encouragée par plusieurs secteurs.

➤ A l'Etat

L'Etat doit initier et encourager cette démarche car elle permet de réduire les pertes post captures et les déchets générés par les industries. Car, Le potentiel de la combinaison des traitements enzymatiques des co-produits de la sole tropicale a été démontré et ouvre ainsi des perspectives encourageantes à l'utilisation de ces techniques douces, s'inscrivant dans une politique actuelle de développement durable et de gestion des bio-ressources

➤ Aux industriels

Il faut inciter les industriels à se porter vers ce domaine car c'est une source de débouchés rentables tels que : la production de sauce de poissons, d'arômes, de protéines musculaires.

D'un point de vue économique, il est important de noter que le prix de vente du Protamex se situe aux alentours de 20.000frcs C.F.A./kg. Et avec un kg de Protamex on hydrolyse environ une tonne (T) de co-produits. Il serait donc intéressant de montrer aux industriels que l'hydrolyse enzymatique est une source rentable.

➤ Aux chercheurs

Pour des travaux de recherches, des analyses plus approfondies peuvent être envisagées dans le cadre d'un travail ultérieur :

- identifications des peptides présentes dans les matrices car notre travail ne s'est limité qu'au dosage des protéines sans savoir exactement lesquels sont présents et dans quelles proportions pour chacune d'elle ;
- hydrolyses des autres co-produits : peau, arêtes et déchets résiduels ;

- hydrolyses longue durée (24h) pour les têtes laissant supposer une hydrolyse des tissus durs contenus dans les têtes (os, cartilage, arêtes). Une étude ultérieure pourrait se focaliser sur l'hydrolyse de ces tissus durs et de leur influence sur les autres composés ;
- dosage du calcium/phosphore sur les arêtes issues des hydrolyses. Dans le but d'une valorisation.

CONCLUSION GENERALE

Les eaux Sénégalaises sont classées parmi les plus poissonneuses d'Afrique de l'ouest. Ainsi, la pêche est une composante essentielle du développement économique et sociale du Sénégal. Elle contribue de manière non négligeable aux objectifs de croissance de l'économie nationale, notamment à la réduction du chômage (600.000 emplois directs et indirects).

Au Sénégal, les produits de la pêche sont la principale source de protéines, couvrant ainsi 75% des besoins. La consommation de produits halieutiques y est très prisée puisque ces derniers entrent dans la composition de nombreux plats et particulièrement dans celle du plat national : le "ceebu jen" (riz au poisson).

Ainsi pour une nation dont l'économie et la nutrition de la population sont essentiellement basées sur la pêche, il est important de trouver des voies et moyens pour contribuer au développement de ce secteur.

L'objectif de ce travail est l'étude de procédés originaux de récupération des fractions peptidiques de biomasses marines habituellement non exploitées (co-produits) par techniques douces (hydrolyse enzymatique) visant à une consommation énergétique et un investissement modérés.

Pour réaliser ce travail nous avons utilisé comme matière première les co-produits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) provenant de l'usine 'la pirogue bleue'.

Ainsi, les têtes et les viscères de sole ont été sélectionnés pour être étudiés.

De cette étude, il ressort qu'un pH de 6,2 à 6,31 et une température de 55 à 56,7°C ont été observés au cours de la conduite de l'hydrolyse enzymatique qui a duré une heure (1h). Le poids de l'hydrolysate représente 97% de la matière initiale et celui des arêtes 3%. L'hydrolysate contient 91% de surnageant et 9% de culot. Le culot et le surnageant contiennent respectivement 22% et 7% de

matière sèche. Le dosage des protéines totales donne une moyenne de 24,97% pour le culot et 27,65% pour le surnageant.

Ces résultats montrent que le culot et le surnageant contiennent une quantité suffisante de protéines pouvant être valorisés, aussi bien dans l'alimentation humaine qu'animale.

La présente étude a ainsi permis de proposer un procédé d'extraction des protéines totales à partir de co-produits de poisson en utilisant l'hydrolyse enzymatique. L'originalité de ce travail de thèse réside dans le fait qu'il ouvre ainsi des perspectives encourageantes à l'utilisation de ces techniques douces, s'inscrivant dans une politique actuelle de développement durable et de gestion des bio-ressources.

