

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل
École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'État
et de Master en Science de la Mer**

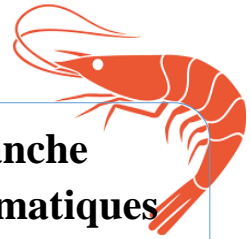
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Hydrobiologie Marine et Continentale

Option : Aquaculture

Thème :

**Valorisation des coproduits de la crevette blanche
(*Parapenaeus longirostris*) par des procédés enzymatiques
en utilisant des protéases bactériennes.**



Présenté par :

- BEZGHOUD Amani Ikram
- MIMOUN Sana

Soutenu le 19/09/2022, devant le jury composé de :

M. KASSAR A.	Maître-assistant 'A'	ENSSMAL	Président
M. ZENATI B.	Maître de Recherche 'B'	CNRDPA	Promoteur
M. AIT SAIDI A.	Maître de Conférence 'B'	ENSSMAL	Co-Promoteur
M ^{me} AMROUCHE L.	Maître-assistante 'A'	ENSSMAL	Examinatrice
M ^{me} MESLEM N.	Maître de conférence 'B'	ENSSMAL	Examinatrice

Année Universitaire 2021-2022

Dédicace



Nulle dédicace ne pourrait exprimer mes profonds
sentiments envers tous ceux pour qui je porte de
l'affection, du respect, de l'amour et de la
reconnaissance.

C'est à travers ces quelques simples mots que je dédie ce mémoire.

Je dédie ce modeste travail **A Dieu** pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'a fournis et
qui m'a fait croire que je suis capable d'arriver à ce stade.

A mon très cher père pour les sacrifices qu'il a consentis pour mon éducation et pour l'avenir qu'il
n'a cessé de m'offrir.

Je te dédie tous ce que je ferai de bien dans ma vie, sachez que rien de ce que je te donnerai
n'égalera ce que tu m'as offert.

Au symbole de douceur, de tendresse, d'amour et d'affection à **ma chère mère** pour ses immenses
sacrifices qu'elle a consentis, pour son sourire angélique qui paraît sur son visage dès qu'elle me voit,
qui me donne la persévérance et me permet de surmonter ma peine et ma fatigue.

Maman, je t'aime et ce travail ne peut exprimer toute la gratitude et l'amour que j'ai pour toi, et ma
réussite sera le moins de mes cadeaux.

A celui qui m'a tout donné sans rien en retour
À celui qui m'a encouragée et soutenue dans mes moments les plus difficiles
Et celui à qui je dois tant, Mr SERIR Hichem
Merci énormément.

À **mes sœurs Aya et Manar**, à tous **mes amis** pour leur encouragement et leur présence morale,
merci d'avoir su m'entourer de toute l'affection et l'attention au cours de ce mastère.

A tous ceux que j'aime.
A tous ceux qui m'aiment.

Je dédie ce modeste travail à:

A mes chers parents, qui m'ont donné la vie et m'ont éduqué et m'ont beaucoup soutenu moralement et financièrement tout au long de mes études, qui m'ont conseillé et sacrifié pour moi.

A mes sœurs qui ne cessent de m'aider et de m'encourager et qui sont toujours là pour moi.

A tous mes meilleurs amis.

Que Dieu vous protège.

MIMOUN Sana.

Remerciements

Avant tout, louange à DIEU le tout- puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'encadrement de **M. ZENATI Bilal**, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, de nous avoir confié ce sujet, et de nous avoir assisté le long de notre travail, ça ne sera pas suffisant pour lui exprimer toute notre grande reconnaissance pour la confiance et le grand soutien et disponibilité ainsi, que pour l'autonomie qu'il nous a accordée pour faire avancer ce travail au niveau scientifique que matériel, ainsi que son encouragement quotidien. Il a fait preuve à la fois d'une grande patience, gentillesse, et d'un esprit responsable, critique et rigoureux. C'était un vrai moment de plaisir de pouvoir travailler avec lui. Sans oublier notre co-encadreur **M. AIT SAIDI Adel** pour la présence et pour son aide et son soutien moral et ses encouragements.

Nous exprimons nos remerciements aux honorables membres du jury, **M. KASSAR Abderrahmane** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce travail et **Mme. AMROUCHE Linda** ainsi que **Mme. MESLEM Nabila** pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner notre mémoire.

Ce stage a été réalisé au sein du Laboratoire Physico-chimie et laboratoire microbiologie au niveau du Centre National de Recherche et de Développement de la pêche et de l'aquaculture à Bou-Ismaïl (CNRDPA), dirigé par **Mr. Mustapha DJELALI**.

Nos vifs remerciements à tous les membres de l'agréable équipe de LPC et LMB à CNRDPA pour les discussions scientifiques que nous avons eues, pour leur sympathie, leur encouragement et leur gentillesse. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos respects et de nos immenses gratitude.

Nous adressons particulièrement nos profonds remerciements à **Mme. GUERROUMI Houda** Ingénieur au LBCM 2 à L'ENSSMAL de nous avoir accueillie et nous aidée à la réalisation de ce travail. Malgré ses énormes occupations au laboratoire, elle nous a consacré énormément du temps pour nous transmettre une partie de son savoir de biotechnologie.

Nous désirons exprimer notre haute considération à tous nos enseignants de l'ENSSMAL, et toute personne n'ayant pas hésité de nous aider de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire et tous ceux qui nous ont aidé au cours de notre stage.

Table des Matières

Remerciements	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iv
Liste des Annexes.....	v
Introduction	1
Chapitre I : Généralités	3
I.1. Généralité sur l'espèce de crevette	3
I.1.1. Description générale	3
I.1.2. Position systématique.....	3
I.1.3. Répartition géographique.....	4
I.1.4. Habitat.....	4
I.1.5. Régime alimentaire	5
I.1.6. Reproduction.....	5
I.1.6. Cycle biologique	5
I.1.7. Exploitation.....	6
I.1.8. Valeur nutritive	7
I.2. Processus biotechnologique de valorisation des co-produits de crevettes.....	8
I.2.1. Composés bioactives issus des co-produits de crevettes	9
I.2.1.1. Hydrolysats protéiques.....	9
I.2.1.1.1. L'hydrolyse enzymatique.....	11
I.2.1.1.2. L'hydrolyse chimique	11
I.2.1.2. Chitine et chitosane.....	12
I.2.1.3. Autres composés bioactifs	12
I.2.1.3.1. Protéines.....	12
I.2.1.3.2. Caroténoïdes et l'Astaxanthine	13
I.2.2. Les bioprocédés pour la production d'hydrolysats protéiques	15
I.2.2.1. Enzymes impliqués dans l'hydrolyse des protéines.....	15
I.2.2.1.1. Enzymes d'origine animales	15
I.2.2.1.2. Enzymes d'origine végétales	15

