



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire de Science et Génie Alimentaires

THESE

Présentée à l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Par

Grodji Albarin GBOGOURI

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'INPL**

Spécialité : **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires**

**CO-VALORISATION DES PROTEINES ET DES LIPIDES RICHES EN LECITHINE
ET EN ACIDES GRAS POLYINSATURES OMEGA 3 A PARTIR DE TETES DE
SAUMON (*Salmo salar*) PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE**

Soutenue publiquement le 22 septembre 2005 devant la commission d'examen

Membres du Jury :

Rapporteurs :

Monsieur Michel PINA, Directeur de Recherche CIRAD, Montpellier
Madame Claude GENOT, Chargée de Recherche INRA, Nantes

Examineurs :

Monsieur Jacques FANNI, Professeur, INPL-ENSAIA, Nancy
Monsieur Joël HARDY, Professeur, INPL-ENSAIA, Nancy
Monsieur Michel LINDER, Maître de Conférences, HDR, INPL-ENSAIA,
Nancy

AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de science et génie alimentaires de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, sous la direction du Professeur Jacques FANNI et la co-direction du Docteur Michel LINDER, HDR, à l'Institut National Polytechnique de Lorraine.

Je tiens à remercier le Professeur Jacques FANNI pour sa disponibilité, son soutien scientifique et l'autonomie qu'il a su me donner tout au long de cette thèse.

Je remercie très chaleureusement le Docteur Michel LINDER pour sa disponibilité quasi-immédiate, son soutien scientifique et ses conseils.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Stéphane DESOBRY, Directeur du laboratoire pour m'avoir accepté au sein du laboratoire.

Toute ma reconnaissance va à l'endroit du Professeur Michel PAMENTIER pour ses conseils et son aide durant ses quatre années au laboratoire.

Je tiens à remercier Mr Joël HARDY, Professeur à l'INPL-ENSAIA, pour avoir accepté de présider le jury de thèse.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à Madame Claude GENOT, HDR, Chargée de Recherche à l'INRA et à Monsieur Michel PINA, Directeur de Recherche au CIRAD, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Tous mes remerciements à l'endroit de Madame Marie Noëlle Maucourt et Carole pour leur soutien technique et leur disponibilité éloquente.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du laboratoire de science et génie alimentaires notamment les doctorants, Elmira, Sandrine, Reine, Ghazlène, Elie DJANTOU et tous ceux que je n'ai pas pu citer.

Je n'oublierai pas mon épouse Doudou Patricia pour sa patience, sa compréhension pendant la rédaction et son aide pour la préparation à la soutenance. Je pense aussi à mon fils.

Merci à mes amis Adou, Dje et Arsène pour leur soutien.

Merci à mon père et à ma mère pour leur soutien pendant toutes ces années d'études.

Merci à mon Oncle Grodji Honoré pour son soutien spirituel.

Publications :

- Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by-products hydrolysates (Journal of food science, Vol. 69 (8): C615-C622. 2004)
- Marine lecithin: Valuable source of long chain polyunsaturated fatty acids extracted from salmon heads (*Salmo salar*) by enzymatic process (Article soumis à Lipid Science and Technology)

Communications scientifiques :

- Communication orale au congrès Agoral de novembre 2004 à Nantes (16^{ème} édition) : Extraction enzymatique des protéines et des lipides riches en acides gras polyinsaturés et en phospholipides à partir des têtes de saumon (*Salmo salar*).
- Poster : Extraction enzymatique et caractérisation des phospholipides de tête de saumon (Séminaire école doctorale RP2E, janvier 2004 à Nancy).
- Poster : Valorisation des protéines de têtes de saumon (Séminaire « doctorale octobre 2002 » à la Bresse).
- Poster : Polyunsaturated fatty acids in phospholipids and triacylglycerols in Atlantic salmon heads (*Salmo salar*): a potential by-product as "marine lecithin" (Congrès EuroFed, septembre 2004, Edingbourg, Ecosse)

ABREVIATIONS

A :	absorbance
AE :	activité émulsifiante
AGMI :	acide gras monoinsaturé
AGPI :	acide gras polyinsaturé
AGPI-LC :	acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AGS :	acide gras saturé
B :	consommation de base
BHA :	butyl-hydroxyl-anisole
BHT :	butyl-hydroxyl-toluène
CCM :	chromatographie sur couche mince
CCM-DIF :	chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme
CE :	capacité émulsifiante
Da :	dalton
DH :	degré d'hydrolyse
DHA :	acide docosahexaénoïque
E/S :	rapport Enzyme / Substrat
EPA :	acide eicosapentaénoïque
g :	gramme
h :	nombre de liaisons peptidiques clivées
h _{tot} :	nombre total de liaisons peptidiques
IA :	indice d'acide
IAE :	indice d'activité émulsifiante
II :	indice d'iode
IP :	indice de peroxyde
IS :	indice de saponification
J/g :	joule par gramme
kDa :	kilodalton
LDL :	lipoprotéine de faible densité
LPC :	lysophosphatidylcholine
m ² :	mètre carré
mg :	milligramme
mM :	millimolaire
Mp :	masse protéique
NaOH :	hydroxyde de sodium
Nb :	normalité de la base
nd :	non déterminé
nm :	nanomètre
NS :	azote soluble
NT :	azote total
PAG :	Protein Advisory Group
PAGE :	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PC :	phosphatidylcholine
PE :	phosphatidyléthanolamine
PI :	phosphatidylinositol

PL :	phospholipide
PS :	phosphatidylsérine
SDS :	dodécyl sulfate de sodium
SE :	stabilité émulsifiante
SPM :	sphingomyéline
T :	turbidité
TAG :	triacylglycérol
TCA :	acide trichloroacétique
UA :	unité Anson
V _a :	volume aqueux
V _t :	volume total
ι :	distance parcourue par la lumière
Φ :	volume de la phase d'huile
μg :	microgramme
μl :	microlitre
μm :	micromètre
ΔT :	différence de turbidité
Δt :	différence de temps
Σ :	somme
Å :	Angström

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

I. INTRODUCTION GENERALE.....	2
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
II.1. Production et valorisation des co-produits de poisson.....	9
II.1.1. Notions de co-produits et de déchets.....	9
II.1.2. Les co-produits de la pêche et de l'aquaculture française.....	9
II.1.3. Valorisation des co-produits du poisson.....	11
II.1.4. Quelques produits dérivés destinés à l'alimentation humaine ou animale.....	11
II.2. Les protéines de poisson	13
II.2.1. Les différents modes d'extraction.....	13
II.2.2. Hydrolyse enzymatique et amertume des hydrolysats.....	20
II.2.3. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques.....	21
II.3. Les Lipides de poissons.....	28
II.3.1. Généralités sur les lipides.....	28
II.3.2. Méthodes d'extraction des lipides.....	34
II.3.3. Des acides gras essentiels aux acides gras polyinsaturés à longue chaîne... ..	37
II.3.4. L'huile de poisson : source d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne.....	39
II.3.5. Les phospholipides du poisson.....	42
II.3.6. Quelques actions bénéfiques des acides gras polyinsaturés de l'huile de poisson.....	44
II.3.7. Stabilisation des huiles riches en AGPI contre l'oxydation.....	47
II.3.8. Les méthodes de concentration des huiles en acides gras polyinsaturés.....	48
II.4. Conclusion.....	53
III. MATERIELS ET METHODES.....	54
III.1. Analyse des co-produits de saumon.....	57
III.1.1. Origine des co-produits.....	57
III.1.2. Caractéristiques morphologiques des têtes de saumon.....	57
III.1.3. Préparation et conditionnement du substrat.....	58
III.1.4. Analyse physico-chimique du substrat.....	58
III.1.5. Dosage des acides aminés.....	61
III.2. Hydrolyse enzymatique des protéines.....	62
III.2.1. Enzymes utilisées.....	62

III.2.2. Protocoles expérimentaux.....	63
III.2.3. Optimisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique.....	65
III.3. Hydrolysats protéiques.....	68
III.3.1. Caractérisation de la taille des peptides des hydrolysats protéiques	68
III.3.2. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques	69
III.4. Fractions lipidiques des co-produits de saumon.....	71
III.4.1. Extraction des lipides.....	71
III.4.2. Analyse des lipides.....	73
III.4.3. Développement de la chromatographie sur couche mince	76
III.4.4. Fractionnement des classes de lipides sur colonne.....	84
III.4.5. Analyse thermique des huiles par calorimétrie différentielle.....	84
III.4.6. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.....	84
IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	87
IV.1. Introduction.....	90
IV.1.1. Les objectifs de l'étude.....	90
IV.1.2. Nature et composition physico-chimique des co-produits.....	90
IV.1.3. Choix des protéases.....	91
IV.2. Fraction protéique des têtes de saumon	92
IV.2.1. Hydrolyse des protéines et cinétique enzymatique.....	92
IV.2.2. Propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques.....	107
IV.2.3. Conclusion	112
IV.3. Fraction lipidique des têtes de saumon.....	112
IV.3.1. Extraction des lipides.....	112
IV.3.2. Séparation des classes de lipides par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®).....	120
IV.3.3. Composition en acides gras des lipides.....	125
IV.3.4. Composition en acides gras des lipides polaires et des lipides neutres de l'huile des culots protéiques.....	127
IV.3.5. Analyse thermique différentielle des lipides	129
IV.3.6. Conclusion.....	133
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	134

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139
ANNEXES.....	154

INTRODUCTION GENERALE

I. INTRODUCTION GENERALE

Les industries de la pêche et de l'aquaculture génèrent une quantité considérable de co-produits au cours des opérations de transformation telles que le filetage, l'étêtage, l'éviscération, le pelage, ...etc. Ces co-produits également appelés « 3^{ème} filet » par extension, sont principalement composés de têtes, de viscères, de peaux et d'arêtes. On estime que 50 % du poids de la production mondiale de poissons sont écartés comme co-produits lors des opérations de transformation (Mackie et *al.*, 1982 ; Jeon et *al.*, 1999, Kristinsson et Rasco, 2000 a).

En 2002, en France, les industries de la filière halieutique et de l'aquaculture ont généré environ 150000 tonnes de co-produits représentant 47 % de la production totale brute (Andrieux, OFIMER 2003).

Face au risque de pollution environnementale que représentent ces écarts de poissons et à la demande grandissante en nutriments issus du poisson, une attention particulière est accordée aux co-produits qui représentent une source potentielle de protéines et de lipides riches en acides gras polyinsaturés (Liaset et *al.*, 2000 ; Gilberg et *al.*, 2002, Aspino et *al.*, 2005).

Les co-produits de poisson sont valorisés traditionnellement par transformation en farine qui représente environ 29 à 30 % de la production mondiale de co-produits (Rebeca et *al.*, 1991 ; Valdimarsson et James, 2001). Ces farines sont principalement destinées à l'alimentation animale.

Parmi les techniques modernes de valorisation de protéines, l'emploi d'enzymes alimentaires, notamment les protéases, connaît un succès considérable. Ce procédé permet une meilleure solubilisation des protéines sous forme d'hydrolysats protéiques. C'est un procédé moins onéreux et relativement facile à maîtriser, aboutissant à l'obtention de produits possédant des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles particulièrement intéressantes pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Liceaga et Li-Chan, 1999 ; Kristinsson et Rasco, 2000 a, 2000 b ; Liaset et *al.*, 2000 ; 2003).

A côté des protéines, les co-produits représentent aussi une source importante de lipides, particulièrement d'acides gras polyinsaturés n-3 et des micro-nutriments tels que les vitamines A et D, le calcium, le magnésium, le phosphore.

On connaît bien aujourd'hui l'exceptionnelle valeur nutritionnelle des poissons d'eau froide, liée à leur richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI), notamment en acide

éicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et en acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3). De nombreux travaux montrent que ces molécules jouent un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose ((Bang et Dyerberg, 1972 ; Socini et *al.*, 1983 ; Nair et *al.*, 1997 ; Zyriax et Windler, 2000), ainsi que dans les fonctions cognitives et le développement du système nerveux central du fœtus (Ackman, 1999 ; Hartvigsen et *al.*, 2003 ; Bourre, 1996).

A ce jour, les méthodes utilisées pour l'extraction des huiles sont d'abord celles qui emploient des solvants organiques et celles qui utilisent la cuisson-pressage.

L'extraction par les solvants organiques est basée sur la solubilité des lipides, ce qui permet de les isoler des autres constituants non lipidiques. Sa transposition à l'échelle industrielle peut être problématique à cause de la grande consommation de solvants organiques et des probables traces de solvants que l'on retrouve dans l'huile finale (Christie, 1982).

La méthode d'extraction classique par cuisson - pressage est un procédé industriel réalisé sur des espèces riches en huile, comme le menhaden, la sardine, le hareng, l'anchois, le maquereau. La cuisson peut se faire par injection directe de vapeur (90 - 95 °C) ou par chauffage indirect à la vapeur afin de coaguler ou dénaturer les protéines (Takahashi et Mitsui, 1923 ; Crowther et *al.*, 2000).

L'objectif général du présent travail consiste à proposer un procédé de valorisation des têtes de saumon afin de favoriser leur utilisation en alimentation humaine. Pour ce faire, nous avons choisi le procédé d'hydrolyse enzymatique qui permet une valorisation concomitante des fractions protéiques et lipidiques. Ce procédé, contrairement aux procédés classiques d'extraction d'huiles marines par "cuisson-pressage" ou par solvants organiques, est conduit dans des conditions douces de température (inférieure à 60 °C) susceptible de garantir à la fois la qualité alimentaire des produits et la stabilité des huiles riches en acide gras polyinsaturés. Ce procédé peut être appliqué à d'autres sources halieutiques.

Une synthèse bibliographique présente une vue générale sur les traitements des co-produits de poissons et nous a permis de choisir le procédé et les conditions d'hydrolyse par voie enzymatique.

La première partie du travail expérimental a été consacrée au paramétrage et à l'optimisation de la protéolyse des têtes de saumon atlantique (*Salmo salar*). L'influence des paramètres de

température, de pH et de rapport enzyme / substrat a été modélisée par planification expérimentale en utilisant une matrice de Doehlert. Les courbes d'isoréponses obtenues permettent de choisir les conditions optimales d'extraction.

Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques ainsi obtenues ont été caractérisées en fonction du degré d'hydrolyse (DH). Ainsi, la solubilité, la taille des peptides, la capacité et la stabilité émulsifiantes, de même que la capacité d'absorption d'huile ont été évaluées.

La deuxième partie expérimentale a été consacrée à l'extraction des lipides en l'absence de solvant organique, conséquence de la déstructuration enzymatique du tissu protéique. La comparaison de ce procédé enzymatique aux procédés classiques d'extraction des huiles, notamment l'extraction par solvants organiques et l'extraction aqueuse par cuisson, a été abordée en terme de rendement d'extraction, de composition en classes de lipides et de composition en acides gras. Dans ce cadre la chromatographie sur couche mince couplée à la détection par ionisation de flamme (Iatroscan[®]) permet de quantifier la proportion relative de triacylglycérols ainsi que la nature des différents lipides polaires.

D'autres fractions issues de la centrifugation qui suit le procédé d'hydrolyse notamment la couche de lipides émulsionnés, ainsi que la phase dense constituée de résidus insolubles ont été également analysées. Cette phase dense est généralement considérée comme un sous-produit ultime de l'hydrolyse enzymatique et elle est donc rejetée.

Il nous a paru pertinent de déterminer la teneur en lipides polaires de ces fractions marginales, notamment en phospholipides connus pour leur richesse en acides gras polyinsaturés n-3 à longues chaînes, dont les principaux représentants sont l'acide docosahexaénoïque et l'acide éicosapentaénoïque.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Production et valorisation des co-produits de poisson.....	9
II.1.1. Notions de co-produits et de déchet	9
II.1.2. Les co-produits de la pêche et de l'aquaculture française.....	9
II.1.3. Valorisation des co-produits du poisson	11
II.1.4. Quelques produits dérivés destinés à l'alimentation humaine ou animale.....	11
II.1.4.1. Les farines et huiles brutes de poisson.....	11
II.1.4.2. Les hydrolysats de protéines	12
II.1.4.3. Hachis congelé.....	13
II.1.4.4. Autres produits dérivés.....	13
II.2. Les protéines de poisson.....	13
II.2.1. Les différents modes d'extraction.....	13
II.2.1.1. Procédés chimiques.....	13
II.2.1.2. Procédés enzymatiques d'hydrolyse des protéines.....	14
II.2.1.2.1. Les protéases utilisées en industries alimentaires.....	14
II.2.1.2.2. Mécanisme et cinétiques de l'hydrolyse enzymatique.....	16
II.2.1.2.3. Les paramètres de contrôle de l'hydrolyse enzymatique.....	17
II.2.1.2.3.1. Le rapport enzyme / substrat et la concentration du substrat.....	17
II.2.1.2.3.2. Le pH et la température.....	18
II.2.1.2.4. Le degré d'hydrolyse (DH).....	19
II.2.2. Hydrolyse enzymatique et amertume des hydrolysats.....	20
II.2.3. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques.....	21
II.2.3.1. La solubilité.....	21
II.2.3.2. La capacité d'hydratation.....	22
II.2.3.3. La capacité d'absorption d'huile	23
II.2.3.4. Les propriétés émulsifiantes.....	24
II.2.3.4.1. L'activité émulsifiante.....	24
II.2.3.4.2. Influence de l'hydrolyse enzymatique sur l'activité émulsifiante.....	25
II.2.3.4.3. La capacité émulsifiante.....	25
II.2.3.4.4. La stabilité émulsifiante.....	26
II.2.3.5. Les propriétés moussantes.....	27

II.2.3.6. La caractérisation des hydrolysats par la taille des peptides.....	27
II.3. Les lipides de poissons.....	28
II.3.1. Généralités sur les lipides.....	28
II.3.1.1. Définitions des lipides.....	28
II.3.1.2. Structure et nomenclature des acides gras.....	28
II.3.1.3. Les glycérides.....	31
II.3.1.4. Les phospholipides.....	32
II.3.1.5. Autres constituants.....	33
II.3.2. Méthodes d'extraction des lipides.....	34
II.3.2.1. Extraction analytique des lipides par solvants organiques.....	34
II.3.2.2. Extraction industrielle des huiles de poisson.....	36
II.3.3. Des acides gras indispensables aux acides gras polyinsaturés à longue chaîne.....	37
II.3.4. L'huile de poisson : source d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne.	39
II.3.5. Les phospholipides du poisson.....	42
II.3.6. Quelques actions bénéfiques des acides gras polyinsaturés de l'huile du poisson.....	44
II.3.6.1. Acides gras polyinsaturés et pathologies cardiovasculaires.....	44
II.3.6.2. Acides gras polyinsaturés et cancer.....	45
II.3.6.3. Besoin d'acides gras polyinsaturés durant la grossesse.....	46
II.3.6.4. Sensibilité à l'oxydation des acides gras polyinsaturés.....	46
II.3.7. Stabilisation des huiles riches en AGPI contre l'oxydation.....	47
II.3.8. Les méthodes de concentration des huiles en acides gras polyinsaturés.....	48
II.3.8.1. La complexation à l'urée.....	48
II.3.8.2. La wintérisation ou cristallisation à basse température.....	50
II.3.8.3. Concentration par des lipases spécifiques.....	49
II.3.8.4. Autres méthodes de concentration en AGPI.....	52
II.4. Conclusion.....	53

II.1. Production et valorisation des co-produits de poisson

II.1.1. Notions de co-produits et de déchets

Dans les chaînes de traitement et transformation des produits agro-alimentaires destinés à l'alimentation humaine, de nombreux sous-produits sont générés. Dans le cas de filière des produits de la mer et de l'aquaculture, les co-produits encore appelés « 3^{ème} filet », sont principalement composés de viscères, de têtes, d'arêtes et de peaux. Ils sont traités dans les mêmes conditions hygiéniques que la partie comestible.

La qualification de « co-produit » est due au fait qu'ils peuvent représenter une valeur ajoutée pour celui qui les génère. En revanche, si aucun débouché commercial n'existe et qu'ils doivent être détruits, ils sont alors considérés comme des « déchets » (Andrieux, rapport de DESS de l'Office National Interprofessionnel des Produits de la Mer et de l'Aquaculture : OFIMER, 2003).

Le terme de déchet est aussi défini comme « produits rejetés » ou « écartés » lors du traitement ou de la transformation des produits principaux et des sous produits (Suparno et Poernomo, 1992).

Les notions de co-produits ou de déchets ont un caractère variable avec les années, les modifications des réglementations et le contexte socio-économique. La crise de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et de la bioaccumulation de la dioxine dans la chaîne alimentaire ont limité la valorisation des co-produits en raison du manque de normalisation et du non respect de la qualité des produits.

II.1.2. Les co-produits de la pêche et de l'aquaculture française

Les pêcheries françaises, réparties sur tout le littoral français, de la Manche au Golfe de Gascogne et sur la Méditerranée, sont caractérisées par une grande diversité avec plus de 70 espèces de poissons cartilagineux et osseux. L'aquaculture française quant à elle, regroupe la conchyliculture, les piscicultures en eau douce et en eau marine. La pisciculture en eau marine se limite essentiellement à l'élevage de la daurade, du saumon, de la truite, du turbot et du bar. La truite est l'espèce dont la production est réellement importante, alors que le saumon est importé en masse des pays nordiques avec près de 90000 tonnes en 2002 (Andrieux, OFIMER 2003). La quantité de co-produits générée par la filière pêche et l'aquaculture en 2002, en France, atteint les 150000 tonnes pour environ 320000 tonnes de produits bruts traités, soient environ 47 % du tonnage destinés à la transformation (Andrieux, OFIMER 2003).

Les espèces générant les co-produits sont en majorité des poissons blancs, des poissons bleus, des salmonidés, des cartilagineux, et des céphalopodes. Les manipulations à l'origine des co-produits sont l'éviscération, l'étêtage, le filetage, le pelage et les étapes de lavage, de congélation ou de cuisson (**Tableau II.1**). Les co-produits sont obtenus dans la chaîne de transformation de la filière pêche et aquaculture à plusieurs niveaux. Les producteurs sont les pêcheurs, les mareyeurs, les conserveurs, les saleurs-saurisseurs et les industries de transformation de produits piscicoles et marins.

Valdimarsson et James (2001) estiment qu'à l'échelle mondiale 25 % des prises de la pêche marine sont abandonnées, 30 % sont transformées en farines et en huile de poisson et 37 % sont destinées à la consommation humaine.

Tableau II.1. Typologie exhaustive des co-produits de la filière pêche et aquaculture (d'après Andrieux, 2003)

Obtention du co-produit	Type de co-produit	Co-produits
Eviscération	Viscères	Appareil digestif, cœur, foie, œufs, laitance, vessie natatoire, encre de céphalopode
	Coquille interne (mollusques céphalopodes)	Os de seiche (calcaire et chitineux), plume de calmar (chitineux)
Etêtage	Têtes	Branchies, collet, joues, langues, organe palatin, os et cartilages, tête/tentacules, yeux
	Carapaces de crustacés	Céphalothorax
Filetage	Arêtes	Arêtes osseuses, cartilages, chair adhérente aux arêtes, nageoires dorsales et caudales
	Chutes de parage de filets	Chute de coupe en "V", ligaments, nageoires ventrales et pectorales, ventrèches
Pelage	Peaux	Derme, écailles, gras et chair sous-cutanée, mucus
Décorticage	Carapaces de crustacés	Carapace
Ecorçage	Coquilles externes (mollusques bivalves et gastéropodes)	Coquille calcaire
Lavage	Eaux de lavage	
Décongélation	Eaux de décongélation	Effluents riches en protéines
Cuisson	Eau de cuisson	

II.1.3. Valorisation des co-produits du poisson

Les pêcheries et l'aquaculture françaises génèrent une grande diversité de co-produits potentiels dont la valorisation optimale n'est pas encore réalisée. Les co-produits d'origine aquatique font surtout l'objet d'une valorisation de masse sous forme de farine, d'huile, d'hydrolysats de protéines et de hachis congelés destinée en majorité à l'alimentation animale (**Figure II.1**).

L'amélioration de la performance de la filière halieutique nécessite une gestion durable des ressources marines. A partir d'un co-produit donné (viscères, têtes, arêtes, peaux par exemple), il est possible d'obtenir différents produits commerciaux qualifiés de « produits dérivés » et non de « produits finis ». Ces produits dérivés peuvent trouver leur application dans trois grandes catégories d'utilisation : l'alimentation humaine, alimentation animale et en cosmétiques.

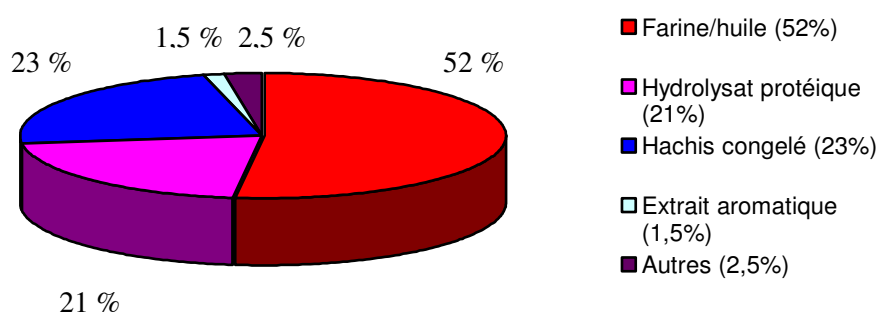


Figure II.1. Répartition de co-produits de la filière aquacole en terme de valorisation en France en 2002 (d'après Andrieux, OFIMER 2003)

II.1.4. Quelques produits dérivés destinés à l'alimentation humaine ou animale

II.1.4.1. Les farines et huiles brutes de poisson

La farine de poisson, destinée principalement à l'alimentation animale, est une source importante de protéines (60 à 70 g / 100 g) et de lipides (5 à 10 g / 100 g). Dans le monde, les farines de poisson sont produites en grande partie à partir de poissons gras (90 %) tels que la sardine, l'anchois, le capelan, le menhaden et à partir d'un peu moins de 10 % d'abats de morue et de haddock (Barlow, 2003).

Les huiles sont obtenues après cuisson, pressage et centrifugation des co-produits, les farines correspondent au résidu séché et broyé (**Figure II.2**). Avant les crises dites de *la vache folle*

et des *dioxines*, c'était une des sources importantes de protéines utilisées pour l'alimentation des poissons d'élevage. Aujourd'hui, le marché des farines de poisson est restreint et réorienté vers les huiles. Environ 74500 tonnes de co-produits sont transformés en farine et huile chaque année en France avec une production de 15000 tonnes de farine et de 5000 tonnes d'huile (Andrieux, OFIMER 2003). La possibilité d'une substitution partielle de ces farines par des farines végétales à des fins nutritionnelles en aquaculture est de plus en plus étudiée (Carter et Hauler, 2001).

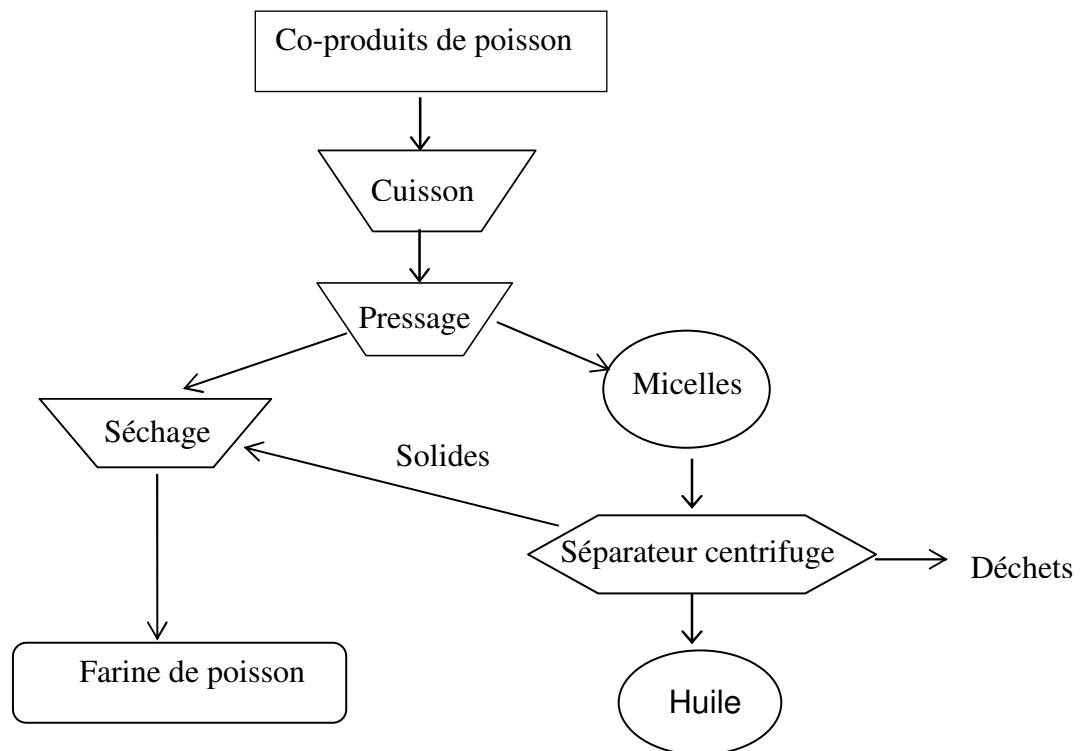


Figure II.2. Production de farine et d'huile de poisson (D'après Pigott et Tucker, 2003)

II.1.4.2. Les hydrolysats de protéines

Les hydrolysats de poisson sont obtenus par hydrolyse enzymatique des co-produits. Ils se présentent sous la forme de farines solubles avec une granulométrie très fine. Ils sont utilisés à 90 % en aquaculture. Ils sont aussi destinés à l'alimentation des jeunes animaux d'élevage afin de favoriser leur croissance.

La France est le leader européen avec une production annuelle de l'ordre de 6000 tonnes (Andrieux, OFIMER 2003).

II.1.4.3. Hachis congelé

Il est obtenu par broyage des co-produits, filtration et congélation en bloc. C'est la troisième valorisation en masse réalisée en France (33000 tonnes en 2002). Le hachis est utilisé pour la fabrication d'aliments pour animaux de compagnie.

II.1.4.4. Autres produits dérivés

Ce sont des produits spécifiquement destinés à être incorporés dans les plats cuisinés, comme ingrédients diététiques et cosmétiques :

- Les pulpes alimentaires : obtenues par séparation mécanique de la chair des chutes de parage de filets, de la chair adhérente à l'arête osseuse et/ou à la tête.
- Les ingrédients diététiques et nutraceutiques : huiles de poisson raffinées (riches en vitamines A et D, et en acides gras "oméga-3"), gélatine, lécithines marines, compléments en minéraux, chondroïtine sulfate.
- Les ingrédients cosmétiques : chitine, collagène, élastine, kératine et squalane.

II.2. Les protéines de poisson

II.2.1. Les différentes modes d'extraction

II.2.1.1. Procédés chimiques

Face au déficit d'apport nutritionnel en protéines, les recherches se sont intensifiées dans les années soixante sur les procédés d'extraction chimiques, en particulier sur les concentrats protéiques de poisson.

Selon le comité consultatif des protéines ou « Protein Advisory Group (PAG) » de la FAO les concentrats protéiques de poisson sont des produits stables propres à la consommation humaine, préparés à partir de poisson entier ou de parties de poisson. Le concentrat protéique est obtenu par élimination des constituants non protéiques, essentiellement les lipides, l'eau et les substances minérales. On utilise les solvants organiques tels que l'isopropanol, le dichloroéthylène. Les conditions d'extraction restent relativement drastiques : utilisation de solvants organiques, traitements thermiques sévères, réactifs chimiques.

Concernant les isolats protéiques, c'est la fraction protéique qui est isolée du milieu complexe. L'opération s'effectue la plupart du temps par une solubilisation des protéines dans un milieu approprié tel que les solutions salines, suivie d'une précipitation des protéines par différentes méthodes (précipitation isoélectrique, relargage par modification de la force ionique, coagulation par la chaleur).

De manière générale, on parle d'un isolat si la teneur en protéines est supérieure à 90 % (g / 100 g); pour des valeurs inférieures à cette teneur et jusqu'à 65 % (g / 100 g), la préparation est appelée concentrat. En dessous de ces valeurs, elle prend la dénomination de farine.

Généralement pauvre en fonctionnalité, le coût de production élevé et les traces de solvant présentes dans le produit final rendent les concentrats protéiques peu compétitifs (Dubrow et *al.*, 1973 ; Finch, 1977). Dans nombre de cas, les concentrats protéiques de poisson sont souvent utilisés comme substrat pour les hydrolyses enzymatiques afin d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles (Cheftel, 1972, Cheftel et *al.*, 1971, ; Hoyle et Meritt, 1994 ; Quaglia et Orban, 1987 a, 1987 b).

Les méthodes d'hydrolyse chimique (acide ou alcaline), restent très limitées, malgré leur faible coût, en raison de la réduction des qualités nutritionnelles et fonctionnelles des produits finaux.

II.2.1.2. Procédés enzymatiques d'hydrolyse des protéines

Compte tenu de leur facilité de mise en œuvre, les procédés enzymatiques offrent des applications plus importantes que l'hydrolyse chimique (Petersen, 1981). L'utilisation des enzymes résulte d'un savoir empirique existant depuis l'antiquité (fermentation du vin et de la bière, lait, pain, papier).

II.2.1.2.1. Les protéases utilisées en industries alimentaires

L'utilisation des protéases en industrie alimentaire est devenue très attractive en raison de leurs diverses applications (**Tableau II.2**), particulièrement en industrie de la viande et du poisson. L'amélioration de la texture et des propriétés fonctionnelles est l'une des premières raisons de l'utilisation de ces enzymes (Cheftel et *al.*, 1971 ; Cheftel, 1972 ; Adler-Nissen, 1982, 1983 ; Blecker et al, 1997 ; Diniz et Martin, 1997 ; Amarowicz et Shahidi, 1997 ; Wilson et *al.*, 1992), vient ensuite la valorisation ou la conversion des protéines des sous-produits pour leur emploi en nutrition humaine et animale (Quaglia et *al.*, 1982 ; Suparno,

Poernomo, 1992 ; Frost, 1992 ; Benjakul et Morrissey, 1997). L'utilisation des protéases dans l'industrie s'inscrit dans plusieurs domaines, tels que les mécanismes de synthèse, en agro-alimentaire et dans l'environnement incluant l'eau, l'air et le sol (Wiseman, 1993).

Les enzymes sont souvent utilisées en industrie des farines de poisson et dans le traitement des eaux de colle riches en protéines issues de la production des farines, contribuant ainsi à une réduction globale du coût, notamment lors des phases d'évaporation (Jacobsen et Ole, 1983 ; Jacobsen, 1984).

Tableau II.2. Application des protéases en industrie de la viande et du poisson (Mohr, 1980)

Industries	Applications	Enzymes
Viande	- Tendreté de la viande	- Protéases végétales
	- Hydrolyse des protéines du sang	- Protéases microbiennes
	- Elimination des résidus carnés	"
Poisson	- Hydrolyse des protéines	- Protéases végétales
	- Réduction de viscosité des "eaux de colle"	- Protéases microbiennes
		"

Parmi les protéases, on distingue les exopeptidases qui exercent leur action à l'extrémité des chaînes et clivent la liaison peptidique de l'acide aminé N- ou C- terminal. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur des chaînes.

Le choix de l'enzyme tient compte de son activité en fonction des propriétés recherchées et de son coût. Hale en 1969, a mesuré l'activité protéolytique de vingt enzymes utilisées dans leurs conditions optimales pour hydrolyser des protéines de poisson. Parmi ces enzymes, la ficine (40 °C, pH 6) est très active pour des réactions d'hydrolyse rapide, la pronase (50 °C, pH 7,5) possède une grande activité par unité de poids. La pepsine (50 °C, pH 2), la papaïne (65 °C, pH 6) et la pancréatine (40 °C, pH 7,5) quant à elles, combinent une bonne activité pour un coût relativement modéré.

Les procédés enzymatiques au niveau industriel n'exigent pas de solutions enzymatiques pures. Ce sont surtout des préparations de pepsine, de chymotrypsine, de trypsine et de pancréatine d'origine animale ou d'origine végétale comme la papaïne, la bromélaïne et la ficine.

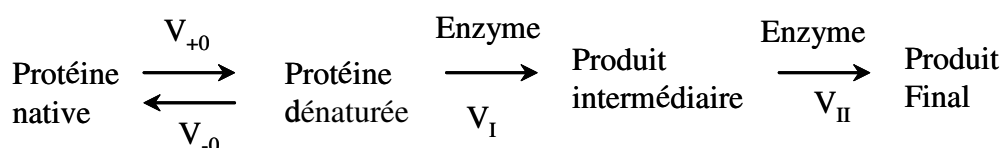
Aujourd'hui les enzymes protéolytiques microbiennes, extraites des bactéries, de levures ou de moisissures sont les plus utilisées à l'échelle industrielle en raison de leur faible coût de production et de leur grande diversité (Frost, 1986).

Ces dernières années, une attention particulière est aussi accordée aux enzymes digestives de poisson et invertébrés marins. Shahidi et Kamil (2001) ont synthétisé les travaux réalisés sur ces enzymes digestives. Ils ont classé ces enzymes en deux grands groupes : les protéases gastriques et les protéases intestinales. Ce sont les pepsines, les chymosines, les gastricsines, les trypsines, les chymotrypsines, les collagénases et les élastases. Ces enzymes sont généralement utilisées dans la dégradation sélective de tissus de poisson (Stoknes et Rustad, 1995), dans la fermentation et les sauces (Owens et Mendoza., 1985), dans la production d'hydrolysats protéiques de poisson (Kristinsson et Rasco, 2000 c, 2000 d ; Gildberg et *al.*, 2002), dans l'extraction de pigments et la coagulation de protéines (Kolkovski, 2001, Cremades et *al.*, 2003).

II.2.1.2.2. Mécanismes et cinétiques de l'hydrolyse enzymatique

La connaissance et la maîtrise des mécanismes enzymatiques sont devenues indispensables parmi les techniques modernes employées en industrie pour la production d'aliments divers destinés à la consommation humaine. La dégradation enzymatique des protéines aboutit à la production d'hydrolysats protéiques valorisables dans de nombreux domaines tels que la pharmacie, l'alimentation humaine et la cosmétique.

Les mécanismes impliquent souvent une réaction catalytique de type interaction enzyme-substrat se résumant au modèle de Linderström-Lang repris par Adler-Nissen (1976, 1986) dans lequel l'hydrolyse initiale de substrat peut conduire à deux types de réactions en fonction de la vitesse de dénaturation des protéines :



(où $V_0 = V_{+0} + V_{-0}$)

L'étape de dénaturation initiale est déterminante dans la réaction d'hydrolyse.

Si $V_0 \ll V_I$, la première réaction est limitante et l'hydrolyse aura lieu selon la cinétique imposée par V_0 . Le mélange réactionnel sera composé de protéines natives et de produits terminaux. Cette réaction est du type « one by one » selon la terminologie de Linderström-Lang.

Si $V_0 \gg V_I$, la protéine native est rapidement convertie en produits intermédiaires, eux-mêmes dégradés en produits terminaux. Cette réaction est dite « zipper ».

Le mécanisme des réactions enzymatiques a intéressé de nombreux auteurs sur divers substrats, notamment les protéines végétales (Adler-Nissen *et al.*, 1982 ; Moreno et Cuadrado, 1993 ; Nouri *et al.*, 1997), les protéines de poisson et animales (Langmyhr, 1981; Vieira *et al.*, 1995 ; Guerard *et al.*, 2001) et la caséine (Krause et Seiler, 1992).

Mohr (1980) a émis l'hypothèse que dans le cas d'une hydrolyse d'un substrat insoluble, les réactions se déroulent en deux étapes : l'enzyme s'associe à la liaison peptidique du substrat préalablement à la réaction d'hydrolyse qui libère un mélange de peptides solubles et d'acides aminés.

La cinétique généralement constatée est une hydrolyse rapide après ajout de l'enzyme, la vitesse de la réaction diminue après avoir atteint une vitesse maximale. Ainsi Moreno et Cuadrado (1993), étudiant l'hydrolyse des protéines de pois, ont suggéré que l'allure de la courbe d'hydrolyse peut être attribuée aux phénomènes suivants :

- décroissance de la concentration en liaisons peptidiques disponibles due à une vitesse initiale de dégradation élevée
- décroissance de l'activité de l'enzyme due à la température
- inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction

II.2.1.2.3. Les paramètres de contrôle de l'hydrolyse enzymatique

La réaction enzymatique est influencée par des paramètres qui permettent de contrôler la vitesse et le degré d'hydrolyse (DH) : la concentration du substrat, le rapport enzyme / substrat (E / S), le pH et la température.

Le contrôle du degré d'hydrolyse peut être obtenu en imposant judicieusement ces paramètres ainsi que la durée de la réaction.

II.2.1.2.3.1. Le rapport enzyme / substrat et la concentration du substrat

Il existe un rapport massique enzyme sur substrat (E / S) optimal, caractéristique de la nature du substrat et de la spécificité de l'enzyme. Cheftel et ses collaborateurs (1971) ont montré que le degré de solubilisation du concentrat lié à l'hydrolyse des protéines de poisson diminuait lorsqu'on augmentait la concentration du concentrat pour une concentration fixe de l'enzyme (la pronase). Cela serait dû à une inhibition de l'enzyme par le produit et à un faible transfert du substrat à l'enzyme. En revanche une augmentation du rapport pronase / concentrat de protéine de poisson favorise la solubilisation des protéines.

Nouri et *al.* (1997) ont observé une augmentation de la vitesse de dégradation de la protéine native de blé proportionnellement à une augmentation de la concentration de l'enzyme (la pepsine). La vitesse maximale passe de $8,47.10^{-6}$ eq -NH₂ / l × min à $12,7.10^{-6}$ eq - NH₂ / l × min respectivement pour des concentrations de pepsine de 2 mg / l à 4 mg / l.

Des études menées par Quaglia et Orban (1987 a) portant sur la valorisation des protéines de sardine par hydrolyse enzymatique montrent que le rapport enzyme / substrat influence le degré d'hydrolyse en fonction de l'enzyme (l'Alcalase 0,6 L, la Neutrase 0,5 L et la Papaïne 60 unités/mg⁻¹) ainsi que la taille des peptides. Avec des rapports enzyme / substrat (E / S) variant entre 0,1 % et 4 % (g / 100 g), ils obtiennent pour l'Alcalase 0,6 L des DH croissant entre 5 % et 30 % ; avec la Neutrase 0,5 L, des DH entre 4 % et 20 % et avec la Papaïne des DH entre 7 % et 24 %.

Guerard et *al.* (2001) ont montré que le DH augmente avec la concentration de l'enzyme, et qu'une hydrolyse prolongée au-delà de 5,5 h n'a plus d'effet significatif sur le DH. Une augmentation notable du DH est observée à des concentrations d'enzymes comprises entre 0 et 28,3 unités Anson / kg. Au-delà de 28,3 unités Anson / kg, une faible augmentation du DH est observée.

II.2.1.2.3.2. Le pH et la température

Le pH est un facteur très important qui doit être maîtrisé, car l'activité enzymatique est entièrement liée à la nature des groupements présents au niveau du site actif de l'enzyme, à leur état d'ionisation ainsi qu'à celui du substrat. Marquez et Fernandez (1998) ont montré que le pH joue un rôle considérable dans le contrôle d'un procédé l'hydrolyse des protéines végétales. De manière générale, chaque enzyme possède un pH optimal autorisant un domaine de variation très restreint, de l'ordre de 0,5 à 1 unité de pH.

Comme pour le pH, chaque enzyme possède une température optimale de fonctionnement qui dépend de plusieurs facteurs : la nature du substrat protéique, le pH et le rapport enzyme / substrat.

Karamac et ses collaborateurs (2002) ont montré une influence de la température sur le degré d'hydrolyse obtenu lors de l'hydrolyse d'isolats de protéines de pois par la trypsine. Adler-Nissen (1982) a montré que le pH et la température ont une influence sur le degré d'hydrolyse. En effet, la variation de pH provoque un changement de la distribution des charges et de la conformation aussi bien au niveau du substrat que de l'enzyme. Quant à la température, il est connu que l'évolution des réactions chimiques suit la loi d'Arrhenius.

Dans des expériences d'hydrolyse du squelette central du saumon par la Protamex, Liaset et ses collaborateurs (2003) ont observé une dépendance mutuelle de ces facteurs. Pour Langmyhr (1981), les molécules d'enzymes se fixent sur les liaisons peptidiques selon un processus rapide dans les conditions optimales de température et de pH.

II.2.1.2.4. Le degré d'hydrolyse (DH)

Le degré d'hydrolyse des liaisons peptidiques peut être mesuré par différentes techniques basées sur trois principes différents : le dosage de la quantité d'azote soluble libéré au cours de la protéolyse, la mesure de la libération des groupements α -aminés par dosage spectrophotométrique et le titrage des protons libérés (technique du pH-stat).

L'avancement de l'hydrolyse est généralement caractérisé par la mesure du nombre d'équivalents de liaisons peptidiques coupées par kg de protéines : h (Adler-Nissen, 1986). Le degré d'hydrolyse est ensuite défini comme étant le rapport du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre de liaisons peptidiques initialement présentes dans la protéine.

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

h_{tot} étant le nombre total initial de liaisons peptidiques par kg de protéines, estimé à 7,501 équivalents mole / kg pour les protéines de saumon (Kristinsson et Rasco, 2000 d)

La méthode de dosage de l'azote soluble libéré au cours de la protéolyse après précipitation au TCA (10 %) a été utilisée par Hoyle et Merritt (1994) pour déterminer le DH d'hydrolysats protéiques de poisson selon l'équation suivante :

$$DH = \frac{\text{Azote soluble de l'échantillon dans du TCA à 10 \%}}{\text{Azote total de l'échantillon}}$$

La méthode la plus utilisée, la plus simple et la plus rapide est la méthode du pH-stat. Elle repose sur le principe du maintien du pH constant par titration continue automatique avec une solution alcaline. La libération des protons issus de la rupture des liaisons peptidiques, qui entraîne une baisse du pH, est compensée par l'ajout d'une base.

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} = \frac{B \times N_B}{\alpha \times MP \times h_{tot}} \times 100$$

B = consommation de solution alcaline en ml (NaOH)

N_b = normalité de la solution alcaline

MP = masse de protéines (NT x 6,25) en g

α = degré moyen de dissociation de groupement α-aminés

h_{tot} = nombre de liaisons peptidiques dans la matière protéique (7,501 méq / g)

La méthode du pH-stat n'est généralement pas préconisée pour des valeurs de pH extrêmes (>11 et < 3) à cause du pouvoir tampon élevé des solutions protéiques (Adler-Nissen, 1986).

II.2.2. Hydrolyse enzymatique et amertume des hydrolysats

Le développement de l'amertume dans les hydrolysats est principalement dû à la libération de peptides hydrophobes lors de la réaction enzymatique. Les auteurs expliquent cette amertume par une exposition des régions hydrophobes des peptides (Adler-Nissen et Olsen, 1979, Adler-Nissen, 1986). En effet, dans une molécule globulaire native, les chaînes hydrophobes sont orientées majoritairement vers l'intérieur de la structure tridimensionnelle et ne peuvent donc réagir avec les papilles gustatives.

L'hydrolyse enzymatique favorise la libération de peptides de taille variable avec des sites hydrophobes exposés développant un goût amer.

Gildberg et al. (2002) ont montré que les hydrolysats de muscle de morue obtenus avec les enzymes bactériennes (Alcalase, Neutrase et Protamex) étaient plus amers que ceux obtenus avec les enzymes tryptiques de la morue. Les premiers contenaient plus d'oligopeptides (inférieurs à 2500 Da) que les seconds.

Kristinsson et Rasco (2000 a) rapportent que la quantité de peptides hydrophobes produits lors de l'hydrolyse dépend de la spécificité des enzymes utilisées. L'hydrolysats de protéines de morue obtenu avec l'Alcalase présente moins d'amertume que celui obtenu avec la Papaïne (Hoyle et Merritt, 1994), alors que l'hydrolyse avec l'Alcalase abouti à un degré d'hydrolyse

plus élevé qu'avec la Papaïne. Cela est sans doute dû à la différence de spécificité des enzymes.

En effet les chaînes latérales hydrophobes des peptides ou acides aminés peuvent interagir et masquer le goût amer. L'hydrolyse enzymatique peut aussi contribuer à la réduction de l'amertume par condensation où agrégation des peptides amers (Stevenson *et al.*, 1998), ou par hydrolyse des peptides amers (Koka et Weimer, 2000).

Saha *et al.* (2001) rapportent dans une revue bibliographique différentes méthodes permettant de diminuer l'amertume des hydrolysats, notamment l'extraction à l'alcool, la chromatographie, la voie enzymatique et par l'intermédiaire de réactions chimiques.

Adler-Nissen et Olsen (1979) ont observé une corrélation entre le degré d'hydrolyse et l'amertume. Il est de ce fait nécessaire de contrôler les réactions d'hydrolyse pour éviter ce phénomène.

II.2.3. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques

La fonctionnalité des hydrolysats est la raison de leur succès comme ingrédients dans les aliments.

L'utilisation des enzymes pour la production d'hydrolysats permet l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéolysats qui peuvent être définies comme l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques que peuvent promouvoir les systèmes alimentaires au cours de leur fabrication, leur conservation et leur consommation.

Les propriétés fonctionnelles des protéines et des hydrolysats protéiques dépendent de nombreuses caractéristiques physico-chimiques (taille et structure des protéines et peptides, composition en acides aminés, distribution des charges, ratio hydrophobie / hydrophilie, flexibilité et rigidité des molécules...).

II.2.3.1. La solubilité

La solubilité est considérée comme l'une des plus importantes propriétés fonctionnelles des protéines et de leurs hydrolysats. D'autres propriétés fonctionnelles comme l'aptitude à l'émulsification et les propriétés moussantes sont affectées par la solubilité, car ces propriétés dépendront de la capacité de ces hydrolysats à se solubiliser (Voutsinas *et al.*, 1983).

Elle est généralement mesurée par l'indice de solubilité de l'azote, défini comme le pourcentage d'azote dans le surnageant par rapport à la quantité d'azote contenu dans la protéine native, après centrifugation de la solution pendant un temps déterminé (Morr *et al.*, 1985).

La solubilité dépend des interactions hydrophobes peptides-peptides, des interactions ioniques peptides-eau, de la taille des peptides et du pH.

