

Table des matières

| | |
|---|----|
| Liste des figures..... | i |
| Liste des tableaux..... | iv |
| Liste des abréviations..... | vi |
| 1. Introduction..... | 1 |
| 1.1. Les bactéries lactiques..... | 4 |
| 1.1.1. Définition et caractéristiques principales..... | 4 |
| 1.1.2. Métabolisme..... | 4 |
| 1.1.2.1. Métabolisme des carbohydrates..... | 4 |
| 1.1.2.2. Métabolisme de l'azote..... | 6 |
| 1.1.3. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques..... | 7 |
| 1.1.3.1. Définition des bactériocines..... | 7 |
| 1.1.3.2. Classification des bactériocines..... | 8 |
| 1.1.3.3. Mode d'action..... | 9 |
| 1.1.3.4. Applications des bactériocines..... | 9 |
| 1.1.4. Le genre <i>Enterococcus</i> | 10 |
| 1.1.4.1. Caractères généraux..... | 10 |
| 1.1.4.2. Habitat..... | 11 |
| 1.1.4.3. Utilisation des entérocoques dans l'alimentation..... | 12 |
| 1.2. Situation de la pêche mondiale..... | 13 |
| 1.3. Les hydrolysats de coproduits d'origine aquatique..... | 15 |
| 1.3.1. Définition..... | 15 |
| 1.3.2. Les coproduits et leur valorisation..... | 15 |
| 1.3.3. L'hydrolyse enzymatique..... | 16 |
| 1.3.4. Intérêt nutritionnel des hydrolysats..... | 21 |
| 1.3.4.1. Composition des hydrolysats..... | 21 |
| 1.3.4.2. Applications des hydrolysats..... | 23 |
| 1.3.4.3. Support de milieu de culture microbienne..... | 24 |
| 1.3.5. Intérêt fonctionnel..... | 25 |
| 1.3.5.1. Les peptides bioactifs..... | 25 |
| 1.3.5.2. Régulation du système immunitaire..... | 26 |
| 1.3.5.3. Régulation du système cardio-vasculaire..... | 28 |

| | | |
|------------|--|----|
| 1.3.5.4. | Autres bioactivités..... | 30 |
| 1.4. | La réaction de Maillard..... | 31 |
| 1.4.1. | Historique..... | 31 |
| 1.4.2. | Les grandes étapes de la réaction..... | 32 |
| 1.4.3. | Les facteurs influençant la RM..... | 34 |
| 1.4.3.1. | L'activité de l'eau..... | 34 |
| 1.4.3.2. | La température et la durée de chauffage..... | 34 |
| 1.4.3.3. | Le pH du milieu réactionnel..... | 35 |
| 1.4.3.4. | Les réactants..... | 35 |
| 1.4.4. | Implication de la RM en agro-alimentaire..... | 37 |
| 1.4.4.1. | Effets bénéfiques de la RM..... | 37 |
| 1.4.4.1.1. | Génération d'arômes et de coloration..... | 37 |
| 1.4.4.1.2. | Propriétés antioxydantes..... | 37 |
| 1.4.4.1.3. | Propriétés prébiotiques..... | 38 |
| 1.4.4.1.4. | Propriétés antibiotiques..... | 38 |
| 1.4.4.1.5. | Propriétés antiallergènes..... | 38 |
| 1.4.4.1.6. | Propriétés antimutagènes..... | 39 |
| 1.4.4.2. | Effets néfastes de la RM..... | 39 |
| 1.4.4.2.1. | Réduction de la valeur nutritionnelle..... | 39 |
| 1.4.4.2.2. | Génération de composés toxiques..... | 39 |
| 2. | Matériel et Méthodes..... | 41 |
| 2.1. | Matériel..... | 41 |
| 2.1.1. | La souche bactérienne utilisée..... | 41 |
| 2.1.1.1. | Origine de la souche DM19..... | 41 |
| 2.1.1.2. | Vérification de la pureté de la souche DM19..... | 41 |
| 2.1.2. | Souches indicatrices : cultures bactériennes et milieux..... | 41 |
| 2.1.3. | Les coproduits marins : origine et collecte..... | 42 |
| 2.2. | Méthodes..... | 43 |
| 2.2.1. | Identification génotypique de la souche DM19..... | 43 |
| 2.2.2. | Préparation de l'extrait enzymatique..... | 43 |
| 2.2.2.1. | Dosage de l'activité protéolytique..... | 43 |
| 2.2.2.2. | Détermination de l'activité spécifique..... | 44 |
| 2.2.2.3. | Caractérisation biochimique de l'extrait enzymatique..... | 44 |

| | | |
|------------|---|----|
| 2.2.2.3.1. | Effet du pH sur l'activité et la stabilité des protéases | 44 |
| 2.2.2.3.2. | Effet de la température sur l'activité et sur la stabilité des protéases..... | 45 |
| 2.2.2.3.3. | Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique | 45 |
| 2.2.2.3.4. | Effet des inhibiteurs sur les protéases | 45 |
| 2.2.2.4. | Détermination des constantes cinétiques..... | 46 |
| 2.2.3. | Hydrolyses enzymatiques | 46 |
| 2.2.3.1. | Hydrolyse par les protéases de la souche DM19..... | 48 |
| 2.2.3.2. | Hydrolyse par les enzymes commerciales et endogènes..... | 51 |
| 2.2.3.3. | Suivi de la cinétique des hydrolyses | 53 |
| 2.2.3.4. | Calcul du degré d'hydrolyse | 53 |
| 2.2.3.5. | Arrêt des réactions d'hydrolyse..... | 53 |
| 2.2.3.6. | Traitements post-hydrolyses | 54 |
| 2.2.4. | Réaction de Maillard..... | 54 |
| 2.2.4.1. | Préparation des PRM..... | 54 |
| 2.2.4.2. | Méthodes de mesure de la RM..... | 54 |
| 2.2.4.2.1. | Mesure du pH..... | 55 |
| 2.2.4.2.2. | Dosage des PRM formés par spectrophotométrie | 55 |
| 2.2.4.2.3. | Dosage des composés fluorescents par spectroscopie de fluorescence..... | 55 |
| 2.2.4.2.4. | Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)..... | 57 |
| 2.2.4.2.5. | Dosage des acides aminés résiduels | 58 |
| 2.2.5. | Méthodes d'étude des peptides et de leurs PRM | 60 |
| 2.2.5.1. | Analyse de la composition en acides aminés | 60 |
| 2.2.5.2. | Distribution du poids moléculaire | 60 |
| 2.2.5.3. | Recherche des activités biologiques..... | 61 |
| 2.2.5.3.1. | Recherche de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA..... | 62 |
| 2.2.5.3.2. | Méthodes de mesure du pouvoir antioxydant | 63 |
| a. | Mesure du pouvoir réducteur du fer | 64 |
| b. | Mesure du pouvoir anti-radicalaire..... | 65 |
| c. | Mesure du pouvoir chélateur de fer..... | 67 |
| 2.2.5.3.3. | Évaluation de l'activité antimicrobienne..... | 69 |
| 2.2.6. | Valorisation des coproduits marins en tant que milieu de culture pour la souche DM19 | 69 |
| 2.2.6.1. | Conditions de culture | 69 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.2.6.2. | Analyses biochimiques..... | 71 |
| 2.2.6.2.1. | Dosage des protéines..... | 71 |
| 2.2.6.2.2. | Mesure du pH..... | 73 |
| 2.2.6.2.3. | Dosage des acides organiques et du glucose..... | 73 |
| 2.2.6.3. | Recherche de l'activité bactériocinogène dans les surnageants de culture | 75 |
| 2.2.6.4. | Séquençage du génome et identification de gènes putatifs codant pour la bactériocine | 75 |
| 2.2.7. | Analyses statistiques | 76 |
| 3. | Résultats et Discussion | 76 |
| 3.1. | Identification de la souche | 77 |
| 3.2. | Caractérisation biochimique de l'activité protéolytique extracellulaire de la souche <i>E.faecalis</i> DM19..... | 77 |
| 3.2.1. | Effet de la température | 77 |
| 3.2.2. | Effet du pH..... | 78 |
| 3.2.3. | Etude de la stabilité à la température et au pH..... | 79 |
| 3.2.4. | Effet des inhibiteurs irréversibles et des ions métalliques | 80 |
| 3.2.4.1. | Effet des inhibiteurs | 80 |
| 3.2.4.2. | Effet des ions métalliques | 81 |
| 3.2.5. | Détermination des constantes cinétiques | 81 |
| 3.3. | Hydrolyse enzymatique | 81 |
| 3.3.1. | Activités antioxydantes des hydrolysats | 83 |
| a. | Pouvoir réducteur de Fer | 84 |
| b. | Capacité de piégeage des radicaux libres | 84 |
| c. | Capacité de chélation de Fer..... | 84 |
| 3.3.2. | Analyse de la composition en acides aminés | 89 |
| 3.3.3. | Profil moléculaire des hydrolysats..... | 91 |
| 3.3.4. | Mesure de l'activité inhibitrice des hydrolysats vis-à-vis de l'ECA..... | 92 |
| 3.4. | Réaction de Maillard..... | 93 |
| 3.4.1. | Mesure du pH..... | 93 |
| 3.4.2. | Mesures de l'absorbance des PRM formés | 94 |
| a. | Mesure à 420 nm | 94 |
| b. | Mesure à 294 nm | 95 |
| 3.4.3. | Mesure de la fluorescence..... | 96 |
| 3.4.4. | Dosage des acides aminés résiduels..... | 98 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.4.5. | Analyse de la composition en acides aminés | 100 |
| 3.4.6. | Distribution des poids moléculaires | 101 |
| 3.4.7. | Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IR-TF) | 102 |
| 3.4.8. | Étude de l'activité antioxydante des PRM | 105 |
| a. | Étude du pouvoir réducteur | 105 |
| b. | Étude du pouvoir antiradicalaire et chélateur de fer | 105 |
| 3.4.9. | Étude de l'activité antibactérienne | 109 |
| 3.5. | Valorisation des coproduits marins en tant que milieu de culture pour la souche <i>E.faecalis</i> DM19 | 111 |
| 3.5.1. | Effet des hydrolysats de coproduits d'origine marine sur la consommation du glucose et de protéines et la production d'acides organiques | 111 |
| 3.5.2. | Effet des hydrolysats de coproduits d'origine aquatique sur la croissance | 114 |
| 3.5.3. | Effet des hydrolysats de coproduits sur l'activité bactériocinogène | 117 |
| 3.5.4. | Identification de gènes codant pour la bactériocine | 120 |
| 4. | Conclusion et perspectives | 122 |
| 5. | Références bibliographique | 125 |
| 6. | Annexes | 163 |

Liste des figures

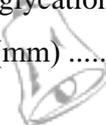
| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation schématique des deux voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (d'après Drider et Prevost, 2009) | 5 |
| Figure 2 : Représentation schématique du système protéolytique de <i>Lactococcus lactis</i> (d'après Guédon et <i>al.</i> , 2001)..... | 7 |
| Figure 3 : Dendrogramme ARNr 16S de la position phylogénétique du genre <i>Enterococcus</i> (adapté de Klein, 2003) | 11 |
| Figure 4 : Utilisation et offre de poisson dans le monde (FAO, 2016) | 11 |
| Figure 5 : Production mondiale de la pêche de capture et de l'aquaculture (FAO, 2016)..... | 11 |
| Figure 6 : Les classes de peptides bioactifs | 25 |
| Figure 7 : Classement des peptides antibactériens en fonction de leur structure secondaire et leur composition en acides aminés | 27 |
| Figure 8 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard (adapté de Hodge, 1953) | 32 |
| Figure 9 : Équipement utilisé pour la régulation du pH..... | 47 |
| Figure 10 : Installation réalisée au laboratoire pour l'hydrolyse enzymatique..... | 49 |
| Figure 11 : Les différentes parties de la crevette..... | 49 |
| Figure 12 : Eau de cuisson de la crevette | 49 |
| Figure 13 : Étapes de l'hydrolyse enzymatique (2h) des coproduits de crevette par les protéases de la souche DM19..... | 50 |
| Figure 14 : Étapes de l'hydrolyse enzymatique des coproduits marins par les protéases commerciales..... | 52 |
| Figure 15 : Spectrofluoromètre Synergy MX (BioTek) utilisé | 56 |
| Figure 16 : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) Spectrum 400 (Perkin–Elmer) utilisée | 58 |
| Figure 17 : Schéma de dérivation d'un acide aminé avec l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) et le 2-mercaptopéthanol | 58 |
| Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la L-sérine | 59 |
| Figure 19 : Étalonnage de la colonne chromatographique d'exclusion de taille Superdex peptide PC 3.2/30..... | 61 |
| Figure 20 : Réaction catalytique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) avec son substrat synthétique hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL). | 62 |
| Figure 21 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (Thomas, 2011) | 64 |

| | |
|---|------------|
| Figure 22 : Courbe d'étalonnage de sulfate ferreux ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 65 |
| Figure 23 : Formation et piégeage du radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ par la vitamine C | 66 |
| Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique | 67 |
| Figure 25 : Mécanisme de formation du complexe Ferrozine- Fe^{2+} | 68 |
| Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'EDTA | 69 |
| Figure 27 : Analyseur d'azote LECO FP-2000 utilisé | 71 |
| Figure 28 : Schéma du principe de l'analyseur d'azote | 73 |
| Figure 29 : Effet de la variation de la température sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de <i>E.faecalis</i> DM19 | 78 |
| Figure 30 : Effet de la variation du pH sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de <i>E.faecalis</i> DM19..... | 78 |
| Figure 31 : Effet de la température sur la stabilité de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de <i>E.faecalis</i> DM19 | 79 |
| Figure 32 : Effet du pH sur la stabilité de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de <i>E.faecalis</i> DM19..... | 79 |
| Figure 33 : Cinétiques d'hydrolyses des protéines de crevette par l'extrait enzymatique de <i>E.faecalis</i> DM19 | 83 |
| Figure 34 : Évolution de la capacité réductrice de fer, des hydrolysats de protéines de carapace (A) et d'eau de cuisson (B) obtenus durant le processus d'hydrolyse.. | 86 |
| Figure 35 : Évolution de la capacité antiradicalaire des hydrolysats de protéines de carapace (A) et d'eau de cuisson (B) obtenus durant le processus d'hydrolyse..... | 87 |
| Figure 36 : Évolution de la capacité chélatrice de fer des hydrolysats de protéines de carapace (A) et d'eau de cuisson (B) obtenus durant le processus d'hydrolyse..... | 88 |
| Figure 37 : L'évolution de l'intensité de brunissement des échantillons en fonction du temps de chauffage..... | 95 |
| Figure 38 : L'évolution de la formation de produits de Maillard mesurées par absorption à 294 nm des échantillons en fonction du temps de chauffage.. | 96 |
| Figure 39 : L'évolution de la formation de produits de Maillard mesurées par fluorescence des échantillons en fonction du temps de chauffage..... | 97 |
| Figure 40 : Estimation de groupes aminés libres des hydrolysats chauffés en présence (A) ou en absence du glucosamine (B) en fonction du temps de chauffage..... | 99 |
| Figure 41 : Spectre IR-TF des hydrolysats natifs et chauffés en présence du sucre | 103 |
| Figure 42 : Spectre IR-TF des hydrolysats natifs et chauffés en présence du sucre | 104 |

| | |
|--|------------|
| Figure 43 : Évolution des capacités, (A) réductrice de fer, (B) antiradicalaire et, (C) chélatrice de fer des hydrolysats avant (en absence du glucosamine) et après glycation avec le glucosamine en fonction du temps de chauffage..... | 109 |
| Figure 44 : Spectres d'émission (A) et d'excitation (B) d'hydrolysats de protéines de carapace chauffés en présence du glucosamine en fonction du temps de chauffage. | 163 |
| Figure 45 : Spectres d'émission (C) et d'excitation (D) d'hydrolysats de protéines d'eau de cuisson chauffés en présence du glucosamine en fonction du temps de chauffage. | 164 |
| Figure 46 : Spectres d'émission (E) et d'excitation (F) d'hydrolysats de protéines de carapace chauffés en absence du glucosamine en fonction du temps de chauffage..... | 165 |
| Figure 47 : Spectres d'émission (E) et d'excitation (F) d'hydrolysats de protéines d'eau de cuisson chauffés en absence du glucosamine en fonction du temps de chauffage..... | 166 |

Liste des tableaux

| | |
|--|------------|
| Tableau 1 : Classification des bactériocines (d'après Reis et <i>al.</i> , 2012) | 8 |
| Tableau 2 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de coproduits de poissons..... | 18 |
| Tableau 3 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de coproduits de crevette et de crustacés..... | 20 |
| Tableau 4 : Composition d'hydrolysats provenant de quelques espèces aquatiques, d'après Chalamaiah (2012) | 22 |
| Tableau 5 : Bioactivité de peptides isolés des coproduits de la mer | 26 |
| Tableau 6 : Hydrolysats de coproduits marins possédant une activitéantibactérienne | 28 |
| Tableau 7 : Peptides antioxydants identifiés dans des hydrolysats de coproduits marins | 29 |
| Tableau 8 : Exemple de peptides antihypertensifs identifiés dans des hydrolysats marins | 30 |
| Tableau 9 : Souches bactériennes indicatrices et leurs conditions de culture | 42 |
| Tableau 10 : Conditions opératoires de l'hydrolyse des coproduits marins | 51 |
| Tableau 11 : Composition des milieux de culture testés (g/L) | 70 |
| Tableau 12 : Caractéristiques de l'analyse par Chromatographie Ionique (METROHM, modèle Compact IC 867) | 74 |
| Tableau 13 : Effet des agents inhibiteurs sur l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut de <i>E.faecalis</i> DM19..... | 80 |
| Tableau 14 : Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut de <i>E.faecalis</i> DM19..... | 81 |
| Tableau 15 : Teneur en protéines des matières premières en g/100g de matières brutes | 83 |
| Tableau 16 : Composition en acides aminés des hydrolysats de protéines d'eau de cuisson (HPEC) et de carapace (HPC) | 90 |
| Tableau 17 : Distribution (en %) des poids moléculaires des peptides contenus dans l'hydrolysat HPEC obtenue après hydrolyse enzymatique | 92 |
| Tableau 18 : Distribution (en %) des poids moléculaires des peptides contenus dans l'hydrolysat HPC obtenue après hydrolyse enzymatique | 92 |
| Tableau 19 : Le changement de pH en fonction du temps de chauffage des hydrolysats en présence et en absence de GlcN | 94 |
| Tableau 20 : Composition et concentration en acides aminés totaux (en mg/g de matière sèche) dans les hydrolysats de crevettes estimées avant et après le chauffage avec le sucre..... | 100 |
| Tableau 21 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur colonne Superdex peptide PC 3.2/30 des hydrolysats avant et au cours du chauffage en présence du GlcN. | 101 |
| Tableau 22 : Activité antibactérienne des hydrolysats avant et après leur glycation avec la GlcN vis-à-vis des bactéries Gram ⁺ et Gram ⁻ mesurée en diamètre d'inhibition (mm) | 110 |



| | |
|--|------------|
| Tableau 23 : Effet des milieux modifiés par les peptones marines sur la consommation de glucose et de protéines ainsi que la production d'acides organiques par <i>E.faecalis</i> DM19..... | 113 |
| Tableau 24 : Effet de l'addition des peptones marines sur la croissance de la souche <i>E.faecalis</i> DM19.. | 115 |
| Tableau 25 : Sensibilité des souches indicatrices à l'activité antimicrobienne des surnageants de culture de <i>E.faecalis</i> DM19 cultivée dans les milieux modifiés. Les résultats sont exprimés en mm de diamètre de zone d'inhibition..... | 118 |
| Tableau 26 : Les bactériocines identifiés chez la souche <i>E.faecalis</i> DM19.. | 121 |

Liste des abréviations

ABTS : acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique)

ADP : adénosine diphosphate

AGE : advanced glycated end products

AH : antioxydant

ATP : adénosine triphosphate

ATR : attenuated total reflection

BAGEL : bacteriocin genome mining tool

BHA : hydroxyanisole butylé

BHT : hydroxytoluène butylé

BL : bactéries lactiques

BLASTX : basic local alignment search tool X

CECT : Colección Española de Cultura Tipográfica

CIB : centro de investigaciones biológicas

CLHP : chromatographie à haute performance

CPL : concentrés protéiques de lactosérum

DAP : dihydroxyacétone phosphate

DH : degré d'hydrolyse

DHA : acide docosahexaénoïque

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

E : *Enterococcus*

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique

EPA : acide éicosapentaénoïque

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FGTR : gélatine de poisson hydrolysée par la Trypsine

FRAP : ferric reducing antioxidant power

GAP : glycéraldéhyde phosphate

GlcN : glucosamine

GRAS : generally recognized as safe

HHL : hippuryl-L-histidyl-L-leucine

HPC : hydrolysats de protéines de carapace de crevette

HPEC : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette
ICTAN : instituto de ciencia y tecnología de alimentos et nutrición
IR-TF : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
LBMB : laboratoire de biologie des microorganismes et de biotechnologie
NCBI : national center for biotechnology information
OPA : ortho-phthaldialdéhyde
PM : poids moléculaires
PRM : produits de la Réaction de Maillard
PTG : produits terminaux de glycation
RM : réaction de Maillard
SBS : sequencing by synthesis
SHAP : protéines de crevette hydrolysées par la Protéase Alkaline
SHEE : protéines de crevette hydrolysées par les enzymes endogènes
SHNP : protéines de crevette hydrolysées par la Protéase Neutre
SHPR : protéines de crevette hydrolysées par la Protamex
SQAP : protéines de calmar hydrolysées par la Protéase Alkaline
SQES : protéines de calmar hydrolysées par la Esperase
SQTR : protéines de calmar hydrolysées par la Trypsine
SNG : séquençage nouvelle génération
TFA : acide trifluoroacétique
TPTZ : tripyridyltriazine
VISAVET : centro de vigilancia sanitaria veterinaria

1. Introduction

La production mondiale de poissons provenant des pêches et de l'aquaculture a été estimée à 167,2 millions de tonnes en 2014 (FAO, 2016). Une grande partie de ce tonnage (146,3 millions de tonnes) est destinés à l'alimentation humaine dont 55 % ont fait l'objet d'une transformation industrielle. Ces étapes de transformation génèrent une quantité importante de déchets estimée à 70 % du volume total (Olsen *et al.*, 2014). En Algérie par exemple, l'usine Raja food à Hassi Ameer, située à Oran, génère en moyenne 6 à 8 tonnes de déchets de poisson chaque semaine (Bousbaa *et al.*, 2017) après la mise en conserve. Cette transformation des produits de la mer est à l'origine de plusieurs types de coproduits : les coproduits solides, comme les têtes, peaux et viscères, et les coproduits liquides, comme les effluents issus de la chaîne de transformation (jus de cuisson, eaux de lavage). Néanmoins, ces déchets ne font l'objet d'aucun traitement spécifique et sont directement rejetés dans l'environnement, entraînant des problèmes de contaminations.

Ces dernières années, l'intérêt porté à l'environnement incite de plus en plus les industriels à prendre en compte les déchets générés par tout procédé de transformation. Il est devenu alors primordial de trouver des voies de valorisation de ces coproduits tout en intégrant la notion de développement durable.

Les coproduits marins, de par leur richesse en protéines, offrent de nombreuses possibilités technologiques suivant le traitement auquel ils sont soumis. En effet, les coproduits marins sont valorisés traditionnellement par transformation en farine qui 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-Gesualdo *et Li-Chan*, 1999 ; Kristinsson *et Rasco*, 2000 a, Kristinsson *et Rasco*, 2000 b ; Liaset *et al.*, 2000 ; Liaset *et al.*, 2002).

Généralement, les conditions opératoires, le type d'enzyme utilisé, essentiellement les protéases, et le degré d'hydrolyse affectent les activités biologiques des hydrolysats protéiques obtenus. L'utilisation d'une préparation enzymatique dans l'élaboration

d'hydrolysats protéiques s'avère très intéressante puisqu'elle permet de réduire le coût du produit fini en évitant l'achat des enzymes commerciales. Dans ce cadre, et afin de minimiser le coût de production des hydrolysats protéiques, nous avons mené une étude sur le potentiel hydrolytique d'une préparation enzymatique d'une bactérie lactique qui appartient à la collection du laboratoire LBMB (laboratoire de biologie des microorganismes et biotechnologie).

La recherche des peptides bioactifs, (notamment les peptides antioxydants et antimicrobiens) comme substituts aux antioxydants (sulfites, BHA : di-tertiobutylhydroxyanisol et BHT : di-tertio-butyl-hydroxytoluène) et conservateurs synthétiques alimentaires (nitrites : E249 et nitrates : E252) utilisés pour prévenir les altérations des aliments (dues aux réactions d'oxydation et aux microorganismes indésirables), est un défi majeur pour les industriels de l'agroalimentaire car la demande actuelle des consommateurs se tournent de plus en plus vers une alimentation naturelle dépourvue d'additifs synthétiques. En outre, la réaction de glycation (ou réaction de Maillard) appliquée aux peptides dotés d'activités biologiques constitue une autre voie de valorisation et suscite un intérêt croissant en industrie agroalimentaire pour sa capacité à renforcer les activités antioxydante et/ou antimicrobienne.

Les coproduits d'origine marine peuvent également servir de matière première de fermentation pour la production de métabolites tels que les acides organiques et la production de biomasse. Différentes recherches ont été menés pour valoriser les déchets industriels en tant que sources de carbone et d'azote alternatives des substrats relativement coûteux (glucose, lactose et extrait de levure) pour la culture des microorganismes. Parmi ces déchets, citons les mélasses, le lactosérum, les hydrolysats d'amidon et du blé. En effet, le milieu de culture entre pour une part importante dans le coût de la biomasse microbienne ainsi que des métabolites d'intérêt. Il est donc essentiel de trouver un bon équilibre entre les qualités nutritionnelle et technologique des matières premières, leurs prix et leur disponibilité sur le marché. De ce fait, l'aspect valorisation des coproduits d'origine marine dans la formulation de milieu de culture notamment celui des bactéries lactiques, est nouveau.

Objectif de l'étude

Le principal objectif de ce travail est la valorisation de coproduits de la pêche provenant de l'industrie de transformation.

La première partie porte sur la production puis la recherche d'activités biologiques des hydrolysats protéiques à partir de coproduits de crevette en utilisant les protéases d'une souche lactique DM19 appartenant à la collection du laboratoire LBMB. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la réaction de Maillard sur les activités biologiques des hydrolysats.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons utilisé les hydrolysats issus de coproduits de la pêche en utilisant, dans ce cas, une série d'enzymes commerciales. Cette étude est entamée pour tester les différents hydrolysats sur la croissance et les activités métaboliques de la souche DM19.

1.1. Les bactéries lactiques

1.1.1. Définition et caractéristiques principales

Les bactéries lactiques (BL) forment un groupe hétérogène, composé de coques, et de bacilles, dont la principale caractéristique est la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres. Ce sont des cellules procaryotes, hétérotrophes, et chimioorganotrophes, non pathogènes, à Gram positif, généralement immobiles, non sporulées, anaérobies mais aéro-tolérantes, ne possédant pas la catalase ni la nitrate réductase ni la cytochrome-oxydase, ne liquéfiant pas la gélatine, et ne produisant pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux (De Roissart et Luquet, 1994). Ces bactéries peuvent être homofermentaires (70 % du produit métabolique est de l'acide lactique), ou hétérofermentaires (50 % d'acide lactique complété par d'autres composés tels que l'acide acétique, le CO₂, ou l'éthanol) (Novel, 1993).

Elles ont été isolées à partir de plusieurs milieux naturels (végétaux, animaux et humains) (De Roissart et Luquet, 1994) et sont classées en plusieurs genres : *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Pot, 2008).

Le genre *Enterococcus* nous intéresse particulièrement.

1.1.2. Métabolisme

1.1.2.1. Métabolisme des carbohydrates

Selon leurs métabolismes, les BL sont homofermentaires ou hétéro-fermentaires (Figure 1) :

Homofermentaires : toutes les BL (à l'exception des genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus*) entravent la voie de la glycolyse pour dégrader les hexoses (ex : glucose). Après son transfert vers la cellule, le glucose subit une phosphorylation pour se transformer en fructose qui est à son tour phosphorylé en fructose 1-6 di-phosphate puis clivé en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et glycéraldéhyde phosphate (GAP), ces deux derniers sont convertis en pyruvate. Le pyruvate est dans une dernière étape réduit en acide lactique qui est le produit unique : c'est la fermentation homolactique. Dans les conditions défavorables telles la limitation du

glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou le CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (Mozzi *et al.*, 2010).

Hétérofermentaires : ce groupe de BL utilise la voie des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) qui consiste à une déshydrogénation du glucose, après sa phosphorylation, pour donner le 6-phosphogluconate qui subira une décarboxylation. Le pentose résultant est clivé en glyceraldéhyde phosphate (GAP) qui suit la voie de la glycolyse donnant l'acide lactique et l'acétyle phosphate qui sera réduit en éthanol. En raison de la production de CO₂, d'éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique, cette fermentation est appelée hétérolactique (Salminen *et al.*, 2004).

Les bifidobactéries sont le seule groupe qui utilise la voie «Bifidus» (Figure 1).

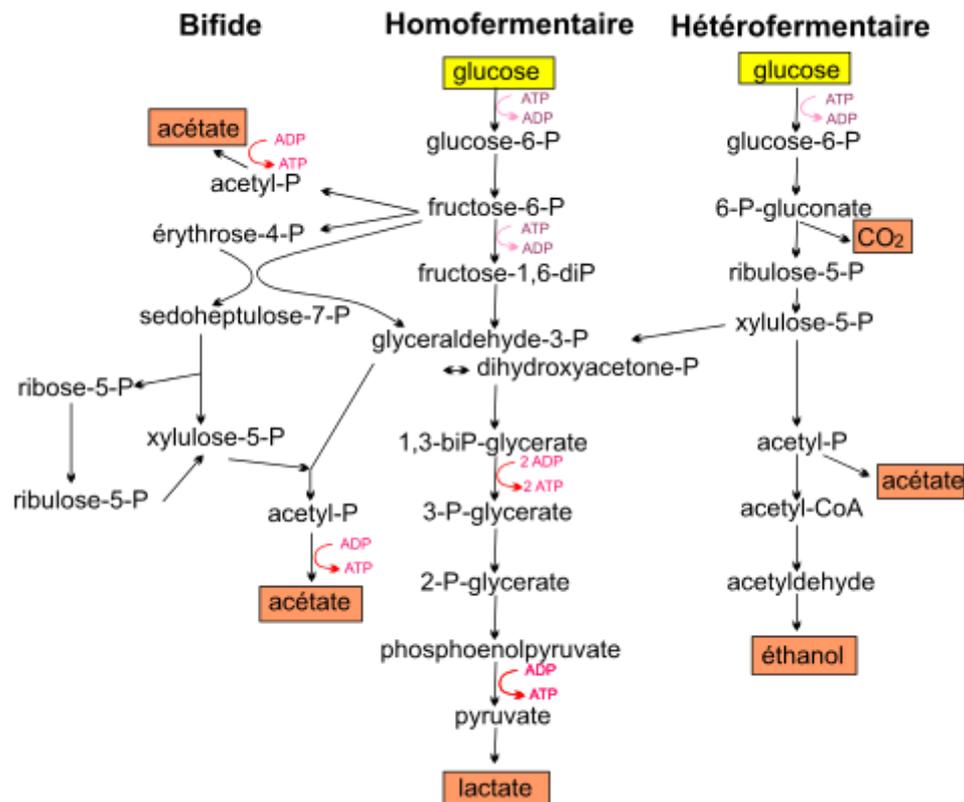


Figure 1 : Représentation schématique des deux voies de fermentation des hexoses chez les bactéries lactiques (d'après Drider et Prevost, 2009)

ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate

1.1.2.2. Métabolisme de l'azote

La protéolyse chez les BL est assez bien documentée (Savijoki *et al.*, 2006 ; Kunji *et al.*, 1998 ; Poolman *et al.*, 1995). La machinerie protéolytique développée chez ces bactéries est assez complexe du fait de la présence limitée d'acides aminés libres dans le milieu, tel que le lait, et des auxotrophies de ces bactéries pour plusieurs acides aminés. Le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation des aliments et permet l'obtention d'acides aminés à partir des protéines alimentaires.

Le système le plus étudié est le système des BL laitières, en particulier celui de *Lactococcus lactis*, pour le développement des technologies fermentaires laitières. La protéolyse est le mécanisme essentiel qui permet la croissance des BL dans le lait (Figure 2). Les protéases membranaires (PrtP) hydrolysent les protéines en oligopeptides qui entrent à l'intérieur de la cellule grâce à des transporteurs d'oligopeptides (Opp). Le système Opp accepte des oligopeptides de plus de 18 résidus (Detmers *et al.*, 1998). Une fois à l'intérieur, les oligopeptides sont alors dégradés en acides aminés libres par des peptidases intracellulaires (oligopeptidases, endopeptidases ou exopeptidases) (Corrieu et Luquet, 2008).

Bruinenberg *et al.* (1992), ont montré une augmentation du taux de croissance de *Lactococcus lactis* dans le lait pour des souches où une surproduction de protéase membranaire avait été induite. Il a aussi été montré que dans l'ensemble du processus de dégradation des protéines en peptides puis en acides aminés libres, l'absorption des peptides de taille importante du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule, dictée par le transporteur d'oligopeptides (Opp), est une étape cruciale dans la croissance de *Lactococcus lactis* dans le lait. Kunji *et al.* (1995), n'ont pas pu faire se développer des mutants Opp-négatif dans un milieu de culture où la caséine était la seule source d'acides aminés. En effet, Juillard *et al.* (1995), ont analysé les peptides dans le lait en suivant la cinétique de croissance de lactocoques et ont montré que les oligopeptides acceptés par le système de transport représentaient 98 % de la source d'azote utilisé par les cellules.

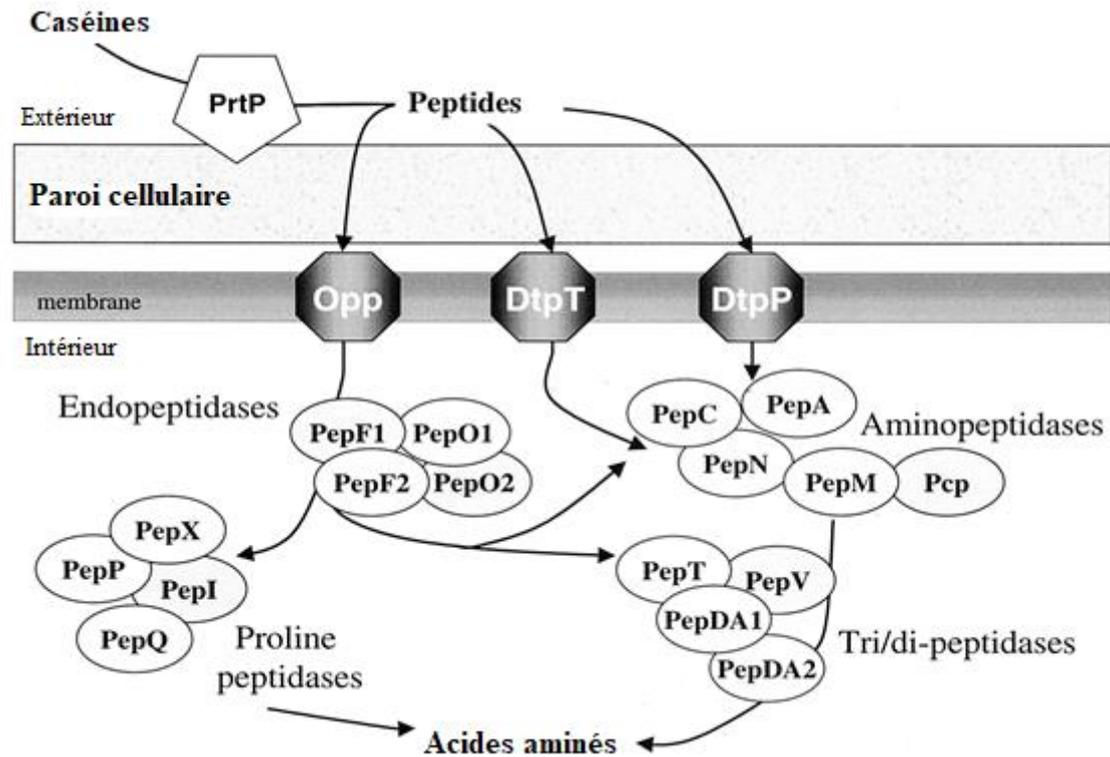


Figure 2 : Représentation schématique du système protéolytique de *Lactococcus lactis* (d'après Guédon *et al.*, 2001)

La transposition de ce système à d'autres BL que *Lactococcus lactis* n'a pu être énoncée. Néanmoins, lorsqu'ils ont été identifiés pour d'autres souches, ces systèmes protéolytiques sont identiques à celui de *Lactococcus lactis* (Salminen et Von Wright, 2009). Par exemple, le génome de *Lactobacillus plantarum* contient tous les gènes (dont les gènes codant pour les systèmes Opp, DtpT et DtpP (transporteurs d'oligopeptides et tri/dipeptides respectivement) pour mettre en place la dégradation de protéines (Salminen et Von Wright, 2009).

1.1.3. Les bactériocines produites par les bactéries lactiques

1.1.3.1. Définition des bactériocines

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique synthétisées par voie ribosomique, modifiées ou non post-traductionnellement et sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles sont douées d'une activité antimicrobienne envers des espèces microbiennes phylogénétiquement proches de l'espèce productrice (Dalié *et al.*, 2010 ; Castellano *et al.*, 2008 ; Ammor *et al.*, 2005). Leur spectre d'activité varie d'une bactériocine à une autre mais avec une activité dirigée principalement contre les bactéries à Gram positif (Dortu et Thonart,

2009). Les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux bactériocines car elles sont protégées par leur membrane externe qui empêche les bactériocines d'atteindre la membrane interne, siège de leur activité (Dortu et Thonart, 2009). D'une manière générale, les bactériocines sont thermostables, solubles et actives à pH acide (Labioui et al., 2005), non toxiques pour les cellules eucaryotes et sensibles aux enzymes protéolytiques du tractus gastro-intestinal (Wijaya et al., 2006), ce qui permet d'éviter les interférences avec la microflore intestinale (Castellano et al., 2008). De plus, d'un point de vue physico-chimique, elles sont généralement cationiques, amphiphiles, non structurées en solution aqueuse (Reis et al., 2012).

1.1.3.2. Classification des bactériocines

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont classées en quatre classes (Tableau 1) qui se distinguent les unes des autres par leur structure chimique, par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques (dont la stabilité thermique) et leur spectre et mode d'action (Dortu et Thonart, 2009).



Tableau 1 : Classification des bactériocines (d'après Reis et al., 2012)

| Classes | Caractéristiques principales | Stabilité thermique | Exemples |
|---|---|---------------------|---|
| Classe I Lanibiotiques | - Cycles thioester dans la séquence - Poids moléculaire <5 kDa | Stable | Nisine Lactacine 481 Carnocine U149 Lactocine S |
| Classe II Peptides anti- Listeria | - IIa : poids moléculaire < 10 kDa - IIb : association de 2 peptides pour l'activité, poids moléculaire < 10 kDa | Stable Stable | Lactococcine MMF2 Sakacine G Lactococcine G Lacticine F |
| Classe III | - poids moléculaire < 30 kDa | Sensible | Helvéticine J Helvéticine V-1829 Lactacine A et B |
| Classe IV | - mélange indéfini de protéines, lipides et carbohydrates | Stable | Plantaricine S Leuconocine S Lactocine 27 Pediocine SJ1 |

1.1.3.3. Mode d'action

Bien que toutes les bactériocines partagent le même site d'action qui est la membrane cytoplasmique, leur mode d'action semble être différent (Dortu et Thonart, 2009) :

Les lantibiotiques tel que la nisine, portant une structure cationique et amphiphile allongée, interagissent avec la membrane des cellules cibles soit en se liant au lipide II (un précurseur de peptidoglycanes) empêchant ainsi la synthèse de la paroi cellulaire conduisant à la mort de la cellule, soit en utilisant ce lipide comme une molécule d'appui pour s'insérer dans la membrane et y former des pores causant la destruction de la cellule suite à la dissipation du potentiel membranaire et l'efflux des petites molécules (ions, ATP, acides aminés, etc). La mersacidine tue la cellule en interférant avec ses réactions enzymatiques comme la synthèse de la paroi (Dortu et Thonart, 2009 ; Gillor et al., 2008).

L'insertion des bactériocines de la classe II dans la membrane est conférée par la structure α -hélice amphiphile, cette insertion induit la perméabilisation de la membrane et par conséquent la mort cellulaire.

Les bactériolysines par ailleurs ont un mode d'action complètement différent basé sur l'hydrolyse des liaisons peptidiques des peptidoglycanes (Cotter et al., 2005).

1.1.3.4. Applications des bactériocines

Actuellement, seulement deux bactériocines, la nisine et la pédiocine, sont approuvées pour une utilisation commerciale dans l'industrie alimentaire. De plus, ces bactériocines sont considérées comme étant sans danger pour une utilisation en tant qu'agent de conservation et les souches productrices portent le statut «*generally recognized as safe*» (GRAS). La nisine est efficace contre plusieurs bactéries Gram-positif ainsi que certaines Gram-négatif. C'est pourquoi, en plus d'être employée dans l'industrie alimentaire, elle est aussi utilisée dans d'autres domaines. Par exemple, elle sert pour le traitement de la mastite chez la vache. En effet, le médicament WIPE OUT® Immucell fait à base de nisine permet de contrôler les deux principaux agents causant la maladie, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae*. D'autre part, une grande variété de bactériocines ayant démontré un potentiel pour une utilisation dans les domaines médicaux, alimentaires ou environnementaux ont été identifiées. Par exemple, certaines études ont montré que les bactériocines peuvent avoir une application potentielle dans le traitement des maladies de la peau (Bonelli et al., 2006), le contrôle de la carie dentaire (Jett et Gilmore, 1990) et le contrôle des infections de la gorge

aux streptocoques (Tagg, 2004). Il a aussi été proposé que les bactéries productrices de bactériocines pourraient avoir un rôle comme probiotiques (Dobson *et al.*, 2012). L'utilisation de bactériocines offre donc de grandes possibilités et demeure un sujet à explorer.

1.1.4. Le genre *Enterococcus*

1.1.4.1. Caractères généraux

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes et dont le génome contient un faible pourcentage en G+C (37,5 à 44 %). Ce sont des organismes anaérobies aérotolestants, oxydase et catalase négatives bien que le gène codant cette dernière enzyme de détoxification existe dans leur génome (Paulsen *et al.*, 2003). En 1984, des expériences d'hybridation ADN-ADN et l'analyse des séquences des ARNr 16S ont permis de montrer que les espèces *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* étaient suffisamment distinctes des autres streptocoques pour justifier leur transfert dans le genre *Enterococcus* (Schleifer *et al.*, 1984). À ce jour, 33 espèces forment le genre *Enterococcus* (Köhler, 2007). Cependant, l'évolution des techniques de taxonomie, ainsi que l'intérêt grandissant pour ce groupe de bactéries laisse augurer d'autres réarrangements possibles dans la phylogénie de ce genre. Les entérocoques ont une température de croissance optimale de 35 °C bien que la plupart des espèces de ce genre peuvent croître à des températures allant de 10 à 45 °C. Ils peuvent aussi croître en présence de 6,5 % de NaCl, à pH 9,6, et ils survivent à un traitement de 60 °C pendant 30 min (certaines exceptions existent quant à ces capacités). De par leur faculté à métaboliser les sucres en produisant (majoritairement) de l'acide lactique, les entérocoques appartiennent également au groupe des BL (Figure 3). La plupart des entérocoques appartiennent au groupe sérologique D de la classification de Lancefield (Lancefield, 1933).

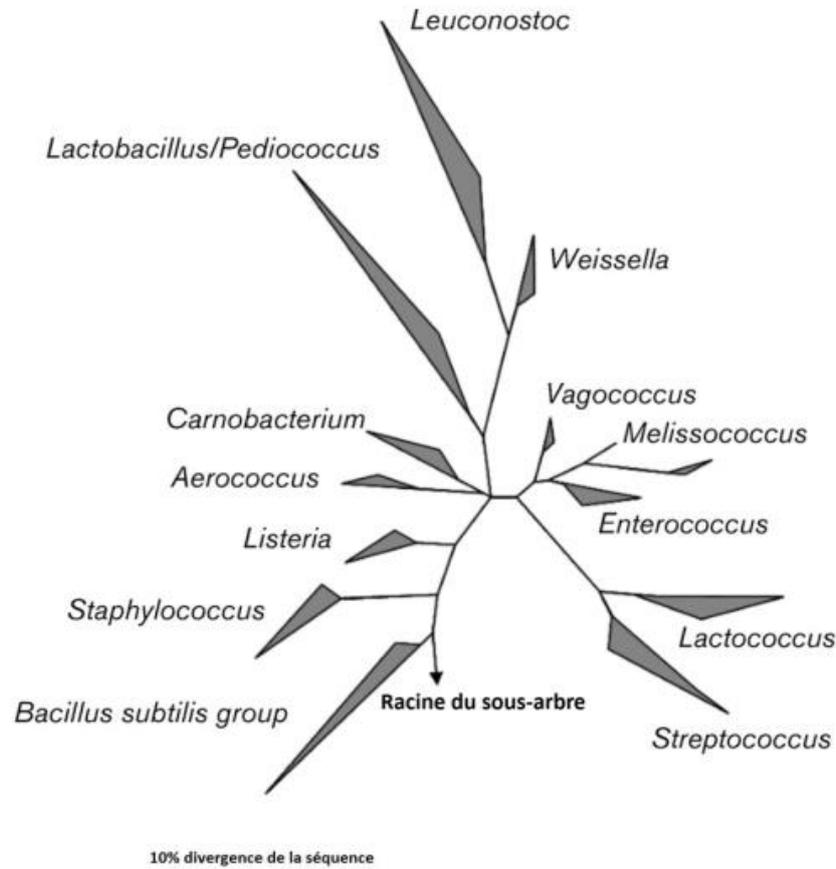


Figure 3 : Dendrogramme ARNr 16S de la position phylogénétique du genre *Enterococcus* (adapté de Klein, 2003)

1.1.4.2. Habitat

Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes, présentes dans différentes niches écologiques telles que les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer, le sol, sur les végétaux et chez les insectes (Mundt, 1986 ; Deibel et Silliker, 1963), l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud (10^5 - 10^8 UFC/g de matière fécale), plus rarement le vagin (Beargie *et al.*, 1975) ou la cavité buccale (Kurrie *et al.*, 1981). On les retrouve également dans les aliments d'origine animale tels que les viandes crues, les viandes fermentées et cuites, ainsi que les fromages (Franz *et al.*, 1999).

De nombreuses études ont établi que parmi les entérocoques du tractus gastro-intestinal, *Enterococcus faecalis* est l'espèce la plus communément retrouvée parmi les entérocoques (Benno *et al.*, 1986 ; Noble, 1978). Ainsi, disséminé avec les excréments humains, les déjections animales et les déchets domestiques, *Enterococcus faecalis* se retrouve dans

l'environnement immédiat de l'homme. En plus d'*Enterococcus faecalis*, d'autres espèces telles que *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* et *Enterococcus cecorum* sont rencontrées dans le tractus gastro-intestinal des animaux de ferme (Leclercq et al., 1996 ; Devriese et al., 1994), leur présence entraîne un risque élevé de contamination du lait des vaches et des moutons ou de la viande au moment de l'abattage. Ainsi, les entérocoques ont été isolés de la viande fraîche (Ben Omar et al., 2004) ou du lait (Giannino et al., 2009 ; Chingwaru et al., 2003).

Les entérocoques contaminent non seulement les viandes crues, mais peuvent également être associés à des produits à base de viande transformés tels que les saucisses crues fermentées ou les produits à base de viande cuits (Ben Omar et al., 2004 ; Magnus et al., 1988). Ils participent au processus d'affinage des fromages artisanaux (Fuka et al., 2010), où ils peuvent jouer un rôle crucial dans la production d'arômes (Bouton et al., 2009 ; Randazzo et al., 2008). En raison de leur tolérance aux valeurs élevées du pH et au sel, les entérocoques peuvent participer à la fermentation des végétaux tels que les olives, où ils peuvent également dégrader l'oléuropeïne (substance qui confère son goût amer aux olives) (Randazzo et al., 2004 ; de Castro et al., 2002). En outre, les espèces d'*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont également fréquemment isolées des produits végétaux fermentés asiatiques et africains (Yousif et al., 2005 ; Moreno et al., 2002).

1.1.4.3. Utilisation des entérocoques dans l'alimentation

La présence d'entérocoques peut-être détectée dans de nombreux aliments comme le Comté, la Mozzarella, différents fromages traditionnels de pays méditerranéens ou encore des produits fermentés tels que des légumes ou des saucisses (Foulquié Moreno et al., 2006). Il a été démontré que cette présence n'était pas toujours due à une contamination fécale (Mundt, 1986). La résistance des entérocoques aux températures de pasteurisation et leur adaptabilité aux différents substrats et aux conditions de culture (basses et hautes températures, pH extrêmes et salinité) justifie qu'ils soient retrouvés, aussi bien dans les aliments à base de produits crus (lait, viande...), que dans ceux élaborés suite à des traitements technologiques. La contribution des entérocoques aux propriétés organoleptiques de ces aliments (par le développement d'arômes) et leur aptitude à produire des bactériocines sont d'importantes caractéristiques pour leurs applications en biotechnologie (López-Díaz et al., 1995 ; Thompson et Marth, 1986). Par contre, la présence d'entérocoques dans le tractus gastro-

intestinal des animaux peut mener à la contamination de la viande durant l'abattage et provoquer des phénomènes d'altération (Magnus *et al.*, 1988).

Les entérocoques peuvent aussi être utilisés comme probiotiques (Franz *et al.*, 2011 ; Franz *et al.*, 1999). Même si l'utilisation de souches de *Enterococcus faecium* et de *Enterococcus faecalis* pour la composition de probiotiques à usage humain reste limitée, les souches d'*Enterococcus faecalis* semblent plus largement utilisées comme complément alimentaire pour animaux (Franz *et al.*, 1999). Depuis 2004, 10 préparations contenant *Enterococcus faecium* sont autorisées en tant qu'additifs alimentaires dans l'Union Européenne dont certaines sont considérées comme cliniquement efficaces dans la prévention des diarrhées associées à la prise d'antibiotiques (Wunderlich *et al.*, 1989) ou dans le traitement des diarrhées infantiles (Bellomo *et al.*, 1980).

1.2. Situation de la pêche mondiale

Depuis longtemps, l'exploitation des ressources marines permet de répondre à un besoin croissant d'alimentation pour l'homme. Dans son rapport de 2016, l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) considère que les ressources marines constituent une source importante d'aliments nutritifs et de protéines animales pour une grande part de la population mondiale (FAO, 2016). Elles procurent 20 % des apports en protéines animales de la population mondiale.