I.2.2.1.3. Enzymes d'origine microbienne	16
I.2.2.2. Les bactéries protéolytiques et leurs enzymes	17
I.2.3. Composition nutritionnelle des hydrolysats protéolytiques des co-produits de crevettes.....	18
I.2.3.1. La fraction protéique.....	18
I.2.3.2. Les autres fractions	18
I.3. Application des hydrolysats protéolytiques des co-produits de crevettes dans l'alimentation pour poissons	18
I.3.1. Effets des hydrolysats protéiques sur la croissance	19
I.3.2. Effet des hydrolysats protéiques sur le système immunitaire.....	19
Chapitre II : Matériels et Méthodes.....	20
II.1. Matériel.....	20
II.1.1. Matériel biologique.....	20
II.1.1.1. Les co-produits de crevette.....	20
II.1.1.1.1. Origine et collecte.....	20
II.1.1.1.2. Préparation de la poudre de co-produits de crevettes	20
II.1.2. Micro-organismes	20
II.1.2.1. Origine des souches bactériennes	20
II.1.3. Milieux de cultures	21
II.2. Méthodes	22
II.2.1. Conservation et vérification de la pureté des souches	22
II.2.2. Criblage préliminaire de l'activité protéolytique.....	22
II.2.3. Réactivation de la souche performante.....	23
II.2.4. Production d'hydrolysat protéique par la souche performante.....	23
II.2.4.1. Production brute	23
II.2.4.2. Hydrolyse enzymatique	24
II.2.4.2.1. Préparation de l'extrait enzymatique.....	24
II.2.4.2.2. Hydrolyse enzymatique via la méthode pH-Stat	24
II.2.5. Méthodes analytiques	27
II.2.5.1. Dosage de l'activité protéolytique :	27
II.2.5.2. Évaluation de la croissance de la bactérie	28
II.2.5.3. Calcul du degré d'hydrolyse.....	29
II.2.5.4. Caractérisation biochimique	30

II.2.5.4.1. Dosage des protéines	30
II.2.5.3.2. Dosage des lipides	35
II.2.5.3.3. La teneur en cendres	38
CHAPITRE III : Résultats et discussions	39
III.1. Sélection de la souche performante en production de protéase	39
III.1.1. Aspect macroscopique des souches bactériennes utilisées	39
III.1.2. Criblage préliminaire de l'activité protéolytique sur milieu solide.....	39
III.2. Optimisation de la production de la protéase de la souche performante en présence des co-produits de crevettes.....	40
III.2.1. Effet de l'ajout des co-produits de crevettes seuls	40
III.2.2. Effet de l'ajout du sucre inducteur sur la production de protéases	42
III.2.3. Effet de l'ajout des sels minéraux	43
III.3. Hydrolyse enzymatique des co-produits de crevette.....	44
III.3.1. Hydrolyse indirecte à partir des milieux de production	44
III.3.2 Hydrolyse direct moyennant la méthode pH-stat.....	45
III.3.2.1. Production de la protéase de la souche S14 dans des milieux favorables.....	45
III.3.2.2. Degré de la première hydrolyse	46
III.3.2.3. Hydrolyse successive	47
III.3.2.4. Hydrolyse combinée.....	47
III.4. Caractérisation biochimique des co-produits de la crevette blanche et des hydrolysats protéiques	48
III.4.1. Composition biochimique des co-produits de la crevette blanche.....	48
III.4.1.1. La teneur en protéines	49
III.4.1.2. La teneur en matière grasse	49
III.4.1.3. La teneur en matières minérales.....	50
III.4.2. Composition biochimique des hydrolysats	50
III.4.2.1. La teneur en protéines	51
III.4.2.2. La teneur en matière grasse	52
III.4.2.3. La teneur en matières minérales.....	53
Conclusion et perspectives	54
Références bibliographiques	56

Annexes.....	60
Annexe I.....	60
Annexe II.....	65

Liste des figures

Chapitre I : Généralité

Figure I- 1 : Aspect générale de <i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846).	3
Figure I- 2 : Répartition géographique de <i>Parapenaeus longirostris</i> à travers le monde (FAO, 2011).	4
Figure I- 3 : Schéma du cycle des crevettes Penaeidae (Lhomme, 2001).	6
Figure I- 4 : Évolution annuelle des captures de la crevette rose dans le monde (FAO, 2021).	6
Figure I- 5 : Évolution annuelle des captures de la crevette blanche dans la région centre de la côte Algérienne (DGPA, 2017).	7
Figure I- 6 : Procédés biotechnologiques de valorisation des déchets de crevettes (Mao et al, 2017).	9
Figure I- 7 : Mécanismes de découpage des protéines (http://www.biostimulants.fr/produits-utilisation/types-de-produits/les-biostimulants-organiques-lexemple-des-hydrolysats-de-protéines/)	10
Figure I- 8 : Les différentes sources de protéines (Colla, 2015)	11

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Figure II- 1 : Les milieux de production brute	24
Figure II- 2 : Dispositif d'hydrolyse enzymatique selon la méthode pH-Stat.	25
Figure II- 3 : Étapes de l'hydrolyse enzymatique des co-produits de crevette par la protéase de la souche performante	26
Figure II- 4 : Méthode de dénombrement en surface des colonies bactériennes sur milieu LB solide.	29
Figure II- 5 : Étape de minéralisation.....	31
Figure II- 6 : Système de distillation.....	32
Figure II- 7 : Étape de titrage.	32
Figure II- 8 : Appareil de soxhlet.	37

Chapitre III : Résultats et Discussions

Figure III- 1 : Aspect visuel des colonies des souches bactériennes cultivée dans le milieu LB, après 48 h d'incubation.	39
Figure III- 2 : Mise en évidence de la production de la protéase par les deux souches S13 et S14 sur milieu GNL.....	40
Figure III- 3 : Farine des co-produits de crevette obtenue.	40
Figure III- 4 : Activité protéolytique dans les milieux à base de PDC seul et croissance de la souche S14.....	41
Figure III- 5 : Activité protéolytique dans le milieu contient la PDC et le glucose et la croissance de la souche S14.....	42
Figure III- 6 : Activité protéolytique dans le milieu M3 avec la présence des sels minéraux et la croissance de la souche S14.	43
Figure III- 7 : Hydrolysats protéiques issus de la culture de la souche S14 dans les milieux M1, M2 et M3 à base des co-produits de crevettes	44
Figure III- 8 : Concentrations d'hydrolysats protéiques obtenus à partir de la culture de la souche S14 dans les différents milieux à base des co-produits de crevettes.....	45
Figure III- 9 : Cinétique de l'activité de la protéase sécrétée par la souche S14 dans les différents milieux de production.....	46
Figure III- 10 : Le rendement d'hydrolyse direct moyennant la méthode pH-stat.	48
Figure III- 11 : Distribution des composants biochimiques dans les co-produits de la crevette blanche (<i>Parapenaeus longirostris</i>) (en %) par rapport au du poids sec.	49
Figure III- 12 : Distribution des protéines, lipides et matières minérales dans les deux hydrolysats.	51
Figure III- 13 : La quantité des lipides extraite à partir d'hydrolysats de la méthode pH-Stat par extraction Folch.....	52