Pour les hydrolysats de lactosérum et de caséine, Chobert et *al.* (1988) observent que plus le DH est élevé, plus la solubilité est élevée. La solubilité des hydrolysats enzymatiques augmente quels que soient les valeurs de pH comparativement aux molécules non hydrolysées (Spinelli et *al.*, 1982 ; Venugopal et Shahidi, 1994). Linder et *al.* (1996) ont obtenu une amélioration de la solubilité des hydrolysats de protéines de muscle de veau en relation avec le DH. Un DH élevé permet une bonne solubilité entre pH 7 et 9. Drago et Gonzalez (2001) ont observé une augmentation de la solubilité du gluten du blé pour des DH élevés. Cette amélioration est attribuée à une production de peptides de petite taille et plus hydrophiles. Le même phénomène est observé par Hoyle et Merritt (1994), lesquels ont montré que la solubilité des hydrolysats de hareng est globalement améliorée. Ils l'attribuent à la formation de petits peptides plus hydrophiles et de polypeptides plus solvatés. Ils constatent aussi que les échantillons prétraités à l'éthanol présentent un indice de solubilité plus élevé (97 à 99 %), qui serait dû à l'élimination des lipides des hydrolysats.

Achouri et *al.* (1998) ont observé que la solubilité des hydrolysats de protéines de soja à tous les pH (1 à 12) est bien meilleure que celle d'un isolat. La solubilité de l'hydrolysat est supérieure à 60 % au pH_i, alors que celle de l'isolat n'est que de 5 % à ce même pH_i.

L'hydrolyse des protéines de muscles du saumon par différentes protéases alcalines a été réalisée par Kristinsson et Rasco (2000 b). Ils ont constaté une solubilité supérieure à 90 % aux différents degrés d'hydrolyse (5, 10 et 15 %). La valeur maximale a été obtenue avec l'Alcalase à un DH de 5 % et à pH 7.

Quaglia et Orban (1987 a) ont étudié la solubilité des hydrolysats de protéines de sardine obtenus avec l'Alcalase : quelle que soit le DH (5 à 20 %), la solubilité est supérieure à 90 % pour des pH de 5 à 9. La solubilité des hydrolysats dépend de la nature de l'enzyme et de sa spécificité vis à vis des liaisons peptidiques. Shahidi et *al.* (1995) observent que la solubilité des hydrolysats de capelan est bonne et varie selon le type d'enzyme. L'hydrolysat obtenu avec l'Alcalase possède une meilleure solubilité que celui obtenu avec la Neutrase, quel que soit le pH.

II.2.3.2. La capacité d'hydratation

Elle correspond à la capacité des protéines à retenir l'eau. Cette propriété est d'autant plus importante, qu'elle permet d'améliorer la texture des produits alimentaires. Elle dépend essentiellement des interactions protéines- eau.

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la capacité d'hydratation, dont celle de Miller et Groninger (1976) décrite par Huda et *al.* (2001). L'échantillon est homogénéisé dans de l'eau distillée, puis il est centrifugé. Le surnageant recueilli permet de mesurer la capacité d'hydratation.

Kristinsson et Rasco (2000 b) ont utilisé une autre technique pour mesurer la capacité d'hydratation d'un hydrolysats de protéines de saumon. Le principe consiste à mesurer la perte d'eau après congélation (48 jours) et décongélation (2 h). Dans cette étude, ils ont observé qu'il n'y pas de corrélation entre le DH (%) et la perte d'eau. En revanche, l'hydrolysats obtenu avec l'Alcalase[®] possède une meilleure capacité d'hydratation que ceux issus de l'utilisation de la Corolase 7089, de la Corolase PN-L et de la Flavourzyme, alors que ces enzymes produisent beaucoup plus de petits peptides que l'Alcalase[®]. Kristinsson et ses collaborateurs (2000 b) expliquent cela par la différence de spécificité des enzymes et la nature des peptides obtenus.

Diniz et Martin (1997) ont observé une diminution de la capacité d'hydratation des hydrolysats de protéines de requin obtenu avec l'Alcalase[®] par rapport aux protéines natives. Cela serait probablement dû selon eux à l'implication des chaînes latérales hydrophiles polaires des protéines natives du requin, plus nombreuses et qui fixent beaucoup plus de molécules d'eau que les hydrolysats protéiques.

II.2.3.3. La capacité d'absorption d'huile

Cette propriété met en jeu les interactions hydrophobes entre les molécules de lipides et les protéines. Elle exprime la quantité d'huile adsorbée par gramme de protéine. Le mécanisme d'absorption est attribué à une réticulation physique de l'huile dans la matrice protéique.

La capacité d'absorption d'huile des hydrolysats de protéines de saumon obtenus par différentes enzymes à des DH variant de 5 à 15 %, a été étudiée par Kristinsson et Rasco (2000 b). Ces hydrolysats possèdent une capacité d'absorption d'huile supérieure à celle obtenue avec l'albumine d'œuf et des concentrats de soja, quel que soit le DH. La capacité d'adsorption est meilleure à DH 5 % (5,98 à 7,07 ml huile / g de protéine) qu'à DH 10 % (3,22 à 5,12 ml huile / g de protéines) et à DH 15 % (2,86 à 3,86 ml huile / g de protéine).

Pour Periago et *al.* (1998), l'amélioration de la capacité d'absorption d'huile des protéines de farine de pois traitées par des enzymes pourrait être due à une disponibilité des acides aminés hydrophobes dans les protéolysats.

II.2.3.4. Les propriétés émulsifiantes

Une émulsion est une dispersion d'une phase liquide sous forme de gouttelettes (0,1 à 1µm) dans une autre phase liquide non miscible dite dispersante. Si l'on considère un mélange huile / eau, on désigne une émulsion « huile dans eau » ou une émulsion « eau dans huile » en fonction de la nature de la phase dispersée.

La formation d'une émulsion entraîne un accroissement de l'aire interfaciale et s'accompagne d'une augmentation de l'énergie libre. Le rôle de l'émulsifiant est d'abaisser la tension interfaciale en s'adsorbant à l'interface.

Les hydrolysats protéiques sont ainsi d'excellents tensio-actifs, car ils permettent de diminuer la tension interfaciale entre les phases aqueuse et lipidique.

La caractérisation des propriétés émulsifiantes peut se faire par la mesure de l'activité émulsifiante, la capacité émulsifiante et la stabilité émulsifiante.

II.2.3.4.1. L'activité émulsifiante

Différentes méthodes sont utilisées pour cette mesure caractérisée par l'indice d'activité émulsifiante (IAE). La méthode spectro-turbidimétrique (Pearce et Kinsella, 1978) modifiée par Liceaga et *al.* (1999) permet de caractériser l'aire interfaciale stabilisée par une quantité donnée d'émulsifiants (m^2 / g).

L'indice d'activité émulsifiante est défini comme étant l'aptitude des protéines à former et à stabiliser des émulsions. Elle s'exprime par la surface d'interface (m^2) couverte par unité de poids et déterminée par mesure de la turbidité à 500 nm d'une émulsion diluée dans les conditions définies.

$$IAE = 2T / \phi c,$$

Où T est la turbidité ($T = 2,3A / l$), A est l'absorbance à 500 nm au temps zéro, l = distance parcourue par la lumière, ϕ est la fraction volumique de la phase huile ($\phi = 0,25$) et c est la concentration des protéines (0,5 g / 100 g) dans la phase aqueuse.

Cette formule montre bien que l'IAE est fonction du volume de l'huile, de la concentration des protéines et du type d'appareil utilisé.

La méthode de Yasumatsu et *al.* (1972), détaillée ci-dessous, reste la plus utilisée avec quelques modifications (Onodenalore et Shahidi, 1996 ; Mahajan et Dua, 1998 ; Bejosano et Corke, 1999 ; El-Adawy, 2000 ; Huda et *al.*, 2001).

Elle se réalise par le mélange d'une solution protéique avec de l'huile à volume égal, suivi d'une homogénéisation et d'une centrifugation. L'activité émulsifiante est mesurée par le rapport de la hauteur de la couche émulsifiée et de la hauteur du mélange entier.

II.2.3.4.2. Influence de l'hydrolyse enzymatique sur l'activité émulsifiante

En 1988, Chobert et ses collaborateurs observent que l'IAE des hydrolysats du lactosérum et de la caséine, varie différemment en fonction du degré d'hydrolyse et du pH. Un DH de 8% à pH 11 permet d'obtenir un indice d'activité émulsifiante maximum.

De leur côté, Haque et Mozaffar (1992), constatent que l'IAE des hydrolysats de caséine, diminue lorsqu'on augmente la concentration en protéines au delà de 5 mg / ml. Une valeur supérieure entraîne une aggrégation des protéines en micelles.

Liceaga et Li-chan (1999) observent que l'activité émulsifiante de l'hydrolysat de hareng améliore la stabilité de l'émulsion par rapport aux protéines natives. Ils ont expliqué cela par l'exposition des charges nettes des peptides issus de l'hydrolyse qui entourent les gouttelettes d'huile.

Selon les travaux de Achouri et *al.* (1998), l'IAE des hydrolysats de protéines de soja n'est pas meilleur que celui de l'isolat, et reste faible lorsque le DH est supérieur à 5 %.

Des méthodes d'hydrolyse associées à des techniques d'ultrafiltration ont permis à Jeon et *al.* (1999) de constater que les molécules de 10 kDa possèdent de meilleures propriétés émulsifiantes que des molécules de 3 à 5 kDa.

L'activité émulsifiante (AE) peut aussi se mesurer par conductimétrie. Les travaux de Kato et *al.* (1985) montrent une bonne corrélation entre les mesures de turbidimétrie et de conductimétrie sur dix protéines. L'AE des protéines est déterminée à partir des courbes de conductivité de l'émulsion. En effet la conductivité chute rapidement en fonction de la quantité d'huile émulsionnée avec la solution de protéines ou d'hydrolysat initiale. Cette technique a l'avantage de se mettre en œuvre automatiquement, en continu et en un temps relativement court. Avec cette technique, Linder et *al.* (1996) ont observé que l'AE d'hydrolysats de veau augmente avec le DH pour des valeurs de DH inférieures à 10 %.

II.2.3.4.3. La capacité émulsifiante

C'est la quantité d'huile (ml) émulsifiée par gramme d'émulsifiant (protéine) au point d'inversion défini comme le point de passage d'une émulsion huile / eau à une émulsion eau/huile.

Elle est déterminée par la mesure de la diminution de la viscosité ou par la mesure de la conductivité électrique.

Blecker *et al.* (1997) ont comparé les capacités émulsifiantes du lait natif et du lait modifié, la capacité émulsifiante atteint une valeur maximale à une concentration de 0,012 %.

En 1988, Chobert et ses collaborateurs ont étudié les caséines et les hydrolysats de protéines du lait. Ils ont observé que la CE est faible au pHi (4,5) et maximale à pH 11. Cela serait dû au changement de conformation des chaînes polypeptides, dans lesquelles les résidus hydrophobes seraient démasqués, permettant ainsi une interaction avec les lipides.

L'influence significative du degré d'hydrolyse sur la capacité émulsifiante a été mise en évidence par Linder *et al.* (1996). Ils ont observé qu'une augmentation du DH de protéines de veau influence négativement la capacité émulsifiante. En 1990, Quaglia et Orban ont aussi constaté qu'un DH de 5 % des protéines de sardine est la valeur maximale au-delà de laquelle la CE et la stabilité de l'émulsion diminuent fortement. Des résultats semblables ont été observés par Kristinsson et Rasco (2000 b) avec les hydrolysats de protéines de saumon.

II.2.3.4.4. La stabilité émulsifiante

La stabilité émulsifiante est la propriété d'une émulsion à rester stable et inchangée au cours du temps. Plusieurs méthodes permettent de la mesurer. Pearce et Kinsella (1978) définissent l'Indice de Stabilité de l'Emulsion (ISE) par la mesure de l'absorbance à 500 nm d'aliqots de solution émulsionnée, prélevés à différents temps après la formation de l'émulsion.

$$ISE = T \times \Delta t / \Delta T$$

où ΔT est la variation de la turbidité T pendant l'intervalle de temps Δt

La méthode de Miller et Groninger (1976) est basée sur le mélange de la solution protéique et d'une huile. Après homogénéisation pendant 2 min, les aliqots de l'émulsion sont mis au repos pendant 15 min et on mesure le volume total et le volume de phase aqueuse.

$$SE = (V_t - V_a) \times \frac{100}{V_t}$$

où V_t est le volume total et V_a est le volume de la phase aqueuse.

II.2.3.5. Les propriétés moussantes

Les mousses alimentaires sont des dispersions de bulles de gaz (principalement de l'air) dans une phase continue liquide ou semi-solide qui contient un surfactant capable de diminuer la tension de surface et interfaciale de la phase continue. Les protéines sont capables de favoriser et de stabiliser des mousses grâce à leur structure amphiphile. Elles s'adsorbent à la surface de bulles d'air piégées dans une solution en formant un film protecteur élastique entre les bulles d'air.

Selon Fidantsi et Doxastakis (2001), l'adsorption rapide des protéines à la surface air-eau lors du moussage et le rapide réarrangement à l'interface sont les critères essentiels pour l'obtention de bonnes propriétés moussantes. Ces dernières années, quelques travaux ont été réalisés sur les protéines de poisson. Liceaga et Li-chan (1999) ont montré que les hydrolysats de protéines de hareng ont des propriétés moussantes supérieures à celles des protéines natives. Shahidi *et al.* (1995), Onodenaloro et Shahidi (1996) ont respectivement étudié les hydrolysats de protéines de capelan et de requin. Les capacités moussantes des hydrolysats sont nettement meilleures que les protéines initiales. Les auteurs expliquent cela par la production des peptides plus amphiphiles et flexibles, ce qui augmenterait leur diffusion aux interfaces, améliorant ainsi les propriétés moussantes.

II.2.3.6. La caractérisation des hydrolysats par la taille des peptides

Avec l'avènement des techniques d'hydrolyse, la chromatographie liquide d'exclusion de taille et l'électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (PAGE-SDS), sont souvent utilisées pour caractériser la taille des peptides résultants. En effet, la plupart des propriétés fonctionnelles sont liées aux caractéristiques physico-chimiques et à la taille des peptides (Mohr, 1980).

Avec ces techniques Chobert *et al.* (1988) ont établi un lien entre la taille des peptides d'hydrolysats du lait et des caséines et les propriétés fonctionnelles comme la solubilité et les propriétés émulsifiantes. Plus les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique sont de petite taille, plus ils sont solubles.

Les techniques chromatographiques et membranaires peuvent être des méthodes adéquates pour isoler les peptides amers (Lee et Warthesen, 1996 ; Maehashi *et al.*, 1999).

II.3. Les lipides de poissons

II.3.1. Généralités sur les lipides

II.3.1.1. Définitions des lipides

Le terme “lipides” n’a pas, à ce jour, une définition fixe et précise. Christie (1982) les définit comme une large variété de produits naturels incluant les acides gras et leurs dérivés, les stéroïdes, les terpènes, les caroténoïdes et les acides biliaires présentant une solubilité dans les solvants organiques, comme l’hexane, le benzène, l’éther diéthylique, le chloroforme ou le méthanol.

Kates (1986) définit les lipides comme des substances (a) insolubles dans l’eau, (b) solubles dans les solvants organiques comme le chloroforme, l’éther ou le benzène, (c) qui contiennent de longues chaînes hydrocarbonées, (d) et qui sont présents dans les organismes vivants végétaux et animaux. La majorité des chercheurs accepte cette définition même si elle émet des réserves en ce qui concerne les acides gras de C1-C3 en raison de leur solubilité dans l’eau et de leur insolubilité dans les solvants organiques.

La classification des lipides peut se faire sur la base de leurs propriétés physiques à la température ambiante (les huiles sont liquides et les graisses sont solides), de la polarité (lipides polaires ou neutres), de leur bio-disponibilité (les acides gras essentiels ou non) et de leur structure (lipides simples ou complexes). Les lipides peuvent être divisés en deux grands groupes :

- les lipides simples qui comprennent les acides gras, les acylglycérols, les stérols et leurs esters et les cires
- les lipides complexes qui sont constitués de phospholipides, de glycolipides et de sphingolipides.

II.3.1.2. Structure et nomenclature des acides gras

Les acides gras sont des molécules organiques ne possédant qu’une seule fonction acide organique (carboxyle) à une extrémité. Ils sont formés d’une chaîne carbonée à nombre généralement pair de carbone compris entre 4 et 30 parce que la synthèse des acides gras se fait par l’addition successive de groupements acétiques. L’extrémité est toujours un groupement méthyle. La structure de la chaîne carbonée peut comporter ou non une liaison éthylénique permettant de les classer en :

- acides gras saturés (AGS) qui comportent que des simples liaisons

- acides gras monoinsaturés (AGMI) possédant une double liaison
- acides gras polyinsaturés (AGPI) comportant deux à six doubles liaisons.

Les principaux acides gras sont couramment désignés par des noms usuels qui s'appliquent aux isomères présents à l'état naturel ainsi qu'à quelques dérivés bien connus (**Tableau II.3**).

Différentes nomenclatures sont en usage pour désigner le nombre et la position des doubles liaisons. La nomenclature chimique fait appel à une numérotation à partir du carboxyle terminal (carbone 1) vers le groupement méthyle (carbone n). La double liaison est indiquée par le symbole Δ suivi d'un chiffre correspondant au premier atome de carbone participant à la double liaison. La nomenclature biochimique (n – x) ou « oméga », en référence à une fonction physiologique et aux précurseurs, tient compte de la première double liaison en partant du groupement méthyle terminal.

Tableau II.3. Principaux acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ainsi que leurs sources (source Linder, 2003)

Acides gras (Formule simplifiée)	Nom systématique (dénomination chimique)	Nom courant	Principales sources
C4:0 C6:0 C8:0 C10:0	Acide butanoïque Acide hexanoïque Acide octanoïque Acide décanoïque	Acide butyrique Acide caproïque Acide caprylique Acide caprique	Matière grasse laitière Orme
C12:0 C14:0 C16:0 C18:0	Acide dodécanoïque Acide tétradécanoïque Acide hexadécanoïque Acide octadécanoïque	Acide laurique Acide myristique Acide palmitique Acide stéarique	Cannelle, noix de coco, amande de palme et palmier, noix de muscade Poisson, lait, graisses de réserve des animaux d'élevage, huiles végétales Beurre de cacao, suif de ruminant
C20:0 C22:0 C24:0 C26:0 C28:0 C30:0 C5:0 C7:0 C9:0 C11:0 C15:0 C17:0	Acide eicosanoïque Acide docosanoïque Acide tétracosanoïque Acide hexacosanoïque Acide octacosanoïque Acide tricontanoïque Acide pentanoïque Acide heptanoïque Acide nonanoïque Acide undécanoïque Acide pentadécanoïque Acide heptadécanoïque	Acide arachidique Acide béhénique Acide lignocérique Acide cérotique Acide montanique Acide mélistique Acide valérique Acide énanthique Acide pélargonique Acide undécanoïque Acide pentadécanoïque Acide margarique	graine Cires des plantes, bactéries et insectes
C16:1 (n-7) cis C16:1 (n-7) trans C18:1 (n-9) cis C18:1 (n-9) trans C18:1 (n-7) trans C18:2 (n-6) C18:3 (n-3) C18:4 (n-3) C20:4 (n-6)	Acide cis-9-hexadécénoïque Acide trans-9-hexadécénoïque Acide 9-octadécénoïque Acide trans-9-octadécénoïque Acide trans-11-octadécénoïque Acide 9, 12-octadécadiénoïque Acide 9, 12, 15-octadécatriénoïque Acide 9, 11, 13, 15-tétraénoïque Acide 5, 8, 11, 14-eicosa-tétraénoïque	Acide palmitoléique Acide palmitélaïdique Acide oléique Acide Elaïdique Acide vaccénique Acide linoléique Acide α -linolénique Acide stéaridonique Acide arachidonique	Répandu en petites quantités Bactéries Graines Graines Produits animaux

C20:5 (n-3)	Acide 5, 8, 11, 14, 17- eicosa- pentaénoïque	Acide timmodonique	Huile marines
C22:5 (n-3)	Acide 7, 10, 13, 16, 19- docosa- pentaénoïque		Huiles marines
C22:6 (n-3)	Acide 4, 7, 10 , 13 , 16 , 19-docosa- hexaénoïque		Huiles marines

La place de la première double liaison est indiquée par le symbole ω suivi du nombre d'atomes de carbone existants jusqu'à cette double liaison (**Figure II.3**). Les acides gras polyéniques ou polyinsaturés de conformation *cis* peuvent utiliser la formulation ($\omega - x$) ou ($n - x$) qui prend en compte la double liaison la plus proche du groupement méthyle.

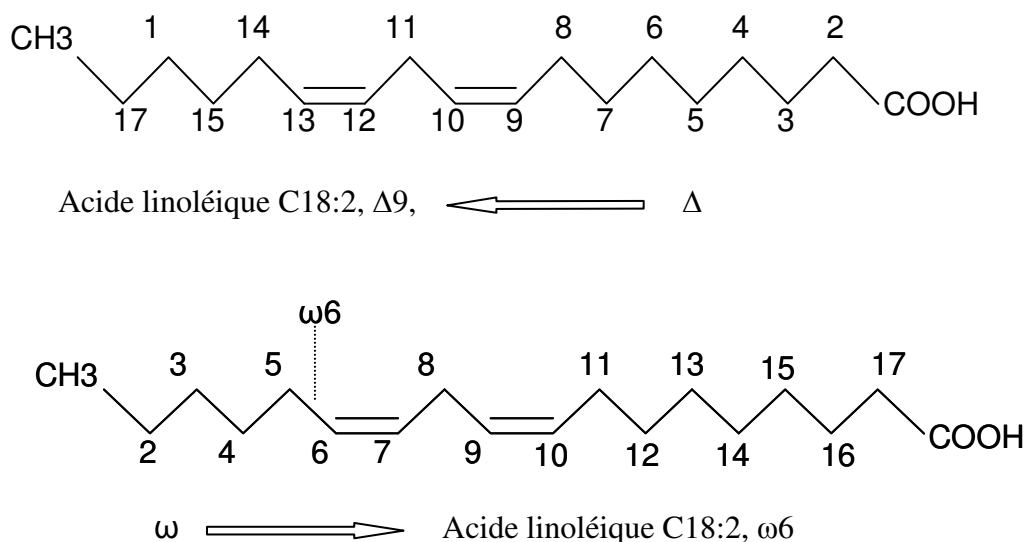


Figure II.3. Nomenclatures des acides gras insaturés.

II.3.1.3. Les glycérides

Ils sont appelés acylglycérols. Ce sont des esters de glycérol et d'acides gras. Les trois fonctions alcooliques du glycérol peuvent être estérifiées pour donner des mono-, di- ou des triglycérides. Les lipides sont constitués de mélange de ces esters où les triacylglycérols sont largement prépondérants. Ce sont des molécules non chargées et qui sont pour cette raison appelés lipides neutres.

Le nom systématique des glycérides reprend le radical de chaque acide gras suivi du numéro de l'atome de carbone du glycérol auquel il est estérifié. Si une même chaîne est présente plus d'une fois, le nom de son radical est précédé de di (ou tri) et suivi des numéros du carbone

auxquels ce type de chaîne est rattaché. A titre d'exemple : palmitoyl-1, stéroyl-2, linoléoyl-3 glycérol ; dipalmitoléoyl-1,3, arachidonoyl-2 glycérol ; trioléoyl glycérol.

Il est intéressant de signaler que les acides gras insaturés estérifient le plus souvent la fonction alcool portée par le carbone médian.

II.3.1.4. Les phospholipides

Les phospholipides (PL) constituent l'essentiel des lipides membranaires des organismes vivants où ils sont organisés en une bicouche lipidique. Ils sont caractérisés par une partie polaire (le phosphoglycérol substitué) et une partie apolaire (les chaînes hydrocarbonées). Ce sont des esters d'acides gras et de glycérol avec, en plus, un résidu d'acide phosphorique estérifié par un composant X. Cette structure leur confère un caractère amphiphile qui est mis à profit dans les milieux dispersés en agroalimentaire, pharmacologie, cosmétologie etc... Les classes de phospholipides sont définies par la nature du composant X (**Figure II.4**). Les phospholipides principaux sont la phosphatidylcholine (PC) ou lécithine, la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI).

L'hydrolyse enzymatique par un phospholipase A₂ d'une liaison ester avec un acide gras en position *sn*-2 aboutit à la formation d'un lyso-phospholipide.

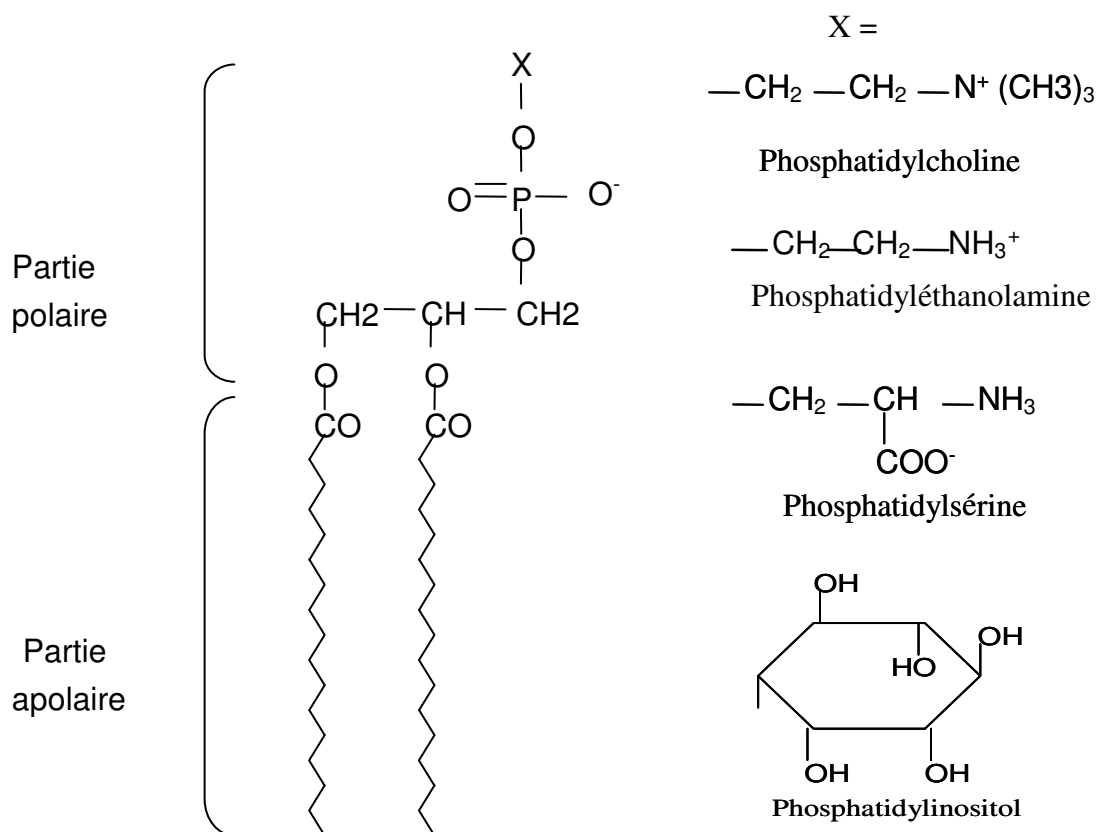


Figure II.4. Structure des phospholipides.

II.3.1.5. Autres constituants

- Les **sphingolipides** : Ils présentent dans leur structure une molécule de céramide résultant de l'association par liaison amide d'un acide gras et d'une molécule de sphingosine. Les **sphingomyélines** sont des dérivés de ces bases dans lesquelles la fonction alcool primaire de la sphingosine est estérifiée par une molécule d'acide phosphorique, elle-même estérifiée à la choline. Les sphingoglycolipides dérivent de la liaison d'un sucre simple (cérébrosides) ou d'un oligosaccharide (gangliosides) à la fonction alcool primaire.
- Les **stéroïdes** sont des composés lipidiques non saponifiables. Leur structure de base est le noyau polycyclique à 17 carbones du perhydrocyclopentanophénanthrène. Parmi les stéroïdes, le **cholestérol** est le plus abondant dans les membranes des cellules animales.
- Les **Glycolipides** sont comme leur nom l'indique constitués de glucides et de lipides. Les cérébrosides possèdent une structure semblable à celle de la sphingomyéline avec du galactose à la place de la phosphorylcholine. Les gangliosides sont également des

dérivés de la sphingosine, mais dans ce cas particulier, une chaîne oligosaccharidique contenant de l'acide N-acétylneuraminique est liée à la fonction primaire de la sphingosine. Les cérebrosides sont présents en grande quantité dans les tissus nerveux, particulièrement dans la substance blanche du cerveau, tandis que les gangliosides sont majoritairement retrouvés dans la substance grise.

II.3.2. Méthodes d'extraction des lipides

L'extraction de la matière grasse est l'étape préliminaire obligatoire pour analyser les lipides à partir d'une matrice alimentaire complexe. Le choix des conditions opératoires de la méthode d'extraction est essentiel pour garantir la fiabilité des résultats en fonction de l'objectif recherché et des produits concernés. Quel que soit le cas, l'extraction doit être sélective (n'extraire que la matière grasse), non altérante et quantitative.

II.3.2.1. Extraction analytique des lipides par solvants organiques

C'est une extraction basée sur la solubilité entre les lipides et les composés non lipidiques. Les effets conjugués de la polarité des solvants et la solubilité des lipides permettent de les isoler des autres constituants tels que les protéines.

Les méthodes de référence telles que la méthode de Folch et *al.* (1957) modifiée par Bligh et Dyer (1959) sont couramment et largement utilisées. Les deux techniques sont basées sur une extraction à froid par le chloroforme associé au méthanol.

La méthode normalisée de Soxhlet (AOAC, 1990) est une méthode qui utilise une extraction à reflux dans un montage généralement en verre, où l'échantillon préalablement broyé est placé dans une cartouche de cellulose, elle-même placée dans un tube rempli de solvant. L'extraction se fait à chaud à la température d'ébullition du solvant qui est alors distillé et recyclé, percolant et imprégnant l'échantillon. Les principaux solvants utilisés sont l'hexane, l'éther de pétrole et l'éther diéthylique. Pour mieux extraire les lipides polaires il est possible d'utiliser les mélanges avec les alcools comme l'éthanol, le méthanol et l'isopropanol (Manirakiza et *al.*, 2001).

Christie (1982) explique les facteurs qui affectent l'extraction des lipides par les mélanges de solvants qui comprennent les solvants hydrocarbonés (hexane, benzène ou cyclohexane), les alcools (éthanol, isopropanol, méthanol), le chloroforme, l'éther et autres. Les effets de la solubilité et de la polarité sont essentiels pour l'extraction. Ainsi, de nombreux mélanges ont été étudiés pour évaluer leur capacité d'extraction des lipides, leur efficacité et l'aspect

sécuritaire (Honeycutt et *al.*, 1995 ; Undeland et *al.*, 1998 ; Smedes et Askland, 1999). Gunnlaugsdottir et Ackman, (1993) ont observé que les méthodes à base de chloroforme comme celle de Bligh et Dyer (1959) donnent de meilleures rendements d'extractions que les méthodes utilisant l'hexane. Selon Rossignol-Castera (1998), les mélanges de solvants organiques apolaires tels que l'hexane, l'éther de pétrole, le chloroforme et des solvants polaires tels que les alcools (méthanol, éthanol ou isopropanol) permet à la fois d'extraire les lipides neutres et les lipides complexes.

Il existe plusieurs méthodes analytiques qui répondent à des objectifs et des domaines d'applications différents (**Tableau II.4**). Chaque méthode possède ses limites. Ainsi le type de produit et l'objectif visé guideront le choix d'une méthode.

Il est important de signaler que l'utilisation des huiles extraites par ces méthodes nécessite une élimination par évaporation des solvants et la protection contre l'oxydation par des antioxydants naturels (tocophérol par exemple) ou chimiques (butyl-hydroxy toluène : BHT).

Tableau II.4. Synoptique des méthodes analytiques d'extraction de la matière grasse (source : Rossignol-Castera, 1998)

Type de méthode	Principe	Domaine d'application
Reflux	- Broyage et séchage - Extraction dans un appareil à reflux type Soxhlet (hexane, éther de pétrole, éther diéthylique, éthanol)	Produits carnés, graines, aliments pour animaux, poudre de lait
Hydrolyse acide et gravimétrie	- Hydrolyse à chaud avec HCl - Extraction dans un appareil type Soxhlet où Mojonnier (éthanol, éther diéthylique et de l'éther de pétrole (méthodes SBR) ou de l'hexane après filtration de l'hydrolysate (méthode Weibull-Berntrop)	Produits laitiers Produits carnés Aliments pour animaux Produits céréaliers et végétaux
Hydrolyse acide et volumétrie	- Hydrolyse avec HCl ou H ₂ SO ₄ (méthode Van Gulik) - Addition d'alcool isoamylique et centrifugation dans un butyromètre - Lecture du volume de graisse libérée	Lait et produits laitiers
Hydrolyse alcaline et gravimétrie	- Hydrolyse avec NH ₄ OH éthanolique - Extraction avec de l'éther diéthylique et de l'éther de pétrole (méthode Rose-Gottlieb)	
A froid et purification par lavage	- Dispersion à froid dans un mélange de solvants : • Méthode de Folch : chloroforme/méthanol (2:1) • Méthode de Bligh et Dyer : chloroforme/méthanol/eau (1:2:0,8) • Méthode de Chen : dichlorométhane/méthanol (2:1) • Méthode de Radin : Hexane/Isopropanol (3:2) • Méthode d'Emery : Hexane/méthanol (1:1) - filtration, lavage de la phase avec une phase saline	Extraits biologiques Viandes, poissons Tous produits alimentaires
A froid et purification sur colonne sèche	• Méthode de Maxwell : - dispersion avec Na ₂ SO ₄ + celite 545 + CaHPO ₄ - Extraction par élution dans une colonne avec un mélange dichlorométhane/méthanol (9:1) • Méthode de Wolff et Castera : dispersion dans hexane/isopropanol (3:2) et filtration sur colonne	Tous produits alimentaires

II.3.2.2. Extraction industrielle des huiles de poisson

La mise en place du procédé d'extraction industriel des huiles de poisson s'est faite progressivement. Jusqu'en 1980 environ, les huiles de poisson étaient considérées comme un sous-produit de l'industrie des farines de poisson (Dacosta, 2004). Les poissons transformés dénommés « poissons industriels » sont des espèces riches en huile, comme le menhaden, la sardine, le hareng, l'anchois, le maquereau.

Aujourd'hui, les huiles marines sont produites essentiellement à partir des co-produits de la pêche, de l'aquaculture et des industries de transformation (saurisserie et conserverie).

Les principaux producteurs des huiles sont le Japon, le Chili, les Etats-Unis, la Norvège et le Pérou. Avec 150 000 tonnes de co-produits en 2002 en France (Andrieux, 2003), le marché des huiles non raffinées est en perte de vitesse en raison de l'application des normes de détoxification des huiles destinées à l'alimentation animale.

La méthode d'extraction classique comporte des étapes de cuisson (90 °C), de pressage (presse à vis), de centrifugation et de filtration de la fraction liquide. L'huile brute est ensuite lavée à l'eau chaude (90 - 95 °C) afin d'éliminer les résidus protéiques.

La cuisson peut se faire par injection directe de vapeur ou par chauffage indirect à la vapeur afin de coaguler ou dénaturer les protéines (Crowther et *al.*, 2003). Les eaux d'égouttage et de presse peuvent être traitées à la vapeur vive, permettant une meilleure séparation de la phase huileuse sur décanteur horizontal centrifuge (Bouchez, 1992 ; Ackman, 1994).

Aidos et ses collaborateurs (2003) ont étudié l'optimisation des paramètres de température, de vitesse de pompage et de centrifugation sur les rendements d'extraction à l'échelle industrielle et sur la qualité de l'huile de co-produits de hareng. Ils ont observé que la qualité de l'huile est influencée par un effet d'interaction entre la vitesse de pompage et la vitesse de centrifugation. Et que l'huile obtenue avec une vitesse de pompage élevée est plus stable à la conservation.

Chantachum et *al.* (2000) ont étudié l'influence du traitement thermique sur la séparation et la qualité de l'huile de têtes de thon. Les échantillons cuits par injection de vapeur à des températures élevées (75, 85 et 90 °C) pendant 10, 20 et 30 minutes, sont pressés à 140 tonnes / m². Les auteurs observent qu'une cuisson à 85 °C permet une meilleure libération des fractions huileuses qui serait freinée lors d'une cuisson à plus haute température en raison de la coagulation des protéines. Une pré-cuisson des têtes semble augmenter la proportion de l'acide docosahexaénoïque (DHA) dans l'huile en raison d'une meilleure extraction des phospholipides.

II.3.3. Des acides gras indispensables aux acides gras polyinsaturés à longue chaîne

L'essentialité de l'acide linoléique (18:2 n-6 ou oméga 6) a été découverte en soumettant à des jeunes rats à un régime dépourvu en lipides (Burr et Burr, 1929). C'est en 1970 que les premières connaissances physiologiques sur le caractère des acides gras n-3 ont été acquises. Ces études ont montré qu'une carence prolongée du régime en acide α -linoléique (18:3 n-3 ou oméga 3) portant sur plusieurs générations occasionne des troubles de la vision et du fonctionnement cérébral chez le rat. Les acides gras essentiels, l'acide linoléique (18:2 n-6) et

l'acide α -linoléique (18:3 n-3) sont qualifiés d'acides gras indispensables car ils ne peuvent être synthétisés par les hommes et les animaux et sont indispensables à la croissance et aux fonctions physiologiques de tous les tissus.

L'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (18:3 n-3) sont les deux précurseurs métaboliques des deux principales familles d'acides gras polyinsaturés des séries n-6 et n-3 ayant 20 ou 22 atomes de carbones et contenant jusqu'à 6 doubles liaisons (**Figure II.5**). Comme l'a souligné Legrand (2004), les désaturases étant communes pour les voies n-3 et n-6, la présence surabondante des acides gras n-6 peut constituer une inhibition compétitive pour la synthèse des dérivés d'acides gras n-3.

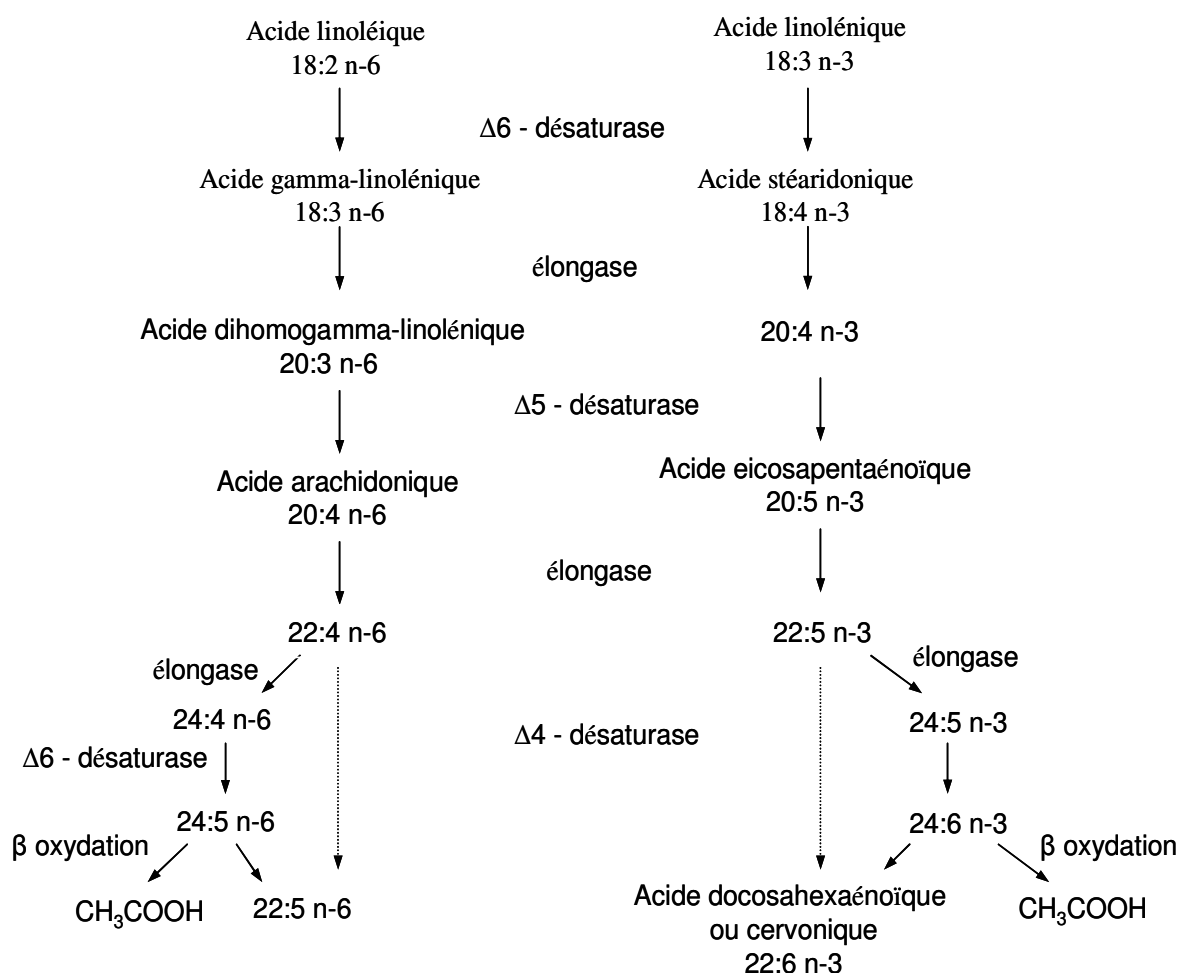


Figure II.5. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés essentiels à partir des acides linoléique et α -linoléique (d'après Simopoulos, 1991 ; Thomas et Holub, 1994)

L'acide arachidonique (AA, 20:4 n-6), l'acide éicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) sont obtenus par une succession de désaturations et d'élongations alternées et d'une β -oxydation. Ces acides polyinsaturés à longue chaîne sont à l'origine des composés biologiquement actifs que sont les éicosanoïdes (Simopoulos, 1991, Lagarde et Vericel, 2004). Ainsi à partir de l'acide arachidonique, une variété de leucotriènes LTA₄, LTB₄, LTC₄ (action inflammatoire), des thromboxanes TXA₂ (vasoconstricteurs et stimulateurs de l'agrégation plaquettaire) et des prostacyclines PGI₂ (vasodilatateurs et inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire) sont synthétisés (Thomas et Holub, 1994). A partir de l'EPA, des leucotriènes de la série 5, des thromboxanes TXA₃ et des prostacyclines PGI₃ sont formés.

II.3.4. L'huile de poisson : source d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne

Les lipides des poissons ont été largement étudiés en raison de leur richesse en molécules d'intérêt, notamment les acides gras polyinsaturés. La teneur et la composition en lipides des poissons varient avec l'espèce considérée, l'environnement de croissance (facteurs environnementaux tels que la température et la salinité de l'eau), l'âge et le cycle sexuel (EL Sayed *et al.*, 1984 ; Vlieg, 1984 ; Takama *et al.*, 1994 ; Watanabe *et al.*, 1995 ; Corraze et Kaushik, 1999 ; Wouters *et al.*, 2001). Les huiles de poisson sont la première source commerciale d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne. En effet, les poissons se nourrissent de phytoplancton, de zooplancton et d'algues unicellulaires. Les acides gras polyinsaturés des huiles de poisson proviennent de ces sources d'alimentation (Ackman, 1994).

Les espèces de poissons sont généralement classées en fonction de leur teneur habituelle en lipides. Les poissons sont ainsi répartis en trois grandes catégories. Les espèces dites « maigres » dont la teneur en lipides dans les muscles est inférieure à 1 g / 100 g comme le cabillaud, la morue, l'églefin. La deuxième catégorie rassemble les poissons « gras » comme le hareng, le maquereau, le menhaden, la sardine, l'anguille, le pilchard, qui ont dans leurs muscles plus de 5 g / 100 g (Sébedio, 1992), ou plus de 10 g / 100 g de lipides (Corraze et Kaushik, 1999). Il y a enfin les poissons « intermédiaires » qui ont dans leur muscle 2 à 10 % (g / 100 g) de lipides et en stockent aussi dans les tissus adipeux sous cutanés ou péri-viscéraux (cas du saumon, du thon, et de l'anchois). Cependant, la fluctuation de la teneur en lipides de certains poissons selon la saison et l'âge rend ce classement relatif.

Des études menées par certains auteurs ont montré que chez le poisson, la teneur en lipides et la répartition des acides gras dépendent du tissu considéré. Katikou et ses collaborateurs (2001) ont étudié la distribution des lipides totaux dans des portions de filets de saumon

(*Salmo salar*). Ils ont observé que la teneur en lipides varie selon la portion de 2,37 à 18,55 % (g / 100 g), et qu'elle est inversement proportionnelle à la teneur en eau. Aursand et *al.*, (1994) ont aussi réalisé des travaux sur la distribution et la composition des lipides chez la même espèce de saumon d'élevage (*Salmo salar*). Ces études ont montré que l'engraissement des poissons dépend principalement de la quantité et de la composition des aliments. La distribution et l'importance des dépôts lipidiques dépendent de la nature du tissu, avec 38 g / 100 g de lipides dans la ligne dorsale, 27 g / 100 g dans le muscle rouge, 28 g / 100 g dans la nageoire pelvienne et 9,6 g / 100 g dans le muscle blanc. Les triacylglycérols (TAG) représentent la part prédominante avec 93 à 98,8 g / 100 g des lipides totaux dans les tissus étudiés, sauf le foie. La teneur en phospholipides (PL) est tout au plus de 6 g / 100 g des lipides dans le muscle blanc.

La composition en acides gras des poissons diffère d'un organe à l'autre et dépend de la spécificité et de la fonction de l'organe (**Tableau II.5**). Pour Meyer-Rochow et Pyle (1980), la forte teneur en acides gras C20:1 n-9 et C20:4 n-6 dans la rétine d'une espèce de poisson de l'antarctique *Trematomus bernacchii*, semble réduire l'impact de la lumière dans les grandes profondeurs.

Les TAG constituent la classe de lipides majoritaires dans les lipides des poissons. Ils sont la principale source énergétique utilisée lors des premières heures de privation de nourriture et pour le développement des gonades.

Dans le cas de nombreuses espèces méditerranéennes, des petits pélagiques et bien d'autres espèces, les proportions d'acides gras saturés et d'acides gras monoinsaturés sont supérieures dans les triacylglycérols, alors que la proportion d'acides gras polyinsaturés est élevée dans les phospholipides (Henderson et *al.*, 1996 b ; Banerjee et *al.*, 1997 ; Kozlova et Kotimchenko, 2000).

La composition en acides gras de différentes espèces de poisson montre une certaine variabilité, notamment en ce qui concerne les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (**Tableau II.5**).

Tableau II.5. Composition en acide gras (% des acides identifiés) des huiles de différentes espèces de poissons.

Acide gras	Tête de bonite ^a	Sardine ^a	Saumon sauvage ^b	Saumon d'élevage (Norvège) ^b	Thon sauvage (Thaïlande) ^b	Morue sauvage ^b
14:0	3,2	8,9	2,5	3,5	3,3	4,5
16:0	12,2	18,4	7,3	6,4	10,4	10,4
18:0	1,7	2,5	1,8	2,3	5,5	2,0
16:1n-7;9	7,0	7,9	3,8	4,8	5,1	5,4
18:1n-7	3,0	3,3	2,6	2,4	2,4	2,9
18:1n-9	15,5	10,9	11,2	10,8	12,3	16,3
20:1n-9	1,0	2,3	11,5	11,5	0,8	13,2
22:1n-9	0,1	0,8	1,4	13,4	0,5	9,0
18:2n-6	2,4	1,2	1,8	2,8	1,2	1,6
20:4n-6	2,1	0,8	nd	nd	nd	nd
18:3n-3	0,7	0,9	nd	nd	nd	nd
18:4n-3	1,2	2,8	nd	nd	nd	nd
20:5n-3 (EPA)	8,7	12,4	10,2	7,4	5,4	7,9
22:5n-3	1,6	1,4	2,9	3,4	1,1	1,2
22:6n-3 (DHA)	31	9,8	18,5	14,3	25,4	12,3
DHA/EPA	3,6	0,8	1,8	1,9	4,7	1,6

a : Ando et *al.*, 1996 ; b : Aursand et *al.*, 2000. nd : non déterminé

La composition lipidique des huiles extraites des poissons d'élevage est également variable, et la teneur en acides gras n-3, notamment en EPA et en DHA, reflète celle des aliments qu'on leur fournit. Ainsi, la nécessité d'augmenter la teneur en acides gras polyinsaturés dans les huiles de poisson devient de plus en plus préoccupante avec l'intensification de l'aquaculture dont l'objectif principal est d'augmenter la masse corporelle du poisson et la teneur en AGPI oméga 3 (Geurden et *al.*, 1995, 1999, Henderson et *al.*, 1996 a, 1996 b; Hardy, 1996 ; Sargent et *al.*, 1997 ; Carter et Hauler, 2001 ; Liu et *al.*, 2004).

Les travaux réalisés par Peng et *al.* (2003) et par Rollin et *al.* (2003) sur différentes espèces de saumon nourries avec des huiles marines mettent en évidence l'effet de ces dernières sur les gains en masse corporelle et la teneur en acides gras des lipides de la chair des saumons . Les résultats ont montré que : la teneur en AGPI des lipides augmente sensiblement, la conversion des AGPI se fait principalement sous la forme de phospholipides et la teneur en DHA chez le saumon est sous contrôle génétique. En effet la composition en acides gras des triacylglycérols des lipides de la chair des différentes espèces de saumon reste similaire alors que la différence est très marquée pour la teneur en DHA des phospholipides. Ce qui expliquerait cette régulation génétique.

II.3.5. Les phospholipides du poisson

La teneur en lipides des muscles de poisson peut représenter jusqu'à 25 g / 100 g de la masse de chair totale pour les poissons gras et atteindre moins de 5 g / 100 g pour les poissons maigres. Body et Vlieg (1989) ont observé que les lipides des poissons maigres sont essentiellement constitués de triglycérides (35 g / 100 g des lipides totaux) et d'une forte proportion de phospholipides (65 g / 100 g des lipides totaux), eux-mêmes intimement liés aux protéines, car ils sont constitutifs des membranes cellulaires.

Des travaux réalisés par Geurden et *al.* (1995, 1999) ont montré que les poissons ont un besoin croissant de phospholipides (PL) pour leur survie et leur croissance au cours du développement larvaire.