Toutefois le rythme de croissance de la production mondiale de poisson est plus prononcé que celui de la population mondiale. En effet, l'offre mondiale de poisson de consommation a progressé de manière spectaculaire depuis cinquante ans, avec un taux moyen de croissance de 3,2 % par an sur la période 1961-2009, soit un rythme supérieur à la croissance démographique mondiale annuelle, qui est de 1,7 % sur la même période. L'une des premières conséquences de cette situation est de faire passer la consommation par habitant d'une moyenne de 9,9 kg dans les années 60, à 18,4 kg en 2009 (Figure 4).

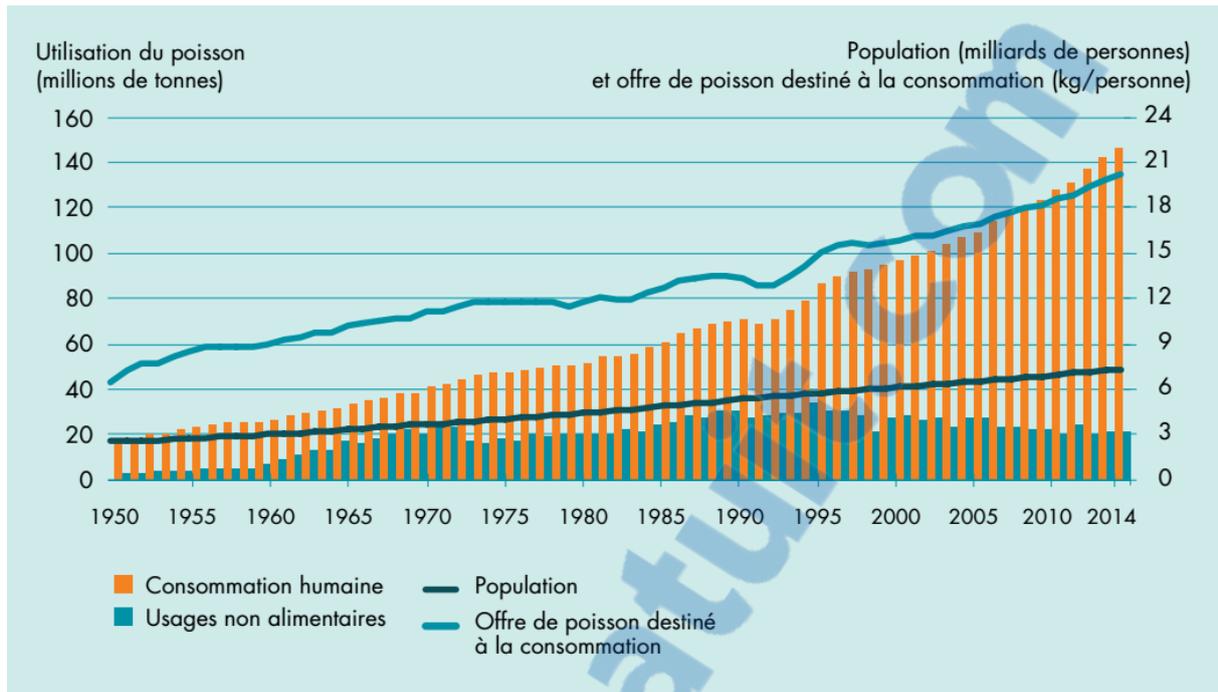


Figure 4 : Utilisation et offre de poisson dans le monde (FAO, 2016)

L'offre a atteint son niveau maximal en 1996, avec 86,4 millions de tonnes, avant d'amorcer une baisse qui se poursuit depuis. Une alternative à la baisse de la production marine mondiale est l'aquaculture. Celle-ci a connu un développement impressionnant ces dernières années. La production mondiale de la pêche marine, relativement stable depuis la fin des années 80, s'est établie à 81,5 millions de tonnes en 2014, alors que celle de la production mondiale de l'aquaculture marine en constante évolution s'est établie à 26,7 millions de tonnes (FAO, 2016). Toutefois, en prenant en considération l'aquaculture dans son ensemble (marine et continentale), la production mondiale a contribué à hauteur de 44,1 % à la production totale de la pêche de capture et de l'aquaculture en 2014 et cette part est en constante augmentation (Figure 5).

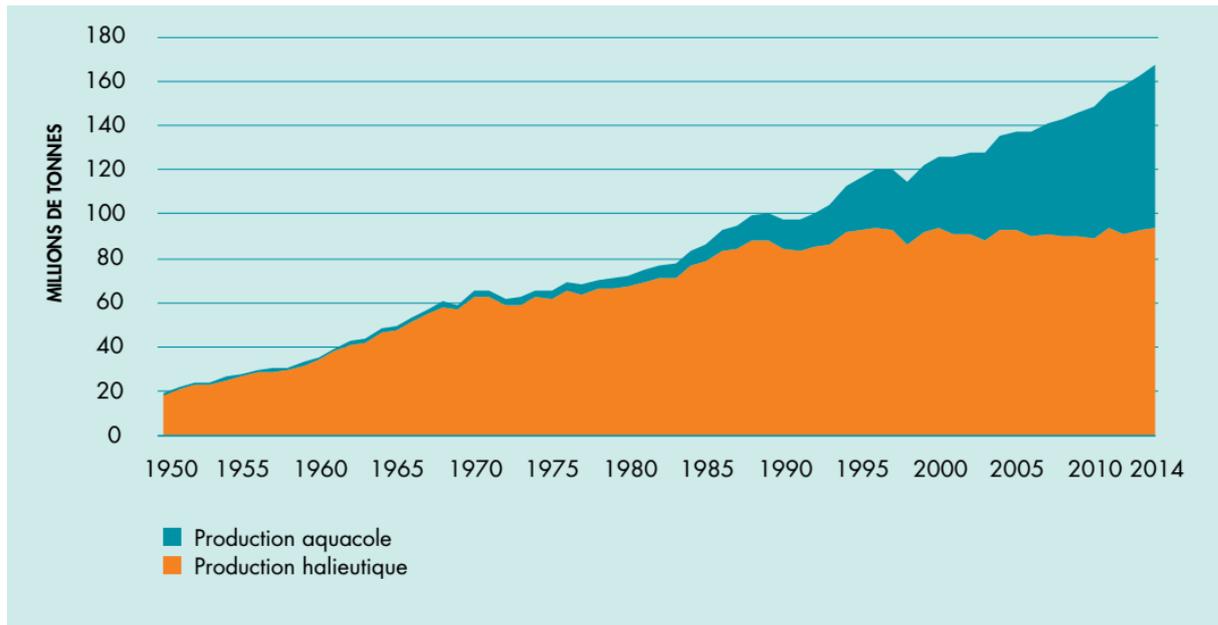


Figure 5 : Production mondiale de la pêche de capture et de l'aquaculture (FAO, 2016)

1.3. Les hydrolysats de coproduits d'origine aquatique

1.3.1. Définition

Les coproduits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Ils sont issus de la transformation des poissons pour la consommation humaine et sont constitués des têtes, des viscères, de la chute de parage (filetage), de la peau, de l'écaille, des arêtes et des queues de poissons. Pour les crevettes, ils engendrent les têtes, la carapace et la queue. Les coproduits renferment de nombreuses molécules valorisables notamment des protéines (Heu *et al.*, 2003 ; Ibrahim *et al.*, 1999), lipides (Dumay *et al.*, 2006), minéraux, vitamines (Heu *et al.*, 2003), ainsi que d'autres composés bioactifs, bénéfiques à la santé humaine et animale (Kim *et al.*, 2008a).

1.3.2. Les coproduits et leur valorisation

Les coproduits marins sont obtenus à partir de la transformation des captures ou des animaux d'élevages destinés à la consommation humaine. La quantité de coproduits générés chaque année est très importante, elle est estimée à 63 millions de tonnes (Rai *et al.*, 2012). Elle provient des animaux d'élevage (environ 60 millions de tonnes/an) et des animaux issus de capture destinés à l'alimentation humaine (76 % des captures totales, soit 68,4 millions de

tonnes en 2010) (Olsen *et al.*, 2014). Or, la tendance actuelle est à la mise sur le marché des poissons transformés, notamment les filets, générant ainsi de plus en plus de coproduits.

Il est très intéressant d'un point de vue économique et environnemental de développer des voies de valorisation pour ce type de matières premières et de nombreuses études sur le sujet sont réalisées depuis une vingtaine d'années (FAO, 2012). Aujourd'hui, de nombreuses voies de valorisation ont été développées. Par exemple, l'agriculture et l'industrie de l'énergie utilisent les coproduits en les transformant principalement en engrais pour l'enrichissement des sols, en chitosane ou en biocarburant. Ces voies de valorisation apportent peu de valeur ajoutée aux produits mais sont majoritaires en termes de tonnage. Les coproduits sont également utilisés pour l'alimentation humaine et animale ainsi que par l'industrie nutraceutique en raison de leur forte teneur en protéines à haute valeur ajoutée, en acides gras insaturés, en minéraux ainsi qu'en vitamines et en antioxydants. Dans ce domaine, la principale voie de valorisation en termes de tonnage est la transformation en farine et huile brute de poisson utilisées en alimentation animale comme sources de protéines et de lipides. Les huiles peuvent aussi être raffinées à partir des huiles brutes pour être enrichies en acides gras insaturés dont les oméga3 EPA (acide éicosapentaénoïque) et DHA (acide docosahexaénoïque). La seconde voie de valorisation en termes de tonnage est la fabrication de hachis congelés. Ils sont fabriqués à partir de tous les coproduits à l'exception des viscères et sont utilisés en alimentation humaine et animale. Enfin, une troisième voie de valorisation importante est leur hydrolyse enzymatique menant à un ingrédient plus riche en protéines que les farines de poisson, leur bonne digestibilité ainsi que leur appétence les rendent intéressants pour l'alimentation animale. Il existe, de plus, des voies de valorisation à haute valeur ajoutée destinées aux industries cosmétique et pharmaceutique. Des molécules à haute valeur ajoutée peuvent être isolées pour leurs propriétés bioactives telles que la chitine et le chitosane utilisés pour leurs propriétés flocculantes, antioxydantes et immunostimulatrices, la gélatine et le collagène isolés dans la peau et les arêtes, la chondroïtine sulfate, des peptides bioactifs ou des enzymes.

1.3.3. L'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est une des voies de valorisation des coproduits intéressante car elle permet de concentrer et valoriser les protéines d'origine marine sous la forme de farines solubles avec une granulométrie très fine. Les hydrolysats peuvent être obtenus de deux manières : l'autolyse ou l'hétérolyse. Dans le premier cas, l'hydrolyse est opérée par les

enzymes protéolytiques endogènes présentes dans le système digestif (pepsine, trypsine, chymotrypsine) ainsi que le tissu musculaire (cathépsine) (Raa *et al.*, 1982). Les bactéries naturellement présentes dans le mélange participent également dans cette protéolyse. Ce procédé est appliqué depuis l'antiquité pour la fabrication des sauces de poisson en Asie. Néanmoins, il est difficile à contrôler car ce procédé dépend de nombreux facteurs : espèce, saison, quantité d'enzymes, température.... (Benjakul et Morrissey, 1997). Dans le cas de l'hétérolyse, des enzymes exogènes sont ajoutées et les conditions de réaction sont contrôlées. De nombreuses protéases sont utilisées dans l'industrie alimentaire, elles sont d'origine végétale (papaine, bromélaïne), animale (trypsine, chymotrypsine, pepsine) ou microbienne et sont classées parmi les exopeptidases ou les endopeptidases. Ce procédé permet un meilleur contrôle de la réaction générant ainsi des hydrolysats reproductibles en terme de qualité (Liaset *et al.*, 2000). Le choix de l'enzyme dépend des propriétés recherchées et de son coût, dans la majorité des cas, à l'échelle industrielle ce sont des mélanges enzymatiques qui sont utilisés. Les enzymes d'origine microbienne extraites de bactéries, de levures ou de moisissures est de plus en plus utilisées du fait de leur faible coût de production et de leur diversité (Gupta *et al.*, 2002). Les tableaux 2 et 3 présentent les différentes protéases utilisées pour l'hydrolyse de différentes matières premières ainsi que l'utilisation des hydrolysats.

Tableau 2 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de coproduits de poissons

| Enzyme | Substrat | Température (°C) | pH | utilisation | Références |
|--|--------------------------------|-------------------------|-----------|------------------------|---|
| Origine végétale | | | | | |
| Papaine | Viscères de morue | 37-80 | 5-9 | Source azotée | Aspmo et al., 2005 |
| | Arêtes de thon | | | Intérêt nutritionnel | Je et al., 2007 |
| | Têtes et viscères de sardine | | | Libération des lipides | Dumay et al., 2006 |
| Bromélaïne | Viscères de morue | 20-65 | 5-8 | Source azotée | Aspmo et al., 2005 |
| Origine animale | | | | | |
| Pepsine | Arêtes de colin | 37-45 | 2-4 | Bioactivité | Je et al., 2004 |
| | Arêtes de saumon et morue | | | Intérêt nutritionnel | Liaset et al., 2000 |
| Trypsine | Arêtes de thon | 37-50 | 7,5-8 | Bioactivité | Je et al., 2007 |
| Chymotrypsine | Arêtes de thon | 37 | 8 | Bioactivité | Je et al., 2007 |
| Origine bactérienne et fongique | | | | | |
| Alcalase | Arêtes de saumon et morue | 35-70 | 6-10,4 | Intérêt nutritionnel | Liaset et al., 2000 |
| | Viscères de morue | | | Source azotée | Aspmo et al., 2005 |
| | Coproduits de saumon | | | Intérêt nutritionnel | Gbogouri et al., 2004 |
| | Squelette de thon | | | Bioactivité | Je et al., 2007 |
| | Viscères de seiches et sardine | | | Intérêt nutritionnel | Kechaou et al., 2009 |
| | Têtes et gonades de hareng | | | Intérêt nutritionnel | Sathivel et al., 2003 |
| | Têtes et viscères de sardine | | | Libération des lipides | Dumay et al., 2006 |
| | Chair de saumon | | | Intérêt nutritionnel | Kristinsson et Rasco, 2000c |

Tableau 2 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de coproduits de poissons (Suite)

| Enzyme | Substrat | Température (°C) | pH | utilisation | Références |
|--|--|------------------|-------|------------------------|---|
| Origine bactérienne et fongique | | | | | |
| Protamex | Viscères de morue | 35-57 | 5,5-8 | Source azotée | Aspmo et al., 2005 |
| | Viscères de seiches et sardine | | | Intérêt nutritionnel | Kechaou et al., 2009 |
| | Squelette de saumon | | | Sources de protéines | Liaset et al., 2002 |
| | Os, peau de poissons | | | Bioactivité | Picot et al., 2006 |
| | Viscères de sardine | | | Libération des lipides | Dumay et al., 2006 |
| | Têtes et viscères de sardine | | | Libération des lipides | Dumay et al., 2006 |
| Flavourzyme | Arêtes de morue | 40-60 | 5-8 | Bioactivité | Slizyte et al., 2009 |
| | Squelette de colin | | | Intérêt nutritionnel | Imm et Lee, 1999 |
| | Viscères de morue | | | Libération des lipides | Dauksas et al., 2005 |
| | Viscères de seiches et sardine | | | Intérêt nutritionnel | Kechaou et al., 2009 |
| Neutrase | Viscères de sardine | | | Libération des lipides | Dumay et al., 2006 |
| | Chair de saumon | | | Intérêt nutritionnel | Kristinsson et Rasco, 2000c |
| | Viscères de morue | | | Source azotée | Aspmo et al., 2005 |
| | Têtes, peau, viscères, squelette de merlan | | | Source azotée | Benjakul et Morrissey, 1997 |
| Corolase | Squelette de thon | | | Bioactivité | Je et al., 2007 |
| | Arêtes de saumon et morue | | | Intérêt nutritionnel | Liaset et al., 2000 |
| Actinidine | Chair de saumon | 40-50 | 7,5-8 | Intérêt nutritionnel | Kristinsson et Rasco, 2000c |
| | Viscères de morue | 15-40 | 4-7 | Source azotée | Aspmo et al., 2005 |

Tableau 3 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de coproduits de crevette et de crustacés

| Enzyme | Substrat | Température (°C) | pH | utilisation | Références |
|--|--------------------------------|------------------|--------|------------------------|--|
| Origine végétale | | | | | |
| Papaïne | Têtes de crevette | 55 | 6,2 | Extraction de pigments | Babu <i>et al.</i> , 2008 |
| Origine animale | | | | | |
| Pepsine | Têtes de crevette | 37-45 | 2-4 | Extraction de pigments | Babu <i>et al.</i> , 2008 |
| Trypsine | Têtes de crevette | 37-50 | 7,5-8 | Bioactivité | Babu <i>et al.</i> , 2008 |
| | Coproduits de crevette | | | | Sumaya-Martinez, 2004 |
| Origine bactérienne et fongique | | | | | |
| Biopraxe SP | Coproduits de crevette | 50 | 9 | Bioactivité | Sumaya-Martinez, 2004 |
| Alcalase | Têtes et carapaces de crevette | 35-70 | 6-10,4 | Intérêt nutritionnel | Gildberg et Stenberg, 2001 |
| | Coproduits de crevette | | | Intérêt nutritionnel | Synowiecki et Al-Khateeb, 2000 |
| | Coproduits de crevette | | | Bioactivité | Sumaya-Martinez, 2004 |
| Protéase de <i>Bacillus subtilis</i> | Têtes de crevette | 60 | 8 | Rétention d'eau | Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2005 ; Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006a ; Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006b |
| Protéase de <i>Aspergillus oryzae</i> | Têtes de crevette | 60 | 6 | Rétention d'eau | Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2005 ; Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006a ; Ruttanapornvareesakul <i>et al.</i> , 2006b |

Les hydrolysats sont caractérisés par leur degré d'hydrolyse (DH), paramètre représentant le nombre de liaisons peptidiques clivées par rapport au nombre de liaisons peptidiques initial. Ce dernier définit les propriétés physico-chimiques de l'hydrolysate (Mullally *et al.*, 1995). Le degré d'hydrolyse dépend directement du choix de l'enzyme (ou mélange d'enzymes) utilisée ainsi que de la température, du pH, de la durée de réaction et du rapport enzyme/substrat. La maîtrise de ces facteurs est essentielle pour obtenir des hydrolysats aux propriétés physico-chimiques, nutritionnelles et fonctionnelles reproductibles.

Différentes méthodes sont disponibles pour déterminer le DH d'un hydrolysate : le dosage de la quantité d'azote libéré au cours de la protéolyse, la mesure de la libération des groupements α -aminés par dosage spectrophotométrique et le suivi des protons libérés (technique du pH-Stat). Cette dernière méthode est la plus utilisée car c'est la plus facile et la plus rapide à mettre en place. 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. Toutefois, la détermination seule de ce paramètre n'est pas suffisante pour caractériser un hydrolysate car pour un même DH, plusieurs profils de masse moléculaire peuvent être obtenus.

1.3.4. Intérêt nutritionnel des hydrolysats



1.3.4.1. Composition des hydrolysats

La fraction protéique

Les hydrolysats de coproduits d'origine aquatique sont plus riches (60 à 90 % de protéines) que les farines de poisson (Choi *et al.*, 2009) (Tableau 4). La composition en protéines dépend directement des organes utilisés pour l'hydrolyse. Par exemple, la peau est connue pour générer beaucoup de peptides de collagène et de gélatine. Les protéines musculaires contenues dans les coproduits peuvent être classées en deux catégories. La première concerne les protéines extracellulaires qui sont généralement insolubles en milieu salin (collagène, de l'élastine, de la kératine, de la reticuline et de la connectine).

La seconde catégorie regroupe les protéines intracellulaires dont la fraction myogène soluble et la fraction myofibrillaire. La fraction myogène soluble regroupe les protéines sarcoplasmiques et représente 15 à 22 % des protéines totales.

Tableau 4 : Composition d'hydrolysats provenant de quelques espèces aquatiques, d'après Chalamaiah (2012)

| Espèce | particularité | Protéine (%) | Lipide (%) | Humidité (%) | Cendre (%) | Référence |
|--|--------------------------|--------------|------------|--------------|------------|-----------------------------------|
| Hareng (<i>Clupea harengus</i>) | Entier-Alcalase | 87,9 | 4,03 | 4,7 | 12,5 | Hoyle et Merritt, 1994 |
| | Entier-Papaïne | 85,3 | 4,7 | 4,8 | 9,6 | |
| | Press cake-Alcalase | 82,3 | 3,7 | 3,9 | 7,5 | |
| | Extrait éthanol-Alcalase | 83,7 | 1,8 | 3,3 | 12,0 | |
| | Hareng-Papaïne | 85,7 | 0,9 | 3,9 | 7,5 | |
| | | 77,0±0,2 | 0,77±0,1 | 3,98±0,02 | 21,7±0,1 | Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999 |
| Capelan (<i>Mallotus villosus</i>) | Alcalase | 72,4±0,7 | 0,18±0,03 | 6,34±0,11 | 20,8±1,82 | Shahidi et al., 1995 |
| | Papaïne | 78,3±1,92 | 0,39±0,02 | 5,32±0,24 | 17,7±1,80 | |
| | Neutrase | 71,2±0,83 | 0,21±0,02 | 5,26±0,11 | 21,5±0,53 | |
| Merlu (<i>Merluccius productus</i>) | Coproduits | 82,25±0,05 | 3,94±0,13 | - | 13,82±0,08 | Benjakul et Morrissey, 1997 |
| | DH (10%) | 88,6±0,3 | 0,1±0,1 | 3,6±1,9 | 11,9±0,1 | Pacheco-Aquilar et al., 2008 |
| | DH (15%) | 88,4±0,3 | 0,2±0,2 | 3,2±0,1 | 11,7±0,4 | |
| | DH (20%) | 85,6±0,3 | 0,3±0,1 | 2,8±0,8 | 11,9±0,4 | |
| | Muscles | 85,6±2,3 | 0,3±0,1 | 2,5±0,6 | 16,6±0,3 | Mazorra-Manzano et al., 2012 |
| Saumon (<i>Salmo salar</i>) | Muscles | 88,39±0,55 | 0,23±0,12 | 0,92±0,22 | 8,93±0,13 | Kistinsson et Rasco, 2000a |
| | Têtes | 82,3±1,19 | 0,8±0,02 | 5,3±0,2 | 10,4±1,1 | Gbogouri et al., 2004 |
| Thon | Coproduits | 66,40±0,27 | 2,37±0,52 | 7,25±0,09 | 25,94±0,04 | Nilsang et al., 2005 |

L'hydrolyse enzymatique va conduire à un mélange d'acides aminés, de peptides et de protéines. La composition et la taille des peptides obtenus sont directement liées aux enzymes utilisées et aux conditions d'hydrolyse. La forte teneur en protéines résulte du fait que les protéines sont solubilisées pendant l'hydrolyse et que les éléments insolubles sont éliminés par la centrifugation (Chalamaiah *et al.*, 2010).

Les autres fractions

Les hydrolysats sont pauvres en lipides car cette fraction est éliminée par centrifugation en même temps que les protéines insolubles. Ils contiennent en général moins de 5 % de lipides (Tableau 4). Néanmoins, certains auteurs rapportent des taux en lipides bien plus importants dans certains hydrolysats, allant jusqu'à 50 % (Yin *et al.*, 2010). Les hydrolysats contiennent également une fraction azotée composée des molécules non protéiques, de faible masse moléculaire et solubles dans l'eau. Il s'agit des acides aminés libres, des nucléotides ainsi que leurs dérivés, comme la créatinine, l'oxyde de triméthylamine et l'ammoniac. Enfin, la fraction minérale représente entre 0,45 et 26 % (Bhaskar et Mahendrakar, 2008 ; Nilsang *et al.*, 2005).

1.3.4.2. Applications des hydrolysats

Applications en alimentation humaine

Les protéines hydrolysées présentent des avantages en nutrition car elles ont une meilleure digestibilité. Les hydrolysats ont ainsi des applications en alimentation humaine notamment pour des personnes en malnutrition (Nesse *et al.*, 2014) ou présentant des dysfonctionnements du système digestif (Clemente, 2000). Ils sont également utilisés pour leurs propriétés bioactives et rentrent ainsi dans la composition de nombreux produits nutraceutiques visant par exemple à améliorer le transit intestinal (Marchbank *et al.*, 2009), à favoriser la prise de masse musculaire chez les sportifs (Nesse *et al.*, 2014), ou à améliorer la mémoire et les fonctions cognitives (Guérard, 2010). Néanmoins, les hydrolysats protéiques sont connus pour leur amertume due à la présence de peptides hydrolytiques hydrophobes et/ou d'acides aminés libres amers.

Applications en nutrition animale

Par rapport aux protéines, les peptides présentent un intérêt particulier dans la nutrition animale à cause de leur digestibilité plus élevée (Heu *et al.*, 2003). Plusieurs études sur l'efficacité de l'utilisation d'hydrolysats de poisson et de crevette en nutrition animale ont été

effectuées. Pour les ruminants, une étude comparative de l'utilisation de coproduits de crevette non traités et d'ensilage de coproduits de crevette a été effectuée *in vitro*. Il a été démontré ainsi que la digestibilité est plus élevée dans l'ensilage de coproduits de crevette (Evers et Carroll, 1998). En aquaculture, l'utilisation d'hydrolysats de coproduits de poisson a prouvé son efficacité sur la croissance des poissons. L'introduction d'hydrolysats dans l'alimentation est connue pour améliorer la croissance chez plusieurs espèces : chez *Oncorhynchus mykiss* (Aksnes et al., 2006), *Lates calcarifer* (Srichanun et al., 2014), *Salmo salar* (Refstie et al., 2004), *Dicentrarchus labrax* (Cahu et al., 1999), *Hippoglossus hippoglossus* (Kvale et al., 2009). Plusieurs études montrent également une augmentation de la prise alimentaire (Refstie, 2004), une amélioration de l'efficacité alimentaire (Aksnes et al., 2006) ainsi que de la digestibilité des protéines (Bui et al., 2014). Il a été démontré également que l'hydrolysats de coproduits de crevette peut remplacer la farine de poisson pour l'élevage de tilapia *Oreochromis niloticus* (Oliveira Cavalheiro et al., 2007). L'utilisation d'hydrolysats montre également une amélioration de la maturation du système digestif chez les larves (Zambonino-Infante et al., 1997) et permet d'améliorer la digestion et l'assimilation des nutriments (Tonheim et al., 2005). Enfin, la production de peptides à activité antioxydante associée à la présence d'astaxanthine dans les autolysats de crevette présente un intérêt particulier en aquaculture (Sachindra et Bhaskar, 2008). En effet, en plus de la pigmentation obtenue avec l'astaxanthine, la génération de peptides à activité antioxydante conduit à une meilleure conservation des aliments en inhibant l'oxydation des nutriments, plus particulièrement des lipides et des acides gras.

1.3.4.3. Support de milieu de culture microbienne

Les peptides issus de l'hydrolyse de composés d'origine marine constituent des ingrédients pour des milieux de culture microbienne (bactéries, champignons, levures) de qualité et à coût réduit. Des études ont été effectuées sur l'efficacité de leur utilisation en milieu de culture et les résultats obtenus avec l'hydrolysats de coproduits de thon sont prometteurs (Guérard et al., 2001). L'utilisation de peptones obtenues lors de l'hydrolyse enzymatique de coproduits de crevette et de crabe comme source azotée pour la culture d'*Escherichia coli* s'avère plus efficace par rapport à une peptone commerciale. Les peptides constituent ainsi une source d'azote efficace à moindre coût pour la culture microbienne (Vieira et al., 2005).

1.3.5. Intérêt fonctionnel

1.3.5.1. Les peptides bioactifs

Les peptides bioactifs sont des fragments de protéines pouvant être libérés par hydrolyse enzymatique lors de la digestion gastro-intestinale ou lors des traitements industriels. En général, les peptides bioactifs comptent 2 à 20 acides aminés. Ils peuvent exercer de nombreuses activités sur les systèmes immunitaire, cardio-vasculaire, gastro-intestinal et nerveux *via* différents modes d'action (Figure 6). De nombreuses activités biologiques (antioxydante, anti-hypertensive, antibactérienne, antifongique, antithrombique) ont été mises en évidence (Kim et Mendis, 2006). Le tableau 5 présente quelques exemples de bioactivité de peptides obtenus lors de manipulations biotechnologiques de poissons et de crustacés.

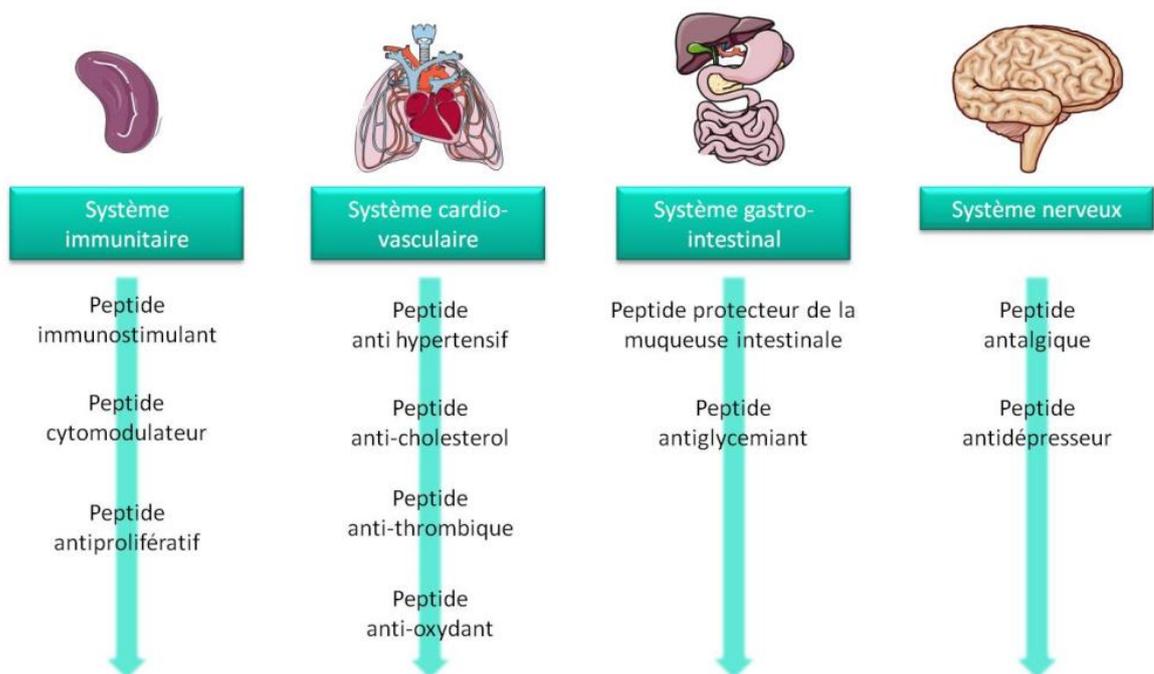


Figure 6 : Les classes de peptides bioactifs

Tableau 5 : Bioactivité de peptides isolés des coproduits de la mer

| Bioactivité | Origine | Références |
|---|-------------------|--|
| Antioxydative | Sole | Kim <i>et al.</i> , 2008b; Jun <i>et al.</i> , 2004 |
| | Crevette | Faithong <i>et al.</i> , 2010; He <i>et al.</i> , 2006; He <i>et al.</i> , 2007; He <i>et al.</i> , 2008 |
| | Morue | Jeon <i>et al.</i> , 1999 |
| | Krill | Faithong <i>et al.</i> , 2010 |
| | Saumon | Nakajima <i>et al.</i> , 2009 |
| | Colin | Nakajima <i>et al.</i> , 2009 |
| | Merlan | Nakajima <i>et al.</i> , 2009 |
| | Hoki | Je <i>et al.</i> , 2005; Kim <i>et al.</i> , 2007 |
| | Thon | Je <i>et al.</i> , 2007 |
| Antihypertensive (inhibition de la conversion de l'angiotensine I) | Sole | Kim <i>et al.</i> , 2008b |
| | Crevette | He <i>et al.</i> , 2006; He <i>et al.</i> , 2008 |
| | Morue | Jeon <i>et al.</i> , 1999 |
| | Saumon | Nakajima <i>et al.</i> , 2009 |
| | Merlan | Nakajima <i>et al.</i> , 2009 |
| | Colin | Je <i>et al.</i> , 2004; Nakajima <i>et al.</i> , 2009 |
| Accélération de l'absorption du calcium | Hoki | Kim <i>et al.</i> , 2007 |
| | Hoki | Jung <i>et al.</i> , 2005; Jung <i>et al.</i> , 2007 |
| Sécrétagogue | | Cudennec <i>et al.</i> , 2008 |
| | Merlan | Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2003; Slizyte <i>et al.</i> , 2009 |
| | Morue Crevette | Cudennec <i>et al.</i> , 2008; Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2003 |
| Antiradicalaire | Crevette | Guérard <i>et al.</i> , 2007 |
| Antiprolifératrice | Morue | Picot <i>et al.</i> , 2006 |
| | Crabe | Picot <i>et al.</i> , 2006 |
| | Saumon | Picot <i>et al.</i> , 2006 |

1.3.5.2. Régulation du système immunitaire

Peptides antibactériens

Les organismes marins, notamment les mollusques et les crustacés produisent de nombreux peptides antibactériens endogènes. En effet, il n'existe pas d'immunité acquise chez les invertébrés marins, l'immunité innée est ainsi le seul système de défense immunitaire. Parmi les effecteurs du système immunitaire inné, les peptides antimicrobiens sont l'un des composants majeurs. Les peptides antimicrobiens sont donc présents naturellement chez les organismes marins soit de manière constitutive dans les cellules sécrétrices, soit de manière

induite lors d'une infection. Il existe une grande variété de séquences, mais la majorité répondent à trois critères (Hancock et Sahl, 2006 ; Wang et Wang, 2004) :

- Ces peptides possèdent entre 6 et 50 acides aminés
- Ils sont cationiques
- Ce sont des peptides amphiphiles dotés d'une forte proportion d'acides aminés hydrophobes

Les peptides antimicrobiens sont souvent classés dans la littérature en fonction de leur structure secondaire et de leur composition (Figure 7). Ainsi 3 grandes classes de peptides antibactériens sont définies par Bulet *et al.* (2004), les peptides linéaires possédant une hélice- α , les peptides riches en cystéine ou en acides aminés comme la proline, l'histidine ou le tryptophane et les peptides mixtes, riches en cystéine et en proline.

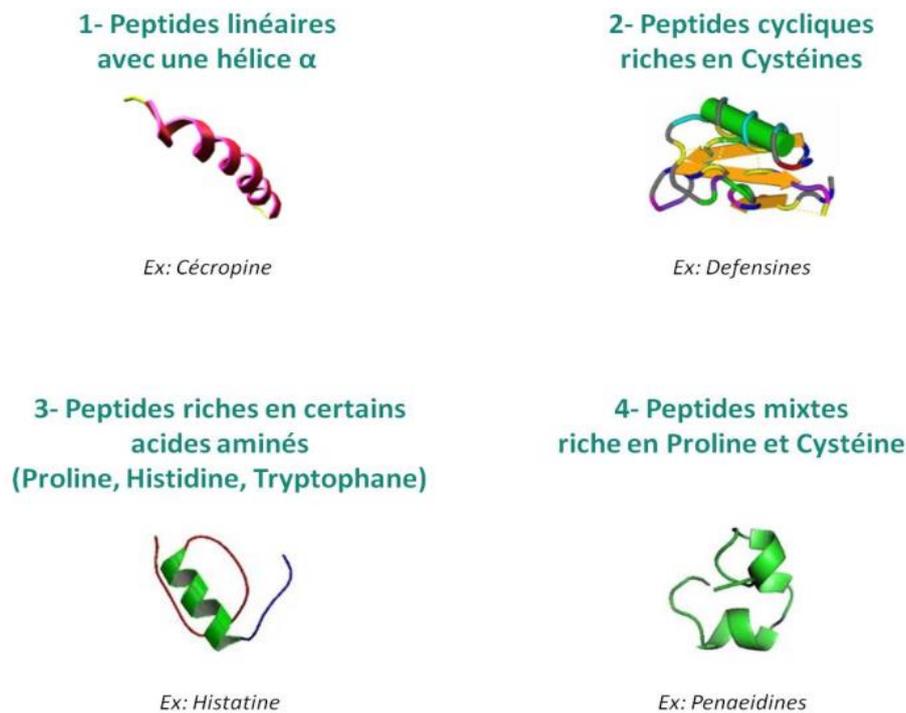


Figure 7 : Classement des peptides antibactériens en fonction de leur structure secondaire et leur composition en acides aminés

Des peptides antimicrobiens peuvent également être générés par hydrolyse enzymatique (Liu et al., 2008 ; Bulet et al., 2004 ; Reddy et al., 2004). Plusieurs études démontrent l'activité antibactérienne d'hydrolysats de poisson ou de crustacé (Tableau 6). Liu et al. (2008) suggèrent que l'activité de l'hydrolysate d'huître creuse *Crassostrea gigas* résulte d'un peptide unique, le Cgpep33 dont la composition en acides aminés est connue mais pas la séquence.

Tableau 6 : Hydrolysats de coproduits marins possédant une activité antibactérienne

| Organisme | Bactéries cibles | Références | |
|-------------------|------------------------------------|---|-------------------------|
| Sardine | <i>Sardinella aurita</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i> | (Jemil et al., 2014) |
| Blennie zébré | <i>Salaria basilisca</i> | <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> | (Jemil et al., 2014) |
| Gobi | <i>Zosterisessor ophiocephalus</i> | <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> | (Jemil et al., 2014) |
| Raie pastenague | <i>Dasyatis pastinaca</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> | (Jemil et al., 2014) |
| Crabes des neiges | <i>Chionoecetes opilio</i> | <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria innocua</i> | (Doyen et al., 2012) |
| Crabes Tourteau | <i>Cancer irroratus</i> | <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> | (Beaulieu et al., 2013) |
| Huître creuse | <i>Crassostrea gigas</i> | <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> | (Liu et al., 2008) |

1.3.5.3. Régulation du système cardio-vasculaire

Peptides antioxydant

Des peptides ayant des activités antioxydantes *in vitro* ont été identifiés dans de nombreux poissons, mollusques et crustacés (Tableau 7). Les mécanismes d'action de ces peptides ne sont pas élucidés. Néanmoins, il a été démontré que ces peptides pouvaient agir en tant que

piégeurs de radicaux libres, chélateurs de métaux ou bien sur la peroxydation des lipides. On suppose que les acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane), l’Histidine et les acides aminés avec une fonction thiol (Cystéine) peuvent agir en tant que donneurs de protons (Mendis *et al.*, 2005a).

Tableau 7 : Peptides antioxydants identifiés dans des hydrolysats de coproduits marins

| Organisme | Séquence | Référence |
|----------------|--|-----------------------------------|
| Merlu | <i>Johnius belengerii</i> HGPLGPL | (Mendis <i>et al.</i> , 2005b) |
| Merlu | <i>Johnius belengerii</i> GSTVPERTHPACPDFN | (Kim <i>et al.</i> , 2007) |
| Thon | - VKAGFAWTANQQLS | (Je <i>et al.</i> , 2007) |
| Encornet géant | <i>Dosidicus gigas</i> FDSGPAGVL, NGPLQAGQPGER | (Mendis <i>et al.</i> , 2005a) |
| Encornet géant | <i>Dosidicus gigas</i> NADFGLENGLEGLA | (Rajapakse <i>et al.</i> , 2005a) |
| Moule | <i>Mytilus eduli</i> HFGDPFH | (Rajapakse <i>et al.</i> , 2005b) |

Peptides antihypertenseurs

Des peptides antihypertenseurs ont été identifiés dans de nombreux hydrolysats de poissons, mollusques et crustacés (Tableau 8). L’un des principaux mécanismes est l’inhibition de l’enzyme de conversion de l’angiotensine (ECA). Cette enzyme joue un rôle dans la régulation de la pression sanguine en catalysant la conversion de l’angiotensine I en angiotensine II, un agent vasoconstricteur, et en inactivant la bradykinine qui est un agent vasodilatateur (Erdös et Skidgel, 1987).

Les peptides inhibiteurs de l’ECA peuvent être compétitifs et se lier au site actif pour empêcher la liaison du substrat ou modifier la conformation spatiale de l’enzyme (Zhao *et al.*, 2009). Il peut également s’agir d’inhibiteurs non-compétitifs (Qian *et al.*, 2007). L’activité de plusieurs peptides a également été démontrée *in vivo* chez des rats spontanément hypertendus. Ainsi l’administration orale du peptide GDLGKTTSVNWSPPKYKDTP, isolé d’un hydrolysats de thon, à 10 mg/kg diminue la pression systolique chez ces rats. L’activité est similaire à celle du Captopril, un médicament contre l’hypertension. Ces peptides constituent une alternative intéressante aux molécules synthétiques commercialisées (Lee *et al.*, 2010).

Tableau 8 : Exemple de peptides antihypertensifs identifiés dans des hydrolysats marins

| Organisme | Séquence | Référence |
|----------------------|--|--------------------------------|
| Colin d'Alaska | <i>Theragra chalcogramma</i> GPL, GPM | (Byun et Kim, 2001) |
| Colin d'Alaska | <i>Theragra chalcogramma</i> FGASTRGA | (Je et al., 2005) |
| SeaBream | - GY, VY, GF, VIY | (Fahmi et al., 2004) |
| Hamaguri | <i>Meretrix lusoria</i> VRK | (Tsai et al., 2008) |
| Krill | <i>Melogale orientalis</i> KLKFBV | (Kawamura et al., 1992) |
| Huître | <i>Pinctada fucata martensii</i> FY, AW, GW, VW | (Katano et al., 2003) |
| Huître | <i>Crassostrea talienwhanensis</i> VVYPWTQRF | (Wang et al., 2008) |
| Crevette | <i>Actinidia chinensis</i> FCVLRP | (Hai-Lun et al., 2006) |
| Thon | - GDLGKTTTWSNWSPPKYKDTP | (Lee et al., 2010) |
| Pipefish | <i>Sphenomorphus schlegeli</i> TFPHGP, HWTTQR | (Wijesekara et al., 2011) |
| Saumon du Pacifique | <i>Oncorhynchus keta</i> GLPLNLP | (Lee et al., 2014) |
| Carpe herbivore | <i>Ctenopharyngodon idella</i> VAP | (Chen et al., 2012) |
| Bonite à ventre rayé | <i>Katsuwonus pelamis</i> MLVRAV | (Intarasirisawat et al., 2013) |

1.3.5.4. Autres bioactivités

D'autres biofonctionnalités ont pu être démontrées dans les hydrolysats de poisson. Quatre (4) peptides (LCR, HCF, CLC et LCRR) ayant une activité antithrombotique ont mis en évidence (Nasri et al., 2012). Ces peptides pourraient aussi avoir des applications dans la prévention de l'ostéoporose, des caries dentaires, de l'hypertension ou de l'anémie (Korhonen et Pihlanto, 2006). Cudennec et al. (2008) ont démontré l'action d'un hydrolysat de crevette sur la sécrétion d'une hormone impliquée (la cholécystokinine) dans la sensation de satiété. Enfin, de nombreux peptides d'origine marine possèdent des actions intéressantes (anti-diabète, anti-obésité...) pour la prévention du syndrome métabolique (Ko et Jeon, 2013).

1.4. La réaction de Maillard

1.4.1. Historique

La réaction non enzymatique entre sucres et groupements aminés a été pour la première fois décrite en 1908 par Ling et Malting qui étudiaient le développement de la couleur dans la bière. En 1912, Louis Camille Maillard, a découvert que la réaction non enzymatique à haute température entre des sucres réducteurs et des acides aminés conduit au développement d'une coloration brune (Maillard, 1912). C'est en travaillant sur la synthèse des protéines qu'il a découvert une succession de réactions entre sucres réducteurs et acides aminés. En voulant obtenir une méthode de synthèse des peptides, Maillard a utilisé des sucres à la place du glycérol pour étudier la formation de polypeptides par la réaction d'acides aminés avec des oses. Il a montré que les fonctions aldéhydes sont beaucoup plus réactives que les groupements hydroxyles. Ces expériences l'ont amené à la découverte de la réaction qui porte aujourd'hui son nom. Il faut attendre 1953 pour voir publier un rapport par Hodge dont le remarquable schéma général sur le mécanisme de brunissement dans des systèmes amine-sucre (Figure 8) sert encore aujourd'hui de référence (Hodge, 1953). Son étude complète et développe les découvertes de Maillard. Depuis, de nombreux chimistes, aromaticiens, technologues, physiologistes, toxicologues mènent des recherches sur cet ensemble complexe de réactions pour en déterminer les voies de synthèses et les structures des multiples produits de la réaction de Maillard (PRM) en fonction des conditions de réaction, des propriétés antioxydantes, des effets sur les organismes, de leurs voies métaboliques etc.

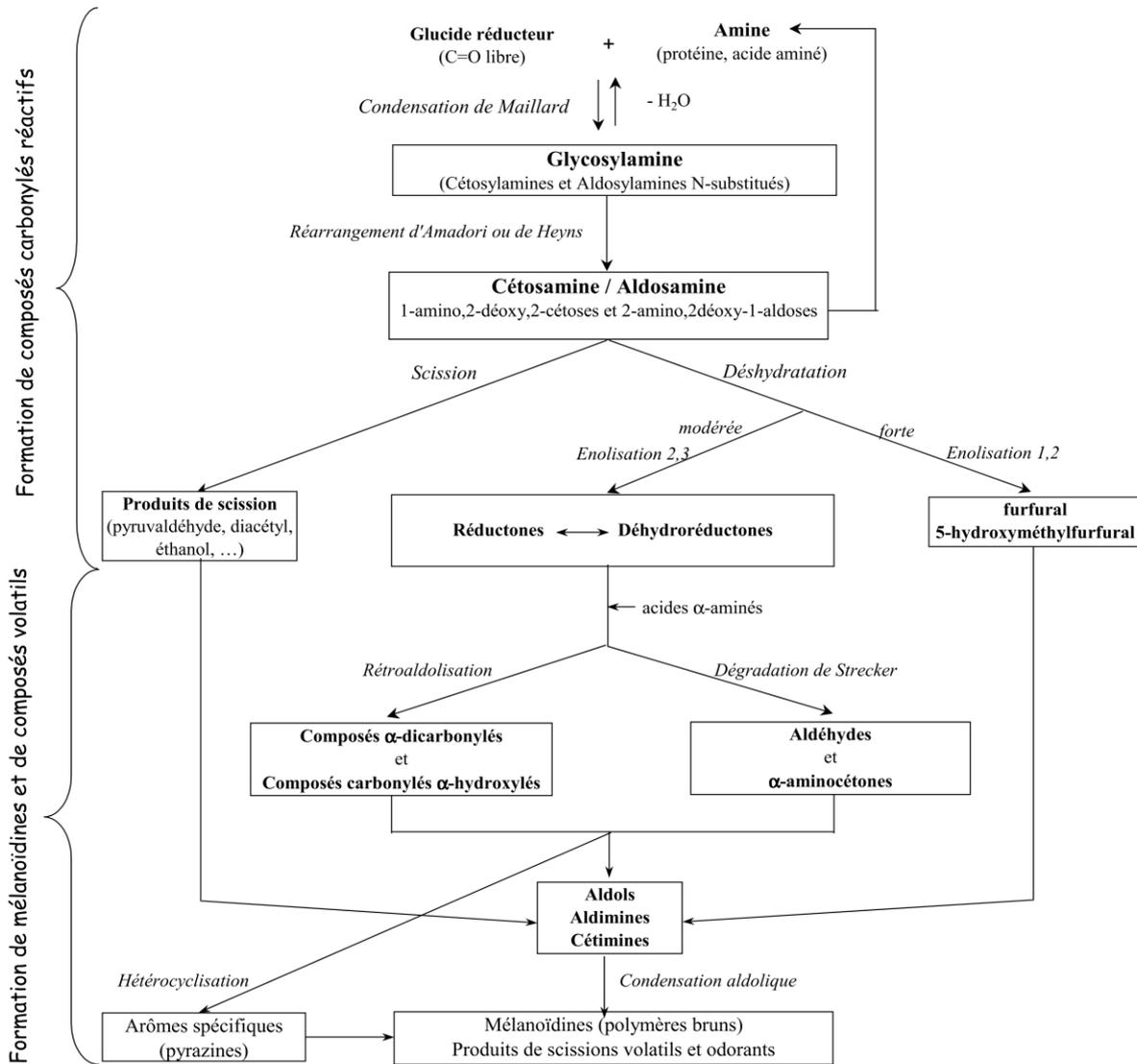


Figure 8 : Schéma simplifié de la réaction de Maillard (adapté de Hodge, 1953)

1.4.2. Les grandes étapes de la réaction

La réaction de Maillard (RM) peut être décomposée en trois étapes principales. Une première étape conduit à la glycation, correspondant à une liaison covalente entre le groupement carbonyle d'un sucre réducteur et le groupe α ou ϵ -NH₂ d'un acide aminé libre ou protéique. Puis une seconde étape (étape avancée) aboutit à la formation de produits bruns ou fluorescents appelés AGE (Advanced Glycated End products) ou PTG (Produits Terminaux de Glycation) pour décrire ceux formés *in vivo*. Dans les aliments, cette étape conduit à un mélange complexe et de composés dont certains de type pyrazines ou aldéhydes constituent souvent des molécules aromatiques, alors que d'autres molécules ont été récemment

identifiées comme potentiellement toxiques (acrylamide, furane, carboxyméthyl-lysine). Enfin, l'étape finale conduit à la polymérisation en mélanoidines.

L'étape initiale : Elle est initiée par condensation de Maillard, qui correspond à l'addition nucléophile d'une fonction amine libre d'un acide aminé sur le groupement carbonyle d'un sucre réducteur (aldose ou cétose). Le composé ainsi formé est hautement instable et perd rapidement une molécule d'eau pour donner une base de Schiff, qui va elle-même rapidement se cycliser en glycosylamine. Les glycosylamines synthétisées à partir d'acides aminés sont relativement instables et conduisent à la production de cétosamines à travers le réarrangement d'Amadori si elles proviennent de la condensation d'aldoses ou à la production d'aldosamines par le réarrangement de Heyns si elles ont été synthétisées à partir de cétooses.

L'étape avancée : Cette étape est plus complexe car elle regroupe plusieurs réactions. Ainsi, trois voies réactionnelles ont été clairement identifiées :

- La première est la principale voie de dégradation des produits d'Amadori. Elle est appelée déshydratation forte et est favorisée par les pH acides. Il s'agit d'une énolisation qui se déroule entre les carbones 1 et 2 des cétosamines, suivie d'un réarrangement qui génère une réductone. Cette réductone, en participant à la dégradation de Strecker, donne un composé dicarbonylé insaturé qui donne par cyclisation des furfuraldéhydes comme le 5-hydroxyméthylfurfural.
- La seconde voie est favorisée par des pH neutres ou légèrement basiques, elle est appelée déshydratation modérée et consiste en une énolisation entre les carbones 2 et 3 d'une glycosylamine N-substituée. Le composé intermédiaire obtenu est également une réductone. Cette réductone donne naissance, par la dégradation de Strecker à une grande variété de composés mono et dicarbonylés.