Liste des tableaux

Chapitre I : Généralité

Tableau I- 1 : Valeur nutritionnelle de la crevette blanche (FoodData central-USDA, 2016).	8
Tableau I- 2 : Les différentes composés bioactives issus de co-produits de crevette et leur utilisation (Djalouli, 2018)	14
Tableau I- 3 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de coproduits de poissons (Djalloul, 2018)	16

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Tableau II- 1 : les dilutions préparées pour le dosage dans la méthode de Lowry	34
---	----

Chapitre III : Résultats et discussions

Tableau III- 1 : Degré d'hydrolyse obtenu à partir des surnageants H2 et H3.	47
Tableau III- 2 : Concentrations en hydrolysats protéiques obtenues à partir de la méthode pH-Stat.....	48
Tableau III- 3 : Composition biochimique des co-produits de la crevette blanche (<i>Parapenaeus longirostris</i>).....	48
Tableau III- 4 : Composition biochimique globale d'hydrolysats protéiques résultats des deux méthodes.....	50

Liste des Annexes

Annexe I

Annexe I-Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16 montrant la position de la souche S13 (n °d'accès: MG601134) dans genre <i>Bacillus</i> et l'espèce <i>amyloliquefaciens</i> (HAMICHE Sonia, 2022).	60
Annexe I-Figure 2 : Courbe d'étalonnage des protéines (présence étude).	60
Annexe I-Figure 3 : Étapes de prétraitement des co-produits de crevette.	60
Annexe I-Figure 4 : Pré-culture de la souche S14 sur milieu LB liquide après 24h d'incubation.	61
Annexe I-Figure 5 : Milieu optimale H1 après 24h d'incubation.	61
Annexe I-Figure 6 : Milieu M1 dans le 5ème jour d'incubation.	61
Annexe I-Figure 7 : Résultat de centrifugation du milieu de production M1	62
Annexe I-Figure 8 : Résultats d'étape d'incubation 15 min (après l'ajout du TCA) dans le dosage de l'activité protéolytique.....	62
Annexe I-Figure 9 : L'inactivation de l'enzyme dans le bain marie à 90°C pendant 10 min.....	63
Annexe I-Figure 10 : Centrifugation du milieu d'hydrolyse enzymatique via la méthode pH-Stat.	63
Annexe I-Figure 11 : Surnageant contient HMSP avant lyophilisation.	63
Annexe I-Figure 12 : Congélation du surnageant de HMPS destiné à lyophilisé.....	64
Annexe I-Figure 13 : Lyophilisation des hydrolysats.	64
Annexe I-Figure 14 : Résultat de l'incération des échantillons dans four à moufle à 550°C.	65
Annexe I-Figure 15	65

Annexe II

Annexe II-Tableau 1 : Caractérisation macromorphologiques et micromorphologique des souches bactériennes étudiées (HAMICHE Sonia, 2022).....	66
Annexe II-Tableau 2 : caractéristiques biochimiques et métaboliques des souches bactériennes étudiées (HAMICHE Sonia, 2022).	66

Introduction

La biomasse produite mondialement du milieu marin est estimée à 178,5 millions de tonnes d'espèces par an, issues de la pêche et de l'aquaculture, regroupant principalement des crustacés, poissons, ou mollusques (FAO, 2020).

Ces dernières années, la crevette constitue une partie importante de la consommation de crustacés dans le monde (MAO, 2016). Selon la DGPA (2017), la production de la crevette blanche est de 111,34 tonnes en 2016 dans la région centre de la côte Algérienne. Une grande partie de ce tonnage est destinée à l'alimentation humaine, dont 55% ont fait l'objet d'une transformation industrielle. Au cours des étapes de transformation, une quantité importante de déchets, estimée à 70% du volume total, est générée (Olsen et al., 2014). Le rejet de déchets de crevettes, en particulier ceux issus de la pêche, pose un problème environnemental et économique critique. Ces déchets sont directement rejetés dans l'environnement, entraînant des problèmes de pollution et par conséquent, des risques sur la santé humaine. Cependant, ces déchets renferment plusieurs substances méritant d'être valorisées : On peut citer entre autres les protéines, les lipides, la chitine, l'astaxanthine et les éléments minéraux, etc. (Heu et al., 2003). Ainsi, la valorisation de ces co-produits constitue une autre alternative pour préserver l'environnement.

Parmi les techniques modernes de valorisation de protéines issues des co-produits, l'hydrolyse enzymatique employant des 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, permettant l'obtention de produits, avec des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles intéressantes qui peuvent être utilisés dans divers domaines comme la nutrition humaine et animale, la nutraceutique et la pharmaceutique, la cosmétique etc.

De nombreuses études ont montré l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique par des protéases pour solubiliser des matrices solides et d'obtenir un hydrolysats, avec une forte teneur en matière protéique (polypeptides, peptides et acides aminés), et éventuellement des lipides pouvant être libérés (Dey and Dora, 2014; Maruthiah and Palavesam, 2017; Sinthusamran et al., 2020). Dans ce contexte, nous avons prospecté le potentiel d'un procédé d'hydrolyse enzymatique contrôlée à déprotéiniser les co-produits de crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846). Notre contribution consiste à tester l'efficacité des protéases produites par des souches bactériennes isolées localement afin d'obtenir des hydrolysats protéiques de valeurs nutritionnelles comparables à ceux obtenus à partir des protéases commerciales pures (Randriamahatody, 2011). L'étude se subdivise en trois parties :

- La sélection de la souche bactérienne protéolytique la plus performante et l'optimisation de la synthèse de la protéase sécrétée dans différents milieux de fermentation favorables, en présence ou en absence, de déchets de crevettes,
- L'obtention des hydrolysats à partir des milieux de fermentation (contenant les déchets de crevettes) ou par protéolyse directe moyennant un procédé appelé « pH-Stat ».
- La caractérisation biochimique des hydrolysats et du substrat de base (les déchets de crevettes).

Chapitre I : Généralités

I.1. Généralité sur l'espèce de crevette

I.1.1. Description générale

On a utilisé comme matière première une espèce de la famille des Penaeidae appelée *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) ; elle est connue en Algérie sous le nom de « crevette blanche ».

Parapenaeus longirostris (Lucas, 1846) se distingue par un corps comprimé latéralement. Rostre bien développé, armé de dents, soit uniquement sur le bord dorsal, soit sur les bords dorsal et ventral. Yeux sans tubercule sur le pédoncule, mais avec une écaille près de leur base. Carapace avec une épine hépatique et un sillon cervical très court, n'atteignant pas la région dorsale. Epine post-orbitaire absente. Les trois premières paires de périopodes munies de pinces de forme identique et qui augmentent légèrement de taille vers l'arrière; les deux dernières paires bien développées, se terminant par des griffes simples. Pleuron du premier segment abdominal chevauchant celui du 2ème. Telson à pointe aiguë, parfois tridentée (Lioris et Rucabado, 1998).

Sa couleur est beige plus ou moins nacré ou rose orangé avec le rostre franchement rouge ainsi que les pattes, les articulations, des appendices et le telson mais virant au blanc après quelques jours de conservation en glace.



Figure I- 1 : Aspect générale de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) (Élaboration personnelle).