La teneur moyenne en lipides varie, dans les valeurs extrêmes, de 5 g / 100 g pour les poissons sauvages et de l'ordre de 15 g / 100 g pour les poissons d'élevages. Ces lipides sont essentiellement constitués de triacylglycérols et une très faible proportion de phospholipides.

Les phospholipides, chez les poissons comme chez tous les vertébrés, sont concentrés dans les tissus cérébraux. Il a été montré que la teneur en phospholipides reste sensiblement constante quelle que soit la concentration en lipides neutres, ce qui paraît logique compte tenu de leur rôle essentiellement structural (Shewfelt, 1981 ; Ackman, 1994).

La phosphatidycholine (PC) et la phosphatidyléтанолamine (PE) sont souvent majoritaires parmi les lipides polaires des poissons (Hazel, 1985 ; Body et Vlieg, 1989; Banerjee et *al.*, 1997 ; Bandara et *al.*, 1997 ; Kozlova et Khotimchenko, 2000). Des auteurs rapportent des proportions de l'ordre de 50 à 70 % pour la PC et de 10 à 30 % pour la PE selon l'espèce et l'organe étudiés (**Tableau II.6**).

Tableau II.6. Composition en classes de phospholipides de différentes huiles d'espèces de poissons ou d'organes de poissons (g / 100 g des phospholipides totaux)

Espèces ou organes de poissons	Classes de phospholipides					
	PC	PI	PE	PS	SPM	LPC
Branchies de la truite (acclimatée 20°C) ^a	55,5	6,5	19,8	5,4	5,2	nd
Espèces : « <i>Boleophthalmus boddarti</i> » ^b	67,0	11,3	10	nd	11,7	nd
Poissons pélagiques ^c :						
1- <i>Comephorus baicalensis</i>						
Foie	62,8	-	25,7	-	7,9	3,6
Muscle	60,7	5,0	21,4	3,6	5,7	3,6
Ovaires	68,1	2,5	14,4	2,5	7,6	4,8
2- <i>Comephorus dybowski</i>						
Foie	65,3	2,7	24,0	2,7	4,6	3,3
Muscle	69,2	3,2	21,3	3,2	1,6	3,2
Ovaires	75,1	2,1	18,0	2,1	2,7	2,1

^aHazel et al., (1985) ; ^bKozlova et Kotimchenko, (2000) ; ^cBanerjee et al., (1997).

PC : phosphatidylcholine, PI : phosphatidylinositol, PE : phosphatidyléthanolamine, PS : phosphatidylsérine, SPM : sphingomyéline, LPC : lysophosphatidylcholine, nd : non déterminé.

La proportion en acides gras varie en fonction de la fraction lipidique considérée. Dans le cas des petits pélagiques (sardine, maquereau, chinchard) et de certaines espèces méditerranéennes, la composition en acides gras est similaire dans les phospholipides et les lipides neutres. Une étude réalisée par Takama et Suzuki (1994), sur la composition en acides gras des phospholipides de 40 espèces de poissons, a montré que les proportions en acides gras polyinsaturés sont beaucoup plus importantes dans les phospholipides que les acides gras saturés et les monoinsaturés (**Tableau II.7**). Les AGPI sont particulièrement abondants dans les PL musculaires des salmonidés. Dans tous les organes étudiés, le taux de DHA est plus élevé que celui de l'EPA. Ces observations s'appliquent aussi à la plupart des petits pélagiques, des salmonidés et des téléostéens, où la teneur en DHA (22:5 n-3) dans les PL est plus élevée que celle de l'EPA (Bandara et al., 1997 ; Passi et al., 2002).

Les AGPI peuvent ainsi représenter plus de 58 % des acides gras de la fraction totale (Henderson et Tocher, 1987 ; Takama et Suzuki, 1994).

Meyer-Rochow et Pyle (1980) ont étudié les lipides d'espèces de poissons et d'amphipodes de l'antarctique. Les résultats ont montré la richesse en acides gras polyinsaturés dans les

phospholipides où la teneur de l'EPA est plus élevée que celle du DHA. Cette composition serait due, selon eux, aux conditions environnementales comme la température (– 1,8 °C en moyenne) et l'intensité de la lumière ambiante.

Tableau II.7. Teneurs en classes d'acides gras (g / 100 g des acides totaux identifiés), d'EPA, de DHA et le ratio n-3 / n-6 dans les phospholipides totaux de différents organes de divers poissons (source : Takama et Suzuki, 1994)

Organes	Espèces de poissons	Σ AGS	Σ AGMI	Σ AGPI	EPA (20:5 n-3)	DHA (22:6 n-3)	n-3/n-6
Muscle	Poissons migrants	29,9	10,8	57,9	9,5	42,3	22,9
	Poisson des côtes et de récif	30,8	14,1	54,5	12,9	30,6	6,6
	Poissons démersaux	28,1	16,8	54,2	15,2	29,5	10,2
Foie	Poissons migrants	33,7	16,8	48,8	10,7	29,1	11,6
	Poisson des côtes et de récif	30,7	12,3	56,4	10,7	31,6	5,3
	Poissons démersaux	29,5	21,2	48,6	13,4	26,2	8,3
Coeur	Poissons migrants	33,9	13,0	52,5	10,5	35,8	23,5
	Poisson des côtes et de récif	28,4	24,4	57,2	10,1	34,1	6,4
	Poissons démersaux	32,6	23,1	41,9	7,8	27,2	9,5
Gonades Ovaires	Poissons migrants	36,6	18,5	44,2	12,3	22,9	9,3
	Poisson des côtes et de récif	29,0	14,0	55,7	9,8	33,1	5,2
	Poissons démersaux	32,6	22,3	44,3	13,4	22,5	7,5
Testicules	Poissons migratoires	39,9	23,7	35,7	10,6	18,0	9,1
	Poisson des côtes et du récif	35,1	23,3	40,6	6	22,7	6,4
	Poissons démersaux	35,6	26,9	37,0	8,1	20,3	8,0

II.3.6. Quelques actions bénéfiques des acides gras polyinsaturés de l'huile du poisson

II.3.6.1. Acides gras polyinsaturés et pathologies cardiovasculaires

Des études épidémiologiques ont clairement mis en évidence le rôle préventif des acides gras polyinsaturés dans la pathologie cardiovasculaire, depuis les travaux d'une équipe danoise (Bang et Dyerberg, 1972, Dyerberg et *al.*, 1975) portant sur une population d'esquimaux du Groenland, dont le régime alimentaire était particulièrement riche en poisson et en mammifères marins. Les résultats montraient une corrélation positive entre la consommation de ces aliments riches en huile polyinsaturée et une faible incidence des maladies

cardiovasculaires. Depuis, plusieurs synthèses ont fait le point des études portant sur ce sujet en faisant ressortir les domaines et les mécanismes d'action des acides gras polyinsaturés dans la diminution du risque cardiovasculaire (Nair *et al.*, 1997 ; Zyriax et Windler, 2000 ; Lercerf et Borgiès, 2002 ; Leaf *et al.*, 2003, Sidhu, 2003, Chen et Yeh, 2003). Parmi les différentes actions citées, il y a la réduction de la production de médiateurs pro-inflammatoires (l'inflammation de la paroi des vaisseaux joue un rôle important sur l'athérosclérose), la diminution de la production de thromboxane (puissant vasoconstricteur), la diminution de la production du facteur d'activation plaquettaire (facteur de croissance cellulaire responsable de la prolifération cellulaire dans les parois artérielles).

La consommation à long terme des acides gras polyinsaturés par des individus en bonne santé, diminue le facteur de risque d'accidents cardiovasculaires.

Socini *et al.* (1983) ont étudié l'effet de la supplémentation en huile de poisson à un aliment diététique (contenant 5 g / 100 g d'huile de maïs) administré à des rats. Ils observent que les paramètres plaquettaires et artériels sont différemment affectés et dépendent de la présence des acides gras n-6 dans l'aliment. Cela ramène la question du rapport des acides gras polyinsaturés n-6 / n-3 dans les aliments diététiques pour obtenir un effet anti-agrégant de l'EPA. Lagarde et Vericel (2004) rapportent qu'un enrichissement en EPA maintient l'activité prostacycline tout en diminuant l'activité thromboxane. Il en résulte une diminution du risque thrombotique.

II.3.6.2. Acides gras polyinsaturés et cancer

Il est aujourd'hui difficile d'établir une corrélation directe entre la consommation des huiles riche en acides gras polyinsaturés et la prévention du cancer. Il n'existe pas à ce jour de consensus ni de recommandations clairement formulées sur la prévention alimentaire du risque de cancer de sein car les cibles d'une intervention nutritionnelle ne sont pas toujours identifiées avec précision (Chajès *et al.*, 2000).

Cependant des études épidémiologiques ont montré que l'incidence de la plupart des cancers (du sein, du colon et de la prostate) était associée à la consommation d'acide gras de la série n-6 (Gonzalez, 1995). Une série de travaux rapportés par Saadatian *et al.* (1999) montre des résultats contradictoires dans l'analyse de l'interaction entre la nutrition et la pathologie cancéreuse. Il ressort de certaines études que les acides gras de la série n-3 ont un effet protecteur alors que les acides gras de la série n-6 augmentent l'incidence des tumeurs.

Malgré l'hétérogénéité des résultats et en dépit de la complexité des études, les acides gras polyinsaturés de la série n-3 semblent être présentés comme neutres ou aptes à inhiber la tumorigénèse.

II.3.6.3. Besoin d'acides gras polyinsaturés durant la grossesse

Au cours de la grossesse, du développement fœtal et de la lactation, les besoins en AGPI sont particulièrement importants et la teneur en AGPI augmente. Les besoins en AGPI du fœtus sont couverts par les transferts maternels pendant la grossesse et les apports alimentaires après la naissance (Ackman, 1999).

Une étude a été réalisée par Hartigsen et *al.* (2003) sur l'influence de l'apport alimentaire d'AGPI à une rate et à sa progéniture nouveau-née. Ils ont observé une augmentation de la teneur en AGPI dans le lait maternel et une influence sur la composition en acides gras des phospholipides du foie de la progéniture.

Soixante-dix pour cent de l'énergie de la croissance fœtale est destinée au développement du cerveau ; les lipides constituent 50 à 60 % de la structure cérébrale et sont particulièrement importants dans la croissance endothéliale. Il est bien évident que des quantités importantes d'AGPI sont nécessaires à l'élaboration des membranes cellulaires, au développement rapide du cerveau et du système nerveux central (Bourre, 1996 ; Vancassel, 2004).

II.3.6.4. Sensibilité à l'oxydation des acides gras polyinsaturés

Le nombre élevé d'insaturations dans les acides gras polyinsaturés à longue chaîne les rend particulièrement vulnérables à l'oxydation. Exposés aux stress oxydatif, les acides gras polyinsaturés peuvent être attaqués par des radicaux libres et se transforment en hydroperoxydes. Il se produit un enchaînement de réactions radicalaires et non radicalaires conduisant à la production de nombreux composés parmi lesquels des aldéhydes, des cétones et des peroxydes cycliques. Certaines de ces molécules sont à l'origine d'odeurs et de saveurs indésirables qui conduisent à la dégradation des propriétés sensorielles et à la diminution des propriétés nutritionnelles.

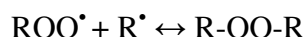
En présence d'oxygène de l'air, l'auto-oxydation des AGPI est un mécanisme irréversible qui se déroule en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

Grâce à l'apport d'énergie (lumière et chauffage) ou sous l'influence d'enzymes, la réaction d'initiation conduit à la formation de radicaux libres à partir des lipides, par le départ d'un

atome d'hydrogène sur un carbone en position α par rapport à une double liaison formant un radical ($R^\bullet$).

La propagation se fait par réaction entre un radical libre $R^\bullet$ et l'oxygène dissous, conduisant à la formation d'un radical peroxy $ROO^\bullet$. Ce dernier capte un hydrogène provenant d'une autre molécule lipidique pour former un hydroperoxyde.

L'étape de terminaison peut intervenir une fois les espèces radicalaires piégées.



Du point de vue de la qualité sensorielle, l'oxydation des lipides est le premier facteur limitant la durée de vie des huiles riches en AGPI.

D'un point de vue physiologique, ces réactions peuvent se propager et modifier la structure des lipides et des protéines constitutives des membranes cellulaires, ainsi que les lipoprotéines.

Une ingestion d'AGPI en quantité importante peut aussi entraîner l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). Mesa et *al.* (2004) ont observé qu'une supplémentation en EPA pendant quatre semaines à des doses de 9 g / jour entraîne une augmentation des quantités de diènes conjugués produits lors de l'oxydation des LDL, alors que le DHA n'a aucun effet de ce genre.

Par ailleurs, des effets de réduction du stress oxydatif ont été observés par Mori et *al.* (2003) après supplémentation de l'EPA et du DHA.

II.3.7. Stabilisation des huiles riches en AGPI contre l'oxydation

La protection des huiles riches en AGPI contre l'oxydation est l'une des précautions majeures à prendre pour limiter ou retarder les mécanismes d'oxydation. Les molécules antioxydantes agissent en inhibant la propagation et en augmentant les cinétiques de terminaison, par réaction avec les radicaux libres auxquels elles fournissent un hydrogène. Les formes radicalaires ($A^\bullet$) de l'antioxydant sont stables et ne possèdent pas l'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides, ce qui marque la fin de la propagation.

Il existe différents groupes d'anti-oxydants :

- les antioxydants primaires ou antiradicalaires comprennent des composés phénoliques naturels (tocophérols) et les antioxydants synthétiques (butyl-hydroxy-toluène : BHT, butyl-hydroxy-anisole : BHA, gallate de propyle). Ils sont généralement utilisés à des concentrations de l'ordre de 0,02 g / 100 g par rapport aux lipides. Il se trouve que l'activité antioxydante peut être amplifiée en utilisant un mélange d'isomères de

tocophérol (α , β , δ et γ -tocophérol) (Ackman et *al.*, 1997). Utilisées séparément, la forme γ -tocophérol se révèle la plus active (Linder, 2003).

- les antioxydants secondaires ou préventifs de type II qui préviennent la formation des radicaux libres par différents mécanismes. Certains chélatent les ions métalliques réduisant par voie de conséquence l'effet pro-oxydant de ces ions. C'est le cas des acides phosphorique et citrique, des protéines phosphorylées ou certains hydrolysats de protéines (Amarowicz et *al.*, 1997). D'autres sont des piègeurs d'oxygène comme l'acide ascorbique, par exemple.
- Les agents dits « synergiques » améliorent l'action de certains antioxydants et augmentent la période de protection. Parmi eux se trouvent l'acide lactique, l'acide tartrique et l'acide orthophosphorique.
- Certaines méthodes comme la micro-encapsulation des huiles dans des matrices de maltodextrine ou d'amidon permettent une protection efficace contre l'oxydation et garantissent la stabilité des produits (Wanasundara et Shahidi, 1995 ; Heinzelmann et *al.*, 2000 ; Dzondo et *al.*, 2004). L'inclusion de lécithine dans les produits d'encapsulation a permis d'améliorer sensiblement la stabilité oxydative et thermique de l'huile de calmar (Lin et *al.*, 1995).

II.3.8. Les méthodes de concentration des huiles en acides gras polyinsaturés

Compte tenu de l'intérêt que présentent les acides gras polyinsaturés pour la santé humaine, de nombreuses méthodes de concentration des AGPI ont été mises en œuvre ces dernières années.

II.3.8.1. La complexation à l'urée

La fraction d'acides gras polyinsaturés présente dans les huiles peut être concentrée par complexation et précipitation avec l'urée. Ce procédé est souvent mis en œuvre en tant que prétraitement des huiles riches en AGPI.

Le principe est basé sur la propriété de l'urée à cristalliser sous forme d'une structure compacte tétragonale stable, formant des canaux de 5,67 Å de diamètre. En présence de molécules linéaires, l'urée forme des cristaux hexagonaux qui complexent les chaînes aliphatiques d'acides gras saturés comportant au moins 6 carbones.

La méthode consiste dans un premier temps en une saponification de l'huile en milieu éthanolique en présence de KOH ou de NaOH. L'huile est ensuite débarrassée de sa fraction

insaponifiable. La fraction d'acides gras est dissoute dans un mélange alcool / urée et refroidie à une température qui permet d'atteindre la concentration désirée. Les acides gras saturés, les monoènes et les diènes, dont une partie cristallise, sont séparés par filtration des AGPI à longue chaîne encore solubles dans le solvant. Des auteurs utilisent la chromatographie préparative pour purifier les AGPI n-3 après cristallisation (Hidajat et *al.*, 1995 ; Breivik et *al.*, 1997).

La réaction de complexation possède des paramètres expérimentaux tels que le rapport urée / acides gras, le temps de cristallisation et la température de cristallisation qui peuvent influencer le degré de concentration des AGPI. L'influence de ces paramètres a été étudiée par Wanasundara et Shahidi (1999) sur le degré de concentration en AGPI des huiles de phoque. Ils aboutissent à une teneur maximum en acides gras oméga 3 de 88,2 % dans des conditions optimales de rapport urée / acides gras de 4,5 (Poids / Poids), un temps de cristallisation de 24 h et une température de cristallisation de -10°C.

Ackman et *al.*, (1988) réalisent la concentration en EPA et DHA d'une huile de poisson rouge qui a la particularité d'être riche en acides gras C 20:1 et C 22:1 (majoritaires) à des teneurs respectives de 22 % et 28,9 % et une teneur modeste en EPA et DHA, respectivement de 5,4 % et 2,1 %. La complexation à l'urée a permis d'enrichir l'huile en EPA (32,5 %) et en DHA (29,2 %).

La concentration en AGPI peut être améliorée en procédant à une hydrolyse enzymatique de l'huile par des lipases avant la cristallisation à l'urée. Gamez-Meza et ses collaborateurs (2003) ont réalisé une concentration des AGPI de l'huile de sardine sur des échantillons d'huile saponifiée, des échantillons d'huile hydrolysée par des lipases immobilisées et par des lipases solubles. Ils ont observé que la complexation à l'urée de l'échantillon hydrolysé par des enzymes immobilisées donne un taux d'enrichissement beaucoup plus important, soit 92,9 % d'AGPI n-3 sous forme libre dans le concentré.

Ganga et *al.* (1998) ont employé une combinaison de 2 étapes de wintérisation (10 et 4°C), suivies d'une saponification et d'une complexation à l'urée pour obtenir un échantillon d'huile de sardine concentré à 90 % d'EPA et DHA.

II.3.8.2. La wintérisation ou cristallisation à basse température

C'est une technique de cristallisation à basse température, initialement développée pour séparer les triacylglycérols, les acides gras libres, les esters et autres lipides solubles dans les

solvants organiques (méthanol, acétone). Elle permet d'obtenir des fractions pures d'acides gras en jouant sur la nature du solvant et la température de cristallisation.

Ce procédé ne permet pas d'obtenir de fraction enrichie en AGPI par simple abaissement de la température et sans solvant en raison de la complexité des huiles en triacylglycérols dont les points de fusion couvrent une large plage de température. Ganga *et al.* (1998) ont observé qu'une wintérisation en deux étapes à des températures modérément faibles, 10 °C en 48 h et 4 °C pendant 72 h, entraîne une faible concentration en EPA et DHA. Ces étapes seraient selon eux, essentielles pour une bonne précipitation à l'urée.

Lee et Foglia (2001) comparent deux méthodes de cristallisation à basse température sur l'huile de menhaden. Ils opèrent d'un côté une cristallisation à froid sans solvant aux températures de 0, - 5, - 10 °C et de l'autre, une cristallisation en présence d'acétone aux températures de 0, - 18 et - 38 °C. Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'enrichissement en AGPI pour le procédé sans solvant quelle que soit la température de cristallisation. Pour le procédé en présence d'acétone, la teneur en [EPA + DHA] est égale à 35 % comparée à l'huile initiale dont la teneur [EPA + DHA] est de 30,4 %, avec un rendement massique de 62 %.

Moffat et ses collaborateurs (1993) proposent un procédé de concentration des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) basé sur la solidification rapide de gouttelettes d'huile sous forme de solides amorphes dans l'azote liquide. Cette solidification est suivie d'une extraction des AGPI dans l'acétone à -60 °C. L'étude menée sur neuf huiles marines montre que les rendements d'extraction et la concentration en AGPI-LC dépendent de la composition en triacylglycérols et de la nature des acides gras. Il est ainsi possible de concentrer par un facteur de 2,5 l'EPA et le DHA dans certaines huiles.

II.3.8.3. Concentration par des lipases spécifiques

Cette méthode emploie des lipases spécifiques qui catalysent l'hydrolyse d'un grand nombre de liaisons esters tout en présentant une spécificité marquée envers les substrats glycéridiques. Les enzymes utilisées sont de diverses origines (fongiques, bactériennes, pancréatiques ou gastriques).

Le principe des procédés de concentration par voie enzymatique consiste, dans une première étape, à hydrolyser spécifiquement les acides gras sur la molécule de glycérol en fonction de la nature de l'huile et de la régio-distribution de ces composés. Après élimination des acides

gras saturés libres, les AGPI sont ré-estérifiés sous forme d'acylglycérols à l'aide de lipases stéréospécifiques. Les réactions d'estérification sont réalisées en présence de solvants organiques. Le rendement d'estérification est influencé par les paramètres comme, entre autres, la quantité d'eau présente, le ratio glycérol / AGPI et la vitesse d'agitation.

Dans l'optique de parvenir à la production d'un concentré d'huile de poisson riche en acides gras polyinsaturés à longue chaîne sous forme de triacylglycérols, Moore et Mc Neill (1996) utilisent la lipase *Candida rugosa*, qu'ils combinent avec des techniques physiques et des réactions de ré-estérification spécifiques, à l'aide de la lipase de *Rhizomucor miehei*.

Les travaux de Tanaka et *al.* (1992) ont montré la spécificité d'action de 6 lipases envers les AGPI-LC d'huile de thon. Après attaque d'un mélange aqueux à 70 % d'huile de thon par la lipase de *Candida cylindracea* et élimination des acides gras libres, le mélange d'acylglycérols résiduels contient trois fois plus de DHA que le milieu initial. Ces travaux montrent une discrimination de cette enzyme non stéréospécifique envers le DHA, qui peut s'expliquer par la structure même de cet acide gras.

Linder et *al.* (2001) ont soumis l'huile de saumon (*Salmo salar*) à l'action d'une enzyme stéréospécifique sn-1 et sn-3 (Novozym[®] SP 398). Après filtration du milieu réactionnel sur une membrane, ils ont obtenu un enrichissement global de 30 % en AGPI dans le perméat.

Sun et Pigott (2002) ont étudié l'influence de 6 lipases commerciales sur la valorisation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne présents dans les viscères. Parmi ces enzymes, les lipases de *Pseudomonas cepacia* et *Candida rugosa* sont les plus efficaces dans la concentration des oméga 3 (EPA et DHA).

Avec cette méthode, Shimada et ses collaborateurs (1997) ont montré qu'il est possible de concentrer l'huile en une seule espèce d'AGPI n-3, comme le DHA. Pour cela, ils ont procédé à deux méthodes de réactions enzymatiques successives. D'abord une hydrolyse enzymatique avec *Pseudomonas sp.*, puis une ré-estérification sélective du DHA avec *Rhizopus delemar*.

Pour préparer un concentré purifié d'huile en EPA et DHA, Breivik et *al.* (1997) ont utilisé un procédé incluant des méthodes enzymatiques, une courte distillation, une complexation à l'urée et une chromatographie préparative.

II.3.8.4. Autres méthodes de concentration en AGPI

- Méthodes chromatographiques et distillation

Ce sont des techniques basées sur la séparation des acides gras en fonction de la longueur des chaînes carbonées ou de leur degré d'insaturation. Elles peuvent rendre possible le fractionnement et la concentration des acides gras libres ou estérifiés au-dessus de 90 %.

La distillation peut être aussi utilisée pour séparer partiellement des esters d'acides gras. Elle repose sur la différence de points d'ébullition et de poids moléculaires des acides gras et se pratique généralement à des températures élevées, de l'ordre de 250 °C.

- Concentration par fluide supercritique

Le fractionnement des esters d'acides gras par le dioxyde de carbone supercritique, en raison de ses propriétés (inertie, ininflammabilité, faible coût, compatibilité avec l'environnement) est une alternative qui peut être réalisée à l'échelle industrielle. Ici, c'est le fluide supercritique qui joue le rôle de solvant d'extraction.

II.4. Conclusion

Dans ce chapitre, une vue panoramique non exhaustive des travaux et recherches sur la valorisation des co-produits de poissons, a permis de mettre en exergue le potentiel nutritionnel que représentent les poissons sur le plan alimentaire. Il ressort de cette synthèse que les poissons représentent une source importante de micronutriments, de minéraux, de protéines et d'acides gras essentiels.

Face à l'augmentation des besoins alimentaires d'une population mondiale croissante, un recours à l'utilisation rationnelle des ressources constitue une solution indispensable pour l'industrie alimentaire. Cela implique nécessairement une profonde mutation des industries de transformation, afin de garantir la compétitivité et la rentabilité économique.

Ces vingt dernières années, les procédés d'extraction des protéines par voie enzymatique ont bien progressé par rapport aux méthodes chimiques, considérées comme sévères. La raison du succès des techniques enzymatiques dans le secteur alimentaire réside dans leur efficacité, leur facilité à l'emploi, leur rapidité, leur rapport coût-performance, ainsi que leur compatibilité avec l'environnement. L'utilisation des enzymes pour l'extraction des protéines de poisson favorise la production d'ingrédients qui possèdent un large spectre d'application dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Nous avons aussi montré dans ce chapitre que le poisson est une source incontournable d'acides gras essentiels. Les huiles de poissons sont riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Le poisson est ainsi une source importante d'énergie et sa consommation possède des effets bénéfiques, notamment sur la prévention des maladies cardiovasculaires, sur le développement du tissu nerveux central, durant la grossesse et la lactation.

Les co-produits de poisson représentent un potentiel protéique et lipidique important dans l'industrie de transformation du poisson. Ces co-produits présentent une garantie d'hygiène avérée au même titre que les produits finis directement comestibles.

De nombreuses méthodes mises en œuvre pour l'extraction de la fraction lipidique utilisent des solvants organiques à l'échelle du laboratoire et la cuisson-pressage à l'échelle industrielle.

En revanche, très peu ou pas de travaux prennent en compte la possibilité d'extraire la fraction lipidique en même temps que la fraction protéique par déstructuration du tissu protéique par voie enzymatique.

MATERIELS ET METHODES

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Analyse des co-produits de saumon.....	57
III.1.1. Origine des co-produits	57
III.1.2. Caractéristiques morphologiques des têtes de saumon.....	57
III.1.3. Préparation et conditionnement du substrat.....	58
III.1.4. Analyses physico-chimiques du substrat.....	58
III.1.4.1. Dosage du taux d'azote.....	58
III.1.4.2. Détermination de la teneur en lipides totaux.....	59
III.1.4.2.1. Méthode de Bligh et Dyer.....	59
III.1.4.2.2. Méthode de Folch.....	60
III.1.4.2.3. Méthode de Soxhlet.....	60
III.1.4.3. Dosage de l'humidité totale.....	61
III.1.4.4. Dosage des cendres et des minéraux.....	61
III.1.5. Dosage des acides aminés.....	61
III.2. Hydrolyse enzymatique des protéines.....	62
III.2.1. Enzymes utilisées.....	62
III.2.2. Protocoles expérimentaux.....	63
III.2.2.1. L'hydrolyse enzymatique.....	63
III.2.2.2. Calcul du degré d'hydrolyse.....	63
III.2.2.3. Séparation des résidus osseux.....	64
III.2.2.4. Inactivation de l'enzyme.....	64
III.2.2.5. Séparation de l'hydrolysate protéique et des différentes fractions lipidiques...	64
III.2.2.6. Conservation des produits.....	65
III.2.3. Optimisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique.....	65
III.3. Hydrolysats protéiques.....	68
III.3.1. Caractérisation de la taille des peptides des hydrolysats protéiques	68
III.3.1.1. Préparation de la colonne de filtration sur gel.....	68
III.3.1.2. Protocole de séparation des mélanges peptidiques.....	68
III.3.2. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques.....	69
III.3.2.1. La solubilité.....	69

III.3.2.2. La capacité émulsifiante.....	70
III.3.2.3. La stabilité des émulsions.....	70
III.3.2.4. La capacité d'absorption d'huile.....	71
III.4. Fractions lipidiques des co-produits de saumon.....	71
III.4.1. Extraction des lipides.....	71
III.4.1.1. Extraction des lipides totaux par solvant.....	71
III.4.1.2. Hydrolyse enzymatique.....	71
III.4.1.2.1. Séparation des fractions lipidiques.....	72
III.4.1.2.2. Traitement de la couche émulsionnée.....	72
III.4.1.3. Extraction par cuisson.....	73
III.4.2. Analyse des lipides.....	73
III.4.2.1. Analyse chimique des huiles.....	73
III.4.2.1.1. Indice d'acide (AOAC, norme 969.17, 1997).....	73
III.4.2.1.2. Indice d'iode (AOAC, norme 969.17, 1997).....	74
III.4.2.1.3. Indice de saponification (AOAC, norme 920.160, 1997).....	74
III.4.2.1.4. Indice de peroxyde (AOAC, norme 965.33, 1997).....	75
III.4.2.2. Détermination de l'insaponifiable.....	76
III.4.3. Développement de la chromatographie sur couche mince	76
III.4.3.1. Chromatographie sur couche mince standard (sur plaque).....	76
III.4.3.1.1. Détection des phospholipides par un réactif spécifique des phosphates.....	77
III.4.3.1.2. Détection des phospholipides par leurs groupements spécifiques.....	78
III.4.3.2. Chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®).....	80
III.4.3.2.1. Principe de l'appareil	80
III.4.3.2.2. Etalonnage des chromarods –SIII par des molécules standard.....	81
III.4.3.2.3. Séparation des classes de lipides des échantillons.....	83
III.4.4. Fractionnement des classes de lipides sur colonne.....	84
III.4.5. Analyse thermique des huiles par calorimétrie différentielle.....	84
III.4.6. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.....	84
III.4.6.1. Préparation des esters méthyliques.....	84
III.4.6.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.....	85

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Analyse des co-produits de saumon

III.1.1. Origine des co-produits

Dans le cadre du programme OFIMER (Office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture) portant sur la valorisation des co-produits de filetage de saumon, nous avons travaillé en collaboration avec la société « Les Salaison Maritimes André Ledun » sur son site de transformation à Cany-Barville (76).

Le saumon d'Atlantique d'élevage (*Salmo salar*) a été choisi en raison de sa forte teneur en huile riche en acides gras polyinsaturés et du tonnage de co-produits générés sur les lignes de transformation. Ces co-produits (essentiellement les têtes, les peaux et les arêtes issues du filetage) ainsi que les filets de saumon sont prélevés sur les chaînes de découpe du site de transformation à Cany-Barville (76) et immédiatement congelés sur place à -20 °C avant d'être acheminés à Nancy par transporteur spécialisé. Les co-produits utilisés dans cette étude ont fait l'objet de la même attention que les filets au cours des diverses manipulations et conditions de conservation. Ces précautions confèrent aux produits des qualités microbiologiques et organoleptiques différentes des produits destinés aux entreprises de transformation des sous-produits en farine de poisson.

III.1.2. Caractéristiques morphologiques des têtes de saumon

Les caractéristiques physiques des têtes de saumon ont été déterminées après un choix aléatoire de 10 têtes qui ont été ensuite décongelées. Chaque tête a été pesée et la longueur (en cm) mesurée dans la partie supérieure dorsale, de l'extrémité de la lèvre supérieure de la bouche à l'extrémité supérieure dorsale. La circonférence a été mesurée à mi-longueur de la tête, entre l'emplacement du cerveau (au-dessus des yeux) et l'arrière des ouïes. (**Figure III.1**).

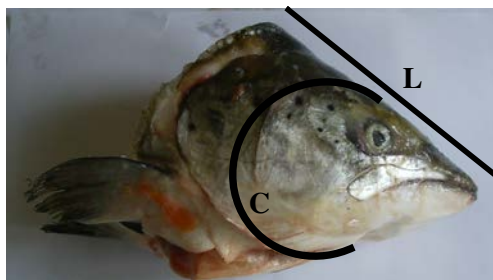


Figure III.1. Mesure des caractéristiques morphologiques de la tête de saumon, C : circonférence, L : longueur (cm)

III.1.3. Préparation et conditionnement du substrat

Les têtes et les filets de saumon congelées, mises à notre disposition par la société « Les salaisons Maritime André Ledun » (Cany-barville, 76), sont immédiatement conditionnées dans un congélateur à -20 °C. Elles sont ensuite décongelées dans un réfrigérateur à 4 °C pendant 24 h et pesées. Des quantités comprises entre 500 g et 1 kg sont alors découpées et broyées dans un broyeur à vis sans fin (S.A.S. Groupe SEB Moulinex, Ecully, France). La durée du broyage pour une quantité de 500 g n'excède pas 15 minutes, ce qui permet d'obtenir un substrat dont la température reste toujours inférieure à 4°C, afin de préserver les qualités microbiologiques.

III.1.4. Analyses physico-chimiques du substrat

III.1.4.1. Dosage du taux d'azote

La teneur en azote total du broyat frais est déterminée par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1990). Cette méthode est basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique en présence d'un catalyseur (Na_2SO_4 17 g / 100 g ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g / 100 g). L'ion ammonium du digestat est déplacé par une base forte (NaOH) que l'on ajoute en excès. Au cours de la distillation, l'hydroxyde d'ammonium formé (NH_4OH) est entraîné par la vapeur d'eau et récupéré dans un vase de titrage contenant une solution d'acide borique en excès. Le borate d'ammonium formé peut alors être déplacé par de l'acide sulfurique titré. Le dosage est réalisé de façon automatique avec un appareil automatique de type Vapodest 4S Gerhardt. Pour chaque échantillon, l'analyse est répétée trois fois. On introduit pour cela successivement dans un matras :

- la prise d'échantillon (1 ml si l'échantillon est liquide et 0,5 g si l'échantillon est solide)
- le catalyseur de minéralisation en excès : de 0,5 à 1 g,
- 2 ml d'acide sulfurique concentré (95 %, v / v),
- 1 ml de peroxyde d'hydrogène à 110 volumes.

Les matras sont ensuite portés 3 heures à 400 °C dans le banc de minéralisation. Après refroidissement, ils sont installés dans l'appareil à distiller. Il y a alors ajout automatique d'eau déminéralisée (2 ml) et de lessive de soude (2,5 ml) à 36 % (v / v). L'acide borique est introduit automatiquement dans le récipient recevant l'hydroxyde d'ammonium issu de la distillation. Le titrage de l'azote est réalisé avec de l'acide sulfurique (0,1 N ou 0,01 N) par colorimétrie (l'indicateur, mélange du rouge de méthyle et de vert de bromocrésol, vire du vert en milieu alcalin au rose en milieu acide).

Les résultats sont exprimés en concentration massique d'azote. La formule utilisée pour cela est la suivante :

$$\text{Taux d'azote (\%)} = (V - V_0) \times N \times 1400 / E \quad \text{pour les échantillons solides}$$

$$\text{Taux d'azote (g / l)} = (V - V_0) \times N \times 14 / E \quad \text{pour les échantillons liquides}$$

Avec V : volume d'H₂SO₄ nécessaire au titrage de l'échantillon en ml,

V₀ : volume d'H₂SO₄ nécessaire au titrage du témoin en ml,

N : normalité de la solution d'H₂SO₄,

E : prise d'échantillon en g ou en ml

Taux de protéines = 6,25 × taux d'azote

III.1.4.2. Détermination de la teneur en lipides totaux

III.1.4.2.1. Méthode de Bligh et Dyer

La méthode de Bligh et Dyer (1959) est reconnue comme méthode de référence pour extraire les lipides des tissus animaux. Elle est, par exemple, applicable à des tissus comme le muscle de la morue qui contient 80 % d'eau et 1 % de lipides.

Différents échantillons de 100 g de têtes fraîches broyées sont pesés (S.A.S. Groupe SEB Moulinex, Ecully, France). On ajoute 100 ml chloroforme et 200 ml méthanol et on mélange vigoureusement avec un mixer (Easy MiXX 260 W Bosch, France) pendant 2 minutes. On rajoute ensuite 100 ml de chloroforme et 100 ml d'eau distillée puis on homogénéise pendant 30 secondes.

L'ensemble est filtré sous aspiration douce sur Büchner garni de papier Whatman n°1. La chair restante et le papier Whatman utilisé sont mélangés avec 100 ml de chloroforme et l'ensemble est filtré sur un nouveau papier Whatman n°1. Les fractions sont rassemblées et mises à décanter dans une ampoule jusqu'à séparation en deux phases. La phase organique sous-jacente est recueillie dans un ballon taré après addition de sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau, puis elle est évaporée à sec dans un évaporateur rotatif (Laborota, Heiolph Instruments, Germany) à 50 °C. Le résidu lipidique est pesé.

Il faut noter que le rapport chloroforme / méthanol / eau (2 / 2 / 1,8 ; v / v / v) a été respecté par ajout de l'eau distillée à la chair fraîche.

III.1.4.2.2. Méthode de Folch

L'extraction de l'huile a également été réalisée selon la méthode de Folch et *al.* (1957) modifiée par Christie (1982), particulièrement bien adaptée aux produits anhydres.

L'extraction a été effectuée sur des broyats lyophilisés de tête de saumon. A un échantillon de 50 g, on ajoute 200 ml de chloroforme et 100 ml de méthanol, puis on homogénéise vigoureusement à l'aide d'un mixeur pendant 2 min. Le mélange est filtré sur Büchner muni d'un papier filtre Whatman n°1. Les résidus sont redispersés dans un mélange chloroforme – méthanol (2 : 1, v / v, 300 ml), homogénéisés pendant 3 min et filtrés à nouveau. Les solides restants sont lavés avec un mélange chloroforme – méthanol (2 : 1, v / v, 60 ml). Tous les filtrats sont rassemblés dans des ampoules à décanter. On ajoute aux filtrats 0,2 volume de solution de NaCl à 0,7 %. On observe la séparation en deux phases : une phase surnageante contenant les composés non lipidiques et une phase organique qui contient la quasi-totalité des lipides. La phase organique est récupérée dans un ballon taré, puis le solvant est éliminé à 50 °C à l'évaporateur rotatif sous vide. La teneur en huile est déterminée par gravimétrie comme ci-dessus.

III.1.4.2.3. Méthode de Soxhlet

L'huile est extraite sur des échantillons 100 g de broyats lyophilisés de têtes de saumon à l'éther de pétrole selon la méthode de Soxhlet (AOAC, 1990) pendant 6 h. La teneur en huile est déterminée par gravimétrie après évaporation du solvant à 50 °C.

III.1.4.3. Dosage de l'humidité totale

L'humidité totale est déterminée en portant des échantillons (1 à 5 g) dans une étuve à 103 °C jusqu'à poids constant. Elle est définie selon la formule suivante :

$$\text{Taux d' humidité} = \frac{\text{Masse de l' échantillon frais} - \text{masse de l' échantillon sec}}{\text{masse de l' échantillon frais}} \times 100$$

III.1.4.4. Dosage des cendres et des minéraux

Les cendres sont déterminées au four à moufle (540 °C) dans des creusets en porcelaine sur quelques centaines de milligrammes d'échantillon jusqu'à minéralisation complète pendant 12 h. Le taux de cendres se calcule comme étant le rapport de masse restante après incinération sur la masse initiale.

Les teneurs en magnésium, potassium, sodium et calcium sont mesurées par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin-Elmer, Model 1100, France) sur les cendres dissoutes dans une solution de HCl concentré à 36 % (diluée au 1 / 100) pour le dosage du potassium et du sodium.

Pour le dosage du magnésium et du calcium, les cendres sont dissoutes dans une solution contenant 10 % de chlorure de lanthane (LaCl₃) comme correcteur d'interaction. Le dosage de minéraux nécessite au préalable l'établissement d'une gamme étalon.

III.1.5. Dosage des acides aminés

Les acides aminés des hydrolysats et les protéines initiales des têtes de saumon sont dosés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (Colonne PTC RP-18, 220 mm de long, 2,1 mm de diamètre interne et une pré-colonne, Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les échantillons sont dispersés dans de l'eau osmosée à raison d'environ 0,8 g / l, ils sont ensuite passés sur un filtre Millipore 0,22 µm.

Les échantillons sont hydrolysés sous vide à 150°C pendant 60 min dans une station Pico-Tag (Waters, Milford, MA, USA) en présence de HCl 6 N à 1 % de phénol. Ils sont ensuite repris dans de l'eau ultra pure et dérivés automatiquement grâce à un auto dérivatiseur-analyseur-420 a (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les dérivés d'acides aminés sous forme de phényl-isothiocyanates (PITC) sont séparés par un tampon A (acétate de sodium 45 mM à pH 5,9) et un tampon B (30 % acétate de sodium 105

mM, pH 4,6 ; 70 % acétonitrile) sous un gradient d'élution. La détection est fixée à 254 nm et la durée totale de l'analyse est de 31 minutes.

L'acquisition et l'exploitation des résultats sont réalisées en utilisant le logiciel Model 600 Data Analysis System » (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

III.2. Hydrolyse enzymatique des protéines

III.2.1. Enzymes utilisées

Toutes les enzymes utilisées dans cette étude ont été fournies par les laboratoires Novo Nordisk (Bagsvaerd, Danemark).

Les activités protéolytiques des préparations enzymatiques sont mesurées en unité Anson (AU) comme décrit par les laboratoires Novo Nordisk (1978).

De l'hémoglobine dénaturée est protéolysée sous certaines conditions (pH 7,5 ; 25°C ; 10 min) et précipitée par l'acide trichloroacétique (TCA). Un dosage spectrophotométrique à 750 nm est effectué sur la phase soluble en présence de réactif phénolique de Folin et Ciocalteu. L'unité Anson (UA) est la quantité d'enzymes produisant une coloration correspondant à un mili-équivalent de tyrosine par minute à partir d'un hydrolysate d'hémoglobine soluble dans l'acide trichloroacétique.

- La subtilisine Carlsberg (Alcalase® 2,4L)

C'est une enzyme qui appartient à la famille des subtilisines (EC.3.4.21.14a). Elle est obtenue à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. Il s'agit d'une endopeptidase de type sérine, elle hydrolyse également des liaisons esters et peut catalyser des réactions de transestérification et de transpeptidation. Elle présente une activité maximale à pH 8 et à la température de 60°C. Son activité est de 2,4 unité Anson / g.

- La protéase neutre (Neutrase® 0,8L)

C'est une protéase bactérienne produite par une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis* (EC.3.4.24.4f). Elle a une activité de 0,8 unité Anson / g. La Neutrase® est une endopeptidase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dont le groupement aminé est apporté par un acide aminé hydrophobe comme la leucine, la valine, l'isoleucine et la norleucine, ainsi que les liaisons dont le groupement carboxylique est porté par la proline. Il s'agit d'une

métalloprotéase comportant un atome de zinc essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme. Son activité est maximale à pH 7 et à 50 °C.

- La ProtamexTM

La ProtamexTM est une endoprotéase issue de *Bacillus sp.* (3.4.21.62). Elle se présente sous forme d'une poudre légère dont les microgranules ont une taille de 250 à 450 µm. C'est une préparation très soluble dans l'eau avec une activité déclarée de 1,5 unité Anson / g. Les conditions optimales d'activité se situent de pH 5,5 à 7,5 entre 35 et 60 °C. Elle peut être inactivée à un barème de 50°C pendant 30 minutes ou de 85°C pendant 10 minutes.

III.2.2. Protocoles expérimentaux

III.2.2.1. L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse a été réalisée dans un réacteur agité thermostaté de 2 litres (Biolafitte) où l'échantillon initial broyé est mis en suspension dans l'eau distillée. La technique du pH-stat utilisée a été développée par Adler-Nissen et Olsen (1979), Adler-Nissen (1982, 1986), Adler-Nissen et *al.* (1983). Elle consiste à maintenir le pH constant par ajout automatique de soude 4 N lors de la réaction enzymatique. La quantité de base consommée permet de calculer le degré d'hydrolyse. La réaction est mise en œuvre pendant 2 heures sous agitation constante à 450 tr / min.

III.2.2.2. Calcul du degré d'hydrolyse

Adler-Nissen (1982) a montré qu'il existe une proportionnalité entre la libération des protons et le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées.

Le degré d'hydrolyse est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées sur le nombre de liaisons peptidiques totales. Il est défini selon la formule suivante :

$$DH = \frac{B \times N_B}{MP \times \alpha \times h_{tot}} \times 100$$

Avec B : volume de NaOH ajouté (ml)

N_B : normalité de la soude

α : degré moyen de dissociation des groupes alpha aminés

MP : masse de protéines (NT x 6,25) présentes dans le milieu réactionnel (g)

h_{tot} : nombre de liaisons peptidiques dans la protéine (7,5 méq / g)

Le degré de dissociation est défini comme suit :

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}}$$

où le pK représente le pK moyen des fonctions α -aminés libérées durant l'hydrolyse :

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400$$

où T est la température exprimée en Kelvin.

III.2.2.3. Séparation des résidus osseux

L'hydrolyse enzymatique permet une solubilisation des protéines, la libération des lipides et une décantation des débris osseux. Après l'hydrolyse, le mélange réactionnel est filtré pour éliminer les matières insolubles avant d'être centrifugé à chaud pour obtenir une meilleure séparation des fractions protéiques et lipidiques.

III.2.2.4. Inactivation de l'enzyme

A la fin de l'hydrolyse, la réaction enzymatique est arrêtée par inactivation thermique du mélange réactionnel. L'hydrolysate est chauffé par injection de vapeur d'eau pendant 10 minutes à 95 °C, à l'aide d'un générateur de vapeur ménager (Vaporetto 1300 NV POLTI).

III.2.2.5. Séparation de l'hydrolysate protéique et des différentes fractions lipidiques

Le mélange réactionnel est soumis à une centrifugation de 5000 g pendant 10 minutes à 50 °C (**Figure III.2 a**). La phase aqueuse, intermédiaire entre la phase émulsionnée (au-dessus) et les protéines plus denses (au-dessous), est minutieusement récupérée pour limiter au maximum les contaminations. Les différentes fractions lipidiques sont ensuite séparées après une deuxième centrifugation (**Figure III.2 b**) et conservées sous azote à - 20 °C.

Le culot protéique est séparé, pesé puis lyophilisé en vue de caractériser les lipides et les protéines qui y sont contenues.

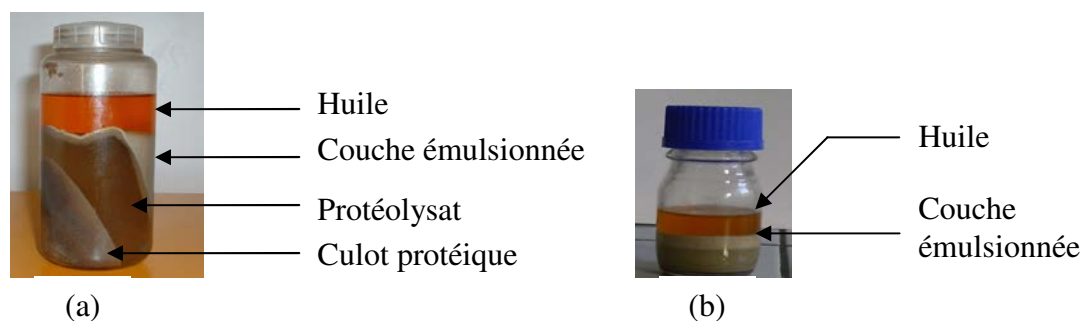


Figure III.2. Résultat des deux types de centrifugations, (a) du milieu réactionnel à $5000 \times g$ / 10 min ; (b) de la phase émulsionnée à $4500 \times g$ / 15 min.

III.2.2.6. Conservation des produits

Tous les hydrolysats protéiques ainsi que les culots de centrifugation obtenus sont congelés rapidement dans des ballons plongés dans un liquide de refroidissement porté à $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, avant d'être installés sur un lyophilisateur (Leybold Heraeus, Orsay) pendant 48 heures. Les lyophilisats sont ensuite conservés dans des sacs en plastique à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour la suite de l'étude.

III.2.3. Optimisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique

Le procédé d'hydrolyse enzymatique appliqué à un substrat aussi complexe et hétérogène que les co-produits de saumon (tête de poisson), ne permet pas une utilisation des modèles théoriques de cinétique enzymatique classique.

L'utilisation des réseaux uniformes de Doehlert (1970) permet d'évaluer les effets et les interactions des facteurs considérés comme les plus influents, à savoir la température, le rapport enzyme / substrat et le pH, sur un domaine suffisamment restreint. Il est important de signaler que la représentation polynomiale de la fonction réponse n'est valable qu'à l'intérieur du domaine expérimental. L'extrapolation de cette dernière à l'extérieur du domaine conduirait à un modèle théorique erroné.

Les réseaux uniformes de Doehlert (1970) ont l'avantage de présenter une distribution uniforme des points expérimentaux dans l'espace des facteurs normés, augmentant ainsi la précision et la qualité du modèle prévisionnel. La précision du modèle peut être améliorée en fonction de la densité des points, disposés suivant un réseau rhombique. Le nombre d'expériences (N) à réaliser est déterminé par le nombre de paramètres (k) pris en compte :

$$N \geq k^2 + k + 1$$

Une des qualités remarquables de cette matrice est la possibilité d'attribuer des niveaux distincts aux différentes variables indépendantes : la première variable comporte 5 niveaux, la dernière est à 3 niveaux et toutes les autres variables intermédiaires présentent 7 niveaux. En fonction des contraintes techniques et économiques imposées par le procédé, il est possible de planifier la matrice d'expériences.

En tenant compte des contraintes imposées par la réaction d'hydrolyse, nous avons retenu la température, le rapport enzyme / substrat et le pH de la réaction. Le **Tableau III.1** présente les niveaux des différents facteurs ainsi que le domaine expérimental défini tenant compte du caractère alimentaire des produits finaux.

Tableau III.1. Domaine expérimental et niveau des facteurs.

Facteurs	Unités	Domaine expérimental	Niveaux
Température	°C	49 52 55 58 61	5
Enzyme / substrat	g / 100 g	3,5 4,0 4,5 5,0 5,5 6,0 6,5	7
pH	-	7,0 7,5 8,0	3

Une matrice d'expériences de 15 essais permet d'évaluer l'influence de chacun des paramètres et les interactions entre ces derniers. Trois répétitions au centre du domaine sont réalisées afin d'évaluer l'erreur expérimentale (**Tableau III.2**).

Après ajustement du pH par ajout automatique de soude 4 N, la réaction enzymatique s'effectue pendant 2 heures sous agitation constante à 450 tr / min, dans le réacteur de 2 litres.