Les réductones issues des déshydratations modérées et fortes sont transformées par la dégradation de Strecker. Il y a condensation entre une réductone et un acide aminé puis libération d'un aldéhyde de Strecker. Ces aldéhydes sont des composés aromatiques importants (Ledl et Schleicher, 1990). Cette réaction est autocatalytique car une partie des réductones est régénérée et se recondense avec des acides aminés pour initier une nouvelle dégradation de Strecker. Ce mécanisme a un impact important sur l'intensification du brunissement non enzymatique.

- La troisième voie est la voie de scission des cétosamines et aldoses issues des réarrangements d'Amadori et de Heyns. La condensation aldolique des petites molécules

issues de ces scissions donne des produits odorants caractéristiques de la réaction de Maillard et des polymères.

L'étape finale : Au cours de cette étape, les réactions de polymérisation de composés très réactifs produits au cours de la seconde étape donnent naissance à des mélanoidines. Ce sont des polymères bruns à haute densité moléculaire qui sont majoritairement responsables de l'intensité du brunissement des matrices.

1.4.3. Les facteurs influençant la RM

1.4.3.1. L'activité de l'eau

La réaction de brunissement non enzymatique se développe de façon intense lorsque la teneur en eau est faible avec un maximum pour des activités de l'eau comprises entre 0,55 et 0,75. En effet, aux fortes teneurs en eau, de fait de la loi d'action des masses, la première étape de réaction étant une déshydratation, l'effet de dilution des réactants entraîne une limitation de la réaction. Aux faibles teneurs en eau, les milieux réactionnels sont pâteux et la solubilité des réactants est réduite.

1.4.3.2. La température et la durée de chauffage

La température de chauffage est un paramètre qui influence la cinétique de réaction et le type de produits formés. Les énergies d'activation des différentes étapes du brunissement non enzymatique varient selon les auteurs en fonction des gammes de températures mises en œuvre et de la méthode utilisée pour mesurer l'intensité de la RM. Ainsi, pour [Barbenti et al. \(1990\)](#) la vitesse de réaction est multipliée par deux et par cinq lorsque la température d'un mélange équimolaire de glucose/glycine est augmentée de 10 et 20 °C respectivement dans une plage de température comprise entre 70 et 90 °C. [Alais et Linden \(1987\)](#) indiquent que la vitesse de disparition de l'azote est multipliée par 20000 lorsque la température passe de 0 à 70 °C. [Anese et al. \(1998\)](#), en mesurant le dégagement de CO₂ et l'absorbance (294 nm et à 420 nm) ont confirmé que la RM s'intensifie lorsque la température et la durée de chauffage augmentent.

Des mesures de l'intensité de la RM (mesures spectrophotométriques ou dosages d'acides aminés résiduels) ont montré que la RM n'est pas totalement stoppée aux basses températures (inférieures à 40 °C) et se produit *in vivo*. Les recherches actuelles sur la RM *in vivo* tendent à comprendre les pathologies liées au vieillissement ([Gerrard, 2006](#)).

1.4.3.3. Le pH du milieu réactionnel

Le pH optimal pour le déroulement de la RM est situé entre pH 6 et pH 10 (Ashoor et Zent, 1984 ; Wolfrom et al., 1974). La RM est favorisée dans cette zone de pH, car la fonction amine est ionisée et donc réactive lorsque le pH de l'environnement est supérieur à son point isoélectrique.

Il est généralement admis que la vélocité de la RM est corrélée positivement au pH (Ashoor et Zent, 1984 ; Fox et al., 1983). La formation de composés acides inhérente à la RM a pour conséquence générale d'abaisser le pH du milieu réactionnel (Renn et Sathe, 1997) et ainsi de ralentir la vitesse de réaction.

Le pH a également un impact sur les types de composés formés et donc sur les modifications organoleptiques finales. En effet, la voie de transformation des produits d'Amadori est orientée en fonction du pH. La déshydratation forte est favorisée par les pH acides et génère des composés furfuraliques tels que le 5-hydroxyméthylfurfural, alors que la déshydratation modérée, privilégiée pour les pH neutres ou légèrement basiques est à l'origine de composés aromatiques tels que les pyrazines (Yaylayan, 1990).

1.4.3.4. Les réactants

Nature des sucres réducteurs

Seuls les sucres réducteurs c'est-à-dire possédant un groupe aldéhyde ou capable d'en former un par isomérisation sont précurseurs des RM. Pour les sucres réducteurs participants à la RM, le premier paramètre important est la concentration en sucres sous forme acyclique qui est déterminante car seuls les sucres sous forme linéaire peuvent réagir (Labuza et Baisier, 1992).

D'après une étude menée en solution modèle par Buera et al. (1987), il apparaît que l'intensité de la coloration issue de la RM à pH 6 soit fonction de la nature des sucres mis en présence de glycine lors du chauffage. Une classification de réactivité décroissante des sucres a ainsi été proposée : xylose > glucose > fructose > lactose > maltose > sucrose. Cette étude a également mis en évidence l'effet du pH sur la réactivité des sucres. En effet, à pH inférieur à 6, la tendance est inversée et la réactivité du fructose devient supérieure à celle du glucose. Ce phénomène peut être expliqué par l'influence du pH sur la répartition des formes cycliques et linéaires d'un sucre (Labuza et Baisier, 1992 ; Isbell, 1969).

La concentration en saccharose peut également être prise en compte dans l'évaluation des paramètres réactionnels initiaux car bien que n'étant pas un sucre réducteur, le saccharose peut être hydrolysé en fructose et glucose via une hydrolyse acide ou par l'action d'une invertase (De Vleeschouwer *et al.*, 2009).

Nature de l'acide aminé

Lorsque la source aminée est de nature protidique, les glucides réducteurs ne peuvent réagir que sur les fonctions aminées libres, c'est-à-dire l'acide aminé N-terminal et/ou les fonctions amines latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine). Cependant, les fonctions ϵ -aminés sont moins réactives que les α -aminés (Adrian, 1999).

Ashoor et Zent (1984) classent les acides aminés en trois groupes selon l'intensité du brunissement de modèles systèmes équimolaires glucose/acide aminé. Le groupe d'acide aminé provoquant un brunissement intense lors de la RM est celui des acides aminés basiques auxquels s'ajoute la tyrosine. Les systèmes modèles à base de thréonine, d'acide aspartique et glutamique, et de cystéine sont ceux qui montrent la plus faible intensité de brunissement. Ajandouz et Puigserver (1999) en utilisant huit acides aminés essentiels ont montré que la lysine et le tryptophane entraînent un brunissement très intense.

Il paraît difficile de dresser une relation structure/réactivité des acides aminés : des acides aminés basiques peuvent avoir des réactivités très différentes. Par ailleurs, en considérant la vitesse de disparition de l'acide aminé, Ajandouz et Puigserver (1999) ont montré que la thréonine qui développe un faible brunissement est l'acide aminé le plus réactif après la lysine. Ces mêmes auteurs ont également souligné l'influence du pH sur la réactivité de l'acide aminé : cette dernière est élevée lorsque le pH réactionnel est proche du pKa du groupement aminé. Ainsi à pH 9, lysine, arginine et thréonine ont une réactivité comparable.

Influence du ratio ose/acide aminé

Barbenti *et al.* (1990) ont déterminé par colorimétrie, les valeurs des constantes de vitesse de réaction de systèmes glucose/glycine chauffés à 70, 80 et 90 °C. En faisant varier la concentration totale en réactants (20, 30, 40 %) et le ratio molaire glucose/glycine (1:1 ; 2:1 ; 5:1), ces auteurs montrent que la constante de vitesse de la réaction augmente lorsque la concentration totale augmente mais diminue lorsque l'excès de glucose augmente. De même, Renn et Sathe (1997) ont observé un brunissement plus rapide des PRM lorsque les systèmes modèles présentaient un excès d'acide aminé.



1.4.4. Implication de la RM en agro-alimentaire

La RM est rencontrée très fréquemment dans les systèmes alimentaires qui réunissent tous les facteurs propices à cette réaction : présence de mélanges protéine – sucre, chauffage, cuisson, stockage...etc.

Si certaines conséquences de la réaction sont recherchées, d'autres ne le sont pas et peuvent poser des problèmes alimentaires. Afin d'appréhender les propriétés des PRM, de nombreux auteurs ont étudié des systèmes « modèles » composés d'un acide aminé et d'un sucre réducteur. Ce système simplifié a l'avantage de limiter la quantité de produits formés, mais présente l'inconvénient d'être plus éloigné des systèmes alimentaires comprenant plusieurs protéines et sucres.

1.4.4.1. Effets bénéfiques de la RM

Bien que certains aspects de la RM semblent éloignés de ce travail de thèse, il nous semble utile d'aborder ce sujet compte tenu de leur importance, au niveau historique de la RM mais surtout d'un point de vue technologique.

1.4.4.1.1. Génération d'arômes et de coloration

Le chauffage lors de la cuisson ou du rôtissage des aliments nécessite des températures de l'ordre de 100 à 250°C. Ces hautes températures sont propices à la RM qui génère alors de nombreux arômes (Chuyen, 1998). La RM tient en particulier un rôle prépondérant dans l'apparition d'arômes et de couleurs brunes lors de la fabrication du café (Tressl et Silwar, 1981), du chocolat (Hoskin, 1994), du pain (Danehy, 1986) et lors de nombreux autres processus rencontrés dans l'industrie agro-alimentaire.

1.4.4.1.2. Propriétés antioxydantes

Les propriétés antioxydantes des PRM qui permettent de stabiliser les produits alimentaires sont reconnues à l'heure actuelle. Différentes réactions d'oxydation se trouvent ainsi inhibées par les propriétés réductrices, chélatrices ou antiradicalaires de certains PRM. La peroxydation lipidique est une des causes principales d'altération des produits alimentaires au cours de leur stockage en présence d'oxygène. Cette oxydation peut être catalysée par des enzymes, des métaux ou être induite photo-chimiquement (Morales et Jimenez-Perez, 2001). Cette oxydation fait apparaître des radicaux libres (peroxyde, alkoxyde, hydroxyde) et forme des composés aldéhydiques affectant les propriétés organoleptiques des aliments. Des

antioxydants synthétiques tels que le BHA (hydroxyanisole butylé) et le BHT (hydroxytoluène butylé) sont actuellement utilisés pour prévenir ce phénomène mais la remise en question de leur sécurité pour la santé humaine a favorisé la recherche d'antioxydants « naturels ». En effet, il a été montré que les mélanoidines et les produits de Maillard de faible poids moléculaire ont des propriétés antioxydantes (Lee et Shibamoto, 2002). Cette activité antioxydante est le résultat de nombreux mécanismes tels que la chélation des métaux de transition, la destruction des hydroperoxydes et la neutralisation des radicaux libres (Bersuder et Hole, 2002).

1.4.4.1.3. Propriétés prébiotiques

Les mélanoidines semblent également se comporter comme des fibres alimentaires au cours de la digestion. Leur faible digestibilité et absorption dans la partie haute du tractus digestif les rendent disponibles pour une métabolisation par la flore bactérienne du colon. Des études récentes indiquent que certaines mélanoidines pourraient favoriser le développement de bactéries intestinales dites « bénéfiques » au profit de bactéries pathogènes. En d'autres termes, les mélanoidines seraient des prébiotiques au même titre que les fibres (Borrelli, et al., 2004 ; Borrelli et Fogliano, 2005).



1.4.4.1.4. Propriétés antibiotiques

Des propriétés antibiotiques ont été observées dans des systèmes composés de xylose et d'arginine ou de glucose et d'histidine (Einarsson, 1987a ; Einarsson, 1987b ; Einarsson et al., 1983). Des expériences ont été réalisées sur de nombreuses espèces bactériennes présentes dans la nourriture. Sur les vingt espèces testées, de grandes différences d'inhibition de croissance ont été obtenues. Les entérobactéries de l'espèce *Salmonella* ne sont pas inhibées alors que les bactéries *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp et *Staphylococcus* sp le sont. Par contre, la bactérie *Bacillus cereus* ne semble pas inhibée.

L'évaluation du potentiel antibiotique révèle que les PRM formés à partir d'arginine sont plus puissants que ceux dérivés de l'histidine. Les PRM ayant une action antibiotique agiraient sur la membrane cellulaire, le matériel génétique et sur les enzymes bactériennes.

1.4.4.1.5. Propriétés anti-allergènes

De nombreux aliments contiennent des allergènes portés par des protéines. Les sites responsables de cette allergénie peuvent être altérés par modification de la protéine par les sucres réducteurs (Friedman, 1996). Par exemple, les propriétés allergènes de l'inhibiteur

trypsique de la graine de soja modifié par du glucose, du lactose ou du maltose sont diminuées de 60 à 80 % par rapport à celles de l'inhibiteur non modifié (Oste *et al.*, 1990).

1.4.4.1.6. Propriétés antimutagènes

Les PRM peuvent inactiver les composés mutagènes. Des amines hétérocycliques ont ainsi pu être inactivées par des produits issus de systèmes composés de lysine et de xylose chauffés à 100 °C et à pH 9,0 pendant 1 h (Yen et Hsieh, 1995). Un des mécanismes proposés pour cette activité serait une inactivation chimique des composés mutagènes, les produits de la RM réagissant avec eux pour conduire à des produits présentant des propriétés différentes (Friedman, 1996).

1.4.4.2. Effets néfastes de la RM

La RM peut réduire de façon significative la valeur nutritionnelle de la nourriture par son action sur des acides aminés essentiels et par la production de composés anti-nutritionnels et toxiques (O'Brien et Morrissey, 1989). La grande variété des produits issus de la réaction de Maillard peut par ailleurs conduire à la formation de composés présentant des propriétés antagonistes comme les composés mutagènes et les composés antimutagènes.

1.4.4.2.1. Réduction de la valeur nutritionnelle

Par son action sur le groupe aminé libre des lysines, la RM engendre la destruction de cet acide aminé essentiel. Par ailleurs, cela a aussi pour conséquence une diminution de l'hydrolyse des protéines par la trypsine conduisant ainsi à une moindre digestibilité (Kato *et al.*, 1983 ; Darewicz *et al.*, 1998).

1.4.4.2.2. Génération de composés toxiques

La RM peut conduire à la formation de nombreux composés toxiques constitués en particulier d'amines hétérocycliques potentiellement mutagènes et carcinogènes (Friedman, 1996).

De nombreuses études utilisant le test de mutagénicité, dit test de « Ames », (Maron et Ames, 1983 ; Ames *et al.*, 1975) ont été réalisées sur des systèmes modèles composés d'un acide aminé et d'un sucre. Ces études ont révélé la présence de produits mutagènes dans des systèmes composés de ribose et de lysine (Cuzzoni *et al.*, 1989 ; Gazzani *et al.*, 1987), de glucose et de lysine (Shinohara *et al.*, 1980) ou de glucose et d'arginine (Powrie *et al.*, 1981). Des propriétés cytotoxiques ont été observées dans des systèmes composés de glucose et de lysine ou de fructose et de lysine (Jing et Kitts, 2000) ; des propriétés clastogéniques ont été

mis en évidence dans des systèmes composés de ribose et de lysine (Vagnarelli *et al.*, 1991) ou de glucose et de lysine (Kitts *et al.*, 1993) révélant la présence de composés toxiques dans les produits issus de la RM.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. La souche bactérienne utilisée

2.1.1.1. Origine de la souche DM19

L'étude est réalisée principalement avec la souche DM19 appartenant à la collection des bactéries lactiques du Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie (LBMB) de l'université d'Oran 1 Ahmed Benbella. La souche DM19 a été isolée du lait de chamelle et est conservée par congélation à -80 °C après addition dans le milieu de culture de glycérol à une concentration finale de 15 % (v/v). Cette souche a été choisie en raison de son activité protéolytique préalablement étudiée au laboratoire (Djellouli, 2010).

2.1.1.2. Vérification de la pureté de la souche DM19

La pureté de la souche DM19 est vérifiée par ré-isolément sur milieu solide MRS par stries selon la technique des quadrants, suivie d'une caractérisation macroscopique (aspect et couleur des colonies) et microscopique par coloration de Gram (forme et le mode d'association des bactéries ainsi que leur caractère Gram positif ou négatif). Le caractère catalase négatif est également recherché en étalant une colonie de la souche sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10V. La présence de l'enzyme (catalase) se manifeste par un dégagement de bulles de gaz.

2.1.2. Souches indicatrices : cultures bactériennes et milieux

Les souches indicatrices utilisées pour le test antimicrobien sont mentionnées ci-dessous (Tableau 9). L'activité antimicrobienne est testée contre 21 souches indicatrices sélectionnées selon leur effet vis-à-vis de la santé (probiotiques ou pathogènes) et du produit alimentaire (microorganismes d'altération). Ces souches nous sont procurées par l'institut des sciences et de technologie des aliments et nutrition ICTAN (Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición) de l'université Complutense de Madrid (Espagne). Toutes les souches utilisées sont conservées à -80 °C dans un mélange glycérol (30 %), bouillon cerveau-cœur (70 %). Pour une conservation de courte durée, elles sont gardées sur une gélose Tryptone-Soja à 4 °C . Avant leur utilisation, les bactéries sont revivifiées par deux repiquages successifs dans un bouillon BHI pendant 18 h à la température optimale de chaque microorganisme (Tableau 9).

Tableau 9 : Souches bactériennes indicatrices et leurs conditions de culture

| Souches indicatrices | Origine | Milieu standard | Température de croissance (°C) |
|----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | CECT | BHI | 30 |
| <i>Aspergillus niger</i> | CECT 2088 | BHI | 30 |
| <i>Bacillus cereus</i> | CECT 148 | BHI | 37 |
| <i>Bacillus coagulans</i> | CECT 56 | BHI | 37 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | DSMZ | BHI | 37 |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i> | CECT 847 | BHI | 30 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | CECT 401 | BHI | 37 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | CECT 486 | BHI | 37 |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | CECT 11364 | BHI (3 % NaCl) | 20 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | DSM 20477 | BHI | 37 |
| <i>Escherichia coli</i> | CECT 515 | BHI | 37 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | DSM 20075 | BHI | 37 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | CECT 4032 | BHI | 37 |
| <i>Penicillium expansum</i> | DSMZ | BHI | 30 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | CECT 4898 | BHI | 30 |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | CECT 4300 | BHI | 37 |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> | CECT | BHI | 30 |
| <i>Shigella sonnei</i> | CECT 4887 | BHI | 37 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | CECT 240 | BHI | 37 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | CECT 511T | BHI (3% NaCl) | 37 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | CECT 4315 | BHI | 37 |

2.1.3. Les coproduits marins : origine et collecte

Les coproduits qui ont servi à la réalisation de ce travail sont constitués par le muscle de Calmar (*Loligo vulgaris*), les sous-produits (muscle, carapace et tête) dérivés du traitement des crevettes blanches du Pacifique (*Penaeus vannamei*) et des crevettes roses (*Penaeus notialis*). Ces coproduits sont générés lors de transformation industrielle. Ils ont été gracieusement fournis par la société Angulas Aguinaga (Burgos, Espagne). Après leur récolte, les coproduits ont été stockés à – 20 °C jusqu'à utilisation. La gélatine de peau de poisson

(*Sebastes* spp.) de type A provenant de la firme Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany) est également utilisé comme coproduit dans notre travail.

2.2. Méthodes

2.2.1. Identification génotypique de la souche DM19

L'identification génotypique de la souche DM19 est réalisée au niveau du laboratoire de génomique CIB (Centro de Investigaciones Biológicas) de Madrid (Espagne). L'ADN est extrait de la culture bactérienne selon la méthode de [Vincent et al. \(1998\)](#).

Le protocole se base sur la lyse cellulaire par action de la mutanolysine, du lysozyme, de la protéinase K et de l'ARNase suivie par une purification de l'ADN sur microcolonne. Le gène de l'ADNr 16S est ensuite amplifié par PCR avec des amorces correspondant à des régions conservées (consensus) en 5' et en 3' du gène. La séquence de l'amplicon obtenu déterminée en utilisant la plateforme d'analyse génomique Illumina MiSeq ([Goodwin et al., 2016](#)), puis comparée avec les séquences d'ADN ribosomiques 16S répertoriées sur les banques de données informatiques NCBI. En utilisant la méthode heuristique BLAST, l'alignement de la séquence d'ADNr 16S de la souche analysée avec celles des séquences les plus apparentées a permis d'établir le pourcentage d'homologie.

2.2.2. Préparation de l'extrait enzymatique

Les bactéries lactiques produisent des protéases exocellulaires qui sont facilement récupérables dans le surnageant de culture. Pour ce faire, 1 litre de bouillon MRS tamponné par le tampon phosphate (0,1 M ; pH 7) et additionné de lait écrémé à 2 % (v/v) est inoculé par la souche DM19 puis incubé pendant 24 h à 30 °C. La culture est ensuite centrifugée à 16000xg pendant 10 min à 4 °C (Sorvall, model RT 6000B). Le surnageant récupéré, contenant l'activité protéolytique, est filtré à travers un filtre de 0,22 µm. Les filtrats sont lyophilisés, et la poudre obtenue est stockée à - 20 °C jusqu'à utilisation pour la caractérisation biochimique de l'extrait brut ainsi que pour l'hydrolyse des protéines de crevettes.

2.2.2.1. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique de l'extrait enzymatique (filtrat) est mesurée en utilisant le substrat chromogène, l'azocaséine, selon la méthode de [Park et al. \(1995\)](#). L'azocaséine est connue comme étant le substrat spécifique de certains groupes d'enzymes telles que les protéases

alcalines et aspartiques (Parente *et al.*, 2010). L'hydrolyse de l'azocaséine par les protéases conduit à la libération du produit "azo" donnant une coloration rouge avec une absorption maximale à 440 nm. Cette coloration est proportionnelle au taux d'azo libéré dans le milieu réactionnel.

Cette méthode consiste à mélanger un volume de la solution d'extrait enzymatique (20 mg/mL) avec un volume de tampon phosphate de potassium (0,2 M ; pH 7) et un volume de solution d'azocaséine (0,5 % m/v) préparée dans le même tampon. Après incubation au bain-marie à 40 °C pendant 8 h, la réaction est arrêtée par addition de TCA (12 %). Pour ce faire, un volume du milieu réactionnel est mélangé avec un volume de TCA (12 %). Les protéines non hydrolysées précipitent alors en présence de la solution acide. Une centrifugation de 5000xg pendant 30 min permet de les sédimenter. Un échantillon (750 µL) de surnageant est mélangé avec 250 µL de NaOH (0,5 M) et le mélange résultant est soumis à une lecture au spectrophotomètre à 440 nm. Le blanc est préparé de la même manière que les échantillons sauf que le surnageant de culture est ajouté après addition du TCA.

2.2.2.2. Détermination de l'activité spécifique

En utilisant le substrat azocaséine, l'unité d'activité protéolytique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 µg d'azo à 440 nm par min d'incubation dans les conditions définies. Le coefficient d'extinction de l'azo-caséine $\epsilon'_{1\%/440\text{nm}} = 37 \text{ L.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ est utilisé pour calculer l'activité enzymatique. L'activité spécifique est mesurée par le nombre d'unités d'activité protéasique par mg de protéines contenues dans 1 mL d'extrait selon la formule suivante (Desmazeaud et Vassal, 1979) :

$$\text{Activité spécifique (U/mg)} = \text{Activité enzymatique (U/mL)} / \text{Protéines totales (mg/mL)}$$

2.2.2.3. Caractérisation biochimique de l'extrait enzymatique

2.2.2.3.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité des protéases

L'effet du pH sur l'activité protéolytique est déterminé à des pH allant de 2 à 11 à 40 °C. Tous les tampons sont utilisés à une concentration de 200 mM. Le tampon KCl-HCl pour le pH 2 ; tampon glycine-HCl pour le pH 3 ; tampon acétate pour les pH 4 à 5 ; tampon

phosphate pour les pH 6 à 8 ; tampon glycine-NaOH pour les pH 9 à 10 ; tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ pour le pH 11.

La stabilité de l'enzyme est étudiée par préincubation pendant 30 min à 40 °C aux différents pH. Les activités résiduelles sont mesurées à pH 7 et à 40 °C en utilisant le substrat azocaséine selon la méthode décrite précédemment. L'enzyme non préincubée est considérée comme témoin).

2.2.2.3.2. Effet de la température sur l'activité et sur la stabilité des protéases

L'effet de la température sur l'activité protéolytique de l'extrait est étudié en maintenant le pH à 7 et en faisant varier la température de 20 à 80 °C (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70°C, 80 °C) pendant une durée d'incubation de 8 h au bain-marie.

Afin de tester la température sur la stabilité de l'activité protéolytique, l'extrait enzymatique est préincubé sans substrat à différentes températures pendant 30 min. L'activité protéolytique résiduelle des solutions enzymatiques est ensuite mesurée à pH 7 et à 40 °C en présence du substrat. L'enzyme non préincubée aux différentes températures est considérée comme témoin.

2.2.2.3.3. Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique

L'activité protéolytique est testé pendant 30 min et à 40 °C dans le tampon phosphate (0,2 M ; pH 7) en présence de solutions de CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , MnCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 à concentration finale de 10 mM. Après incubation, l'activité protéolytique résiduelle est évaluée comme décrit précédemment en utilisant l'azocaséine comme substrat. L'enzyme non préincubée est considérée comme témoin.

2.2.2.3.4. Effet des inhibiteurs sur les protéases

L'activité enzymatique de l'extrait brut est étudiée en présence de solutions du phénylméthyl sulfonyl fluoride (PMSF) à 10 mM, l'acide iodoacétique à 10 mM, l'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA) à 10 mM et la pepstatine A à 1 mM. L'extrait enzymatique préalablement préparé dans le tampon phosphate (0,2 M ; pH 7) est préincubé avec les solutions des inhibiteurs (1V : 1V) pendant 30 min à 40 °C. Le substrat azocaséine est ensuite ajouté et le mélange est laissé à incuber 8h à 40°C pour déterminer l'activité protéolytique résiduelle. L'enzyme non préincubée est considérée comme témoin.

2.2.2.4. Détermination des constantes cinétiques

Une enzyme en phase homogène en présence d'un substrat en concentration saturante, suit généralement la loi cinétique de Michaëlis-Menten rappelée ci-dessous :

$$V = \frac{V_{max} \cdot C_S}{K_m + C_S} = \frac{K_{cat} \cdot E_0 \cdot C_S}{(K_m + C_S)}$$

Expression dans laquelle C_S représente la concentration du substrat; K_m la constante de Michaëlis et k_{cat} la constante catalytique de l'enzyme pour ce substrat; E_0 la concentration d'enzyme. V_{max} est égale à la vitesse maximale de conversion du substrat lorsque ce dernier est en quantité suffisante pour ne pas limiter la cinétique réactionnelle ($C_S \gg K_m$). On est alors en condition de "substrat saturant" et la vitesse mesurée est proportionnelle à la concentration d'enzyme.

Les constantes V_{max} et K_m , sont obtenues en préparant le substrat l'azocaséine à différentes concentrations (0,005 %, 0,010 %, 0,021 %, 0,042 %, 0,083 %, 0,167 %, 0,333 %, 0,667 %, 1,333 %, 1,667 %, 2 %, 2,333 %, 2,667 %) et en maintenant constante la concentration de l'extrait enzymatique à 6,7 mg/mL. Ces séries d'expériences sont réalisées selon les conditions optimales déterminées préalablement ([Chapitre : 2.2.2.1](#)). Les paramètres V_{max} et K_m sont calculés à partir de la représentation des inverses de Lineweaver-Burck en utilisant le programme SigmaPlot 9.0.

2.2.3. Hydrolyses enzymatiques

Les hydrolyses à l'échelle du laboratoire se sont déroulées à l'institut ICTAN (Madrid, Espagne) au laboratoire de valorisation des produits de la pêche selon le processus utilisé par [Giménez et al. \(2009\)](#) avec quelques modifications. Le but de cette étude est d'hydrolyser les protéines contenues dans les coproduits marins par le biais de protéases de façon à libérer les peptides en vue d'une valorisation ultérieure. La genèse de produits d'intérêt doit être répétable et le procédé maîtrisé. Il est donc important de travailler dans des conditions précises et contrôlées de température et de pH adaptées à l'enzyme utilisée. C'est pourquoi la méthode du pH-Stat est utilisée dans cette étude pour réaliser toutes les hydrolyses enzymatiques. La technique du pH-Stat utilisée a été développée par [Adler-Nissen \(1986\)](#). Elle consiste à maintenir le pH constant par ajout automatique de soude (NaOH) lors de la réaction enzymatique. La quantité de base consommée permet de calculer le degré d'hydrolyse.

Description de l'appareil

Le titrateur (TIM 84, Radiometer Analytical, SAS, France) délivre une quantité d'ions OH^- proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques rompues. En milieu basique ou neutre, le groupe amine sera plus ou moins dissocié, libérant ainsi des ions H^+ qui seront neutralisés par les ions OH^- provenant de la cuve d'alimentation en soude du pH-Stat (Figures 9 et 10).

Tant que le pH reste constant, il existe une relation linéaire entre le nombre de liaisons peptidiques coupées et le nombre de moles de base apportées par le pH-Stat pour maintenir le pH constant.

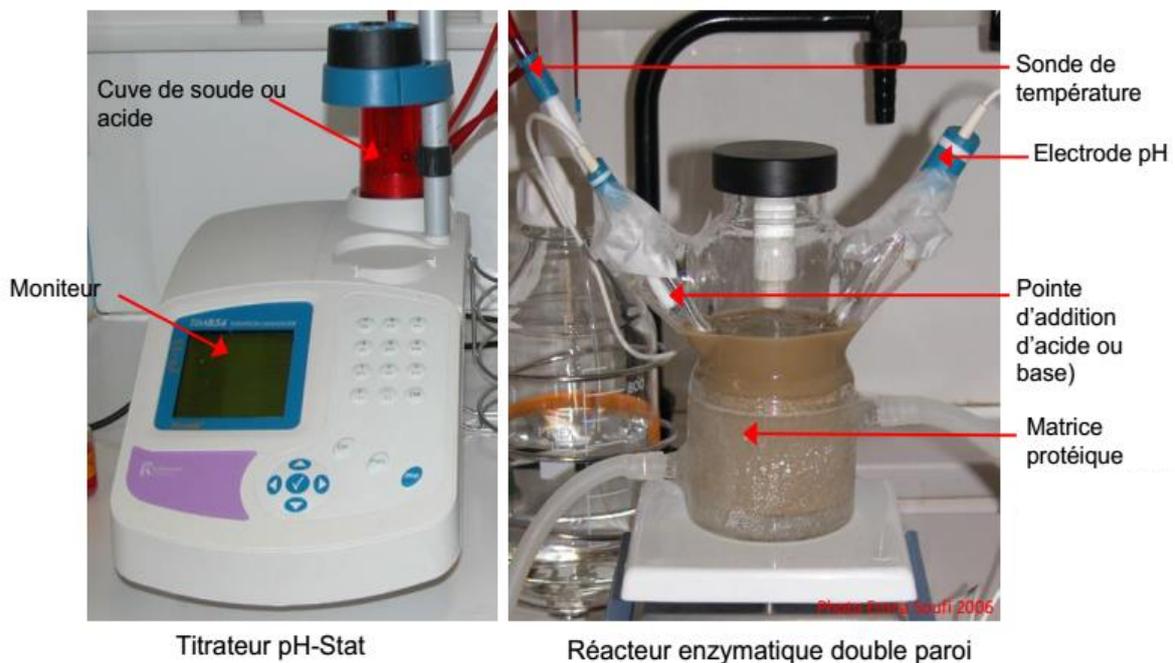


Figure 9 : Équipement utilisé pour la régulation du pH

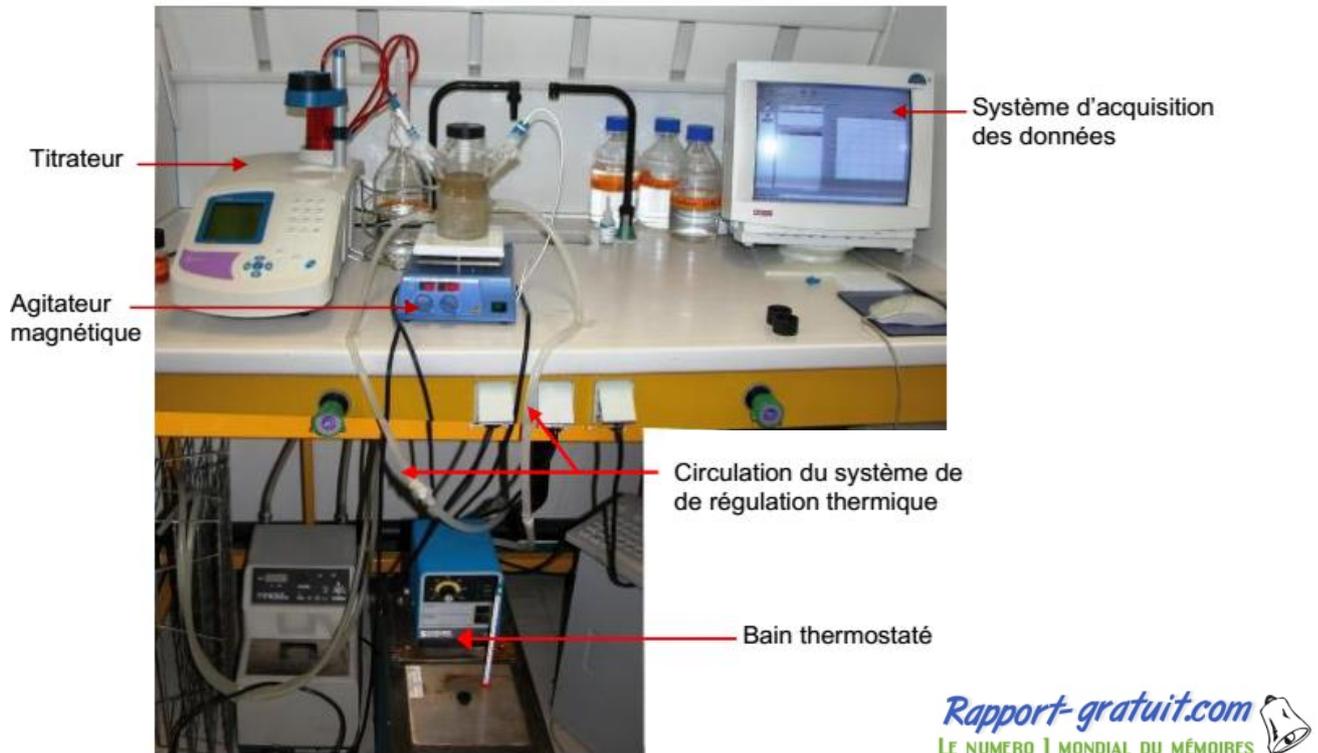


Figure 10 : Installation réalisée au laboratoire pour l'hydrolyse enzymatique

2.2.3.1. Hydrolyse par les protéases de la souche DM19

Préparation des substrats protéiques

Dans un premier temps, la carapace ainsi que l'eau de cuisson de la crevette blanche du Pacifique (*Penaeus vannamei*) (Figures 11 et 12) sont choisies comme substrats protéiques pour la réaction d'hydrolyse à l'aide des protéases de la souche DM19. Les protéines d'eau de cuisson sont obtenues en homogénéisant 500 g de crevette (après avoir été laissée décongeler à 4 °C) dans 1000 mL d'eau distillée. Après cuisson à 100 °C pendant 2 à 3 min, les crevettes ont été enlevées, et l'eau contenant les protéines a été récupérée, refroidie puis lyophilisée. Le lyophilisat ainsi obtenu est stocké à -20 °C jusqu'à son utilisation pour l'hydrolyse.



Figure 12 : Eau de cuisson de la crevette

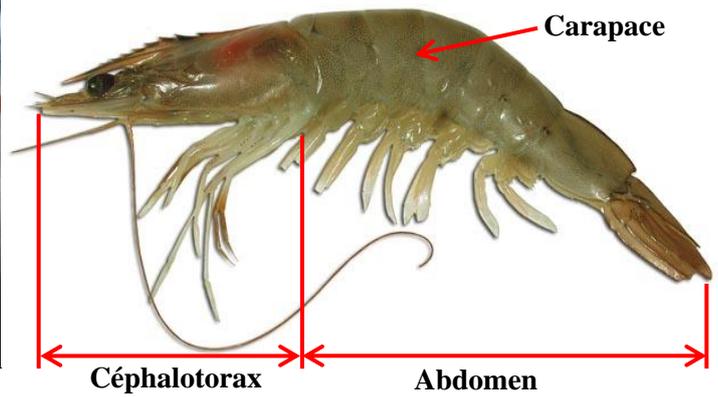


Figure 11 : Les différentes parties de la crevette

Déroulement de l'hydrolyse

Avant les opérations d'hydrolyse, les matières premières sont mises à décongeler toute une nuit dans un réfrigérateur à 4 °C. Pour chaque réaction 50 g de matière première sont introduites dans le réacteur enzymatique à double enveloppe de capacité 300 mL, en rajoutant 150 mL de solution de tampon phosphate (0,2 M ; pH 7). Le système est mis en agitation et amené à la température voulue à l'aide de la circulation d'eau dans la double paroi grâce à un bain-marie thermostaté (Figure 13). La température à l'intérieur du système est mesurée à l'aide de la sonde de température du pH-Stat

Dès que la température optimale d'action de l'enzyme est atteinte (40 °C), le pH initial du substrat est mesuré puis l'ajout manuel de NaOH (0,1N) ou bien HCl (0,1N) est réalisé jusqu'à l'obtention du pH voulu pour réaliser l'hydrolyse. La réaction d'hydrolyse est alors initiée en rajoutant 2 g d'extrait enzymatique de la souche DM19. Toutes les réactions d'hydrolyse sont conduites à 40 °C et pH 7. Le système est maintenu en agitation pendant 2 h en effectuant les prélèvements à différents moments de l'hydrolyse. Le pH est contrôlé par l'électrode et régulé par la pointe d'addition du titrateur (TIM 84, Radiometer Analytical, SAS, France) (Figure 13).

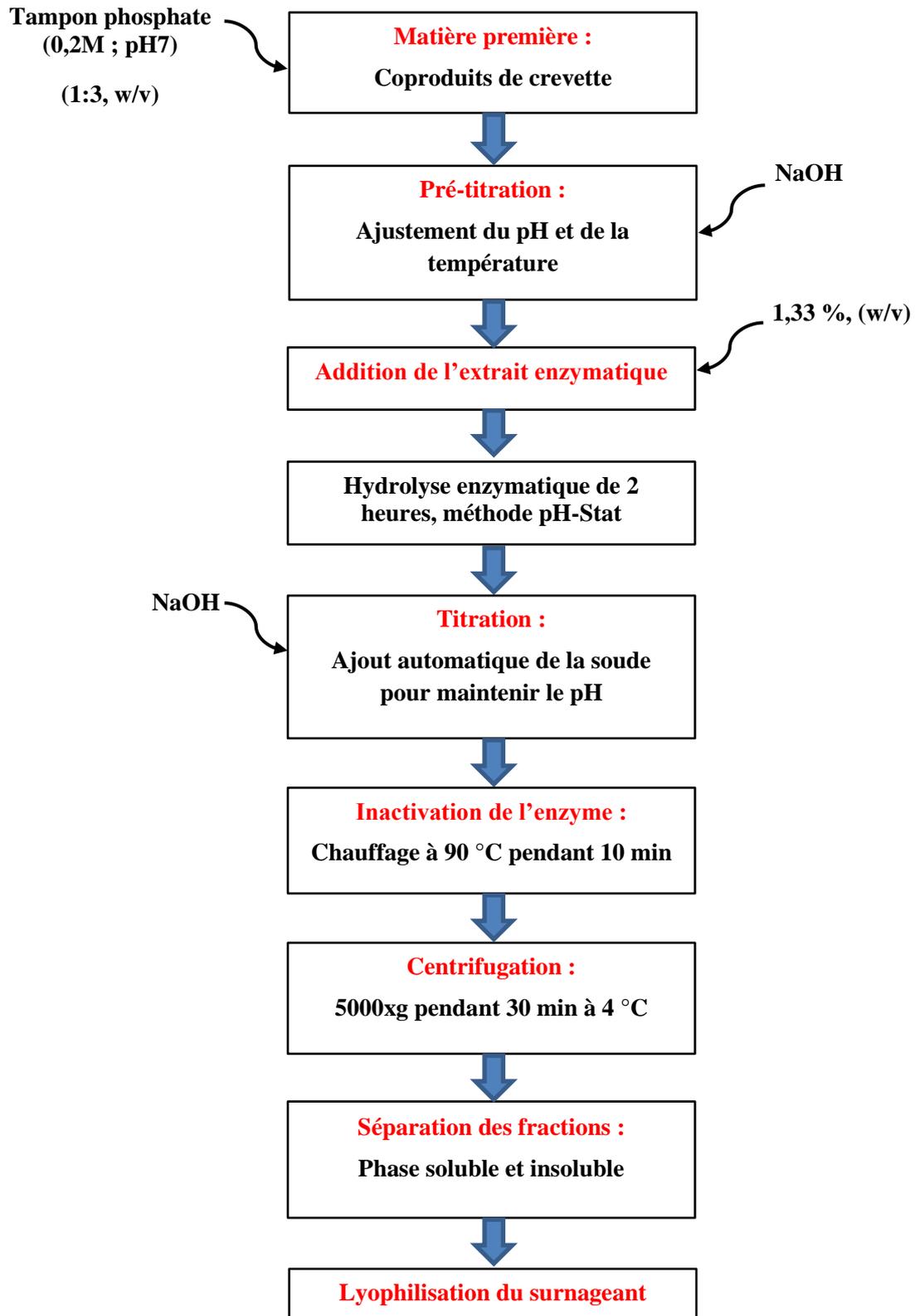


Figure 13 : Étapes de l'hydrolyse enzymatique (2h) des coproduits de crevette par les protéases de la souche DM19

2.2.3.2. Hydrolyse par les enzymes commerciales et endogènes

Les coproduits marins choisis pour cette étude ainsi que leurs conditions d'hydrolyse sont mentionnés dans le [tableau 10](#). Toutes les enzymes commerciales utilisées pour l'hydrolyse de ces coproduits ([Figure 14](#)) sont fournies par la firme Novozymes SA (Danemark).

Les coproduits marins sont mis à décongeler la veille puis broyés dans une broyeuse de type Blender (Waring Commercial, USA). Comme pour la réaction précédente, le broyat obtenu de chaque matière première (20 g) est introduit dans un bioréacteur à double enveloppe dans lequel l'hydrolyse va avoir lieu, puis dilué avec de l'eau distillée (60 mL) et agité. L'ensemble est chauffé à la température optimale d'activité de l'enzyme.

Tableau 10 : Conditions opératoires de l'hydrolyse des coproduits marins

| Hydrolysats | Coproduct utilisé | Enzyme | Degré d'hydrolyse | Conditions de la réaction | | |
|-------------|--|-------------------|-------------------|---------------------------|--------|-------------|
| | | | | pH | T (°C) | Temps (min) |
| SQES | Muscle de Calmar (<i>L.vulgaris</i>) | Espérase | 20,12 | 8 | 50 | 90 |
| SQAP | Muscle de Calmar (<i>L.vulgaris</i>) | Protéase alcaline | 45,98 | 8 | 50 | 90 |
| SQTR | Muscle de Calmar (<i>L.vulgaris</i>) | Trypsine | 21,50 | 8 | 37 | 90 |
| SHAP | Queue, carapace et tête de crevette (<i>P.vannamei</i>) | Protéase alcaline | 13,47 | 8 | 50 | 90 |
| SHNP | Queue, carapace et tête de crevette (<i>P.vannamei</i>) | Protéase neutre | 9,67 | 7,5 | 50 | 90 |
| SHEE | carapace et tête de crevette (<i>P.vannamei</i>) | Enzymes endogènes | ND | 7,5 | 40 | 360 |
| FGTR | Gélatine de peau de poisson (<i>Sebastes.spp.</i>) de type A | Trypsine | 10,90 | 9 | 38 | 360 |
| SHPR | Muscle de crevette (<i>P.notialis</i>) | Protamex | 6,68 | 7,5 | 50 | 90 |

ND : non déterminé

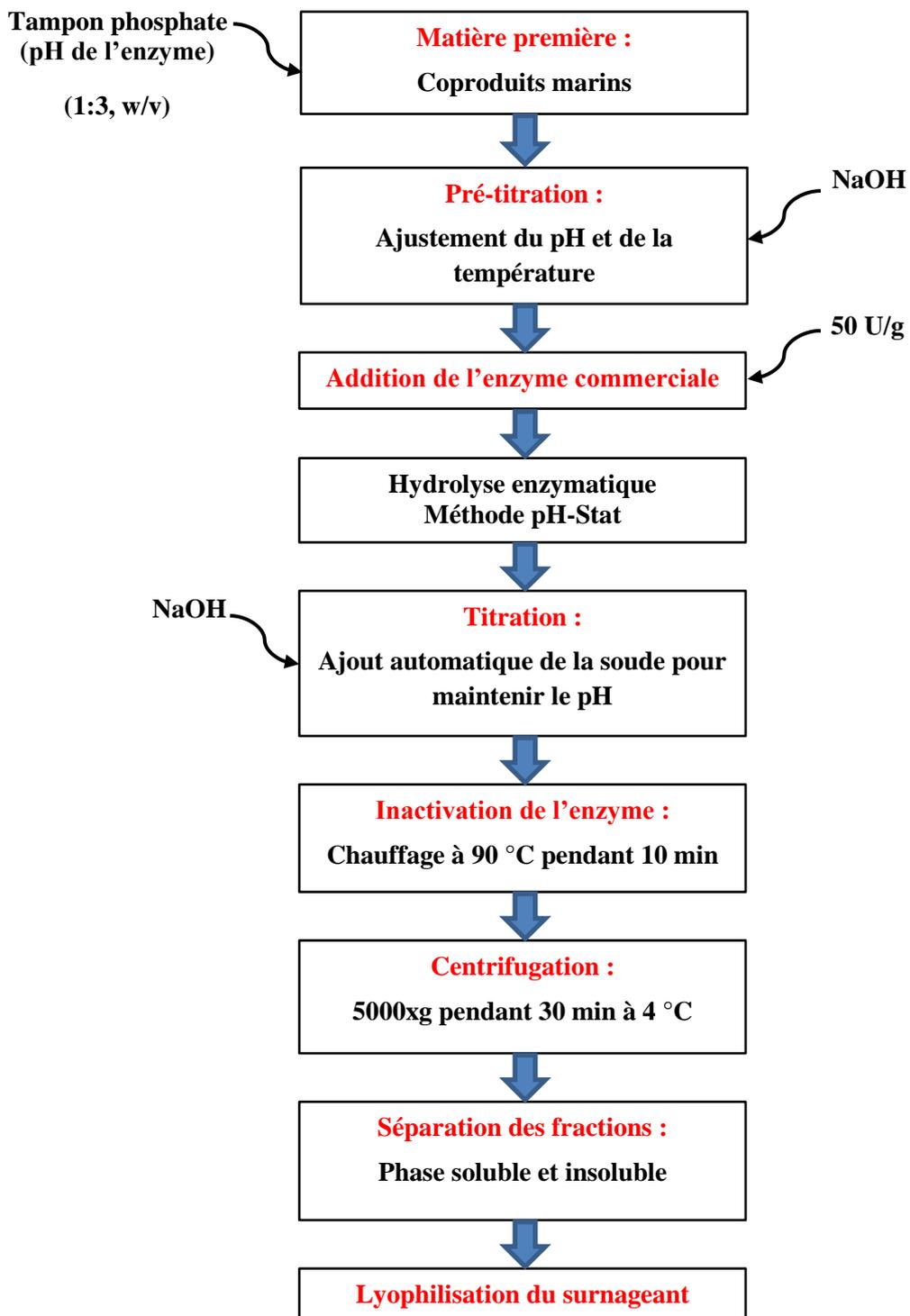


Figure 14 : Étapes de l'hydrolyse enzymatique des coproduits marins par les protéases commerciales

Ensuite, le pH est ajusté au pH d'activité optimale de l'enzyme. Lorsque les conditions d'activité optimale (décrites dans le [tableau 10](#)) sont atteintes, l'enzyme est ajoutée à 50 U par gramme de la matière première. L'hydrolyse est alors réalisée sous agitation en maintenant les conditions optimales de pH et de température de chaque système jusqu'à la fin de la réaction d'hydrolyse ([Figure 14](#)).

2.2.3.3. Suivi de la cinétique des hydrolyses

Le taux de l'hydrolyse est quantifié par le degré d'hydrolyse (DH) qui est déterminé par le nombre de liaisons peptidiques coupées sur le nombre total de liaisons peptidiques. Une protéine intacte a une valeur de DH égale à 0 % tandis qu'une protéine totalement hydrolysée en acides aminés libres a une valeur de DH égale à 100 %. Le suivi de la cinétique des hydrolyses se fait donc par le calcul du degré d'hydrolyse (DH).

2.2.3.4. Calcul du degré d'hydrolyse

Afin de normaliser nos données, l'évolution de l'hydrolyse est exprimée à l'aide du degré d'hydrolyse (DH), dont l'équation, déterminée par [Adler-Nissen \(1986\)](#) est la suivante :

$$DH = \frac{V \cdot N}{\alpha \cdot Mp \cdot h_{tot}} \times 100$$

Avec :

V : Volume de la soude versée durant l'hydrolyse (mL)

N : Normalité de la soude (mM)

α : Facteur de dissociation des groupements α -NH₂

Mp : Masse protéique dans la matière fraîche (g) déterminée par la teneur en azote total (% N) x 6,25 ([Crooke et Simpson, 1971](#))

h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques dans la protéine (ég.g.Kg⁻¹).

2.2.3.5. Arrêt des réactions d'hydrolyse

Pour toutes les hydrolyses effectuées, la réaction est arrêtée par inactivation thermique des enzymes à 90 °C pendant 10 min.

2.2.3.6. Traitements post-hydrolyses

Après inactivation de la réaction enzymatique et refroidissement de la préparation à température ambiante, cette dernière est centrifugée à 5000xg pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant, qui constitue l'hydrolysate, est récupéré et lyophilisé pendant 3 jours. Les lyophilisats sont broyés au mortier et conservés à -20 °C dans des flacons en plastique avant leur analyse.