Références bibliographiques

1. Abdul-Hamid A.; Bakar J.; Bee, et G.H., 2002
Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chem.*, **78**: 69-74.
2. Adler-Nissen J., 1986
Enzymic hydrolysis of food proteins. *New York: Elsevier, Applied Science Publishers.*: 110-69.
3. Anderson J.S.; Lall S. P.; Anderson D.M. et McNiven M.A., 1993
Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. *Aquaculture*, **115**: 305 – 325.
4. Andrieux., 2004
La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture: état des lieux et analyse. *Etudes de l'Ofimer* : 63
5. Aspino S.I.; Horn S. J. et Eijsink V. G. H. - Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) 2005
viscera as a component of microbial growth media. *Process Biochem.*, **40**: 3714-22.
6. Aubertin Severine, 2004
Valorisation des protéines de Merlan Bleu sous forme de poudre.
Thèse de doctorat ; Spécialité : UFR Sciences et Sciences de l'ingénieur
Lieu de soutenance : Université de Bretagne - Sud
7. Bradford M., 1976
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**:248-54.
[développement initial de la méthode au bleu de Coomassie]
8. Ching L.H 1999
Les nouvelles de l'IFREMER : valorisation des co-produits Juin 99, N°5.
<en ligne> - [accès internet] [www.ifremer.fr/bibliomer/ document/so](http://www.ifremer.fr/bibliomer/document/so) 2005
9. Córdova-Murueta J.H. et García-Carreno F.L., 2002
Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, **210**: 371-84.

10. Cuvellier G.F., 1999
Enzymologie et biocatalyse. *Dans* Biotechnologie. Paris :*Tec et Doc, Lavoisier, Paris* : 319-42.
11. Dumay J., 2006
Extraction de lipides en voie aqueuse par bioreacteur enzymatique combiné à l'ultracentrifugation : application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*).
Thèse de doctorat ; Spécialité : bioprocédés et biotechnologies marines
Lieu de soutenance : Ecole Polytechnique de l'Université de Nantes
12. Dong Y.L.; Sheng G. Y.; Fu J. M. et Wen K. W., 2005
Chemical characterization and antianaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongata*. *J. Sci. Food Agric.*, **85**: 2033-39.
13. F.A.O 1998
The state of world fisheries and aquaculture. Rome, Italy
14. Fitzgerald A.J.; Rai P. S.; Marchbank T.; Taylor G. W.; Ghosh S.; Ritz B. W. et Playford R. J., 2005
Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut*, **54**:775-81.
15. Gauthier D., 2006
Introduction aux techniques utilisées en biochimie : le dosage des protéines .
<en ligne> [accès internet]
www.chimiebiochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/prodosage.
16. Gildberg A., 1993
Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.*, **28**: 1-15.
17. Gildberg A.; Brgwald J.; Johansen A. et 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. *Comp. Biochem. Physiol.*, **114 B**: 97-101.
18. Gildberg A.; Arnesen J. A. et Carlehög M., 2002
Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.*, **38**: 475-80.

19. Guérard F. ; Dufossé L. ; De La Broise D. et Binet A., 2001
Enzymatic hydrolysis of protein from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **11**: 1051-9.
20. Guérard F., Batista I., Pires C., Thorkelson G., et Le Gal Y., 2004
Report on sources and selection criteria for raw material. *Rapport établi pour le programme SEAFOODplus.*- 57
21. Gornall; Bardawill et David, 1949
J. Biol. Chem. 177: 751. [Mise au point d'une méthode quantitative pour doser les protéines avec le biuret]
22. Hoyle N.T. et Merrit J. H., 1994
Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.*, **59**: 76-9.
23. Direction des Pêches Maritimes (DPM); Centre de Recherche Océanographiques de Dakar-Thiaroye(CRODT)
Rapport final : Etude de l'évaluation et de la gestion des ressources halieutiques en République de Sénégal. Dakar, direction des pêches maritimes
24. Institut Français pour la Nutrition, 1997
Les protéines – Tome 2 : Caractéristiques des différentes sources de protéines alimentaires.
Paris : IFN.- Dossier spécifique N°9 bis .
25. Jones D.A., 1995
Frippak – the facts. A response to the article by P.R. Muir and D.C Sutton. *J. Word Aquacult. Soc.*, **26**(2):220-222.
26. Jun S.Y.; Park P. J.; Jung W. K., et Kim S. K., 2004
Purification and characterization of an antioxydative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Technol.*, **219**: pp 20-6.
27. Kim S.K. et Mendis E., 2006
Bioactive compounds from marine processing by-products - A review. *Food Res. Int.*, **39**:383-93.
28. Kristinsson H.G. et Rasco B. A., 2000
Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*, **40**: 43-81.