Tableau III.2. Plan d'expériences des conditions d'hydrolyse des protéines par l'Alcalase® 2,4L.

N° Expérience	Température (°C)	Enzyme / Substrat (g / 100 g)	pH
1	61	5	7,5
2	49	5	7,5
3	58	6,5	7,5
4	52	3,5	7,5
5	58	3,5	7,5
6	52	6,5	7,5
7	58	5,5	8
8	52	4,5	7
9	58	4,5	7
10	55	6	7
11	52	5,5	8
12	55	4	8
13	55	5	7,5
14	55	5	7,5
15	55	5	7,5

Les réponses étudiées retenues sont le degré d'hydrolyse (DH) et le rendement d'extraction protéique. Ce dernier est calculé à partir de la teneur en azote x 6,25 de l'hydrolysate, après élimination des débris osseux et de l'huile par centrifugation.

Le traitement statistique des réponses expérimentales a été réalisé à l'aide du logiciel NEMROD® (New Efficient Methodology for Research using Optimal Design (Mathieu et Phan-Tan-Luu, 1992) :

- Analyse de la variance, régression multilinéaire, analyse des résidus (REGSIA)
- Effets des facteurs principaux et interactions (MEFFET)
- Surfaces de réponse (SUREPE)

III.3. Hydrolysats protéiques

III.3.1. Caractérisation de la taille des peptides des hydrolysats protéiques

- Principe de la chromatographie liquide d'exclusion de taille

La chromatographie liquide d'exclusion de taille est une technique basée sur la rétention sélective des molécules de soluté suivant leur taille lors de leur pénétration dans le réseau poreux de la phase stationnaire. Les plus grosses molécules ne pénètrent pas dans les pores et sont exclues tandis que les plus petites pénètrent plus profondément dans les pores et sortent les dernières.

III.3.1.1. Préparation de la colonne de filtration sur gel

La préparation de la colonne est effectuée en deux étapes : la préparation du gel et le remplissage de la colonne.

La préparation du gel est réalisée selon la fiche technique de Sigma (Sigma Chemical Company). Elle consiste à hydrater le gel sec (Sephadex G 50F) dans de l'eau distillée à raison de 30 ml/g de résine pendant une nuit. Le gel hydraté est ensuite mis en suspension dans quatre volumes de tampon d'élution (50 mM Tris-HCl, pH 7,5).

La colonne vide est remplie à 20 % du tampon d'élution. Le gel est versé dans la colonne en évitant la formation de bulles d'air (la sortie étant ouverte). Lorsque la colonne est remplie à la hauteur souhaitée, on insère l'adaptateur de flux et on fait passer du tampon (environ un volume de lit) au débit d'élution. A la fin du remplissage, la sortie est fermée et l'adaptateur de flux est ajusté à la hauteur du lit.

III.3.1.2. Protocole de séparation des mélanges peptidiques

La distribution de la taille des peptides des différents hydrolysats a été étudiée par chromatographie liquide d'exclusion de taille à basse pression. La séparation a été réalisée avec une colonne Sephadex[®] G50 F (Sigma) (longueur : 100 cm, diamètre interne : 1 cm, volume du gel : 70 cm³). Les limites de séparation vont de 1500 à 30000 Da, la phase mobile est le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Les échantillons sont dissous dans de l'eau distillée (14 mg / ml), passés sur un filtre Millipore 0,45µm et élués à 0,14 ml / min.

La détection est réalisée à 210 nm permettant ainsi de détecter les liaisons peptidiques.

L'étalonnage de la colonne est réalisé avec des protéines et peptides de masses molaires connues, dilués à 1 mg / ml dans de l'eau distillée (**Figure III.3**). Les molécules standard (Sigma) utilisées sont la sérum albumine (66000 Da), l'anhydrase carbonique (29000 Da), le cytochrome C (12400 Da), l'aprotinine (6500 Da), l'hormone parathyroïde humaine (2808 Da).

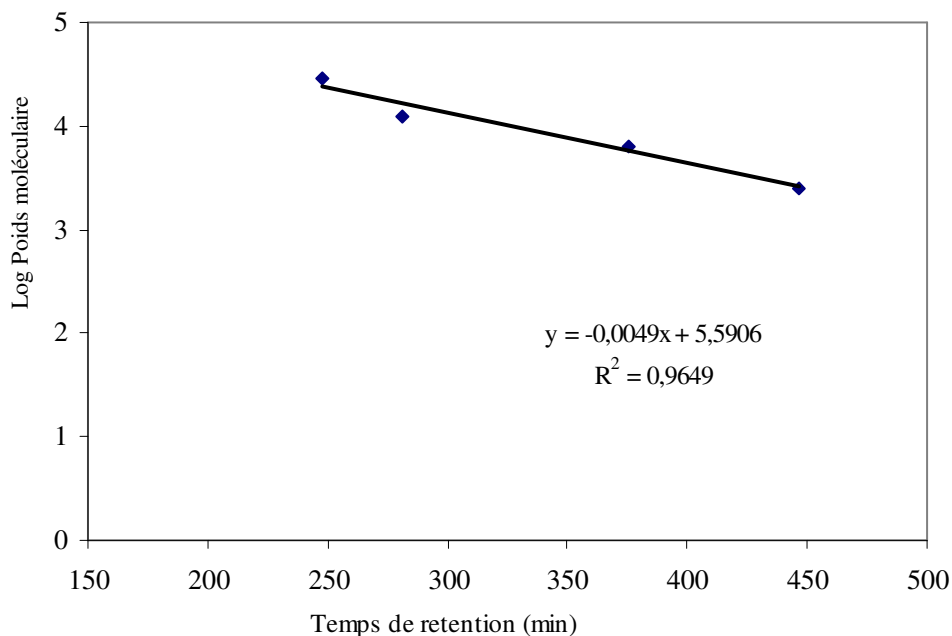


Figure III.3. Etalonnage de la colonne chromatographique d'exclusion de taille Sephadex® G50-F (solvant Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; débit 0,14 ml / min ; 214 nm)

III.3.2. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques

III.3.2.1. La solubilité

La solubilité des hydrolysats lyophilisés est déterminée selon la méthode standard AOCS modifiée par Morr et *al.* (1985). Des aliquots de 500 mg d'hydrolysats sont dispersés dans environ 40 ml de solution de NaCl 0,1 M. Le pH du mélange est ensuite ajusté sous agitation pendant 1 h jusqu'à valeur constante au moyen de HCl et de NaOH 0,1 N. Les solutions sont ensuite complétées à 50 ml avec la solution de NaCl 0,1 M, puis centrifugées à 4500 × g pendant 30 min. Les surnageants sont passés sur papier Whatman n°1 et l'azote soluble est dosé par la méthode de Kjeldahl. Le pourcentage de solubilité est calculé selon la formule suivante :

$$NS(\%) = \frac{NT \text{ du surnageant}}{NT \text{ de la dispersion initiale}} \times 100$$

où NS est la solubilité de l'azote et NT est l'azote total.

III.3.2.2. La capacité émulsifiante

La capacité émulsifiante des hydrolysats et du témoin (protéines non hydrolysées) a été mesurée selon la méthode de Vuillemand et *al.* (1990). Elle est évaluée par la mesure de la conductivité électrique spécifique ($\mu\text{S} / \text{cm}$) sur des émulsions préparées à partir des hydrolysats protéiques et de l'huile de maïs (Epi d'or, France), dont la composition en acides gras est la suivante :

C18:2 = 60,8 % ; C18:1 = 27,1 % ; C16 = 12,0 % ; densité de l'huile = 0,91 à 20 °C.

Des dispersions protéiques (50 ml) ont été préparées dans de l'eau distillée à des concentrations (g/100 mL) variant de 0,02 % à 0,2 %, puis ajustées à pH 7 avec NaOH ou HCl (0,1 M).

Le système de mesure de la conductivité est constitué d'un récipient, contenant la solution protéique, connecté à un système de réfrigération par l'eau glacée afin de maintenir la température de l'émulsion à 25 °C. L'huile est ajoutée en continu au mélange (17 g / min) à l'aide d'une pompe péristaltique. La conductivité de l'émulsion est mesurée à l'aide d'un conductimètre à microprocesseur LF 196 (WTW, OSI, France), le mélange étant sous agitation constante à 20000 tr / min grâce à un agitateur Ultra-turrax T25 (Janke-Kunkel IKA Staufen, Germany). L'addition de l'huile est arrêtée lors de la chute brutale de la conductivité correspondant à l'inversion de phase. Le volume de l'huile ajoutée permet de calculer la capacité émulsifiante de la solution.

$$CE = \frac{\left(\text{masse d'huile émulsifiée} \right)_{\text{dans 50 ml de solution protéique}} - \left(\text{masse d'huile émulsifiée} \right)_{\text{dans 50 ml d'eau}}}{\text{masse de protéines initiales}} \times 100$$

III.3.2.3. La stabilité des émulsions

La stabilité des émulsions a été mesurée selon la méthode de Miller et Groninger (1976) décrite par Kristinsson et Rasco (2000 b).

500 mg d'hydrolysate lyophilisé sont dispersés dans une solution saline (NaCl 0,1 M) pour obtenir un volume total de 50 ml. On ajoute 50 ml d'huile de soja. Le mélange est homogénéisé (2 min) à l'aide d'un vortex pour obtenir une émulsion. On dispose 3 aliquotes de 25 ml de l'émulsion dans des éprouvettes graduées qu'on laisse reposer pendant 15 min. On mesure ensuite le volume total et le volume aqueux qui se séparent de l'émulsion.

$$SE = (V_t - V_a) \times \frac{100}{V_t}$$

où V_t est le volume total et V_a est le volume aqueux.

III.3.2.4. La capacité d'absorption d'huile

La capacité d'absorption d'huile a été analysée selon la méthode modifiée décrite par Shahidi et *al.* (1995) :

On mélange 500 mg d'échantillon et 10 ml d'huile de soja, avec une spatule, dans un tube à centrifuger de 50 ml. On laisse reposer l'ensemble dans une chambre à 23 °C pendant 30 min en remuant toutes les 10 min. Le mélange est centrifugé à 2000 × g pendant 25 min.

L'huile libre est retirée et l'huile adsorbée est déterminée par la différence des masses.

Le résultat est exprimé en millilitres d'huile adsorbée par gramme de protéines ou d'hydrolysats.

III.4. Fractions lipidiques des co-produits de saumon

III.4.1. Extraction des lipides

III.4.1.1. Extraction des lipides totaux par solvant

Les lipides totaux ont été extraits selon les méthodes de Bligh et Dyer (1959), Folch et *al.* (1957) et Soxhlet (AOAC, 1990), toutes décrites dans le paragraphe III.1.4.2.

III.4.1.2. Hydrolyse enzymatique

La réaction enzymatique a été mise en œuvre selon la description au paragraphe I.3.2.1.

Les capacités d'extraction de l'huile avec l'Alcalase[®] 2,4 L, la Neutrase[®] 0,8 L et la Protamex[™] ont été étudiées dans leurs conditions d'activité optimale selon la fiche technique des laboratoires Novo Nordisk (**Tableau III.3**).

Tableau III.3. Conditions opératoires pour les hydrolyses selon l'enzyme utilisée pour l'extraction de l'huile.

	Alcalase [®] 2,4 L	Neutrase [®] 0,8 L	Protamex [™]
Température de la réaction	60 °C	50 °C	50 °C
pH	8,0	7,0	7,5
rapport E / S	5 g / 100 g		90 UA / kg
Taux de protéines (g / 100 g du produit humide)	12,5		
Volume du milieu réactionnel	1 litre		
Agitation	450 tr / min		
NaOH	4 N		

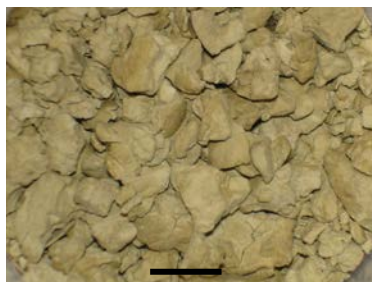
III.4.1.2.1. Séparation des fractions lipidiques

Afin de limiter la dégradation des AGPI réputés pour leur sensibilité à l'oxydation, les fractions d'huile sont séparées par centrifugation à $4500 \times g$ / 15 min avant l'inhibition thermique de l'enzyme dans le protéolysat (**Figure III.2**). La fraction d'huile est passée sur une couche de sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer les traces d'eau. Le sulfate de sodium anhydre est disposé sur une hauteur de 10 cm dans une colonne reliée à un système d'aspiration sous vide. L'huile recueillie est conservée sous azote à -20 °C .

III.4.1.2.2. Traitement de la couche émulsionnée

La couche émulsionnée solide obtenue après les deux séries de centrifugations du milieu réactionnel (**Figure III.2**) est lavée avec une solution de NaCl (0,7 %). Cette fraction est mise en suspension dans la solution de NaCl dans un rapport 1 : 1 (poids : poids). L'ensemble est ensuite homogénéisé au vortex puis centrifugé à 2000 tr / min pendant 10 min. Selon Rossignol-Castera (1998), le lavage d'une phase organique par une solution saline a pour but d'éliminer les protéines hydrophobes, les hydrates de carbone (glucides et polysaccharides) et

autres constituants non lipidiques. La couche émulsionnée est ensuite lyophilisée et conservée sous azote à - 20 °C (**Figure III.4**).



1 cm

Figure III.4. Photographie de la couche émulsionnée lyophilisée (échelle 1)

III.4.1.3. Extraction par cuisson

L'extraction thermique a été mise en œuvre dans un réacteur thermostaté de 2 litres dans lequel 500 grammes de broyat de tête sont dispersés dans 500 ml d'eau distillée. Le mélange est mis sous agitation (450 tr / min) sous azote à 95 °C pendant 30 min. Le bouillon issu de la cuisson est passé sur un tamis, puis le filtrat est centrifugé à 2000 × g pendant 15 min. L'huile surnageante est séparée, puis pesée pour calculer le taux d'extraction. Elle est ensuite conservée sous azote à - 20 °C.

III.4.2. Analyse des lipides

III.4.2.1. Analyse chimique des huiles

III.4.2.1.1. Indice d'acide (AOAC, norme 969.17, 1997)

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes de KOH nécessaires pour neutraliser l'acidité libre d'un gramme de matière grasse. Il donne une évaluation de la quantité d'acides gras libres. On dissout 500 mg de matière grasse dans un mélange éthanol / éther diéthylique (1 : 1, v / v). On ajoute 4 à 5 gouttes de phénolphthaléine comme indicateur coloré. L'ensemble est titré sous agitation magnétique avec une solution d'hydroxyde de potassium 0,1 N jusqu'à ce que le mélange devienne rose. L'indice d'acide se détermine comme suit :

$$IA = V \times N \times 56,1 / \text{Masse de la matière grasse}$$

où V est le volume de KOH (ml) nécessaire à neutralisation des acides gras libres,

N est la normalité de la solution de KOH, 56,1 est la masse molaire du KOH

L'acidité est le pourcentage d'acides gras libres exprimé en pourcentage d'acide oléique (masse molaire : 282) :

$$\text{Acidité (\% acide oléique)} = \frac{IA \times 282}{56,1} \times 100 = \frac{IA}{1,99}$$

III.4.2.1.2. Indice d'iode (AOAC, norme 993.20, 1997)

L'indice d'iode représente le nombre de grammes d'iode fixé par 100 g de corps gras. Il permet de connaître le degré d'insaturation global des matières grasses. Le dosage consiste à faire agir une solution halogénante, le réactif de Wijs sur l'échantillon préalablement dissous dans le tétrachlorure de carbone. On ajoute ensuite une solution d'iodure de potassium KI afin d'extraire l'iode en excès dans la phase aqueuse et on titre en retour par le thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N. La réaction d'addition est accélérée par l'emploi d'un catalyseur, l'acétate mercurique dans l'acide acétique. Le résultat est obtenu selon :

$$II = \frac{(B - S) \times 0,1 \times 126,9}{\text{Masse de matière grasse}}$$

où B est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer le blanc

S est le volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour titrer l'essai

0,1 est la molarité de la solution de thiosulfate de sodium

Masse molaire de l'iode : 126,9

III.4.2.1.3. Indice de saponification (AOAC, norme 920.160, 1997)

L'indice de saponification correspond au nombre de milligrammes de KOH nécessaires pour saponifier 1 g de matière grasse. C'est un indicateur de la quantité d'acides gras totaux présents dans un corps gras.

A 5 grammes ($\pm 0,05$ g) de l'échantillon pesé dans un erlenmeyer, on ajoute 50 ml de solution de potasse alcoolique (40 g de KOH / litre d'éthanol). L'erlenmeyer est adapté à un réfrigérant à eau et l'ensemble est porté à ébullition pendant 30 min. Pendant ce temps on titre 50 ml de potasse alcoolique par HCl 0,5 N en présence de phénolphthaléine (essai blanc). On

refroidit l'échantillon à l'eau courante et on titre avec du HCl 0,5 N en présence de phénolphthaléine.

L'indice de saponification (IS) est exprimé par :

$$IS = \frac{56,1 \times N \times (v_0 - v)}{\text{Masse de l'échantillon}}$$

où N : normalité de HCl

v_0 : volume de HCl nécessaire pour titrer le blanc

v : volume de HCl nécessaire pour titrer l'échantillon

III.4.2.1.4. Indice de peroxyde (AOAC, norme 965.33, 1997)

L'indice de peroxyde correspond à la quantité d'oxygène actif du peroxyde contenu dans une 1 kg de matière grasse, capable d'être libéré dans les conditions de l'expérience. Le principe consiste en l'addition d'une solution d'iodure de potassium à la matière grasse dissoute dans le chloroforme, puis à titrer l'iode libéré en milieu acide par une solution de thiosulfate de sodium.

A 5 g ($\pm 0,05$ g) de l'échantillon dans un erlenmeyer, on ajoute 10 ml de chloroforme puis on agite pour dissoudre la matière grasse. On ajoute 15 ml d'acide acétique pur et 1 ml de la solution de KI saturée, on bouche le flacon et on agite pendant 1 min avant de laisser reposer à l'abri de la lumière. On ajoute 75 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'empois d'amidon qui servira d'indicateur.

L'iode libéré est titré sous agitation (vigoureuse) avec la solution de thiosulfate 0,02 N.

Un essai à blanc est effectué sans matière grasse.

Le résultat est exprimé comme suit :

$$IP = \frac{(V - V_0) \times N \times 1000}{\text{masse en gramme de la prise d'essai}}$$

Où V : volume en ml de la solution de thiosulfate

V_0 : volume en ml de la solution de thiosulfate pour le témoin

N : normalité exacte de la solution de thiosulfate

Un résultat nul sera exprimé par $IP < 0,25$ méq. / kg d'O₂ actif

En millimole d'oxygène actif par kg de matière grasse : la valeur initiale est divisée par 2.

En microgrammes d'oxygène actif par gramme de matière : la valeur initiale est multipliée par 8.

III.4.2.2. Détermination de l'insaponifiable

La méthode d'extraction à l'oxyde diéthylique (AOAC, 1999) a été utilisée pour cette détermination. On pèse 5 g de l'échantillon dans un ballon de 250 ml. On procède ensuite à la saponification. Pour cela on ajoute 50 ml de solution d'hydroxyde de potassium (solution éthanolique à 1 mol / l) et quelques fragments de pierre ponce comme régulateurs d'ébullition. Le ballon est adapté au réfrigérant à reflux, puis on chauffe pendant 1 h à légère ébullition. On arrête le chauffage, on ajoute 100 ml d'eau par le haut du réfrigérant. L'extraction est réalisée après refroidissement. La solution est transvasée dans une ampoule à décanter de 500 ml et le ballon est rincé plusieurs fois avec 100 ml d'oxyde diéthylique. L'ampoule à décanter est bouchée et agitée énergiquement en équilibrant périodiquement la pression par l'ouverture du robinet. On laisse reposer jusqu'à séparation de deux phases. La phase inférieure est recueillie dans une autre ampoule. Avec la phase savonneuse, on procède à deux nouvelles extractions en utilisant à chaque fois 100 ml d'oxyde diéthylique. Les trois extraits sont rassemblés dans une ampoule à décanter contenant 40 ml d'eau pour un lavage. On soutire la phase aqueuse et on reprend deux fois le lavage. La phase étherée est ensuite successivement lavée avec 40 ml de la solution d'hydroxyde de potassium, puis 40 ml d'eau.

La phase étherée est évaporée dans un évaporateur rotatif. Le solvant est complètement évaporé après avoir ajouté 5 ml d'acétone.

La teneur en insaponifiable est déterminée par gravimétrie et exprimée en pourcentage par rapport à l'échantillon initial.

III.4.3. Développement de la chromatographie sur couche mince

III.4.3.1. Chromatographie sur couche mince standard (sur plaque)

La chromatographie sur couche mince a été mise en œuvre pour détecter les principaux phospholipides présents dans les échantillons de lipides extraits après l'hydrolyse enzymatique. Des plaques de silice 20 cm × 20 cm × 0,5 mm (Silicagel 60, Merck Darmstadt) ont été utilisées à cet effet.

Les types de phospholipides ont été détectés par des réactifs spécifiques en chromatographie unidimensionnelle après séparation dans un solvant d'élution composé d'un mélange de chloroforme / méthanol / ammoniacal à 25 % (130 / 70 / 10, v / v / v) (Fanni, 1977).

Après activation de la plaque à l'étuve à 100 °C pendant 30 min, 20 µl de chaque échantillon notamment l'huile contenue dans le culot protéique (phase dense) et les lipides de la couche émulsionnée, préalablement dissous à raison de 50 mg / ml de chloroforme - méthanol (2 : 1, v / v) sont déposés.

Il faut noter que la couche émulsionnée dissoute a été filtrée sur un filtre Millex[®]-HV 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 USA) après la séparation.

Les standards de phospholipides : L α – phosphatidylcholine (PC) à 99 g / 100 g, L α - phosphatidylserine (PS) à 98 g / 100 g, 3 sn – phosphatidyléthanolamine (PE) à 98 g/100g, L α – phosphatidylinositol (PI) à 50 g / 100 g, sphingomyéline (S) à 99 g /100 g et Lyso-phosphatidylcholine (LPC) à 99 g / 100 g ont été fournis par Sigma. Ils ont été dissous chacun à raison de 10 mg / ml de chloroforme – méthanol (2 : 1 v / v), dont 20 µl sont déposés en spot sur la plaque.

La chromatoplaque est placée dans une cuve contenant 200 ml du solvant de migration en évitant que la ligne dépôt ne baigne dans le solvant de migration. Après une migration de 45 min pour un front de migration situé à environ 12 cm du dépôt, la plaque est mise à sécher dans une étuve de 100°C pendant 1 min, puis les divers réactifs spécifiques sont appliqués au moyen d'un générateur d'aérosol.

III.4.3.1.1. Détection des phospholipides par un réactif spécifique des phosphates

Le réactif de molybdate d'ammonium – acide perchlorique a été utilisé pour détecter les phospholipides (Nzai et Proctor, 1998).

Environ 3 grammes de molybdate d'ammonium sont dissous dans 50 ml d'eau distillée. On y ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique 6 N et 13 ml d'acide perchlorique à 70 %.

Après pulvérisation de la solution, la plaque est mise à sécher à l'étuve à 80 °C pendant 10 min. Les phospholipides apparaissent sous forme de tâches bleues sur fond blanc.

La **Figure III.5** montre bien que les huiles contenues dans le culot et les lipides de la couche émulsionnée contiennent les différents phospholipides.

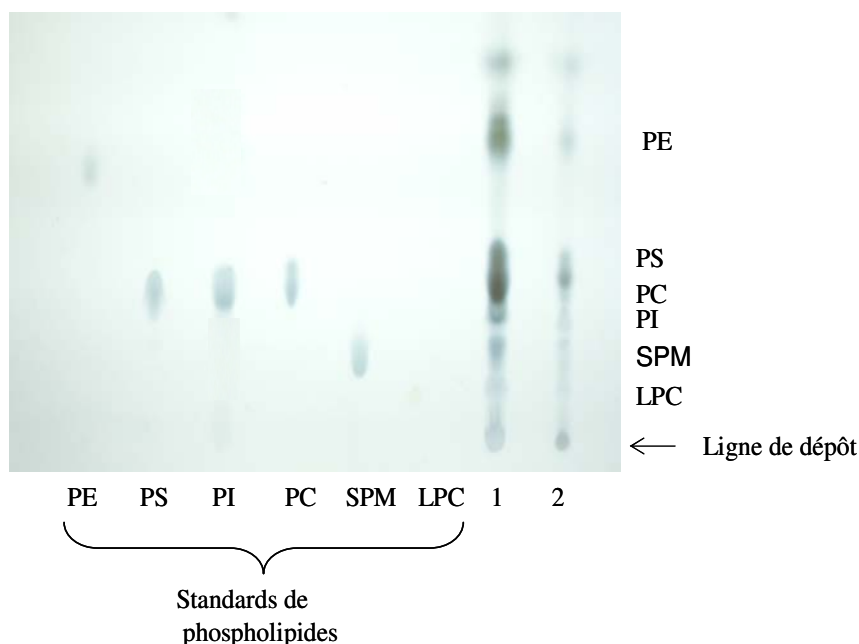


Figure III.5. Chromatographie sur plaque de silice (20 cm × 20 cm × 0,5 mm), solvant de migration : chloroforme / méthanol / ammoniac 25 % (130 / 70 / 10, v / v / v). Révélation au molybdate d'ammonium – acide perchlorique ; 1 : Huile du culot protéique, 2 : lipides émulsionnés.

PC : phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanoline, PI : phosphatidylinositol, SPM : sphingomyéline, LPC : lysophosphatidylcholine

III.4.3.1.2. Détection des phospholipides par leurs groupements spécifiques

- **Le réactif de détection des aminolipides** (phosphatidyléthanoline et phosphatidylsérine) est préparé par mélange de ninhydrine (25 g / 100 ml) dans l'acétone - lutidine (9 / 1, v / v). La plaque est pulvérisée avec la solution, séchée puis pulvérisée à nouveau. Des spots violets caractéristiques sont observés après 30 min à température ambiante.

- **Le réactif de Dragendorff** est un réactif de détection des composés contenant de la choline et de la sphingosine. Il est préparé comme suit :

- Solution 1 ; on dissout 1,7 g de nitrate basique de bismuth dans 100 ml d'acide acétique à 20 %.
- Solution 2 ; on dissout 10 g d'iodure de potassium dans 25 ml d'eau distillée. On mélange ensuite 20 ml de la solution 1 et 5 ml de la solution 2, le tout dilué avec 100 ml d'eau distillée. Des tâches caractéristiques de couleur orange sont observées après pulvérisation.

Nous observons que la couche émulsionnée lipidique et l'huile contenue dans le culot contiennent des phospholipides. Les taches caractéristiques des phospholipides sont beaucoup plus denses pour les huiles du culot que pour la couche de lipides émulsionnés. Cela peut être synonyme d'une teneur en phospholipides plus élevée dans les huiles contenues dans le culot après hydrolyse. La phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la sphingomyéline apparaissent sous forme de tâches orangées par le réactif de Draggendorff (**Figure III.6 A1 et A2**). La phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine sont visibles sous l'aspect de tâches violettes (**Figure III.6 B**).

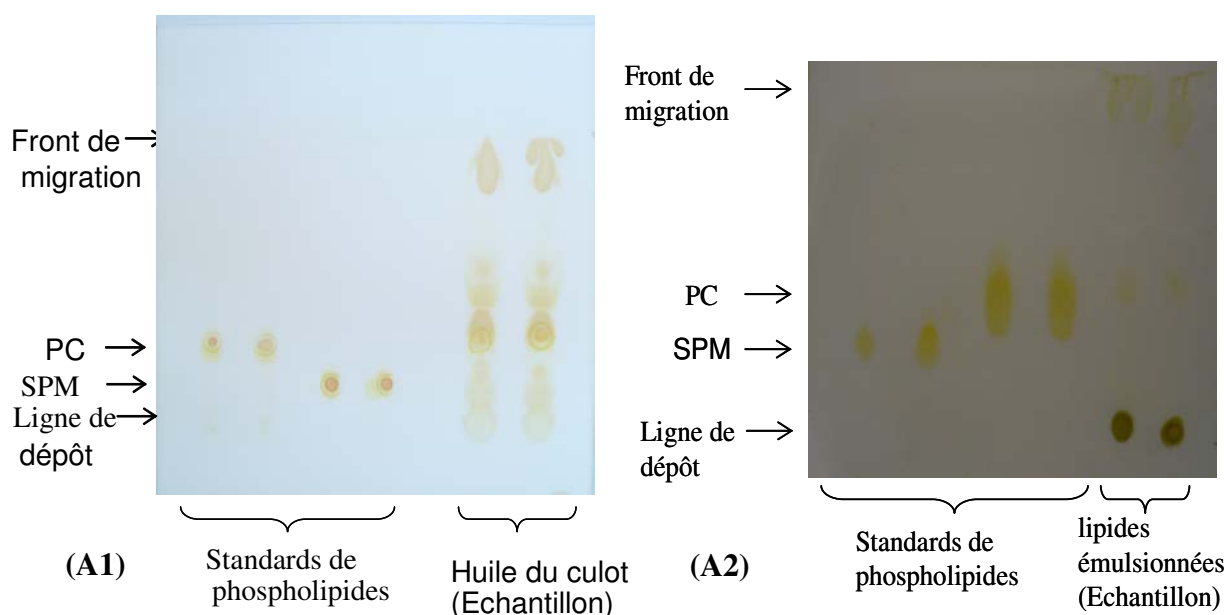
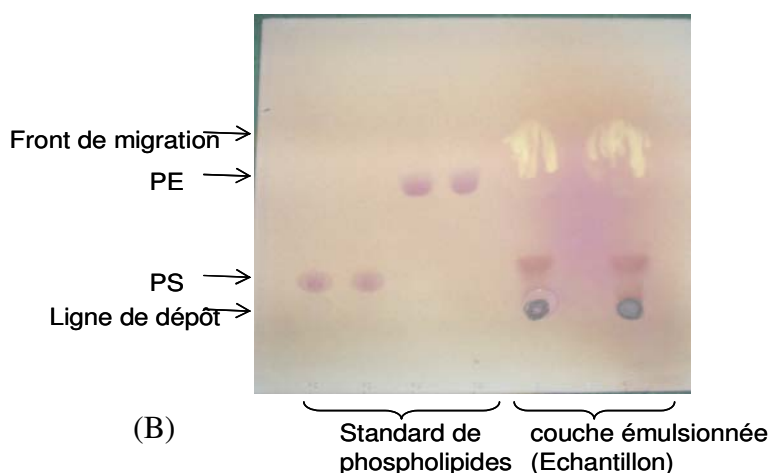


Figure III.6. Chromatographie sur plaques de silice (20 cm × 20 cm × 0,5 mm), solvant de migration : chloroforme / méthanol / solution d'ammoniaque 25 % (130 / 70 / 10, v / v / v), plaque (A1) et (A2) détectée au réactif de Draggendorff ; plaque (B) détectée à la ninhydrine. PC : phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine, PE : phosphatidyléthanolamine, S : sphingomyéline



III.4.3.2. Chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan[®])

III.4.3.2.1. Principe de l'appareil

L'analyse des classes de lipides des échantillons d'huile a été réalisée par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme Iatroscan[®] (chromarods-SIII, Iatroscan Laboratory Inc, Tokyo, Japan).

C'est une méthode chromatographique qui combine la chromatographie sur couche mince (CCM) à la détection par ionisation de flamme. Les composés organiques sont séparés sur CCM et détectés par un système à ionisation de flamme hydrogène / air. La couche d'absorbant (la silice) est déposée sur des baguettes de quartz désignées sous le terme de « chromarods[®] ». Les molécules organiques sont ionisées dans une flamme hydrogène / air. Les ions formés sont collectés entre deux électrodes et provoquent un courant d'ionisation qui est ensuite amplifié au niveau du détecteur (FID Ammeter) avant d'être analysés par le logiciel de traitement de données (Chromstar[™]) (**Figure III.7**).

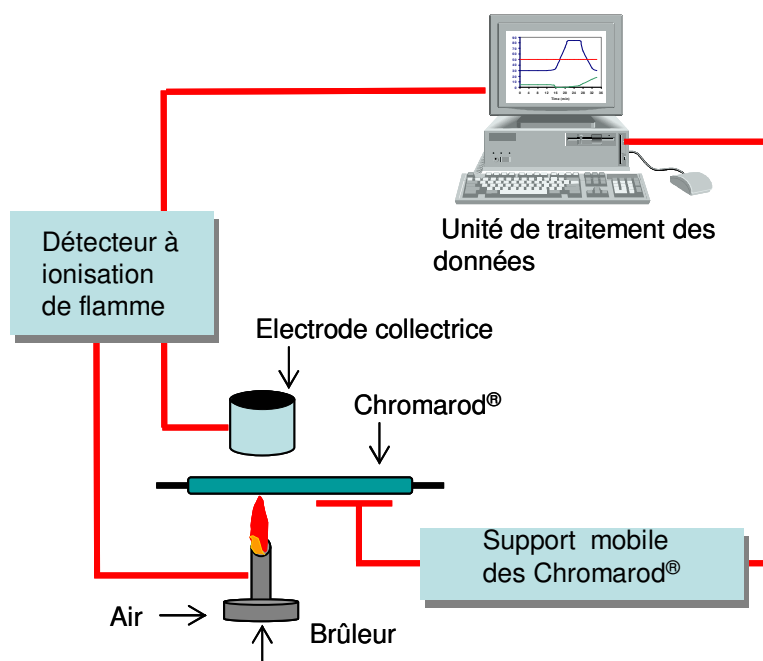


Figure III.7. Synoptique de l'analyseur Iatroscan MK IV

III.4.3.2.2. Etalonnage des chromarods –SIII par des molécules standard

Les molécules standard utilisées pour identifier les composés des échantillons lipidiques ont été fournies par Sigma. Ce sont :

- les lipides neutres : 1-monostéaroyl-glycérol (99 g /100 g), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol (99 g / 100 g), tripalmitine (99 g /100 g), cholestérol (99 g /100 g).
- les phospholipides : L α -phosphatidylcholine (PC), 3 sn- phosphatidyléthanolamine (PE), L α -phosphatidyl-L-sérine (PS), L α -phosphatidylinositol (PI), lyso-phosphatidylcholine (Lyso PC), sphingomyéline (S).

Les lipides standard sont dissous à raison de 5 mg / ml de chloroforme et la migration a été réalisée selon la description au paragraphe III.4.3.2.3. Les lipides neutres sont séparés dans l'éluant apolaire (hexane / diéthyléther / acide formique, 80 / 20 / 0,2, v / v / v). Les lipides polaires sont développés dans le solvant polaire (chloroforme / méthanol / eau / ammoniacque 25 %, 47 / 20 / 2,5 / 0,28 v / v / v / v). Nous accordons ici une attention particulière aux standards de phospholipides, car le but de cette étude est en grande partie d'identifier les phospholipides de l'huile de saumon.

L'identification a été réalisée grâce aux courbes des phospholipides standard (**Figure III.8**). Le **Tableau III.4** résume les paramètres de régression linéaire des courbes étalons. Nous observons une très bonne corrélation entre les concentrations des principaux phospholipides (PE, PC, PS, LPC, SPM) et leur réponse de détection ($R^2 > 0.98$).

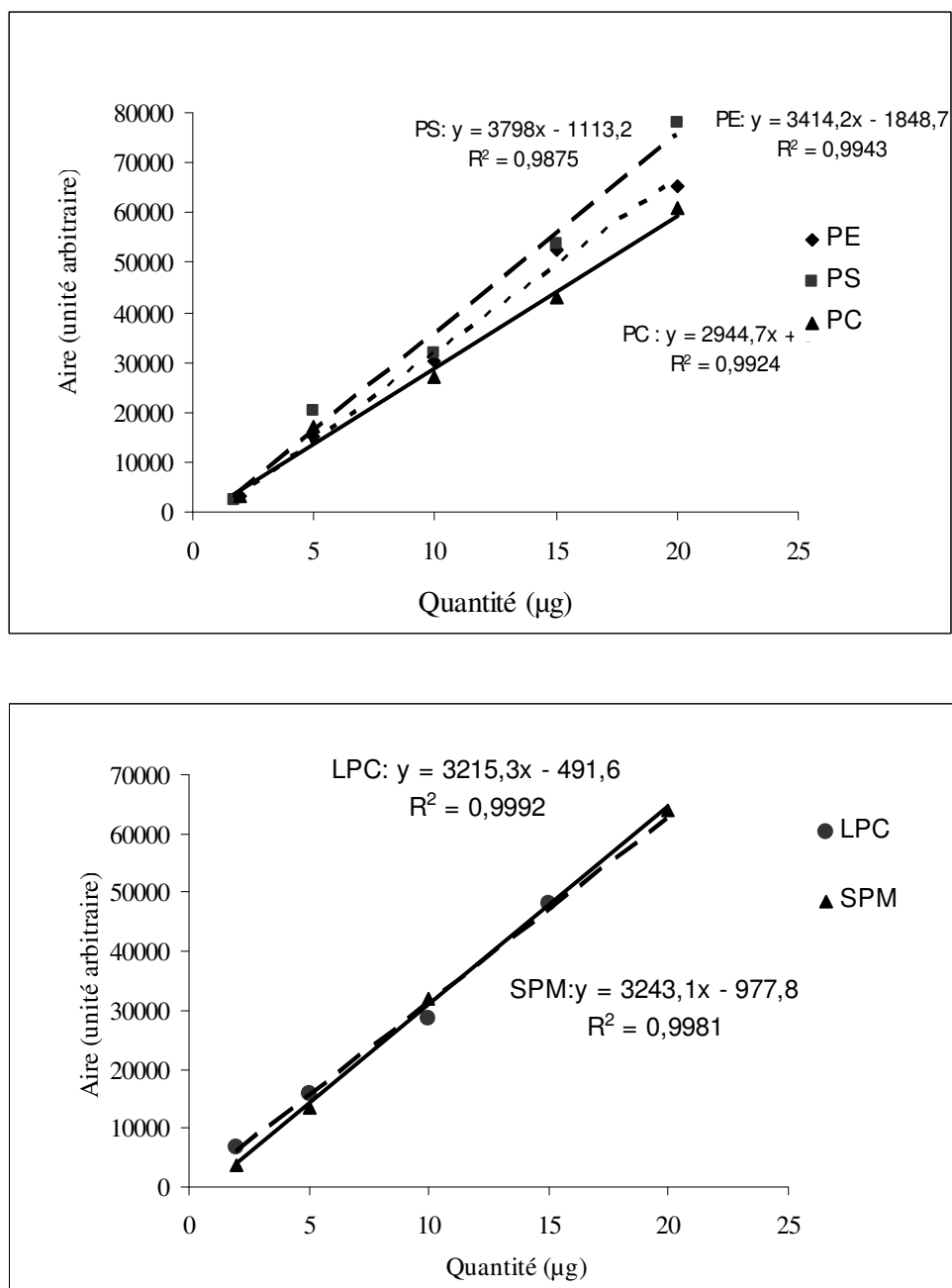


Figure III.8. Courbe d'étalonnage des standard de phospholipides par CCM-DIF Iatroscan™, mélange éluant : chloroforme / méthanol / eau / solution d'ammoniaque 25 % (47 / 20 / 2,5 / 0,28 ; v / v / v / v).

Tableau III.4. Paramètres de régression linéaire des courbes d'étalonnage des standards de phospholipides

Phospholipides	Quantités (µg)	Aires (ua)	Corrélation (R^2)	Temps de rétention (min)
PC	2-20	0-60700	0,99	0,24 - 0,26
PE	1,3-20	0-65340	0,99	0,10 – 0,18
PS	1,7-20	0-78170	0,98	0,20 – 0,22
Lyso PC	2-20	0-60000	0,99	0,34 – 0,36
SPM	2,2-20	0-63995	0,99	0,32 – 0,34
PI	nd	nd	nd	0,22 - 0,24

nd : non déterminé

ua : unité arbitraire

III.4.3.2.3. Séparation des classes de lipides des échantillons.

Avant toute opération, les chromarods doivent être nettoyés au niveau de l'analyseur en utilisant la fonction « Blank scan » pour éliminer les impuretés.

Les échantillons destinés à l'analyse sont dissous à raison de 5 mg/ml de chloroforme, et déposés sur les baguettes ("chromarods" ou "rods") (1 à 5 µl du mélange) à l'aide d'une micropipette de 1 µl (Hirschmann™ Laborgeräte, Germany). Les chromarods sont placés pendant 15 min dans une cuve contenant une solution de NaCl saturée (a_w : 0,76).

Une première chromatographie est réalisée dans un mélange hexane / diéthyléther / acide formique (80 / 20 / 2, v / v / v) pendant 30 à 45 minutes, pour séparer les lipides neutres (triglycérides, stérols, acides gras libres...). Les chromarods sont ensuite séchés dans une étuve (ROD DRYER TK-B, Tokyo, Japon) à 100°C pendant 1 min. Un brûlage total (« Normal scan ») des chromarods permet de détecter les lipides neutres et les lipides polaires. Le brûlage partiel (« PPS scan ») est effectué pour ne brûler que les lipides neutres. Dans ce cas, une deuxième séparation dans un éluant constitué de chloroforme / méthanol / eau / solution d'ammoniaque 25 %, 47 / 20 / 2,5 / 0,28 (v / v / v / v), sépare individuellement les phospholipides. Les chromatographies sont réalisées à 20°C.

L'analyse est menée sous un flux d'air (200 ml / min) et d'hydrogène (160 ml / min), la vitesse de brûlage est de 30 s pour un rod.

III.4.4. Fractionnement des classes de lipides sur colonne

Une séparation préparative des classes de lipides (lipides polaires et lipides neutres) a été réalisée sur une colonne d'acide silicique. Pour cela, environ 10 grammes de l'échantillon sont dissous dans 250 ml d'éther de pétrole. On mélange la solution étherée à 30 g d'acide silicique (ICN Biomedicals) préalablement activé à 103°C pendant 24 h. Le mélange est transféré dans la colonne de verre (700 mm × 25 mm) garnie d'un filtre en verre fritté et contenant de l'acide silicique sec sur 10 cm de hauteur environ. Le lit d'acide silicique est ensuite ajusté à 600 mm de hauteur. Après élution de l'éther de pétrole, les lipides neutres sont désorbés par ajout de 300 ml d'un mélange hexane / éther diéthylique (80 / 20, v / v). Les lipides neutres sont récupérés sous vide dans un ballon préalablement taré. Les lipides polaires sont ensuite élués selon le même principe par 300 ml de méthanol anhydre.

III.4.5. Analyse thermique des huiles par calorimétrie différentielle

L'analyse thermique différentielle consiste à mesurer une différence de température entre l'échantillon étudié et un échantillon de référence, ne présentant pas de phénomènes thermiques dans l'intervalle de température étudié. Le profil thermique ainsi obtenu reflète les changements d'état du produit analysé et les variations d'énergie associées à ces changements.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre différentiel (Modèle Pyris1, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, USA).

L'appareil a été étalonné au préalable en mesurant la température de fusion et l'enthalpie de l'indium (T_f : 156,6 °C, ΔH : 28,45 J / g).

Une micro-capsule en aluminium contenant environ 8 à 10 mg de l'échantillon, exactement pesés, est placée dans le calorimètre. Le programme consiste en un maintien à 50°C pendant 10 min, suivi d'un refroidissement de 50°C à -60°C (40°C / min) maintenu durant 10 min, suivi d'un réchauffement progressif (5°C / min) jusqu'à 60°C. Les températures correspondant aux maximums des pics et les enthalpies de fusion (J / g) ont été calculées par le Logiciel Pyris (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, USA).

III.4.6. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse

III.4.6.1. Préparation des esters méthyliques

Les esters méthyliques d'acides gras ont été préparés par le réactif au trifluorure de bore à la concentration de 8 % dans du méthanol (BF₃ / MetOH).

100 mg d'échantillon sont pesés dans un tube à essai à vis de 10 ml. On y ajoute 1,5 ml d'hexane et 1,5 ml BF₃ / MetOH. Le tube est fermé hermétiquement sous azote, agité énergiquement, puis chauffé à 100°C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute 1 ml d'hexane, 2 ml d'eau distillée, on agite sous azote. Deux phases se séparent après repos. La phase supérieure est récupérée dans un autre tube mis sous azote. On extrait deux fois la phase inférieure avec 1 ml d'hexane. L'ensemble des phases (esters méthyliques) collectées est lavé avec 2 ml d'eau distillée, puis séché sur sulfate de sodium anhydre. Le solvant est évaporé sous azote. De l'hexane est rajouté pour une concentration des esters méthyliques adaptée à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

III.4.6.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des esters méthyliques est réalisée sur un chromatographe Péri 2000 (Périchrom, Saulx-le-Chartreux, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Ils sont séparés sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, dont l'épaisseur du film est de 0,5 µm) garnie de polyéthylène glycol dopé à l'acide téréphtalique (Périchrom).

Les températures du détecteur et de l'injecteur sont fixées à 260°C.

Le programme utilisé pour l'analyse est le suivant : maintenue au départ à 70 °C pendant 2 min, la colonne est portée à 180 °C (39,9 °C / min) et maintenue durant 8 min à cette température, puis elle subit une seconde phase de réchauffement jusqu'à 220 °C (3 °C / min) pendant 45 min. Le refroidissement s'effectue à raison de 39,9 °C / min.

L'identification des pics est réalisée à l'aide de deux standards d'acides gras fournis par la société Supelco (Belle fonte, USA) : PUFA 1 (source marine) et PUFA 2 (source animale).

Le logiciel Winlab 3 (Périchrom, Saulx-le-Chartreux, France) permet l'intégration des chromatogrammes (**Figure III.9**).

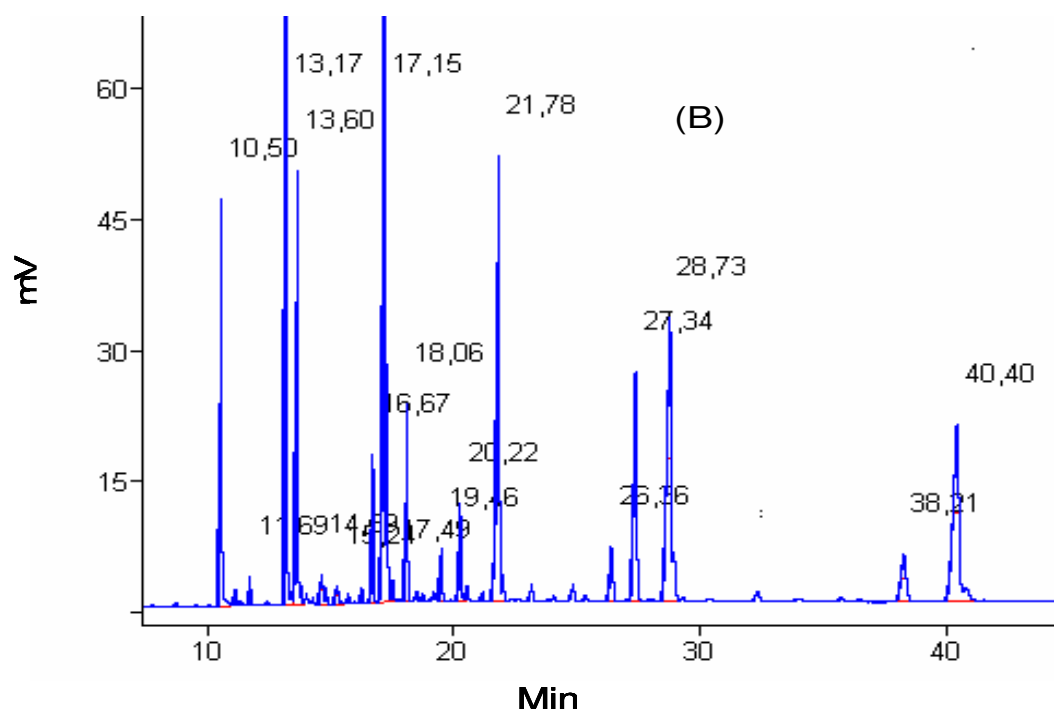
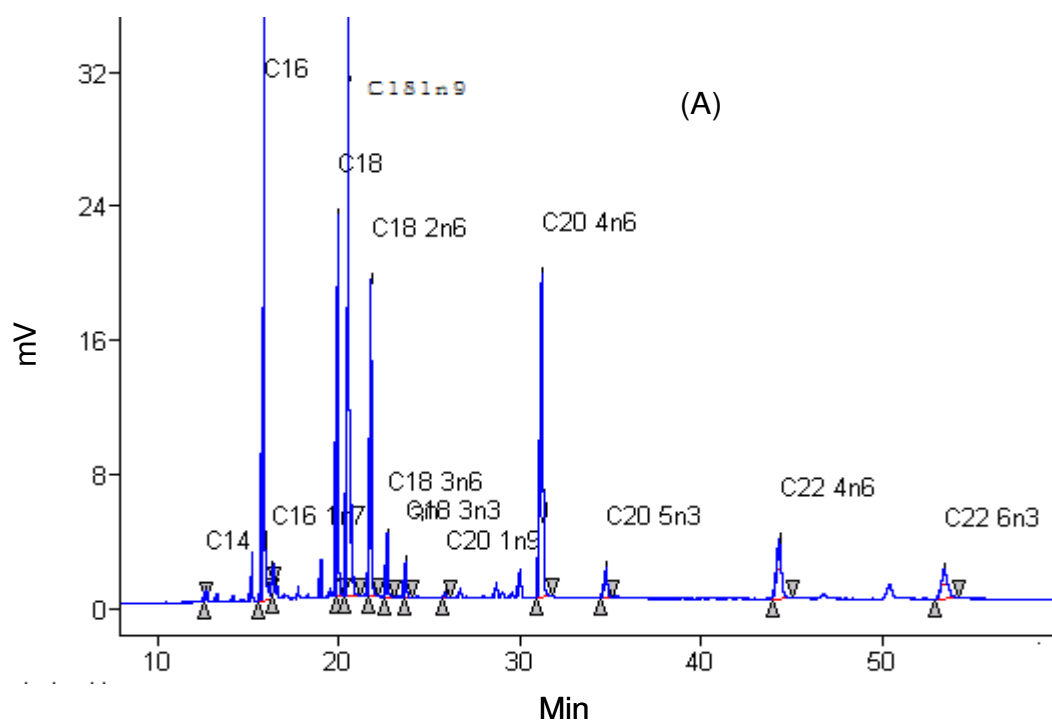


Figure III.9. Chromatogrammes des acides gras, (A) : PUFA 2, (B) : l'huile de tête de saumon extraite par voie enzymatique.