2.2.4. Réaction de Maillard

La présente étude concerne la réaction de Maillard par traitement thermique en vue de modifier et par conséquent améliorer les activités biologiques des hydrolysats de crevette. Afin de répondre à cet objectif, nous avons choisi de travailler avec la glucosamine comme précurseur à cette réaction chimique. L'idée de ce choix de substrat s'inscrit également dans la valorisation de la chitine (unités de répétition de D-glucosamine) comme étant l'un des constituants majoritaires de l'exosquelette des crustacés.

2.2.4.1. Préparation des PRM

La glycation non-enzymatique des peptides contenus dans les hydrolysats de protéines de carapace et d'eau de cuisson de crevette est réalisée suivant la méthode décrite par [Sumaya-Martinez, \(2004\)](#). Pour ce faire, 100 mg de chaque type d'hydrolysats lyophilisé est dissous dans 40 mL de tampon phosphate (0,2 M ; pH 8), puis 800 mg de D-chlorhydrate de glucosamine (Sigma-Aldrich, China) sont ajoutés. Les mélanges ainsi préparés sont ensuite transférés dans des tubes Pyrex hermétiquement fermés. Ces tubes sont par la suite incubés au bain-marie à 100 °C sous agitation continue (120 rpm). Des prélèvements sont effectués à 40, 60, 120 et 180 min. Ils sont immédiatement refroidis dans un bain de glace afin de stopper la réaction. Le contrôle à la réaction est préparé avec les hydrolysats en l'absence de glucosamine. Les échantillons sont ensuite lyophilisés puis stockés à -20 °C avant leur analyse.

2.2.4.2. Méthodes de mesure de la RM

Le traitement thermique lors d'une RM est à l'origine de nombreuses réactions chimiques entraînant la disparition de composés initiaux ou/et la synthèse de nouveaux composés.

Généralement, l'analyse en spectrophotométrie est la méthode la plus utilisée pour suivre la RM où les mesures sont réalisées en lumière visible à 420 nm (dosage des produits bruns

responsables de la coloration brune) ou ultraviolette à 294 nm (dosage des intermédiaires incolores). Contrairement à cette méthode, la spectrofluorescence est jugée, cependant, utile en raison de sa plus haute sensibilité vis-à-vis des produits fluorescents générés lors de la réaction. Il existe d'autres techniques qui permettent d'apprécier l'évolution de la RM telles que la modification du pH du milieu, le dosage des fonctions amines bloquées ainsi que des acides aminés détruits.

2.2.4.2.1. Mesure du pH

Le pH des échantillons prélevés à différents temps (0, 40, 60, 120 et 180 min) est mesuré directement à l'aide de l'électrode du pH-mètre (Metrohm 827 pH lab, Swiss).

2.2.4.2.2. Dosage des PRM formés par spectrophotométrie

L'intensité de la RM est estimée par mesure de l'absorbance aux ultra-violets ainsi que le degré de brunissement des échantillons selon la méthode décrite par [Ajandouz et al., \(2001\)](#). Avant de commencer les analyses, les échantillons les plus concentrés sont dilués avec de l'eau Milli-Q® (Millipore, Molsheim, France). Les densités optiques des PRM sont prises par spectrophotomètre (UV-Visible spectrophotometer model UV-1601 from Shimadzu) à 294 nm (comme indice de la formation de produits intermédiaires du brunissement non enzymatique), et à 420 nm (en tant qu'indice des polymères bruns formés).

2.2.4.2.3. Dosage des composés fluorescents par spectroscopie de fluorescence

Principe de la spectrofluorimétrie

La spectrofluorimétrie permet d'identifier l'ensemble des substances fluorescentes en solution. L'analyse de l'échantillon s'effectue en balayant simultanément une large plage de longueurs d'onde d'excitation et d'émission, ce qui permet la quantification de chaque composé. Le principe de cette méthode repose sur le fait que de nombreux composés organiques et inorganiques, en solution ou solide, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet. Ce phénomène appelé fluorescence permet de caractériser la substance analysée, puisque l'intensité maximale de fluorescence correspond à un couple particulier de longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

Description de l'appareil

L'appareil utilisé est le spectrofluorimètre Synergy MX (BioTek) (Figure 15).

Une source lumineuse composée d'une lampe pulsée au xénon, émet une lumière qui est rendue rectiligne par la présence d'une lentille, la lumière ainsi émise est sélectionnée à une longueur d'onde précise grâce à un monochromateur d'excitation, ce rayon (I_1) incident va ensuite exciter la molécule fluorescente (généralement un composé possédant un cycle aromatique) présente au sein de l'échantillon. Afin de revenir à son état normal, la molécule ainsi excitée va émettre l'énergie reçue sous forme d'une intensité lumineuse (I_2). L'intensité lumineuse est schématisée sur l'enregistreur en fonction de la longueur d'onde, lue par le détecteur et sélectionnée par le monochromateur d'émission.



Figure 15 : Spectrofluoromètre Synergy MX (BioTek) utilisé

La fluorescence des PRM est déterminée selon la méthode décrite par [Morales and Jimenez-Perez \(2001\)](#). Avant de commencer l'analyse, les solutions de PRM sont diluées 30 fois avec de l'eau Milli-Q®, puis 300 μ L de chaque échantillon sont placés dans microplaque à 96 puits. L'intensité de la fluorescence est ensuite mesurée aux longueurs d'ondes d'excitation de 340 nm et d'émission de 440 nm au spectrofluorimètre Synergy MX (BioTek).

2.2.4.2.4. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

Contrairement aux méthodes d'analyse par réaction colorée ou enzymatique qui réagissent avec une molécule donnée, l'analyse par infrarouge est une méthode d'analyse structurale qui révèle la nature des liaisons entre atomes dans une molécule et d'en caractériser les groupements moléculaires afin d'obtenir de nombreuses informations sur la conformation et les éventuelles interactions.

Principe

La technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) est basée sur l'identification des fréquences de vibration des liaisons chimiques (fonctions alcool, acides, méthyles, méthylène...etc.). Dans les molécules, les différentes liaisons vibrent en effet à des fréquences spécifiques, qui sont fonction des atomes composants les liaisons, et de leurs environnements proches. Chaque liaison possède plusieurs modes vibratoires (étirement symétrique, antisymétrique, cisaillement, agitation, etc.) : à des fréquences données, la liaison va donc rentrer en résonance, absorbant alors une grande partie de l'énergie apportée par le faisceau infrarouge. Chaque pic du spectre d'absorption obtenu en IR-TF est donc caractéristique d'un mode vibratoire d'un certain type de liaison. L'interprétation du spectre obtenu permet ainsi de reconstituer la molécule et donc d'identifier le produit. Dans notre travail, les spectres ont été utilisés dans le but d'étudier l'interaction glucosamine-peptide au niveau de la liaison carbonyle-amine.

Cette technique consiste à appliquer l'échantillon (1 mg) sur un cristal prismatique ATR (Attenuated Total Reflection) de fort indice de réfraction. Le faisceau IR incident transmis à travers le cristal est réfléchi par la surface de l'échantillon. Les spectres IR sont enregistrés entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge Spectrum 400 (Perkin–Elmer Inc., Waltham, MA, USA) (Figure 16).



Figure 16 : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) Spectrum 400 (Perkin–Elmer) utilisée

2.2.4.2.5. Dosage des acides aminés résiduels

Principe

Le principe du dosage repose sur la formation d'un composé fluorescent par réaction de la fonction -NH_2 avec l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA), en présence d'un thiol (Roth, 1971). Cette dérivation permet une détection sensible des acides aminés dérivés par fluorescence. La réaction de dérivation est présentée dans la figure 17.

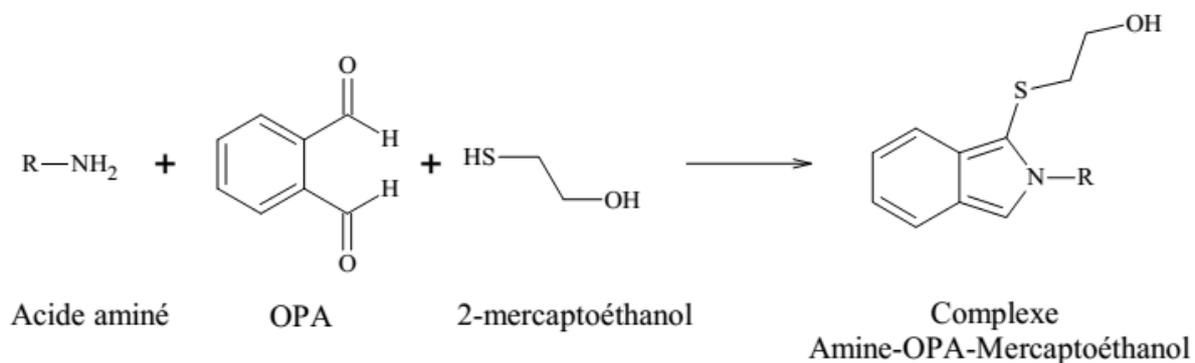


Figure 17 : Schéma de dérivation d'un acide aminé avec l'*ortho*-phthalaldéhyde (OPA) et le 2-mercaptoéthanol

Une solution de dérivation, composée de OPA et de 2-mercaptoéthanol doit être préparée quotidiennement avec un ratio volumique : 200 : 1, respectivement.

En utilisant une microplaque de 96 puits, 300 μL de solution de dérivation sont ajoutés à 10 μL d'échantillon à analyser (40 fois dilué) ou standard d'acide aminé, puis mélangé à l'aide d'un agitateur. L'OPA réagit, en 2 à 5 min, avec les acides aminés pour former des dérivés thioisoindoles, hautement fluorescents, détectables avec une excitation maximale à 340 nm et une émission maximale à 455 nm. Les dérivés ainsi formés, sont à peu près stables pendant environ 2 h et demie. Des concentrations croissantes de L-sérine (0–0,2 mg/mL) sont préparées pour obtenir une droite d'étalonnage (Figure 18), et les mesures de fluorescence sont exprimées en milligramme d'équivalents de sérine par millilitre.

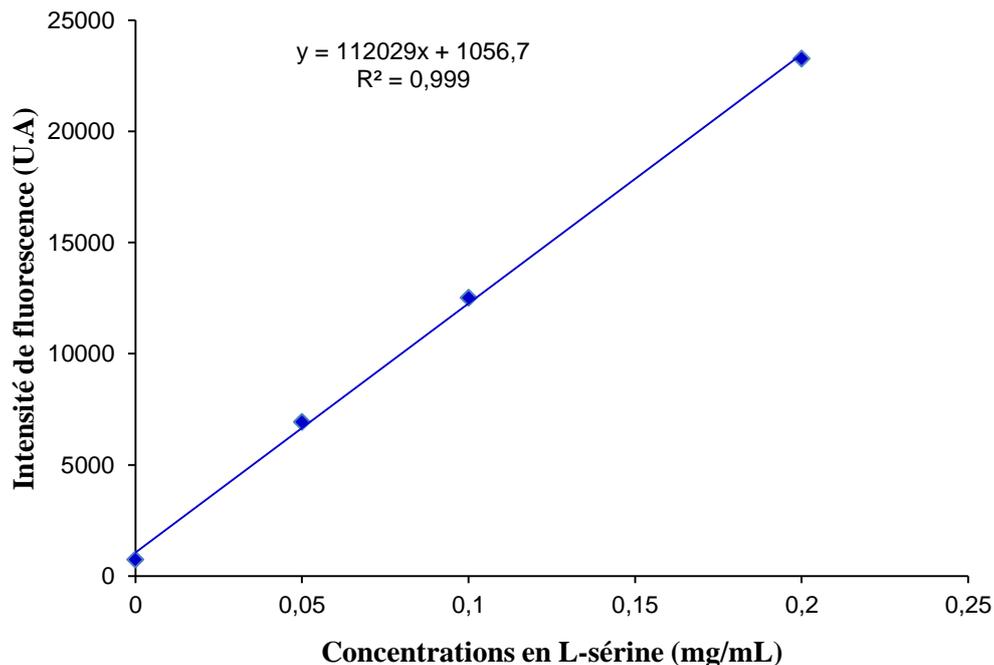


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la L-sérine

2.2.5. Méthodes d'étude des peptides et de leurs PRM

2.2.5.1. Analyse de la composition en acides aminés

L'analyse des acides aminés dans les hydrolysats et de leurs PRM est effectuée au centre de recherches biologiques (CIB) de Madrid. La méthode utilisée suit la Directive 98/64/CE (Fischler, 1998). Elle permet de déterminer les acides aminés libres et totaux (liés dans des peptides et libres) et s'applique aux acides aminés cystine, méthionine, lysine, thréonine, alanine, asparagine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, histidine, isoleucine, leucine, phénylalanine, proline, serine, tyrosine, et valine.

Cent (100) mg de l'échantillon à analyser sont hydrolysés par 0,2 mL d'acide chlorhydrique (6 N) contenant 0,1% de phénol, dans une ampoule scellée sous vide pendant 24 h à distillée. L'hydrolysate est ensuite séché sous azote et dilué dans 2,5 mL d'eau distillée. La solution ainsi préparée est ensuite analysée par chromatographie à haute performance (CLHP) à l'aide du dispositif Biochrom 20 Plus Amino Acid analyzer.

La colonne chromatographique utilisée pour l'analyse des acides aminés est une Vydac C18 : 250 mm x 4,6 mm. Elle est chauffée à 45 °C. Le débit d'injection est de l'ordre de 1 mL/min et le volume injecté est de 25 µL. La phase mobile est composée de solvant A (acétate / triéthylamine à pH 4,5) et solvant B (méthanol). Le solvant A est préparé avec l'acétate de soude 0,07 M additionné de 0,25 mL de triéthylamine et ajusté à pH 4,5 avec de l'acide acétique glacial. Neuf cent cinquante (950) mL de ce mélange sont ajoutés à 50 mL de méthanol. Les acides aminés sont identifiés par leurs temps de rétention et quantifiés par leur facteur de réponse par rapport au standard interne (la norleucine) ajouté (200 µmol/L) dans chaque échantillon. La détection est photométrique (570 nm pour tous les acides aminés, 440 nm pour la proline). La teneur en acides aminés est exprimée par le nombre de résidus sur 1000 résidus.

2.2.5.2. Distribution du poids moléculaire

La distribution de la taille des peptides des hydrolysats de protéines de carapace et d'eau de cuisson de crevette ainsi que leur PRM est étudiée par chromatographie liquide d'exclusion de taille à haute pression (CLHP modèle SPE-MA10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japan). La séparation est réalisée avec une colonne Superdex peptide PC 3.2/30 (GE Healthcare Bio-Sciences, Barcelona, Spain). Cette colonne possède un domaine de fractionnement compris entre de 100 à 7000 Da. L'échantillon (10 µL) est élué par une phase mobile constituée de 30

% d'acétonitrile et 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA). Les échantillons sont dissous dans de l'eau Milli-Q® (10 mg/mL), passés sur un filtre Millipore 0,45 µm et élués à 0,1 mL/min. Les composés sont détectés par une lecture de la densité optique à 214 nm.

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 Milli-Q® (Figure 19). Les molécules standards (Sigma) utilisées sont : aprotinine (6511 Da) ; vitamine B12 (1345 Da) ; angiotensine II (1046 Da) hippuryl histidyl leucine (429 Da) et glycine (75 Da).

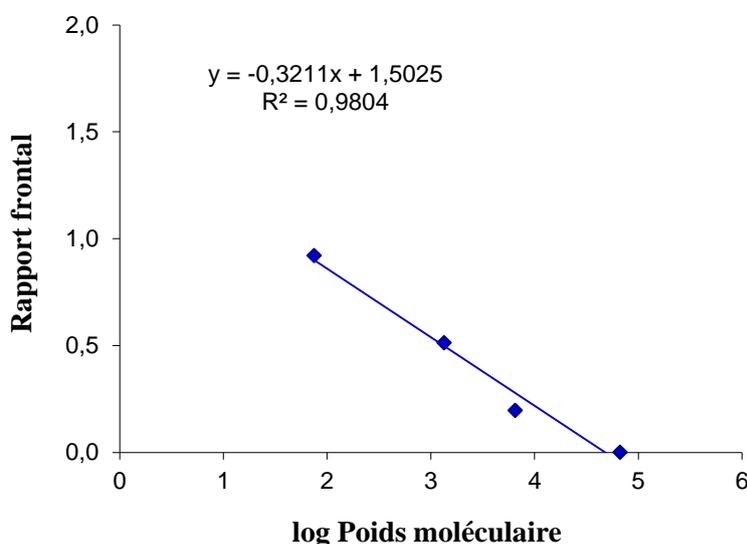


Figure 19 : Étalonnage de la colonne chromatographique d'exclusion de taille Superdex peptide PC 3.2/30

2.2.5.3. Recherche des activités biologiques

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

Dans notre travail, les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre (Shimadzu spectrophotometer, modèle CPS-240, Japan), sont utilisées pour étudier les activités biologiques des hydrolysats natifs ou modifiés par la RM.

2.2.5.3.1. Recherche de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA

Principe

L'activité inhibitrice sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est déterminée selon la méthode établie par [Cushman et Cheung \(1971\)](#). Cette réaction utilise le substrat synthétique, hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL, USA). L'enzyme ECA clive la liaison N-terminale du dipeptide His-Leu et libère ainsi dans le milieu l'acide hippurique dont le maximum d'absorption est mesuré à 228 nm ([Figure 20](#)).

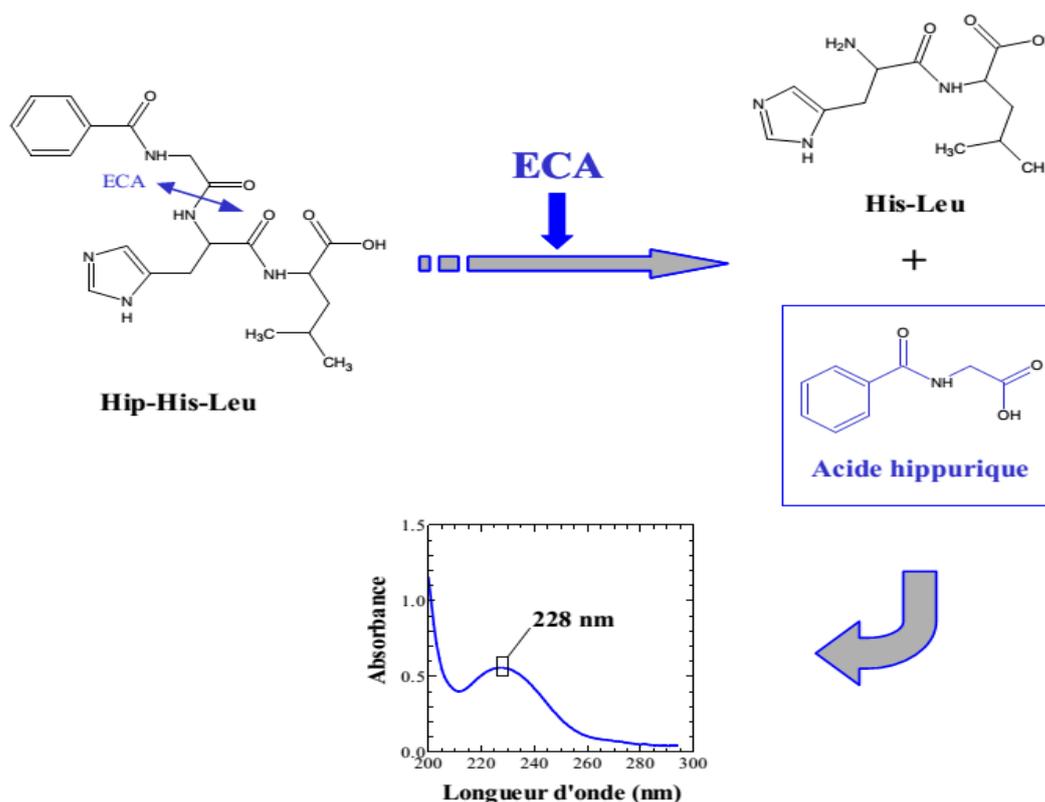


Figure 20 : Réaction catalytique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) avec son substrat synthétique hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL).

Deux cent (200) μL d'une solution HHL à 5 mM dans du tampon borate (100 mM ; pH 8,3) contenant 300 mM de NaCl sont mélangés à 80 μL d'hydrolysats de protéines de carapace ou d'eau de cuisson de crevette préparés à 2 mg/mL dans le même tampon, puis préincubés à

37°C pendant 3 min. L'initiation de la réaction se fait par ajout de 20 µL d'enzyme à 0,1 U/mL au volume réactionnel et incubé pendant 30 min à 37 °C au bain-marie sous agitation constante. La réaction est arrêtée par ajout de 250 µL d'HCl à 1N. Après arrêt de la réaction, 100 µL du volume réactionnel sont injectés en CLHP (système Waters TM 600) sur colonne de phase inverse C18 (Tracer excel 120 ODSA 5 µm, Teknokroma, Barcelona, Spain) et élués par un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 28 % en 50 min et de 28 à 47 % en 20 min. L'acide hippurique libéré est quantifié à 228 nm par le logiciel Millénium par estimation des aires sous la courbe du pic d'acide hippurique. Le taux d'inhibition de l'ECA est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'ECA (\%)} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{inhibiteur}}}{A_{\text{contrôle}}} \right) \right] \times 100$$

$A_{\text{inhibiteur}}$: représente l'aire relative mesurée du pic de l'acide hippurique produit suivant le test réalisé avec l'hydrolysat inhibiteur.

$A_{\text{contrôle}}$: représente l'aire relative mesurée du pic de l'acide hippurique produit suivant le test réalisé en remplaçant les 80 µL d'hydrolysat inhibiteur par du tampon.

2.2.5.3.2. Méthodes de mesure du pouvoir antioxydant

La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites « d'inhibition » dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait la mise en évidence du profil antioxydant d'un échantillon. Ainsi, différents tests de mesure du pouvoir antioxydant sont effectués pour générer un profil plus global des propriétés antioxydantes des échantillons étudiés (Frankel et Meyer, 2000).

a. Mesure du pouvoir réducteur du fer

Principe

Cette technique correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique $[(\text{Fe}(\text{III})\text{-TPTZ})_2]$ en un complexe tripyridyltriazine ferreux $[(\text{Fe}(\text{II})\text{-TPTZ})_2]$ par un antioxydant (AH), à un pH acide pour maintenir la solubilité du fer (Figure 21).

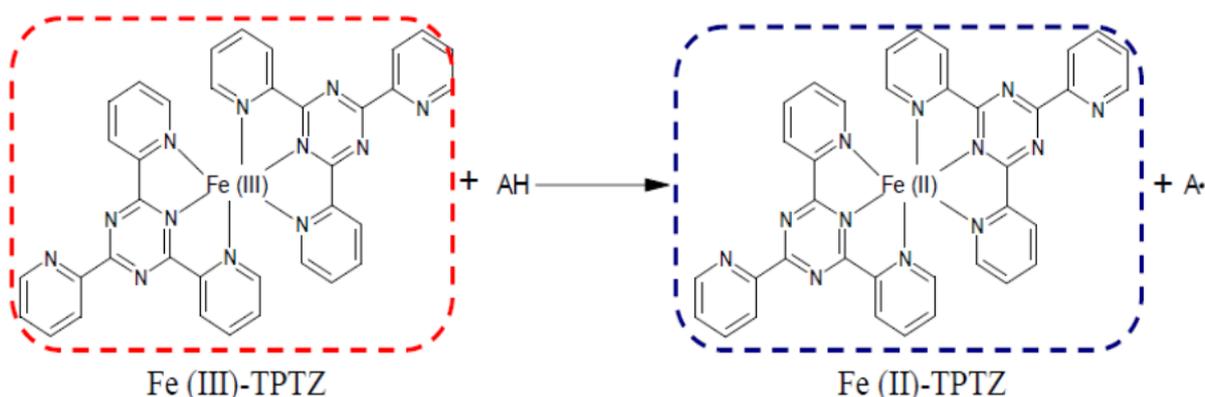


Figure 21 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique $\text{Fe}(\text{III})\text{-TPTZ}$ et un antioxydant (AH) (Thomas, 2011)

Lors de la réduction du complexe ferrique en complexe ferreux une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 595 nm (Thomas, 2011). Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur qui détermine la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 595 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en Fe^{2+} (Benzie et Strain, 1996).

Le pouvoir réducteur est déterminé suivant la méthode décrite par Benzie et Strain (1996) en utilisant le réactif FRAP (ferric reducing antioxidant power). Ce réactif est obtenu en mélangeant le TPTZ (10 mM), une solution tampon d'acétate de sodium (0,2 M, pH 3,6), et une solution de FeCl_3 (20 mM) dans les proportions 1 : 10 : 1, respectivement). À chaque échantillon (hydrolysats de protéines de carapace et d'eau de cuisson de crevette ainsi que leur PRM) à tester (30 μL), préparé à 25 mg/mL, sont ajoutés 90 μL d'eau distillée et 900 μL du réactif FRAP. Le blanc est préparé de la même manière sauf que l'échantillon à tester est remplacé par de l'eau distillée. Le mélange est incubé à 37 °C au bain-marie pendant 30 min. l'absorbance est ensuite mesurée contre le blanc à 595 nm.

Les résultats obtenus sont exprimés en mmol équivalents de Fe^{2+} par gramme du poids de la matière sèche, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée du sulfate ferreux (Figure 22).

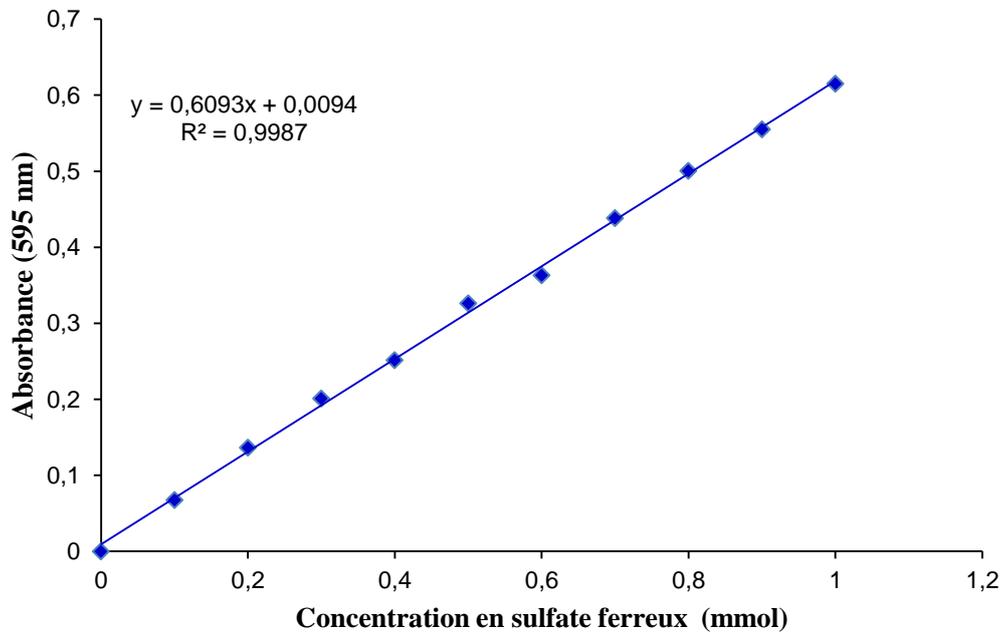


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de sulfate ferreux ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

b. Mesure du pouvoir anti-radicalaire

Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation ABTS^{*+} , (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. En réagissant avec le persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), ABTS forme le radical ABTS^{*+} , de couleur bleue à verte. L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange (Figure 23). L'inhibition du radical stable (ou la décoloration du radical) dépend de l'activité de l'antioxydant, mais également du temps et de la concentration.

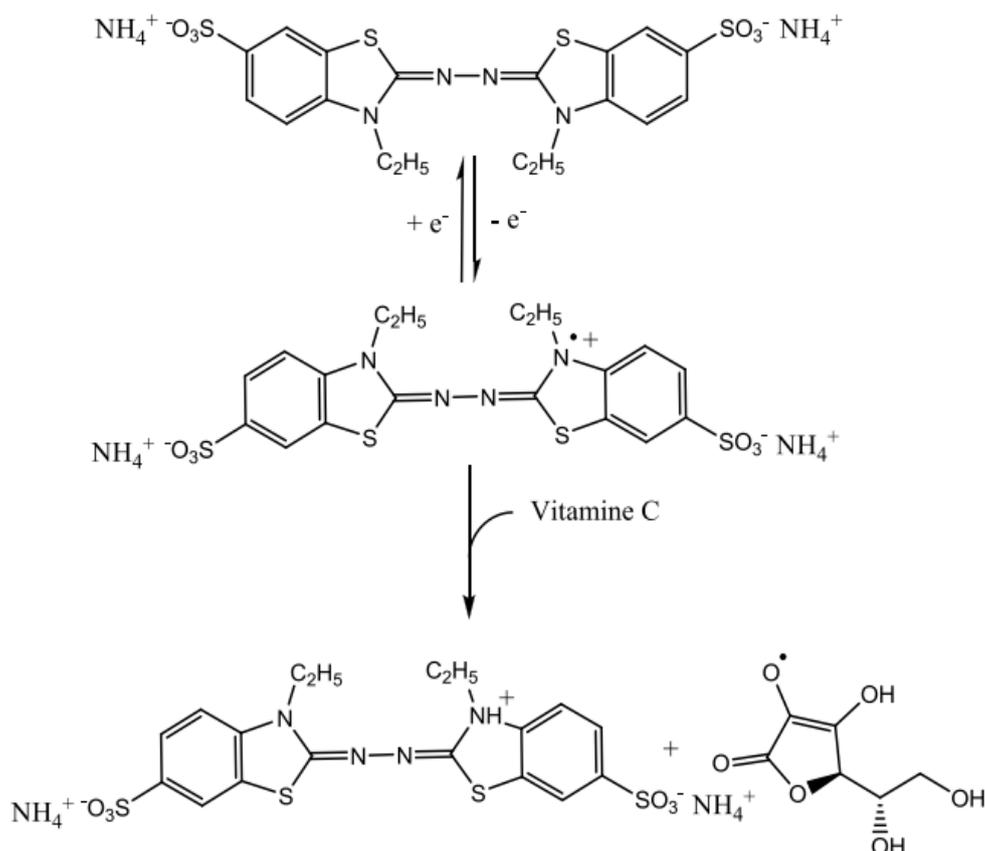


Figure 23 : Formation et piégeage du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par la vitamine C

L'activité antioxydante des échantillons à tester est déduite de leur capacité à inhiber le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ selon la méthode décrite par [Re et al., \(1999\)](#). À une solution ABTS préparée à 7 mM dans l'eau est ajoutée une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM (concentration finale). Le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 à 16 h avant utilisation pour la formation du radical-cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Avant utilisation, la solution est diluée avec l'eau Milli-Q® (Millipore, Molsheim, France) jusqu'à ce que la concentration du complexe radical-cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ bleu-verdâtre donne une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm. La solution obtenue (dite réactif ABTS) est stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante. La réaction est démarrée en combinant 20 μL de la solution d'échantillon (hydrolysats de protéines de carapace et d'eau de cuisson de crevette ainsi que leur PRM préparés à 25 mg/mL) avec 980 μL du réactif ABTS. Le blanc est préparé de la même manière sauf que l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. Le mélange réactionnel est laissé incuber à l'obscurité, à 30 °C pendant 10 min. L'absorbance est ensuite mesurée contre le blanc à 734 nm.

Une droite d'étalonnage est établie avec des solutions d'acide ascorbique (vitamine C) préparées à différentes concentrations (Figure 24). Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme du poids de la matière sèche.

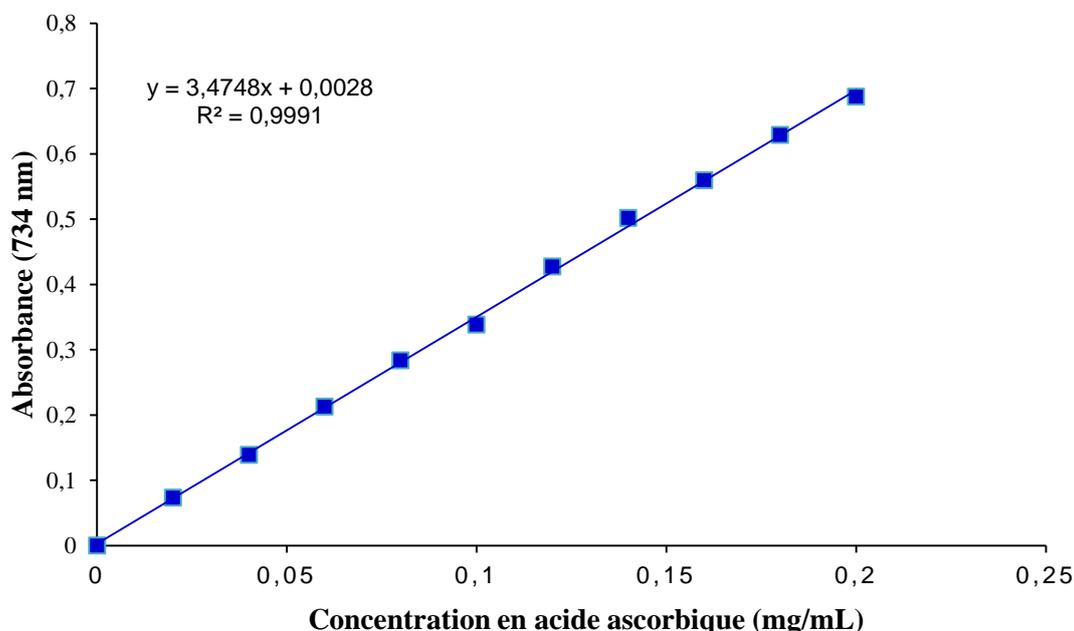


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

c. Mesure du pouvoir chélateur de fer

Principe

La chélation des ions ferreux est déterminée suivant une méthode basée sur l'inhibition de la formation du complexe Ferrozine- Fe^{2+} (Figure 25), chromophore de couleur violette intense ayant un maximum d'absorption à 562 nm (Zhao *et al.*, 2006). Le fer ferreux (Fe^{2+}) est rapidement complexé par la ferrozine et conduit à un complexe stable dans un pH compris entre 4 et 8 (Pascual-Reguera *et al.*, 1997 ; Gibbs, 1976). En présence d'un agent chélateur (antioxydant), la formation de ce complexe est perturbée aboutissant ainsi à une diminution de l'intensité de couleur qui sera suivie au spectrophotomètre. Plus la coloration de la solution de l'échantillon testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

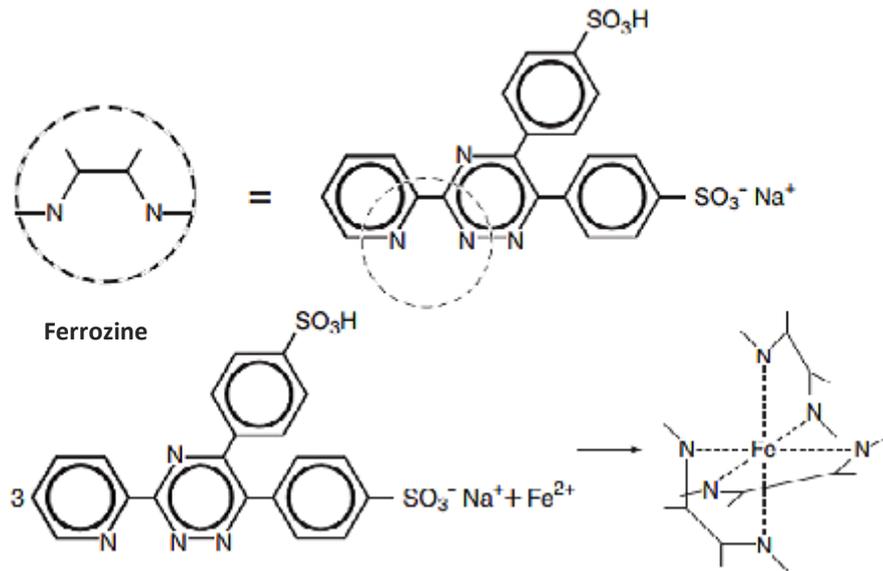


Figure 25 : Mécanisme de formation du complexe Ferrozine–Fe²⁺

La capacité chélatrice des échantillons à analyser est estimée selon la méthode de [Dinis et al., \(1994\)](#) en comparaison avec l'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique). Huit cent (800) µL de la solution d'échantillon à analyser (hydrolysats de protéines de carapace et d'eau de cuisson de crevette ainsi que leur PRM préparés à 25 mg/mL) sont ajoutés à 10 µL de solution FeCl₂ (2 mM). Après agitation, le mélange est laissé 5 min à température ambiante avant d'ajouter 20 µL d'une solution de ferrozine (acide 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phényl)-sulfonique, Sigma-Aldrich, USA) préalablement préparée dans l'eau Milli-Q® (Millipore, Molsheim, France) à 5 mM. Le mélange obtenu est agité et laissé réagir pendant 10 minutes à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation du complexe Ferrozine–Fe²⁺. L'absorbance est mesurée à 562 nm contre un blanc (sans ferrozine). Les résultats obtenus sont exprimés en µM équivalents d'EDTA par gramme du poids de la matière sèche, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage ([Figure 26](#)).

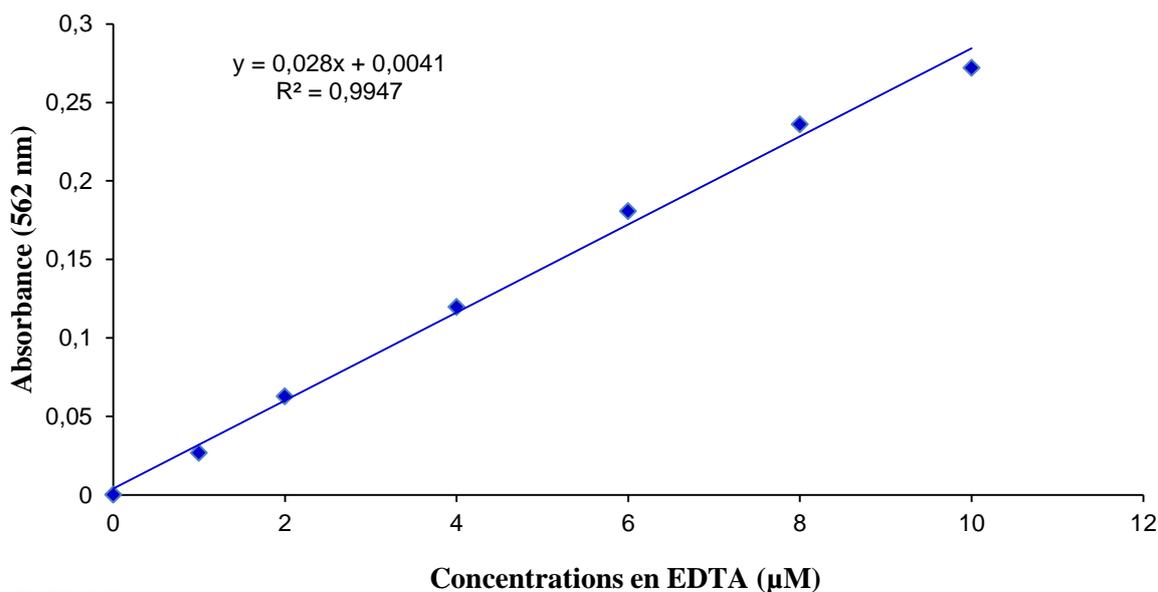


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de l'EDTA

2.2.5.3.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne

Cette méthode consiste à réaliser un tapis, par étalement de 0,1 mL d'une préculture de la souche indicatrice sur gélose BHI. Des disques stériles en papier Whatman No. 1 (5 mm de diamètre) imprégnés avec 40 µL de solutions des échantillons à tester sont déposés à la surface de la gélose BHIensemencée avec les souches indicatrices. Un disque imbibé de MRS stérile, témoin négatif, est aussi placé sur la gélose. Après incubation, les boîtes sont examinées pour la présence éventuelle de zones d'inhibition (considérées comme une activité antimicrobienne) autour des disques (Arancibia et al., 2014). Les diamètres sont mesurés à l'aide d'un logiciel (Corel Draw X6 software) et les résultats sont exprimés en mm.

2.2.6. Valorisation des coproduits marins en tant que milieu de culture pour la souche DM19

2.2.6.1. Conditions de culture

Une préculture bactérienne de la souche DM19 réalisée dans le MRS est ajustée à une DO ($\lambda = 600$ nm) de 0,9 (UV-Visible spectrophotometer model UV-1601 from Shimadzu), puis centrifugée à 16000xg pendant 10 min à 4 °C. Le culot cellulaire est lavé deux fois au tampon phosphate de potassium (0,1 M, pH 7). Ce lavage sert à éliminer toute trace du milieu de culture (MRS). Les cellules lavées sont resuspendues dans le même tampon et ajustées à une

$DO_{600\text{ nm}} = 0,9$. Ces suspensions serviront à ensemercer à 1 % les milieux MRS reconstitués. Une série de milieux de culture ont été préparés en substituant la concentration de la peptone recommandée dans le MRS commercial par les hydrolysats des coproduits marins. Une autre série de milieux est préparée de la même manière mais en doublant la concentration des hydrolysats étudiés (Tableau 11). Après avoir ajusté le pH à 7, ces milieux sont autoclavés à 121 °C pendant 20 min avant d'être inoculés avec la souche bactérienne. Après 24 h d'incubation à 30 °C, un volume du milieu est prélevé pour estimer la croissance bactérienne en mesurant la densité optique, à $\lambda = 600\text{ nm}$, au spectrophotomètre. Le reste du milieu est centrifugé à 5000xg pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est utilisé pour le dosage du glucose, l'azote total, les acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide formique), ainsi que pour la détermination de l'activité bactériocinogène.

Tableau 11 : Composition des milieux de culture testés (g/L)

| Composition | MRS | MRS⁻ | MRS^a | MRS^b |
|---------------------------------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Extrait de levure | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Extrait de viande | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Glucose | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Acétate de sodium | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Tween 80 (mL) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Phosphate disodique | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Citrate triammonium | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sulfate de magnésium | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Sulfate de manganèse | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Peptone | 10 | — | — | — |
| Hydrolysats du coproduit marin | — | — | 10 | 20 |

a : milieux de culture préparés avec 10 g/L de peptones marines

b : milieux de culture préparés avec 20 g/L de peptones marines

2.2.6.2. Analyses biochimiques

2.2.6.2.1. Dosage des protéines

Principe de la méthode de Dumas

L'analyse de l'azote total se trouvant dans une matrice organique peut-être réalisée par la méthode de [Dumas \(1831\)](#). Celle-ci consiste en une combustion totale de la matrice sous oxygène. Les gaz produits sont réduits par du cuivre puis desséchés ; le CO₂ est piégé. L'azote est ensuite quantifié à l'aide d'un détecteur universel.

En appliquant cette méthode dans notre travail, l'azote total (N) est dosé par combustion d'un échantillon de surnageant sur un appareil LECO FP-2000 (LECO Corporation, St-Joseph, MI, USA) disponible à l'ICTAN ([Figure 27](#)), étalonné avec une solution EDTA. La teneur en protéines est rapportée à la matière sèche selon la formule suivante :

$$\text{Taux de protéines (\%)} = \text{Taux d'azote (\%)} \times 6,25$$

Les résultats sont exprimés en grammes de protéine/100 g du spécimen.



Figure 27 : Analyseur d'azote LECO FP-2000 utilisé

Principe de l'analyse (Figure 28)

- Injection de l'échantillon et de l'oxygène dans le tube de combustion à 940 °C (1) ;
- Combustion « flash » (2) ;
 - La combustion de la nacelle (3) porte temporairement la température à 1800 °C ;
 - Oxydation complémentaire et piégeage des halogènes sur de l'oxyde cobalto cobaltique argenté et sesquioxyde de chrome granulaire (4) ;
 - Réduction des oxydes d'azote en N₂ et piégeage des composés soufrés et de l'excès d'oxygène par du cuivre à 700 °C (5) ;
 - Les gaz présents dans l'hélium sont : N₂, CO₂ et H₂O (6) ;
 - Piégeage des éléments non dosés : H₂O par de l'anhydron (perchlorate de magnésium anhydre granulaire) (7) et du CO₂ par de l'ascarite (hydroxyde de sodium sur silice) (8) ;
 - Séparation chromatographique de l'azote et du méthane éventuellement présent à la suite d'une prise d'essai trop importante (9) ;
 - Détection sur catharomètre (10) ;
 - Collection du signal et traitement des données (11).

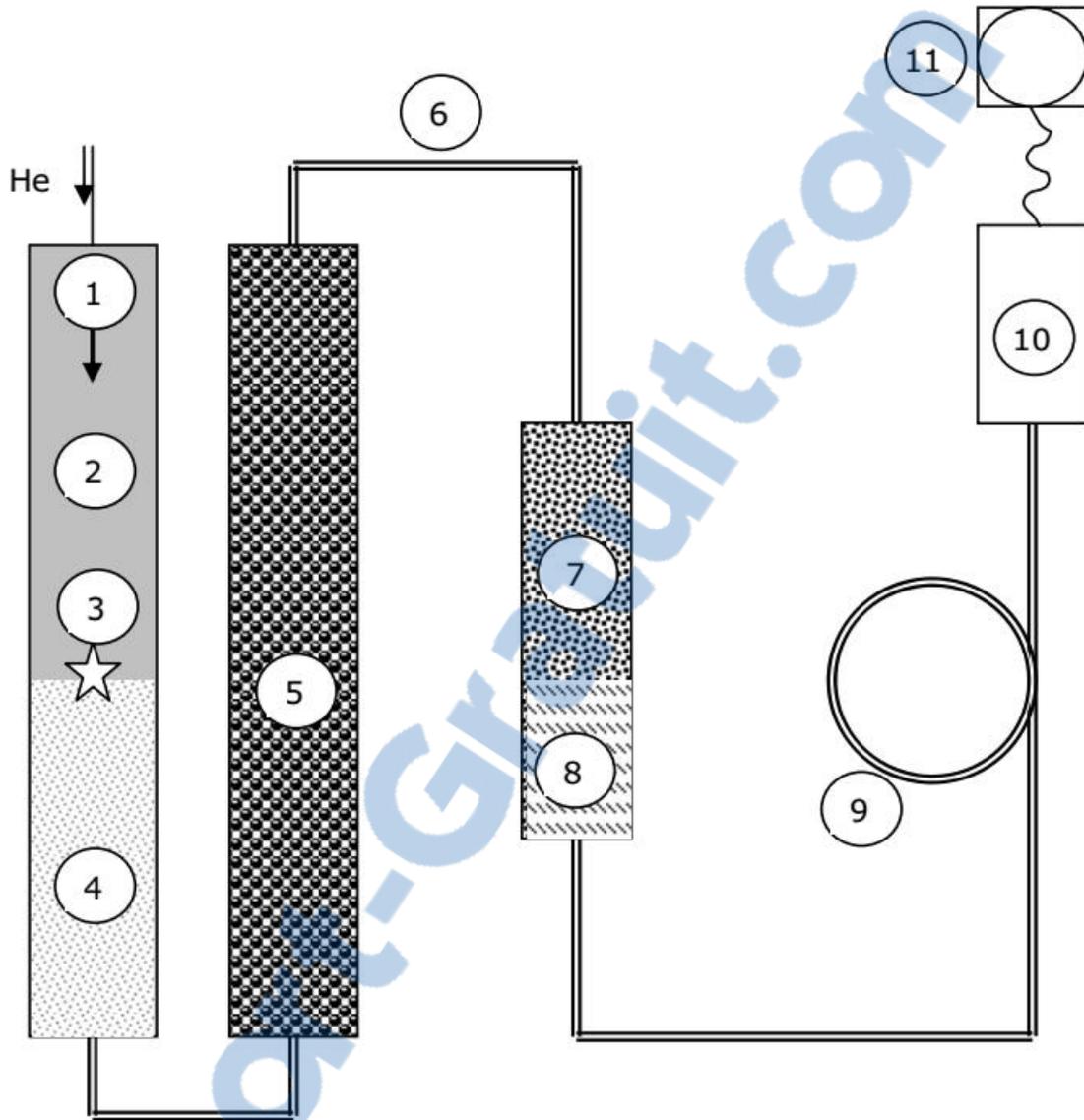


Figure 4 : Schéma du principe de l'analyseur d'azote

2.2.6.2.2. Mesure du pH

Le pH des prélèvements des cultures MRS modifié est mesuré directement à l'aide de l'électrode du pH-mètre (Metrohm 827 pH lab, Swiss). L'acidité est exprimée en ΔpH selon la formule : $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{(\text{mesuré après 24h})} - \text{pH}_{\text{initial}}$.

2.2.6.2.3. Dosage des acides organiques et du glucose

La chromatographie ionique couplée à l'ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) est utilisée pour doser le glucose, les acides lactique, acétique et formique, à partir des surnageants prélevés

des milieux de culture. La technique chromatographique HPAEC-PAD est particulièrement adaptée pour les analyses qualitatives et quantitatives des sucres. Elle peut également être utilisée pour le dosage d'acides organiques et/ou de métaux. Cette technique donne de résultats avec une grande sensibilité (de l'ordre de 300 fmol), et dans un intervalle de temps très court (Grey *et al.*, 2009). Cette technique permet une meilleure séparation que la méthode traditionnelle CLHP. Pour ce faire, les échantillons sont préparés par dilution dans de l'eau Milli-Q® (Millipore, Molsheim, France), et les solutions ont été ensuite filtrées à travers une membrane dont la taille des pores est de 0,45 µm avant injection. Les mesures sont effectuées sur une chromatographie Metrohm modèle IC 867 dont les caractéristiques sont résumées dans le [tableau 12](#). La détection est réalisée à l'aide d'un réfractomètre et d'un spectrophotomètre UV à longueur d'onde fixe 210 nm. L'analyse des chromatogrammes est réalisée grâce au logiciel Metrodata IC Net 2.3. Après détection, les différentes molécules à étudier sont identifiées par leur temps de rétention spécifique et quantifiés après intégration du signal (Chromeleon management system Dionex) par comparaison avec des courbes étalon établies avec les standards ([Tableau 12](#)).

Tableau 12 : Caractéristiques de l'analyse par Chromatographie Ionique (METROHM, modèle Compact IC 867)

| | Analyse du glucose | Analyses des acides organiques |
|--------------------|---|--|
| Type de colonne | Hamilton RCX30 (250 x 4 mm, la taille des particules est de 5µm) | Metrosep Organic Acid (250 x 4 mm, la taille des particules est de 5µm) |
| Phase mobile | 30 mM soude + 3 mM acétate de sodium | 1 mM acide perchlorique + 10 % acétone |
| Débit d'élution | 1 mL/min | 0,5 mL/min |
| Volume d'injection | 20 µL | 20 µL |
| Temps d'analyse | 35 min | 20 min |
| Standards | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Glucose (Ref. 1,08337,0250 Merck) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ L-Lactate de sodium (Ref. 71718 Sigma) ▪ Formate (Ref. 49897 Sigma) ▪ Acetate (Ref. 51791 Sigma) |

2.2.6.3. Recherche de l'activité bactériocinogène dans les surnageants de culture

Les surnageants obtenus de chaque milieu de culture ont été testés pour leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion du disque (Arancibia et al., 2014) décrite précédemment.