I.1.2. Position systématique

En 1997, Pérez-Farfante et Kensley proposent la taxonomie suivante de la crevette blanche :

Embranchement : Arthropodes

Sous-Embranchement : Antennates

Classe : Crustacés.

Sous-classe : Malacostracés

Super-ordre : Eucaridés

Ordre : Décapodes

Sous-Ordre : Natantia

Infra-Ordre : Penaeidea

Super-Famille : Penaeoidea

Famille : Penaeidae

Genre : *Parapenaeus*

Espèce : *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)

I.1.3. Répartition géographique

La crevette blanche *P. longirostris* présente une large distribution géographique. Elle est présente sur les fonds sablo-vaseux ou vaseux en Atlantique Est, de l'Angola au Portugal et en Atlantique ouest de la Guyane au Massachusetts (USA), ainsi que dans toute la Méditerranée (Arzel et al., 1992).

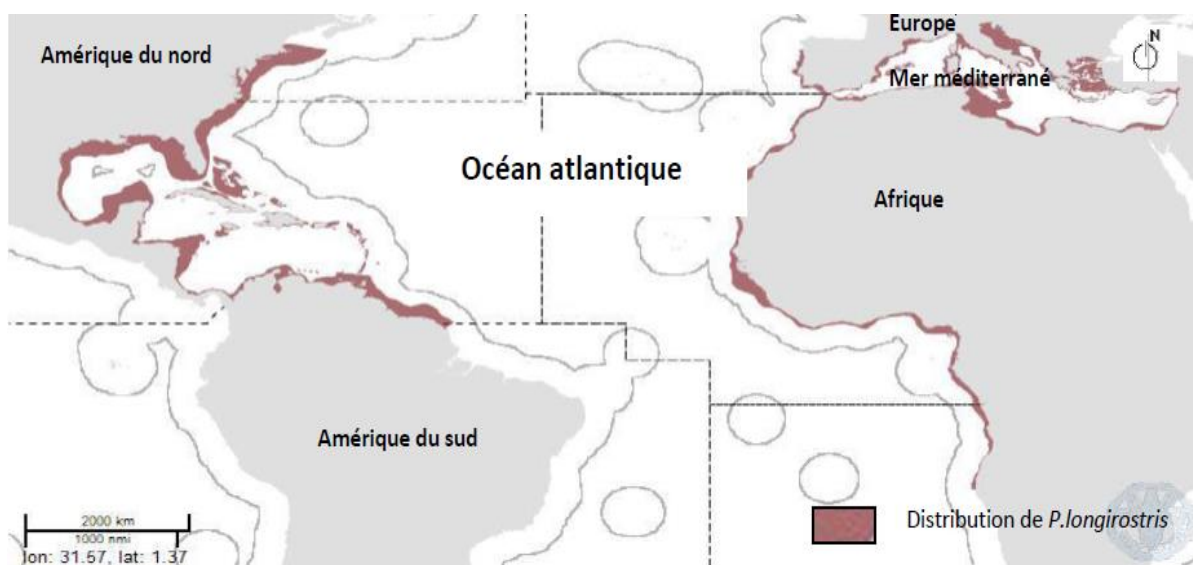


Figure I- 2 : Répartition géographique de *Parapenaeus longirostris* à travers le monde (FAO, 2011).

I.1.4. Habitat

P. longirostris est une espèce exclusivement marine. Elle est généralement rencontrée entre les profondeurs 50 et 700 m (FAO, 2009). En Afrique de l'Ouest, elle vit généralement sur les fonds vaseux et sablo-vaseux à *Funiculina quadrangularis* (Arzel et al., 1992), entre les profondeurs 30 m et 500 m, à la recherche d'une température optimale de 14-15 °C (Crosnier et Bondy, 1968 ; Thiam, 2009). Cependant, quel que soit la saison et la zone, son abondance maximale se situe à 200-300 m (Caverivière et al, 1986 ; FAO, 1986).

I.1.5. Régime alimentaire

Le régime alimentaire de la crevette blanche est très diversifié. La période de chasse est nocturne. Cette crevette se nourrirait essentiellement de petits bivalves, de petits crustacés (crangonidés en particulier), de foraminifères, de polychètes, de mollusques, de débris végétaux, ainsi que de cadavres de poissons (Tursi et al., 1999).

I.1.6. Reproduction

Comme toutes les crevettes Penaeidae, *P. longirostris* n'incube pas ses œufs (Crosnier et al., 1970). Les œufs, une fois fécondés, sont émis directement dans l'eau. En général, c'est un seul groupe d'ovocytes qui évolue jusqu'à la ponte. Ce mode unique de maturation des ovocytes est presque commun aux Penaeidae (Crosnier et al., 1970). La ponte a lieu au mois de mai. Les mois de juin, juillet et août correspondent à la période de repos sexuel et, en septembre la maturation des ovaires reprend.

L'aire de reproduction se situe entre 200 et 350 m de profondeur ; toutes les femelles pondeuses (taille ≥ 25 mm longueur céphalothoracique (LC)) se retrouvent entre ces deux isobathes (Crosnier et al., 1970).

I.1.6. Cycle biologique

Le cycle biologique des grandes crevettes pénéides tropicales est bien connu dans ses grandes lignes (Garcia et Le Reste, 1981). Il peut être schématisé de la façon suivante (Figure I-3) : *P. longirostris* commence leur cycle biologique en répandant leurs œufs fertilisés dans l'eau de mer environnante. Les larves planctoniques (nauplii) dérivent vers des nourriceries côtières (souvent des lits d'algues) où elles se développent par une série de mues (trois stades zoé, trois stades mysis) pour atteindre un stade post-larvaire où leur apparence est généralement proche de celle des adultes. Elles se développent alors rapidement dans les eaux productives du littoral (le plus souvent des estuaires), pour ensuite gagner des zones côtières peu profondes, à l'âge de quatre ans environ. Chez certaines espèces, le cycle biologique peut toutefois se dérouler entièrement dans les eaux de l'estuaire (Lewis, 1988).

La physiologie des crevettes Penaeidae se modifie au cours de leur développement ; leurs capacités d'osmorégulation, en particulier évoluent (Lhomme et Garcia, 1984).