RESULTATS ET DISCUSSION

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Introduction.....	90
IV.1.1. Les objectifs de l'étude.....	90
IV.1.2. Nature et composition physico-chimique des co-produits.....	90
IV.1.3. Choix des protéases.....	91
IV.2. Fraction protéique des têtes de saumon.....	92
IV.2.1. Hydrolyse des protéines et cinétique enzymatique.....	92
IV.2.1.1. Optimisation de la réaction enzymatique.....	94
IV.2.1.2. Composition physico-chimique des hydrolysats protéiques.....	102
IV.2.1.3. Composition en acides aminés.....	103
IV.2.1.4. Caractérisation de la taille des peptides des hydrolysats protéiques.....	104
IV.2.2. Propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques.....	107
IV.2.2.1. La solubilité.....	107
IV.2.2.2. La capacité émulsifiante.....	109
IV.2.2.3. La stabilité des émulsions.....	110
IV.2.2.3. La capacité d'absorption d'huile.....	111
IV.2.3. Conclusion.....	112
IV.3. Fraction lipidique des têtes de saumon.....	112
IV.3.1. Extraction des lipides.....	112
IV.3.1.1. Traitement enzymatique	112
IV.3.1.2. Caractéristiques physico-chimiques des fractions issues de l'hydrolyse	115
IV.3.1.3. Analyse chimique des huiles.....	116
IV.3.1.4. Taux d'extraction des lipides par différentes méthodes.....	117
IV.3.1.5. Composition en classes de lipides par méthodes d'extraction des lipides.....	118
IV.3.2. Séparation des classes de lipides par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme Iatroscan®	120
IV.3.2.1. Les huiles issues des culots protéiques.....	120
IV.3.2.2. Les lipides de la couche émulsionnée.....	122

IV.3.3. Composition en acides gras des lipides.....	125
IV.3.4. Composition en acides gras des lipides polaires et des lipides neutres de l'huile des culots protéiques.....	127
IV.3.5. Analyse thermique différentielle des lipides.....	129
IV.3.6. Conclusion.....	133

IV.1. Introduction

IV.1.1. Les objectifs de l'étude

Cette étude a été en partie menée dans le cadre d'un programme Ofimer (Office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture) portant sur la valorisation des co-produits issus des activités de découpe et de filetage des poissons. Prenant en compte l'intérêt considérable que représentent ces écarts tant du point de vue économique qu'environnemental, ce travail s'est donné pour objectif la valorisation simultanée des fractions protéiques et lipidiques issues de co-produits de saumon.

Le procédé de valorisation a fait appel à l'utilisation des enzymes notamment des protéases, véritables outils biotechnologiques qui préservent les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des produits.

Dans une première partie, nous avons étudié l'extraction enzymatique des protéines, l'optimisation de la réaction enzymatique par planification expérimentale et étudié les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques.

Dans une deuxième partie, les fractions lipidiques extraites lors de la déstructuration protéique ont été caractérisées par leur richesse en acide gras polyinsaturés et en phospholipides. Cette méthode d'extraction de l'huile a été comparée aux méthodes conventionnelles telles que les méthodes d'extraction par solvant organique et la méthode par cuisson.

IV.1.2. Nature et composition physico-chimique des co-produits

Les co-produits utilisés dans cette étude sont les têtes de saumon (*Salmo salar*) dont la composition physico-chimique est présentée dans le **Tableau IV.1**. En comparant les caractéristiques physico-chimiques de la tête de saumon à celle du filet, il apparaît une différence de composition entre les tissus. Nous observons que la tête de saumon contient une forte teneur en lipides (21,5 %) par rapport au filet (15 %) et une portion de chair du filet (2,9 % ; Kristinsson et Rasco, 2000 b). La teneur en protéines de la tête (15 %) est comparable à celle du filet (18,2 %).

Par ailleurs, le taux de cendres de la tête est au moins 2 fois supérieur à celui du filet et du muscle. Cela peut s'expliquer par une teneur en os de la tête relativement importante ; en effet, 100 g de tête humide contiennent 5 à 6 g d'os secs.

La tête du saumon (*Salmo salar*) représente environ 10 % du poids du poisson entier (Andrieux, OFIMER 2003).

Au regard des paramètres morphologiques de la tête, notamment le poids d'environ 0,5 kg, et en comparant les compositions physico-chimiques de la tête à celles du filet, il est possible d'affirmer que ce co-produit (la tête de saumon) représente une source potentielle de lipides et de protéines.

Aitken et *al.* (1984) rapportent la nécessité dans l'industrie, de connaître ces compositions avant de réaliser certaines opérations telles que l'obtention de farines, le séchage et l'évaluation des propriétés nutritionnelles.

Tableau IV.1. Composition physico-chimique de la tête, du filet de saumon provenant des salaisons André Ledun et d'une portion de chair du filet de saumon ^a.

Composés	Tête de saumon (% de poids frais)	Filet de saumon (% de poids frais)	Chair du filet de saumon (% de poids frais) ^a
Lipides totaux	21,5 ± 0,4	15,0 ± 0,5	2,9 ± 0,4
Protéines (NT × 6,25)	15,0 ± 0,1	18,2 ± 0,5	20,3 ± 0,4
Humidité	67,8 ± 1,3	66,0 ± 0,5	75,1 ± 0,9
Cendres	2,6 ± 0,6	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,02
Potassium	0,14	nd	nd
Sodium	0,013	nd	nd
Magnésium	0,042	nd	nd
Calcium	0,13	nd	nd
Matière osseuse sèche	5,6 ± 0,2	nd	nd
Morphologie			
Poids (g)	420-660	nd	nd
moyenne	540		
Longueur (cm)	11-13,5	nd	nd
moyenne	12,3		
Circonférence (cm)	22-25,5	nd	nd
moyenne	22,3		
	max 29	nd	nd

a : Kristinsson et Rasco, 2000 b, nd : non déterminé

IV.1.3. Choix des protéases

L'utilisation d'enzymes dans le secteur alimentaire a pour but d'améliorer les qualités fonctionnelles et nutritionnelles, sans développer de goût ou d'arôme parasite tel que l'amertume.

La qualité organoleptique des oligopeptides produits au cours de l'hydrolyse est fortement dépendante de la spécificité des enzymes utilisées (Adler-Nissen, 1986 ; Kristinsson et Rasco,

2000 a). Par exemple, Hoyle et Merritt, (1994) ont observé que l'hydrolysate de protéines de morue obtenu avec l'Alcalase est moins amer que celui obtenu avec la Papaine, ce qui est *a priori* inattendu, car le degré d'hydrolyse atteint avec l'Alcalase est plus élevé.

En fait, ces propriétés sont évidemment liées au degré d'hydrolyse, lequel dépend en retour de la nature des protéines, de la spécificité de l'enzyme utilisée et bien évidemment des conditions d'hydrolyse.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé trois endopeptidases : l'Alcalase[®] 2,4 L, la Neutrase[®] 0,8 L et la Protamex[™] (Novo Nordisk), toutes de qualité alimentaire. Ce choix a été fait à partir d'études antérieures menées au sein du laboratoire, étayées par une synthèse bibliographique. Ce sont des enzymes dont les activités optimales se situent à des pH neutres ou alcalins (paragraphe III.2.1).

L'Alcalase[®] 2,4 L a été utilisée pour étudier l'influence de facteurs comme le pH, la température et le rapport enzyme / substrat sur le degré d'hydrolyse et l'optimisation du procédé. Des auteurs ont montré que l'Alcalase[®] 2,4 L est très efficace pour la solubilisation des protéines de poisson (Quaglia et Orban, 1987 a ; Shahidi et *al.*, 1995 ; Benjakul et Morrissey, 1997). Son efficacité lui confère un large domaine d'activité, dépendant des conditions d'utilisation et agissant principalement sur la déstructuration du tissu protéique. Sa capacité d'extraction des fractions lipidiques a été comparée à celles de la Neutrase[®] 0,8 L et de la Protamex[™].

Pour pouvoir comparer avec certains résultats de la littérature, nous avons souvent utilisé, dans cette étude, les termes de teneur en protéines ou de rendement protéique même dans le cas des hydrolysats protéiques qui en réalité sont constitués de mélange de peptides. Les teneurs en azote ont été converties en protéines en multipliant par le facteur de conversion selon la formule : azote total (NT) $\times$ 6,25.

IV.2. Fraction protéique des têtes de saumon

IV.2.1. Hydrolyse des protéines et cinétique enzymatique

La méthode de pH-stat est couramment utilisée pour contrôler la réaction d'hydrolyse enzymatique des protéines. Sa répétabilité est excellente, les variations du degré d'hydrolyse demeurant très faibles dans les conditions identiques. Il s'agit d'un atout très important qu'il

faut prendre en compte lorsqu'on souhaite obtenir des hydrolysats avec des propriétés prédéterminées à des degrés d'hydrolyse spécifiques.

La **Figure IV.1** montre l'évolution du degré d'hydrolyse en fonction du temps. Les cinétiques sont de type michaelien et indiquent une phase de croissance rapide de l'hydrolyse au cours de laquelle de très nombreuses liaisons peptidiques sont clivées. Ces cinétiques ont été observées dans la plupart des cas : par Quaglia et Orban (1997 a, 1997 b) sur la sardine, par Liceaga et Li-Chan (1999) sur le hareng, par Kristinsson et Rasco (2000 b, 2000 c) sur le filet de saumon et pour les abats de thon par Guerard *et al.* (2001, 2002). Au cours de ces expériences, différents degrés d'hydrolyse terminaux dépendant des conditions expérimentales ont été obtenus après 120 min de réaction.

Après 1 h, la vitesse d'hydrolyse diminue et la cinétique devient asymptotique. La diminution du taux d'hydrolyse est due, entre autres à la diminution de la concentration en liaisons peptidiques disponibles, à l'inhibition par le produit et à la désactivation de l'enzyme (Moreno et Cuadrado, 1993).

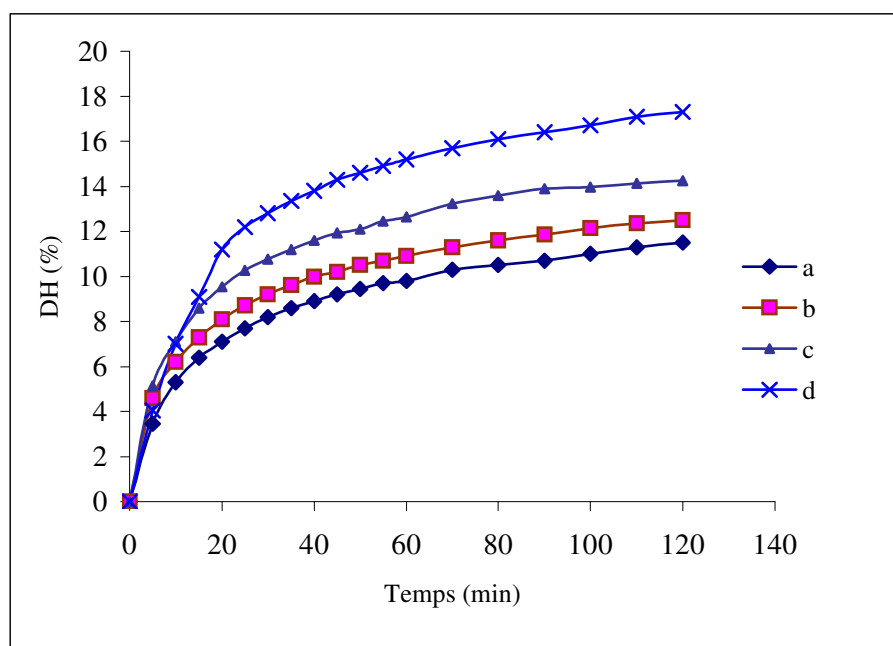


Figure IV.1. Hydrolyse des protéines de tête de saumon avec l'Alcalase^{  } 2,4 L, pendant 2 h dans différentes conditions, (a) 52   C, pH 7,5, E / S 3,5 % ; (b) 55   C, pH 7,5, E / S 5 % ; (c) 61   C, pH 7,5, E / S 5 % ; (d) 58   C, pH 8, E / S 5,5 %. (E / S : masse d'enzyme / masse de protéines)

La **Figure IV.2** montre l'effet de l'addition d'enzyme fraîche (100 % et 400 % de la concentration d'enzyme initiale) après 1 h d'hydrolyse. On observe une faible augmentation

du DH de 13 % à 15 %. Selon Guerard et *al.* (2001, 2002), cette augmentation relative du DH après une nouvelle addition d'enzyme permet de montrer qu'il y a bien une désactivation de l'enzyme au cours de l'hydrolyse, qui serait due à l'inhibition par les peptides, en d'autres termes, le manque de liaisons peptidiques disponibles lors de leur solubilisation pendant l'hydrolyse.

D'un point de vue technique, on peut faire remarquer que le degré d'hydrolyse optimal peut être atteint au bout d'une heure du fait de la forme asymptotique de la courbe du DH.

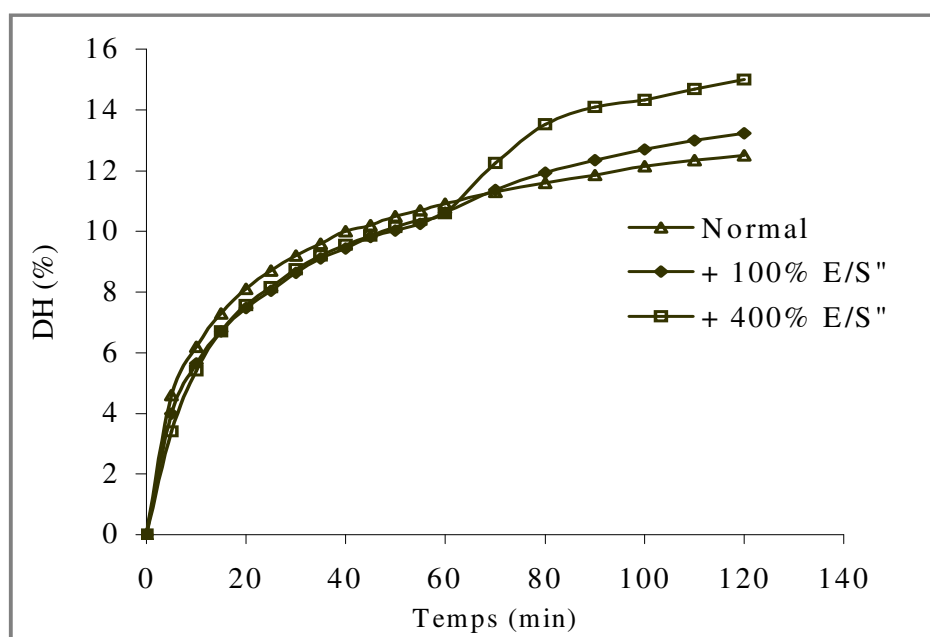


Figure IV.2. Effet de l'addition d'enzyme fraîche (Alcalase® 2,4 L) à des proportions de 100 % et 400 % de la concentration initiale d'enzyme après 1 h d'hydrolyse. Conditions initiales : E / S 5 % (masse d'enzyme / masse de protéines), 55 °C, pH 7,5.

IV.2.1.1. Optimisation de la réaction enzymatique

Le modèle quadratique (Equation 1) contenant 10 coefficients a été utilisé pour décrire les interactions entre les réponses suivantes : (1) le degré d'hydrolyse (DH) qui doit être contrôlé pour éviter l'apparition de peptides amers (Saha et Hayashi, 2001 ; Gilberg et *al.*, 2002) et (2) le rendement protéique.

$$\text{Equation 1: } \eta_k = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=l+i}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

où η_k représente les variables dépendantes; β_0 le coefficient constant; X_i les variables indépendantes; β_i les coefficients linéaires, β_{ij} les coefficients d'interaction du second ordre et β_{ii} les coefficients quadratiques. Les résultats sont validés dans le domaine expérimental.

Pour étudier l'influence des paramètres tels que la température, le pH et le rapport enzyme / substrat, ainsi que pour optimiser la réaction d'hydrolyse, un plan d'expériences dicté par la matrice de Doehlert de 15 essais a été réalisé. Le **Tableau IV.2** montre les DH, les rendements d'extraction protéique et les "teneurs en protéines" (NT x 6,25) des hydrolysats. Les DH varient entre 10,8 % et 17,3 % et les rendements d'extraction protéique entre 47,7 % et 71 %. Les hydrolysats obtenus après lyophilisation présentent une couleur jaune clair, une odeur de poisson atténuée et des "teneurs en protéines" (NT x 6,25) comprises entre 78,9 % et 85,3 %. Ces résultats ont été obtenus dans des conditions de température, de pH et de rapport enzyme / substrat différentes. Il est ainsi possible de mettre en évidence l'existence d'interactions entre ces variables indépendantes lors de l'hydrolyse des protéines de tête de saumon par l'Alcalase® 2,4 L.

Tableau IV.2. Valeurs expérimentales pour les réponses de l'hydrolyse des protéines des têtes de saumon par l' Alcalase® 2,4 L.

N° Expérience	DH (%)	Rendement protéique (%)	Teneur en protéines NT x 6,25 (%)
1 c	14,3	69,1	83,3
2	12,2	61,5	83,0
3	12,9	63,7	81,0
4 a	11,5	61,8	82,3
5	13,0	60,0	80,0
6	13,3	47,7	81,2
7 d	17,3	71,0	78,9
8	10,8	51,7	83,8
9	11,6	59,1	85,3
10	12,0	57,6	85,7
11	15,8	61,8	83,0
12	14,7	63,1	83,0
13 b	12,5	62,5	81,5
14	13,0	62,2	82,5
15	12,4	63,0	82,0

L'analyse des effets et des interactions entre les différents facteurs (température, rapport enzyme / substrat, pH) dans le domaine expérimental est présentée dans le **Tableau IV.3**. Ces résultats montrent que les différents facteurs ont un effet significatif sur le DH et le

rendement protéique, et un coefficient de régression élevé avec un $r^2 > 0,91$. Par exemple, c'est le pH ($\alpha < 1 \text{ ‰}$) qui a plus d'influence significative sur le DH, viennent ensuite la température et le rapport enzyme / substrat. Le modèle quadratique utilisé (Equation 1) montre une interaction significative entre la température et le rapport enzyme / substrat (effet = 10,27) sur le rendement protéique.

Les hydrolysats issus des expériences de référence a, b, c et d ont été précisément caractérisés lors de ces travaux.

Tableau IV.3. Estimation des coefficients de régression des modèles polynomiaux quadratiques^a pour les réponses (DH et rendement protéique).

VARIABLES		DH (%)	Rendement (%)
Moyenne		12,63***	62,58***
Linéaire			
Température	b1	0,94*	5,74***
		0,75*	-1,45
		2,73***	5,61***
Quadratique	E/S b2	0,59	2,75*
	pH b3	-0,14	-6,63**
		1,48	-1,82*
	b11		
	b22	-1,09	10,27**
Interaction	b33	0,81	-2,53*
		0,48	-2,54***
	b12		
	b13		
	b23		
r ²		0,97	0,91

^a *: $1\% < \alpha \leq 5\%$; **: $1\% < \alpha \leq 1\%$; ***: $\alpha < 1\%$

Les résultats expérimentaux sont édités sous forme de courbes d'isoreponses générées par le logiciel NEMROD à partir des modèles quadratiques. L'exploitation des courbes permet de visualiser et de déterminer les conditions optimales de l'hydrolyse enzymatique.

En fixant le niveau d'un facteur au centre du domaine expérimental, il est possible de suivre l'évolution des paramètres deux à deux et leur influence sur les réponses (DH, rendement protéique).

En ce qui concerne les résultats concernant le degré d'hydrolyse, l'analyse des courbes d'isoréponses (**Figure IV.3**) montre que le degré d'hydrolyse augmente lorsqu'on augmente le pH et la température (E / S étant fixé au centre du domaine). Le DH le plus élevé est obtenu à une température d'environ 60 °C et un pH de 8,0. Cela est en accord avec la fiche technique des laboratoires Novo Nordisk.

Si l'on veut obtenir par exemple un DH de 12 % pour éviter l'apparition de peptides amers, il faut se situer dans l'intervalle de pH au dessous de 7,5 et à une température au dessous de 60 °C.

Dans la **Figure IV.4**, l'évolution des paramètres enzyme / substrat en fonction de la température (le pH étant fixé au centre du domaine) entraîne une variation très légère du DH qui varie approximativement entre 11,4 % et 13,2 %. Cette observation confirme les résultats expérimentaux de l'addition d'enzyme au cours de l'hydrolyse au cours de laquelle nous avons observé une faible augmentation du DH. Au-delà d'une valeur de rapport E / S de 5 %, une inhibition de l'enzyme peut survenir incluant une possibilité d'autolyse de l'enzyme. Des résultats similaires ont été obtenus par O'Meara et Munro (1980) sur des protéines de bœuf et par Diniz et Martin (1996) sur les protéines de muscle de la roussette. La relation non linéaire entre le rapport enzyme / substrat et le DH est visible par la distance entre les iso-courbes (**Figure IV.4**) lorsqu'on augmente le rapport E / S. Cela s'explique par le fait que la réaction d'hydrolyse dépend de la disponibilité des liaisons peptidiques et de la structure physique de la protéine.

On observe également qu'une augmentation du pH jusqu'à 8,0 entraîne une augmentation sensible du DH de 11 % à 16,8 %, alors qu'une élévation de E / S n'entraîne qu'une faible augmentation du DH (**Figure IV.5**).

Il apparaît donc comme cela est montré dans la littérature que les facteurs de température, de pH et de rapport enzyme / substrat ont un effet positif sur le degré d'hydrolyse.

L'analyse des courbes du « chemin optimal » (**Figure IV.6**) permet de visualiser le paramètre principal et le sens dans lequel il faut le faire varier pour atteindre l'objectif de la maximisation ou de la minimisation de la réponse.

La Figure **IV.6** montre que pour augmenter le DH, il faut augmenter fortement le pH (courbe 3), augmenter légèrement la température et le rapport enzyme / substrat par rapport au centre du domaine. En d'autres termes, pour obtenir des hydrolysats protéiques à DH inférieur à 12,3 %, il faut diminuer la valeur des trois facteurs dans le domaine expérimental.

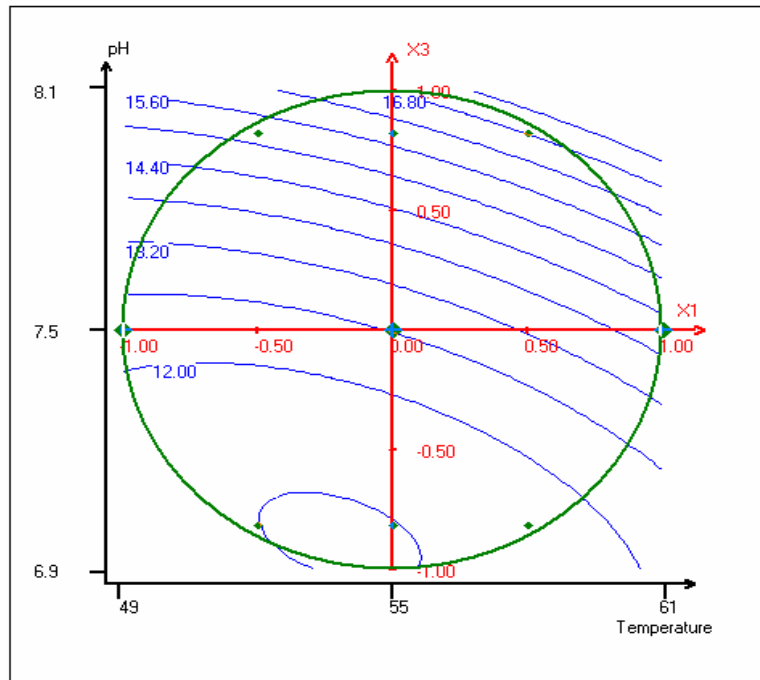


Figure IV.3. Courbes d'isoréponses du degré d'hydrolyse (DH). Tracé du pH en fonction de la température. La valeur du rapport enzyme / substrat (E / S) est maintenue au niveau 0 (centre du domaine expérimental).

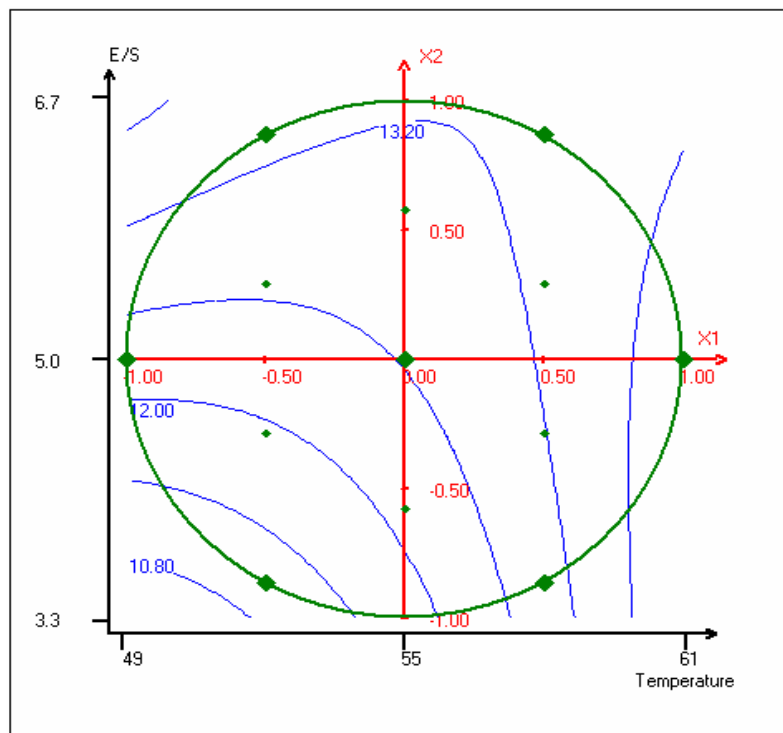


Figure IV.4. Courbes d'isoréponses du degré d'hydrolyse (DH). Tracé de E / S en fonction de la température. La valeur du pH est maintenue au centre du domaine expérimental.

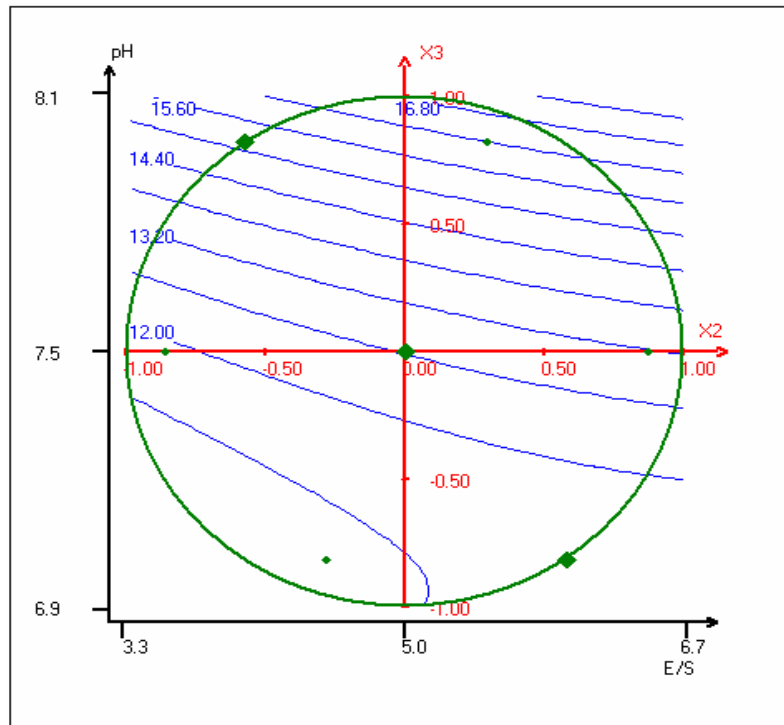


Figure IV.5. Courbes d'isoréponses du degré d'hydrolyse (DH). Tracé du pH en fonction de E / S. La valeur de la température est maintenue au niveau 0 (centre du domaine expérimental).

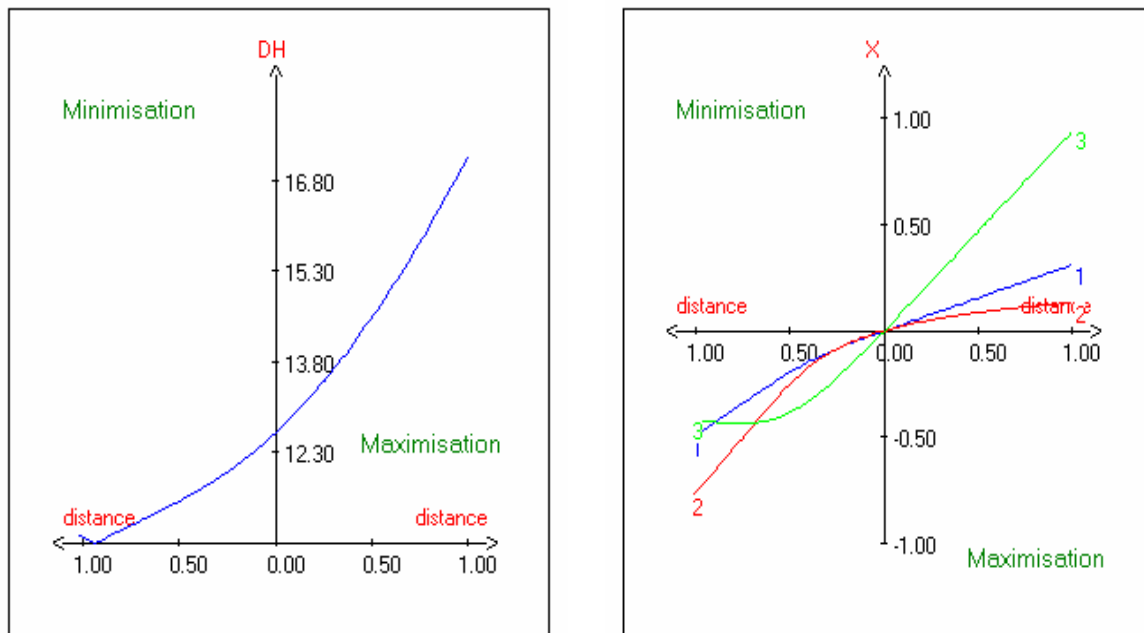


Figure IV.6. Chemin optimal pour minimiser ou pour maximiser le DH. Les variables de température (1), de E / S (2) et de pH (3) sont présentées en variables centrées réduites

Pour les résultats concernant le rendement protéique, les courbes d'isoréponses (**Figure IV.7**) montrent l'évolution du pH en fonction de la température (E / S étant fixé au centre du

domaine expérimental). Nous observons qu'un rendement protéique élevé (68 %) peut être obtenu en augmentant la température à 60 °C et le pH à 8.

Dans la **Figure IV.8**, on obtient un rendement protéique élevé en augmentant la température à 60 °C et en diminuant E / S vers le centre du domaine expérimental (E / S : 5 %).

L'évolution du pH en fonction de E / S (**Figure IV.9**) montre que l'augmentation du pH a un effet positif sur le rendement protéique alors que l'augmentation de E / S n'a pas d'effet. Les courbes du « chemin optimal » du rendement protéique, présentées dans la **Figure IV.10** montrent qu'une maximisation du rendement intervient si l'on augmente fortement la température (courbe 1), légèrement le rapport enzyme / substrat (courbe 2) et si l'on stabilise le pH.

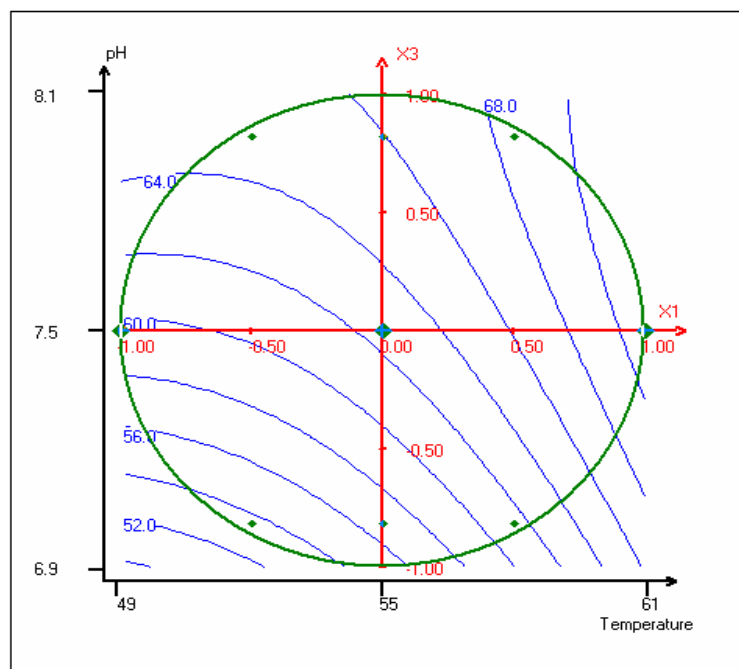


Figure IV.7. Courbes d'isoréponses du rendement protéique. Tracé du pH en fonction de la température. La valeur du rapport enzyme / substrat (E / S) est maintenue au niveau 0 (centre du domaine expérimental).

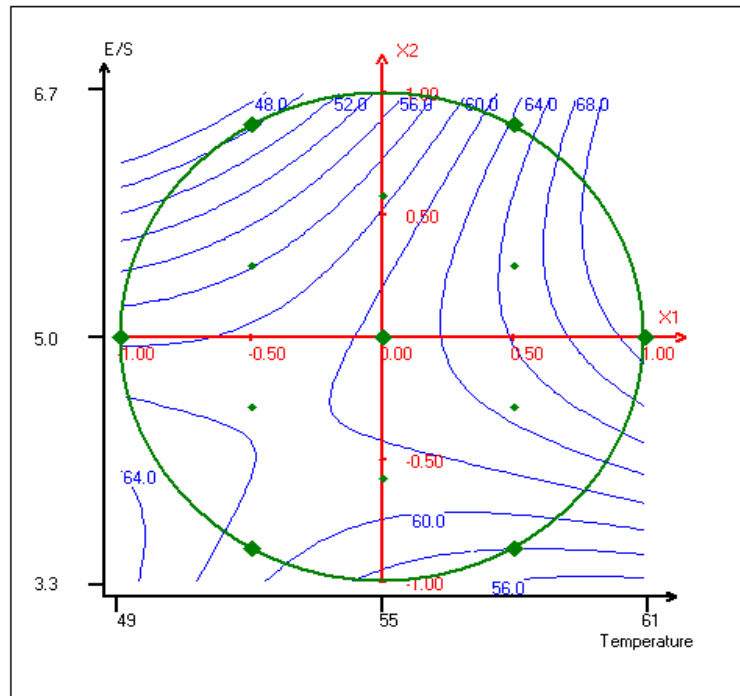


Figure IV.8. Courbes d'isoréponses du rendement protéique. Tracé de E / S en fonction de la température. La valeur du rapport de pH est maintenue au centre du domaine expérimental.

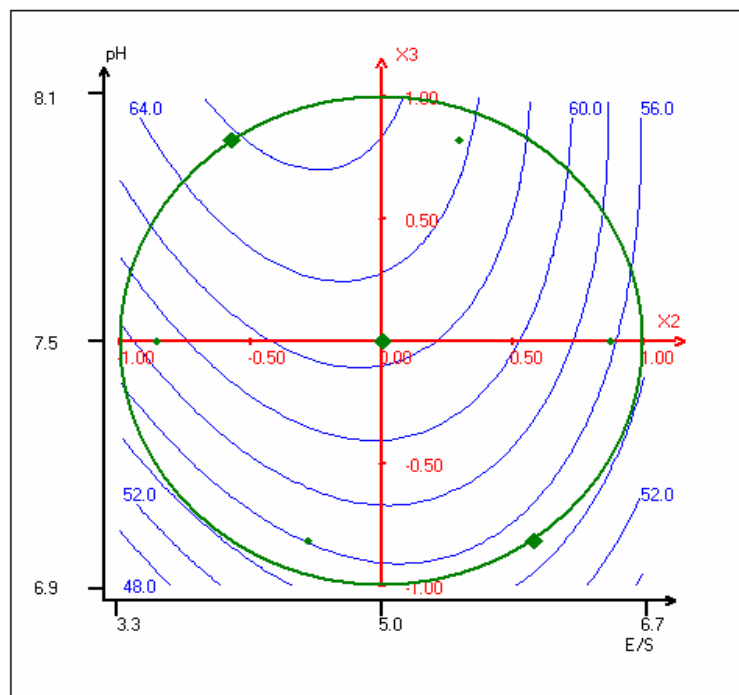


Figure IV.9. Courbes d'isoréponses du rendement protéique. Tracé de pH en fonction de E / S. La valeur de la température est maintenue au centre du domaine expérimental.

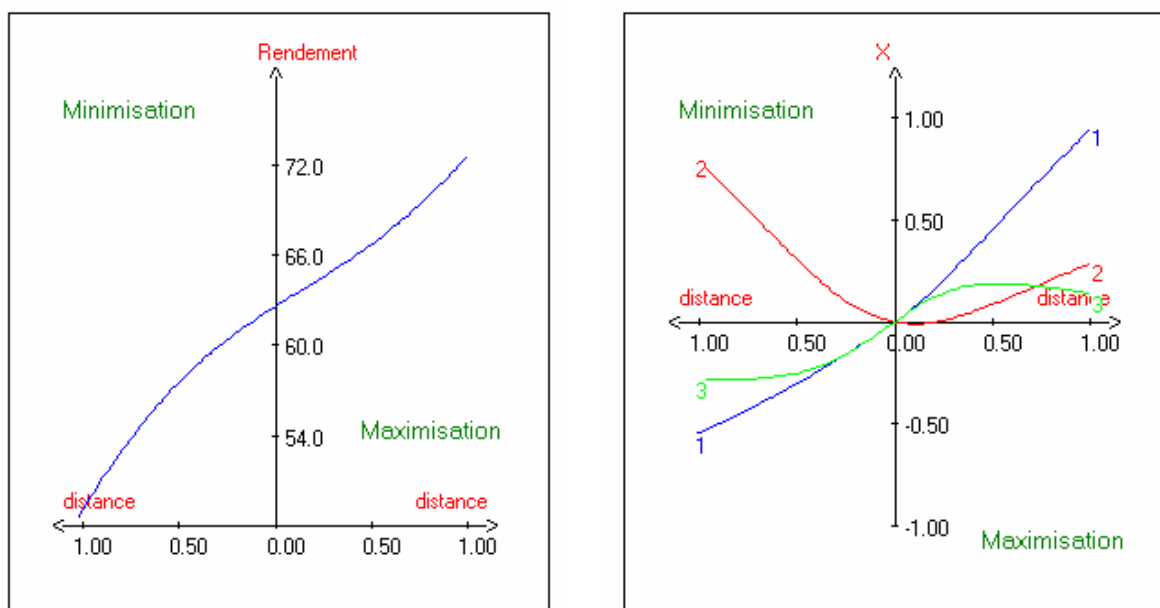


Figure IV.10. Chemin optimal pour maximiser le rendement protéique. Les variables de température (1), de E / S (2) et de pH (3) sont présentées en variables centrées réduites.

IV.2.1.2. Composition physico-chimique des hydrolysats protéiques

La composition physico-chimique des hydrolysats est visible dans le **Tableau IV.4**. Les compositions des hydrolysats de tête de saumon sont proches de celles du filet, publiées par Kristinsson et Rasco (2000 b). Après centrifugation, les hydrolysats de tête sont riches en protéines (82,3 %), avec une teneur en cendres 5 fois plus élevée que dans les têtes non hydrolysées (2,6 % de cendres). Cette teneur élevée en cendres est attribuée à la quantité de soude requise pour maintenir le pH constant (Quaglia et Orban, 1987 ; Benjakul et *al.*, 1997 ; Liceaga et Li-Chan, 1999).

Tableau IV.4. Composition physico-chimique d'hydrolysats lyophilisés de tête de saumon (étude actuelle) et d'hydrolysats de chair de filet de saumon

Composés (%)	Hydrolysats de tête de saumon (DH 11,5 %)	Hydrolysats de la chair de filet de saumon (DH 10 %) (Kristinsson et Rasco, 2000 b)
Protéines (NT × 6,25)	82,3 ± 1,9	71,6 ± 0,2
Lipides totaux	0,8 ± 0,02	0,06 ± 0,04
Humidité	5,3 ± 0,2	4,2 ± 0,9
Cendres	10,4 ± 1,1	22,3 ± 0,9
Potassium	1,2	
Sodium	2,3	
Magnésium	0,02	
Calcium	-	

IV.2.1.3. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés des protéines natives et des hydrolysats de tête de saumon est présentée dans le **Tableau IV.5**. Les aminogrammes des deux échantillons sont semblables et du même ordre de grandeur que ceux des hydrolysats de squelette central de saumon publiés par Liaset et *al.* (2003). Cependant, la teneur en glycine (> 1 mmol / g de protéines) est plus élevée dans les protéines natives de la tête et les hydrolysats du squelette central que dans les hydrolysats de tête. Cela est probablement dû à une hydrolyse incomplète des tissus par les protéases. La lysine montre également une teneur réduite dans l'hydrolysats de tête, peut-être due à des réactions croisées de type condensation de Maillard entre la fonction amine libre de la lysine et la fonction carboxyle des sucres réducteurs tels que les cérébrosides qui font partie des constituants majeurs du tissu cérébral.

Tableau IV.5. Composition en acides aminés des protéines natives et d'hydrolysats de tête de saumon comparée à celle d'hydrolysats des résidus de chair présents sur l'arête centrale de saumon.

Acides Aminés	Protéines natives de tête de saumon (mmol / g protéine)	Hydrolysats (DH 17,3 %) de tête de saumon (mmol / g protéine)	Hydrolysats de chair du squelette central de saumon (mmol / g protéine) (Liaset et <i>al.</i> , 2003)
Asn +Asp	0,62	0,61	0,61
Gln+Glu	0,78	0,75	0,86
Ser	0,35	0,37	0,40
Gly	1,69	1,10	1,45
His	0,10	0,10	0,25
Arg	0,34	0,33	0,39
Thr	0,30	0,34	0,34
Ala	0,72	0,82	0,88
Pro	0,53	0,54	0,50
Tyr	0,11	0,11	0,13
Val	0,27	0,26	0,30
Met	0,17	0,18	0,13
Ile	0,20	0,20	0,22
Leu	0,39	0,40	0,44
Phe	0,16	0,16	0,18
Lys	0,21	0,11	0,47

IV.2.1.4. Caractérisation de la taille des peptides des hydrolysats protéiques

Les hydrolysats de protéines et les protéines natives ont été fractionnés par chromatographie liquide d'exclusion de taille sur une colonne de gel Sephadex G 50 F pour étudier la distribution de tailles des peptides. En effet, la taille des peptides, qui dépend du degré d'hydrolyse, est en relation avec les propriétés organoleptiques et fonctionnelles des hydrolysats. Les propriétés telles que la solubilité, la capacité émulsifiante et l'amertume sont liées en grande partie à la taille des peptides (Mohr, 1980 ; Jeon et *al.*, 1999 ; Gilberg et *al.*, 2002). Le pic d'élution des protéines natives est observé à un temps de rétention inférieur à 300 min montrant que la taille des peptides est supérieure à 13200 Da (**Figure IV.11**).

Les chromatogrammes des quatre hydrolysats (**Figure. IV.12**), observés après 300 min d'élution, montrent des profils de distribution de taille de peptides similaires qui varient selon le degré d'hydrolyse. La distribution des classes de peptides (**Tableau IV.6.**) montre que les poids moléculaires moyens sont inférieurs à 13200 Da et que la répartition dépend du DH. Les proportions des classes de peptides ont été estimées à partir des aires de pic des chromatogrammes. Il apparaît qu'un hydrolysats à faible DH (11,5 %) est caractérisé par une

proportion élevée (47 %) de peptides de poids moléculaires compris entre 4200 Da et 13200 Da. Cette classe de peptides diminue au profit des petits peptides lorsque le DH augmente. Nous observons par ailleurs que la classe de peptides de 2430 Da < PM < 4272 Da est la fraction majoritaire dans les hydrolysats à DH 12,5 %, 14,3 %, 17,3 %. Pour ces hydrolysats, les proportions des diverses classes de peptides ne sont pas significativement différentes malgré des conditions expérimentales variées.

Nous pouvons alors souligner que si l'addition d'enzyme au cours de l'hydrolyse permet de lever partiellement la désactivation de l'enzyme, elle n'influence pas véritablement la taille des peptides.

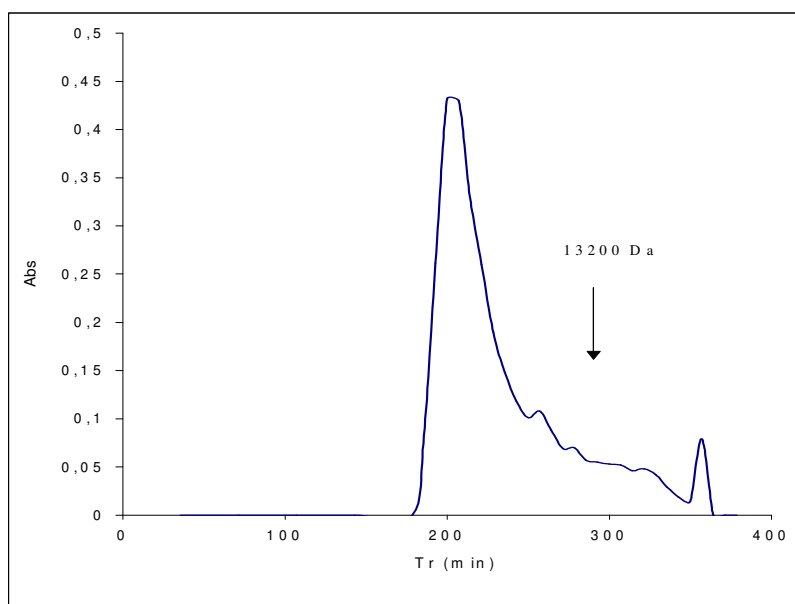


Figure IV.11. Chromatographie d'exclusion de taille des protéines natives de tête de saumon sur une colonne Sephadex G 50 F (1500-30000 Da), solvant d'élution : Tris- HCl 50 mM, pH 7,5, débit : 0,14 ml / min, 210 nm. Tr : temps de rétention, Abs : absorbance.

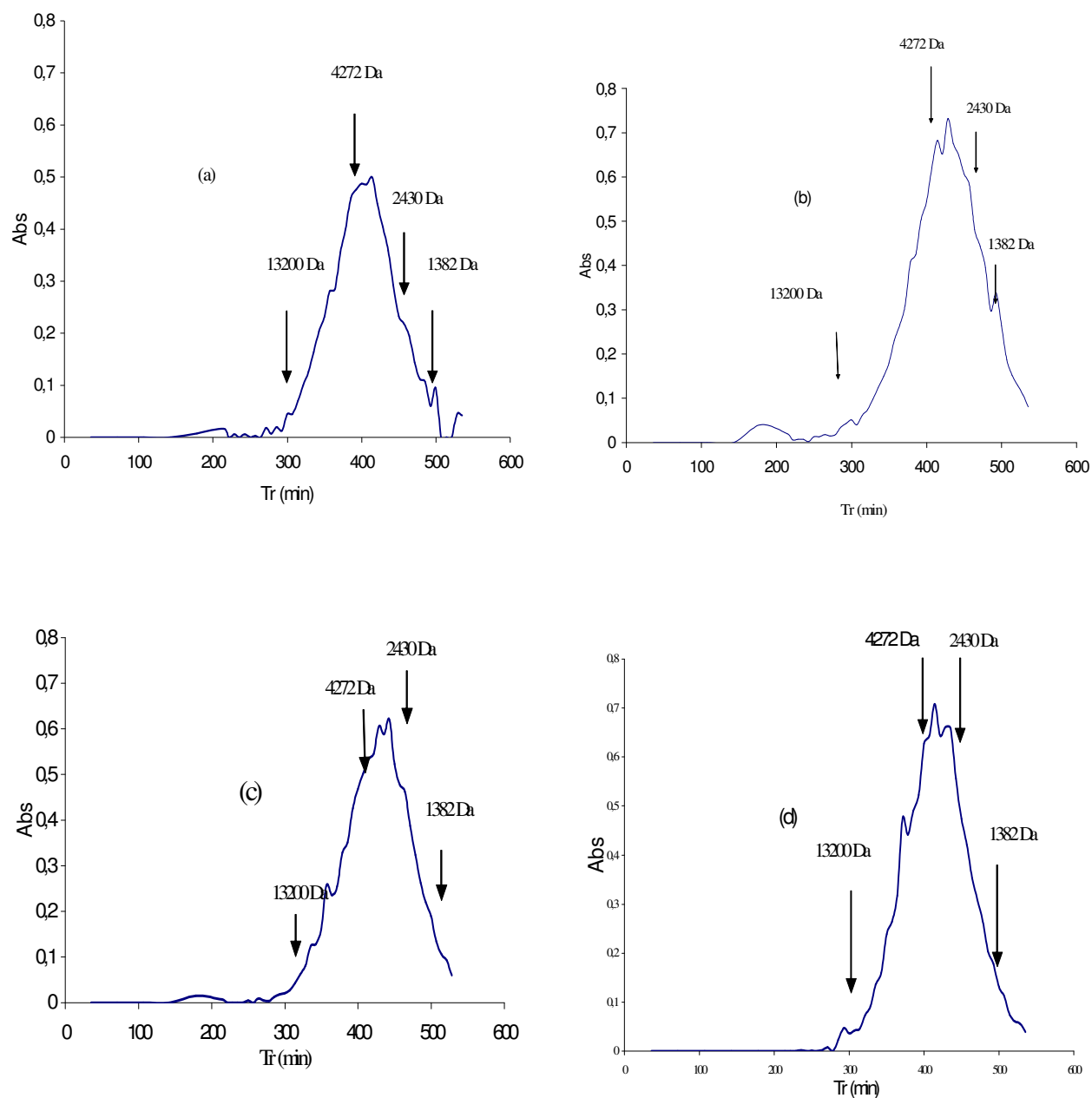


Figure IV.12. Chromatographie d'exclusion de taille des hydrolysats protéiques de tête de saumon sur une colonne Sephadex G 50 F (1500-30000 Da), solvant d'élution : Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, débit : 0,14 ml / min, 210 nm, (a) DH 11,5 %, (b) DH 12,5 %, (c) DH 14,3 %, (d) DH 17,3 %. Tr : temps de rétention, Abs : absorbance

Tableau IV.6. Distribution des classes de peptides dans les hydrolysats protéiques de tête de saumon.