En vue de tester l'activité bactériocinogène, les surnageants de culture des différents milieux sont filtrés à travers un filtre (0,22 µm) pour éliminer les cellules bactériennes. Les extraits obtenus sont ensuite lyophilisés puis stockés à - 20 °C.

Les échantillons à tester sont resuspendus dans de l'eau distillée à une concentration de 5mg/mL et le pH des solutions préparées est ajusté à 7 avec une solution de NaOH (3N). L'activité due au peroxyde d'hydrogène est éliminée par addition d'une solution de catalase (Sigma-Aldrich, USA) à une concentration de 1 mg/mL au surnageant pendant 30 min à 25°C.

2.2.6.4. Séquençage du génome et identification de gènes putatifs codant pour la bactériocine

Séquençage du génome

Ce travail est une prestation de service offerte par le centre de surveillance de la santé vétérinaire VISAVET (Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria) de l'université Complutense de Madrid. Le séquençage du génome entier de la souche DM19 est effectué par la plateforme d'analyse génomique Illumina HiSeq (Goodwin et al., 2016). Les phases expérimentales de cette technologie consistent à une fragmentation de l'ADN génomique par sonication, suivi par la préparation d'une librairie de fragments d'ADN à séquencer. Ces fragments sont ensuite soumis à une amplification clonale et le séquençage par synthèse (SBS). Le processus permet d'identifier simultanément les bases d'ADN lorsqu'elles sont incorporées dans la chaîne d'acides nucléiques. Chaque base émet un signal de fluorescence unique lorsqu'elle est ajoutée au brin en cours de synthèse, ceci est utilisé pour déterminer la séquence d'ADN. Les séquences sont ensuite assemblées de novo en utilisant l'algorithme SPAdes 3.9 (Bankevich et al., 2012).

Identification de gènes putatifs codant pour la bactériocine

Les gènes putatifs codant pour la bactériocine ont été identifiés à l'aide de l'outil «*BActeriocin GENome mining tool*» (BAGEL3 ; <http://bagel.molgenrug.nl>) sur le génome de la souche DM19 (Van Heel et al., 2013). Chaque gène de bactériocine identifié est ensuite vérifié en utilisant la méthode «*Basic Local Alignment Search Tool X*» (BLASTX).

2.2.7. Analyses statistiques

Les essais ont été réalisés en triplicata et les résultats sont exprimés avec un écart type. L'analyse statistique a été menée en utilisant SPSS pour Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Les données sont comparées entre elles à l'aide d'une ANOVA complétée par un test de Tukey-b. La valeur du $P < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

3. Résultats et Discussion

3.1. Identification de la souche

L'analyse de la séquence de gène de l'ADNr 16S est l'une des techniques les plus utilisées pour l'identification d'espèces étant donnée sa rapidité, son efficacité et sa reproductibilité comparée aux techniques conventionnelles utilisant des critères morphologiques et physiologiques. La souche a été purifiée sur milieu MRS. Le gène de l'ADNr 16S a été amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche DM19. Le produit PCR a été analysé par électrophorèse, purifié et enfin séquencé en utilisant la plateforme d'analyse génomique Illumina MiSeq (Goodwin *et al.*, 2016). En utilisant l'algorithme "BLAST", la comparaison de la séquence nucléotidique ribosomale ADNr 16S de la souche DM19 avec toutes les séquences correspondantes disponibles sur la base de données "NCBI", a montré 99% d'homologie avec la souche *Enterococcus faecalis*. Suite au résultat obtenu, la souche a été nommée *Enterococcus faecalis* DM19.

3.2. Caractérisation biochimique de l'activité protéolytique extracellulaire de la souche *E. faecalis* DM19

L'effet des paramètres pH et température ainsi que l'effet d'inhibiteurs sur l'activité des protéases produites dans le milieu de culture sont analysés par spectrophotométrie en utilisant le substrat chromophore azocaséine.

3.2.1. Effet de la température

L'influence de la température sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut a été analysée dans les conditions de température variable (20 °C à 80 °C).

D'après la [figure 29](#), on constate que l'activité protéolytique est maximale à 40 °C puis diminue rapidement pour s'annuler à 50 °C. Ce résultat corrobore avec les données de la littérature ; une protéinase extracellulaire de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* a exprimé une activité maximale à 45 °C (García de Fernando *et al.*, 1991).

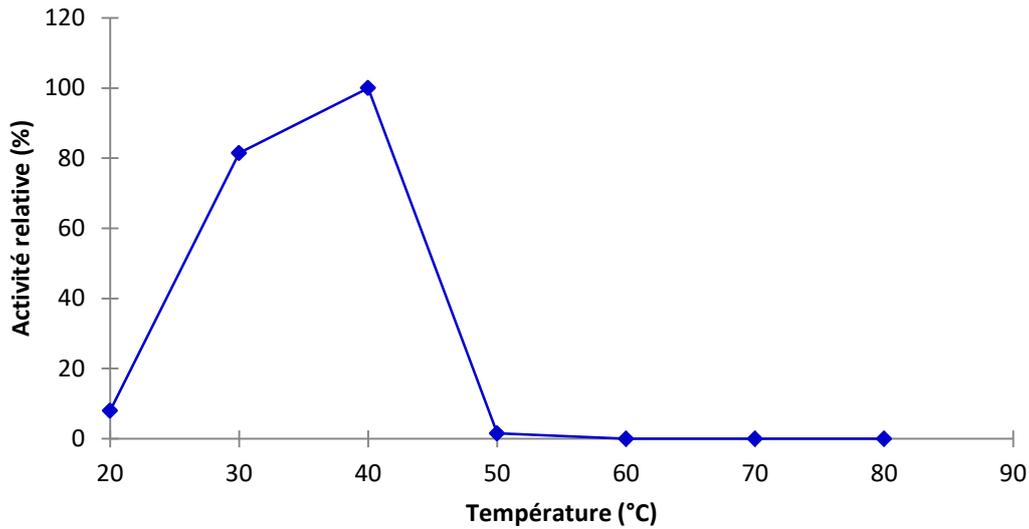


Figure 29 : Effet de la variation de la température sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de *E.faecalis* DM19

3.2.2. Effet du pH

Les résultats obtenus (Figure 30) indiquent que l'activité protéolytique est maximale à pH 7. Cette activité est très sensible aux pH supérieurs à 8 et inférieurs à 5. Ces résultats rejoignent ceux de *García de Fernando et al. (1991)* qui, dans une étude similaire sur la protéinase purifiée de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* ont rapporté une activité maximale à pH 7,5.

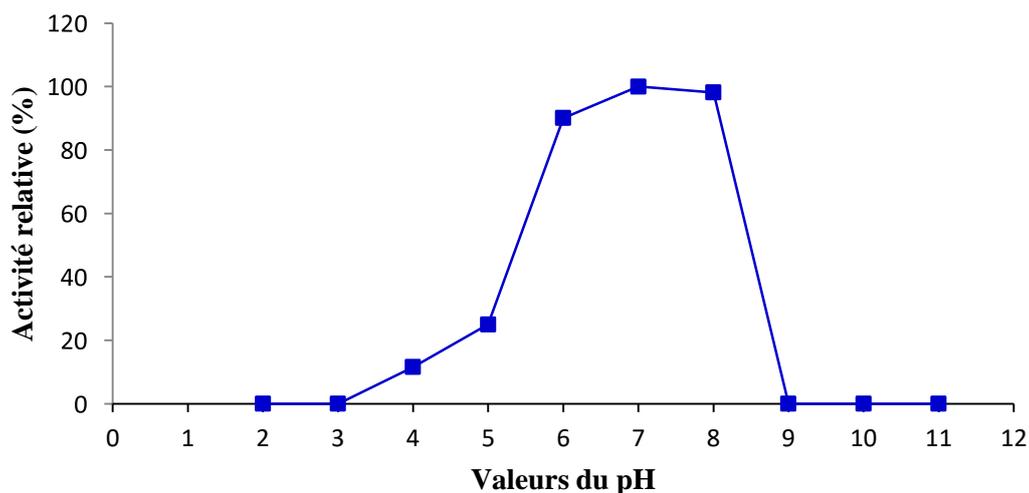


Figure 30 : Effet de la variation du pH sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de *E.faecalis* DM19

3.2.3. Étude de la stabilité à la température et au pH

Dans cette partie de l'étude, l'extrait enzymatique est incubé pendant 30 min à des températures ou des pH différents pour évaluer la stabilité de l'activité protéolytique. Ainsi, cette activité apparaît stable entre 30 °C et 40 °C (Figure 31) et dans l'intervalle de pH 6, 7, 8 (Figure 32). L'activité protéolytique est totalement inactivée à 50 °C et aux pH très acides et très basiques. On peut conclure que les enzymes produites par la souche *E.faecalis* DM19 sont des protéases thermostables à pH neutre.

Sur la base de ces résultats, la température 40 °C et pH 7 ont été retenus pour le procédé d'hydrolyse enzymatique.

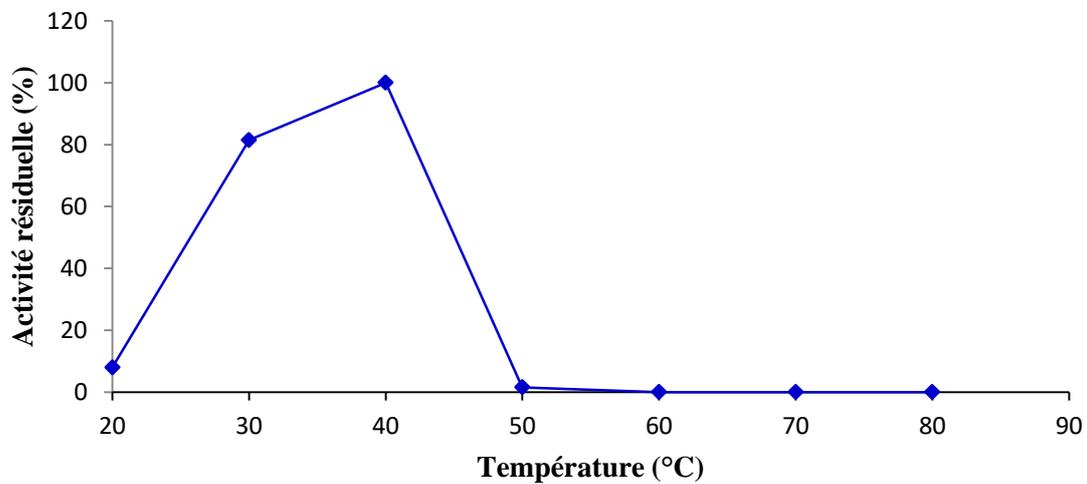


Figure 31 : Effet de la température sur la stabilité de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de *E.faecalis* DM19

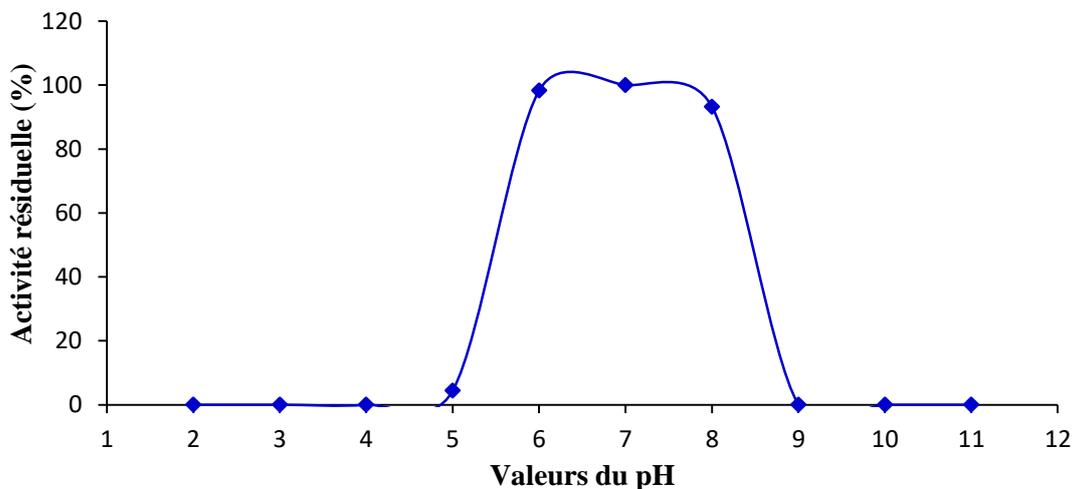


Figure 32 : Effet du pH sur la stabilité de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut de *E.faecalis* DM19

3.2.4. Effet des inhibiteurs irréversibles et des ions métalliques

3.2.4.1. Effet des inhibiteurs

Cette étude a été entreprise pour déterminer la nature des enzymes protéolytiques extracellulaires. Le [tableau 13](#) montre les activités protéolytiques résiduelles exprimées en pourcentage par rapport à l'activité enzymatique en l'absence d'inhibiteurs. Les résultats montrent que l'activité des protéases est totalement inhibée en présence du PMSF (10 mM) et fortement inhibée par l'acide iodoacétique (10 mM). De même la présence de l'EDTA (10 mM) provoque une forte diminution de l'activité enzymatique alors que, lorsque la pepstatine A est utilisée comme inhibiteur de protéases acides, l'activité protéolytique résiduelle est de 86 %.

L'ensemble de ces résultats laisse suggérer l'appartenance des protéases extracellulaires à la classe des protéases à serine mais aussi de nature métalloprotéasique. L'inhibition de l'activité enzymatique en présence de l'EDTA est probablement due à la chélation de certains ions métalliques indispensables pour l'activation et/ou la stabilisation de l'enzyme ([Roy et al., 1990](#)).

Nos résultats rejoignent ceux de [Tsakalidou et al. \(1999\)](#). Cependant, des protéases extracellulaires produites par *Lactobacillus curvatus* et *Lactobacillus homohiochii* ([Pereira et al., 2001](#)) et par *Lactobacillus brevis* CHTD27 et *Lactobacillus plantarum* BH14 ([Roudj, 2010](#)) ont été rapportées fortement inhibées par l'EDTA.

Tableau 13 : Effet des agents inhibiteurs sur l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut de *E.faecalis* DM19

| Les inhibiteurs | Concentration | Activité résiduelle (%) |
|--------------------|---------------|-------------------------|
| Control | - | 100 |
| PMSF | 10 mM | 0 |
| EDTA | 10 mM | 14 |
| Acide iodoacétique | 10 mM | 6 |
| Pepstatine A | 1 mM | 86 |

3.2.4.2. Effet des ions métalliques

L'effet des ions métalliques divalents (10 mM) sur l'activité enzymatique a été étudié et exprimé en pourcentage par rapport à l'activité enzymatique en l'absence d'ions.

Le [tableau 14](#) montre que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique n'est pas sensible à la présence des ions Zn^{2+} et Mg^{2+} . Toutefois, la présence de Co^{2+} et de Cu^{2+} diminue considérablement cette activité. L'incubation de l'extrait enzymatique avec Mn^{2+} provoque une augmentation de l'activité suggérant que cet ion est indispensable dans la catalyse enzymatique. Ces observations corroborent avec celles faites par [Yuan et al. \(2009\)](#) en étudiant une protéase purifiée de *Enterococcus faecalis* TN-9.

Tableau 14 : Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut de *E.faecalis* DM19

| Les ions métalliques | Concentration | Activité résiduelle (%) |
|----------------------|---------------|-------------------------|
| Control | - | 100 |
| Co^{2+} | 10 mM | 11 |
| Cu^{2+} | 10 mM | 28 |
| Mn^{2+} | 10 mM | 121 |
| Mg^{2+} | 10 mM | 101 |
| Zn^{2+} | 10 mM | 99 |

3.2.5. Détermination des constantes cinétiques

Les paramètres K_m et V_m ont été déterminés en utilisant le programme SigmaPlot 9.0. Les résultats obtenus sont comme suit : $V_m = 11396,655$ U/mg et $K_m = 6,982$ mg/mL.

3.3. Hydrolyse enzymatique

Au cours de ces dernières années, il a été reconnu que les protéines alimentaires sont une potentielle source de peptides à activités biologiques. En modifiant leur taille et leur charge, la protéolyse contrôlée par addition d'enzymes exogènes modifie les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines (digestibilité, solubilité, réduction de l'allergénicité, développement d'activités biologiques...). L'évolution de l'hydrolyse enzymatique est quantifiée par degré d'hydrolyse (DH). Ce dernier correspond au pourcentage de liaisons

peptidiques coupées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques de la protéine durant l'hydrolyse.

La [figure 33](#) montre un DH maximal (9,27 %) à 8 min pour les protéines de l'eau de cuisson de crevette (HPEC), il est atteint (12,92 %) à 17 min pour les protéines de carapace de crevette (HPC). Cette différence de DH entre les deux matières premières pourrait être expliquée :

1- par la teneur élevée en protéines dans la carapace par rapport aux protéines de l'eau de cuisson ([Tableau 15](#)) ce qui offre la possibilité d'atteindre un degré élevé d'hydrolyse. En effet, une faible teneur en protéines dans l'eau de cuisson des crevettes a été rapportée par [Amado et al. \(2016\)](#).

2- par l'inaccessibilité des liaisons peptidiques aux protéases à cause des lipides contenus dans les différentes parties de la crevette ([Ibrahim et al., 1999](#)) ; il est probable que les lipides sont concentrés dans l'eau après la cuisson, et sont éventuellement liés aux protéines pour former un complexe lipoprotéine qui diminuerait l'accessibilité des protéines ([Slizyte et al., 2005](#)), donc leur digestibilité.

L'allure générale de ces cinétiques est classique et s'apparente à celles décrites dans la littérature notamment pour des produits et coproduits marins : estomacs de thon ([Guérard et al., 2001](#)), têtes et muscles de harengs ([Sathivel et al., 2003](#) ; [Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999](#)), muscles de saumon ([Kristinsson et Rasco, 2000a](#); [Kristinsson et Rasco, 2000b](#)), têtes de saumon ([Gbogouri et al., 2004](#)), muscles de morue ([Ravallec-Plé, 2000](#)), têtes et viscères de sardine ([Kechaou et al., 2009](#) ; [Souissi et al., 2007](#) ; [Dumay, 2006](#)).

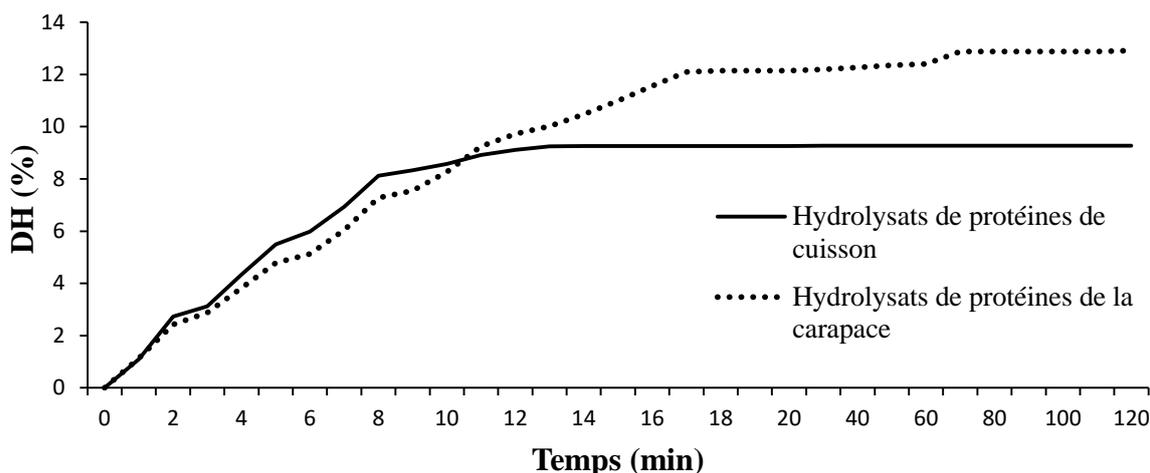


Figure 33 : Cinétiques d'hydrolyses des protéines de crevette par l'extrait enzymatique de *E.faecalis* DM19

La première phase correspond à la rupture des liaisons peptidiques facilement accessibles facilement et donc à la transformation rapide de substrat. Le plateau qui apparaît juste après cette phase traduit le fait que l'enzyme ne soit plus capable de couper des liaisons peptidiques. Il peut être expliqué par une autolyse enzymatique, ou bien par une conversion complète du substrat, ce qui veut dire une hydrolyse totale. Cependant, d'autres paramètres peuvent influencer cette cinétique. Il s'agit de l'augmentation de la teneur en peptides solubles dans le milieu réactionnel qui est susceptible d'agir comme inhibiteurs de la réaction de protéolyse (Souissi et al., 2007 ; Shahidi et al., 1995).

Tableau 15 : Teneur en protéines des matières premières en g/100g de matières brutes

| Les échantillons de <i>P.vannamei</i> | Teneurs en protéines |
|---------------------------------------|----------------------|
| Eau de cuisson | 18,86 |
| Carapace | 24,85 |

3.3.1. Activités antioxydantes des hydrolysats

Au cours de nos recherches bibliographiques sur les processus d'oxydation, ceux-ci apparaissent très complexes, de ce fait une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses

obtenues à l'aide de tests différents. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois tests chimiques dont le principe repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

La fonctionnalité des hydrolysats de protéines est un facteur important dans leur succès comme ingrédients alimentaires fonctionnels. Les propriétés physico-chimiques des hydrolysats de protéines dépendent du substrat protéique, la spécificité de l'enzyme utilisée pour la protéolyse et les conditions d'hydrolyse. En outre, il a été démontré que les activités antioxydantes des protéines peuvent être augmentées à travers l'hydrolyse enzymatique, et certains peptides possèdent un fort potentiel antioxydant par rapport à d'autres.

a. Pouvoir réducteur de Fer

C'est une méthode de mesure de la capacité des substances de nos hydrolysats à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) qui est l'un des mécanismes antioxydants. C'est une technique rapide, facile et reproductible (Karagözler *et al.*, 2008). La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. À différents temps d'hydrolyse, tous les hydrolysats de protéines présentent une capacité de réduction du fer significativement élevée par rapport à celle de leurs substrats d'origine telle que décrite dans la [figure 34](#). Ce résultat indique que les deux types de protéines génèrent des peptides ayant la capacité d'agir comme donneur d'électrons capables d'inactiver certains types d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), responsables de l'oxydation des lipides et des protéines notamment dans les aliments.

b. Capacité de piégeage des radicaux libres

Les résultats de la capacité des hydrolysats à piéger le radical-cation ABTS^{++} sont illustrés dans la [figure 35](#). On note une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'activité antioxydante des deux types d'hydrolysats en comparaison avec leurs substrats d'origine. Cette augmentation reste plus ou moins stable quel que soit le degré d'hydrolyse. Les résultats obtenus suggèrent que tous les hydrolysats contiennent des peptides qui sont des donneurs d'hydrogènes et qui peuvent réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables.

c. Capacité de chélation de Fer

Tous les aliments contenant de la graisse contiennent toujours des traces de métaux appelés de transition. Ce sont principalement le fer, le cuivre et le cobalt se trouvant sous la forme

métallique ou ionique. L'ion ferreux (Fe^{2+}) est le pro-oxydant le plus puissant parmi les ions métalliques. Cet ion peut interagir avec le peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton) pour produire un radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), conduisant à l'initiation de l'oxydation des lipides. De manière similaire, Fe^{2+} peut réagir avec un hydroperoxyde de lipide (LOOH) pour former un radical alkoxy ($\text{LO}\cdot$). La chélation des ions métalliques par les antioxydants pourrait ralentir la réaction d'oxydation des lipides responsable des modifications organoleptiques (rancidité, acidité, modification de la couleur avec apparition de brunissements) des aliments.

La ferrozine forme quantitativement des complexes avec l'ion Fe^{2+} . En présence d'agents chélateurs, la formation du complexe est interrompue, ce qui entraîne une diminution de la formation de couleur (Thiansilakul *et al.*, 2007).

Les résultats de la capacité de chélation du fer ferreux au cours de la réaction d'hydrolyse sont montrés sur la [figure 36](#). L'activité chélatante vis-à-vis du Fe^{2+} des hydrolysats augmente graduellement en fonction du DH. Les hydrolysats ont montré une activité intéressante en comparaison avec celle des protéines non hydrolysées.

En comparant les résultats des trois techniques utilisées pour mettre en évidence l'activité antioxydante, il apparaît que le pouvoir antioxydant de l'hydrolysat généré par les protéines de carapace se montre significativement important par rapport à la fraction peptidique issue des protéines de la cuisson. Cela signifie que les deux types d'hydrolysats engendrés sous l'action du même extrait enzymatique, n'ont pas la même composition et présentent par conséquent des capacités antioxydantes différentes. En effet, la composition spécifique des peptides en acides aminés dans les hydrolysats semble un facteur important pour manifester une activité antioxydante (Wiriyaphan *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 1998).

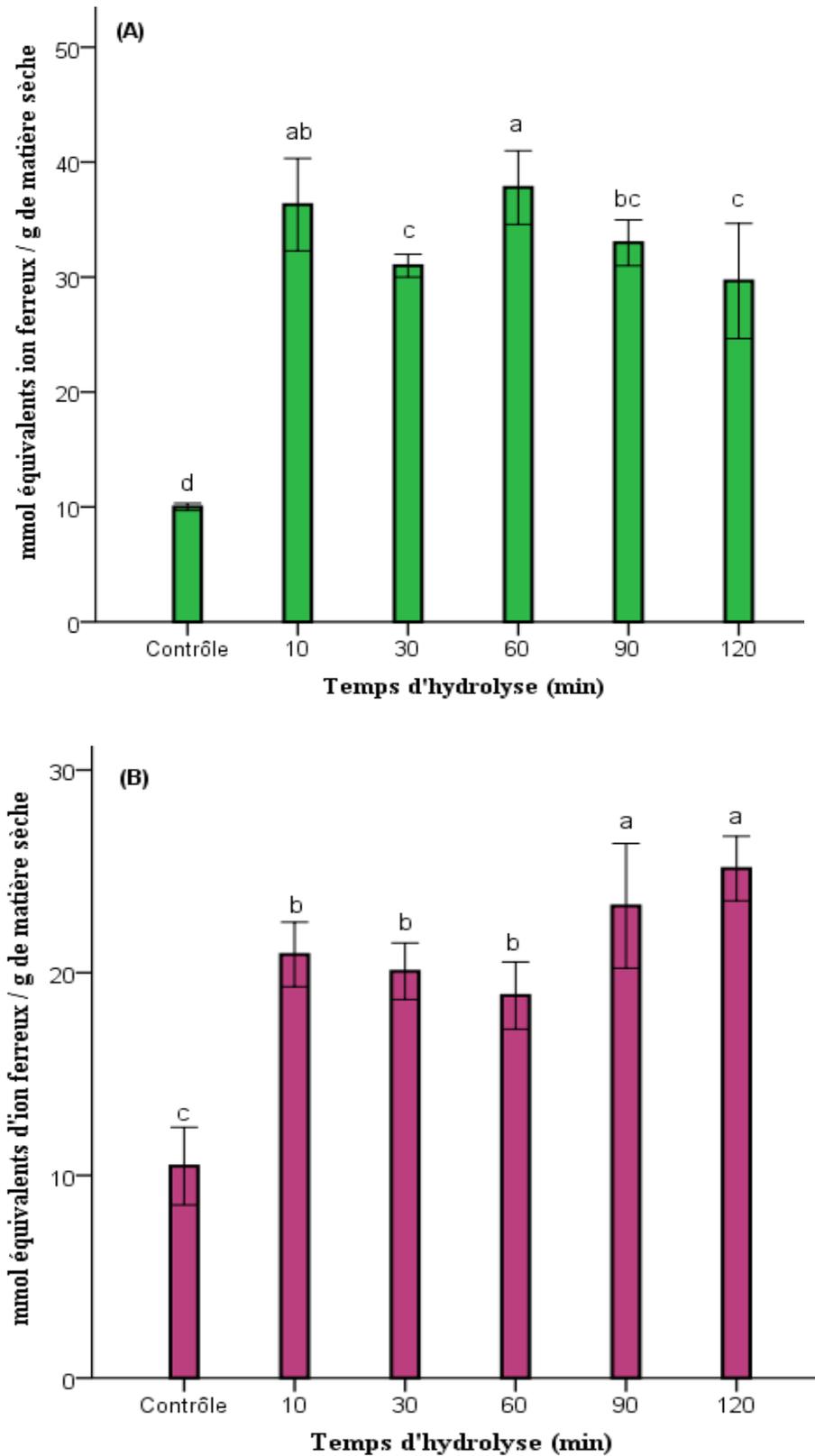


Figure 34 : Évolution de la capacité réductrice de fer, des hydrolysats de protéines de carapace (A) et d'eau de cuisson (B) obtenus durant le processus d'hydrolyse. Les lettres en minuscules (a,b et c) indiquent les différences significatives ($P<0,05$) à différents temps d'hydrolyse.

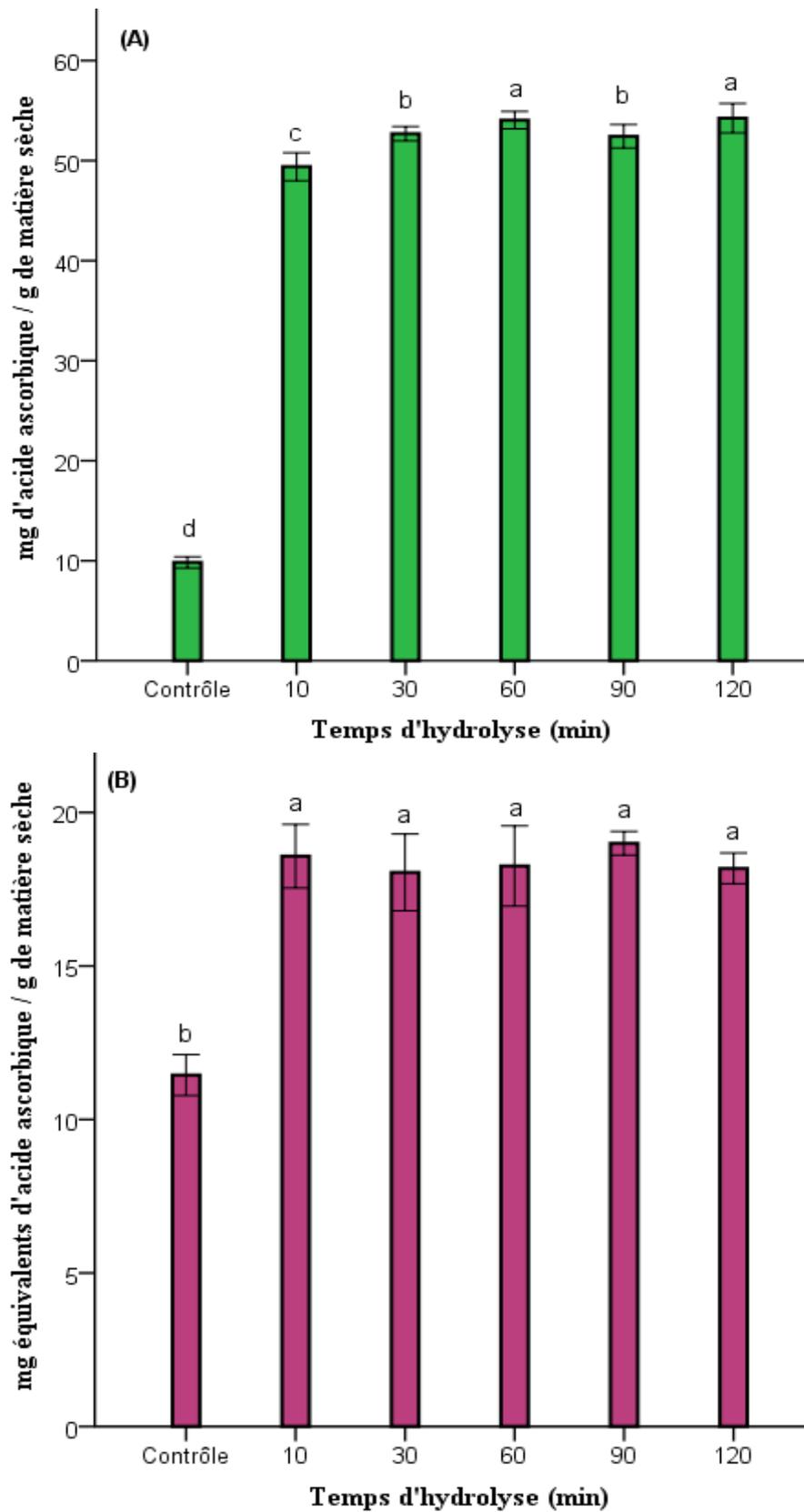


Figure 35 : Évolution de la capacité antiradicalaire des hydrolysats de protéines de carapace (A) et d'eau de cuisson (B) obtenus durant le processus d'hydrolyse. Les lettres en minuscules (a,b et c) indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) à différents temps d'hydrolyse.

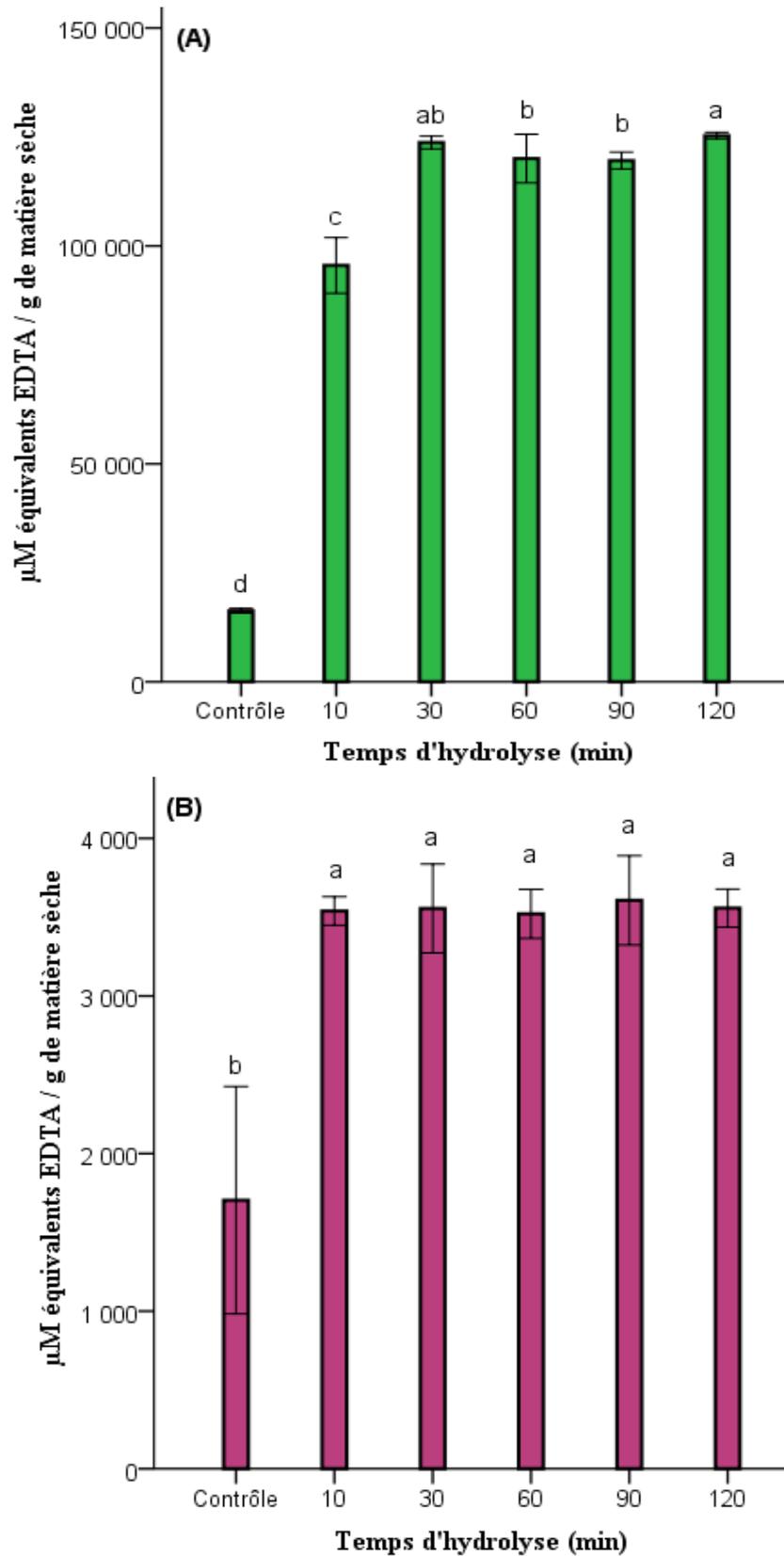


Figure 36 : Évolution de la capacité chélatrice de fer des hydrolysats de protéines de carapace (A) et d'eau de cuisson (B) obtenus durant le processus d'hydrolyse. Les lettres en minuscules (a,b et c) indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) à différents temps d'hydrolyse.

3.3.2. Analyse de la composition en acides aminés

Après analyse de la composition en acides aminés (Tableau 16), il semble que le taux de certains acides aminés se trouvant dans les hydrolysats tels que : Asp (103/1000 résidus), Glu (133/1000 résidus), Ala (99/1000 résidus), Val (55/1000 résidus), Met (14/1000 résidus), Leu (75/1000 résidus) et Tyr (13/1000 résidus) soit plus important dans l'hydrolysat HPC que dans l'hydrolysat HPEC. Il a été rapporté que les acides aminés Trp, Tyr, Met (dans leur forme libre) donnent la plus haute activité antioxydante, suivie par les acides aminés Cys, His et Phe (Dávalos *et al.*, 2004). D'autres acides aminés tels que His, Lys et Trp ont également montré des propriétés antioxydantes (Chen *et al.*, 1996). De plus, la présence de résidus hydrophobes (Gly, Pro, Ala, Val et Leu) dans des hydrolysats a été liée au pouvoir piègeur des radicaux libres (Mendis *et al.*, 2005). En effet, Dans une étude similaire, Zhu *et al.* (2006) ont également rapporté que les hydrolysats de protéines de soja avaient une activité antioxydante plus élevée que la protéine de soja non hydrolysée. L'hydrolyse de la protéine a libéré des séquences peptidiques contenant des acides aminés hydrophobes. Ces acides aminés peuvent contribuer de manière significative à la solubilité des peptides dans les lipides et par conséquent à l'augmentation de leur activité antioxydante (Chen *et al.*, 1996). En plus de leur nature hydrophobe, leur positionnement dans la séquence peptidique joue également un rôle crucial dans la manifestation de l'activité antioxydante (Chen *et al.* 1998).

Tableau 16 : Composition en acides aminés des hydrolysats de protéines d'eau de cuisson (HPEC) et de carapace (HPC)

| Les acides aminés | Nombre de résidus/1000 résidus | |
|-------------------|--------------------------------|------|
| | HPEC | HPC |
| Asp | 52 | 103 |
| Thr | 20 | 40 |
| Ser | 21 | 43 |
| Glu | 106 | 133 |
| Gly | 215 | 147 |
| Ala | 74 | 99 |
| Cys | 7 | 4 |
| Val | 41 | 55 |
| Met | 5 | 14 |
| Ile | 21 | 40 |
| Leu | 43 | 75 |
| Tyr | 1 | 13 |
| His | 79 | 25 |
| Lys | 115 | 83 |
| Arg | 69 | 43 |
| Pro | 125 | 75 |
| Total | 1000 | 1000 |

Le degré d'hydrolyse (DH) pourrait avoir aussi une influence significative sur l'activité antioxydante des hydrolysats du moment qu'il détermine la longueur de la chaîne peptidique ainsi que les acides aminés se trouvant en N-terminal. Cependant, le type d'enzyme, le rapport substrat/enzyme ainsi que le temps d'hydrolyse semblent des paramètres impliqués aussi dans cette activité biologique.

3.3.3. Profil moléculaire des hydrolysats

Les différentes tailles des peptides composant les hydrolysats ont été analysées (Tableaux 17 et 18). Trois principaux pics sont identifiés pour les deux types d'hydrolysats. Les Tableaux 17 et 18 montrent la distribution des peptides des hydrolysats selon leurs poids moléculaires (PM). La variation des PM a révélé des différences considérables dans le degré d'hydrolyse (DH) des protéines selon la nature du substrat. Ainsi, 9 % à 21 % des hydrolysats de protéines HPEC ont un PM supérieur à 1000 Da (Tableau 17). Par contre 79 % à 99 % (Tableaux 17 et 18) voire 100 % possèdent un poids moléculaire inférieur à 1000 Da. Les poids moléculaires correspondant à ce pourcentage élevé de peptides pourraient représenter les acides aminés, les dipeptides, tripeptides ou tetrapeptides et autres peptides de faible PM. Durant l'hydrolyse enzymatique, une grande variété de peptides de petite taille ainsi que des acides aminés sont générés, cela dépend de la spécificité de l'enzyme mise en jeu. La modification de la taille des peptides ainsi que les acides aminés qu'ils les composent affectent par conséquent l'activité antioxydante (Wu *et al.*, 2003). Dans ce contexte, Il est très bien documenté que ce sont les peptides de faible PM qui présentent l'activité la plus importante (Phanturat *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2001), et ils pourraient, ainsi, franchir la barrière intestinale et exercer leur activité biologique (Rufian-Henares et Morales, 2007). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportée par Wu *et al.* (2003) qui observent une activité antioxydante très élevée avec les peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 1,4 kDa. De même, les travaux de Je *et al.* (2005) ont montré une corrélation entre l'activité antioxydante et la masse moléculaire des peptides dans les hydrolysats de protéines de Colin d'Alaska, avec une activité antioxydante plus importante associée à des peptides dont le PM est inférieur à 1 kDa.

On note également que la capacité réductrice de fer semble ne pas être bien corrélée avec l'abondance des peptides à PM inférieur à 1 kDa dans les deux types d'hydrolysats. Cela peut être dû à l'activité spécifique de l'enzyme mise en œuvre, qui pourrait produire des peptides pourvus ou dépourvus à la fois de l'activité antioxydante, ce qui dénote l'importance de la séquence peptidique (composition en acides aminés) plutôt que sa taille moléculaire (Giménez *et al.*, 2009).

Tableau 17 : Distribution (en %) des poids moléculaires des peptides contenus dans l'hydrolysats HPEC obtenue après hydrolyse enzymatique

| Poids moléculaire | Temps d'hydrolyse | | | | |
|-------------------|-------------------|--------|--------|--------|---------|
| | 10 min | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| >1000 Da | 9 | 16 | 1 | 21 | 15 |
| 206 Da - 740 Da | 86 | 78 | 93 | 75 | 74 |
| 199 Da - 206 Da | 6 | 6 | 6 | 4 | 5 |
| Total des PM<1kDa | 92 | 84 | 99 | 79 | 79 |

Tableau 18 : Distribution (en %) des poids moléculaires des peptides contenus dans l'hydrolysats HPC obtenue après hydrolyse enzymatique

| Poids moléculaire | Temps d'hydrolyse | | | | |
|-------------------|-------------------|--------|--------|--------|---------|
| | 10 min | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min |
| 380 Da - 920 Da | 40 | 43 | 42 | 41 | 41 |
| 195 Da - 380 Da | 34 | 30 | 30 | 34 | 33 |
| 170 Da - 195 Da | 26 | 26 | 28 | 25 | 26 |
| Total des PM<1kDa | 100 | 99 | 100 | 100 | 100 |

3.3.4. Mesure de l'activité inhibitrice des hydrolysats vis-à-vis de l'ECA

Les hydrolysats à partir des deux types de substrats (protéines de carapace et protéines d'eau de cuisson) générés à 120 min ont été recueillis et testés pour leur capacité à inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine I. Les résultats obtenus ont révélé que les deux types d'hydrolysats (HPEC et HPC) sont capables d'inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine I avec un taux d'inhibition de 1,8 % et 32,66 % respectivement. Le dernier résultat semble plus élevé, mais il n'est pas intéressant lorsque l'on compare avec les données de la littérature. [Muguerza et al. \(2006\)](#) ont démontré que l'hydrolyse des caséines au cours de la fermentation du lait par des souches d'*E.faecalis* générerait des peptides dotés d'activité inhibitrice de l'ECA supérieure à 70 %. Ainsi, une autre étude a montré que les protéases de *Bacillus* sp. SM98011 permettent de libérer de peptides en hydrolysant les protéines d'une crevette (*Acetes chinensis*) avec une forte activité d'inhibition de l'ECA ([Hai-Lun et al. 2006](#)). D'autres études ont souligné que l'effet antihypertensif *in vivo et in vitro* des hydrolysats de protéines dépend fortement du type de protéases utilisées ou des conditions de protéolyse ainsi que la nature du substrat protéique à partir duquel les peptides antihypertensifs sont issus ([Alashi et al., 2014](#) ; [He et al., 2013](#) ; [Marrufo-Estrada et al.,](#)

2013 ; Ewart *et al.*, 2009). Par exemple, il a été démontré que l'hydrolyse des concentrés protéiques de lactosérum (CPL) avec l'alcalase produisait des hydrolysats de protéines avec des taux d'activité inhibitrice de l'ECA plus élevés à ceux des hydrolysats produits par l'action de flavourzyme et de pancreatine (Morais *et al.*, 2014). Li *et al.* (2006) ont également montré que l'activité antihypertensive d'un hydrolysat de haricot mungo préparé à l'aide de l'alcalase était supérieure à celle de l'hydrolysat obtenu par la neutrase. L'ensemble de ces données démontre que les différences d'activité entre les produits d'hydrolyse enzymatique sont dues à la nature et la spécificité d'action de l'enzyme et aussi à la nature des peptides (taille de la séquence peptidique et composition en acides aminés) et leur concentration dans l'hydrolysat (Aluko *et al.*, 2015).

3.4. Réaction de Maillard

3.4.1. Mesure du pH

Le pH des deux systèmes modèles préparés avec les deux types d'hydrolysats (en absence ou en présence de glucosamine) a été mesuré en fonction du temps de chauffage et les valeurs obtenues sont présentées dans le [tableau 19](#).

Une diminution du pH avec le temps est observée pour les deux systèmes modèles incubés en présence de glucosamine (GlcN). On observe une diminution de pH (pH = 6,98) après 40 min de chauffage (100 °C) puis reste plus ou moins stable jusqu'à la fin de l'incubation (120 min). Le pH en absence de GlcN reste stable durant tout le temps de chauffage.

Les échantillons ont été préparés dans un tampon de force ionique élevée (50 mM) afin de limiter d'éventuelles baisses de pH au cours de la RM. Cependant ce tampon n'a pas été suffisant pour maintenir stable le pH initial. La diminution du pH est due principalement à l'implication des groupements amines dans la RM pour former les PRM (Eric *et al.*, 2014). D'autre part, Brands et Van Boekel (2002) révèlent que la chute du pH découle en partie de la formation d'acides organiques (acide acétique et acide formique) de la RM.

Tableau 19 : Le changement de pH en fonction du temps de chauffage des hydrolysats en présence et en absence de GlcN

| Temps de chauffage (min) | HPEC-GlcN | HPEC | HPC-GlcN | HPC |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 0 | 8,00±0,00 ^a | 8,00±0,00 ^a | 8,00±0,00 ^a | 8,00±0,00 ^a |
| 40 | 6,98±0,02 ^b | 7,99±0,01 ^{ab} | 6,98±0,03 ^b | 8,00±0,00 ^a |
| 60 | 6,91±0,01 ^c | 7,99±0,01 ^{ab} | 6,87±0,02 ^c | 8,00±0,00 ^a |
| 120 | 6,64±0,01 ^d | 7,98±0,01 ^{ab} | 6,61±0,02 ^d | 8,00±0,00 ^a |
| 180 | 6,55±0,01 ^e | 7,97±0,02 ^b | 6,50±0,01 ^e | 8,00±0,00 ^a |

Les abréviations ; **HPEC** : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette, **HPC** : hydrolysats de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine. Les lettres en minuscules dans la même colonne indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) à différents temps de chauffage

3.4.2. Mesures de l'absorbance des PRM formés

a. Mesure à 420 nm

L'intensité et la cinétique de la RM peuvent être suivies par la mesure de la coloration orange-brun du milieu réactionnel à 420 nm. Cette couleur est caractéristique des PRM et son intensité est proportionnelle à la réaction (Morales et Jimenez-Perez, 2001). Les cinétiques d'apparition des pigments bruns sont illustrées dans la figure 37. Aucun brunissement n'est observé dans les solutions d'hydrolysats en absence de GlcN tout au long de la RM. L'intensité du brunissement augmente considérablement de façon rapide durant 40 min puis elle reste relativement stable jusqu'à 60 min. Ensuite, une accélération de la réaction apparaît, suivie d'un ralentissement entre 120 et 180 min d'incubation pour chaque système modèle en présence de GlcN.

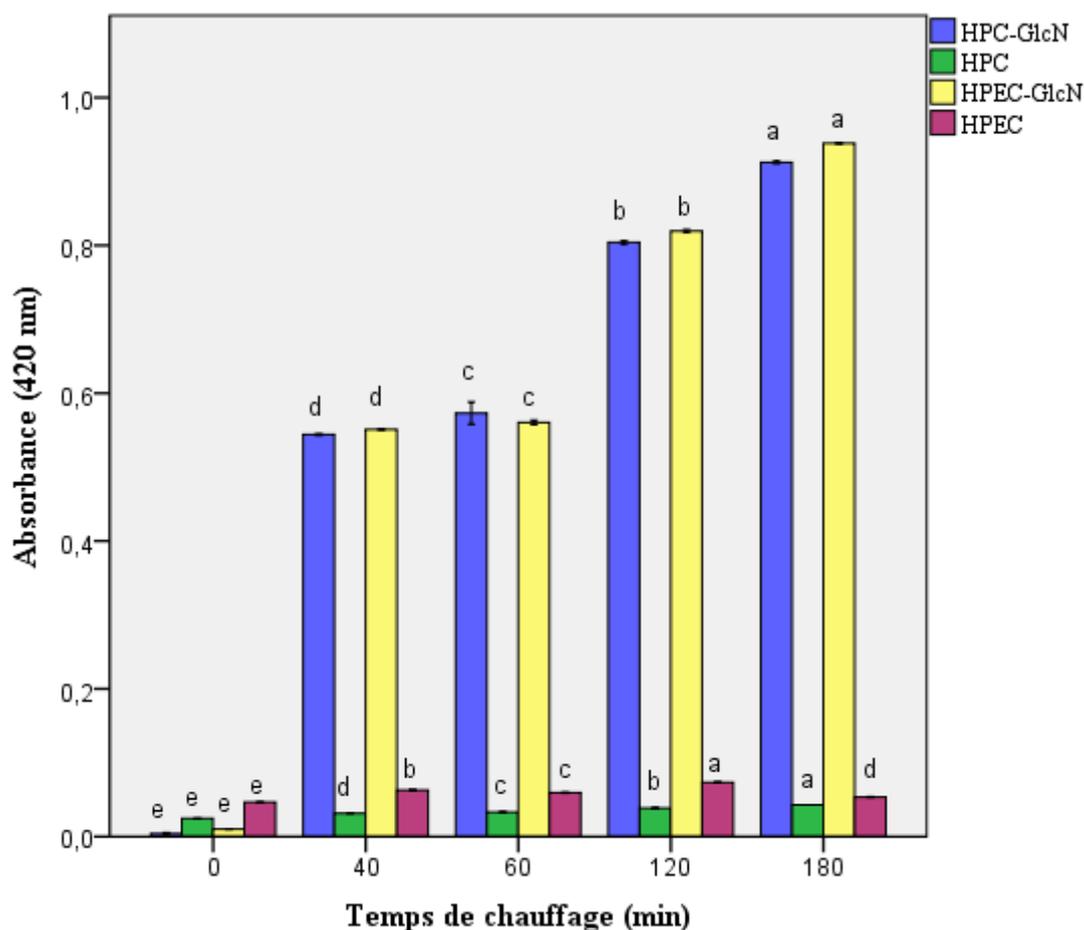


Figure 37 : L'évolution de l'intensité de brunissement des échantillons en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; **HPEC** : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette, **HPC** : hydrolysats de protéines de carapace de crevette, **GlcN** : glucosamine. Les barres d'erreurs représentent l'écart type de la moyenne des expériences en triplicat. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour le même échantillon.