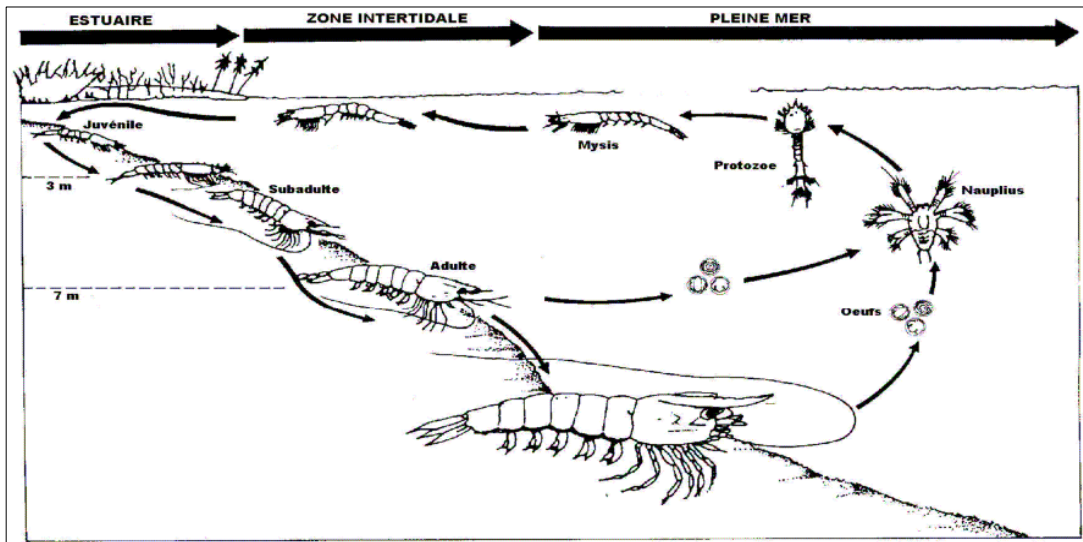


Figure I- 3 : Schéma du cycle des crevettes Penaeidae (Lhomme, 2001).

I.1.7. Exploitation

P. longirostris occupe une place importante dans les pénéides grâce à sa haute valeur nutritive et marchande. Donc, elle est l'une des espèces de crevettes ciblées par la pêche avec une production mondiale de 26697,01 tonnes en 2020 (Figure I-4). À l'échelle nationale et spécifiquement dans la région algéroise, la production de la crevette blanche est environ 115,342 tonnes en 2016 (Figure I-5).

Les techniques de pêche utilisées pour cette espèce sont : les chaluts à perche, les chaluts jumeaux à panneaux et les chaluts-bœufs de fond.

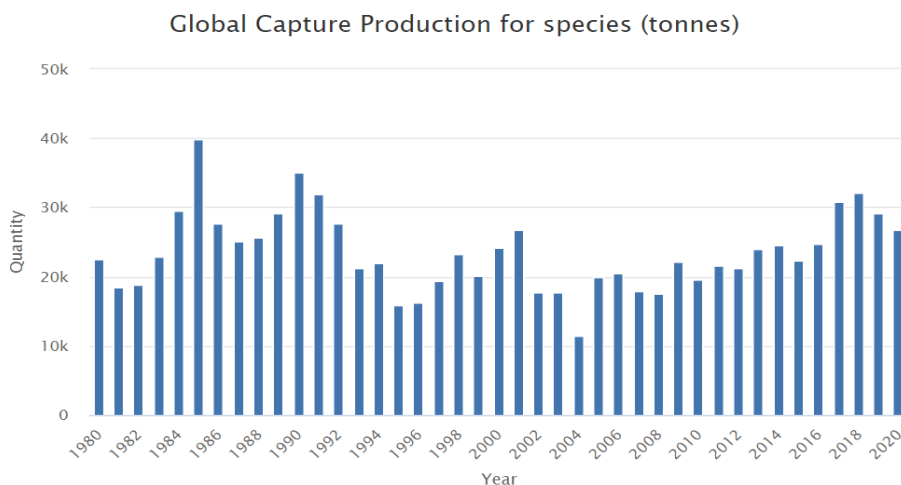


Figure I- 4 : Évolution annuelle des captures de la crevette rose dans le monde (FAO, 2021).

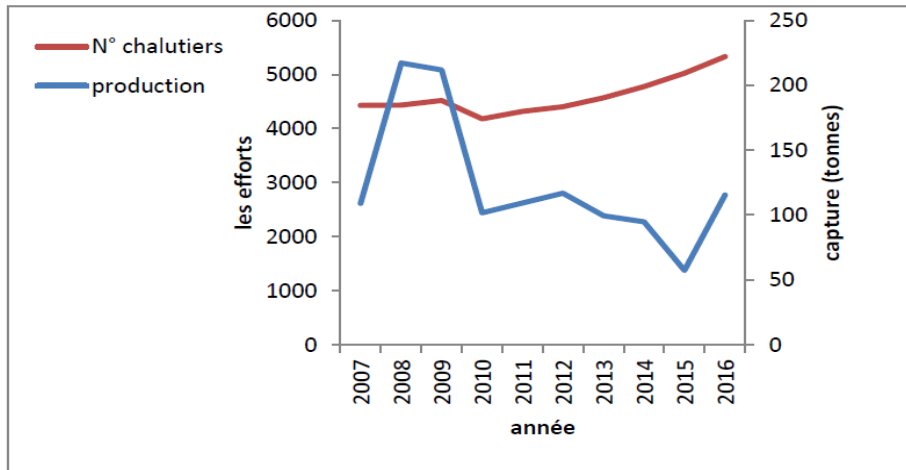


Figure I- 5 : Évolution annuelle des captures de la crevette blanche dans la région centre de la côte Algérienne (DGPA, 2017).

I.1.8. Valeur nutritive

Comme la plupart des produits de la mer, la crevette blanche possède une excellente valeur nutritive. Elle contient des protéines d'une haute valeur nutritionnelle, car à côté des 20 acides aminés standards, elle offre aussi des acides aminés non standards, c'est-à-dire d'autres acides aminés inconnus jusqu'à présent, que synthétisent les crevettes. La plupart de ces nouveaux acides aminés proviennent de la transformation des 20 acides (Tifour et Douara, 2018). Ainsi, la composition des lipides de cette espèce compte une majorité d'acides gras mono-insaturés et polyinsaturés. Elle constitue aussi une excellente source de vitamines du groupe B, notamment la vitamine B12 et B3 (ou PP). Elle apporte également de la vitamine A, de la provitamine A, et de la vitamine E. *P. longirostris* présente d'importantes concentrations en minéraux et oligo-éléments (notamment en sélénium, fer, phosphore, zinc, cuivre, iode et magnésium) et d'autres substances avec des propriétés antioxydantes particulières : la coenzyme Q10 (CoQ10), un composé dont la structure est proche de la vitamine K et l'astaxanthine, un pigment de la famille des caroténoïdes, et chitine et chitosane.

Le tableau I-1 présente la valeur nutritionnelle de la crevette blanche.

Tableau I- 1 : Valeur nutritionnelle de la crevette blanche (FoodData central-USDA, 2016).

Valeurs nutritionnelles par portion (100g)	
Énergie	71,0 kcal
Graisse totales	1,01 g
Acides gras	0,261 g
Glucides	0,91 g
Sucres	0,0 g
Protéines	13,61 g
Sels	1415,0 mg

I.2. Processus biotechnologique de valorisation des co-produits de crevettes

Les co-produits biologiques accumulés sans utilisation appropriée ont entraîné un gaspillage des sources et des problèmes d'élimination des déchets et de pollution de l'environnement. Le traitement approprié des co-produits de crevettes est une approche pour récupérer les biomatériaux tels que la chitine, les protéines, les lipides, l'astaxanthine, les composés aromatiques et le carbonate de calcium. La valorisation des co-produits conduit à des produits dérivés qui sont utilisés comme matière première ou ingrédient dans d'autres domaines tels que l'agriculture, l'alimentation humaine et animale, le nutraceutique et pharmaceutique, le cosmétique, le médical... A partir d'un même type de coproduit, il est possible d'obtenir différents produits dérivés : farine, huile, hydrolysats... (Dumay, 2006)

Des méthodes biotechnologiques telles que la biocatalyse et la biotransformation avec des enzymes et des microorganismes ont également été décrites (Mao et *al.*, 2017).