Temps de rétention (min)	Poids moléculaires (Da)	Aires (%)			
		DH 11,5 %	DH 12,5 %	DH 14,3 %	DH 17,3 %
450-500	1382 -2430	13,7	29,1	30,3	30,4
400-450	2430- 4272	38,9	44,6	42,6	42,2
300-400	4272-13200	47,4	26,3	27,3	27,4

IV.2.2. Propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques

IV.2.2.1. La solubilité

La solubilité est exprimée en pourcentage d'azote soluble par rapport à l'azote total des échantillons protéiques. Parmi les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, elle est l'une des plus importantes en industrie alimentaire.

La **Figure IV.13** montre l'évolution de la solubilité des hydrolysats et des protéines natives (témoin) en fonction du pH 3 à 11. Tous les hydrolysats ont une meilleure solubilité par rapport aux protéines natives, avec des valeurs supérieures à 75 % dans la gamme de pH explorée.

Une concentration saline appropriée est nécessaire pour une meilleure solubilisation des protéines. La solution saline (NaCl) induit une force ionique dont l'augmentation (par exemple du NaCl 3 M) entraîne une réduction de la solubilité des protéines (Quaglia et Orban, 1987 b). Lors de la solubilisation, les protéines et les hydrolysats sont solvatés par formation de carboxylates de sodium (Venugopal et Shahidi, 1994). L'amélioration de la solubilité est également due à la réduction de taille des peptides des hydrolysats comparés aux protéines natives (Quaglia et Orban, 1987 b ; Chobert et *al.*, 1988 ; Rebeca et *al.*, 1991 ; Linder et *al.* 1996).

Les profils de solubilité des hydrolysats ont une évolution similaire dans la gamme de pH 3 à 11. D'après Diniz et Martin (1997), cela serait dû à la spécificité de la seule enzyme utilisée pour tous les hydrolysats. On a montré que L'Alcalase[®] produit des hydrolysats protéiques

possédant une très bonne solubilité (Quaglia et Orban, 1987 b, Shahidi et *al.*, 1995 ; Kristinsson et Rasco, 2000 b).

On observe que la solubilité des hydrolysats augmente avec le degré d'hydrolyse. Cela est en accord avec les résultats publiés par Quaglia et Orban (1987 b) sur les hydrolysats de protéines de sardine. L'une des causes de l'amélioration de la solubilité est liée à la force de la balance hydrophile-hydrophobe des peptides. Les petits peptides possèdent plus de résidus polaires dans leurs chaînes latérales et ils ont l'aptitude à former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau, ce qui se traduit par une amélioration de la solubilité.

Les hydrolysats ont une solubilité maximale (supérieure à 90 %) entre pH 6 et 7 et minimale entre pH 3 et 4. Kristinsson et Rasco (2000 b) ont observé des résultats similaires avec des hydrolysats de filet de saumon. Le pH influence la charge des chaînes latérales acides et basiques faibles, c'est la raison pour laquelle les protéines et les hydrolysats présentent une solubilité faible à leur pH isoélectrique (Chobert et *al.*, 1988 ; Vieira et *al.*, 1995, Onodenaloro et Shahidi, 1996; Linder et *al.*, 1996).

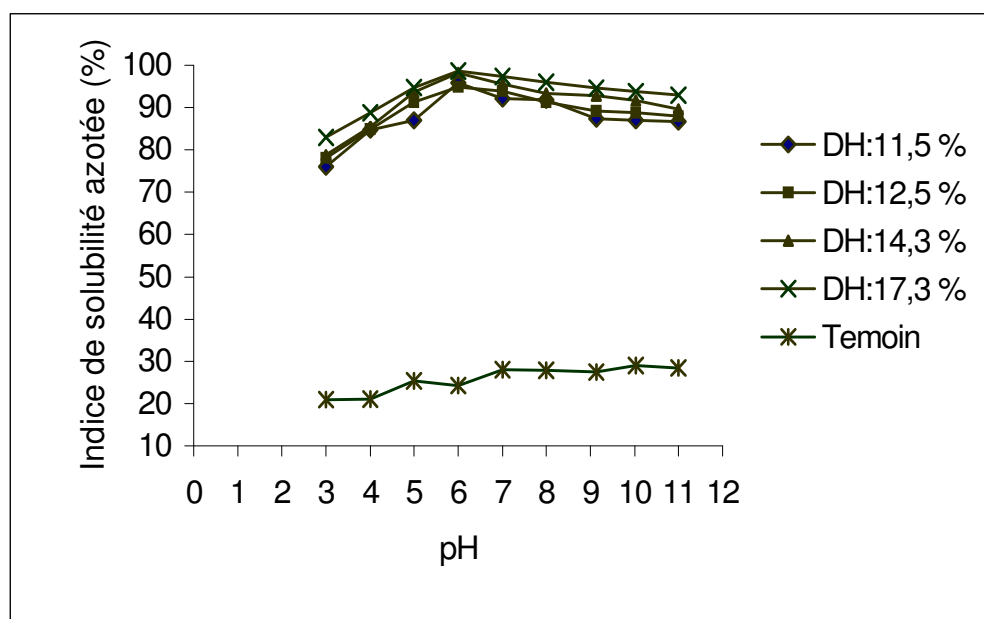


Figure IV.13. Solubilité des hydrolysats et de la protéine native (témoin) de tête de saumon entre pH 3 et pH 11.

IV.2.2.2. La capacité émulsifiante

La capacité émulsifiante (CE) représente le volume de phase lipidique pouvant être émulsifiée par unité de masse de protéine ou d'hydrolysats protéique. La capacité émulsifiante des hydrolysats a été étudiée en fonction de la concentration de 0,02 % à 0,2 %.

Les résultats présentés dans la **Figure IV.14** montrent que la capacité émulsifiante augmente en fonction de la concentration protéique, atteint un maximum puis diminue. Des profils de courbes similaires ont été obtenus par Vuilleumard et *al.* (1990) et Linder et *al.* (1996).

Selon Vuilleumard et *al.* (1990), la phase de croissance de la capacité émulsifiante peut s'expliquer par la différence du rapport protéines adsorbées / protéines disponibles. Aux faibles concentrations protéiques, la vitesse d'adsorption des polypeptides est plus faible ; de même que la vitesse de recouvrement de la surface des globules gras, ce qui augmente CE.

La phase de décroissance de la capacité émulsifiante est due au fait que la vitesse d'adsorption à l'interface huile / solution protéique liée à la concentration croissante en protéine augmente plus vite que la vitesse de propagation à l'interface (Linder et *al.*, 1996 ; Bleker et *al.*, 1997).

Selon Rahali et *al.* (2000), l'ancrage des peptides à l'interface dépend de la distribution des acides aminés chargés et hydrophobes. Ainsi, l'hydrophobie et les propriétés émulsifiantes sont-elles bien corrélées (Voutssinas et *al.*, 1983).

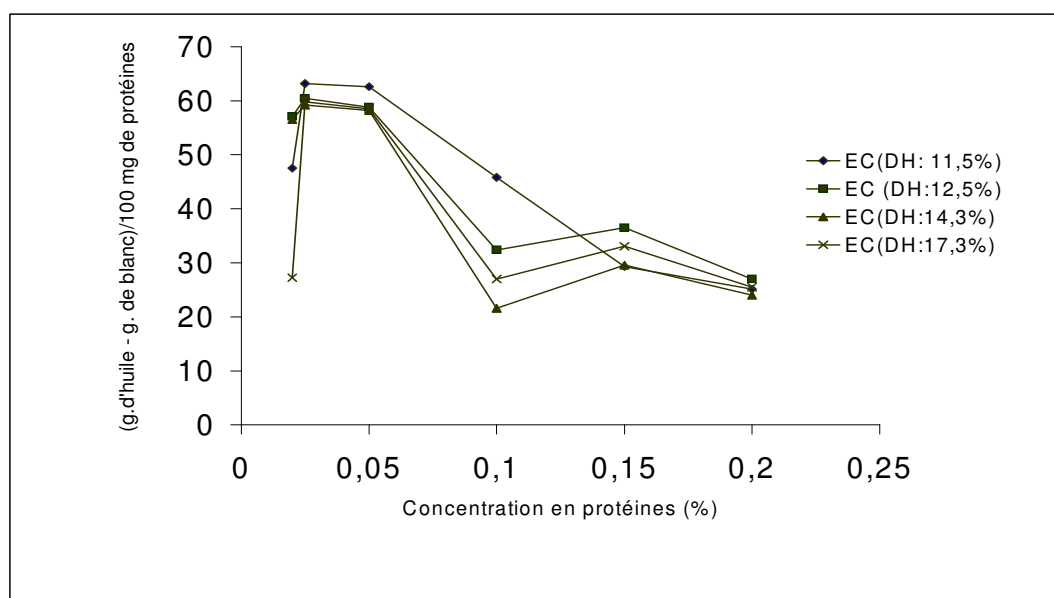


Figure IV.14. Capacité émulsifiante des hydrolysats de têtes de saumon en fonction de la concentration en protéines (NT x 6,25).

Nous constatons que l'hydrolyse influence négativement la capacité émulsifiante quelle que soit la concentration protéique. La capacité émulsifiante diminue lorsque le DH augmente. Des résultats analogues ont été observés par Diniz et Martin (1997) sur des hydrolysats de protéines de requin et par Quaglia et Orban (1990) sur les protéines de sardine. Les hydrolysats à DH élevé contiennent plus de petits peptides. Lors de l'émulsion, ces petits peptides diffusent rapidement et sont absorbés aux interfaces huile / solution protéique ; ils réduisent moins efficacement la tension interfaciale, car ils ne peuvent pas se réorienter et se déployer aux interfaces comme les peptides de grande taille (Turgeon et *al.*, 1991).

IV.2.2.3. La stabilité des émulsions

La stabilité des émulsions (SE) préparées avec des hydrolysats diminue faiblement en fonction de la protéolyse (**Figure IV.15**). Cette observation confirme que les meilleures propriétés émulsifiantes sont obtenues à des degrés d'hydrolyse faibles. Les hydrolysats à DH 11,5 % et DH 12,5 % présentent des stabilités émulsifiantes (87 à 88 %) très proches de celle du caséinate de sodium (90 %). Quaglia et Orban, (1990) ont montré que pour des hydrolysats de sardine issus d'une même enzyme, l'hydrophobie des peptides de grande taille est plus importante que celle des petits peptides. Ainsi la capacité et la stabilité émulsifiante diminuent en fonction du DH.

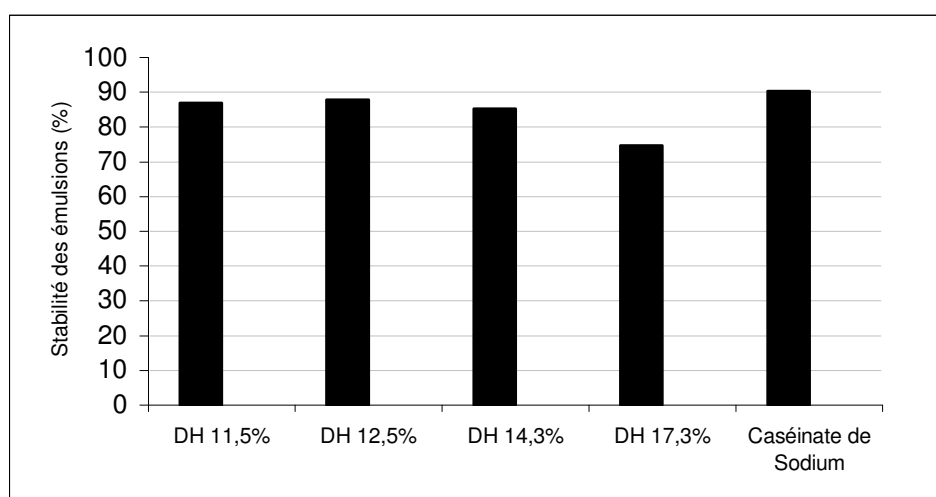


Figure IV.15. Stabilité comparée des émulsions d'huile de soja et de solutions d'hydrolysats de tête de saumon ou de caséinate de sodium (protéine de référence).

IV.2.2.3. La capacité d'absorption d'huile

La capacité d'absorption d'huile exprime la quantité d'huile directement fixée par la protéine. Dans les industries de transformation de la viande, c'est une caractéristique fonctionnelle très importante (Shahidi et *al.*, 1995 ; Onodenalore et Shahidi, 1996 ; Periago et *al.*, 1998).

La **Figure IV.16** montre les capacités d'absorption d'huile des hydrolysats, des protéines natives et du caséinate de sodium (protéine de référence). Nous observons que l'hydrolysat à faible DH (11,5 %) possède une meilleure aptitude à absorber l'huile que les hydrolysats à DH élevé et le caséinate de sodium. Les protéines natives ont une capacité d'absorption d'huile de 11 %, bien plus élevée que celle des hydrolysats (< 4 %).

La capacité d'absorption d'huile est liée à la taille des protéines. L'huile est absorbée par réticulation physique dans la matrice protéique, donc plus celle-ci est grande, plus l'huile est absorbée (Kinsella, 1976). Wang et Kinsella, (1976) ont rapporté que la corrélation entre la densité de la matrice protéique et l'absorption d'huile est de 0,95.

Les interactions hydrophobes entre les molécules de lipides et les chaînes latérales hydrophobes des peptides sont aussi responsables de la fixation d'huile (Haque et Mozaffar, 1992 ; Periago et *al.* 1998). Kristinsson et Rasco (2000 b) ont montré que la spécificité de l'enzyme a une influence sur l'absorption de l'huile.

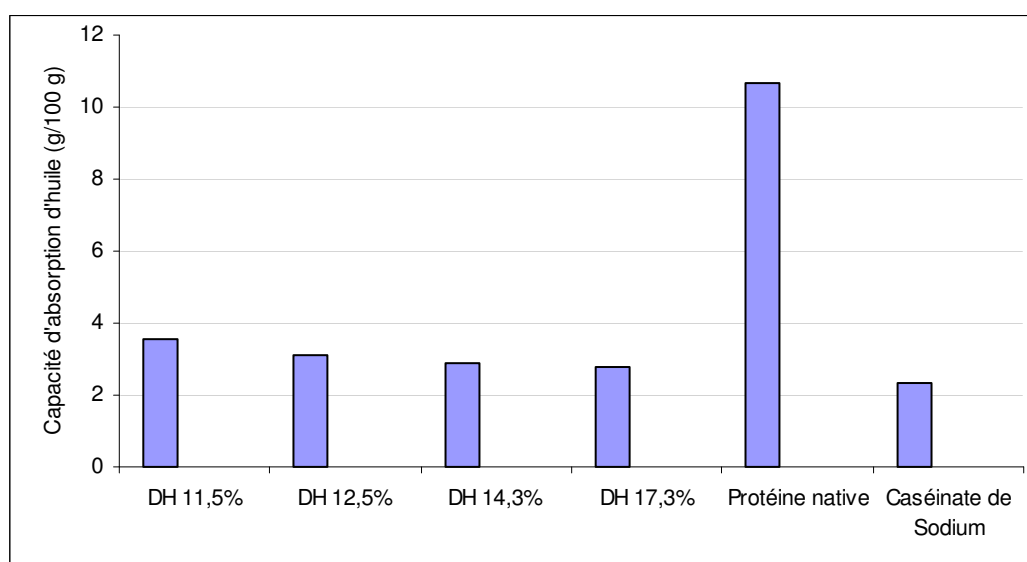


Figure IV.16. Capacité d'absorption d'huile des hydrolysats protéiques, des protéines de tête de saumon et du caséinate de sodium (protéine de référence).

IV.2.3. Conclusion

Une endopeptidase commerciale (Alcalase® 2,4 L) a été utilisée pour obtenir des hydrolysats à partir de têtes de saumon. Les hydrolysats lyophilisés et déshuilés ont une teneur en équivalent protéines (NT x 6,25) de 82 %.

Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques ont été caractérisées en termes de solubilité, de taille, de capacité et stabilité émulsifiantes, ainsi que par la capacité d'absorption d'huile. Les hydrolysats possèdent de bonnes propriétés fonctionnelles qui varient en fonction du degré d'hydrolyse. Par conséquent l'utilisation de protéases peut être une bonne alternative à la conversion des co-produits de poisson en ingrédients pour des applications industrielles.

IV.3. Fraction lipidique des têtes de saumon

IV.3.1. Extraction des lipides

IV.3.1.1. Traitement enzymatique

L'hydrolyse enzymatique a été réalisée avec des protéases commerciales (Alcalase® 2,4 L, Neutrase® 0,8 L, Protamex™) employées dans leurs conditions optimales d'activité. Les cinétiques présentées dans la **Figure IV.17** sont des courbes typiques de la protéolyse (Kristinsson et Rasco, 2000 c ; Guerard et *al.*, 2001, 2002). On peut observer que l'hydrolyse avec l'Alcalase® 2,4 L aboutit à un degré d'hydrolyse plus élevé (DH 21,5 %) devant la Protamex™ (DH 14,5 %) et la Neutrase® 0,8 L (DH 9 %). Lors de la protéolyse, la libération des lipides est obtenue après déstructuration et solubilisation du tissu protéique. On aboutit, après séparation par centrifugation, à l'obtention de deux fractions lipidiques : une fraction d'huile et une couche émulsionnée (présentées dans la section Matériels et Méthodes, **Figure II.2**). Des résultats similaires ont été obtenus par Liaset et ses collaborateurs (2003) pour l'hydrolyse de résidus de chair de l'arête centrale du saumon avec la Protamex™.

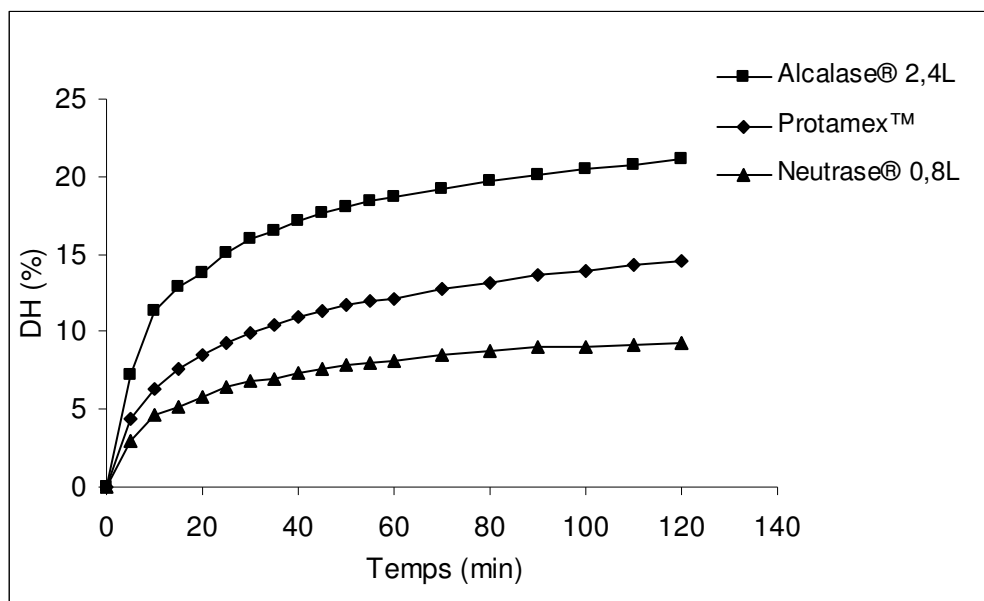


Figure IV.17. Hydrolyse enzymatique de têtes de saumon pendant 2 heures dans les conditions optimales des protéases : Alcalase® 2,4 L, 60 °C, pH 8, E / S : 5 % ; Protamex™, 50 °C, pH 7,5, E / S : 90 UA / kg ; Neutrase® 0,8 L, 50 °C, pH 7, E / S : 5 %, (E / S : masse d'enzyme / masse de protéines).

Le taux d'extraction d'huile après séparation par centrifugation, est présenté dans le **Tableau IV.7**. On observe que l'hydrolyse avec l'Alcalase® 2,4 L entraîne la séparation d'un maximum d'huile, soit 19,6 g / 100 g d'échantillon initial, plus une partie sous forme émulsionnée (3,7 g / 100 g d'échantillon initial).

La Protamex™ et la Neutrase® 0,8 L, bien qu'aboutissant à des degrés d'hydrolyse différents (respectivement DH 14,6 % et 9 %) conduisent à la séparation de quantités d'huile sensiblement égales (de 14,4 et 14,6 g / 100 g d'échantillon initial).

La différence du taux d'extraction entre les trois enzymes peut s'expliquer par leur capacité et leur spécificité à déstructurer le tissu protéique. L'Alcalase® 2,4 L apparaît comme la plus efficace pour les protéines de saumon. Il s'agit d'une enzyme déjà signalée par d'autres auteurs comme étant très active sur les protéines de poisson (Gildberg et *al.*, 1989, Benjakul et Morrissey, 1997, Diniz et Martin, 1997).

Les fractions émulsionnées obtenues se caractérisent probablement par la présence de lipides polaires, de lipides neutres et de résidus protéiques, engagés dans des interactions hydrophobes – hydrophiles à l'interface phase aqueuse / huile.

Liaset et *al.* (2003) expliquent que le taux d'extraction d'huile dépend de la technique de séparation utilisée et que la température est un paramètre critique. Ils rapportent que la température optimale de séparation est de 95 °C. Dans notre cas, nous avons choisi les

températures de 50 à 60 °C sous atmosphère inerte et une centrifugation à 5000 x g pendant 10 min, afin de limiter les réactions de dégradation des lipides.

A partir des différentes protéolyses réalisées, les rendements d'extraction d'huile peuvent être estimés par comparaison des masses d'huile extraites soit par voie enzymatique soit par solvant :

$$Rdt = Mh_{enz} / Mh_{solv}$$

Où Mh_{enz} est le pourcentage massique d'huile extraite par voie enzymatique par rapport à la masse de poisson hydrolysée.

Mh_{solv} est la masse d'huile mesurée après extraction par solvant.

Il en résulte que l'Alcalase® 2,4 L permet l'extraction d'environ 91 % de lipides totaux, alors que la Protamex™ et la Neutrase® 0,8 L extraient approximativement 68 % des lipides totaux.

Tableau IV.7. Taux d'extraction d'huile et de la couche émulsionnée après traitement enzymatique des têtes de saumon et centrifugation.

Enzyme	Degré d'hydrolyse (%)	Huile (g /100 g échantillon initial)	couche émulsionnée (g / 100 g échantillon initial)
Neutrase® 0,8L	9	14,4 ± 0,2	6,4 ± 0,9
Protamex™	14,5	14,6 ± 1,0	6,2 ± 0,6
Alcalase® 2,4L	20,5	19,6 ± 1.2	3,7 ± 1,0

D'autre part, les données massiques des différentes fractions extraites lors de l'hydrolyse de 500 grammes de têtes fraîches de saumon par l'Alcalase® 2,4 L dans les conditions optimales d'activités sont résumés dans le **Tableau IV.8**. Ces valeurs ont un caractère indicatif, compte tenu des pertes réalisées aux cours des différentes étapes de traitement. La totalité des fractions lyophilisées représente en masse 183 g, soit environ 36,6 % (g / 100 g) de la masse de têtes fraîches hydrolysées.

Tableau IV.8. Données massiques (g) sur les fractions récoltées lors de l'hydrolyse enzymatique de 500 g de têtes de saumon par l'Alcalase® 2,4 L.

Têtes fraîches initiales	Hydrolysats protéique lyophilisé	Huile extraite	Couche émulsionnée lyophilisée	Culot protéique lyophilisé	Arêtes sèches
500	44	95	6	10	28

IV.3.1.2. Caractéristiques physico-chimiques des fractions issues de l'hydrolyse

La couche émulsionnée et les culots protéiques séparés après centrifugation du milieu réactionnel ont été analysés. Les fractions émulsionnées ont été lavées avec une solution saline pour tenter d'éliminer les résidus protéiques, puis elles ont été lyophilisées. Les culots protéiques, recueillis après centrifugation dans le fond des pots de centrifugation ont été aussi analysés.

Les compositions sont présentées dans le **Tableau IV.9**. Les caractéristiques physico-chimiques de la couche émulsionnée varient beaucoup, car elles dépendent des conditions d'hydrolyse et de séparation. La teneur en protéines varie entre 7,20 et 20 % (g / 100 g). Ce sont des peptides qui se placent à l'interface huile / phase aqueuse et stabilisent une émulsion avec les lipides. La teneur en lipides de la fraction émulsionnée est importante, elle peut contenir jusqu'à 82 g pour 100 g de fraction lyophilisée. Cette teneur en lipides est fluctuante en fonction de l'enzyme et dépend surtout des techniques de séparation décrites.

Tableau IV.9. Compositions de la couche émulsionnée et des culots protéiques, lyophilisés issus de l'hydrolyse enzymatique.

	couche émulsionnée	Culots protéiques
Lipides totaux (g / 100 g échantillon sec)	75 - 82	12 - 28
Protéines (NT × 6,25) (g / 100 g échantillon sec)	7,20 - 19,60	70 - 80
Cendres	0,40 - 2,50	4,73 ± 0,31

Les culots protéiques lyophilisés contiennent une teneur en matière protéique très élevée (70 à 80 g / 100 g de matière lyophilisée), probablement des peptides de haut poids moléculaire ou des protéines faiblement hydrolysées par les protéases, en raison de l'inaccessibilité de certaines liaisons peptidiques.

La teneur en lipides est relativement élevée (12 à 28 g / 100 g de matière sèche) et dépend du taux d'hydrolyse des protéines initiales. Ce sont des lipides formant des complexes avec les peptides de grande taille et les protéines non hydrolysées (Liaset et *al.*, 2003). Cette huile présente un aspect visqueux et une coloration brune, différente de la coloration des huiles extraites de la tête entière par solvant et par voie enzymatique (**Figure IV.18**). Ces caractéristiques sont probablement dues à une teneur élevée en phospholipides.

La teneur en cendres est relativement plus élevée dans les culots protéiques (4,73 g / 100 g) que dans les fractions émulsionnées (0,4 à 2,50 g / 100 g).

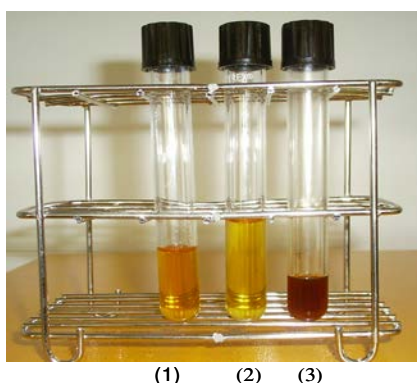


Figure IV.18. Photographie des différentes huiles : (1) huile totale de tête de saumon extraite par solvant, (2) huile de tête de saumon obtenue par voie enzymatique, (3) huile extraite par solvant (Bligh et Dyer) des culots issus de l'hydrolyse protéique.

IV.3.1.3. Analyse chimique des huiles

Les caractéristiques chimiques des huiles issues de la tête et du filet de saumon sont présentées dans le **Tableau IV.10** ci-dessous. L'huile de tête présente dans l'ensemble de bons indices chimiques. L'indice d'iode, plus élevé que celui de l'huile du filet, indique une plus grande richesse en acides gras polyinsaturés à longue chaîne, corrélée à un indice de saponification plus faible. Les faibles indices de peroxyde et d'acide présagent d'une bonne qualité, probablement liée à la bonne conservation des co-produits.

Tableau IV.10. Analyse chimique des huiles de tête et de filet de saumon

	Huile tête de saumon	Huile de filet de saumon (pour comparaison)
Indice de peroxyde (meq O ₂ / kg huile)	1,5 ± 0,2	2,5 ± 0,3
Indice d'iode (g d'iode / 100g huile)	187,0 ± 2,0	131,0 ± 2,0
Indice de saponification (meq KOH / g huile)	196,0 ± 1,0	228,0 ± 2,0
Indice d'acide (mg KOH / g huile)	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Acidité (% acide oléique)	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1

IV.3.1.4. Taux d'extraction des lipides par différentes méthodes

Différentes méthodes d'extraction des lipides ont été appliquées aux broyats de têtes de saumon, dans le but de comparer les taux d'extraction. Il s'agit des méthodes d'extraction par solvant (Folch et *al.*, 1957 ; Bligh et Dyer, 1959 ; méthode de Soxhlet), de la méthode de cuisson et de la méthode enzymatique par l'Alcalase[®] 2,4 L. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure IV.19**.

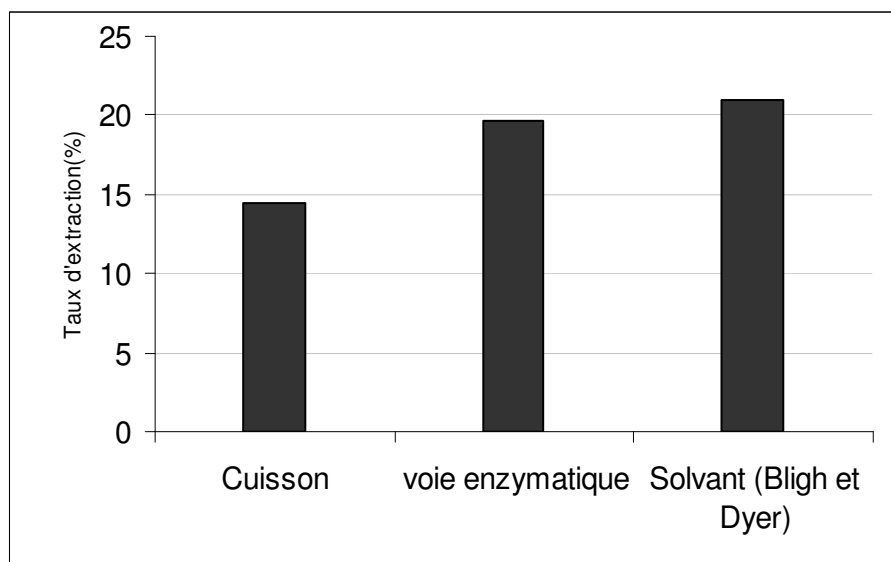


Figure IV.19. Taux d'extraction des lipides totaux de tête de saumon par différentes méthodes.

Nous observons que les méthodes d'extraction par solvants (Bligh et Dyer, 1959 ou Folch et *al.*, 1957) sont les plus efficaces, puisqu'elles extraient 21,5 % de lipides. Des auteurs ont

montré que les méthodes utilisant des mélanges de solvants, tels que le chloroforme, le méthanol et l'eau permettent une meilleure extraction des matières grasses (Gunnlaugsdottir et Ackman, 1993, Honeycutt et *al.*, 1995 ; Undeland et *al.*, 1998). Les tissus de poisson sont aussi considérés comme des substrats bien adaptés à ces méthodes.

L'extraction par voie enzymatique avec l'Alcalase[®] 2,4 L conduit à un bon taux d'extraction (19,6 %) très proche de l'extraction par solvant, supérieur au taux d'extraction par cuisson (14,5 %). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Linder et *al.* (2002) qui rapportent que la différence entre l'extraction par voie enzymatique et l'extraction par solvant n'excède pas 2 %.

L'extraction par cuisson aboutit au plus faible rendement. Cela s'explique, selon Chantachum et *al.*, (2000), par la température élevée (95 °C) utilisée lors de l'extraction qui limite la libération d'huile. Cette libération serait en effet freinée par la coagulation des protéines.

IV.3.1.5. Composition en classes de lipides par différentes méthodes d'extraction

La composition en classes des lipides totaux (lipides neutres et lipides polaires) des huiles extraites par solvant et des huiles extraites par voie enzymatique (Alcalase[®] 2,4 L), ainsi que les lipides totaux des culots protéiques issus de l'hydrolyse enzymatique, a été analysée par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan[®]). La **Figure IV.20** présente les proportions de lipides neutres et de lipides polaires.

Il apparaît que les huiles extraites par solvant contiennent une forte proportion de lipides neutres (les triacylglycérols) qui apparaissent à raison de 97 % des lipides totaux, alors que les lipides polaires n'en représentent que 2,5 %. Cela est en accord avec les résultats observés par Aursand et ses collaborateurs (1994) sur la distribution des lipides dans des portions de saumon (*Salmo salar*). Ils ont observé que les têtes de saumon contiennent 97,3 % de TG et 2,2 % de phospholipides. Les triacylglycérols sont la première source énergétique durant les périodes de privation et de développement des gonades. Peng et *al.* (2003) ont observé que 85 % des lipides fournis dans la nourriture de deux espèces de saumon se reconvertissent en triacylglycérols, alors que seulement 10 % se convertissent en phospholipides. Il faut par ailleurs mentionner que les méthodes d'extraction par solvant, avec la présence d'eau comme la méthode de Bligh et Dyer, extraient majoritairement les lipides neutres (Gunnlaugsdottir et Ackman, 1993).

L'huile extraite par voie enzymatique (Alcalase[®] 2,4 L) contient aussi une forte proportion de TG (96 %) et une proportion de lipides polaires n'excédant pas 3 %. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Liaset *et al.* (2003).

On observe donc que l'huile extraite par voie enzymatique (Alcalase[®] 2,4 L) présente les mêmes proportions de classes de lipides que les huiles extraites par les méthodes utilisant des solvants, notamment celle de Bligh et Dyer (1959) et celle de Folch *et al.* (1957).

L'analyse de l'huile des culots protéiques révèle une forte teneur en lipides polaires, environ 55 à 60 % des lipides totaux, alors que la teneur en lipides neutres est d'environ 44 %. Cette observation est d'autant plus intéressante que les culots protéiques ont toujours été considérés comme des sous-produits, voire de véritables déchets, dans les procédés d'hydrolyse. La présence d'une forte proportion de phospholipides dans les culots protéiques peut s'expliquer par le fait qu'ils se présentent avec les protéines sous forme de complexes lipo-peptidiques qui ont échappé à l'action des protéases. Par ailleurs, les phospholipides ont une densité voisine de 1,035, ce qui les différencie des lipides neutres qui ont une densité de 0,92. Cette différence très importante peut également expliquer pourquoi les phospholipides se retrouvent majoritairement dans les culots protéiques.

On peut aussi noter que le fractionnement des lipides totaux en lipides neutres et en lipides émulsionnés, obtenus après des étapes d'hydrolyse et de centrifugation, a conduit à une partition des molécules lipidiques en fonction de leur balance hydrophile-lipophile.

Par ailleurs les proportions d'insaponifiables sont de l'ordre de 1,8 % pour les méthodes utilisant des solvants, 0,5 % pour l'huile neutre et 0,7 % pour la couche émulsionnée issue par voie enzymatique (résultats non présentés sur la **Figure IV.20**).

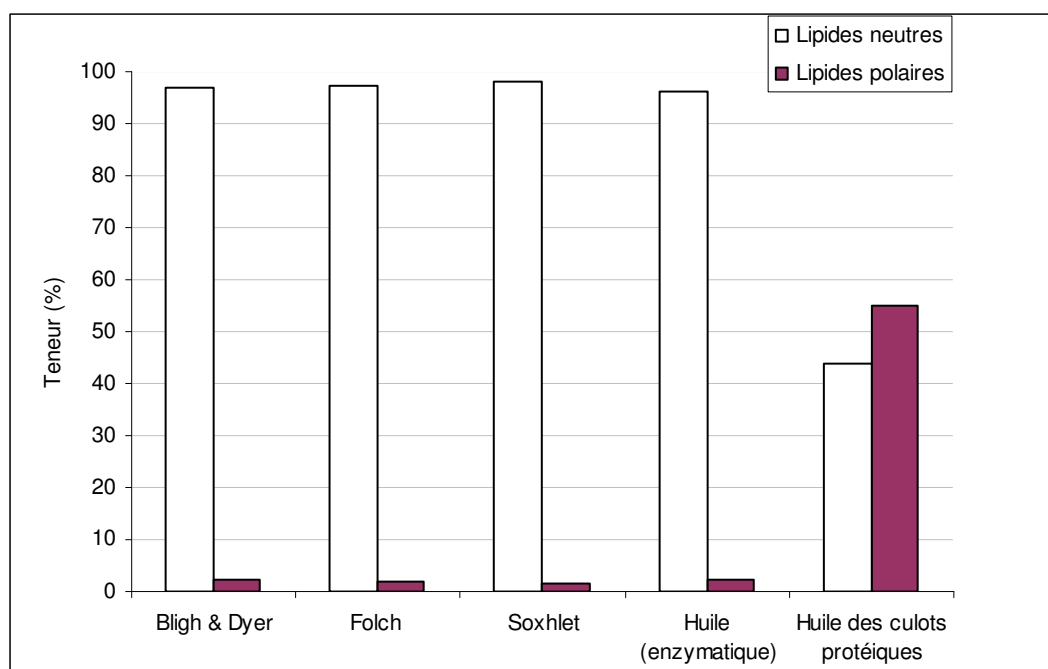


Figure IV.20. Classes de lipides analysées par CCM-DIF Iatroscan® dans les huiles extraites par solvant, de l'huile obtenue par voie enzymatique (avec l'Alcalase® 2,4 L) et de l'huile des culots protéiques.

IV.3.2. Séparation des classes de lipides par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®)

IV.3.2.1. L'huile issues des culots protéiques

Dans la littérature, diverses procédures de séparation et de quantification des classes de lipides ont été publiées. En raison de la complexité des composés lipidiques, il existe des méthodes reposant sur plusieurs étapes de séparation basées sur les groupements polaires des lipides. Ces méthodes comprennent souvent la chromatographie sur couche mince et le fractionnement sur colonne couplé ou non à la chromatographie liquide à haute performance. Parmi ces méthodes, la chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®) est très souvent utilisée pour son efficacité et sa bonne résolution (Hazel, 1985 ; Parrish et *al.*, 1996 ; Striby et *al.*, 1999). C'est la technique que nous avons employée ici.

La **Figure IV.21** montre l'analyse des huiles extraites des culots protéiques.

Le développement des chromarods dans un éluant apolaire constitué de hexane / éther diéthylique / acide formique (80 / 20 / 0,2, v / v / v) a permis la séparation de deux pics, l'un correspondant aux lipides polaires et l'autre aux lipides neutres (**Figures IV.21 a**). Selon De Shreijver et Vermeulen (1991), la présence de l'hexane dans le mélange de solvants conduit à

une meilleure séparation des lipides neutres des lipides polaires. Les lipides neutres ont été identifiés comme des triacylglycérols (TG). La proportion de lipides polaires (55 %) est plus importante que celle des lipides neutres (44 %).

La séparation des phospholipides individuels a été réalisée après un brûlage partiel des chromarods pour éliminer les lipides neutres, suivi d'une séparation dans un éluant polaire constitué de chloroforme / méthanol / eau / ammoniacque 25 % (47 / 20 / 2,5 / 0,28, v / v / v / v).

La **Figure IV.21 b** montre sept pics distincts présentant une bonne résolution. L'identification de six pics a été réalisée à partir des phospholipides standard. Le pic observé au temps de rétention de 0,45 min représente des composés qui n'ont pas migré dans l'éluant. Ces composés, qui n'ont donc pas été identifiés, pourraient être les glycolipides (cérébrosides).

Le **Tableau IV.11** résume les proportions des différentes classes de phospholipides. Il ressort que la phosphatidylcholine représente le constituant majeur avec une proportion de 54,7 %, loin devant la phosphatidyléthanolamine (14 %).

Ces observations sont en accord avec la littérature qui révèle que la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine sont les phospholipides majoritaires parmi les lipides polaires des poissons (Hazel, 1985 ; Henderson et Tocher, 1987). Des auteurs rapportent des proportions de l'ordre de 50 à 70 % pour la PC et de 10 à 30 % pour la PE selon l'espèce et l'organe étudiés (Body et Vlieg, 1989 ; Banerjee *et al.*, 1997 ; Kozlova et Khotimchenko, 2000)

La phosphatidylsérine et la sphingomyéline représentent des teneurs moyennes respectivement de 10,4 % et 8,3 %. Le phosphatidylinositol et la lysophosphatidylcholine représentent de faibles teneurs, respectivement 2,4 % et 1,4 %.

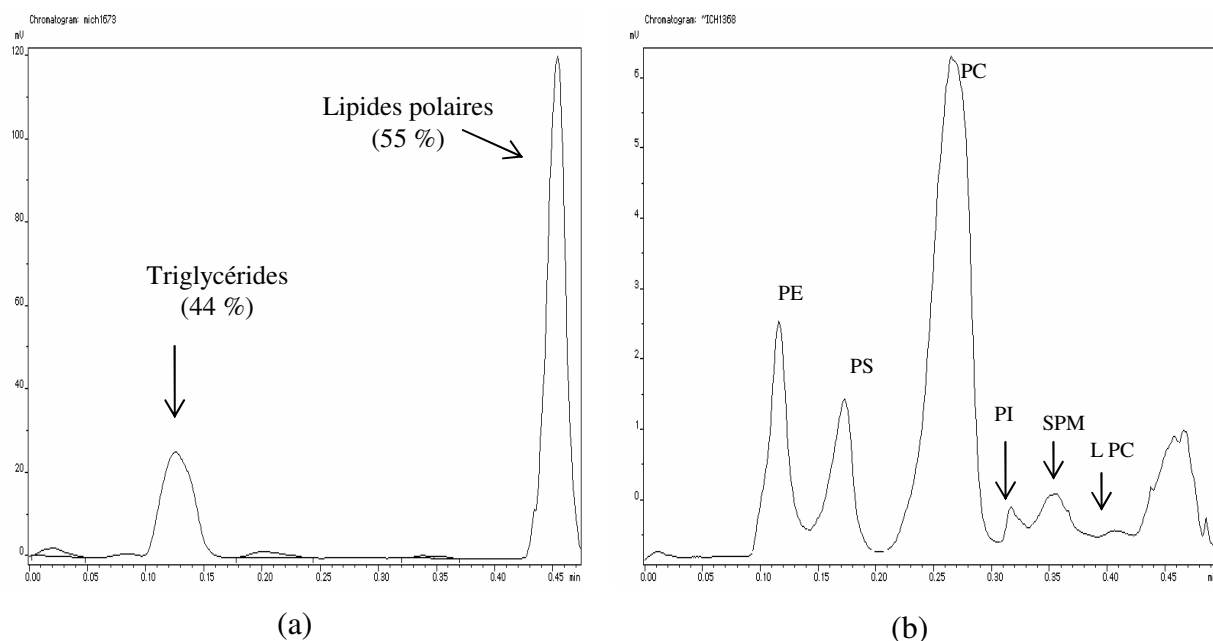


Figure IV.21. Séparation par CCM Iatroscan® des classes de lipides et des phospholipides de l'huile des culots protéiques issus de l'hydrolyse enzymatique ; (a) séparation dans l'éluant : hexane / éther diéthylique / acide formique (80 / 20 / 0,2, v / v / v) ; (b) séparation du pic de lipides polaires dans l'éluant : chloroforme / méthanol / eau / ammoniacque 25 % (47 / 20 / 2,5 / 0,28, v / v / v / v) ; l'échantillon a été dissous à raison de 5 mg / ml de mélange chloroforme / méthanol (2 / 1, v / v). PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, SPM : sphingomyéline
LPC : lyso-phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol.

Tableau IV.11. Composition en phospholipides de l'huile des culots protéiques issus de l'hydrolyse enzymatique analysés par CCM-DIF Iatroscan®.

Type de phospholipide	PE	PS	PC	PI	SPM	LPC
Proportion (% phospholipides totaux)	14 ± 0,2	10,4 ± 0,4	54,7 ± 1,2	2,5 ± 0,1	8,3 ± 0,3	1,4 ± 0,1

n = nombre de répétitions : 5

PE : phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, SPM : sphingomyéline

LPC : lyso-phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine, PI : phosphatidylinositol

IV.3.2.2. Les lipides de la couche émulsionnée

La fraction d'huile émulsionnée se présente comme une émulsion de lipides, de résidus protéiques et de molécules d'eau retenues par absorption ou par formation de micelles. La fraction lyophilisée a été dispersée dans un solvant (Chloroforme / méthanol, 2 / 1), puis passée sur un filtre Millex®- HV 0,45 µm afin d'éliminer les résidus protéiques insolubles.

L'analyse par CCM-DIF Iatroscan[®] des lipides émulsionnés extraits par la méthode de Bligh et Dyer après hydrolyse par l'Alcalase[®] 2,4 L et par la Neutrase[®] 0,8 L est présentée dans la **Figure IV.22**.

La séparation dans un mélange éluant apolaire (hexane / éther diéthylique / acide formique (80 / 20 / 0,2, v / v / v) montre la séparation d'un pic de lipides neutres, notamment les triacylglycérols et d'un pic de lipides polaires.

Nous observons que la fraction de lipides émulsionnés extraits par voie enzymatique avec l'Alcalase[®] 2,4 L contient beaucoup moins de lipides neutres (18 % de triacylglycérols) que les lipides émulsionnés extraits après hydrolyse avec la Neutrase[®] 0,8 L (56 % de triacylglycérols). A l'inverse, les lipides polaires représentent 80 % des lipides de la couche émulsionnée extraits avec l'Alcalase[®] 2,4 L, alors qu'ils représentent 43 % dans le cas de la Neutrase[®] 0,8 L. Ces proportions peuvent donc varier et dépendent des techniques de séparation après l'hydrolyse (Liaset et *al.*, 2003).

La séparation des phospholipides individuels réalisée dans l'éluant constitué de chloroforme / méthanol / eau / ammoniac 25 % (47 / 20 / 2,5 / 0,28 ; v / v / v / v) est présentée dans la **Figure IV.23**. Nous observons un profil d'élution différent de celui observé pour l'huile des culots protéiques, présentant une bonne résolution des pics de phospholipides (pics 1 à 6) et un pic (n° 7) fixé à l'origine représentant la majeure proportion (52,20 %) des molécules polaires. Ce dernier est non identifié et pourrait être constitué de glycolipides tels que les cérébrosides.

Parmi les phospholipides identifiés (**Tableau IV.12**), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC) représentent respectivement 20,70 % et 14,83 % des lipides polaires de la couche émulsionnée. Cette observation ne reflète pas, bien évidemment, la littérature sur les phospholipides de poissons. Cela met en évidence la particularité des lipides de la couche émulsionnée, dont la composition dépend des caractéristiques physico-chimiques des composés engagés dans l'émulsion. La fraction émulsionnée est constituée d'un mélange de peptides, de lipides qui ont migré à l'interface de la phase aqueuse (ou protéolysat) et de la phase huileuse.

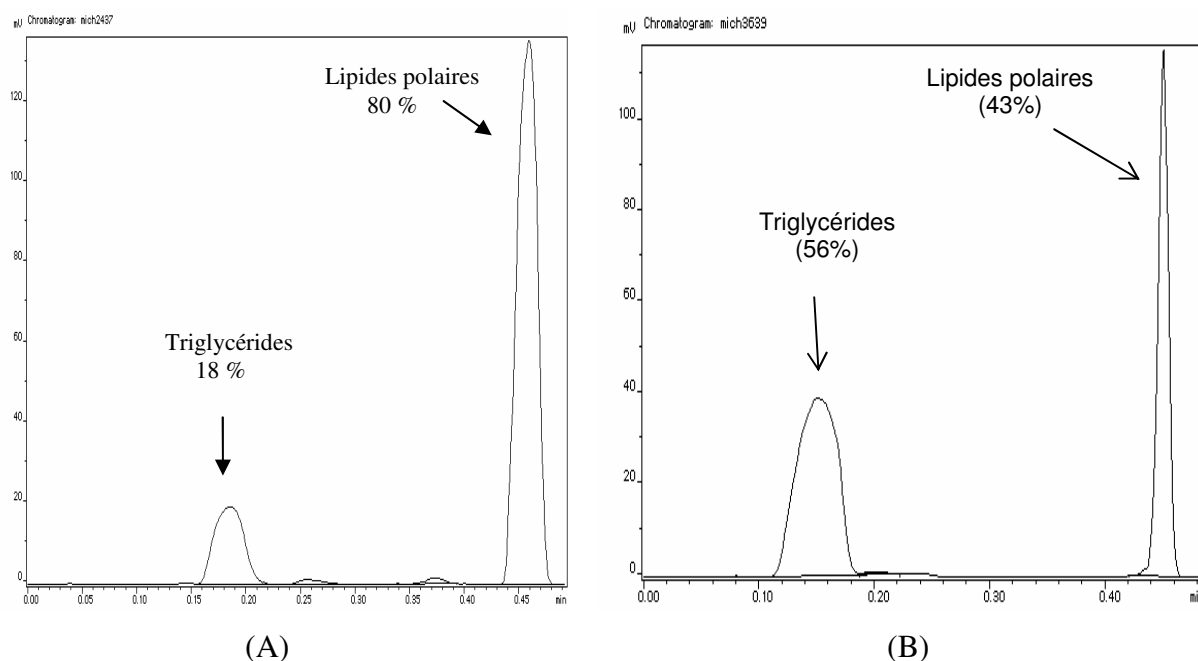


Figure IV.22. Analyse par CCM-DIF Iatroscan[®] des lipides émulsionnés passés sur filtre Milex[®] - HV 0,45 μm ; (A) lipides émulsionnés (Alcalase[®] 2,4 L) et (B) lipides émulsionnés (Neutrase[®] 0,8 L) dans un éluant hexane / éther diéthylique / acide formique (80 / 20 / 0,2 ; v / v / v)

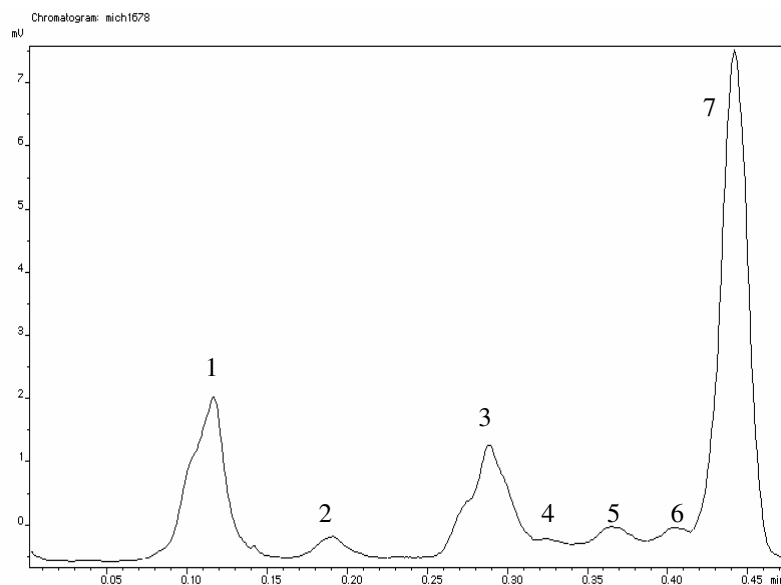


Figure IV.23. Séparation du pic de phospholipides de (A) dans un éluant chloroforme / méthanol / eau / ammoniac 25 % (47 / 20 / 2,5 / 0,28, v / v / v / v) ; les échantillons ont été dissous à raison de 5 mg / ml de mélange chloroforme / méthanol (2 / 1, v / v).