Kim et Lee (2009) suggèrent que le degré de brunissement serait lié au degré d'hydrolyse des peptides et/ou des protéines lors du chauffage, ce qui pourrait être le cas de notre étude. Cependant, le ralentissement de formation de brunissement observé est probablement associé à un épuisement des réactants au cours des incubations, mais aussi à une diminution du pH.

b. Mesure à 294 nm

Dans ce cas aussi, on note une augmentation de l'absorbance à 294 nm pour les deux systèmes modèles HPEC-GlcN et HPC-GlcN. Cette augmentation apparaît après 40 min, puis reste stable jusqu'à 60 min alors que le maximum est atteint à 120 min. En revanche, en absence de GlcN, l'absorbance est faible et demeure plus au moins constante durant le traitement thermique (Figure 38).

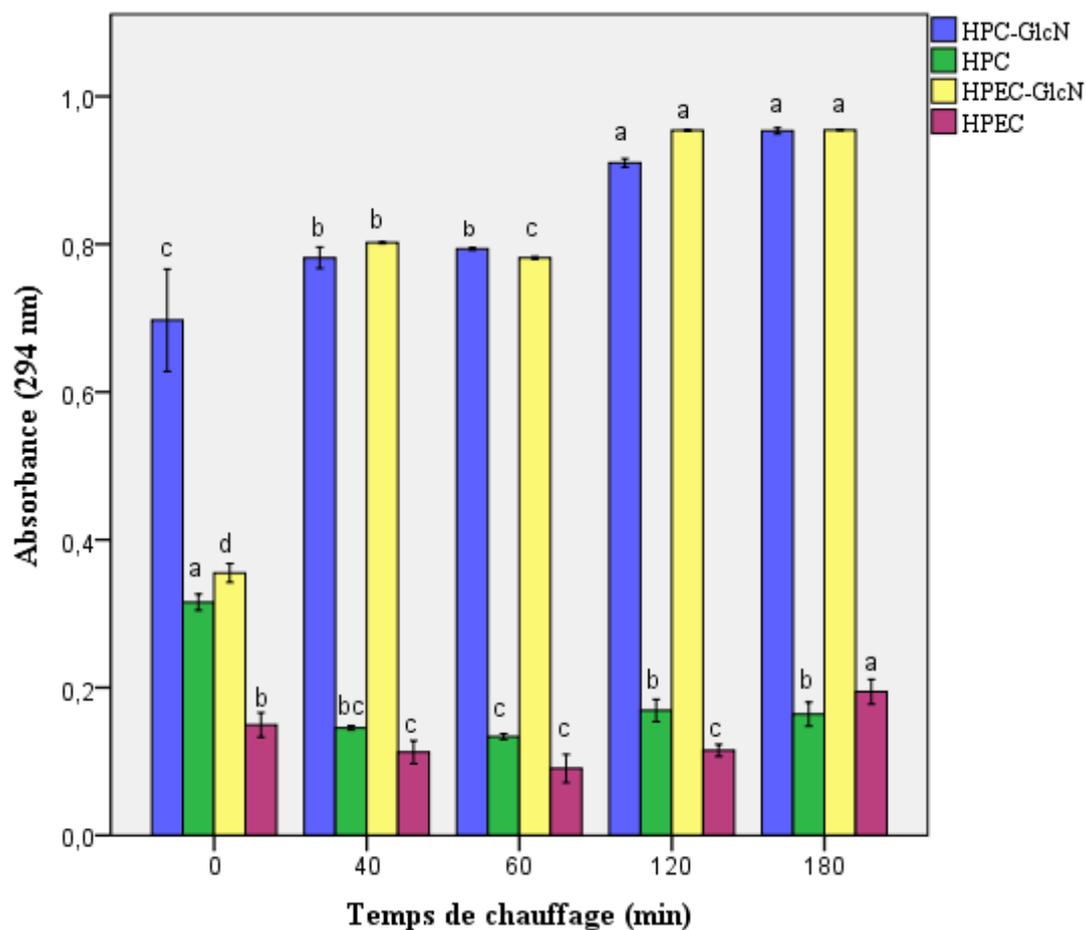


Figure 38 : L'évolution de la formation de produits de Maillard mesurées par absorption à 294 nm des échantillons en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; **HPEC** : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette, **HPC** : hydrolysats de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine. Les barres d'erreurs représentent l'écart type de la moyenne des expériences en triplicat. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour le même échantillon.

Selon [Lertittkul et al. \(2007\)](#), des composés intermédiaires ayant la propriété d'adsorber à l'UV sont produits en quantité suffisante durant la RM, puis cette production se stabilise indiquant ainsi l'épuisement de l'un des deux substrats mis en jeu.

3.4.3. Mesure de la fluorescence

D'après les résultats illustrés dans la [figure 39](#), le changement de la fluorescence est faible voir absent dans les deux systèmes modèles en absence de GlcN sur toute la durée de l'incubation, alors que, nous constatons une augmentation continue de la fluorescence en fonction du temps pour les deux systèmes modèles en présence du sucre. L'intensité de la

fluorescence semble constante entre 120 et 180 min pour le système modèle HPEC-GlcN, alors qu'elle continue à augmenter pour le système modèle HPC-GlcN.

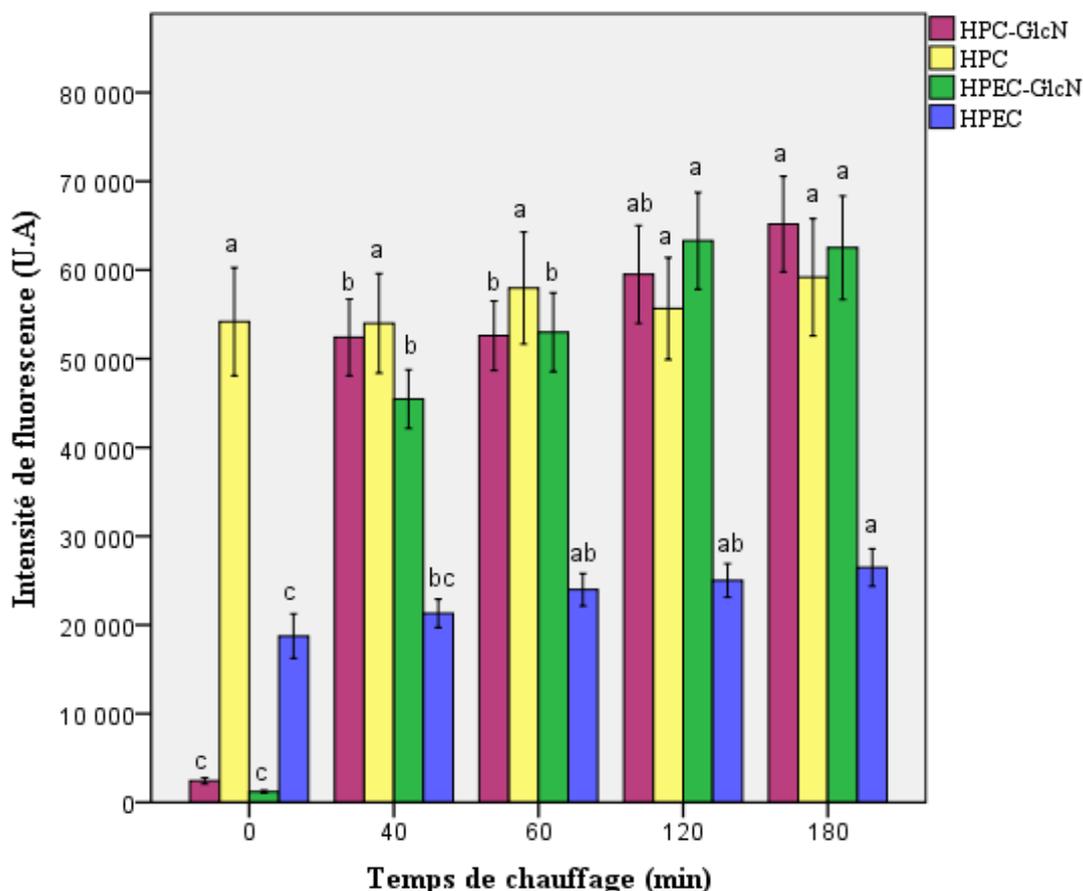


Figure 39 : L'évolution de la formation de produits de Maillard mesurées par fluorescence des échantillons en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; HPEC : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette, HPC : hydrolysats de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine. Les barres d'erreurs représentent l'écart type de la moyenne des expériences en triplicat. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour le même échantillon.

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux publiés par [Dong et al. \(2012\)](#) et [Benjakul et al. \(2005\)](#). Ces auteurs ont rapporté que d'autres produits intermédiaires, outre que les composés ayant la propriété d'adsorber à l'UV, appelés fluorophores sont formés lors de la RM. Ces molécules sont considérées comme les précurseurs des pigments bruns et leur détection par spectrofluorimétrie permet de suivre ainsi la progression de la RM avant que tout changement visuel se produit.

Par ailleurs, la forme ionisée et la forme moléculaire d'une base faible ou d'un acide faible possèdent des structures électroniques différentes. En conséquence, elles auraient aussi des

spectres électroniques différents. En se référant à cette théorie, il nous a paru intéressant de comparer la relation entre le pH et la forme ainsi que l'intensité des spectres des fluorophores de nos systèmes modèles. Nous remarquons d'après les figures en [annexes A et B](#), que le pH a une influence sur l'intensité de fluorescence mais pas sur ses maxima d'émission et d'excitation. Autrement dit, un milieu acide a tendance à augmenter l'intensité de fluorescence sans modification de spectre.

3.4.4. Dosage des acides aminés résiduels

La quantité de groupements NH_2 libres a été estimée pour les échantillons d'hydrolysats chauffés ou modifiés par GlcN à 100 °C pendant différentes périodes ([Figures 40A et 40B](#)). Après chauffage des hydrolysats en présence du sucre, une diminution considérable du taux de groupements amines est observée dès 40 min de chauffage ([Figure 40A](#)). Il semble que cette diminution se poursuive jusqu'à atteindre des valeurs minimales proches du zéro en fin de cinétique. Notre résultat rejoint celui rapporté par [Liu et al. \(2015\)](#) qui notent que les groupements amines libres de peptide de poulet diminuent progressivement par RM avec le sucre xylose. Selon [Lan et al. \(2010\)](#), la diminution du nombre de groupements amines au cours de la RM est attribuée aux interactions entre l'acide aminé et le sucre.

En parallèle, les résultats recueillis après chauffage des hydrolysats en absence du GlcN ([Figure 40B](#)) révèlent que le nombre de groupements NH_2 augmente de façon significative après 40 min de chauffage, puis se stabilise. Plusieurs auteurs ([Gu et al., 2010](#) ; [Oluwaniyi et al., 2010](#)) ont rapporté que les peptides pourraient être fragmentés en séquences de faible poids moléculaire ou encore en acides aminés lorsqu'ils subissent un chauffage à une haute température en milieu alcalin. Ceci pourrait expliquer dans ce cas l'augmentation de la teneur en NH_2 .

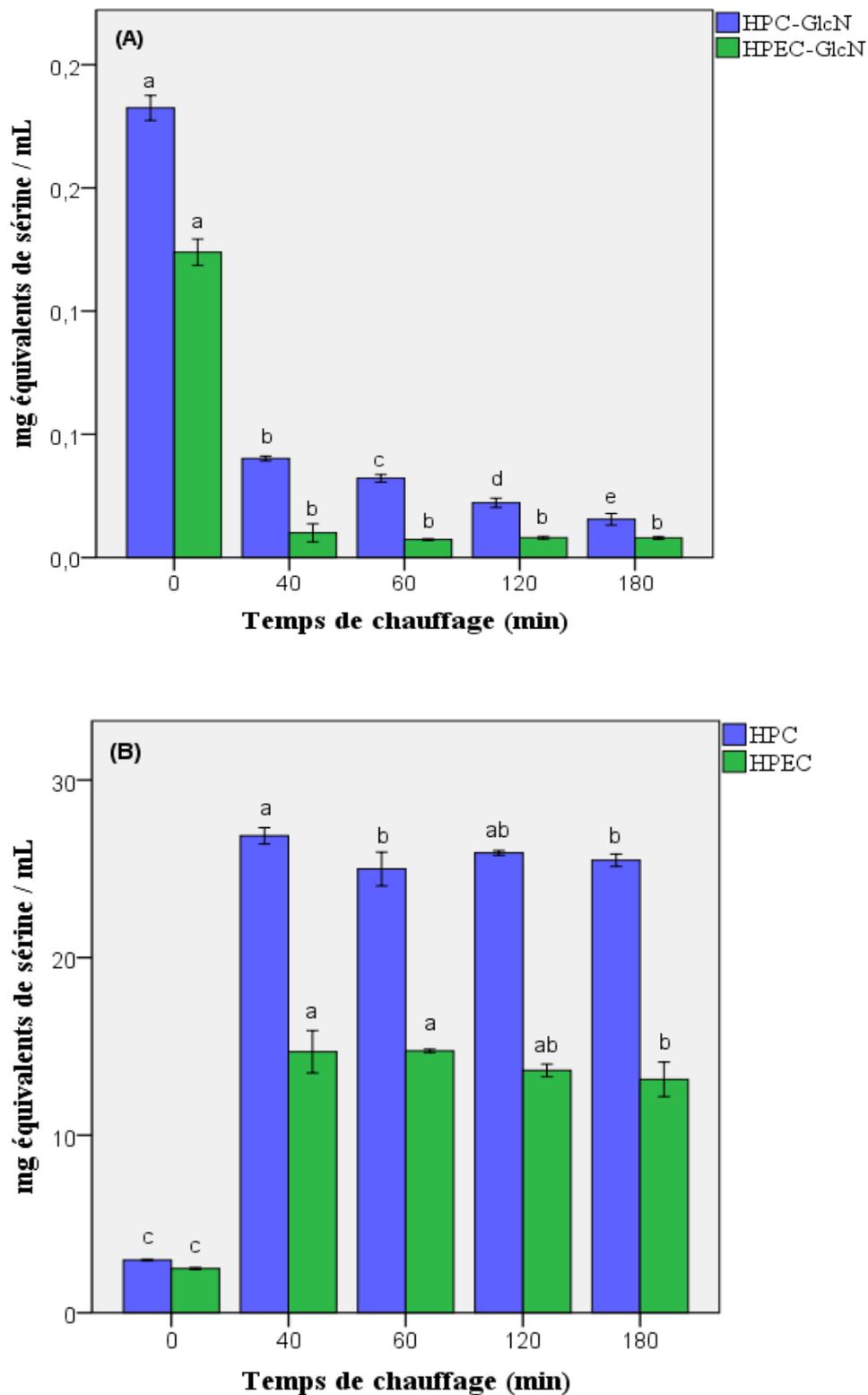


Figure 40 : Estimation de groupes aminés libres des hydrolysats chauffés en présence (A) ou en absence du glucosamine (B) en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; **HPEC** : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette, **HPC** : hydrolysats de protéines de carapace de crevette, **GlcN** : glucosamine. Les barres d'erreurs représentent l'écart type de la moyenne des expériences en triplicat. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour le même échantillon.

3.4.5. Analyse de la composition en acides aminés

La RM peut également être suivie en dosant les acides aminés encore présents en fin de réaction. On observe que le chauffage des systèmes en présence de GlcN affecte la composition d'acides aminés des hydrolysats (Tableau 20). Les acides aminés Lys et Arg semblent être les plus réactifs et leur contenu diminue considérablement après la réaction des hydrolysats avec GlcN. Il est important de noter que GlcN interagit avec les résidus His de HPEC et HPC. Ainsi, le contenu de His dans HPEC diminue considérablement après la réaction avec GlcN, mais cette réduction est en particulier faible dans le système modèle HPC-GlcN. Cela suggère que, soit les résidus His dans HPEC-GlcN sont situés en position N-terminal des peptides soit qu'ils sont présents à l'état libres dans cet hydrolysat.

Tableau 20 : Composition et concentration en acides aminés totaux (en mg/g de matière sèche) dans les hydrolysats de crevettes estimées avant et après le chauffage avec le sucre

| Acides aminés | HPC | HPC-GlcN | HPEC | HPEC-GlcN |
|---------------|-------|----------|-------|-----------|
| Asp+Asn | 16,59 | 13,53 | 4,47 | 3,24 |
| Thr | 5,72 | 5,27 | 1,52 | 1,15 |
| Ser | 5,21 | 6,02 | 1,38 | 1,63 |
| Glu+Gln | 24,03 | 19,53 | 10,09 | 7,36 |
| Gly | 11,72 | 9,90 | 9,09 | 5,95 |
| Ala | 9,86 | 10,10 | 3,89 | 4,25 |
| Cys | 1,23 | 1,54 | 1,27 | 0,94 |
| Val | 7,67 | 6,85 | 3,02 | 1,66 |
| Met | 2,63 | 1,59 | 0,46 | 0,26 |
| Ile | 6,32 | 4,49 | 1,75 | 1,11 |
| Leu | 11,89 | 9,41 | 3,60 | 2,52 |
| Tyr | 2,92 | 3,39 | 0,07 | 0,25 |
| His | 4,80 | 3,58 | 7,99 | 0,48 |
| Lys | 14,83 | 6,83 | 10,92 | 2,05 |
| Arg | 9,41 | 4,67 | 8,00 | 2,68 |
| Pro | 12,01 | 10,39 | 10,55 | 8,51 |

Les abréviations ; HPEC : hydrolysat de protéines d'eau de cuisson de crevette, HPC : hydrolysat de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine.

Dans le système modèle HPC-GlcN, la diminution de la quantité de Asp/Asn et Glu/Gln est plus marquée après réaction avec GlcN, en comparaison avec le système modèle HPEC-GlcN. Cela suggère une réaction plus élevée entre le sucre et les acides aminés Asn et Gln dans ce système.

3.4.6. Distribution des poids moléculaires

Les résultats illustrés dans le [tableau 21](#) montrent que la distribution des poids moléculaires (PM) des deux systèmes modèles change pendant le chauffage avec GlcN. Ainsi, des molécules de PM élevé (de 228 à 235 Da) apparaissent après 40 minutes de chauffage, alors que d'autres à faible PM (de 165-175 Da) disparaissent.

[Hong et al. \(2014\)](#) ont rapporté qu'une différence de PM de 161 Da entre le peptide natif et son conjugué est un signe de présence de produits d'Amadori (ou base de Schiff) après une RM à 25 °C ou 37 °C pendant 3h et demie. Cependant ce changement de masse déterminé dans notre étude est de 60 à 70 Da. Dans ce cas, les deux systèmes modèles étudiés ont probablement subi, à température élevée, une RM plus avancée donnant lieu d'après [Schmidt et al. \(2015\)](#) à d'autres composés, autres que les produits d'Amadori, appelés mélanoidines.

Tableau 21 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur colonne Superdex peptide PC 3.2/30 des hydrolysats avant et au cours du chauffage en présence du GlcN.

| Système modèle | Temps de chauffage (min) | Poids moléculaire (Da) |
|------------------|--------------------------|------------------------|
| HPEC-GlcN | 0 | 165 |
| | 40 | 228 |
| | 60 | 232 |
| | 120 | 235 |
| | 180 | 229 |
| HPC-GlcN | 0 | 174 |
| | 40 | 232 |
| | 60 | 232 |
| | 120 | 239 |
| | 180 | 230 |

Les abréviations ; **HPEC** : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette, **HPC** : hydrolysats de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine

3.4.7. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IR-TF)

La spectrométrie infrarouge est une technique d'analyse structurale fonctionnelle basée sur l'analyse vibrationnelle des liaisons. Cette technique simple à mettre en œuvre, est largement utilisée pour étudier et caractériser les fonctions chimiques de produits organiques. Elle est particulièrement utile pour l'étude des systèmes protéine-glucides (Farhat *et al.*, 1998).

Cette analyse a été réalisée afin de confirmer les interactions établies entre le sucre et les peptides des hydrolysats. Les spectres obtenus sont montrés dans les figures 41 et 42. On constate que les spectres d'absorption obtenus sont sensiblement identiques pour les deux types d'hydrolysats (avant et après glycation). Le groupe amide a été identifié pour les hydrolysats aux bandes d'absorption à 1626 cm^{-1} , correspondant au C=O. Après réaction, ce pic d'absorption disparaît et une nouvelle bande à 1596 cm^{-1} a été observée, ce qui suggère que la base de Schiff (double liaison C=N) a été formée entre l'extrémité réductrice de GlcN et le groupement amine des peptides. L'apparition de ce pic peut être due à la formation de 1,2-énamine par énoilisation dans l'étape primaire de la RM (Devine *et al.*, 2004).

Dans le cas des hydrolysats en absence de sucre, la bande d'absorption de NH_2 apparaît à 3252 cm^{-1} . Le même pic a été identifié dans les produits de la RM. Ceci s'explique par la présence de GlcN qui possède à la fois le groupement carbonyle et le groupement amine, contrairement aux sucres glucose, au fructose et au lactose.

L'apparition d'un pic à 1410 cm^{-1} indiquerait une vibration d'une liaison $\nu_{\text{C-N}}$. Le spectre infrarouge affiche également une bande à 2930 cm^{-1} qui pourrait être attribuée à la vibration de valence C-H. Un signal intense à 1034 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation et de déformation des liaisons de type C-O, C-C ou C-OH.

Dans ces zones, les produits de Maillard présentent une diminution d'intensité par rapport aux hydrolysats natifs. Liu *et al.* (2014) et Gu *et al.* (2009) ont supposé que cette diminution serait due à l'épuisement de la teneur en acides aminés (comme Arg, Lys et His) suite à leur implication dans la formation des conjugués lors de la RM.

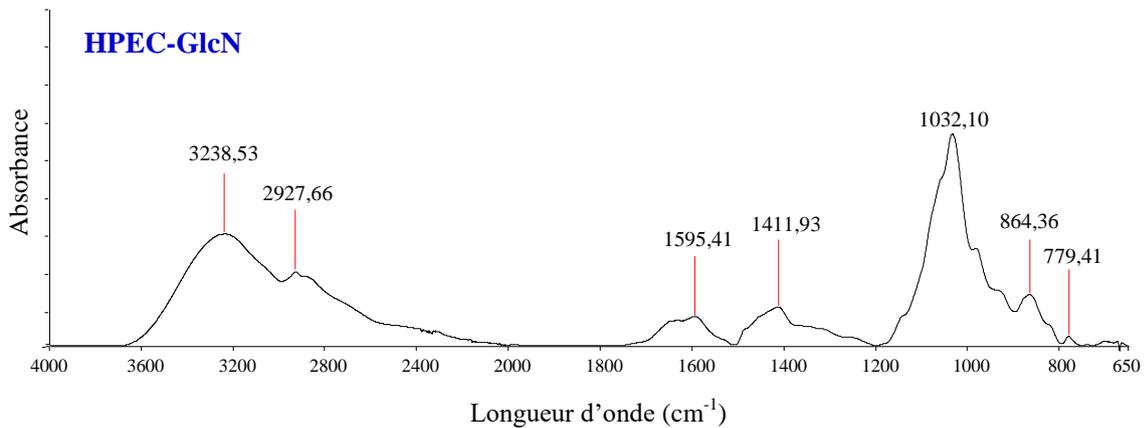
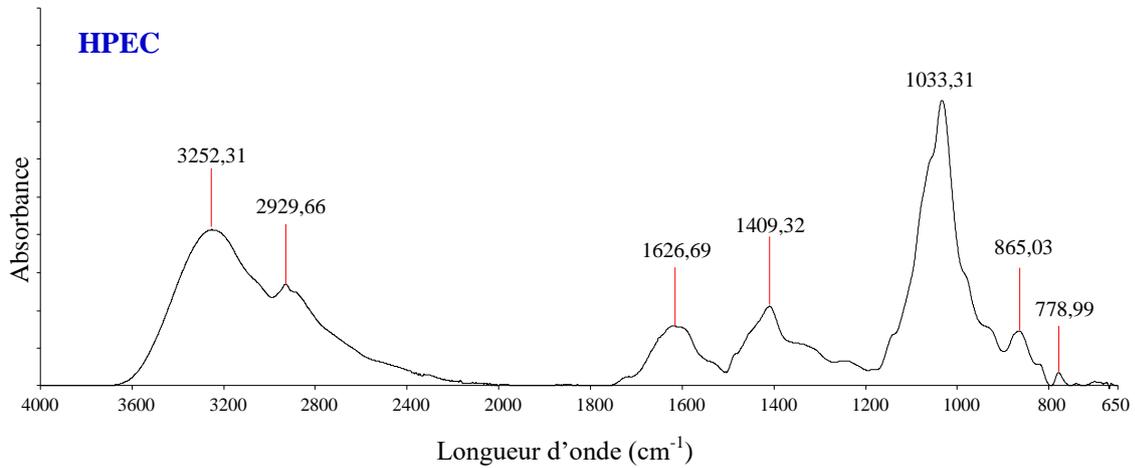


Figure 41 : Spectre IR-TF des hydrolysats natifs et chauffés en présence du sucre. Les abréviations ; **HPEC** : hydrolysate de protéines d'eau de cuisson de crevette, GlcN : glucosamine.

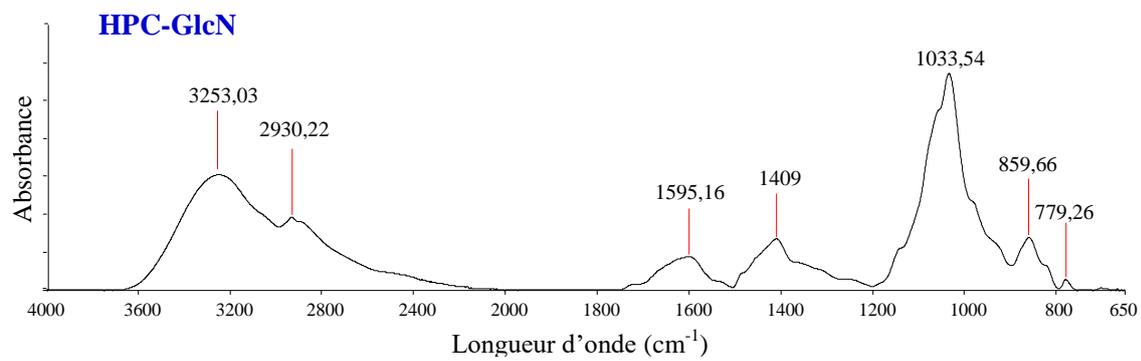
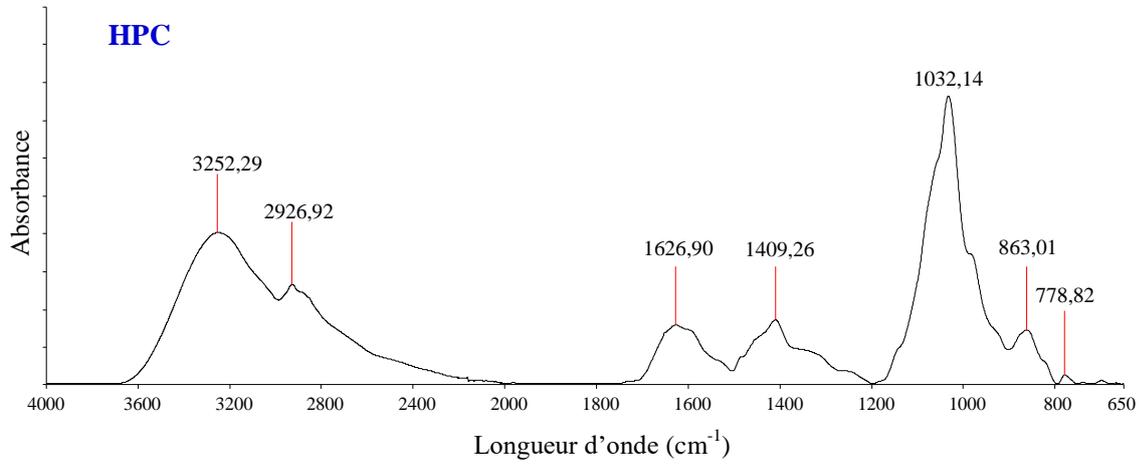


Figure 42 : Spectre IR-TF des hydrolysats natifs et chauffés en présence du sucre. Les abréviations ; **HPC** : hydrolysate de protéines de carapace de crevette, **GlcN** : glucosamine.

3.4.8. Étude de l'activité antioxydante des PRM

a. Étude du pouvoir réducteur

La RM entre les hydrolysats de sous-produits de la crevette et GlcN a été effectuée afin d'améliorer l'activité antioxydante des hydrolysats natifs.

L'activité réductrice du Fer a été déterminée par l'étude de la capacité des échantillons à transformer le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Les résultats sont présentés dans la [figure 43A](#). Nous constatons une capacité réductrice négligeable des hydrolysats tout au long de la période du chauffage, en absence de GlcN. Après glycation, cette activité s'élève de façon considérable (350 à 430 mmols équivalents de Fe^{2+} /g de poids de la matière sèche) au cours des 40 premières minutes de la RM, elle se stabilise pendant 20 min puis augmente légèrement pour atteindre le maximum (446 à 563 mmol équivalents de Fe^{2+} /g de matière sèche) à 180 min de réaction. Nous constatons également que l'activité antioxydante des PRM obtenus a été augmentée d'un facteur 22 par rapport aux hydrolysats non conjugués (20 à 31 mmol équivalents de Fe^{2+} /g de matière sèche) indiquant que la RM a permis d'améliorer la capacité des deux hydrolysats à réduire l'ion ferrique.

Ces composés à pouvoir réducteur indiquent qu'ils sont des donneurs d'électrons et peuvent réduire les ERO qui exercent leur action sur les lipides et les protéines ([Yen et Chen, 1995](#)). Conformément à nos résultats, [Vhangani et Wyk \(2013\)](#) ont également rapporté une activité antioxydante plus élevée et proportionnelle à l'augmentation du temps de chauffage des mélanges fructose-lysine et ribose-lysine. Ces données appuient les résultats de [Hwang et al. \(2011\)](#) et de [Berker et al. \(2010\)](#) qui ont noté que le pouvoir réducteur des PRM est dû à la présence de groupement hydroxyle qui peut servir comme donneur d'électron.

b. Étude du pouvoir antiradicalaire et chélateur de fer

Les capacités de piégeage de radicaux libres et de chélation de fer des deux systèmes modèles conjugués ont été comparées aux hydrolysats chauffés en absence du sucre. Les résultats sont illustrés dans les [figures 43B et 43C](#). En absence de GlcN, les deux activités antioxydantes antiradicalaire et chélatrice de fer semblent négligeables pour les deux types d'hydrolysats. Les deux activités ont montré une augmentation significative (24 à 26 mg équivalents d'acide ascorbique/g de matière sèche ; 22280 à 29080 μ mol équivalents d'EDTA/g de matière sèche) des deux types d'hydrolysats modifiés par GlcN durant les 40 premières minutes, qui continuent ensuite à augmenter lentement jusqu'à leur maximum (28 à 30 mg équivalents

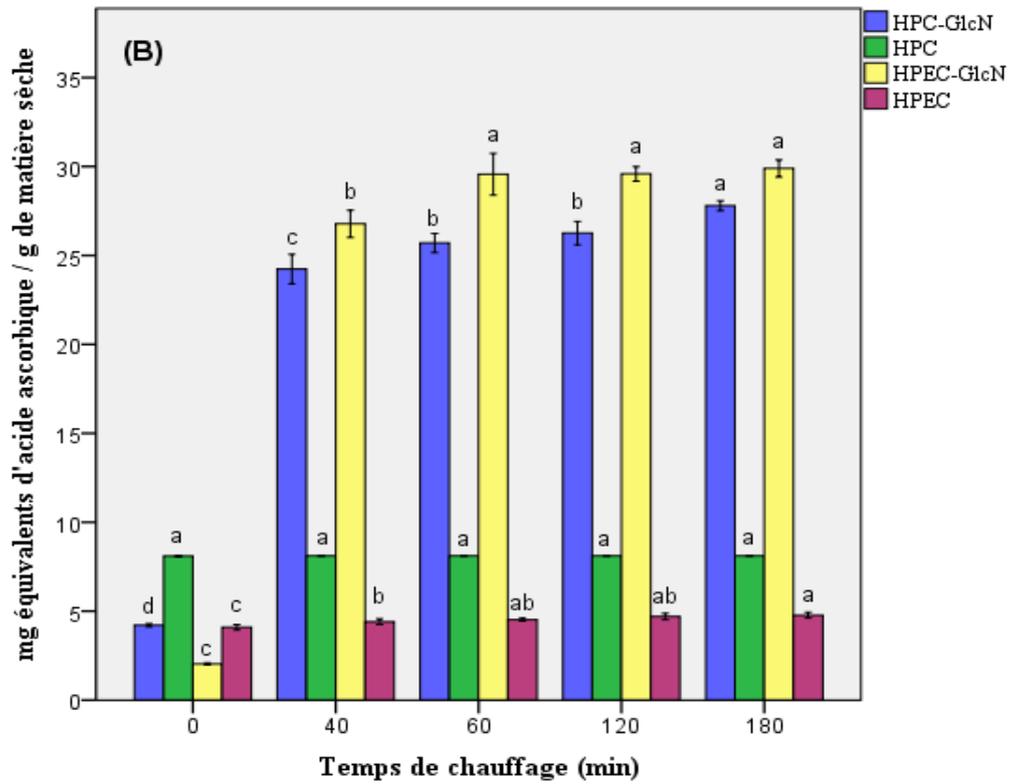
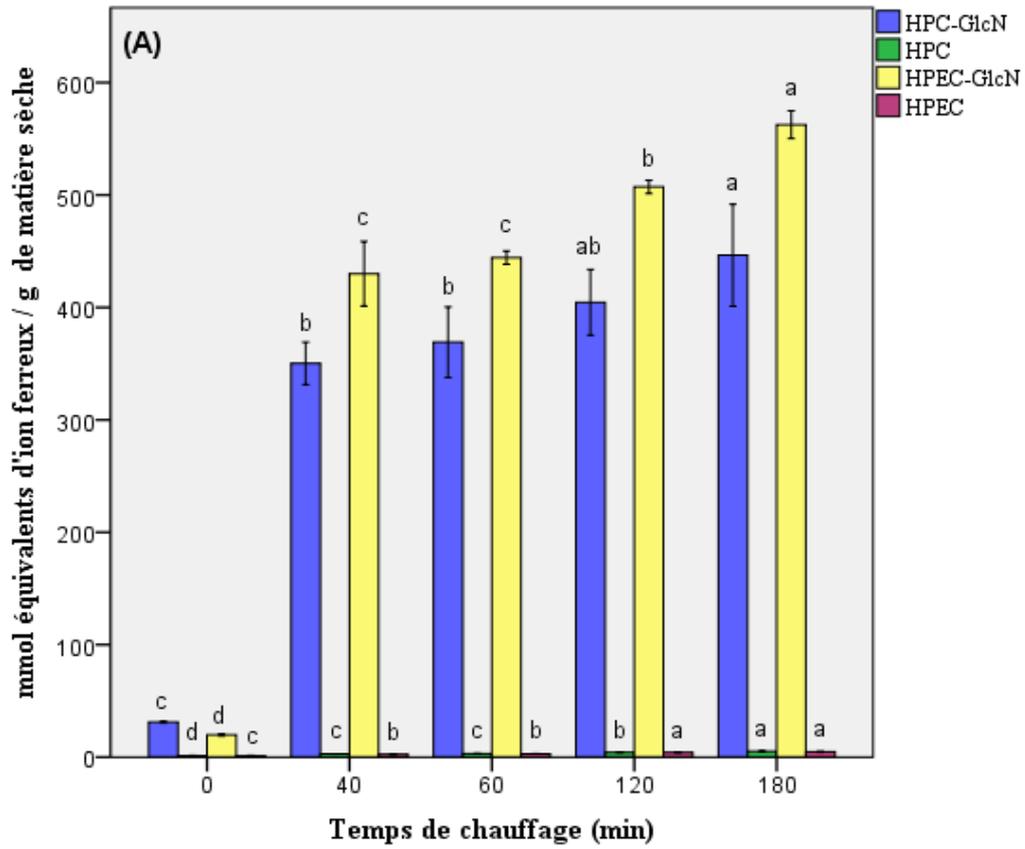
d'acide ascorbique/g de poids de matière sèche ; 23270 29004 μmols équivalents d'EDTA/g de matière sèche) à mesure que le temps de chauffage se prolonge. Ces activités ont été améliorées d'un facteur 7 par rapport aux hydrolysats non conjugués (2 à 4 mg équivalents d'acide ascorbique/g de matière sèche ; 6147 à 7480 μmols équivalents d'EDTA/g de matière sèche). Ces résultats rejoignent ceux rapportés par [Vhangani et Wyk \(2013\)](#) et [Nooshkam et Madadlou \(2016\)](#). Néanmoins, on remarque une diminution du pouvoir chélateur de fer pour le système modèle HPEC-GlcN après 120 minutes de chauffage (25080 μmols équivalents d'EDTA/g de matière sèche). [Vhangani et Wyk \(2013\)](#) ainsi que [Knol et al. \(2010\)](#) ont attribué cette diminution d'activité à la formation d'acides au cours du chauffage, pouvant affecter l'activité antioxydante des PRM formés.

On remarque également que le système modèle HPEC-GlcN présente une amélioration de l'activité de chélation du fer par rapport au système modèle HPC-GlcN. Il est intéressant de noter que l'activité antioxydante améliorée peut être influencée par de nombreux facteurs tels que la concentration des réactifs, la température, le temps de chauffage, le pH initial. En effet, [Morales et Babbel \(2002\)](#) ont constaté que l'augmentation de l'activité de piégeage des radicaux libres des PRM était différente avec les systèmes modèles incluant les acides aminés : alanine, glycine ou lysine avec le même sucre (glucose).

Par ailleurs, le changement de la taille moléculaire pendant la RM pourrait avoir un effet sur l'activité antioxydante des PRM. Les résultats de la distribution des poids moléculaires ([Tableau 22](#)) montrent que des composés à PM élevé ont été obtenus en fonction du temps de chauffage, ce qui indique que des modifications moléculaires se sont produites pendant le processus de glycation. Ainsi, les échantillons testés démontrent que l'activité antioxydante la plus élevée est liée aux molécules à PM élevé, ce qui est en accord avec les travaux réalisés par [Gu et al. \(2009\)](#) et [Monti et al. \(1999\)](#).

L'utilisation de PRM comme source d'antioxydants dans les aliments a été très bien étudiée, mais la compréhension des composés responsables de l'activité antioxydante est incomplète et les mécanismes d'action sont encore inconnus. Les effets protecteurs des PRM, en particulier les mélanoidines contre l'auto-oxydation, dépendent probablement de leur capacité à chélater les métaux ([Kawakishi et al., 1987](#)). D'autre part, des composés appelés reductones, qui sont formés à pH alcalin, présentent un pouvoir réducteur élevé en raison de leur aptitude à donner un atome d'hydrogène ([Amarowicz, 2009](#)). Cette différence de suggestion est probablement liée la différence dans les conditions utilisées par ces auteurs.

À la suite de l'ensemble des résultats obtenus, on note une cohérence entre l'activité antioxydante, la diminution du taux de groupements amines, l'accroissement du brunissement et de fluorescence ainsi que la génération des composés incolores intermédiaires. En effet, cette cohérence de données a été également rapportée dans plusieurs travaux par différents auteurs (Matmaroh *et al.*, 2006 ; Delgado-Andrade et Morales, 2005 ; Yamaguchi *et al.*, 1981).



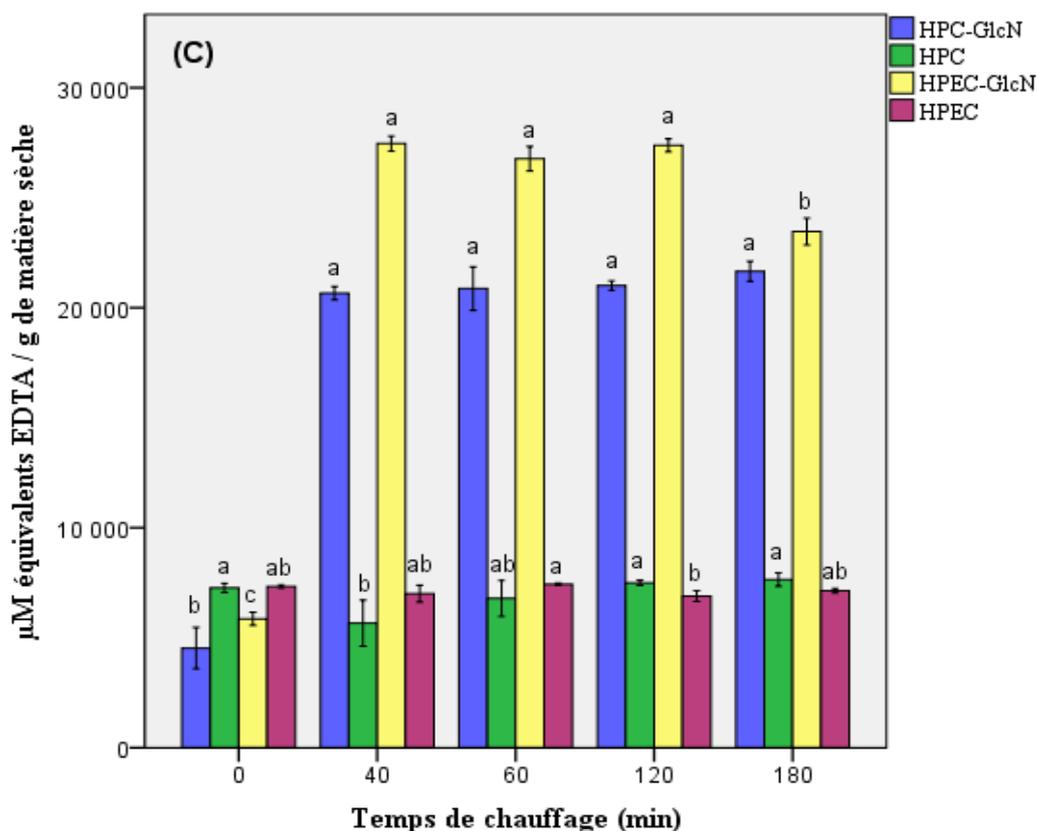


Figure 43 : Évolution des capacités, (A) réductrice de fer, (B) antiradicalaire et, (C) chélatrice de fer des hydrolysats avant (en absence du glucosamine) et après glycation avec le glucosamine en fonction du temps de chauffage. Les barres d'erreurs représentent l'écart type de la moyenne des expériences en triplicat. Les valeurs moyennes avec différentes lettres sont significativement différentes ($P < 0,05$) pour le même échantillon.

3.4.9. Étude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des hydrolysats natifs ou modifiés par GlcN (PRM) a été évaluée par la méthode de diffusion du disque vis-à-vis des bactéries à Gram-négatif et Gram-positif. D'après les résultats obtenus (Tableau 22), aucune activité inhibitrice n'a été observée pour les hydrolysats natifs. Cependant, après réaction avec GlcN, l'hydrolysate de protéines de carapace a présenté une activité antibactérienne contre toutes les souches testées. Cela signifie que la glycation à la température utilisée (100 °C) a contribué à l'amélioration de l'activité antibactérienne de l'hydrolysate de carapace.

Song *et al.* (2016) ont rapporté une activité antibactérienne des PRM, issus de la glycation des hydrolysats enzymatiques des anchois avec le glucose, contre à la fois les bactéries Gram-négatif et Gram-positif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, et

Sarcina lutea). De même, il a été observé que des mélanoidines formées à partir de caséine et de lactose inhibent aussi bien *in vitro* que *in vivo* *Helicobacter pylori* (Hiramoto et al., 2004). Une remarque similaire a été faite par Del Castillo et al. (2007) et Miralles et al. (2007) dans les systèmes modèles β -lactoglobuline-GlcN et gluten-glucose, respectivement, où l'effet antibactérien des composés de Maillard était plus prononcé en faisant augmenter le temps de chauffage. L'effet antimicrobien des PRM n'est pas encore compris, mais il est probable que ces derniers exercent différents mécanismes inhibiteurs. En 1999, Lanciotti et al. ont rapporté que les PRM pourraient interférer avec l'absorption de la sérine, du glucose et de l'oxygène et inhiber ainsi les enzymes du catabolisme de sucre des microorganismes en provoquant des changements irréversibles dans les membranes cellulaires interne et externe, et par conséquent une inhibition du transport des nutriments chez les bactéries Gram-négatif. D'autres auteurs suggèrent que les mélanoidines pourraient développer une activité antimicrobienne en fixant des métaux essentiels, tels que le fer, le cuivre et le zinc, éléments clés pour la croissance et la survie des bactéries pathogènes (Rufián-Henares et Cueva, 2009 ; Rufián-Henares et Morales, 2008).

Tableau 22 : Activité antibactérienne des hydrolysats avant et après leur glycation avec la GlcN vis-à-vis des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ mesurée en diamètre d'inhibition (mm)

| Les souches testées | Les échantillons testés | | | |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|------|-----------|
| | HPC | HPC-GlcN | HPEC | HPEC-GlcN |
| Gram-positif | | | | |
| <i>Lacobacillus helveticus</i> | - | 8,40 ± 0,50 | - | - |
| <i>Listeria innocua</i> | - | 7,56 ± 0,48 | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | 7,25 ± 0,10 | - | - |
| Gram-négatif | | | | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | - | 6,60 ± 0,28 | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | - | 6,96 ± 0,11 | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | - | 8,66 ± 1,60 | - | - |

Les résultats sont représentés en moyenne ± écart type. Les abréviations ; HPEC : hydrolysats de protéines d'eau de cuisson de crevette, HPC : hydrolysats de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine

3.5. Valorisation des coproduits marins en tant que milieu de culture pour la souche

E.faecalis DM19

Le choix du milieu approprié de fermentation est essentiel pour la culture et le maintien des microorganismes. Ces microorganismes ont tous un nombre de besoins communs tels : l'eau, une source d'énergie, une source de carbone, une source d'azote et des éléments minéraux. Cependant, l'azote est en général le substrat le plus onéreux pour la croissance microbienne et la production d'enzymes. À l'heure actuelle, cette importante source est obtenue à partir de la caséine, la farine de soja et la gélatine (Ellouz *et al.*, 2003). Compte tenu de leur teneur élevée en protéines, l'utilisation des sous-produits d'origine marine comme source azotée pour la souche *E.faecalis* DM19 constitue une bonne voie de valorisation. Cette utilisation permettrait d'augmenter la valeur de ce coproduit et de réduire le coût de production de la culture cellulaire.

3.5.1. Effet des hydrolysats de coproduits d'origine marine sur la consommation du glucose et de protéines et la production d'acides organiques

La quantité de glucose et de protéines consommée ainsi que des acides organiques produits lors du processus de fermentation a été déterminée. On constate, d'après les résultats illustrés dans le [tableau 23](#), que la consommation du glucose et de protéines par la souche *E.faecalis* DM19 est plus élevée dans les milieux additionnés avec 10 g/L d'hydrolysats de coproduits d'origine marine. La consommation du glucose la plus élevée (48 %) a été relevée avec l'hydrolysat SQES. On constate également que lorsque la concentration en hydrolysats ajoutée est augmentée (20 g/L), la consommation du glucose augmente à 20 % jusqu'à 75 % selon le milieu modifié, tandis que la consommation de protéines tend à diminuer de manière significative. Cette diminution est de 60 % à 80 % pour certains milieux (préparés avec FGTR, SQTR, SQES, SQAP et SHPR), et de plus de 80 % pour d'autres (à base de SHEE et SHAP).

En revanche, les acides lactique et acétique se montrent les principaux produits de *E.faecalis* DM19 générés lors du processus de fermentation, tandis que l'acide formique est produit en faibles quantités. À l'instar de ce qui a été observé pour le glucose et les protéines, l'aptitude de la souche à produire ces deux acides organiques semble être dépendante du milieu et de la concentration en hydrolysats testés ([Tableau 23](#)). En effet, l'incorporation des hydrolysats des coproduits à 10 g/L dans les milieux a amélioré la production d'acide lactique dans tous les milieux MRS modifiés, par rapport au milieu MRS non modifié, notamment ceux à base de

SQAP et SHNP (20 % et 30 % respectivement) ainsi que de SHEE et SHPR (40 % et 50 % respectivement). De même, ces milieux s'avèrent favorables à la production de l'acide acétique par la souche. Par ailleurs, les résultats montrent que l'ajout des hydrolysats à 20 g/L dans les milieux exerce un effet positif sur la production d'acide lactique (Tableau 23). Le pourcentage de quantité produite par *E. faecalis* DM19 peut atteindre 60 % dans les milieux substitués par les hydrolysats SQTR, SHAP, SHNP, SHEE et SHPR par rapport aux résultats obtenus avec le milieu MRS non modifié, alors que la meilleure production d'acide acétique (46 %) est notée pour le milieu substitué avec SHEE. Cette différence de production ne peut être liée qu'à l'effet des hydrolysats des coproduits marins utilisés dans la fermentation.