Le rejet de déchets de crevettes, en particulier les déchets des pêcheries, pose un problème environnemental et économique critique parce que des biomatériaux précieux sont gaspillés (Kandasamy et *al.*, 2012 ; Morgan et Chuenpagdee, 2003). Les biodéchets sont reconnus comme une ressource abondante de composés biologiques, y compris la chitine, les protéines, les lipides, les pigments, les composés aromatiques et le carbonate de calcium (Bueno-Solano et *al.*, 2009 ; Shahidi et Brown, 1998 ; Yan et Chen, 2015).

Des traitements chimiques (alcalis forts et acides forts) ont été utilisés pour récupérer la chitine, les protéines et les caroténoïdes. Il en résulte un coût et une production élevée d'eaux usées nocives qui sont inappropriés au regard des considérations économiques et environnementales (Mahmoud et *al.*, 2007).

Il est donc urgent d'appliquer une technologie appropriée pour convertir les biomatériaux des déchets de crevettes en produits à valeur ajoutée. Les procédés biotechnologiques utilisés dans la valorisation des déchets de crevettes sont résumés dans la figure I-6.

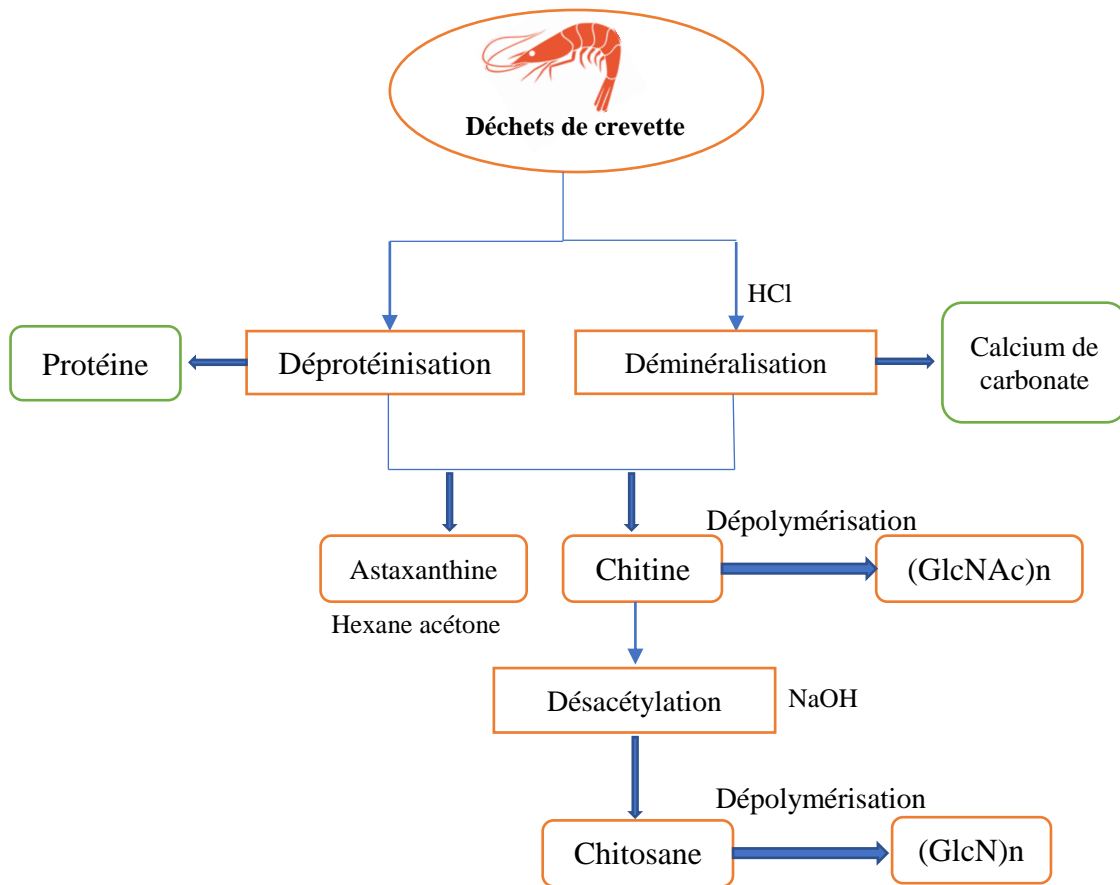


Figure I- 6 : Procédés biotechnologiques de valorisation des déchets de crevettes (Mao et al, 2017)

I.2.1. Composés bioactifs issus des co-produits de crevettes

Les co-produits de crevettes sont considérés comme une source potentielle de protéines animales, et des biomatériaux importants. Les co-produits de crevettes contiennent une large gamme de composants bioactifs tels que des acides gras insaturés, des pigments caroténoïdes, des acides aminés libres et des oligo-éléments. Par conséquent, la récupération efficace de ces composants bioactifs à partir de co-produits de crevettes a de vastes applications industrielles et scientifiques. Les composés bioactifs issus des co-produits de crevettes sont :

I.2.1.1. Hydrolysats protéiques

L'hydrolysat protéique correspond à la coupure des liaisons peptidiques entre les acides aminés aboutissant à un hydrolysat de protéines c'est-à-dire un mélange de polypeptides, d'oligopeptides et d'acides aminés issus de protéines par une hydrolyse partielle (Figure I-7).

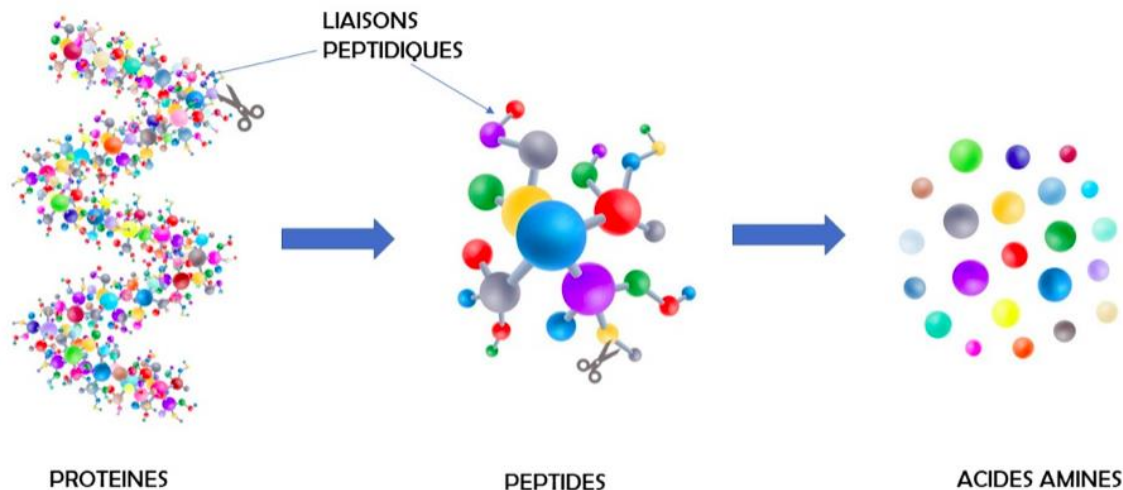


Figure I- 7 : Mécanismes de découpage des protéines

(<http://www.biostimulants.fr/produits-utilisation/types-de-produits/les-biostimulants-organiques-lexemple-des-hydrolysats-de-proteines/>)