Tous les autres phospholipides des lipides émulsionnés (**Tableau IV.12**), notamment la sphingomyéline (pic 5), la lyso-phosphatidylcholine (pic 6), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) ont des proportions ne dépassant pas 3,7 %.

Il ressort de ces observations que dans la couche émulsionnée, les lipides polaires qui pourraient être des glycolipides entrent pour 52 % des lipides polaires totaux.

Tableau IV.12. Composition en phospholipides de la fraction de lipides émulsionnés lyophilisés filtrés et analysés par CCM-DIF Iatroscan®

Type de phospholipides	1 = PE	2 = PS	3 = PC	4 = PI	5 = SPM	6 = LPC	7= non identifié
Proportion (%) phospholipides totaux)	20,7 ± 1	2,5 ± 0,2	14,8 ± 0,3	2,1 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,2	52,2 ± 2
n = 5							

IV.3.3. Composition en acides gras des lipides

Le **Tableau IV.13** montre la composition en acides gras des différents échantillons lipidiques. Les profils d'acides gras sont semblables pour les trois échantillons, notamment les lipides totaux des têtes de saumon extraits par solvant (Bligh et Dyer), de la fraction d'huile et la fraction de lipides émulsionnés extraits par voie enzymatique, à l'exception de l'acide palmitique (C16:0) dont la proportion est un peu plus élevée (17,60 %) dans la fraction d'huile émulsionnée. Pour ces trois échantillons, les trois grands groupes d'acides gras peuvent être classés par ordre décroissant selon les proportions suivantes : acides gras monoinsaturés (AGMI) > acides gras polyinsaturés (AGPI) > acides gras saturés (AGS). Ce classement est en accord avec les observations de Aursand et *al.* (1994) et Peng et *al.* (2003) qui ont étudié différentes espèces de saumons.

L'huile des culots protéiques présente un profil d'acides gras sensiblement différent des trois autres fractions. Dans cette huile, l'acide docosahexaénoïque (DHA) est l'acide gras majoritaire, avec une proportion de 18,2 % des acides gras totaux identifiés. Les groupes d'acides gras suivent l'ordre décroissant : AGPI > AGMI > AGS. La richesse en AGPI (45,1 %) des huiles de culot, par rapport aux autres huiles, est en relation avec les proportions des classes de lipides, notamment les lipides polaires et les lipides neutres. Nous avons observé que les lipides polaires sont majoritaires (55 %) dans l'huile des culots protéiques.

Tableau IV.13. Composition en acides gras (% d'acides gras identifiés) des lipides totaux (méthode d'extraction par solvant), des fractions de lipides extraits après hydrolyse enzymatique (avec l'Alcalase® 2,4 L) et de l'huile des culots protéiques issu de l'hydrolyse enzymatique de tête de saumon.

Acide gras	Lipides totaux extraits par solvant (Bligh et Dyer)	Lipides extraits par voie enzymatique		Huile des culots protéiques
		Huile	lipides émulsionnés	
14 :0	5,33 ± 0,24	5,79 ± 0,74	6,07 ± 0,01	4,12 ± 0,28
16 :0	15,82 ± 0,66	15,98 ± 0,83	17,60 ± 0,3	16,28 ± 0,29
18 :0	3,50 ± 0,07	3,46 ± 0,01	3,35 ± 0,1	3,25 ± 0,02
16 :1n-7	7,00 ± 0,03	6,98 ± 0,33	7,42 ± 0,8	5,42 ± 0,35
18 :1n-7	3,85 ± 0,38	3,97 ± 0,18	4,39 ± 0,08	0,54 ± 0,07
18 :1n-9	17,35 ± 0,05	17,8 ± 0,35	17,25 ± 0,25	15,63 ± 0,82
20 :1n-9	6,52 ± 0,26	6,39 ± 0,22	6,22 ± 0,11	8,57 ± 0,26
22 :1n-11	5,19 ± 0,26	5,64 ± 0,32	5,15 ± 0,01	1,18 ± 0,05
18 :2n-6	6,46 ± 0,04	6,63 ± 0,22	6,36 ± 0,11	2,49 ± 0,03
20 :2n-6	0,55 ± 0,01	0,48 ± 0,07	0,51 ± 0,03	1,24 ± 0,09
20 :3n-6	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,1 ± 0,01	0,38 ± 0,04
20 :4n-6	0,59 ± 0,04	0,55 ± 0,01	0,66 ± 0,01	1,48 ± 0,16
18 :3n-3	0,37 ± 0,02	0,30 ± 0,07	0,14 ± 0,01	0,25 ± 0,03
18 :4n-3	1,84 ± 0,06	1,79 ± 0,03	1,67 ± 0,01	0,69 ± 0,13
20 :3n-3	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,03	8,07 ± 0,35
20 :4n-3	1,71 ± 0,11	1,57 ± 0,11	1,52 ± 0,01	1,32 ± 0,06
20 :5n-3 (EPA)	8,43 ± 0,18	7,74 ± 0,48	7,51 ± 0,19	8,19 ± 0,14
22 :5n-3	3,09 ± 0,22	2,75 ± 0,25	2,66 ± 0,01	2,84 ± 0,04
22 :6n-3 (DHA)	12,10 ± 0,64	11,9 ± 0,7	11,03 ± 0,01	18,18 ± 0,39
Σ saturés	24,65	25,23	27,28	23,64
Σ mono insaturés	39,92	40,78	40,42	31,34
Σ AGPI	35,42	34,02	32,30	45,13
Σ AGPI n-6	7,73	7,78	7,63	5,59
Σ AGPI n-3	27,69	26,24	24,67	39,04
n-3/n-6	3,58	3,17	3,23	6,98
DHA/EPA	1,44	1,54	1,47	2,16

Dans les fractions d'huile totale de tête (extraite par la méthode de Bligh et Dyer), d'huile (extraite par voie enzymatique) et d'huile émulsionnée, l'acide palmitique (C16:0) est l'acide gras majoritaire des acides gras saturés et représente 63 % des AGS identifiés. L'acide oléique (C18: 1n-9) est l'acide gras majoritaire des AGMI, avec une part de 43,5 % des AGMI identifiés.

Ces mêmes observations peuvent être formulées pour l'huile des culots protéiques où l'acide palmitique représente 69 % des acides gras saturés identifiés. Parmi les AGMI, l'acide oléique

est majoritaire, alors que nous observons une forte réduction des teneurs en C18: 1n-7 et C22: 1n-11 par rapport aux trois autres échantillons d'huile.

L'acide docosahexanoïque (DHA) et l'acide éicosapentaénoïque (EPA) sont majoritaires parmi les AGPI, avec des proportions respectives de 11 à 12 % et 7,5 à 8,43 % des acides gras totaux identifiés dans les lipides totaux extraits par solvant, dans l'huile extraite après hydrolyse enzymatique et dans les lipides émulsionnés extraits par voie enzymatique.

Dans l'huile des culots, on trouve une forte teneur en DHA (18,8 %), suivi de l'EPA (8,19 %) et une teneur élevée en C20: 3n-3 (8,07 %). L'acide gras C20: 3n-3 est à l'état de trace dans les trois autres échantillons.

Le rapport des acides gras n-3 / n-6 des lipides totaux de tête est environ de 3,6. Selon Henderson et Tocher (1987), le rapport n-3 / n-6 peut permettre de définir l'origine des poissons : les poissons des eaux douces présentent un rapport n-3 / n-6 de 1,08 à 3,3, alors que dans les poissons des eaux de mer, ce rapport va de 8,3 à 11,4.

Ce rapport n-3 / n-6 est plus élevé dans les huiles de culots protéiques où il atteint la valeur de 7.

Nous pouvons également remarquer que les huiles de tête de saumon sont riches en acides gras insaturés, à raison de 72 à 76 % des acides gras identifiés.

IV.3.4. Composition en acides gras des lipides polaires et des lipides neutres de l'huile des culots protéiques

Les lipides totaux des culots protéiques ont été fractionnés sur une colonne d'acide silicique. Pour vérifier la pureté des fractions de lipides neutres et de lipides polaires, une analyse par CCM DIF-Iatroscan[®] a été réalisée sur chaque fraction. Le résultat est présenté dans la **Figure IV.24**. Il apparaît que chaque fraction présente un pic majeur qui, dans le cas des lipides neutres, est constitué à 95 % d'un pic identifié comme des triacylglycérols. Dans les cas de la fraction de lipides polaires, nous n'observons aucune migration pour 97 % des constituants de l'échantillon dans l'éluant apolaire.

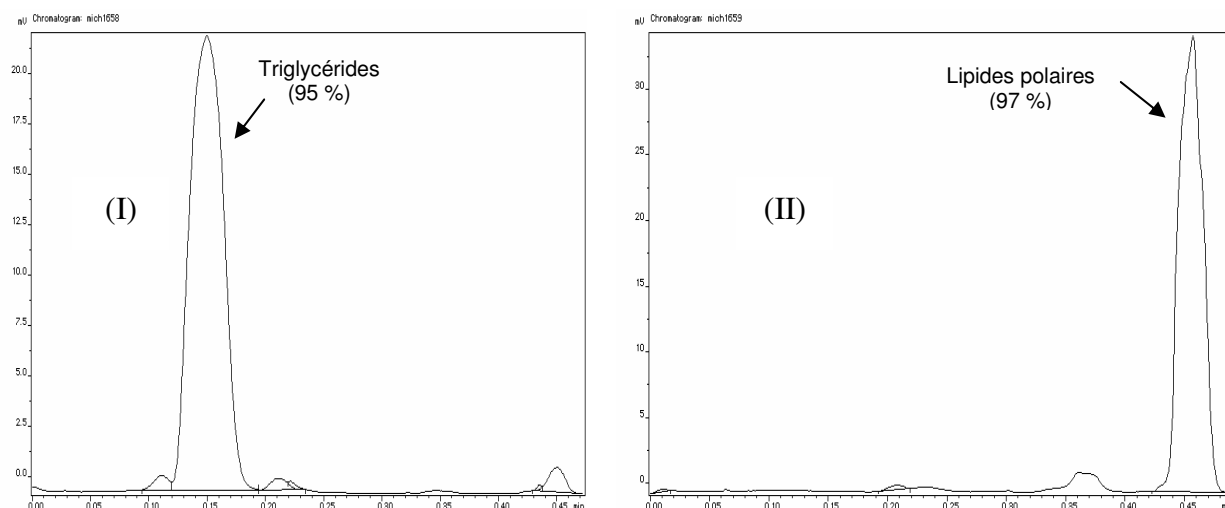


Figure IV.24. Analyse par CCM Iatroscan® des fractions de (I) lipides neutres et de (II) lipides polaires séparées sur une colonne d'acide silicique, éluant : hexane / éther diéthylique / acide formique (80 / 20 / 0,2 ; v / v / v).

La composition en acides gras des lipides polaires et des triacylglycérols (TG) des huiles des culots protéiques fractionnées sur colonne d'acide silicique est présentée dans le **Tableau IV.14**. Les profils d'acides gras des lipides polaires et des lipides neutres sont significativement différents. Seules les proportions de l'acide oléique (C18 :1n-9) dans les deux classes sont identiques (14 %). Même si dans les deux classes, les groupes d'acides gras peuvent être rangés dans l'ordre : AGPI > AGMI > AGS, dans les lipides polaires la proportion des AGPI est plus de deux fois plus élevée que la teneur en AGMI, alors que dans les triglycérides ces deux groupes sont sensiblement dans les mêmes proportions.

Nous observons que le DHA est l'acide gras largement majoritaire dans les lipides polaires avec une proportion de 33 %, loin devant l'acide oléique (14 %). La teneur en DHA (22:6 n-3) dans les lipides polaires est trois fois plus élevée que celle de l'EPA (20:5 n-3). Cette observation est en accord avec les observations d'autres auteurs comme Bandara *et al.* (1997) et Passi *et al.* (2002). Les AGPI représentent 56,7 % des acides gras identifiés dans les lipides polaires, dont 89 % sont des AGPI n-3.

Dans les triacylglycérols, l'acide palmitique et l'acide oléique sont majoritaires, représentant respectivement 15 % et 14 %. L'acide gras C20 :3n-3 est en proportion quatre fois plus élevée dans les triacylglycérols que dans les lipides polaires. Le rapport n-3 / n-6 est plus élevé dans les lipides polaires (8,60) que dans les triacylglycérols (5,73 %).

Tableau IV.14. Composition en acides gras (% des acides gras identifiés) des lipides polaires et des triacylglycérols issus des huiles des culots protéiques

Acide gras	Lipides polaires	Triacylglycérols
14 :0	1,59 ± 0,10	5,18 ± 0,01
16 :0	12,80 ± 0,06	15,00 ± 0,07
18 :0	4,90 ± 0,04	2,60 ± 0,01
16 :1n-7	3,20 ± 0,05	6,60 ± 0,01
18 :1n-7	0,60 ± 0,01	3,76 ± 0,10
18 :1n-9	14,13 ± 0,05	14,03 ± 0,20
20 :1n-9	4,46 ± 0,10	12,14 ± 0,07
22 :1n-11	1,68 ± 0,06	0,86 ± 0,03
18 :2n-6	1,50 ± 0,04	3,08 ± 0,02
20 :2n-6	0,82 ± 0,01	1,61 ± 0,03
20 :3n-6	0,35 ± 0,01	0,57 ± 0,01
20 :4n-6	3,19 ± 0,04	0,65 ± 0,02
18 :3n-3	0,34 ± 0,03	0,28 ± 0,06
18 :4n-3	0,59 ± 0,02	0,87 ± 0,01
20 :3n-3	3,01 ± 0,01	12,44 ± 0,13
20 :4n-3	1,08 ± 0,11	1,59 ± 0,21
20 :5n-3 (EPA)	10,31 ± 0,10	6,94 ± 0,20
22 :5n-3	2,83 ± 0,21	2,66 ± 0,10
22 :6n-3 (DHA)	33,10 ± 0,41	9,14 ± 0,2
Σ saturés	19,29	22,78
Σ mono-insaturés	24,00	37,39
Σ AGPI	56,71	39,83
Σ AGPI n-6	5,86	5,91
Σ AGPI n-3	50,44	33,88
n-3/n-6	8,60	5,73
DHA/EPA	3,34	1,33

IV.3.5. Analyse thermique différentielle des lipides

L'étude des propriétés thermiques des différentes huiles et des fractions de lipides a été réalisée par analyse thermique différentielle (DSC pour Differential Scanning Calorimetry). Cette analyse permet d'obtenir des informations sur les propriétés thermiques des huiles entre - 60 °C et + 60 °C. Ces informations sont nécessaires pour réaliser le fractionnement des huiles riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne sur la base des températures de fusion des molécules de lipides.

La **Figure IV.25** présente les profils thermiques de l'huile extraite par solvant organique et de l'huile extraite par voie enzymatique. On observe des thermogrammes superposables avec trois pics endothermiques principaux et un épaulement du pic centré entre -10 °C et 13 °C.

Cet épaulement est beaucoup plus marqué dans le cas de l'huile extraite après hydrolyse enzymatique.

L'huile extraite par solvant présente des pics de fusion à $-44,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, à $-16,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ et à $-10,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Figure IV.25 A**) et pour l'huile extraite par voie enzymatique, des pics de fusion à $-44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, à $-16,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-11,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Figure IV.25 B**). Il apparaît que ces deux huiles sont composées de molécules à bas point de fusion, caractéristiques des acylglycérols, avec une forte proportion d'acides gras polyinsaturés. Ces observations confirment les résultats obtenus par les analyses au CCM-Iatroscan[®] et par CPG, selon lesquelles les deux types d'huiles sont constituées de 97 % de triacylglycérols avec, en moyenne, 35 % d'AGPI et 40 % d'AGMI.

Les molécules qui ont une température de fusion entre $-44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-44,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ont une enthalpie de fusion (ΔH_f) relativement élevée, pratiquement identique pour l'huile extraite par voie enzymatique et pour l'huile extraite par solvant, respectivement $11,5\text{ J/g}$ et $10,9\text{ J/g}$.

Les molécules à température de fusion comprise entre $-16,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-16,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ présentent des enthalpies de fusion identiques et très faibles : $1,55\text{ J/g}$ pour l'huile "d'extraction enzymatique" et $2,3\text{ J/g}$ pour l'huile extraite par solvant. Les faibles différences de forme de ces pics ne seraient que des artefacts.

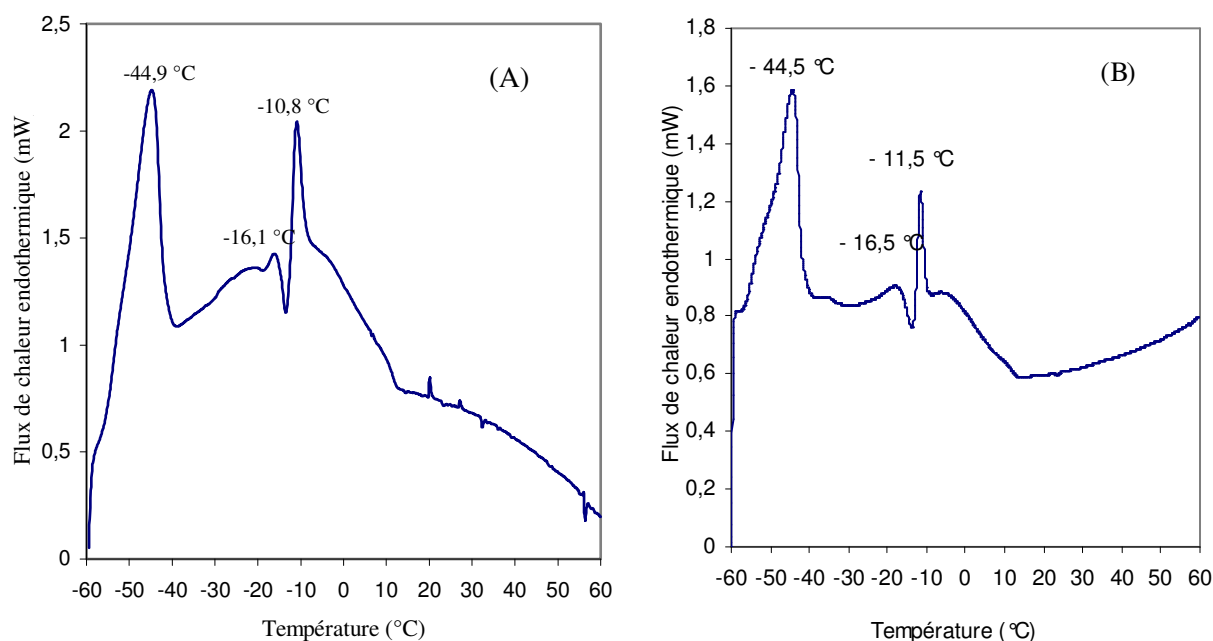


Figure IV.25. Thermogrammes d'huile de tête extraite (A) par solvant organique, (B) extraite par voie enzymatique. Analyse thermique différentielle : maintien 10 min à $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis chauffage jusqu'à $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$.

Cette similitude des propriétés thermiques des deux types d'huiles confirme que les deux méthodes d'extraction influencent peu la composition chimique.

Le profil thermique de l'huile des culots protéiques présenté sur la **Figure IV.26 C** est totalement différent des profils thermiques précédents. Nous observons un seul pic endothermique à -9,5 °C et dont la chaleur de fusion est élevée ($\Delta H_f = 22,8 \text{ J / g}$). Le thermogramme commence par une allure exothermique à -39 °C difficile à interpréter. Ce type d'allure est, selon Zaliha et ses collaborateurs (2004), dû à un changement polymorphique pendant le processus de fusion.

La structure très visqueuse des huiles des culots protéiques, due probablement à une teneur en phospholipides élevée, serait la cause d'un tel profil thermique. Une forte proportion d'acides gras polyinsaturés (45 %) (Réf. **Tableau IV.13**) est sous forme de phospholipides dont les points de fusion sont plus élevés que ceux des acylglycérols.

Le thermogramme de la couche de lipides émulsionnés issus de l'hydrolyse enzymatique (**Figure IV.27 D**) présente un pic à - 50,6 °C et une "allure" de pic à - 8,9 °C. Ce profil n'est pas caractéristique des lipides de la couche car le comportement thermique des molécules de lipides est influencé par les molécules peptidiques présentes dans la couche émulsionnée. Ces valeurs restent cependant indicatrices du comportement thermique de l'émulsion lipo-peptidique.

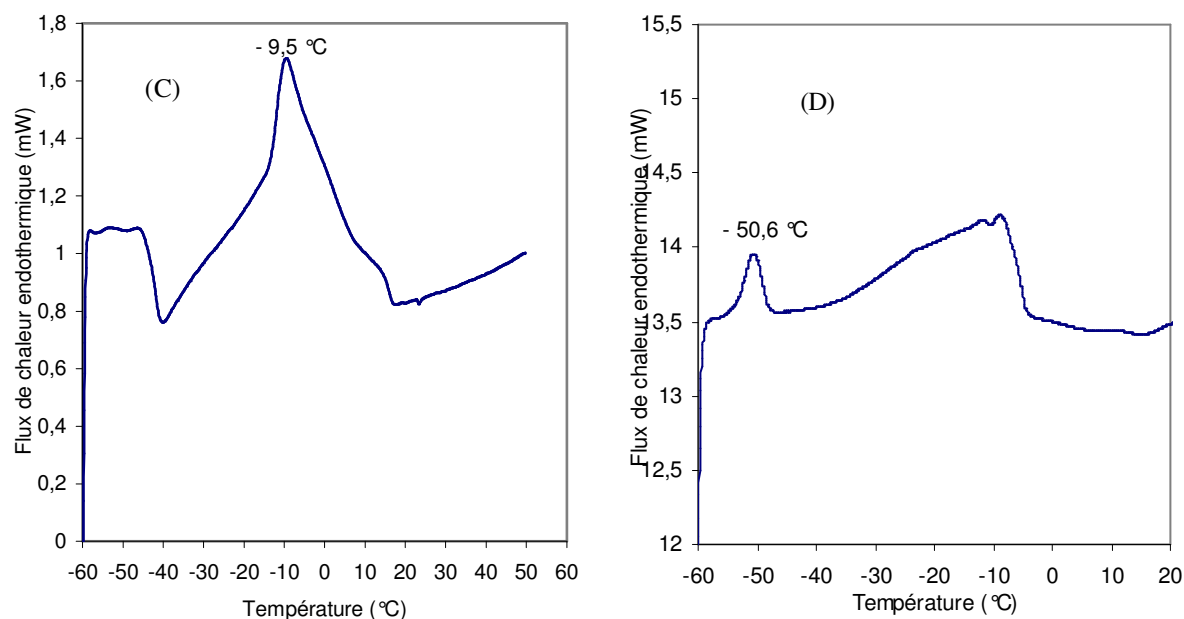


Figure IV.27. Thermogramme (C) d'huile extraite des culots protéiques enzymatiques, (D) de la fraction d'huile émulsionnée. Analyse thermique différentielle : maintien 10 min à -60 °C , puis chauffage jusqu'à $+60\text{ °C}$ à 5 °C / min .

Les lipides neutres obtenus par fractionnement des huiles des culots protéiques ont été aussi analysés par DSC (**Figure IV.28 E**). Le profil thermique est très semblable avec les profils thermiques des lipides totaux extraits par solvant et par voie enzymatique. On observe dans ce cas une meilleure résolution du pic centré à $-0,94\text{ °C}$; ce pic était sous forme d'un épaulement dans les lipides totaux de tête.

Ce profil thermique est caractéristique des acylglycérols à bas points de fusion avec les couples température de fusion T_f ; chaleur de fusion ΔH_f de $-44,6\text{ °C}$ et $11,8\text{ J / g}$, $-20,6\text{ °C}$ et $6,6\text{ J / g}$; $-11,6\text{ °C}$ et $1,75\text{ J / g}$; $0,9\text{ °C}$ et $6,5\text{ J / g}$.

Les lipides polaires issus du fractionnement des huiles des culots présentent un thermogramme avec de faibles changements entre -60 °C et $+60\text{ °C}$ (**Figure IV.28 F**). Avec un seul pic de fusion centré à -15 °C et une faible chaleur de fusion ($2,12\text{ J / g}$), l'échantillon ne semble avoir subi qu'une fusion partielle des constituants. Une augmentation de la température jusqu'à 100 °C n'entraîne pas de changement notable sur le thermogramme.

La fraction de lipides polaires se présente sous un aspect très visqueux, voire solide, probablement à cause de la richesse en phosphore.

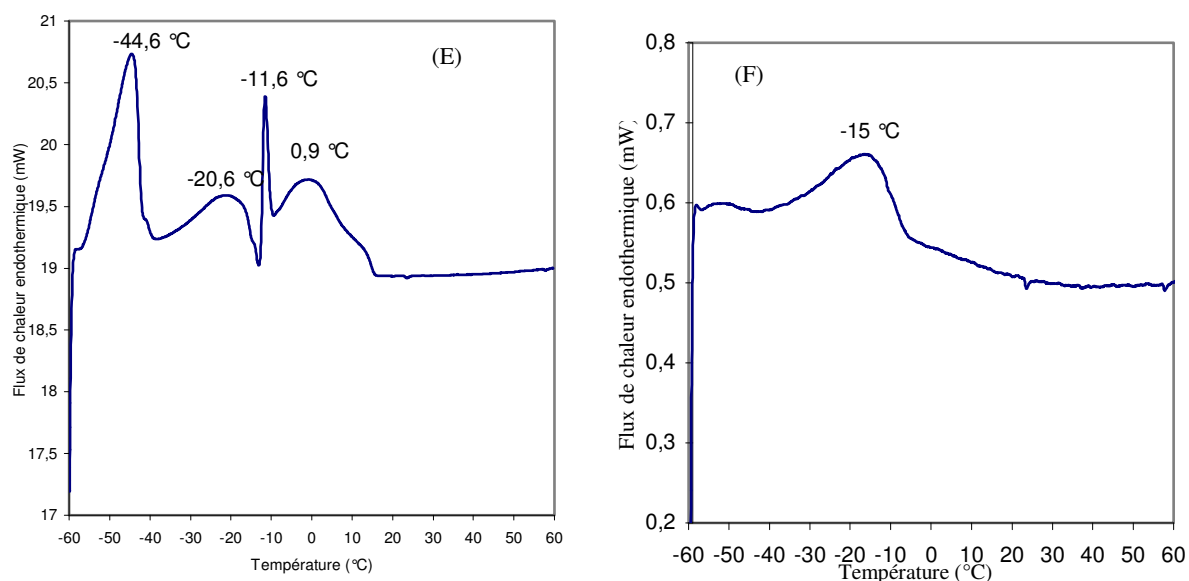


Figure IV.28. Thermogramme de (E) lipides neutres et de (F) lipides polaires issus du fractionnement de l'huile des culots protéiques. Analyse thermique différentielle : maintien 10 min à - 60 °C, puis chauffage jusqu'à + 60 °C à 5 °C / min.

IV.3.6. Conclusion

Il ressort de cette étude que l'extraction d'huile, conséquence de l'hydrolyse enzymatique réalisée particulièrement avec l'Alcalase[®] 2,4 L donne un bon taux d'extraction (19,6 %), très proche de l'extraction par solvants organiques (21,5 %). Les deux types d'huiles possèdent des caractéristiques chimiques et physiques similaires, qu'il s'agisse de la composition en acides gras, de la composition en classes de lipides et des thermogrammes de fusion.

Les culots protéiques issus de l'hydrolyse enzymatique contiennent des lipides riches en lécithine de poisson (55 %) et en acides gras polyinsaturés en n-3 tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide éicosapentaénoïque (EPA).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La valorisation des co-produits dans l'industrie halieutique représente un enjeu économique et géopolitique très important. La quantité très élevée de co-produits générés, estimée à 50 % ces dernières années, est une source potentielle incontournable de protéines et de lipides.

Cette étude menée partiellement dans le cadre d'un programme de l'office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture (OFIMER) avait pour objectif de mieux valoriser les co-produits de saumon, afin de favoriser leur utilisation dans l'alimentation humaine.

Nous avons choisi la valorisation par voie enzymatique. L'hydrolyse enzymatique est une technique douce qui a conduit à la déstructuration et la solubilisation des protéines de têtes de saumon (*Salmo salar*) et à la libération de l'huile.

Dans la première partie, qui a été consacrée à la fraction protéique, nous avons réalisé une planification expérimentale de la protéolyse avec l'Alcalase[®] 2,4 L, afin d'optimiser les conditions d'extraction. Ainsi, les facteurs influents tels que la température (T °C), le pH et le rapport concentration d'enzyme / concentration de protéines (E / S), ont été étudiés pour leurs interactions et leurs effets sur le rendement protéique, le degré d'hydrolyse (DH) et donc sur les propriétés fonctionnelles qui en résultent.

Avec la planification expérimentale, des rendements d'extraction protéique variant entre 47,7 % et 71 % liés à des degrés d'hydrolyses compris entre DH 10,8 % et 17,3 %, des hydrolysats protéiques déshuilés (moins de 1 % de lipides) à teneur moyenne en protéines de 82 % ont été obtenus.

Les modèles quadratiques générés à partir d'une matrice de Doehlert ont montré que les paramètres de contrôle (T °C, rapport E / S, pH) ont une influence significative sur le DH et le rendement protéique. L'étude des surfaces de réponses à partir des modèles polynomiaux quadratiques a permis de visualiser et d'optimiser les niveaux des variables pour obtenir des hydrolysats protéiques selon l'objectif recherché. Elle permet de prédire les conditions pour contrôler le degré d'hydrolyse et de produire des hydrolysats à DH faible (ne présentant pas d'amertume).

Par exemple, avec l'hydrolyse assistée à l'Alcalase[®] 2,4 L, pour produire des hydrolysats à DH 12 % tout en maximisant le rendement protéique, un compromis peut être trouvé entres

les paramètres : E/S compris entre 3,3 à 5 %, le pH entre 7,5 à 8,0 et la température entre 55 et 60 °C.

Les propriétés fonctionnelles étudiées avec quatre types d'hydrolysats (DH 11,5 % ; 12,5 % ; 14,3 % et 17,3 %) varient avec le degré d'hydrolyse. Les hydrolysats possèdent un indice de solubilité supérieur à 75 % sur une large gamme de pH (3 - 11) et qui augmente avec le degré d'hydrolyse. La capacité émulsifiante et la capacité d'absorption d'huile varient en raison inverse de la protéolyse.

La deuxième partie concernant l'extraction de l'huile après hydrolyse a été mise en œuvre avec différentes protéases (Alcalase® 2.4 L, Neutrase® 0.8 L et Protamex™). Nous avons observé que le taux d'extraction d'huile est meilleur avec l'Alcalase® 2.4 L à raison de 19,6 %, alors que la Neutrase® 0.8 L et la Protamex™ ne parviennent à extraire que 14,5 % d'huile par rapport à la matière fraîche initiale traitée.

La comparaison de l'extraction assistée à l'Alcalase® 2.4 L avec les méthodes d'extraction par solvant et la méthode de cuisson, a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre la méthode enzymatique et les méthodes par solvant en termes de rendement d'extraction d'huile.

Les mêmes similitudes ont été observées pour ces deux méthodes en ce qui concerne les caractéristiques chimiques et physiques des huiles extraites.

Les deux types d'huiles ont, par exemple, des compositions en classes de lipides semblables (97 % de lipides neutres et 2 à 3 % de lipides polaires), des compositions en acides gras similaires (35 % d'acides gras polyinsaturés en n-3 à longue chaînes, 39 % d'acides gras monoinsaturés et 25 % d'acides gras saturés). Les taux de l'acide docosahexaénoïque (DHA) et de l'acide éicosapentaénoïque (EPA) sont respectivement de 12 % et de 8 %.

Les thermogrammes des deux huiles sont aussi superposables.

L'un des points d'intérêt de cette partie du travail porte sur les caractéristiques physiques et chimiques des fractions dérivées de l'hydrolyse enzymatique issues de la séparation par centrifugation du milieu réactionnel. Il s'agit de la fraction émulsionnée intermédiaire à l'interface huile / phase aqueuse protéique et des culots protéiques insolubles recueillis dans le fond des pots de centrifugation.

Les culots protéiques renferment environ 80 % de protéines et une teneur en lipides pouvant atteindre 30 % par rapport au poids sec. Dans la littérature, ces culots protéiques, qui renferment en grande partie des protéines insolubles faiblement hydrolysées, ont presque

toujours été considérées comme des sous-produits, voire de véritables déchets, et sont donc non exploitées. Les résultats des analyses menées sur ces fractions montrent à quel point celles-ci sont intéressantes à valoriser.

Les lipides contenus dans ces culots protéiques contiennent une forte teneur en lipides polaires (55 à 60 %), dont la phosphatidylcholine qui représente 55 % des phospholipides, loin devant la phosphatidyléthanolamine (14 %).

Cette huile est riche en acides gras polyinsaturés en n-3, principalement le DHA et l'EPA qui représentent respectivement 18 % et 8 % des acides gras identifiés.

Les lipides polaires fractionnés sur colonne d'acide silicique présentent un enrichissement en DHA jusqu'à 33 %.

En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques, les culots protéiques issus de la protéolyse constituent ce l'on peut appeler un « complexe phospho-lipo-protéique » riche en AGPI n-3.

La fraction émulsionnée à l'interface l'huile / phase aqueuse présente des teneurs en lipides et en peptides variables, dépendant de la technique de séparation, de l'enzyme et du DH.

La composition en acides gras est comparable à celle de l'huile neutre (extraction enzymatique). Les lipides qu'elle contient ont une faible teneur en phospholipides. Plus de la moitié des lipides polaires pourraient être des glycolipides.

Il ressort de cette étude que les têtes de saumon (*Salmo salar*) représentent une véritable source de nutriments protéiques et lipidiques que l'hydrolyse enzymatique a permis de révéler. Toutes les fractions issues de l'hydrolyse enzymatique possèdent un atout sur le plan nutritionnel lié à leurs caractéristiques physiques et chimiques.

Cette technique d'extraction a révélé qu'un taux important de lécithine de poisson et de DHA se retrouvent dans la fraction protéique insoluble issue de la protéolyse.

Ce travail reste cependant préliminaire et ouvre des perspectives diverses qui devrait intéresser autant la méthode d'hydrolyse enzymatique que le devenir des fractions protéiques et lipidiques qui en sont issues en termes de valeur ajoutée.

Concernant l'hydrolyse enzymatique, il serait intéressant d'étudier l'influence des conditions opératoires, la nature de l'enzyme et le degré d'hydrolyse sur la composition physico-chimiques, sur les fractions dérivées telles que la fraction émulsionnée et les culots protéiques.

L'amélioration du rendement d'extraction d'huile pourrait être obtenue en jouant sur les paramètres de centrifugation, ainsi que sur l'addition de molécules susceptibles de déstabiliser les émulsions (sels, sucres, acide phosphorique).

Dans cette étude, l'attention a été plus portée sur la composition lipidique des fractions dérivées, une étude beaucoup plus poussée permettrait de maîtriser la nature des peptides engagés dans les liaisons lipo-peptidiques.

Ainsi, la mise en œuvre des émulsions huile-hydrolysats peptidiques stabilisées par des lipides polaires riches en AGPI n-3 pourrait s'effectuer dans le cadre d'une formulation alimentaire.

La structure visqueuse des huiles de culots protéiques pourrait favoriser leurs propriétés liantes, tant recherchées dans les préparations de plats cuisinés à base de poisson, en substitution des ingrédients non marins apportés dans les formulations industrielles.

Dans le domaine plus spécifique de la nutraceutique, il serait aussi intéressant de mettre en place une technique de purification de la lécithine de poisson. Cette technique pourrait se baser sur le principe de la chromatographie liquide préparative à basse pression.

Enfin, l'étude du potentiel nutritionnel et de la biodisponibilité des phospholipides riches en acides gras polyinsaturés en n-3 et à longues chaînes pourrait présenter un grand intérêt, notamment dans la prévention des maladies neurodégénératives, pour lesquelles ils semblent démontrer une efficacité de plus en plus certaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achouri A, Wang Z, Xu S. 1998. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food Res. Intern.*, 31 (9) : 617-623.
- Ackman RG, Ratnayak WMN, Olsson B. 1988. The basic fatty acids composition of atlantic fish oils: potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation, *JAOCs*, 65 : 136-138.
- Ackman RG. 1994. Seafood lipid. In: *Seafood Chemistry, Processing Technology and Quality*. Shahidi F and Botta JR, Blackie Acad. and Professional, NY. 34-48.
- Ackman RG. 1999. Docosahexaenoic acid in the infant and its mother. *Lipids*, 34 : 125-128.
- Ackman RG, Parazo MP, Lall SP. 1997. Impact of dietary peroxides and tocopherols on fillet flavour of farmed Atlantic salmon. In: *Flavour and Lipid Chemistry of Seafoods*, chap. 14. pp 148-165. Eds F. Shahidi and K. R. Cadwallader.
- Ackman RG. 1994. Animal and marine lipids. In: *Technological advances in improved and alternative source of lipids*. B. S. Kamel and Y. Kakuda. Blackie Eds., Academic, Professional, 292-328.
- Adler-Nissen J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.*, 24 : 1090-1093.
- Adler-Nissen J, Olsen SH. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *ACS Symposium Series*, 92 : 125-146.
- Adler-Nissen J. 1982. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32 : 138-156.
- Adler-Nissen J, Eriksen S, Olsen HS. 1983. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qual. Plant Foods Hum. Nutr.*, 32 : 411-423.
- Adler-Nissen J. 1986. *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publisher. London and New York.
- Aidos IKN, Boonman M, Luten JB, Boom RM, Van Der PA. 2003. Influence of production parameters on fish oil quality in a pilot plant. *J. of Food Sci.*, 68 (2) : 581-587.
- Aitken A, Lees A, Smith JGM. 1984. Measuring fish composition. *Torry Advisory Note*, 89, p 11.

- Amarowicz R, Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem.*, 58 (4) : 355-359.
- Ando Y, Ota T, Matsuhira Y, Yazawa K. 1996. Stereospecific analysis of triacyl-*sn*-glycerols in docosahexaenoic acid-rich fish oils. *JAOCS*, 73 : 483-487.
- Andrieux G. 2003. La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture : Etat des lieux et analyse. DESS Exploitation des Ressources Vivantes Côtières. Université de Caen. Pp 62, OFIMER.
- Aursand M, Bleivik B, Rainuzzo JR. 1994. Lipid distribution and composition of commercially farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Sci Food Agric*, 64 : 239-248.
- Aursand M, Mabon F, Martin GJ. 2000. Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *JAOCS*, 77 : 659-666.
- AOAC, Official Methods of Analysis. 1990. 15th Ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC.
- AOAC, Official Methods of Analysis. 1997. 15th Ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC international, 16th Ed. 1999.
- Aspmo SI, Horn SJ, Eijssink VG. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem.*, 40 : 1957-1966.
- Bandara NM, Batista I, Nunes ML, Empis JM, Christie WW. 1997. Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Food Sci.*, 62 : 40-42.
- Banerjee D, Pal D, Patra TK, Mistra S, Amitabha G. 1997. Lipids and fatty acids of air breathing fish (*Boleophthalmus boddarti*). *Food Chem.*, 60 (3) : 303-309.
- Bang H, Dyerberg J. 1972. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic West Coast Eskimos. *Acta Med. Scand.*, 192 : 85-94.
- Barlow SM. 2003. Fish meal. *In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. pp. 2486-2490. Edts. B. Caballero, L. C. Trugo, P. M. Finglas. Academic Press.
- Bejosano FP, Corke H. 1999. Properties of protein concentrates and hydrolysates from *Amaranthus* and buckwheat. *Industrial Corps and Products*, 10 : 175-183.
- Benjakul S, Morrissey M. 1997. Protein hydrolysates from whiting solid wastes. *J. Agric. Food Chem.*, 45 : 3423-3430.
- Blecker C, Paquot M, Lamberti I, Sensidoni I. 1997. Improved emulsifying and foaming of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *J. Food Sci.*, 62 (1) : 48-52.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J. of Biochem. and Physiol.*, 37 : 911-917.

- Body DR, Vlieg P. 1989. Distribution of the lipids classes and eicosapentaenoic (20:5 n-3), docosahexaenoic (22:6 n-3) acids in different sites in blue mackerel (*Scomber australasicus*) fillets. J. Food Sci., 54 : 569-572.
- Bouchez P. Animaux marins. 1992. In: Manuel des corps gras. A. Karleskind, Ed. Londres Tec., Doc., 782-787
- Bourre JM. 1996. Développement du cerveau et des acides gras polyinsaturés. OCL, 3 : 173-177.
- Breivik H, Haraldsson GG, Kristinsson B. 1997. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. JAOCS, 74 (11) : 1425-1429.
- Burr GO, Burr MM. 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. J. Biol. Chem., 82 : 345-367.
- Carter CG, Hauler RC. 2001. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 185 : 299-311.
- Chajès V, Cognault S, Maillard V. 2000. Acide alpha-linolénique, anti-oxydants et croissance tumorale mammaire. OCL, 7 (1) : 65-67.
- Chantachum S, Benjakul S, Sriwirat N. 2000. Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. Food Chem., 69 : 289-294.
- Cheftel C. 1972. Solubilisation enzymatique continue du concentré protéique de poisson. Essai de recyclage des enzymes. Ann. Technol. Agric., 21 (3) : 423-433.
- Cheftel C, Micheal A, Wang DIC, Tannenbaum SR. 1971. Enzymatic solubilisation of fish protein concentrate : batch studies applicable to continuous enzyme recycling process. J. Agr. Food Chem., 19 (1) : 155-161.
- Chen WJ, Yeh SL. 2003. Effects of fish oil in parenteral nutrition. Nutrition, 19 : 275-279.
- Chobert JM, Bertrand-Harb C, Nicolas MG. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. J. Agric. Food Chem., 36 : 883-892.
- Christie WW. 1982. Lipids analysis, 2nd Edn. Pergamon Press, Oxford
- Clemente A, Vioque J, Sanchez-Vioque R., Pedroche J. 1999. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. Food Chem., 67 : 269-274.
- Corraze G, Kaushik S. 1999. Les lipides des poissons marins et d'eau douce. OCL, 6 (1) : 111-115.
- Cremades O, Parrado J, Alvarez OMC, Jover M. 2003. Isolation and characterization of carotenoproteins from crayfish (*Procambarus clarkii*). Food Chem., 1-8.

- Crowther JB, Booth BH, Blackwell DD. 2000. Procédé de production d'une huile de poisson de qualité alimentaire. Brevet WO/00/042535.
- Dacosta Y. 2004. Les acides gras omega-3. Synthèse des connaissances actuelles. Eds. Y. Dacosta. p 313.
- De Shreijver R, Vermeulen D. 1991. Separation and quantitation of phospholipids in animal tissues by Iatroscan TLC/FID. *Lipids*, 26 (1) : 74-76.
- Dyerberg J, Bang HO, Hjerne N. 1975. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.*, 958-966.
- Diniz FM, Martin AM. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 31 : 419-426.
- Diniz FM, Martin AM. 1997. Effect of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 30 : 266-272.
- Doehlert DH. 1970. Uniform Shell design. *Appl. Stat.*, 19 : 231-239.
- Drago SR, Gonzalez RJ. 2001. Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innovative food science & Emerging Technology*, 1 : 269-273.
- Dubrow DL, Kramer A, McPhee AD. 1973. Effect of temperature on lipid extraction and functional properties of fish protein concentrate (FPC). *J. Food Sci.*, 38 : 1012-1015.
- Dzondo GM, Nzikou JM, Etoumoungou A, Linder M, Desobry S. 2004. Encapsulation and storage of pulpe oil in 6DE maltodextrins. *Process Biochem.*, 40 (1) : 265-271.
- El-Adawy TA. 2000. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chem.*, 70 : 83-91.
- El-Sayed MM, Ezzat AA, Kandeel KM, Shaban FA. 1984. Biochemical studies on the lipid content of *Tilapia nilotica* and *Saprus auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79 B (4) : 589-594.
- Fanni J. 1977. Importance de la contribution de la flore fongique dans l'accumulation du calcium et du phosphore à la surface d'un fromage à pâte molle de type Camembert. Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France.
- Fidantsi A, Doxastakis G. 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B*, 21 : 119-124.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal sources. *J. Biol. Chem.*, 226 : 497-509.
- Finch R. 1977. Whatever happened to fish protein concentrate ? *Food Technol.*, 31 (5) : 44-53.

- Frost GM. 1986. Commercial production of enzymes. Chap. 3. pp. 57-67. *In* : Development in food production proteins - 4. (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science, London.
- Frost GM. 1992. Applications of enzymes in food. Chap. 10. pp. 307-362. *In*: Biochemistry of food proteins. (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science, London.
- Ganga A, Nieto S, Sanhuez J, Romo C, Speisky H, Valenzuela A. 1998. Concentration and stabilization of n-3 polyunsaturated fatty acids from sardine oil. *JAOCS*, 75 : 733-736.
- Gamez-Meza N, Noriega-Rodriguez JA, Medina-Juarez LA. 2003. Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Res. Intern.*, 36 : 721-727.
- Geurden I, Radünz NJ, Bergot P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 131 : 303-314.
- Geurden I, Bergot P, Karla VR, Sorgeloos P. 1999. Phospholipids composition of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae starved or fed different phospholipids classes. *Aquaculture*, 171 : 93-107.
- Gilberg A, Arnesen JA, Carlehög M. 2002. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.*, 38 : 475-480.
- Gildberg A, Batista I, Strom E. 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by two-step enzymic hydrolysis of whole fish. *Biotech. Appl. Biochem.*, 11 : 413-423.
- Gonzalez MJ. 1995. Dietary fat, fish oil and tumor growth: a perspective. *J. Optimal Nutrition*, 4 : 5-8.
- Guerard F, Dufossé L, De la Broise D, Binet A. 2001. Enzymatic hydrolysis of protein from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) wastes using Alcalase. *J. of Molecular Catalysis. B : Enzymatic*, 11 : 1051-1059.
- Guerard F, Guimas L, Binet A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, 19-20 : 489-498.
- Gunnlaugsdottir H, Ackman RG. 1993. Three extraction methods for determination of lipids in fish meal: Evaluation of a hexane/Isopropanol method as an alternative to chloroform-based methods. *J. Sci. Agric.*, 61 : 235-240.
- Hale MB. 1969. Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein. *Food Technol.*, 23 : 107-110.
- Haque ZU, Mozaffar Z. 1992. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocolloids*, 5 : 559-579.

- Hardy RW. 1996. Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Animal Feed Sci. and Technol.*, 59 : 71-80.
- Hartvigsen MS, Mu H, Hoy CE. 2003. Influence of maternal dietary n-3 fatty acids on breast milk and liver lipids of rat dams and offspring – a preliminary study. *Nutrition Research*, 23 : 747-760.
- Hazel JR. 1985. Determination of the phospholipids composition of trout gill by Iatroscan TLC/FID: Effet of thermal acclimation. *Lipids*, 20 : 516-520.
- Heinzelmann K, Franke K, Jensen B, Haahr A. 2000. Protection of fish from oxidation by microencapsulation using freeze-drying techniques. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 114-121.
- Henderson RJ, Tocher DR. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progr. Lipid Res.*, 26 : 282-347.
- Henderson JR, Bell GJ, Park MT. 1996 a. Polyunsaturated fatty acid composition of the salmon (*Salmo salar* L.) pineal organ: modification by diet and effect on prostaglandin production. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1299 : 289-298.
- Henderson RJ, Tillmans MM, Sargent JR. 1996 b. The lipid composition of two species serrasalmid fish in relation to dietary polyunsaturated fatty acids. *J. of Fish Biology*, 48 : 522-538.
- Hidajat K, Ching CB, Rao MS. 1995. Preparative-scale liquid chromatographic separation of ω -3 fatty acids from fish oil sources. *J. of Chromatography A*, 702 : 215-221.
- Honeycutt ME, McFarland VA, McCant DD. 1995. Comparison of three lipid extraction methods for fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55 : 469-472.
- Hoyle N, Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. of Food Sci.*, 59 (1) : 76-79.
- Huda N, Abdullah A, Badji SA. 2001. Functional properties of surimi powder from three Malaysian marine fish. *International J. of Food Sci. and Technol.*, 36 : 401-406.
- Jacobsen F, Ole LR. 1983 Energy-savings through enzymatic treatment of stickwater in the fish meal industry. Novo industry A/S.
- Jacobsen F. 1984. Effect of enzymatic treatment of stickwater on evaporator capacity and fouling. Novo industry A/S.
- Jeon YJ, Heek-GB, Kim Sk. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochem.*, 35 : 471-478.
- Karamac M, Amarowicz R, Henryk K. 2002. Effect of temperature and enzyme / substrat ratio on the hydrolysis of pea protein isolates by trypsin. *J. of Food Sci.*, 20 (1) : 1-5.

- Kates M. 1986. Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids. Elsevier, New York.
- Katikou P, Hughes SI, Robb DHF. 2001. Lipid distribution within Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fillets. Aquaculture, 202 : 89-99.
- Kato A, Fujishige T, Matsudomi N, Kobayashi KK. 1985. Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. J. of Food Sci., 50 : 56-58.
- Kato A, Komatsu K, Fujimoto K, Kobayashi K. 1985. Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by protease susceptibility. J. Agric. Food Chem., 33 : 931-934.
- Kinsella JE. 1976. Functional properties of proteins in foods: a survey. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 8 (4) : 219-280.
- Koka R, Weimer CB. 2000. Investigation of the ability of purified protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98 to hydrolyze bitter peptides from cheese. International Dairy Journal, 10: 75-79.
- Kolkovski S. 2001. Digestive enzymes of fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. Aquaculture, 200 : 181-201.
- Kozlova TA, Kotimchenko SV. 2000. Lipids and fatty acids of two pelagic cottoid fishes (*Comephorus* spp.) endemic to Lake Baikal. Comp. Biochem. and Physiol., Part B 126 : 477-485.
- Krause WGA, Seiler M. 1992. Hydrolysis of casein and casein components by acid proteases with milk clotting properties-kinetic investigations. pp. 87-92. In : Food Proteins. Structures and functionality. (Eds.) K.D. Shwenke and R. Mothes. New York.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000 a. Fish protein hydrolysates : production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40 (1) : 43-81.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000 b. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. J. Agric. Food Chem., 48 : 657-666.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000 c. Kinetic of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protein. Process Biochem., 36 : 131-139.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000 d. Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from Atlantic salmon (*Salmo salar*) pyloric caeca. J. of Food Biochem., 24 : 177-187.