Il a été rapporté que *Enterococcus faecalis* qui est caractérisée par son aptitude à se cultiver dans des conditions hostiles (thermorésistance, tolérance à de larges variations de pH), est une souche attractive pour une utilisation industrielle (Wee et al., 2006). Néanmoins, elle présente une exigence nutritionnelle vis-à-vis des acides aminés isoleucine, leucine, méthionine, glutamate, glycine, tryptophane et valine (Murray et al., 1993). Les résultats obtenus dans le présent travail suggère que l'assimilation du glucose par la souche serait lié au transport des acides aminés et/ou des peptides (qui composent les hydrolysats protéiques des coproduits marins), et tout accroissement de la concentration en azote apportée par les hydrolysats peptidiques entraînerait une augmentation significative de l'absorption de glucose et donc de son assimilation pour être converti en acides lactique ou acétique (Fakas et al., 2008).

Tableau 23 : Effet des milieux modifiés par les peptones marines sur la consommation de glucose et de protéines ainsi que la production d'acides organiques par *E.faecalis* DM19

| Surnageant | Consommation de glucose (%) | | Consommation de protéines (%) | | Production d'acide lactique (g/L) | | Production d'acide acétique (g/L) | | Production d'acide formique (g/L) | |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | 1f | 2f | 1f | 2f | 1f | 2f | 1f | 2f | 1f | 2f |
| MRS-S | 13,2±0,2 ^{g,A} | 13,2±0,2 ^{h,A} | 0,2±0,1 ^{d,A} | 0,2±0,1 ^{abc,A} | 5,1±0,1 ^{e,A} | 5,1±0,1 ^{f,A} | 5,9±0,4 ^{b,A} | 5,9±0,4 ^{cd,A} | 0,05±0,03 ^{a,A} | 0,05±0,03 ^{bc,A} |
| MRS⁻-S | 7,0±0,3 ^{h,A} | 7,0±0,3 ^{i,A} | 0,4±0,2 ^{bcd,A} | 0,4±0,2 ^{a,A} | 4,6±0,1 ^{f,A} | 4,6±0,1 ^{g,A} | 4,1±0,2 ^{f,A} | 4,1±0,2 ^{f,A} | 0,04±0,01 ^{a,A} | 0,04±0,01 ^{c,A} |
| SQES-S | 47,7±0,7 ^{a,A} | 47,4±0,1 ^{f,A} | 0,5±0,1 ^{abcd,A} | 0,1±0,0 ^{bc,B} | 5,4±0,4 ^{de,B} | 7,4±0,2 ^{d,A} | 4,2±0,2 ^{ef,B} | 5,6±0,1 ^{de,A} | 0,07±0,01 ^{a,A} | 0,08±0,01 ^{ab,A} |
| SQAP-S | 44,0±1,0 ^{c,B} | 67,5±0,5 ^{a,A} | 0,6±0,1 ^{abc,A} | 0,1±0,0 ^{c,B} | 6,3±0,3 ^{c,B} | 7,7±0,1 ^{bcd,A} | 5,2±0,2 ^{c,B} | 6,3±0,3 ^{c,A} | 0,06±0,01 ^{a,B} | 0,09±0,01 ^{a,A} |
| SQTR-S | 39,4±0,1 ^{e,B} | 64,7±0,7 ^{c,A} | 0,8±0,1 ^{a,A} | 0,3±0,1 ^{ab,B} | 5,2±0,1 ^{e,B} | 8,5±0,6 ^{a,A} | 4,0±0,3 ^{f,B} | 5,5±0,1 ^{de,A} | 0,06±0,04 ^{a,A} | 0,09±0,01 ^{a,A} |
| SHAP-S | 46,5±0,9 ^{b,B} | 49,6±0,2 ^{e,A} | 0,4±0,2 ^{bcd,A} | 0,0±0,0 ^{c,B} | 5,7±0,1 ^{d,B} | 8,5±0,6 ^{a,A} | 5,1±0,2 ^{cd,B} | 6,9±0,3 ^{b,A} | 0,07±0,01 ^{a,A} | 0,07±0,01 ^{abc,A} |
| SHNP-S | 40,7±0,3 ^{d,B} | 58,8±0,1 ^{d,A} | 0,2±0,1 ^{cd,A} | 0,3±0,0 ^{ab,A} | 6,6±0,1 ^{c,B} | 8,0±0,1 ^{bc,A} | 5,4±0,4 ^{bc,B} | 6,3±0,3 ^{c,A} | 0,07±0,01 ^{a,A} | 0,08±0,01 ^{ab,A} |
| SHEE-S | 40,6±0,1 ^{d,B} | 64,0±0,1 ^{c,A} | 0,7±0,3 ^{ab,A} | 0,1±0,1 ^{bc,B} | 7,1±0,2 ^{b,B} | 8,2±0,2 ^{ab,A} | 6,9±0,1 ^{a,B} | 8,6±0,1 ^{a,A} | 0,08±0,01 ^{a,A} | 0,09±0,01 ^{a,A} |
| FGTR-S | 37,8±0,1 ^{f,B} | 46,5±0,6 ^{g,A} | 0,5±0,0 ^{bcd,A} | 0,2±0,1 ^{bc,B} | 5,2±0,2 ^{de,B} | 6,2±0,0 ^{e,A} | 4,6±0,3 ^{de,B} | 5,2±0,4 ^{e,A} | 0,07±0,01 ^{a,A} | 0,05±0,01 ^{bc,A} |
| SHPR-S | 37,9±0,2 ^{f,B} | 66,2±0,7 ^{b,A} | 0,5±0,3 ^{abcd,A} | 0,1±0,0 ^{bc,B} | 7,7±0,3 ^{a,B} | 8,4±0,2 ^{a,A} | 6,7±0,1 ^{a,A} | 7,4±0,5 ^{b,A} | 0,07±0,01 ^{a,A} | 0,10±0,03 ^{a,A} |

Les lettres en minuscules (a, b, c, d, e, f et g) indiquent les différences significatives ($P<0,05$) entre les différents échantillons à la même concentration.

Les lettres en majuscule (A et B) indiquent les différences significatives ($P<0,05$) entre les deux concentrations du même hydrolysats marin (1f et 2f).

Les résultats de notre travail sont en accord avec ceux de l'étude effectuée sur *Streptococcus zooepidemicus* où la substitution de la tryptone par les hydrolysats de coproduits marins améliore la production de l'acide lactique par cette souche (Vázquez *et al.*, 2009).

3.5.2. Effet des hydrolysats de coproduits d'origine aquatique sur la croissance

La souche de *E.faecalis* DM19 a été cultivée en présence de huit hydrolysats protéiques. Après 24 h d'incubation, le pH ainsi que le taux de croissance ont été déterminés (Tableau 24).

On remarque d'après les résultats obtenus que la substitution de la peptone dans les milieux de culture par les hydrolysats de calmar (SQES) et de crevette (SHPR) à 10 g/L a augmenté la biomasse cellulaire de 10 % et ce en comparaison avec le milieu MRS non modifié traduisant ainsi une croissance favorable de la souche dans ces milieux. Le même résultat est observé avec l'hydrolysat SQAP de calmar lorsqu'il est additionné dans le milieu à 20 g/L. En revanche, la biomasse se révèle relativement faible dans les milieux dans lesquels les hydrolysats SHAP, FGTR ($DO_{600} \sim 1,70$ quel que soit la concentration en hydrolysat) et SHEE ($DO_{600} = 0,64 \pm 0,01$ avec 20 g/L) ont été incorporés et ce par rapport à ce qui a été obtenu avec le milieu MRS de référence ($DO = 1,81 \pm 0,01$).

La plupart des produits marins possèdent une excellente valeur nutritive. Ils sont une excellente source de protéines de grande qualité, en plus d'être riches en vitamines et minéraux (Ibrahim *et al.*, 1999 ; Cruz-Ricque *et al.*, 1989 ; Cruz et Guillaume, 1983). Cette étude montre que la croissance de la souche *E.faecalis* DM19 est différente ($P < 0,05$) lorsqu'elle est cultivée sur les milieux MRS à base d'hydrolysats marins générés par l'action de différentes enzymes protéolytiques à partir du même substrat protéique. Autrement dit, la souche *E. faecalis* DM19 semble avoir une préférence pour les milieux MRS additionnés d'hydrolysats de protéines de calmar (SQES à 10 g/L ainsi que SQAP aux deux concentrations) préparés avec les enzymes espérase ou protéase alcaline, respectivement ou encore d'hydrolysat de protéines de crevette (SHPR à 20 g/L) préparé avec la protamex.

Tableau 24 : Effet de l'addition des peptones marines sur la croissance de la souche *E.faecalis* DM19. Le tableau présente en plus la mesure du pH dans les différents milieux de culture modifiés.

| Paramètres étudiés | Hydrolysats marins | MRS | MRS ⁻ | SQES | SQAP | SQTR | SHAP | SHNP | SHEE | FGTR | SHPR |
|--------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| pH final | 1f | 4,62 | 4,55 | 4,56 | 4,56 | 4,57 | 4,58 | 4,62 | 4,57 | 4,60 | 4,56 |
| | 2f | 4,62 | 4,55 | 4,69 | 4,74 | 4,71 | 4,66 | 4,80 | 4,81 | 4,79 | 4,79 |
| ΔpH | 1f | 1,58 | 1,65 | 1,64 | 1,64 | 1,63 | 1,62 | 1,58 | 1,63 | 1,60 | 1,64 |
| | 2f | 1,58 | 1,65 | 1,51 | 1,46 | 1,49 | 1,54 | 1,4 | 1,39 | 1,41 | 1,41 |
| DO (600nm) | 1f | 1,81±0,01 ^{c,A} | 1,65±0,01 ^{g,A} | 2,01±0,02 ^{a,A} | 1,95±0,01 ^{b,B} | 1,83±0,02 ^{c,B} | 1,74±0,01 ^{e,A} | 1,81±0,01 ^{c,A} | 1,80±0,01 ^{d,A} | 1,69±0,02 ^{f,A} | 2,02±0,01 ^{a,A} |
| | 2f | 1,81±0,01 ^{c,A} | 1,65±0,01 ^{de,A} | 1,83±0,02 ^{c,B} | 2,11±0,01 ^{a,A} | 1,94±0,00 ^{b,A} | 1,67±0,01 ^{e,B} | 1,82±0,01 ^{c,A} | 0,64±0,01 ^{f,B} | 1,70±0,01 ^{de,A} | 1,73±0,01 ^{d,B} |

Les lettres en minuscules (a, b, c, d, e, f et g) indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) entre les différents échantillons à la même concentration (1f ou 2f)

Les lettres en majuscule (A et B) indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) entre les deux concentrations du même hydrolysats marin (1f et 2f).

Ce résultat corrobore avec celui de [Stein et al. \(2005\)](#) qui, en étudiant la croissance des bactéries lactiques sur des hydrolysats de viscères de morue préparés avec les enzymes alcalase, papaïne et des enzymes endogènes, ont constaté que la performance de l'hydrolysats est fortement dépendante de sa composition en peptides et acides aminés. Cela pourrait être expliqué par le fait que certaines protéases libèrent, à partir des protéines, des acides aminés et des peptides appropriés aux systèmes de transport de la bactérie lactique qui facilitent leur assimilation à l'intérieur de la cellule, menant par conséquent à une optimisation de la croissance bactérienne ([Kunji et al., 1996](#)).

Cependant, la croissance de la souche *E.faecalis* DM19 est faible dans les milieux additionnés des hydrolysats SHAP et FGTR (quel que soit leurs concentrations) ainsi que SHEE (à 20 g/L) en comparaison avec le milieu MRS non modifié. Ces résultats peuvent être interprétés par le fait que ces deux types d'hydrolysats contiennent probablement des peptides ou des composés qui affectent négativement la biomasse cellulaire en ralentissant la croissance bactérienne ([Van't Hof et al., 2001](#)). Par ailleurs, Plusieurs études ont montré l'effet inhibiteur des acides organiques sur la croissance de certaines bactéries. D'après les travaux de [Hsiao et Siebert \(1999\)](#), l'acide acétique inhibe la croissance de *Bacillus subtilis* (0,105 g/L), de *Lactobacillus plantarum* (27,5 g/L), et de *Escherichia coli* (1,6 g/L).

Plus récemment, les travaux de [Boguta et Jensen \(2014\)](#) ont montré que l'acide acétique (5,3 g/L) est capable de provoquer une inhibition de croissance de *Pediococcus acidilactici* jusqu'à 4 %. En se basant sur ces résultats d'investigations, le phénomène d'inhibition résultant de l'incorporation de SHEE serait probablement dû également à la forte concentration d'acide acétique produite par *E. faecalis* DM19 ([Tableau 23](#)).

Nous avons par la suite porté notre attention sur les résultats du pH obtenus après 24 h d'incubation ([Tableau 24](#)). L'étude de l'effet de la concentration des hydrolysats marins a montré que la production des acides lactique et acétique par la souche *E.faecalis* DM19 est plus importante à 20 g/L par rapport à 10 g/L ([Tableau 23](#)). Ce résultat apparait cependant contradictoire avec la variation du pH ([Tableau 24](#)) qui devrait diminuer avec l'augmentation de la quantité des acides produits. Ce résultat pourrait être lié à la présence, dans les hydrolysats, de substances minérales dissoutes constituant un pouvoir-tampon permettant ainsi aux milieux de culture de résister aux changements de pH ; plus la concentration en substances minérales sera élevée, moins le pH du milieu pourra varier.

3.5.3. Effet des hydrolysats de coproduits sur l'activité bactériocinogène

Dans le but d'étudier l'effet des hydrolysats sur l'activité antagoniste de la souche *E.faecalis* DM19, des essais de l'activité bactériocinogène des surnageants de culture ont été réalisés par la méthode du disque contre 21 souches microbiennes. Les résultats de l'antagonisme sont indiqués dans le [tableau 25](#). D'après les résultats obtenus, il apparaît que le pouvoir antagoniste de la souche *E.faecalis* DM19 varie significativement ($P<0,05$) avec la souche cible et le type du milieu modifié. Les diamètres des zones d'inhibition varient entre $5,44\pm 0,18$ et $18,73\pm 1,80$ mm. On remarque que le surnageant issu de la culture de *E.faecalis* DM19 sur le milieu MRS non modifié présente une activité bactéricide contre la majorité des souches testées, à l'exception de *Aspergillus niger* CECT 2088, *Bacillus coagulans* CECT 56, *Penicillium expansum* DSMZ 62841 et *Yersinia enterocolitica* CECT 4315. Cependant, ces dernières espèces se montrent sensibles aux surnageants issus des milieux préparés avec les hydrolysats marins traduisant ainsi l'existence d'agents d'inhibition qui sont produits par la souche *E.faecalis* DM19 dans ces milieux modifiés ([Tableau 25](#)).

On remarque aussi d'après les résultats que la souche *E.faecalis* DM19 est à l'origine des zones d'inhibitions avec des diamètres faibles (ne dépassant pas 7 mm) voire absentes pour toutes les espèces testées, et ce, lorsqu'elle est cultivée en présence de 10 g/L d'hydrolysats. Cependant, à 20 g/L, les hydrolysats semblent avoir un effet sur l'activité inhibitrice d'*E.faecalis* DM19 contre toutes les souches indicatrices étudiées ([Tableau 25](#)) où les diamètres d'inhibition varient de $5,4\pm 0,2$ à $17,2\pm 0,7$. L'activité inhibitrice la plus élevée est observée contre *Listeria monocytogenes* CECT 4032 avec l'hydrolysate SQES ($14,2\pm 0,2$), suivie par l'hydrolysate SHNP ($13,0\pm 0,7$) et ce en comparaison avec les résultats du MRS non modifié ($P<0,05$).

Ces résultats laissent suggérer que la souche *E.faecalis* DM19 produit des bactériocines sous les conditions qui éliminent l'effet des acides organiques et de peroxyde d'hydrogène. En effet, plusieurs études ont déjà montré que *E.faecalis* produit un large spectre de bactériocines appelées entérocinés, actives contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif ([Pieniz et al., 2014](#) ; [Line et al., 2008](#)).

Tableau 25 : Sensibilité des souches indicatrices à l'activité antimicrobienne des suragants de culture de *E.faecalis* DM19 cultivée dans les milieux modifiés. Les résultats sont exprimés en mm de diamètre de zone d'inhibition

| Souches indicatrices | MRS-S | | | SHNP-S | | | SHEE-S | | | FGTR-S | | | SHPR-S | | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|--------|----------------------------|------------------------|--------|-----------------------|--------------------------|--------|----|--|
| | 1f | 2f | 1f | 1f | 2f | 1f | 1f | 2f | 1f | 2f | 1f | 2f | 1f | 2f | |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 8,0±0,1 ^b | 6,3±0,3 ^c | - | - | 6,1±0,1 ^c | - | - | 7,8±0,4 ^b | - | - | - | 6,2±0,2 ^c | - | - | |
| <i>Aspergillus niger</i> | - | 6,9±0,4 ^{b,c,BC} | - | - | 6,4±0,1 ^{c,d,CD} | - | - | 6,3±0,1 ^{e,t,CDE} | - | - | 7,4±0,1 ^{AB} | 5,7±0,2 ^{d,DE} | - | - | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 7,4±1,0 ^{b,B} | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 5,9±0,6 ^{c,C} | - | - | |
| <i>Bacillus coagulans</i> | - | 11,6±0,2 ^d | - | - | 9,1±0,3 ^c | - | - | 13,0±0,2 ^c | - | - | - | 11,8±0,3 ^d | - | - | |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 5,9±1,0 ^b | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i> | 15,8±1,7 ^{a,A} | 8,6±0,0 ^{e,E} | - | 6,5±0,3 ^{b,F} | 10,4±0,1 ^{d,D} | - | - | 15,0±0,4 ^{ab,AB} | - | - | - | 10,2±0,1 ^{d,D} | - | - | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 7,1±0,7 ^a | 5,7±0,1 ^b | - | - | 6,3±0,0 ^b | - | - | 6,2±0,0 ^b | - | - | - | 6,3±0,3 ^b | - | - | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 7,4±0,5 ^{bcd} | 6,6±0,1 ^d | - | - | - | - | - | 7,3±0,1 ^{bcd} | - | - | - | - | - | - | |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | 18,7±1,8 ^a | 12,4±0,1 ^{bc} | - | - | 9,3±2,1 ^{de} | - | - | 9,6±1,0 ^{de} | - | - | - | 11,2±1,0 ^{cd} | - | - | |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 9,6±1,8 ^a | 6,5±0,1 ^b | - | - | 7,0±0,7 ^b | - | - | 7,4±0,2 ^b | - | - | - | 8,8±0,3 ^a | - | - | |
| <i>Escherichia coli</i> | 7,0±0,2 ^b | - | - | - | - | - | - | 6,2±0,2 ^c | - | - | - | - | - | - | |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 9,0±0,1 ^{a,A} | 8,4±0,9 ^{ab,AB} | - | - | 7,5±0,6 ^{bc,BC} | - | - | 6,8±0,1 ^{c,C} | - | - | - | 7,3±0,8 ^{c,C} | - | - | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 9,0±0,8 ^{c,F} | 13,0±0,7 ^{b,B} | - | - | 8,6±0,8 ^{e,F} | - | - | 8,4±0,7 ^{c,F} | - | - | - | 11,8±0,4 ^{d,CD} | - | - | |
| <i>Penicillium expansum</i> | - | 6,2±0,4 ^{c,C} | 5,7±0,1 ^{a,C} | - | 5,7±0,0 ^{c,C} | 6,8±0,3 ^{a,C} | - | 7,1±0,1 ^{b,B} | 6,0±0,3 ^{a,C} | - | - | 7,1±0,6 ^{b,B} | - | - | |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 6,6±1,2 ^a | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6,2±0,1 ^{ab} | - | - | |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | 9,0±0,2 ^a | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> | 15,0±2,8 ^{a,A} | 6,6±0,0 ^{c,C} | - | - | 10,5±0,0 ^{b,B} | 7,6±0,2 ^{b,C} | - | 11,2±0,1 ^{b,B} | 6,0±0,1 ^{b,C} | - | - | 10,7±0,1 ^{b,B} | - | - | |
| <i>Shigella sonnei</i> | 8,1±1,0 ^a | 6,6±0,1 ^b | - | - | - | - | - | 8,0±0,9 ^a | - | - | - | 7,5±0,6 ^{ab} | - | - | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 17,2±0,2 ^{a,A} | 11,4±0,2 ^{f,F} | - | - | 11,2±0,4 ^{f,F} | - | - | 13,9±0,1 ^{c,C} | - | - | - | 13,1±0,2 ^{d,D} | - | - | |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 8,2±0,4 ^b | 6,0±0,2 ^f | - | - | 7,2±0,0 ^{cd} | - | - | 8,8±0,1 ^a | - | - | - | 6,6±0,3 ^c | - | - | |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | - | - | - | - | 8,5±0,3 ^b | - | - | 7,6±0,6 ^{cd} | - | - | - | 7,5±0,5 ^{cd} | - | - | |

| Souches indicatrices | MRS-S | | SQES-S | | SQAP-S | | SQTR-S | | SHAP-S | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|----|
| | If | 2f | If | 2f | If | 2f | If | 2f | If | 2f |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 8,0±0,1 ^b | 9,3±0,3 ^a | - | 6,2±0,1 ^c | - | 6,6±0,3 ^c | - | 6,3±0,4 ^c | - | - |
| <i>Aspergillus niger</i> | - | 6,5±0,1 ^{cC} | - | 5,7±0,1 ^{dE} | - | 7,7±1,0 ^{aA} | - | 7,4±0,2 ^{ab,AB} | - | - |
| <i>Bacillus cereus</i> | 7,4±1,0 ^{b,BC} | - | - | 10,2±0,6 ^{aA} | 6,5±0,0 ^{BC} | 5,6±0,3 ^{cC} | - | - | - | - |
| <i>Bacillus coagulans</i> | - | 14,4±0,9 ^b | - | 17,2±0,7 ^a | - | 8,7±0,3 ^c | - | 13,9±0,5 ^b | - | - |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | 6,0±1,0 ^b | 6,2±0,1 ^b | - | 8,2±0,1 ^a | - | - | - | - | - | - |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i> | 15,8±1,7 ^{a,A} | 14,2±0,1 ^{bc,BC} | 7,0±0,5 ^{a,F} | 10,0±0,1 ^{dD} | 6,4±0,2 ^F | 13,5±0,9 ^{cC} | - | 9,6±0,1 ^{de,DE} | 7,0±0,3 ^{b,F} | - |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 7,1±0,7 ^a | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 7,4±0,5 ^{bcd} | 8,7±0,3 ^a | - | 8,0±0,0 ^{ab} | - | 7,8±0,1 ^{bc} | - | 7,2±0,9 ^{cd} | - | - |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | 18,7±1,8 ^a | 14,6±1,9 ^b | - | 12,4±1,0 ^{bc} | - | 11,0±0,8 ^{cd} | - | 8,1±1,4 ^e | - | - |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 9,6±1,8 ^a | 6,7±0,4 ^b | - | 6,4±0,2 ^b | - | 6,7±0,4 ^b | - | 7,4±0,2 ^b | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 7,0±0,2 ^b | 7,1±0,2 ^b | - | - | - | 8,0±0,3 ^a | - | - | - | - |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 9,0±0,1 ^{a,A} | 9,2±0,3 ^{a,A} | - | 7,2±0,3 ^{c,C} | - | 9,0±0,1 ^{a,A} | 6,7±0,7 ^C | 6,8±0,5 ^{c,C} | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 9,0±0,8 ^{c,F} | 14,2±0,2 ^{a,A} | - | 11,8±0,2 ^{d,CD} | - | 12,6±0,1 ^{bc,BC} | 10,2±0,2 ^E | 11,4±0,4 ^{d,D} | - | - |
| <i>Penicillium expansum</i> | - | 5,8±0,3 ^{c,C} | 5,7±0,3 ^{a,C} | 7,4±0,5 ^{b,B} | 5,9±0,1 ^{a,C} | 8,2±0,1 ^{a,A} | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 6,6±1,2 ^a | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella choleraesuis</i> | 9,0±0,2 ^a | - | - | - | - | 5,4±0,2 ^b | - | 6,1±0,7 ^b | - | - |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> | 15,0±2,8 ^{a,A} | 6,0±0,1 ^{c,C} | - | 10,0±0,2 ^{b,B} | - | 10,8±0,2 ^{b,B} | - | 6,5±0,5 ^{c,C} | - | - |
| <i>Shigella sonnei</i> | 8,1±1,0 ^a | - | - | 10,0±0,2 ^b | - | - | - | 6,7±0,2 ^b | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 17,2±0,2 ^{a,A} | 16,4±0,4 ^{b,B} | 7,2±0,2 ^G | 12,1±0,6 ^{c,E} | - | 15,8±0,1 ^{b,B} | - | 12,8±0,2 ^{d,D} | - | - |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 8,2±0,4 ^b | 7,0±0,2 ^{de} | - | 8,5±0,4 ^{ab} | - | 7,6±0,3 ^c | - | 6,5±0,2 ^e | - | - |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | - | 9,3±0,4 ^a | - | 7,3±0,3 ^d | - | 8,2±0,2 ^{bc} | - | 8,0±0,3 ^{bcd} | - | - |

Les lettres en minuscules (a, b, c, d, e et f) dans la même ligne indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) entre les différents échantillons à la même concentration de peptones marines (2f). Les lettres en majuscule (A, B, C, D, E, F et G) dans la même ligne indiquent les différences significatives ($P < 0,05$) entre les différents échantillons et entre les deux concentrations de peptones marines (1f et 2f). (-) : signifie l'absence d'activité antimicrobienne. (S) : signifie surageant recueilli après culture de *E. faecalis* sur les différents milieux de culture modifiés

Il convient cependant de noter que la composition du milieu, tout particulièrement les sources et concentrations de carbone et d'azote, affectent fortement la production de bactériocines. Les bactéries lactiques productrices de bactériocines requièrent de nombreux nutriments pour leur croissance et des milieux riches contenant de l'extrait de viande, de levure et des hydrolysats de protéines sont nécessaires. Nos résultats avec ceux rapportés par plusieurs auteurs (Kanmani *et al.*, 2010 ; Mataragas *et al.*, 2004 ; Verluoyten *et al.*, 2004 ; Todorov *et al.*, 2004 ; Nel *et al.*, 2001 ; Aasen *et al.*, 2000) qui ont montré que l'augmentation des concentrations de ces nutriments azotés peut permettre une augmentation de la production de bactériocines. D'autres auteurs par ailleurs ont souligné que la production de bactériocines par les bactéries lactiques est un processus associé à la croissance (Kout, 2017 ; De Vuyst *et al.*, 1996).

3.5.4. Identification de gènes codant pour la bactériocine

La recherche de gènes de bactériocine sur le génome de la souche a été effectuée à l'aide de l'outil BAGEL3, puis, en utilisant la méthode BLASTX, les séquences de bactériocines qui en découlent sont comparées avec celles ayant déjà été caractérisées antérieurement. Les résultats sont résumés dans le [tableau 26](#). Quatre séquences liées à des gènes de bactériocines ont été identifiées, et seulement trois d'entre elles ont montré des niveaux élevés d'homologie avec l'enterolysine A, et deux types de lantibiotiques (Ia et Ib). Par contre, une faible homologie a été observée avec l'uvicine B (UviB).

L'entérolysine A, est une bactériocine thermolabile synthétisée par *Enterococcus faecalis*, appartenant à la classe III et présente une activité anti-*Listeria* sp. (Nigutova *et al.*, 2007 ; Nilsen *et al.*, 2003). Cette protéine possède dans sa région N-terminale une activité « *endopeptidase-like* ». De plus, sa région C-terminale est similaire au gène de lyse de bactériophages (A2, T4). Le mécanisme d'action de cette bactériocine repose sur une activité muralytique permettant la dégradation de la paroi de la cellule cible (Nilsen *et al.*, 2003). Nos résultats obtenus concernant l'activité bactériocinogène sont en accord avec ceux publiés sur l'entérolysine A par Khan *et al.* (2013) et Nilsen *et al.* (2003) qui ont rapporté que cette bactériocine possède une activité inhibitrice vis-à-vis des entérocoques, des pédiocoques, des lactocoques, ainsi que des lactobacilles.

En outre, les autres bactériocines identifiées chez *E. faecalis* DM19 sont les lantibiotiques. Ces bactériocines tirent leur nom du fait qu'elles contiennent des acides aminés inhabituels, la lanthionine et la β -méthyllanthionine, acquis lors des modifications post-traductionnelles.

Elles appartiennent à la classe I des bactériocines et leur activité inhibitrice est dirigée principalement contre les bactéries Gram-positif (Bierbaum *et al.*, 2009). Les lantibiotiques sont des peptides thermostables et, agissent également sur la paroi cellulaire d'autres bactéries comme pour le cas de l'entérolysine A.

Tableau 26 : Les bactériocines identifiés chez la souche *E.faecalis* DM19

| Bactériocine identifiée | Numéro d'accession | Taille de la séquence (acides aminés) | Pourcentage d'identité en acides aminés | Annotation |
|--------------------------------|---------------------------|--|--|--|
| Enterolysine A | Q9F8B0 | 343 | 343/343 (100 %) | <i>E.faecalis</i> |
| Lantibiotique Ia | AF454824 | 63 | 63/63 (100 %) | Île de pathogénicité de <i>E. faecalis</i> |
| Lantibiotique Ib | AF454824 | 68 | 33/33 (100 %) | Île de pathogénicité de <i>E. faecalis</i> |
| Uvicine B | EPH69978 | 82 | 54/69 (78 %) | <i>E.faecalis</i> 20-SD-BW-06 |

RapportGratuit.com

4. Conclusion et perspectives

Les industries de la pêche et de l'aquaculture génèrent une quantité considérable de sous-produits au cours des opérations de transformation. Les coûts économiques et environnementaux qui en résultent sont élevés. Il convient de trouver de nouvelles utilisations pour ces biomasses. Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation biotechnologique des coproduits de la pêche en vue d'obtenir des composés à hautes valeurs ajoutées.

La souche DM19 utilisée pour ce travail a été identifiée par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Les résultats ont conduit à *Enterococcus faecalis*.

Notre travail a porté, dans un premier temps, sur l'activité protéolytique de la souche et de la caractérisation biochimique des protéases responsables de cette activité.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité protéolytique de la souche est maximale dans les conditions de température 40 °C et de pH 7.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la valorisation des sous-produits issus des industries de transformation des crevettes. L'hydrolyse des protéines d'eau de cuisson (HPEC) de crevette et de carapace de crevette (HPC) a été conduite en utilisant les protéases de la souche *E.faecalis* DM19 et les activités antioxydante et antihypertensive des hydrolysats ont été recherchées.

Les hydrolysats obtenus ont révélé une activité antioxydante plus importante que l'activité trouvée dans les coproduits non hydrolysés tandis que l'activité antihypertensive semble être moins intéressante si l'on compare avec les données de la littérature.

Les deux hydrolysats HPEC et HPC ont présenté une richesse en acides aminés hydrophobes. De plus, ils possèdent des teneurs élevés en peptides de faible PM (inférieur à 1 kDa). Ces résultats peuvent expliquer en partie l'activité antioxydante des deux hydrolysats préparés.

L'impact de la réaction de Maillard sur les activités antioxydante et antimicrobienne des hydrolysats HPC et HPEC a été mis en évidence par diminution du pH et des groupements amines libres. Les résultats ont montré une amélioration des activités réductrice de fer, chélatrice de fer et antiradicalaire lorsque les hydrolysats sont modifiés en HPC-GlcN et HPEC-GlcN par la réaction de Maillard, alors que les hydrolysats non modifiés ont présenté un très faible pouvoir antioxydant.

L'analyse de la composition des hydrolysats en acides aminés a montré que les acides aminés : lysine, arginine et histidine sont impliqués dans la réaction de Maillard. Par ailleurs, l'activité antioxydante est liée à l'apparition des pigments bruns ainsi que des composés intermédiaires et fluorescents. En effet, le fractionnement par CLHP a montré que les PRM sont des produits terminaux de glycation (PTG).

Alors que les deux hydrolysats HPC et HPEC n'ont montré aucune activité antimicrobienne, les PRM dérivés du système modèle HPC-GlcN se sont montrés bactéricide contre, à la fois, les bactéries Gram-positif et les bactéries Gram-négatif.

Dans un deuxième temps, la valorisation des protéines contenues dans les coproduits comme source d'azote pour optimiser le milieu de culture MRS a été étudiée. La possibilité d'utiliser les hydrolysats en tant qu'alternative aux peptones a été explorée. Pour cela, la croissance ainsi que la production de certains métabolites à caractère technologique ont été étudiés.

Les résultats obtenus ont montré que la substitution des peptones par les hydrolysats issus des coproduits de calmar et de crevette a permis d'obtenir une croissance équivalente ou supérieure à celle obtenue dans le milieu MRS non modifié. L'augmentation de la concentration de ces hydrolysats a amélioré la production des métabolites acide lactique et acide acétique ainsi que l'activité bactériocinogène de la souche *E.faecalis* DM19.

La mise en évidence de cette activité inhibitrice par la méthode de diffusion du disque a révélé une inhibition importante contre *Listeria monocytogenes*.

Le génome de la souche *E.faecalis* DM19 a été analysé à l'aide de BAGEL3 pour la présence de gènes liés aux bactériocines. La souche a montré la présence de deux gènes ayant une forte homologie avec ceux de lantibiotique et de l'entérolisine A.

Ces résultats permettent d'ouvrir de nombreuses perspectives :

L'analyse des résultats de cette étude indique que l'extrait enzymatique de la souche *E.faecalis* DM19 peut être utilisé pour valoriser les protéines des coproduits marins. Afin d'approfondir cette étude, des essais de purification des enzymes protéases de cet extrait seront indispensables pour augmenter l'efficacité de la protéolyse.

Dans le but d'améliorer la digestibilité des protéines d'eau de cuisson, il conviendrait tout d'abord de se renseigner, par une analyse biochimique, sur le taux de lipides dans cette matière première, puis refaire l'hydrolyse enzymatique en présence de protéase et de lipase.

L'étude des activités biologiques a montré que les hydrolysats obtenus par l'action des protéases de *E.faecalis* DM19 peuvent être prometteurs dans la mesure où on pourrait les utiliser dans les produits alimentaires comme additifs naturels possédant les propriétés antioxydantes. Afin d'approfondir cette étude, des travaux de purification et de caractérisation seront indispensables pour identifier quelles sont les molécules à l'origine de cette activité.

La modification d'hydrolysats protéiques par RM conduite en conditions contrôlées représente une solution innovante pour créer de nouveaux ingrédients de type "bi-fonctionnel" (à la fois antioxydants et antimicrobiens) pour l'agro-alimentaire. Les perspectives porteront sur l'évaluation de nouvelles propriétés techno-fonctionnelles telles que les propriétés gélifiantes, moussantes, filmogènes et émulsifiantes des hydrolysats glyqués, puis fractionnés par classes de taille. Enfin, il conviendra de vérifier l'innocuité des composés néoformés, de valider leur conformité à la réglementation en vigueur et d'évaluer leurs caractéristiques organoleptiques.

Il serait intéressant d'inclure ces molécules bioactives (peptides antioxydants, PRM) comme additifs à différentes doses dans un aliment de choix et d'évaluer leurs incidences sur les qualités microbiologique et organoleptique du produit fini.

Une autre perspective de l'utilisation des propriétés antioxydantes et antimicrobienne des PRM dans les produits alimentaires pourrait être la conception de produits qui incluraient dès leur formulation, les réactifs nécessaires à la formation des PRM actifs *in situ*.

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent aussi que les coproduits marins pourrait être valorisés sous forme d'hydrolysats enzymatiques dans la formulation du milieu de culture à moindre coût. Cette valorisation biotechnologique permet non seulement de limiter la pollution engendrés par ces coproduits, mais aussi à produire par fermentation des métabolites d'intérêt tels que les acides lactique, acide acétique et les bactériocines, qui trouvent une grande gamme d'application notamment dans le domaine alimentaire. Dans les futures expérimentations, de nouvelles cinétiques de croissance et de production de métabolites devront être réalisées en élargissant le choix de microorganisme (diverses origines, besoins particuliers).

Finalement, il conviendrait d'étudier la faisabilité des procédés envisagés dans ce travail (production de peptides bioactifs, productions de protéases, réaction de Maillard et fermentation en utilisant le milieu de culture à base de coproduits marins) à plus grande échelle.

5. Références bibliographique

- **Asen, I. M., Moreto, T., Katla, T., Axeleson, L., Storro, I. (2000).** Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 159-66.
- **Adler-Niessen, J. (1986).** Enzymatic Hydrolysis of Food Protein. Elsevier Applied Science Publishers (Eds.), London, 132-145.
- **Adrian, J. (1999).** Louis Camille Maillard : de la médecine à l'alimentation. Tec & Doc, Ed, Paris, 154 p.
- **Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Ore, F. D., Benajiba, A., Puigserver, A. (2001).** Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose–lysine model systems. *Journal of Food Science*, 66, 926-931.
- **Ajandouz, E. H., Puigserver A. (1999).** Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids : effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1786-1793.
- **Aksnes A., Hope B., Jönsson E., Björnsson B.T. Albrektsen S. (2006).** Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture*, 261, 305-17.
- **Alais C., Linden G. (1987).** Biochimie alimentaire. Paris, Masson Editeur. 224 p.
- **Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., Malomo, A. S., Girgih, A. T., Aluko, R. E. (2014).** Blood pressure lowering effects of Australian canola protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 55, 281-87.
- **Aluko, R. E., Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Li, H., Offengenden, M., Wu, J., Papadopoulos, Y. A. (2015).** Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived antihypertensive peptides. *Food Research International*, 77, 10-16.
- **Amado, I. R., Gonzalez, M. P., Murado, M. A., Vazquez, J. A. (2016).** Shrimp wastewater as a source of astaxanthin and bioactive peptides. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91, 793-805.

- **Amarowicz, R. (2009).** Antioxidant activity of Maillard reaction products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 109-111.
- **Ames, B. N., Mc Cann, J., Yamasaki, E. (1975).** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31, 347-364.
- **Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S., Chevallier, I. (2005).** Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food microbiology*, 22, 529-538.
- **Anese M., Lanciotti R., Sinigaglia M., Massini R. (1998).** Response surface methodology applied to the study of some factors affecting the Maillard reaction. *Advances in Food Sciences*, 20, 190-197.
- **Arancibia, M., Giménez, B., López-Caballero, M.E, Gómez-Guillén, M.C., Montero, P. (2014).** Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. *LWT- Food Science and Technology*, 59, 989-995.
- **Ashoor, S. H., Zent, J. B. (1984).** Maillard browning of common amino acids and sugars. *Journal of Food Science*, 49(4), 1206-1207.
- **Aspmo, S.I., Horn, S.J., Eijsink, V.G. (2005).** Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 248 (1), 65-68.
- **Babu, C. M., Chakrabarti, R., Surya Sambasivarao, K. R. (2008).** Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 227-235.
- **Balti, R., Bougatef, A., Sila, A., Guillochon, D., Dhulster, P., Nedjar-Arroume, N. (2015).** Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 170, 519-525.

- **Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., Pevzner, P. A. (2012).** SPAdes : a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19, 455-477.
- **Barbenti D., Mastrocola D., Lerici C. R. (1990).** Early indicators of chemical changes in food due to enzymic or non enzymic browning reactions. Part II: Colour changes in heat treated model systems. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 23, 494-498.
- **Beargie, R., Lynd, P., Tucker, E., Duhring, J. (1975).** Perinatal infection and vaginal flora. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 122, 31-33.
- **Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bonnet, C., Bryl, P., Carbonneaux, M. E. (2013).** Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*, 1, 149-157.
- **Bellomo, G., Mangiagale, A., Nicastro, L., Frigerio, G. (1980).** A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 28, 927-936.
- **Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M. K., Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. (2004).** Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 118-130.
- **Benno, Y., K. Suzuki, K. Suzuki, K. Narisawa, W. R. Bruce, T. Mitsuoka. (1986).** Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiology and Immunology*, 30, 521-532.
- **Benjakul, S, Lertittikul, W, Bauer, F. (2005).** Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 93, 189-196.

- **Benjakul, S., Morrissey, M. T. (1997).** Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3423-3430.
- **Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- **Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., Demirata, B., Apak, R. (2010).** Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Analytical Methods*, 3, 154-168.
- **Bersuder, P., Hole, M. (2002).** The isolation and characterisation of potential antioxydants from heated histidine-glucose model system. *Dans: Vegarud, G. et Morales, F. J. (eds), Melanoidins in food and health. Proceedings of COST Action 919 workshops*, 4, 158-166.
- **Bhaskar, N., Mahendrakar, N. (2008).** Protein hydrolysate from visceral waste proteins of catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource technology*, 99(10), 4105-4111.
- **Bierbaum, G., Sahl, H. G. (2009).** Lantibiotics: Mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 2-18.
- **Boguta, A. M., Jensen, P. R. (2014).** Screening of lactic acid bacteria for their potential as microbial cell factories for bioconversion of lignocellulosic feedstocks. *Micobial Cell Factories*, 13, 97.
- **Bonelli, R. R., Schneider, T., Sahl, H. G., Wiedemann, I. (2006).** Insights into *in vivo* activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 1449-1457.
- **Borrelli, R. C., Fogliano, V. (2005).** Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 673-678.
- **Borrelli, R. C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V. (2004).** Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1338-1343.

- **Bougatef, A., Ravallec, R., Nedjar-Arroume, N., Barkia, A., Guillochon, D., Nasri, M. (2010).** Evidence of in vivo satietogen effect and control of food intake of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysate in rats. *Journal of Functional Foods*, 2, 10-16.
- **Bousbaa, H., Lapuerta, M., Khatir, N., A. Liazid. (2017).** Caractérisation de la production de biodiesel à partir de déchets gras de sardine. *Communication Science and Technology*, 18, 31-42.
- **Bouton, Y., Buchin, S., Pochet, S., Beuvier, E. (2009).** Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiology*, 26, 183-191.
- **Brands, C. M. J., Van Boekel, M. A. J. S. (2002).** Kinetic modeling of reactions in heated monosaccharide–casein systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6725-6739.
- **Bruinenberg, P. G., Vos, P., De Vos, W. M. (1992).** Proteinase overproduction in *Lactococcus lactis* strains : regulation and effect on growth and acidification in milk. *Applied and environmental microbiology*, 58, 78-84.
- **Buera, M. D., Chirife, J., Resnik, S. L., Lozano, R. D. (1987).** Non enzymatic browning in liquid model systems of high water activity - kinetics of color changes due to caramelization of various single sugars. *Journal of Food Science*, 52(4), 1059-1067.
- **Bui, H. T. D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., Lee, K. J. (2014).** Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 418-419, 11-16.
- **Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. (2004).** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 198(1), 169-184.
- **Byun, H. G., Kim, S. K. (2001).** Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, 36(12), 1155-1162.

- **Cahu, C. L., Zambonino Infante, J. L., Quazuguel, P., Le Gall, M. M. (1999).** Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171(1-2), 109-119.
- **Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., et Vignolo, G. (2008).** A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 483-499.
- **Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T. (2012).** Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135, 3020-3038.
- **Chalamaiah, M., Rao, G. N., Rao, D. G., Jyothirmayi, T. (2010).** Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food chemistry*, 120(3), 652-657.
- **Chen, J., Wang, Y., Zhong, Q., Wu, Y., Xia, W. (2012).** Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides*, 33(1), 52-58.
- **Chen, H. M., Muramoto, K., Yamaguchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, N. (1998).** Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragment found in digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 49-53.
- **Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K. (1996).** Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 44, 2619-2623.
- **Chingwaru, W., Mpuchane, S. F., Gashe, B. A. (2003).** *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. *Journal of Food Protection*, 66, 931-936.

- **Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K., Park, J. W. (2009).** Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, 74(1), C17-C24.
- **Chuyen, N. V., Ijichi, K., Umestu, J. H., Moteki, K. (1998).** Antioxidative properties of products from amino acids or peptides in the reaction with glucose. In *Process-induced chemical changes in food*. F. Shahidi (Ed.). New York, Plenum Press. 17, 201-212.
- **Clemente, A. (2000).** Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 11(7), 254-262.
- **Corrieu, G. Luquet, F. M. (2008).** Bactéries lactiques : De la génétique aux ferments. Lavoisier, Paris, pp. 849.
- **Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005).** Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- **Crooke, W. M., Simpson, W. E. (1971).** Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256-1262.
- **Cruz, E., Guillaume, J. (1983).** Facteur de croissance inconnu de la farine de calmar pour la crevette japonaise: localisation de ce facteur. In 'Conseil International pour l'Exploitation de la Mer'. pp. 1-7.
- **Cruz-Ricque, E., Guillaume, J., Van Wormhoudt, A. (1989).** Effect of squid extracts on time course appearance of glucose and free amino acids in haemolymph in *Penaeus japonicus* after feeding : preliminary results. *Aquaculture*, 76, 57-65.
- **Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., Fouchereau-Peron, M. (2008).** Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111(4), 970-975.
- **Cushman, D.W., Cheung, H. S. (1971).** Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648.

- **Cuzzoni, M. T., Stoppini, A., Gazzani, G., Mazza, P. (1989).** Effect of storage on mutagenicity, absorbance and content of furfural in the ribose-lysine Maillard system. *Food Chemical Toxicology*, 27, 209-213.
- **Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., Richard-Forget, F. (2010).** Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21, 370-380.
- **Danehy, J. P. (1986).** Maillard reactions : nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor. *Advances in Food Research*, 30, 77-138.
- **Darewicz, M., Dziuba, J., Mioduszevska, H. (1998).** Some physico-chemical properties and structural changes of bovine beta-casein upon glycation. *Nahrung/Food*, 42, 213-214.
- **Dauksas, E., Falch, E., Slizyte, R., Rustad, T. (2005).** Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40, 2659-2670.
- **Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., López-Fandiño, R. (2004).** Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1939-1944.
- **De Roissart, H., Luquet, F. M. (1994).** Bactéries lactiques, Vol I et II, Edition Lorica.
- **De Vleeschouwer, K., Plancken, I. V. d., Loey, A.V., Hendrickx, M. E. (2009).** Role of precursors on the kinetics of acrylamide formation and elimination under low moisture conditions using a multiresponse approach – Part I : Effect of the type of sugar. *Food Chemistry*, 114(1), 116-126.
- **De Vuyst, L., Callewaert, R., Crabbé, K. (1996).** Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142, 817-827.

- **Deibel, R. H., J. H. Silliker. (1963).** Food-poisoning potential of the enterococci. *Journal of Bacteriology*, 85, 827-832.
- **Del Castillo, M., Ferrigno, A., Acampa, I., Borrelli, R., Olano, A., Martínez-Rodríguez, A., Fogliano, V. (2007).** In vitro release of angiotensin-converting enzyme inhibitors, peroxy-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. *Journal of Cereal Science*, 45, 327-334.
- **Delgado-Andrade, C., Rufian-Henares, J. A., Morales, F. J. (2005).** Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3, 7832-7836.
- **Desmazeaud, M. J., Vassal, L. (1979).** Activité protéolytique intracellulaire de streptocoques lactiques mésophiles. Rôle au cours de l'affinage des fromages. *Lait*, 59, 327-344.
- **Detmers, F. J., Kunji, E. R., Lanfermeijer, F. C., Poolman, B., Konings, W. N. (1998).** Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, 37(47), 16671-16679.
- **Devine, C. E., Hopkins, D. L., Hwang, I. H., Ferguson, D. M., Richards, I. (2004).** Electrical stimulation. In 'Encyclopedia of meat sciences'. (Eds W Jensen, C Devine, M Dikeman) pp. 413–423. (Elsevier: Oxford).
- **Devriese, L. A., Hommez, J., Pot, B., Haesebrouck, F. (1994).** Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 31-36.
- **Dey, S., Dora, K. (2012).** Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Journal of Food Technology*, 49, 1-9.
- **Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M. (1994).** Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.

- **Djellouli, M. (2010).** Caractérisation technologique des souches de lactobacilles isolées de lait camelin. Mémoire de Magistère. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. Algérie, 100 pages.
- **Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2012).** Bacteriocin production : a probiotic trait ?. *Applied and environmental microbiology*, 78, 1-6.
- **Dong, S. Y., Panya, A., Zeng, M. Y., Chen, B. C., McClements, D. J., Decker, E. A. (2012).** Characteristics and antioxidant activity of hydrolyzed beta-lactoglobulin glucose Maillard reaction products. *Food Research International*, 46(1), 55-61.
- **Dortu, C., Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires (2009). Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Interest For Food Products Biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13, 143-154.
- **Doyen, A., Saucier, L., Beaulieu, L., Pouliot, Y., Bazinet, L. (2012).** Electroseparation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, 132(3), 1177-1184.
- **Drider, D., Prevost, H. (2009).** Bactéries lactiques, Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. *Economica*, 593 p., chap. II (« Métabolisme des bactéries lactiques, les acides aminés, Véronique MONNET »).
- **Dumas, J. B. A. (1831).** Procédés de l'analyse organique. *Annales de Chimie et de Physique*, 47, 198-213.
- **Dumay, J. (2006).** Extraction des lipides par voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*) thèse d'université : sciences de la vie et de la terre: Université de Nantes, 325 p.
- **Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Bergé, J. P. (2006).** Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41, 2327-2332.

- **Einarsson, H. (1987a).** The effect of time, temperature, pH and reactants on the formation of antibacterial compound in the Maillard reaction. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 20, 51-55.
- **Einarsson, H. (1987b).** The effect of pH and temperature on the antibacterial effect of Maillard reaction products. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 20, 56-58.
- **Einarsson, H., Snygg, B. G., Eriksson, C. (1983).** Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 1043-1047.
- **Ellouz, Y. T., Ghorbel, B., Souissi, N., Kammoun, S., Nasri, M. (2003).** Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 41-45.
- **Erdös, E. G., Skidgel, R. A. (1987).** The angiotensin I-converting enzyme. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 56(4), 345.
- **Eric, K., Raymond L. V., Abbas, S., Song, S., Zhang, Y., Masamba, K., Zhang, X. (2014).** Temperature and cysteine addition effect on formation of sunflower hydrolysate Maillard reaction products and corresponding influence on sensory characteristics assessed by partial least square regression. *Food Research International*, 57, 242-258.
- **Evers, D. J., Carrol, D. J. (1998).** Ensiling salt-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. *Animal Feed Science and Technology*, 71, 241-249.
- **Ewart, H. S., Dennis, D., Potvin, M., Tiller, C., Fang, L. H., Zhang, R., Zhu, X. M., Curtis, J. M., Cloutier, S., Du, G., Barrow, C. J. (2009).** Development of a salmon protein hydrolysate that lowers blood pressure. *European Food Research and Technology*, 229, 561-9.
- **Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K., Uemura, Y. (2004).** Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200.