29. Lalasidis G., Boström S. et Sjöberg L. B., 1978
Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: chemical composition and nutritive values. *J. Agric. Food Cehm.*, **28**: 751-6.
30. Liaset B., Julsham K., et Espe M., 2003
Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex. *Process Biochem.*, **38**: 1747-59.
32. Liaset B.; Lied E. et Espe M., 2000
Enzymatic hydrolysis of by-products from the fishfilleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric.*, **80**: 881
33. Larbier M. et Leclercq B., 1992
Les matières premières utilisées en aviculture (225 – 301). in : *nutrition et alimentation des volailles*, Paris :INRA
34. Lowry O. H.; Rosebrough N.J.; Farr A.L. et Randall R. J., 1951
Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 256 – 275.
35. Lynch et coll. (1998)
Lynch J.M.; Barbano D.M. et Fleming J.R. – Indirect and direct determination of the casein content of milk by Kjeldhal nitrogen analysis: collaborative study. *J. AOAC Int.*
36. Mackie I.M., 1982
General review of fish protein hydrolysates. *Animal Feed Sci. And Technol.*, **7**: 113-24.
37. Martin A.M. et Chintalapati S. P., 1989
Fish offal-peat compost extracts as fermentation substrate. *Biological wastes*, **27**: 281-8.
38. Martone et al. (2005)
Martone C.B.; Pérez Borla O. et Sán chez J. J., 2005
Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and aracha growth media. *Bioresource Technol.*, **96**: 383-87.
39. Merritt J.H., 1982
Assessment of the production costs of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **1**: 147-51.

40. Ndoye F.; Moïty-maïzi P. et Broutin c. 2002
Le poisson fumé sur la petite côte Senegalaise
41. Ørskov E.R. ; Soliman H. S. et Clark C. F. S., 1982
Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **7**: 135
42. Ouellet D.R.; Seoane J. R.; Veira D. M. et 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. *Anim. Feed Sci. Tech.*, **68**: 307-26.
43. 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.
44. Quaglia G.B. et Orban E., 1987
Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.*, **38**: 271-6.
45. Rajapakse N.; Jung W. K.; Mendis E.; Moon S. H. et Kim S. K., 2005
A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, **76**: 2607-19.
46. 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*
47. Ravallec-Plé R. et Van Wormhoudt A., 2003
Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **134**: 669-79.
48. Rousseau M.; Batista I.; Le Gal Y. et Fouchereau-Péron M., 2001
Purification of a functional competitive antagonist for calcitonin gene related peptide action from sardine hydrolysate. *EJB*, **4**: 25-32.
49. Shahidi F.; Han X. et Synowiecki J., 1995
Production and characteristics of protein hydrolystae from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.*, **53**: 285-93.

50. Seret B., 1981

Poisson de mer de l'Ouest Africain tropical. (Initiation documentation technique N° 49)

Paris : ORSTM.

Illustration : Pierre OPIC

51. Šližyte R.; Daukšas E.; Falch E.; Storrø I. et Rustad T., 2005

Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.*, **40**: 2021-33.

52. 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.



SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR

« Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, fondateur de l'enseignement vétérinaire dans le monde, je promets et je jure devant mes maîtres et mes aînés :

- d'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire ;
- d'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le code de déontologie de mon pays ;
- de prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire ;
- de ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.



Que toute confiance me soit retirée s'il advient que je me parjure. »

RESUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des co-produits issus de la chaîne de transformation de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) en filet, par la mise en oeuvre de techniques douces (hydrolyse enzymatique) visant à un investissement et une dépense énergétique modérés afin d'obtenir des composés d'intérêt.

Pour ce travail, l'étude a été appliquée aux co-produits (tête et viscères) de la sole tropicale avec l'enzyme protamex. L'objectif étant de libérer les protéines totales et ensuite les doser par la méthode de Kjeldahl, en réalisant au préalable une hydrolyse enzymatique des co-produits (têtes et viscères). L'hydrolysats obtenu est centrifugé et on obtient deux principales phases (la phase soluble ou surnageant et la phase insoluble ou culot). Après passage à l'étuve de ces deux phases, la récupération des matières sèches a permis le dosage des protéines totales.

Des résultats, il ressort qu'un pH de 6,2 à 6,31 et une température de 55 à 56,7°C ont été observés au cours de la conduite de l'hydrolyse enzymatique qui a duré une heure (1h). Le poids de l'hydrolysats représente 97% de la matière initiale et celui des arêtes 3%. L'hydrolysats contient 91% de surnageant et 9% de culot. Le culot et le surnageant contiennent respectivement 22% et 7% de matière sèche. Le dosage des protéines totales donne une moyenne de 24,97% pour le culot et 27,65% pour le surnageant

La présente étude a ainsi permis de proposer un procédé d'extraction des protéines totales à partir de co-produits de poisson en utilisant l'hydrolyse enzymatique. L'originalité de ce travail de thèse réside dans le fait qu'il ouvre ainsi des perspectives encourageantes à l'utilisation de ces techniques douces, s'inscrivant dans une politique actuelle de développement durable et de gestion des bio ressources.

Mots clés : soles, co-produits, hydrolyse enzymatique, valorisation

Adresse: Rose Eliane PENDA,
BP 30432 Yaoundé (Cameroun)
Tél: + (237) 77 46 23 88, + (221) 66 83 33
E-mail : eliopend@yahoo.fr