Les hydrolysats protéiques ont généralement une bonne digestibilité et une haute qualité nutritive. L'hydrolysat de têtes de crevettes, de fait de sa teneur élevée en protéines et en acides aminés libres, peut être utilisé comme additif dans les aliments pour améliorer leur valeur nutritionnelle (Djallouli, 2018). En alimentation animale, le produit d'hydrolysat peut utiliser comme complément protéique pour l'alimentation animale ou bien il peut rentrer dans la composition d'aliments pour les poissons d'élevage. L'hydrolyse est caractérisée par le degré d'hydrolyse qui correspond au pourcentage de liaisons peptidiques coupées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques de la protéine. En modifiant leur taille et leur charge, l'hydrolyse modifie les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines (digestibilité, solubilité, hypoallergénique, développement d'activités biologiques...).

Les hydrolysats de protéines sont principalement produits par hydrolyse enzymatique et/ou chimique (avec des acides forts ou alcalins) de protéines animales ou végétales (Colla, 2015). La figure I-8 illustre les différentes sources de protéines utilisées.

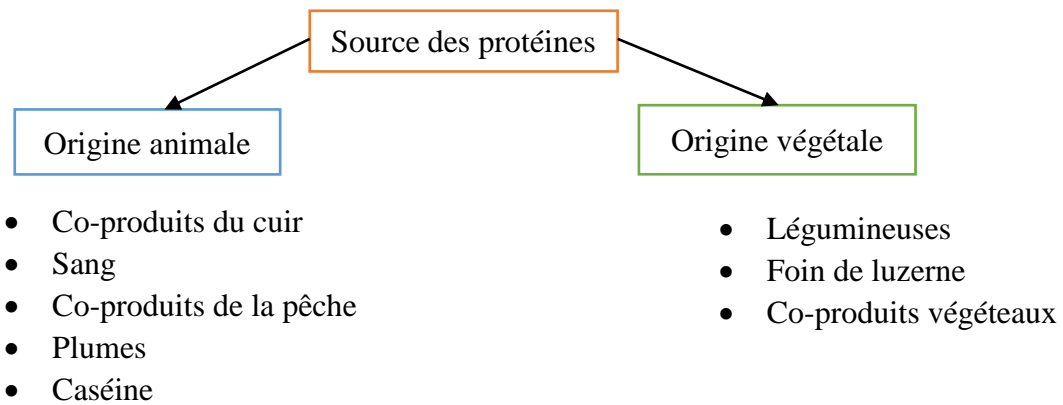


Figure I- 8 : Les différentes sources de protéines (Colla, 2015)

Deux techniques d'hydrolyse sont utilisées pour extraire les protéines :

I.2.1.1.1. L'hydrolyse enzymatique

Dans l'hydrolyse enzymatique, les résidus protéiques des coproduits de la mer sont mis en présence d'une enzyme (protéase) dans un milieu aqueux aux pH et température optimales leurs activités. L'enzyme va découper les protéines contenues dans les coproduits.

Chaque enzyme a une action sélective et coupe une liaison peptidique après une séquence précise d'acides aminés.

Il s'agit d'autolyse lorsque l'enzyme utilisée est initialement présente dans les coproduits (enzyme endogène) comme pour la production de sauces de poissons. Le terme hétérolyse est employé lorsque l'enzyme n'est pas présente dans les coproduits (enzyme exogène).

L'hydrolyse enzymatique présente l'avantage d'être plus facilement contrôlable que l'hydrolyse chimique. Elle permet également de préserver la valeur nutritionnelle de la matière première et conduit à la génération et la libération de produits qui possèdent des intérêts nutritionnels, fonctionnels ou biologiques (Nguyen, 2009).

I.2.1.1.2. L'hydrolyse chimique

Dans le cas d'hydrolyse chimique, le réactif utilisé pour découper les protéines est un acide ou une base. L'hydrolyse chimique est simple non spécifique (coupure des liaisons peptidiques quelle que soit la séquence des acides aminés) ; elle est donc peu reproductible (taille, composition et fonctionnalité variables des peptides obtenus).

Cependant, cette hydrolyse a l'inconvénient de décomposer partiellement certains acides aminés et de détruire complètement le tryptophane (température élevées et conditions de pH extrême). Alors que, l'hydrolyse alcaline provoque la destruction de la cystéine, la cystine, l'arginine et la méthionine. Il sera donc nécessaire de compléter l'hydrolysate chimique par les acides aminés perdus (Nguyen, 2009).

I.2.1.2. Chitine et chitosane

La chitine, est le biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose ; un polymère polysaccharidique, qui comprend principalement des chaînes non ramifiées de N-acétyl-D-glucosamine. Après désacétylation (DA), la chitine peut être transformée en chitosane, qui comprend des chaînes de D-glucosamine (Yeul et Rayalu, 2012). La chitine est un composant structural des exosquelettes de crustacés, mollusques et arthropodes. Elle est aussi rencontrée dans la structure de la membrane cytoplasmique de certains champignons et algues (Di Mario et al., 2008). On retrouve également la chitine dans la paroi de plusieurs champignons, algues chlorophycées, et dans certaines bactéries (Bordenave, 2009). La nature hydrophobe de la chitine la rend insoluble dans l'eau, aussi bien que dans la plupart des solvants organiques polaires.

La chitine et le chitosane sont d'importants matériaux bioactifs, avec de nombreuses activités très puissantes comme la fonction immunitaire, l'hémostase et la cicatrisation des plaies, l'action antioxydante, l'activité antimicrobienne et l'élimination des métaux lourds et d'autres polluants (Feisal et Montarop, 2010). C'est pourquoi, en tant que ressources renouvelables, la chitine et ses dérivés ont une large gamme d'applications dans l'alimentation et la nutrition (Limam et al., 2011), pharmaceutique (Kato et al., 2003), biotechnologique (Kim et Mendis, 2006), cosmétique (Muzzarelli et al., 2012), emballage (Leceta et al., 2013), textile, traitement des eaux usées (Bhatnagar, 2009), et agricole (Jin et al. , 2005).

Parmi les dérivées de la chitine, on retrouve principalement le chitosane, la forme désacétylée de la chitine.

I.2.1.3. Autres composés bioactifs

I.2.1.3.1. Protéines

La protéine, une grande molécule bioactive, est l'un des six nutriments essentiels dans les organismes vivants. Notamment, les co-produits de crevettes qui sont riches en protéines et fournissent des acides aminés essentiels pour les compléments alimentaires pour animaux ou la nutrition humaine (Cahú et al., 2012 ; Cheong et coll., 2014).