- Lagarde M, Vericel E. 2004. Effets et métabolismes spécifiques des acides gras ω 3. OCL, 11 (1) : 55-57.
- Langmyhr E. 1981. Enzymatic hydrolysis of fish protein. Dissertation Abstract International, C 43 (4), p 758.
- Leaf A, Xiao YF, Kang XK, Billman G. 2003. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacology & Therapeutics*, 98 : 355-377.
- Lecerf JM, Borgiès B. 2002. Effets de l'huile de soja sur les lipoprotéines plasmatiques et le risque cardiovasculaire chez l'homme et la femme. OCL, 9 (2-3) : 97-99.
- Lee DKP, Warthesen JJ. 1996. Preparative methods of isolating bitter peptides from cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 44 : 1058-1063.
- Lee TK, Foglia TA. 2001. Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil: characterization of triacylglycerol fractions. *JAACS*, 78 : 297-303.
- Legrand P. 2004. Comment augmenter l'apport nutritionnel en acides gras n-3. OCL, 1 (11) : 50-54.
- Liaset B, Espe M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry ; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 80 : 581-589.
- Liaset B, Julshamm K, Epse M. 2003. Chemical composition and theoretical nutrition evaluation of produced fraction from enzymic hydrolysis of salmon frames with ProtamexTM. *Process Biochem.*, 38 (12) : 1747-1759.
- Liceaga GAM., Li-chan ECY. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Food Chem. and Toxicol.*, 64 (6) : 1000-1004.
- Lin CC, Lin SS, Hwang LS. 1995. Microencapsulation of Squid oil with hydrophilic macromolecules for oxidative and thermal stabilization. *J. of Food Sci.*, 60 (1) : 36-39.
- Linder M. 2003. Les acides gras polyinsaturés : Des sources aux procédés d'extraction pour une meilleure maîtrise nutritionnelle. HDR, pp 150.
- Linder M, Fanni J, Parmentier M. 1996. Functional properties of veal bone hydrolysates. *J. of Food Sci.*, 61 : 712-716.
- Linder M, Fanni J, Parmentier M. 2001. Enzyme-catalysed enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids of salmon oil: optimisation of reaction conditions. OCL, 8 (1) : 73-77.
- Linder M, Matouba E, Fanni J, Parmentier M. 2002. n-3 PUFA enrichment of salmon oil as obtained by lipolysis, filtration and enzymatic re-esterification. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 8 (104) : 455-462.

- Liu KKM, Barrows FT, Hardy RW, Dong FM. 2004. Body composition, growth performance, and product quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing poultry fat, soybean/corn lecithin, menhaden oil. *Aquaculture*, 238 : 309-328.
- Mackie IM. 1982. Fish protein hydrolysates. *Process Biochem.*, 17 (1) : 26
- Maehashi K., Matsuzaki M, Yamamoto Y, Udaka S. 1999. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysates of food proteins and characterization of their taste properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (3) : 555-559.
- Mahajan A, Dua S. 1998. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var. *toria*) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. *Food Hydrocolloids*, 12 : 349-355.
- Manirakiza P, Covaci A. 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Rose-Gottlieb, Bligh and Dyer & modified Bligh and Dyer extraction methods. *J. of Food Composition and Analysis*, 14 : 93-100.
- Marquez C, Fernandez V. 1998. Significant process variable in enzymatic hydrolysis of vegetable Protein. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 37 : 1223-1235.
- Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. 1992. Laboratoires des Prospectives Réactionnelles et d'Analyse de l'Information (LPRAI). Université d'Aix-Marseille. NEMROD® : New Efficient Methodology for Research using Optimal Design.
- Mendy F. 1995. Acides gras polyinsaturés (AGPI) et premières années. *OCL*, 2 (1) : 37-45.
- Mesa MD, Buckley R, Minithane AM, Yaqoob P. 2004. Effect of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxydizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 175 : 333-343.
- Meyer-RVB, Pyle CA. 1980. Fatty acid analysis of lens and retina of two Antarctic fish and of head and body of the Antarctic amphipod *Orchomenes plebs*. *Comp. Chem. Physiol.*, 65 B : 395-398.
- Miller R, Groninger HS. 1976. Functional properties of enzyme-modified acylated fish protein derivatives. *J. of Food Sci.*, 41 : 268-272.
- Moffat CF, McGill AS, Hardy R, Anderson RS. 1993. The production of fish oils enriched in polyunsaturated fatty acid containing triglycerides. *JAOCS*, 70 : 133-138.
- Mohr V. 1980. Enzymes Technology in meat and fish industries. *Process Biochem.*, August/September, 32 : 18-21.
- Moore SR, McNeill GP. 1996. Production of triglycerides enriched in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil. *JAOCS*, 73 (11) : 1409-1414.

- Moreno MCM, Cuadrado VF. 1993. Fernandez. Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and kinetics. *Process Biochem.*, 481-490.
- Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB. 2003. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radical Biology & Medicine*, 35 (7) : 772-781.
- Morr CV, German B, Kinsella JE, Regenstein JM. 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J. of Food Sci.*, 50 : 1715-1718.
- Nair SS, James W, John F, Manohar L. 1997. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 127 (3) : 383-393.
- Nzai JM, Proctor A. 1998. Phospholipids determination in vegetable oil by thin layer chromatography and imaging densitometry. *Food Chem.*, 63 (4) : 571-576.
- Nouri L, Legrand, Popineau Y, Belleville P. 1997. Enzymatic hydrolysis of wheat proteins. Part I. Enzymatic kinetics and study of limited hydrolysis in a batch stirred reactor. *Chemical Engineering Journal*, 65, 187-194.
- Novo Industri. 1978. Analytical method. Anson hemoglobin method for determination of Alcalase activity. AF 4.3/5-GB.
- O'Meara GM, Munro PA. 1984. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by Alcalase. *Meat Science*, 11 : 227-238.
- Onodenalore CA, Shahidi F. 1996. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). *J. of Aquatic Food Product Technol.*, 5 (4) : 43-59.
- Owens JD, Mendoza LS. 1985. Enzymatically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *J. of Food Technol.*, 273-293.
- Parrish CC, Bodennec G, Gentien P. 1996. Determination of glycerolipids by chomarod thin-layer chromatography with Iatroscan flame ionization detection. *J. of chromatography A*, 741 : 91-97.
- Passi S, Cataudella S, Di Marco P, De Simone F. 2002. Fatty acid composition and antioxydant levels in muscle tissue of different mediterranean species of fish and shellfish. *J. of Agric and Food Chem.*, 50 : 7314-7322.
- Pearce KN, Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26 : 716-723.
- Peng J, Larondelle Y, Pham D, Ackman RG, Rollin X. 2003. Polyunsaturated fatty acid profiles of whole body phospholipids and triacylglycerol in anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Comp. Biochem. and Physiol., Part B*, 134 : 335-348.

- Petersen BR. 1981. The impact of the hydrolysis process on recovery and use of proteins. Pp. 149 – 175. *In: Enzymes of Foods processing.* (Eds) G.G. Birch, N. Blakebrough, and K.J. Parker. Elsevier Applied Science Publishers. London.
- Periago M. Jesus, Vidal M. Luisa, Ros Guaspar, Rincon Francisco, Martinez Carmen. 1998 Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.*, 63 (1) : 71-78.
- Pigott GM, Tucker BW. 2003. Fish oils/Production. *In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition.* pp. 2491-2495. Edts. B. Caballero, L. C. Trugo, P. M. Finglas. Academic Press.
- Quaglia GB and Orban E. 1987 a. Enzymic Solubilisation of proteins of Sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *J. Sci. Food Agric.*, 38 : 263-269.
- Quaglia GB and Orban E. 1987 b. Influence of degree of hydrolysis on the solubility of protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.*, 38 : 271-276.
- Quaglia G.B. and Orban E. 1990. Influence of enzymatic on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *J. of Food Sci.*, 55 (6) : 1571-1619.
- Quaglia GB, Filiaci T, Lombardi M, Orban E. 1982. Préparation et propriétés des protéolysats enzymatiques à partir des sous-produits de l'industrie du thon à l'huile. *Utilisation des enzymes en technologie alimentaire*, 371-378.
- Rahali V., Chobert J.-M., Haertle T., Gueguen J. 2000. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin: Characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Die Nahrung*, 44 (2) : 89-95.
- Rebeca BD, Pena-Vera MT, Diaz-Casteneda M. 1991. Production of fish protein and hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *J. of Food Sci.*, 56 (2) : 309-314.
- Rollin X, Peng J, Pham D, Ackman RG, Larrondelle Y. 2003. The effect of dietary lipid strain differences on polyunsaturated fatty acid composition and conversion in anadromous and landlocked salmon (*Salmo salar*.) parr. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B*, 134 : 349-366.
- Rosignol CA. 1998. Un préliminaire important : l'extraction analytique des lipides. *OCL*, 5 (4) : 301-307.
- Saha CB, Hayashi K. 2001. Debitting of protein hydrolyzates. *Biotechnol. advances*, 19, 355-370.
- Saadatian M, Goudable J, Ribobli E. 1999. Lipides et cancer. *OCL*, 6 (3) : 242-251.

- Sargent JR, MacEvoy LA, Bell JG. 1997. Requirements presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155 : 117-127.
- Sébédio JL. Huile marine. 1992. *In: Manuel des corps gras*. Pp 260-270. Ed. A. Karleskind. Londres Tec & Doc.
- Shahidi F, Hang XQ, Synowiecki J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.*, 53 : 285-293.
- Shahidi F, Kamil JYV. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 12 : 435-464.
- Shewfelt R.L. 1981. Fish muscle lypolysis – A review. *J. Food Biochem.*, 5 : 79-100.
- Shimada Y, Maruyama K, Sugihara A, Moriyama S. 1997. Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two-step enzymatic method: hydrolysis and selective esterification. *JAOCs*, 74 (11) : 1441-1445.
- Sidhu KS. 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 38 : 336-334.
- Simopoulos A. 1991. Omega 3 fatty acid in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54 : 438-463.
- Smedes F, Askaland T. 1999. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. *Marine Pollution*, 38 (3) : 193-201.
- Socini A, Galli C, Colombo C. 1983. Fish oil administration as a supplement to a corn oil containing diet affects arterial prostacyclin production more than platelet thromboxane formation in the rat. *Prostaglandins*, 25 (5) : 693-710.
- Spinelli J, Dassou JA. 1982. Fish Proteins: their modification and potential uses in the food industry. *In: Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, 13-25.
- Stevenson ED, Ofman JD, Morgan RK, Stanley AR. 1998. Protease-catalyzed condensation of peptides as a potential means to reduce the bitter taste of hydrophobic peptides found in protein hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technol.*, 22 : 100-110.
- Stoknes I, Rustad T. 1995. Proteolytic activity in muscle from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. of Food Sci.*, 60 (4) : 711-714.
- Striby L, Lafont R, Goutx M. 1999. Improvement in the Iatroscan thin-layer chromatographic-flame ionisation detection analysis of marine lipids. Separation and quantification of monoacylglycerols and diacylglycerols in standards and natural samples. *J. of Chromatography A*, 849 : 371-380.
- Suparno, Poernomo A. 1992. Fish waste utilisation in Indonesia. *ASEAN Food Journal*, 7 (2): 67-72.

- Sun T, Pigott GM. 2002. Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids from viscera of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. of Food Sci., 67 : 130-136.
- Takama K, Suzuki T. 1994. Lipid content and fatty acid composition of phospholipids in white-flesh fish species. Fisheries Science, 60 (2) : 177-184.
- Takayashi C, Mitsui K. 1923. Improvement relating to the extraction oil from fish. Patent GB199054.
- Tanaka Y, Hiano J, Funada T. 1992. Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of oil with *Candida cylindracea* lipase. JAOCS, 69 : 1210-1214.
- Thomas LM, Holub BJ. 1994. Nutritional aspects of fats and oils. In : Technological advances in improved and alternative sources of lipids. Pp. 16-49. Eds B. S. Camel & Y. Kakuda. Blackie Academic & Professional.
- Turgeon SL, Gauthier SF, Paquin P. 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process. J. Agric. Food Chem., 39 : 673-676.
- Undeland I, Härrod M, Lignert H. 1998. Comparison between methods using low toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). Food Chem., 61 (3) : 355-365.
- Valdimarsson G, James D. 2001. World fisheries-utilisation of catches. Ocean and Coastal Management, 44 : 619-633.
- Vancassel S. 2004. Oméga 3 et neurotransmission cérébrale. OCL, 11 (1) : 59-63.
- Venugopal V, Shahidi F. 1994. Thermostable water dispersions of myofibrillar proteins from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). J. of Food Sci., 59 (2) : 265-276.
- Vieira GHF, Martin AM, Saker SS. 1995. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian Lobster (*Panulirus* spp) Processing wastes. J. Sci. Food Agric., 69 : 61-65
- Vlieg P. 1984. Proximate analysis of 10 commercial New Zealand fish species. New Zealand Journal of Science, 27 : 99-104.
- Voutsinas LP, Cheung E, Nakai S. 1983. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. J. of Food Sci., 48 : 26-32.
- Vuilleumard JC, Gauthier SF, Richard JP. 1990. Development of a method for measurement of the maximum value of emulsifying capacity of milk proteins. Milchwissenschaft, 45 : 572-575.
- Wanasundara UN, Shahidi F. 1995. Storage stability of microencapsulated seal blubber oil. J. of Food Lipids, 2 : 73-86.

- Wanasundara UN, Shahidi F. 1999. Concentration of omega 3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. Food Chem., 65: 41-49.
- Wang JC, Kinsella JE. 1976. Functional properties of novel proteins: Alfalfa Leaf protein. J. of Food Sci., 41 : 286-292.
- Watanabe T, Murase T, Saito H. 1995. Specificity of fatty acid composition of highly migratory fish. A comparison of docosahexaenoic acid content in total lipids extracted in various organs of bonito (*Euthynnus pelamis*). Comp. Biochem. Physiol., 111 B (4) : 691-695.
- Wilson SA, Young OA, Coolbear T, Daniel RM. 1992. The use of proteases from extreme thermophiles for meat tenderization. Meat Sci., 32 : 93-103.
- Wiseman A. 1993. Review. Designer enzyme and cell applications in industry and in environmental monitoring. J. Chem. Tech. Biotechnol., 56 : 3-13.
- Wouters R, Molina C, Lavens P, Calderon J. 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannemei* in different stages of sexual maturation. Aquaculture, 198 : 307-323.
- Yasumatsu K, Sawada K, Moritaka S, Misaka M, Toda J. 1972. Whipping and emulsifying properties of soybean products. Agric. and Biol. Chem., 36 : 719-727.
- Zaliha O, Chong CL, Cheow CS, Norizzah AR, Kellens MJ. 2004. Crystallization properties of palm oil by dry fractionation. Food Chem., 86 : 245-250.
- Zyriax BC, Windler E. 2000. Dietary fat in the prevention of cardiovascular disease – a review. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 355-365.

ANNEXES

Annexes 1 : Chromatogrammes des acides gras des huiles par CPG

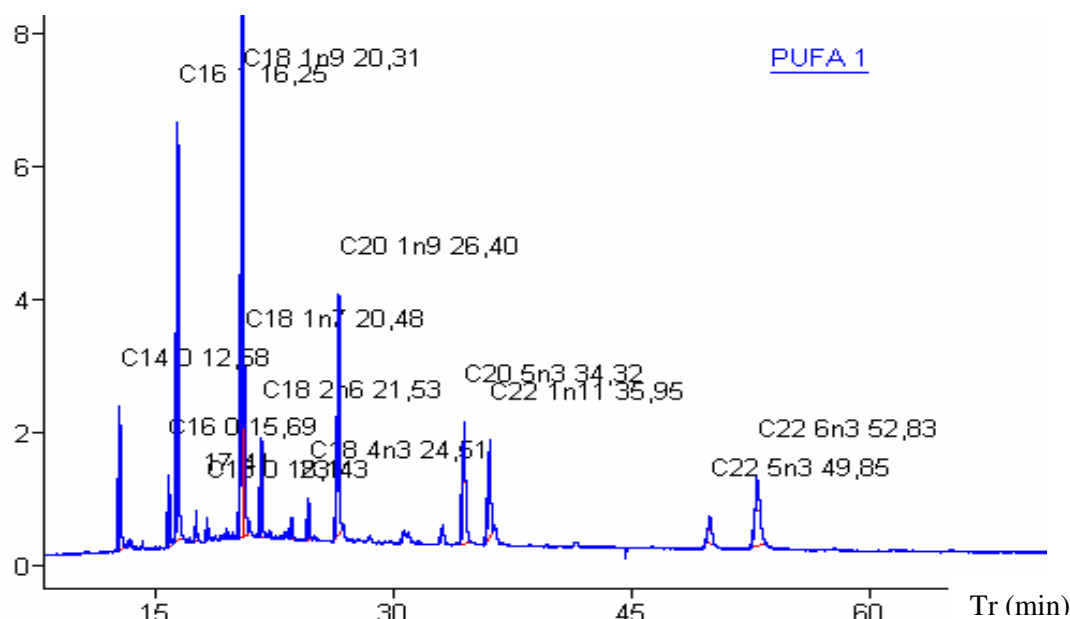


Figure 1. Chromatogramme des acides gras du PUFA 1, analysé par chromatographie en phase gazeuse Péri 2000 (Périchrom) sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, 0,5 μ m d'épaisseur du film) de polyéthylène glycol dopé avec de l'acide téréphtalique.

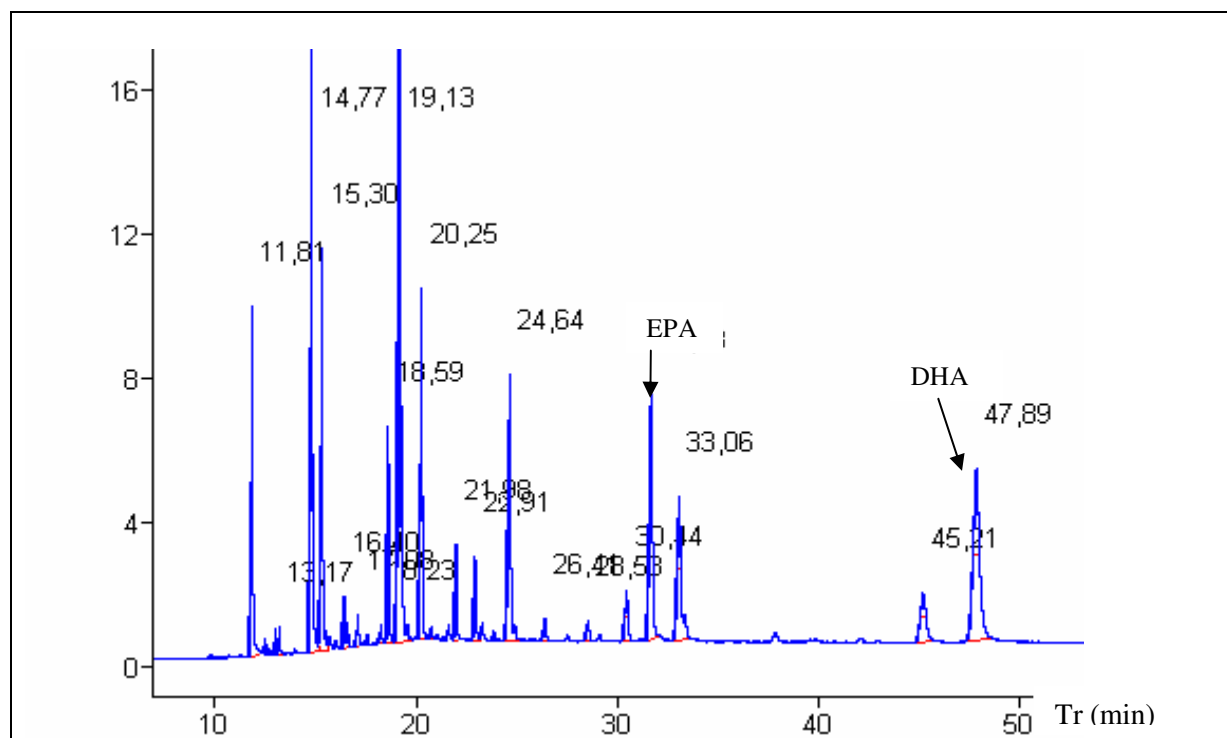


Figure 2. Chromatogramme des acides gras de l'huile de tête de saumon extraite par la méthode de Folch, analysée par chromatographie en phase gazeuse Péri 2000 (Périchrom) sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, 0,5 μ m d'épaisseur du film) de polyéthylène glycol dopé avec de l'acide téréphtalique.

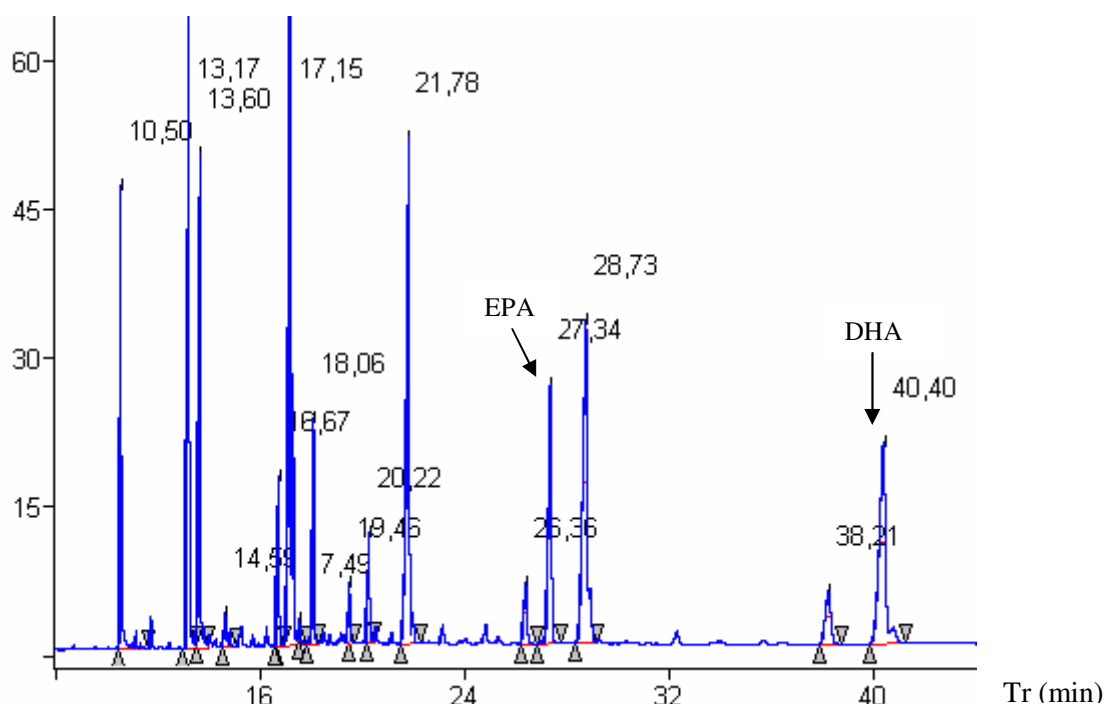


Figure 3. Chromatogramme des acides gras de l'huile de tête de saumon extraite par voie enzymatique, analysée par chromatographie en phase gazeuse Péri 2000 (Périchrom) sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, 0,5 μ m d'épaisseur du film) de polyéthylène glycol dopé avec de l'acide téréphthalique.

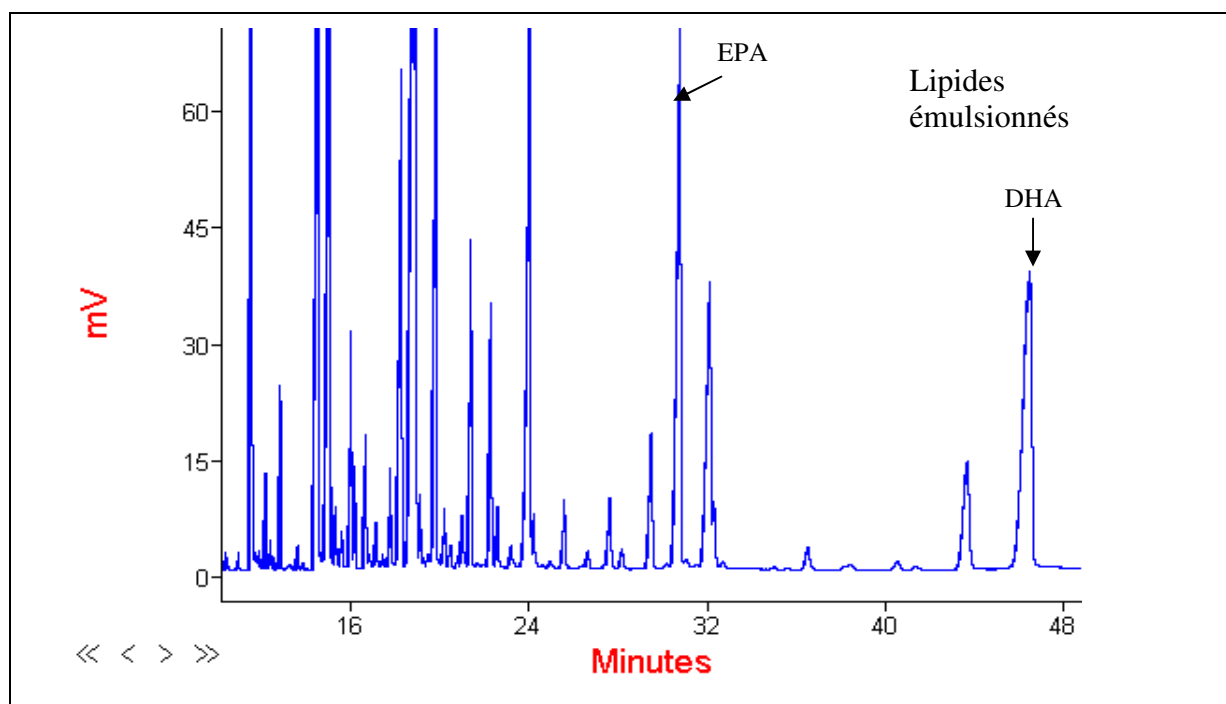


Figure 4. Chromatogramme des acides gras de l'huile émulsionnée de tête de saumon extraite par voie enzymatique, analysée par chromatographie en phase gazeuse Péri 2000 (Périchrom) sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, 0,5 μ m d'épaisseur du film) de polyéthylène glycol dopé avec de l'acide téréphthalique.

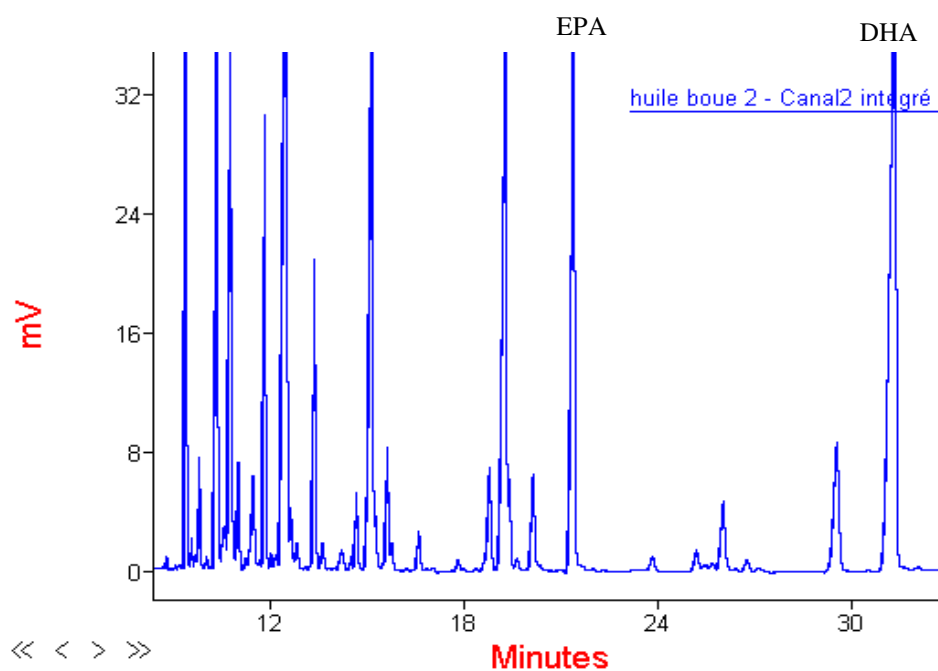
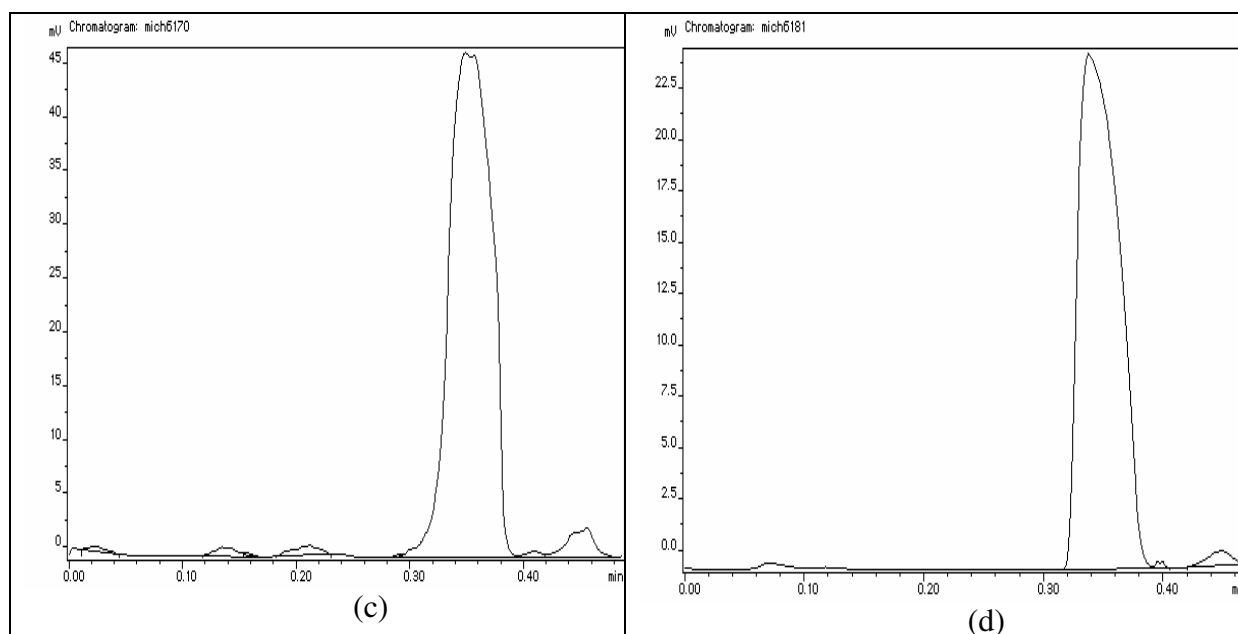
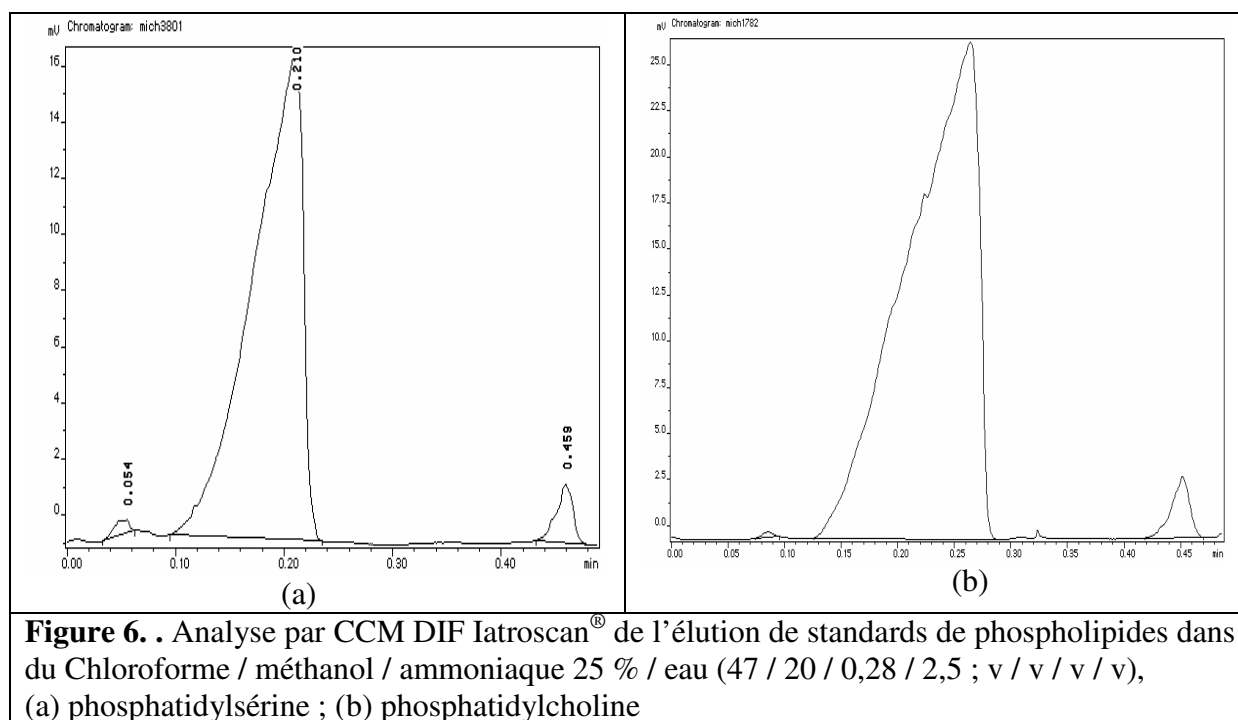
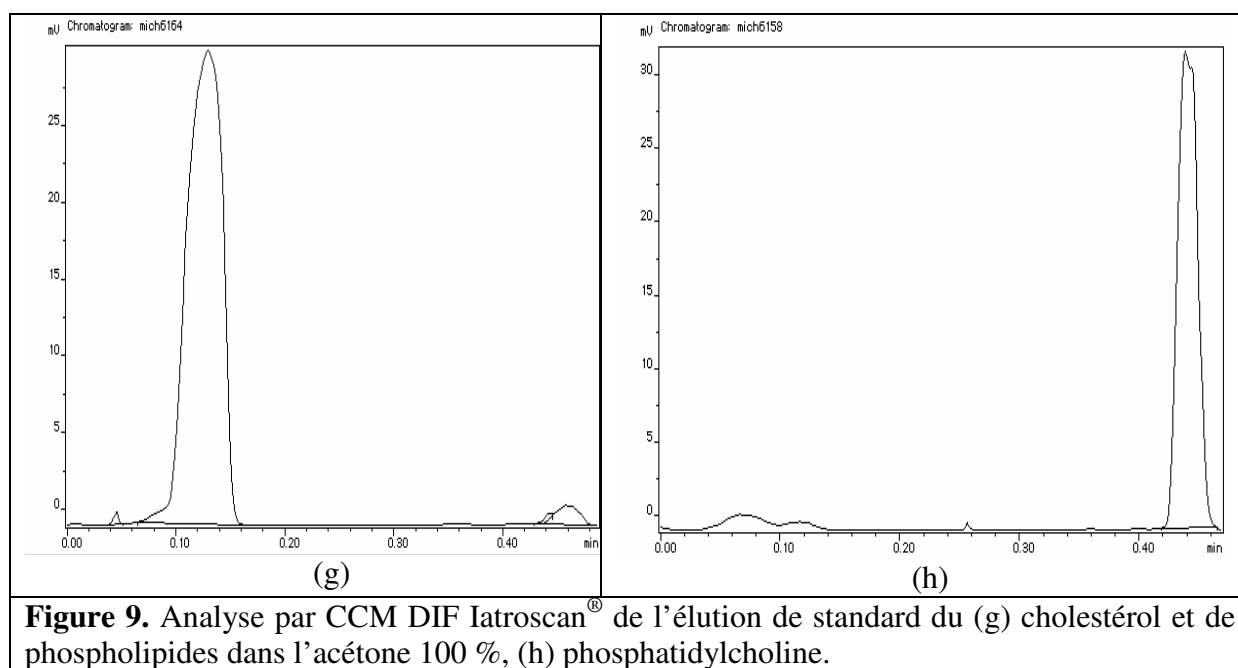
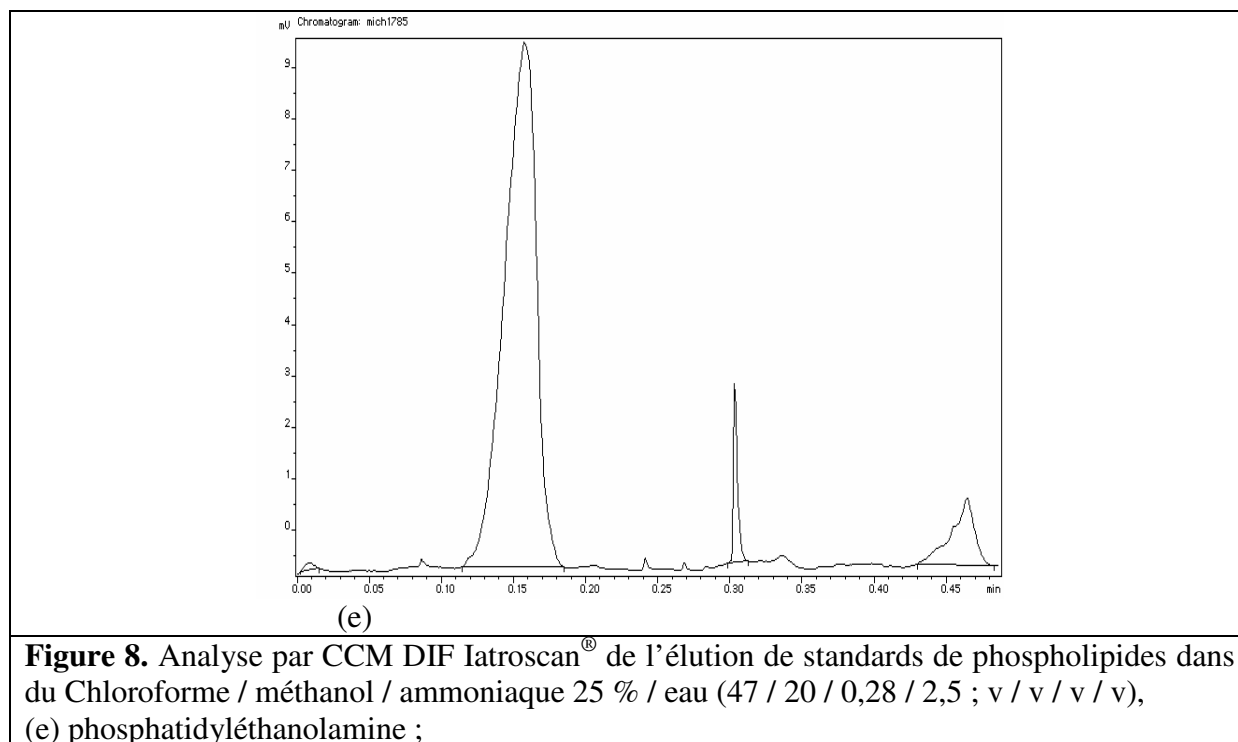
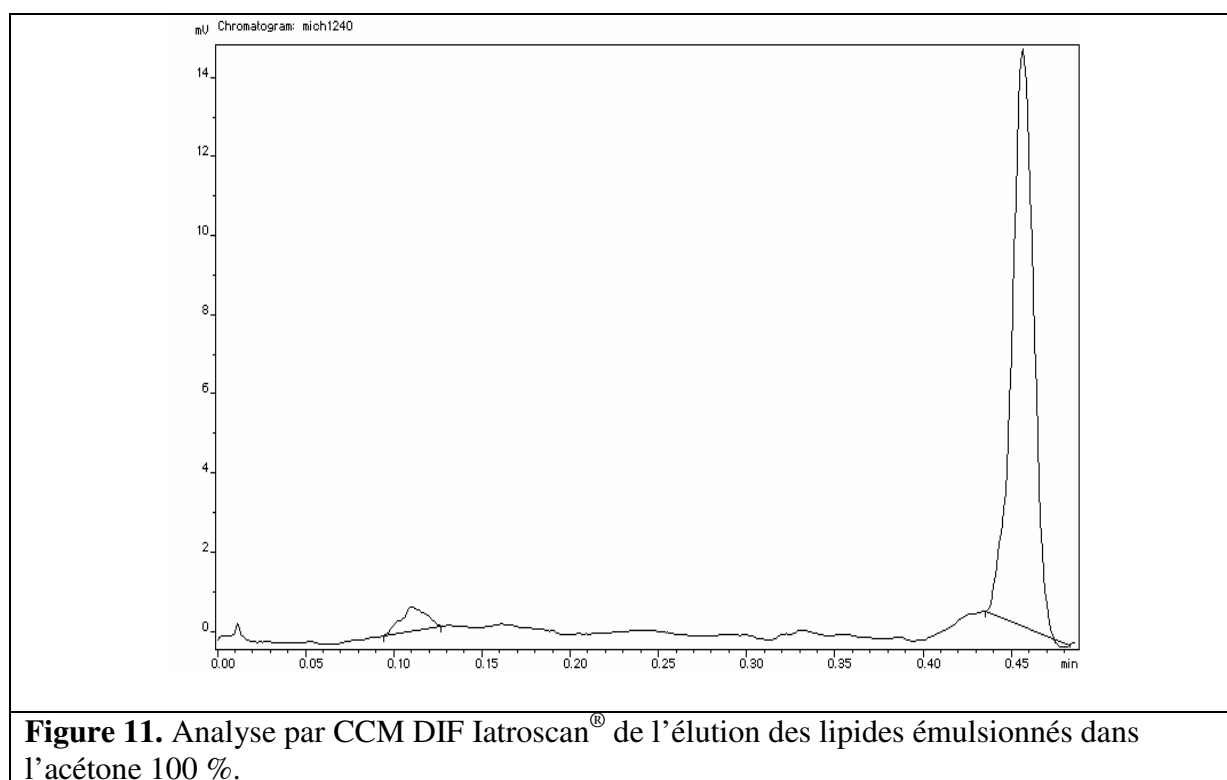
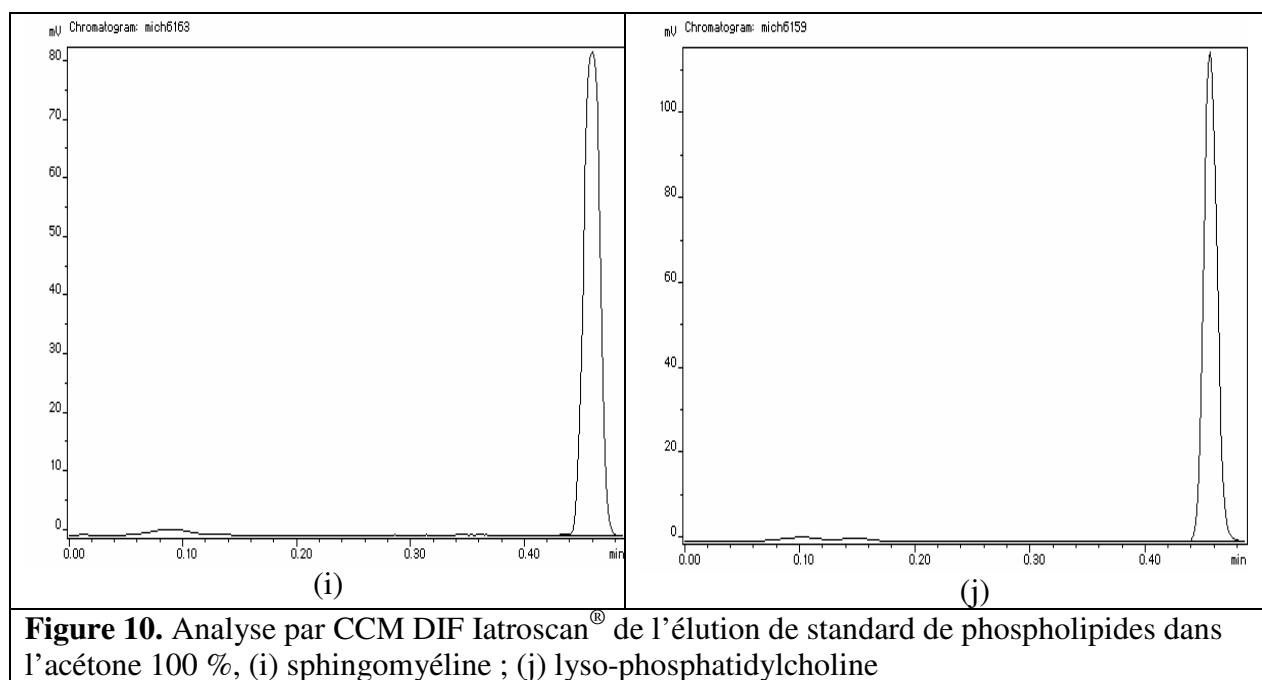


Figure 5. Chromatogramme des acides gras de l'huile des culots protéiques de tête de saumon issus de l'hydrolyse enzymatique, analysée par chromatographie en phase gazeuse Péri 2000 (Périchrom) sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, 0,5 μ m d'épaisseur du film) de polyéthylène glycol dopé avec de l'acide téréphtalique.

Annexes 2 : Analyse par CCM DIF Iatroscan[®] des lipides







Remarques :

- Les phospholipides ne migrent pas dans l'acétone (100 %)
- Le cholestérol migre dans l'acétone (100 %)
- Les lipides émulsionnés ne contiennent pas de classes de lipides mobiles dans l'acétone

Annexes 3 : Photographies des échantillons



Figure 12. (I) Têtes de saumon, (II) broyage des têtes de saumon.



Figure 13. Dispositif de laboratoire (pH-Stat) d'hydrolyse des protéines de tête de saumon.

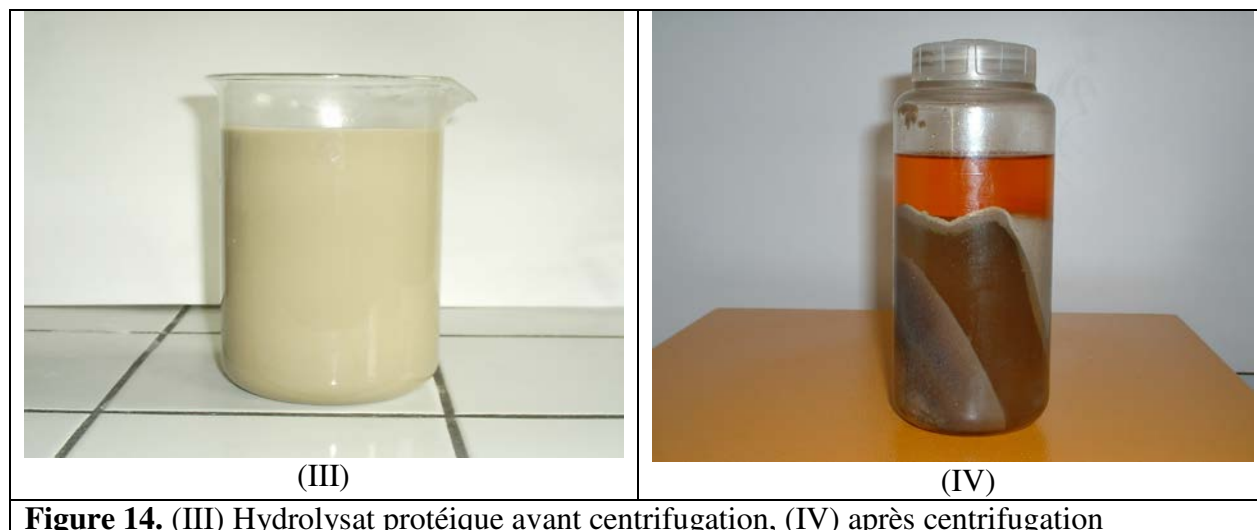


Figure 14. (III) Hydrolysate protéique avant centrifugation, (IV) après centrifugation

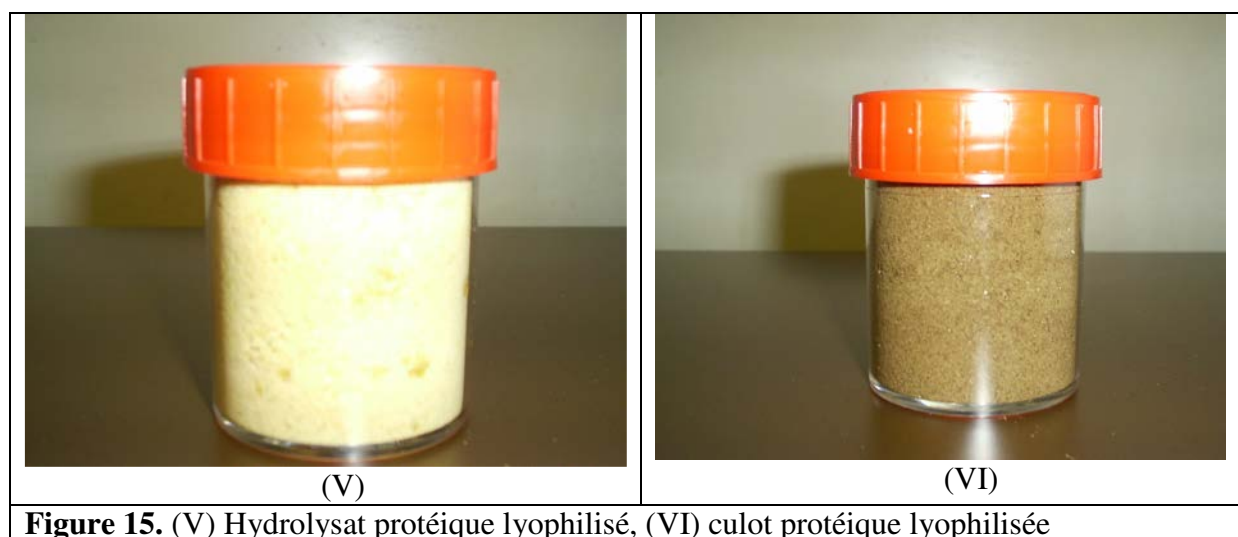


Figure 15. (V) Hydrolysate protéique lyophilisé, (VI) culot protéique lyophilisée



Figure 16. Huile totale des têtes de saumon extraite (VII) par solvant organique, (VIII) huile extraite par voie enzymatique, (IX) huile extraite des culots protéiques par solvants