- **Faithong, N., Benjakul, S., Phatcharat, S., Binsan, W. (2010).** Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. *Food Chemistry*, 119, 133-140.
- **Fakas, S., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2008).** Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulate*. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (4), 70-1062.
- **FAO. (2016).** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous. Rome. 224 pages.
- **FAO. (2012).** The state of world fisheries and aquaculture. In F. F. a. A. Department (Ed.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- **Farhat, I. A., Orset, S., Moreau, P., Blanshard, J. M. V. (1998).** FTIR study of hydration phenomena in protein–sugar systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 207, 200-208.
- **Fischler, F. (1998).** Méthodes d'analyse pour la détermination des teneurs en acides aminés, en matières grasses et olaquinox dans l'alimentation. Directive 98/64/CEE de la Commission du 3 septembre 1998.31998L0064. JOCE, L257, 14-28.
- **Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- **Fox, M. Loncin, M. Weiss, M, (1983).** Investigations into the influence of water activity, pH and heat treatment on the velocity of the Maillard reaction in foods. *Journal of Food Quality*, 6, 103-118.
- **Frankel, E. N., Meyer, A. (2000).** The Problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- **Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A. (2011).** Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151 (2), 125-140.

- **Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzapfel, W. H. (2003).** Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122.
- **Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., Stiles, M. E. (1999).** Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-24.
- **Friedman, M. (1996).** Food browning and its prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- **Frister, H., Meisel, H., Schlimme, E. (1986).** Modifizierte OPA method zur Charaterisierung von Proteolyse-Produkten. *Milchwissenschaft*, 41, 483-487.
- **García de Fernando, G. D., Hernández, P. E., Burgos, J., Sanz, B., Ordóñez, J. A. (1991).** Extracellular proteinase from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*: II. Partial purification and some technologically important properties. *Folia Microbiologica*, 36, 429-436.
- **García-Moreno, P. J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N. M., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., Guadix, E. M. (2014).** Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International*, 65, 469-476.
- **Gazzani, G., Vagnarelli, P., Cuzzoni, M. T., Mazza, P. (1987).** Mutagenic activity of the Maillard reaction products of ribose with different amino acids. *Journal of Food Science*, 52, 757-760.
- **Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J, Parmentier, M. (2004).** Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by-products hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69(8), 615-22.
- **Gerrard J. A. (2006).** The Maillard reaction in food: Progress made, challenges ahead—Conference Report from the Eighth International Symposium on the Maillard Reaction. *Trends Food Science and Technology*, 17, 324-330.
- **Giannino, M. L., Marzotto, M., Dellaglio, F., Feligni, M. (2009).** Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production

- by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 188-195.
- **Gibbs, C. R. (1976).** Characterization and application of the ferrozin iron reagent as ferrous indicator. *Analytical Chemistry*, 48, 1197-1200.
 - **Gildberg, A., Stenberg, E. (2001).** A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36, 809-812.
 - **Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A. (2008).** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, 81, 591-606.
 - **Giménez, B., Gomez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., Montero, M. P. (2009).** Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23, 132-1327.
 - **Glenn, T. C. (2011).** Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11, 759-69.
 - **Goodwin, S., McPherson, J. D., McCombie, W. R. (2016).** Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17, 333-351.
 - **Grey, C., Edebring, P., Krook, M., Jacobsson, S. P. (2009).** Development of a high performance anion exchange chromatography analysis for mapping of oligosaccharides. *Journal of Chromatography B*, 877, 1827-1832.
 - **Gu, F. L., Kim, J. M., Abbas, S., Zhang, X. M., Xia, S. Q., Chen, Z. X. (2010).** Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein–glucose. *Food Chemistry*, 120, 505-511.
 - **Gu, F., Kim, M.J., Hayat, K., Xia, S., Feng, B. Zhang, X. (2009).** Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltered Maillard reaction products from a casein-glucose model system. *Food Chemistry*, 117, 48-54.
 - **Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, D., Delorme, C. (2001).** Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for

- coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology*, 183, 3614-3622.
- **Guérard, F., Decourcelle, N., Sabourin, C., Floch-Laizet, C., Le Grel, L., Le Floc'h, P., Gourlay, F., Le Delezir, R., Jaouen, P., Bourseau, P. (2010).** Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. *Journal des sciences Halieutique et Aquatique*, 2, 1-27.
 - **Guérard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A., Dufossé, L. (2007).** Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42, 1486-1491.
 - **Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., Binet, A. (2001).** Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1051-1059.
 - **Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32.
 - **Hai-Lun, H. E., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., Bai-Cheng, Z. (2006).** Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12(11), 726-733.
 - **Hancock, R. E., Sahl, H. G. (2006).** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557.
 - **He, R., Alashi, A., Malomo, S. A., Girgih, A. T., Chao, D., Ju, X., Aluko, R. E. (2013).** Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 141, 153-59.
 - **He, H. L., Wu, H., Chen, X. L., Shi, M., Zhang, X. Y., Sun, C. Y., Zhang, Y. Z., Zhou, B.C. (2008).** Pilot and plant scaled production of ACE inhibitory hydrolysates from *Acetes chinensis* and its in vivo antihypertensive effect. *Bioresource Technology*, 99, 5956-5959.

- **He, H. L., Chen, X. L., Wu, H., Sun, C. Y., Zhang, Y. Z., Zhou, B. C. (2007).** High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology*, 98, 3499-3505.
- **He, H. Chen, X., Sun, C., Zhang, Y., Gao, P. (2006).** Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technology*, 97, 385-390.
- **Heu, M. S., Kim, J. S., Shahidi, F. (2003).** Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82, 235-242.
- **Hiramoto, S., Itoh, K., Shizuuchi, S., Kawachi, Y., Morishita Y, Nagase M, Suzuki Y, Nobuta Y, Sudou Y, Nakamura O, Kagaya I, Goshima H, Kodama Y, Icatro FC, Koizumi W, Saigenji K, Miura S, Sugiyama T, Kimura N. (2004).** Melanoidin, a food protein-derived advanced maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. *Helicobacter*, 9, 429-435.
- **Hodge, J. E. (1953).** Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15), 928-943.
- **Hong, P. K., Gottardi, D., Ndagijimana, M., Betti, M. (2014).** Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity. *Food Chemistry*, 142, 285-293.
- **Hoskin, J. C. (1994).** Sensory properties of chocolate and their development. *American Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1068S-1070S.
- **Hrynets, Y., Ndagijimana, M., Betti, M. (2013).** Non-enzymatic glycation of natural actomyosin (NAM) with glucosamine in a liquid system at moderate temperatures. *Food Chemistry*, 139, 1062-1072.
- **Hsiao, C. P., Siebert, K. J. (1999).** Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 189-201.
- **Huang, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P., Hsu, K. C. (2012).** Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*, 35, 114-121.

- **Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Lee, J., Jeong, H. S. (2011).** Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar–amino acid model system. *Food Chemistry*, 126(1), 221-227.
- **Ibrahim, H. M., Salama, M. F., El-Banna, H. A. (1999).** Shrimp's waste : Chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung*, 43, 418-423.
- **Imm, J. Y., Lee, C. M. (1999).** Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2360-2366.
- **Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Wu, J., Visessanguan, W. (2013).** Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1854-1862.
- **Isbell, H. S., Frush, H. L., Wade, C. W. R., Hunter, C. E. (1969).** Transformations of sugars in alkaline solutions. *Carbohydrate Research*, 9(2), 163-175.
- **Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., Kim, S. K. (2007).** Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840-846.
- **Je, J. Y., Park, P. J., Kim, S. K. (2005).** Antioxydant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theraga chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38, 45-50.
- **Je, J. Y., Park, P. J., Kwon, J. Y., Kim, S. K. (2004).** A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from *Alaska pollack* (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7842-7845.
- **Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Ben Slama-Ben Salem, R., Mehiri, M., Hajji, M., Nasri, M. (2014).** Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* a26. *Process Biochemistry*, 49(6), 963-972.

- **Jeon, Y. J., Byun, H. G., Kim, S. K. (1999).** Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35, 471-478.
- **Jett, B. D., Gilmore, M. S. (1990).** The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin encoded by pAD1 extends to the oral streptococci. *Journal of dental research*, 69, 1640-1645.
- **Jing, H., Kitts, D. D. (2000).** Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine Maillard reaction. *Food Research International*, 33, 509-516.
- **Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J. C., Richard, J. (1995).** Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3024-3030.
- **Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., Kim, S. K. (2004).** Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219, 20-26.
- **Jung, W. K., Kim, S. K. (2007).** Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *European Food Research and Technology*, 224, 763-767.
- **Jung, W. K., Park, P. J., Byun, H. G., Moon, S. H., Kim, S. K. (2005).** Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2), 333-340.
- **Kanmani, P., Kumar, P.S., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V. (2010).** Design and optimization of fermentation medium for enhanced bacteriocin production by probiotic bacterium *E. faecium* MC13. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 41, 40-52.
- **Katano, S., Oki, T., Matsuo, Y., Yoshihira, K., Nara, Y., Miki, T., Matsui, T., Matsumoto, K. (2003).** Antihypertensive effect of alkaline protease hydrolysate of

the pearl oyster *Pinctada fucata martencii* & separation and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 69(6), 975-980.

- **Kato, Y., Watanabe, K., Nakamura, R., Sato, Y. (1983).** Effect of pre-heat treatment on tryptic hydrolysis of Maillard-reacted ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 437-441.
- **Kawamura, Y., Takane, T., Satake, M. et Sugimoto, T. (1992).** Physiologically active peptide motif in proteins : Peptide inhibitors of ACE from the hydrolysates of antarctic krill muscle protein. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 26, 210-210.
- **Kawakishi, S., Okawa, Y., Hayashi, T. (1987).** Interaction between melanoidin and active oxygen producing system. In: Trends in Food Science: Proceedings of the 7th World Congress of Food Science and Technology (A. H. Ghee, L. W. Sze, and F. C. Woo, eds.). Singapore Institute of Food Science and Technology, Singapore, p. 15.
- **Kechaou, E. S., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J. P., Bergé, J. P., Ben Amar, R. (2009).** Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 158-164.
- **Khan, H., Flint, S., Yu, P. L., (2013).** Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 484-494.
- **Kim, J. S., Lee, Y. S. (2009).** Study of Maillard reaction products derived from aqueous model systems with different peptide chain lengths. *Food Chemistry*, 116, 227-232.
- **Kim, S. K., Rajapakse, N., Shahidi, F. (2008a).** Production of bioactive chitosan oligosaccharides and their potential use as nutraceuticals. In: C.S. Barrow, F (Ed.) Marine nutraceuticals and functional foods. *Nutraceutical Science and Technology*, New York, pp. 183- 196.

- **Kim, S. K., Mendis, E., Shahidi, F. (2008b).** Marine fisheries by-products as potential nutraceuticals : an overview. In: C.S.F. Barrow (Ed.) *Marine nutraceuticals and functional foods. Nutraceutical Science and Technology*, New York, pp. 1-22.
- **Kim, S. Y., Je, J. Y., Kim, S. K. (2007).** Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 31-38.
- **Kim, S. K., Mendis, E. (2006).** Bioactive compounds from marine processing byproducts-a review. *Food Research International*, 39(4), 383-393.
- **Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S., Shahidi, F. (2001).** Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1984-1989.
- **Kitts, D. D., Wu, C. H., Stich, H. F., Powrie, W. D. (1993).** Effect of glucose-lysine Maillard reaction product on bacterial and mammalian cell mutagenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2353-2358.
- **Klein, G. (2003).** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 123-31.
- **Knol, J. J., Linssen, J. P.H., van Boekel, M. A. J. S. (2010).** Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the Maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modelling. *Food Chemistry*, 120, 1047-1057.
- **Ko, S. C. et Jeon, Y. J. (2013).** Marine peptides for preventing metabolic syndrome. *Current Protein and Peptide Science*, 14(3), 183-188.
- **Köhler, W. (2007).** The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 133-150.
- **Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006).** Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- **Kout, A. (2017).** Bactériocines des bactéries lactiques : étude biochimique. Thèse de Doctorat LMD. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. Algérie, 133 pages.

- **Kraehenbuehl, K., Davidek, T., Devaud, S., Mauroux, O. (2008).** Basic and acidic sugars as flavour precursors in Maillard reaction. In I. Blank, M. Wust, C. Yeretjian (Eds.), *Expression of multidisciplinary flavour science. Proceedings to 12th Weurman symposium* (pp. 267-271).
- **Kristinsson, H. G., Rasco, B. A. (2000a).** Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, 131-139.
- **Kristinsson, H. G., Rasco, B. A. (2000b).** Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 657-666.
- **Kristinsson, H. G., Rasco, B. A. (2000c).** Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 43-81.
- **Kunji, E. R., Hagting, A., De Vries, C. J., Juillard, V., Haandrikman, A. J., Poolman, B., Konings, W. N. (1995).** Transport of casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 1569-1574.
- **Kunji, E. R., Fang, G., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P., Poolman, B., Konings, W. N. (1998).** Reconstruction of the proteolytic pathway for use of beta-casein by *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 27, 1107-1118.
- **Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W. N. (1996).** The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.
- **Kurrie, E., Bhaduri, S., Krieger, D., Gaus, W., Heimpel, H., Pflieger, H., Arnold, R., Vanek, E. (1981).** Risk factors for infections of the oropharynx and the respiratory tract in patients with acute leukemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 144, 128-136.
- **Kvale, A., Harboe, T., Mangor-Jensen, A., Hamre, K. (2009).** Effects of protein hydrolysate in weaning diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture Nutrition*, 15(2), 218-227.

- **Labioui, H., Elmoualdi, L., El Yachioui, M., et Ouhssine, M. (2005).** Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144, 237.
- **Labuza, T.P., Baisier, W. (1992).** The kinetics of nonenzymatic browning. In *Physical chemistry of foods*; Marcel Dekker: New York, 595-649.
- **Lan, X., Liu, P., Xia, S., Jia, C., Mukunzi, D., Zhang, X., Xia, W., Tian, H., Xiao, Z. (2010).** Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. *Food Chemistry*, 120, 967-972.
- **Lancefield, R. C. (1933).** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of Experimental Medicine*, 57, 571-595.
- **Lanciotti, R., Anese, M., Sinigaglia, M., Severini, C., Massini, R. (1999).** Effects of heated glucose–fructose–glutamic acid solutions on the growth of *Bacillus stearothermophilus*. *Lebensmittel -Wissen und Technologie*, 32, 223-230.
- **Lee, J. K., Jeon, J. K., Byun, H. G. (2014).** Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 7, 381-389.
- **Lee, S. H., Qian, Z. J. et Kim, S. K. (2010).** A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 118(1), 96-102.
- **Lee, K. G., Shibamoto, T. (2002).** Toxicology and antioxydant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Reviews International*, 18, 151-175.
- **Leclercq, H., Devriese, L. A., Mossel, D. A. A. (1996).** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their uses as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 459-466.

- **Ledl, F., Schleicher, E. (1990).** New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(6), 565-594.
- **Li, G. H., Shi, Y. H., Liu, H., Le, G. W. (2006).** Antihypertensive effect of alcalase generated mung bean protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *European Food Research and Technology*, 222, 733-36.
- **Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., Espe, M. (2002).** Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex (TM) protease. *Process Biochemistry*, 37, 1263-1269.
- **Liaset, B., Lied, E., Espe, M. (2000).** Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 581-589.
- **Liceaga-Gesualdo, A. M., Li-Chan, E. C. Y. (1999).** Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64(6), 1000-4.
- **Line, J. E., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., Seal, B. S., Siragusa, G. R., Stern, N. J. (2008).** Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 1094-1100.
- **Liu, J., Liu, M., He, C., Song, H., Chen, F. (2015).** Effect of thermal treatment on the flavor generation from Maillard reaction of xylose and chicken peptide. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 316-325.
- **Liu, Q., Kong, B., Han, J., Sun, C., Li, P. (2014).** Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions. *Food Structure*, 1, 145-154.
- **Liu, Z., Dong, S., Xu, J., Zeng, M., Song, H., Zhao, Y. (2008).** Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control*, 19(3), 231-235.

- **López-Díaz, T. M., Santos, J. A., Gonzalez, C. J., Moreno, B., Garcia, M. L. (1995).** Bacteriological quality of traditional Spanish blue cheese. *Milchwissenschaft*, 50, 503-505.
- **Magnus, C. A., McCurdy, A. R., Ingledew, W. M. (1988).** Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21, 209-212.
- **Maillard, L. C. (1912).** Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 154, 66-68.
- **Marchbank, T., Elia, G., Playford, R. J. (2009).** Intestinal protective effect of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Regulatory Peptides*, 155, 105-109.
- **Mardis, E. R. (2008).** Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics Journal*, 9, 387-402.
- **Maron, D. M., Ames B. N. (1983).** Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
- **Marrufo-Estrada, D. M, Segura-Campos, M. R, Chel-Guerrero, L. A, Betancur-Ancona, D. A. (2013).** Defatted *Jatropha curcus* flour and protein isolate as materials for protein hydrolysates with biological activity. *Food Chemistry*, 138, 77-83.
- **Mataragas, M., Drosinos, E.H., Tsakalidou, E., Metaxopoulos, J. (2004).** Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *L. curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 191-198.
- **Matmaroh, K., Benjakul, S., Tanaka, M. (2006).** Effect of reactant concentrations on the Maillard reaction in a fructose–glycine model system and the inhibition of black tiger shrimp polyphenoloxidase. *Food Chemistry*, 98, 1-8.

- **Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.G., Kim, S.K. (2005a).** Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. *Life Science*, 77, 2166-2178.
- **Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S. K. (2005b).** Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), 581-587.
- **Miralles, B., Martinez-Rodriguez, A., Santiago, A., van de Lagemaat, J., Heras, A. (2007).** The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between beta-lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry*, 100(3), 1071-1075.
- **Monti, S. M., Ritieni, A., Graziani, G., Randazzo, G., Mannina, L., Segre, A. L., Fogliano, V. (1999).** LC/MS Analysis and antioxidative efficiency of Maillard reaction products from a lactose-lysine model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1506-1513.
- **Morais, H. A., Silvestre, M. P. C., Amorin, L. L., Silva, V. D. M., Silva, M. R., Silva, A. C. S., Silveira, J. N. (2014).** Use of different proteases to obtain whey protein concentrates hydrolysates with inhibitory activity toward angiotensin-converting enzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 38, 102-109.
- **Morales, F. J., Babbel, M. B. (2002).** Antiradical efficiency of Maillard reaction mixtures in hydrophilic media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2788-2792.
- **Morales, F. J., Jimenez-Perez, S. (2001).** Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119-125.
- **Moreno, M. R. F., Leisner, J. J., Tee, L. K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M., De Vuyst, L. (2002).** Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 147-157.
- **Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M. (2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing, Singapore.

- **Muguerza, B., Ramos, M., Sanchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., Recio, I. (2006).** Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16, 61-69.
- **Mullally, M. M., O'Callaghan, D. M., Fitzgerald, R. J., Donnelly, W. J., Dalton, J. P. (1995).** Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein hydrolysate characteristics. *Journal of food science*, 60(2), 227-233.
- **Mundt, J. O. (1986).** Enterococci. p. 1063–1065. In P.H.A. Sneath *et al.* (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- **Murray, B., Singh, K., Ross, P., Heath, J., Dunny, G., Weinstock, G. (1993).** Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *Journal of Bacteriology*, 175, 5216-5223.
- **Nakajima, K., Yoshie-Stark, Y., Ogushi, M. (2009).** Comparison of ACE inhibitory and DPPH scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chemistry*, 114, 844- 851.
- **Nasri, R., Amor, I. B., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., Châabouni, M. K., Nasri, M. (2012).** Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133(3), 835-841.
- **Nel, H. A., Bauer, R., Vandamme, E. J., Dicks, L. M. (2001).** Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *Journal of Applied Biotechnology*, 91, 1131-1138.
- **Nesse, K. O., Nagalakshmi, A. P., Marimuthu, P., Singh, M., Bhetariya, P. J., Ho, M., Simon, R. R. (2014).** Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(1), 1-6.

- **Nigutova, K., Morovsky, M., Prista, P., Teather, R. M., Holo, H. Javorsky, P. (2007).** Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 563-569.
- **Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A. (2005).** Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of food Engineering*, 70(4), 571-578.
- **Nilsen, T., Ingolf, F., Helge, H. (2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2975-2984.
- **Noble, C. J. (1978).** Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of Clinical Pathology*, 31, 1182-1186.
- **Nooshkam, M., Madadlou, A. (2016).** Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. *Food Chemistry*, 200, 1-9.
- **Novel, G. (1993).** In Les bactéries lactiques. Microbiologie industrielle et microorganismes d'intérêt industriel. Ed. Leveau, J. Y., Bouix, M. Tec et Doc. Lavoisier. Apria. p. 170-171.
- **O'Brien, J., Morrissey, P. A. (1989).** Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 28, 211-248.
- **Oliver, C. M., Stanley, R. A., Melton, L. D. (2006).** Creating proteins with novel functionality through the Maillard reaction. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337-350.
- **Oliveira Cavalheiro, J. M., Oliveira De Souza, E., Bora, P. S. (2007).** Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. *Bioresource Technology*, 98, 602-606.

- **Olsen, R. L., Toppe, J., Karunasagar, I. (2014).** Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science and Technology*, 36(2), 144-151.
- **Oluwaniyi, O. O., Dosumu, O. O., Awolola, G. V. (2010).** Effect of local processing methods (boiling, frying and roasting) on the amino acid composition of four marine fishes commonly consumed in Nigeria. *Food Chemistry*, 123, 1000-1006.
- **Oste, R. E., Brandon, D. L., Bates, A. H., Friedman, M. (1990).** Effects of the Maillard reaction of the Kunitz soybean trypsin inhibitor on its interaction with monoclonal antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 258-261.
- **Parente, J. A., Salem-Izaac S. M., Santana, J. M., Pereira, M, Borges, C. L, Bailao, A. M, Soares C. M. A. (2010).** A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. *BMC Microbiology*, 10, 292-30.
- **Park, S. Y., Gibbs, B. F., Lee, B. H. (1995).** Effects of Crude Enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on Water-Soluble Peptides of Enzyme-Modified Cheese. *Food Research International*, 28, 43-49.
- **Pascual-Reguera, M. I., Ortega-Carmona, I., Molina-Díaz, A. (1997).** Spectrophotometric determination of iron with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta*, 44, 1793-1801.
- **Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., Tettelin, H., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K. A., Dougherty, B. A., Fraser, C. M. (2003).** Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299, 2071-2074.

- **Pereira, C. I., Barreto Crespo, M. T., San Romão, M. V. (2001).** Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 211-216.
- **Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S. (2010).** Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT- Food Science and Technology*, 43(1), 86-97.
- **Pieniz, S., Andrezza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., Brandelli, A. (2014).** Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251-256.
- **Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, J. P., Guérard, F., Chabeaud, A., Picot, J. M. (2006).** Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41, 1217-1222.
- **Pot, B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. *In Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*. Ed. Corrieu, G. et Luquet, F.-M. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. p. 1-152.
- **Poolman, B., Kunji, E. R., Hagting, A., Juillard, V., Konings, W. N. (1995).** The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 24, 65S-75S.
- **Powrie, W. D., Wu, C. H., Rosin, M. P., Stich, H. F. (1981).** Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems. *Journal of Food Science*, 46, 1433-1445.
- **Qian, Z. J., Je, J. Y., Kim, S. K. (2007).** Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8398-8403.
- **Raa, J., Gildberg, A., Olley, J. N. (1982).** Fish silage : A review. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 16(4), 383-419.

- **Rai, A. K., Swapna, H., Bhaskar, N., Baskaran, V. (2012).** Potential of seafood industry byproducts as sources of recoverable lipids: fatty acid composition of meat and nonmeat component of selected Indian marine fishes. *Journal of Food Biochemistry*, 36(4), 441-448.
- **Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., Kim, S. K. (2005a).** Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.
- **Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., Kim, S. K. (2005b).** Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2), 175-182.
- **Randazzo, C. L., Pitino, I., De Luca, S., Scifo, G. O., Caggia, C. (2008).** Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 269-278.
- **Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., Caggia, C. (2004).** *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 9-14.
- **Ravallec-Plé, R., Van wormhoudt, A. (2003).** Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134, 669-679.
- **Ravallec-Plé, R. (2000).** Valorisation d'hydrolysats d'origine marine; optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. Thèse Méd Vét.: Université de Bretagne Occidentale, 89 pages.
- **Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., Aranha, C. (2004).** Antimicrobial peptides : premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 24(6), 536-547.
- **Refstie, S., Olli, J. J., Standal, H. (2004).** Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, 239(1-4), 331-349.

- **Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., Penna, A. L. B. (2012).** Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4, 124-140.
- **Renn, P. T., Sathe, S. K. (1997).** Effects of pH, temperature, and reactant Molar Ratio on L-Leucine and D-Glucose Maillard Browning reaction in an aqueous system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3782-3787.
- **Roth, M. (1971).** Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*, 43, 880-882.
- **Roudj, S. (2010).** Protéolyse chez *Lactobacillus* : purification et caractérisation de protéases et aminopeptidases. Thèse de Doctorat d'Etat *Es-Sciences Naturelles*. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. Algérie, 117 pages.
- **Roy, S. K., Dey, S. K., Raha, S. K., Chakrabarty, S. L. (1990).** Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *Journal of General Microbiology*, 136, 1967-1971.
- **Rufián-Henares, J. A., Morales, F. J. (2008).** Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2357-236.
- **Rufián-Henares, J. A., De la Cueva, S. P. (2009).** Antimicrobial activity of coffee melanoidins—a study of their metal-chelating properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 432-438.
- **Ruttanapornvareesakul, Y., Ikeda, M., Hara, K., Osako, K., Orawan, K., Nozaki, Y. (2005).** Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. *Fisheries Science*, 71, 220-228.
- **Ruttanapornvareesakul, Y., Ikeda, M., Hara, K., Osatomi, K., Osako, K., Kongpun, O., Nozaki, Y. (2006a).** Concentration-dependent suppressive effect of shrimp head protein hydrolysate on dehydration-induced denaturation of lizardfish myofibrils. *Bioresource Technology*, 97, 762-769.

- **Ruttanapornvareesakul, Y., Somjit, K., Otsuka, A., Hara, K., Osatomi, K., Osako, K., Kongpun, O., Nozaki, Y. (2006b).** Cryoprotective effects of shrimp head protein hydrolysate on gel forming ability and protein denaturation of lizardfish surimi during frozen storage. *Fisheries Science*, 72, 421-428.
- **Sachindra, N. M., Bhaskar, N. (2008).** In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. *Bioresource Technology*, 99, 9013-9016.
- **Salminen, S., Von Wright, A. (2009).** Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Third Edition Taylor & Francis*.
- **Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.
- **Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D., Prinyawiwatkul, W. (2003).** Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by-product hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68, 2196-200.
- **Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- **Schleifer, K. H., R. Kilpper-Bälz. (1984).** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 34, 31-34.
- **Schmidt, R., Bohme, D., Singer, D., Frolov, A. (2015).** Specific tandem mass spectrometric detection of AGE-modified arginine residues in peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, 50, 613-624.
- **Shahidi, F., Han, X. Q. H., Synowieck, J. (1995).** Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285-293.
- **Sherwin, E. R. (1990).** Antioxidant. In Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S. (Eds.), *Food additives* (pp. 139–193). New York, USA: Marcel Dekker.
- **Shinohara, K., Wu, R. T., Jahan, N., Tanaka, M., Morinaga, N., Murakami, H., Hirohisa, O. (1980).** Mutagenicity of the browning mixtures by amino-carbonyl

reactions on Salmonella typhimurium TA 100. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 671-678.

- **Slizyte, R., Mozuraityte, R., Martinez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., Rustad, T. (2009).** Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44, 668- 677.
- **Slizyte, R., Rustad, T., Storrø, I. (2005).** Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40, 3680-3692.
- **Song, R., Yang, P., Wei, R., Ruan, G. (2016).** Antioxidative, Antibacterial, and Food Functional Properties of the Half-Fin Anchovy Hydrolysates-Glucose Conjugates Formed via Maillard Reaction. *Molecules*, 21, 795.
- **Souissi, N., Ali, B., Yousra, T. E., Moncef, N. (2007).** Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology* , 45, 187-194.
- **Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T. M., Krogdahl, A., Chotikachinda, R. (2014).** Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. *Aquaculture*, 428-429, 195-202.
- **Sumaya-Martinez, M.T., Thomas, S., Linard, B., Binet, A., Guerard, F. (2005).** Effect of Maillard reaction conditions on browning and antiradical activity of sugar–tuna stomach hydrolysate model system. *Food Research International*, 38, 1045-1050.
- **Stein, I.A., Svein, J. H., Vincent, G. H. E. (2005).** Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letter*, 248, 65-68.
- **Synowiecki, J., Al-Khateeb, N. A. A. Q. (2000).** The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68, 147-152.

- **Tagg, J. R. (2004).** Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian journal of medical research*, 119, 13-16.
- **Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., Qi, X. (2015).** Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168, 115-123.
- **Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F. (2007).** Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103(4), 1385-1394.
- **Thomas, M. (2011).** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Thèse de Doctorat en Chimie Analytique – Phytochimie l'université d'Orléans.
- **Thompson, T. L., Marth, E. H. (1986).** Changes in Parmesan cheese during ripening: microfloracolibforms, enterococci, anaerobs, propionibacteria and staphylococci. *Milchwissenschaft*, 41, 201-204.
- **Todorov, S. D., Dicks, L. M. (2004).** Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of Basic Microbiology*, 44, 305-316.
- **Tonheim, S. K., Espe, M., Hamre, K., Rønnestad, I. (2005).** Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 321(1), 19-34.
- **Tressl, R., Silwar, R. (1981).** Investigation of sulfur-containing components in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1078-1082.
- **Tsai, J. S., Chen, J. L., Pan, B. S. (2008).** ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochemistry*, 43(7), 743-747.

- **Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Vandenberghe, I., van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G. (1999).** Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* ACA-DC 178 : Characterization and specificity for b-casein. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2035-2040.
- **Vagnarelli, P., de Sario, A., Cuzzoni, M.T., Mazza, P., de Carli, L. (1991).** Cytotoxic and clastogenic activity of ribose-lysine browning model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 2237-2239.
- **Van Heel, A. J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., Kuipers, O. P. (2013).** BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-) bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Research*, 41, 448-453.
- **Vandajon, L., Cros, S., Jaouen, P., Quéméneur, F., Bourseau, P. (2002).** Recovery by nanofiltration and reverse osmosis of marine flavours from seafood cooking waters. *Desalination*, 144,379-385.
- **Vázquez, J. A., Montemayor, M. I., Fraguas, J., Murado, M. A. (2009).** High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 125-130.
- **Verluyten, J., Leroy, F., De Vuyst, L. (2004).** Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolated *L. curvatus* LTH 1174. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5081-5088.
- **Vhangani, L. N., Van Wyk, J. (2013).** Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems. *Food Chemistry*, 137(1), 92-98.
- **Vieira, G. H. F., Vieira, R. H. S. F., Macrae, A., Sousa, O. V. (2005).** Peptone preparation from fishing by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1235-1237.

- **Vincent, D., Roy, D., Mondou, F., Dery, C. (1998).** Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 185-193.
- **Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Du, Y., Miyaguchi, Y., Lin, B. (2008).** Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food chemistry*, 111(2), 302-308.
- **Wang, Z., Wang, G. (2004).** APD : the antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*, 32, D590-D592.
- **Wee, Y. J., Yun, J. S., Kim, D., Ryu, H. W. (2006).** Batch and repeated batch production of L (+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 431-435.
- **Wijaya, A., Neudeker, C., Holzapfel, W., Franz, C. (2006).** Influence of bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* BFE 1071 on *Lactobacillus* spp. in the rat gastrointestinal tract. In : *Proceedings of Food Micro*, August 2006, University of Bologna, Bologna, Italy, 124 pages.
- **Wijesekara, I., Qian, Z. J., Ryu, B., Ngo, D. H., Kim, S. K. (2011).** Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegeli*) muscle protein hydrolysate. *Food Research International*, 44(3), 703-707.
- **Wiriayphan, C., Chitsomboon, B., Yongsawadigul, J. (2012).** Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132(1), 104-111.
- **Wolfom, M. L., Kashimura, N., Horton, D. (1974).** Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids. Nonenzymic browning of dehydrated orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(5), 796-800.

- **Wu, H. C., Chen, H. M., Shiau, C. Y. (2003).** Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-57.
- **Wunderlich, P. F., Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F., Zeltner, L. (1989).** Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *Journal of International Medical Research*, 17, 333-338.
- **Yamaguchi, Y., Koyama, Y., Fujimaki, M. (1981).** Fractionation and antioxidative activity of browning reaction products between D-xylose and glycine. *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 429.
- **Yang, J. I., Ho, H. Y., Chu, Y. J., Chow, C. J. (2008).** Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatine hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110, 128-136.
- **Yaylayan, V. A. (1990).** In search of alternative mechanisms for the Maillard reaction. *Trends Food Science and Technology*, 1, 20-22.
- **Yen, G. C., Chen, H. Y. (1995).** Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43, 27-32.
- **Yin, H., Pu, J., Wan, Y., Xiang, B., Bechtel, P. J., Sathivel, S. (2010).** Rheological and functional properties of catfish skin protein hydrolysates. *Journal of food science*, 75(1), E11-E17.
- **Yousif, N. M., Dawyndt, P., Abriouel, H., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H. A., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P. (2005).** Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from 'Hussuwa', an African fermented sorghum product. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 216-228.
- **Yuan, Q., Hayashi, A., Kitamura, Y., Shimada, T., Na, R., Jin, X. (2009).** Purification and characterization of cold-adapted metalloprotease from deep sea

water lactic acid bacteria *Enterococcus Faecalis* TN-9. *International Journal of Biology*, 1, 12-21.

- **Zambonino-Infante J. L., Cahu C. L., Péres, A. (1997).** Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition*, 127, 608-14.
- **Zhao, Y., Li, B., Dong, S., Liu, Z., Zhao, X., Wang, J., Zeng, M. (2009).** A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides*, 30(6), 1028-1033.
- **Zhao, G. R., Xiang, Z. J., Ye, T. X., Yuan, Y. J., Guo, Z. X. (2006).** Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, (99), 767-774.
- **Zhu, K., Zhou, H., Qian, H. (2006).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296-1302.

6. Annexes

ANNEXE A

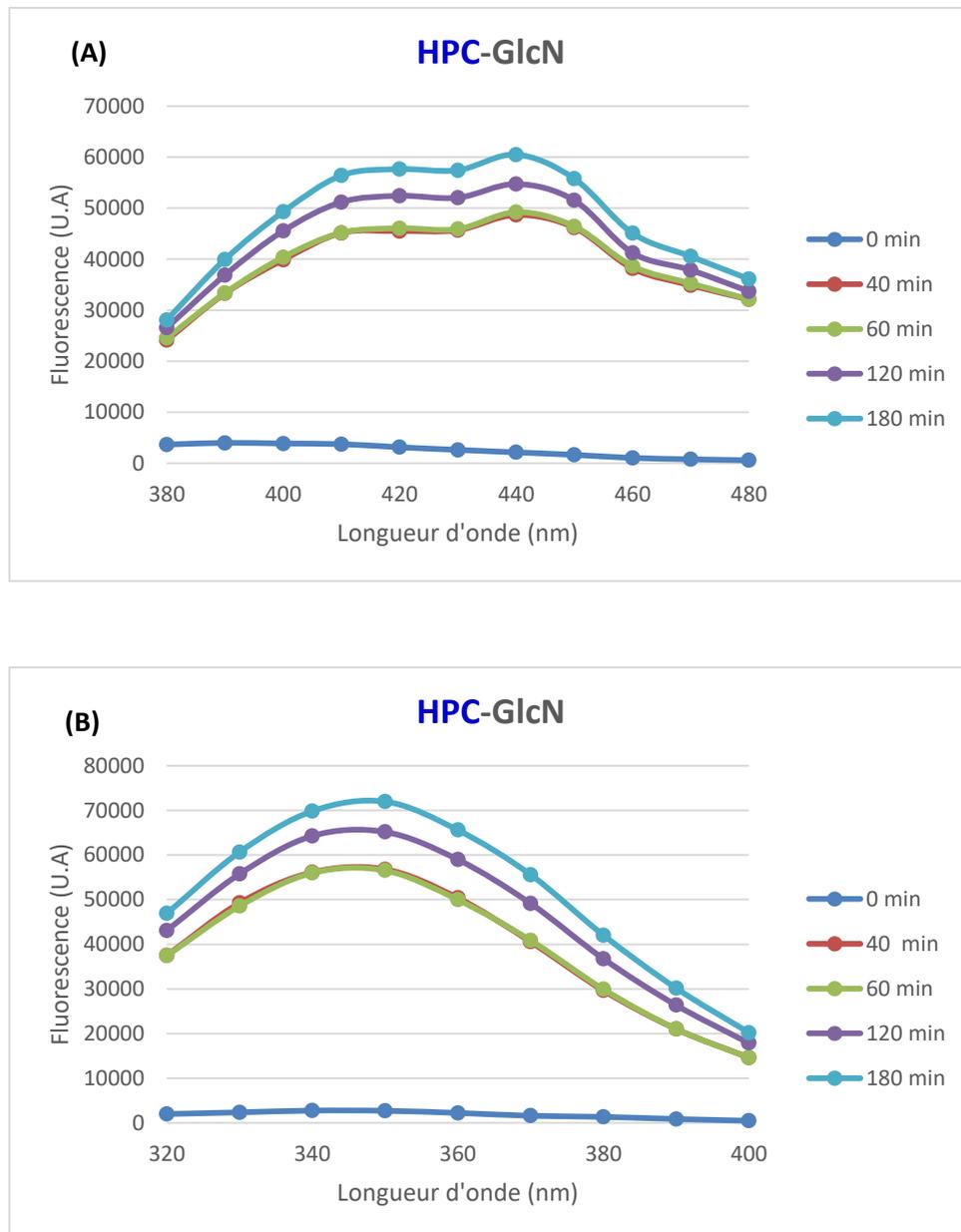


Figure 44 : Spectres d'émission (A) et d'excitation (B) d'hydrolysate de protéines de carapace chauffés en présence du glucosamine en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; HPC : hydrolysate de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine

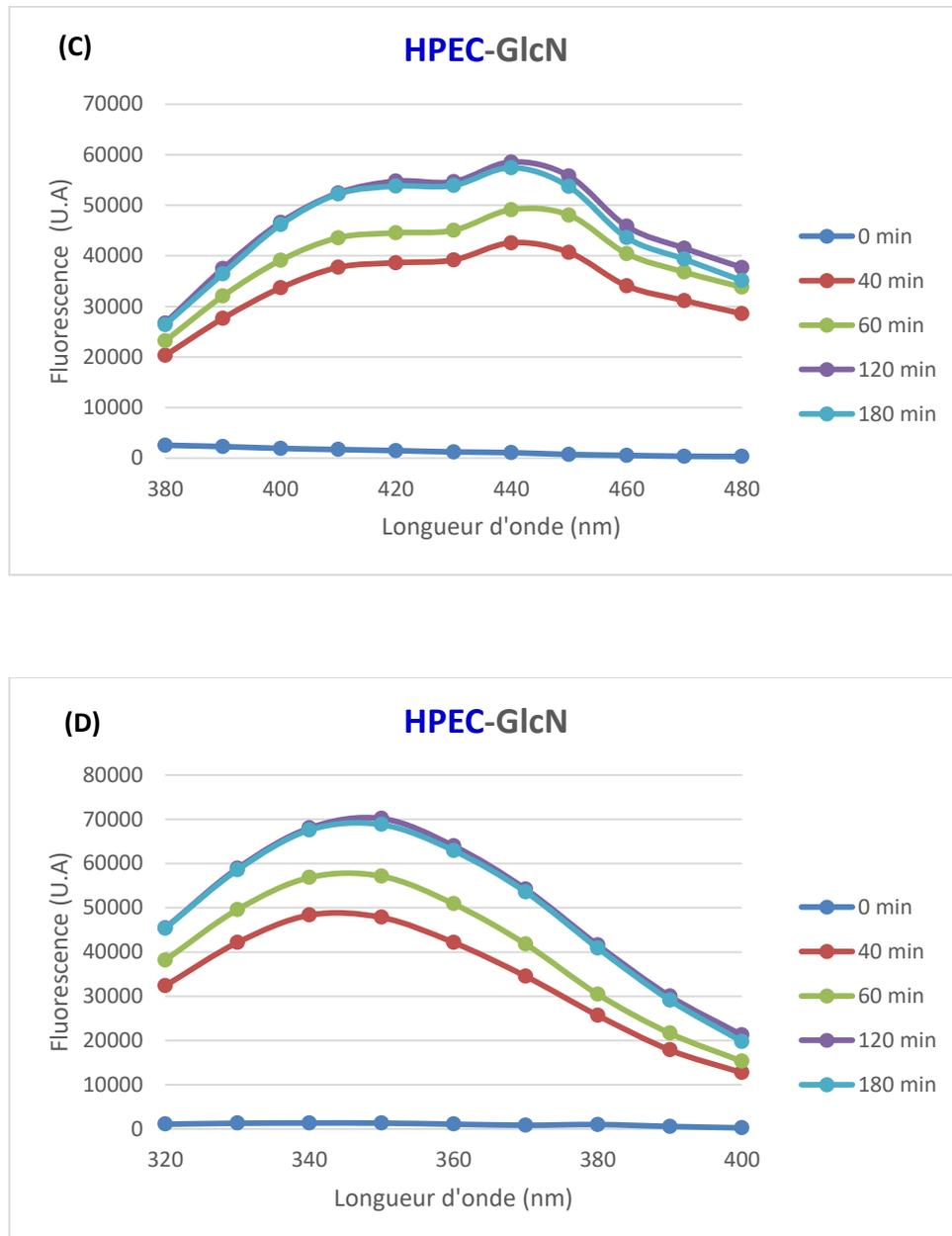


Figure 45 : Spectres d'émission (C) et d'excitation (D) des hydrolysats chauffés en présence du glucosamine en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; HPEC : hydrolysats de protéines des eaux usées de crevette, GlcN : glucosamine.

ANNEXE B

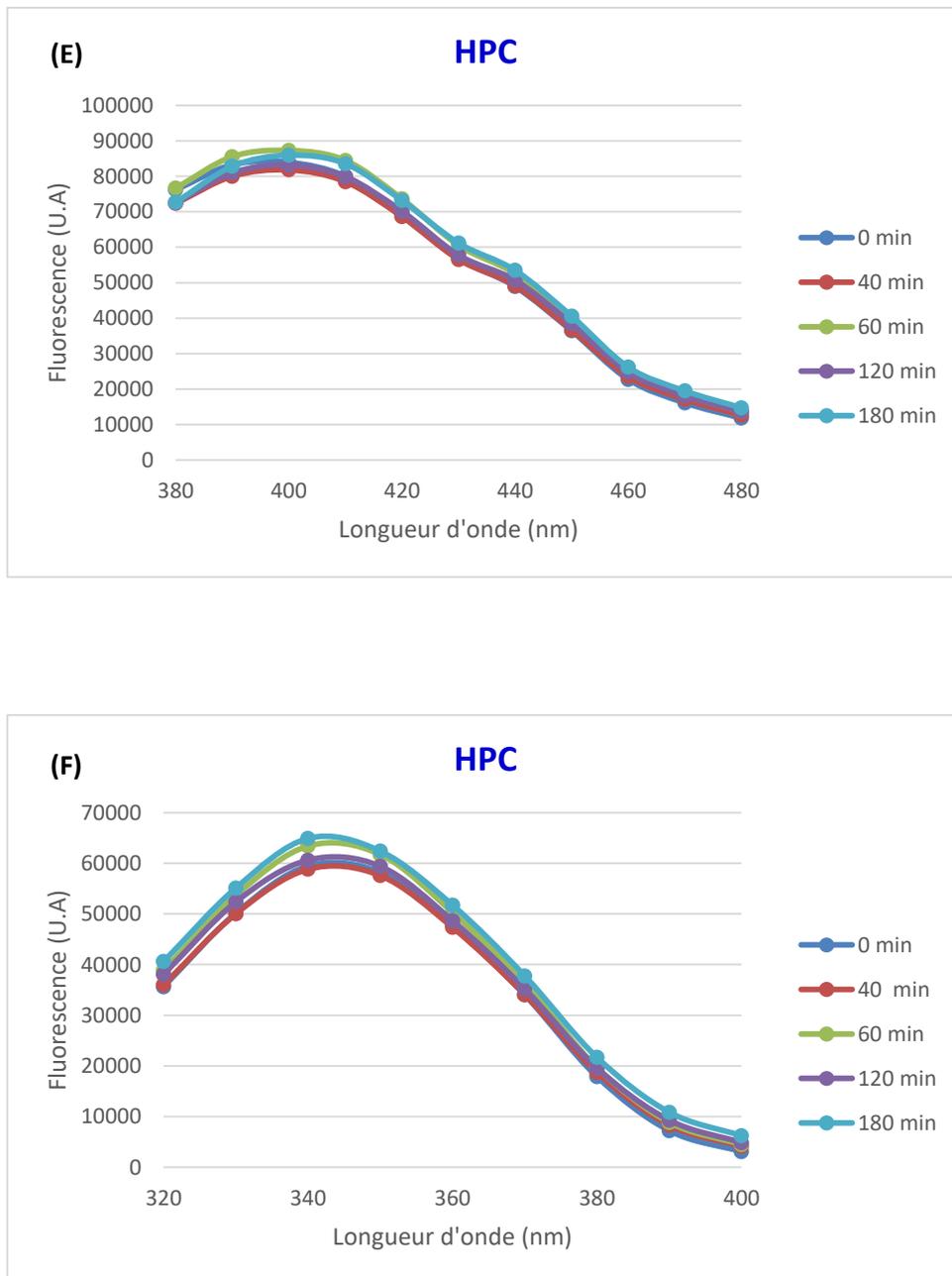


Figure 46 : Spectres d'émission (E) et d'excitation (F) des hydrolysats chauffés en absence du glucosamine en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; HPC : hydrolysat de protéines de carapace de crevette, GlcN : glucosamine.

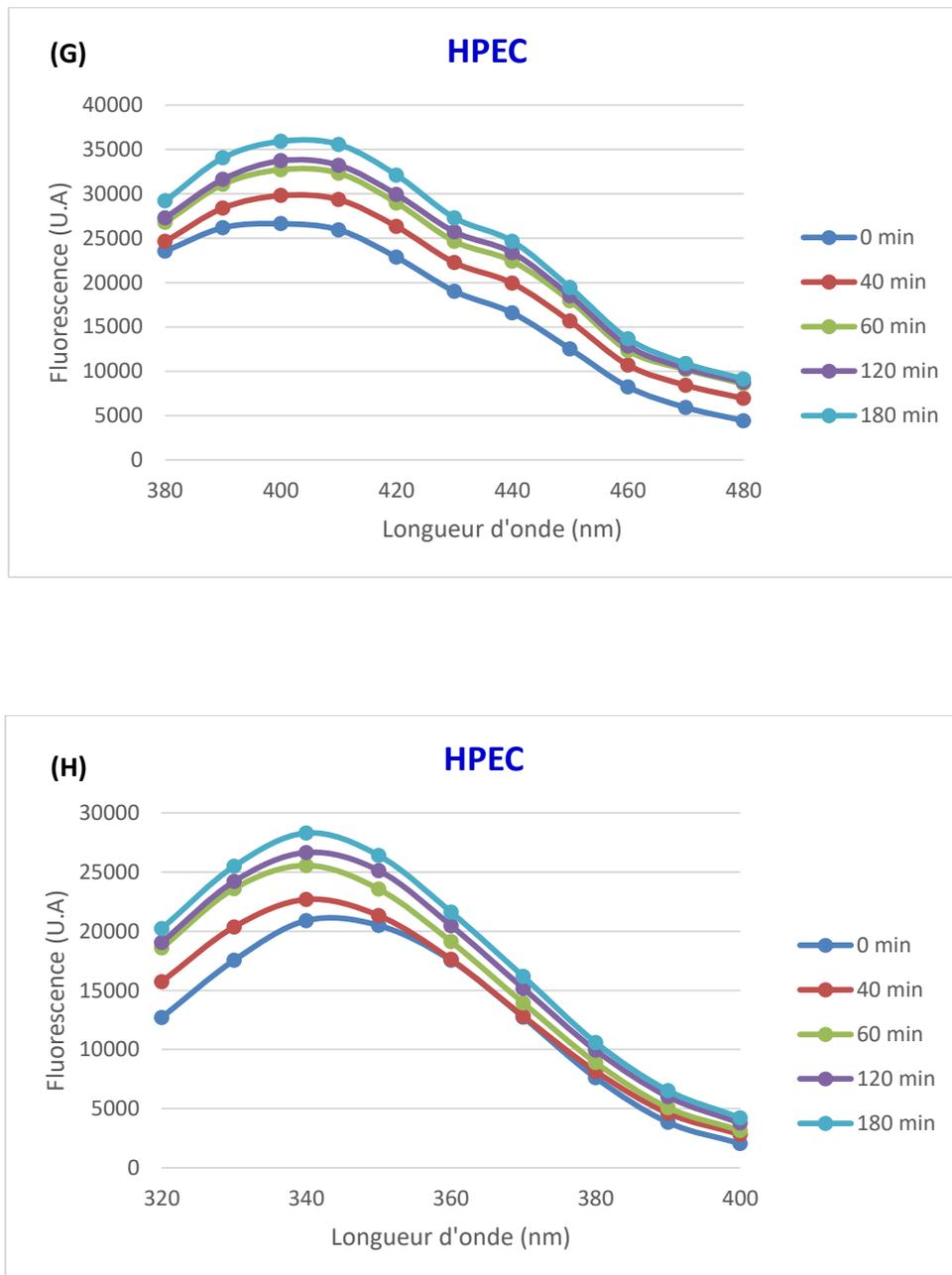


Figure 47 : Spectres d'émission (G) et d'excitation (H) des hydrolysats chauffés en absence du glucosamine en fonction du temps de chauffage. Les abréviations ; HPEC : hydrolysat de protéines des eaux usées de crevette, GlcN : glucosamine.

Résumé

Les déchets issus de la chaîne de transformation des produits de la mer (crevettes et poisson) sont valorisés par la mise en œuvre d'hydrolyse enzymatique afin d'obtenir des peptides à haute valeur ajoutée. L'hydrolyse des protéines de coproduits de crevettes (carapace et eau de cuisson) par les protéases de *Enterococcus faecalis* DM19 a permis d'obtenir des hydrolysats avec une activité antioxydante élevée comparativement aux témoins. Ces hydrolysats soumis à une glycation en présence de glucosamine (réaction de Maillard) par traitement thermique à 100°C ont montré une amélioration d'activité antioxydante. De plus, la glycation des peptides de l'hydrolysate de carapace de crevette conduit à la formation de produits dotés d'activité antibactérienne contre, à la fois, les bactéries à Gram-négatif et les bactéries Gram-positif. Par ailleurs, le milieu de culture MRS préparé avec les hydrolysats de crevette obtenu par l'action de Protamex ou de calmar obtenu avec Esperase ou Protéase Alcaline, a montré une stimulation (16%) de la croissance de la souche *E. faecalis* DM19 comparativement au milieu MRS non modifié. Les hydrolysats de crevette augmentent significativement la production d'acides lactique et acétique (60%). De plus, les hydrolysats de coproduits marins stimulent également l'activité bactériocinogène de *E. faecalis* DM19.

Mots clés :

valorisation de coproduits marins; Protéolyse enzymatique; Hydrolysats; Milieu de culture; *Enterococcus faecalis* DM19; Activités biologiques; Croissance; Activité bactériocinogène; Acides organiques; Réaction de Maillard.