La teneur en protéines des co-produits de crevettes représente environ 35 % et 65 % de son poids sec, et les quantités dépendent des modes de transformation et des espèces (Mizani et al., 2005), dont les acides aminés essentiels et les acides aminés non essentiels représentent respectivement 56,8 % et 43,2 % (Narayan et al., 2010). La protéine présente dans les co-produits de crevettes est étroitement associée à la chitine et aux minéraux. Tout comme la chitine, le processus de récupération des protéines des co-produits de crevettes est par déprotéinisation (DP).

Les protéines extraites du complexe protéine-chitine-minéraux ont diverses applications. Comme on l'a signalé, les hydrolysats de protéines des co-produits de crevettes peuvent être utilisés dans

diverses industries, y compris les produits pharmaceutiques, la nutrition humaine, la nutrition animale et les cosmétiques. De plus, les hydrolysats de protéines sont une bonne source d'azote dans les milieux de croissance des microorganismes (Quitain et *al.*, 2001; Holanda et Netto, 2006).

I.2.1.3.2. Caroténoïdes et l'Astaxanthine

Les caroténoïdes dans les lipides des co-produits de crevettes sont les pigments les plus largement distribués, allant du rouge au jaune chez les plantes et les animaux. L'astaxanthine est un précieux caroténoïde de couleur rouge orangé découvert initialement chez plusieurs oiseaux et poissons et se retrouve principalement chez les crustacés invertébrés comme les crevettes, les crabes et les homards (Armenta-Lopez et *al.*, 2002). L'astaxanthine est un pigment de la classe des xanthopylles. Il est présent dans les co-produits des crustacés à raison de 50 à 200 mg/kg. Il constitue 63,5 % et 92,2 % des pigments caroténoïdes de coproduits de quelques espèces de crevettes péneïdes, respectivement, sous forme native et avec les formes mono et di-esters lipidiques (Sachindra et *al.*, 2005). L'astaxanthine est le pigment le plus commercialisé dans l'élevage de poisson, notamment le saumon, pour sa bonne coloration. Des études récentes ont montré des effets positifs de l'astaxanthine sur la fertilité, la qualité des œufs et la survie des poissons.

En alimentation humaine et dans le domaine de la nutraceutique, l'astaxanthine présente le grand intérêt de posséder différentes activités biologiques telles des activités anti-inflammatoire, immuno-modulatrice, anticancéreuse et des actions photoprotectrices. Il prévient aussi la survenue de maladies cardiovasculaire et neurodégénérative. Son activité antioxydante est très intéressante : elle est 500 fois plus puissante que celle de la vitamine E (Olaizola, 2008).

Une étude a démontré l'effet antidépresseur des caroténoïdes de crevettes sur des rats de laboratoire, lié probablement à leur caractère antioxydant (De Souza Bezerra et *al.*, 2005). L'astaxanthine peut être extrait pendant la production de la chitine et du chitosane, mais la majeure partie de la production d'astaxanthine est actuellement issue de la synthèse chimique (Hoischen et *al.*, 1998 ; Archer et Russell, 2007). Dans le souci de préserver sa structure et de récupérer les autres composés présents dans les coproduits de crustacés, plusieurs études sont effectuées pour l'extraction de l'astaxanthine. Parmi les techniques les plus courantes, la fermentation s'avère être une technique prometteuse (Bhaskar et *al.*, 2007; Sachindra et *al.*, 2007 ; Armenta et Guerrero-Legarreta, 2009; Pacheco et *al.*, 2009) ainsi que l'hydrolyse enzymatique (Lee et *al.*, 1999; Babu et *al.*, 2008). L'extraction des caroténoprotéines par hydrolyse enzymatique semble efficace pour des applications à destination de l'alimentation humaine du fait de l'abondance en acides aminés libres et en astxanthines dans l'hydrolysats ; à l'inverse, la

fermentation lactique paraît plus intéressante pour le secteur de l'alimentation animale par la richesse et la concentration de pigments caroténoïdes (Cremades et *al.*, 2003). Des études sur l'extraction des astaxanthines avec des huiles végétales ont été également menées (Handayani et *al.*, 2008) : l'huile de tournesol à chaud est efficace pour l'extraction d'astaxanthine dans les co-produits de crevette (Sachindra et Mahendrakar, 2005). Enfin, concernant les solvants organiques, l'utilisation du mélange isopropanol/hexane prouve son efficacité avec une récupération de 60% de l'astaxanthine dans l'hexane (Sachindra et *al.*, 2006). L'astaxanthine est définie comme un super oxydant en raison de sa forte capacité antioxydante, qui est 10 et 500 fois plus élevée que celle des autres caroténoïdes et de la vitamine E, respectivement (Shmidzu et coll., 1996). Le tableau I-2 récapitule les différents composés bioactives extraits de co-produits de crevette et leur utilisation.

Tableau I- 2 : Les différentes composés bioactives issus de co-produits de crevette et leur utilisation (Djelouli, 2018)

Produits	Intérêt	Domaine d'utilisation
Chitine et Chitosane	Bioactivité Rétention d'eau Chélation de minéraux	Agroalimentaire Nutraceutique Pharmaceutique Cosmétique Agriculture Traitement des eaux
Astaxanthine	Bioactivité	Alimentation animale Alimentation humaine Nutraceutique
Peptides	Bioactivité	Alimentation humaine Alimentation animale Milieu de culture microbienne Nutraceutique
Substances aromatiques	Aromatisent naturel	Agroalimentaire
Glucosamine	Nutrition	Diététique
Phosphate alcalin	Enzymatique	Biotechnologie
Éléments minéraux	Nutrition	Agroalimentaire
Huiles riches en $\omega 3$ et $\omega 6$	Nutrition Bioactivité	Agroalimentaire Nutraceutique

I.2.2. Les bioprocédés pour la production d'hydrolysats protéiques

En vue de valoriser les coproduits de crevettes, des différentes enzymes sont utilisées, avec différents intérêt et utilisations.

I.2.2.1. Enzymes impliqués dans l'hydrolyse des protéines

Les protéases, appelées aussi protéinases ou enzymes protéolytiques, font partie de la famille des hydrolases. Ce sont des enzymes dont la fonction est l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des protéines, générant de petits peptides et acides aminés (Ram et *al*, 2019).

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 sont de plus en plus utilisées du fait de leur faible coût de production et de leur diversité (Gupta et *al.*, 2002). Les enzymes protéolytiques peuvent avoir différentes origines :

I.2.2.1.1. Enzymes d'origine animales

Les protéases les plus familières d'origines animales sont les trypsines, les chymotrypsines, les pepsines et les rénines. La trypsine est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. La chymotrypsine se trouve dans l'extrait pancréatique chez l'animal. La pepsine est une protéase acide qui se trouve dans l'estomac de tous les vertébrés. La rénine est une protéase qui est produite comme un précurseur inactif, la protéine. Dans l'estomac des mammifères, elle est convertie en rénine active par l'action de la pepsine (Rao et *al*, 1998 ; Gençkal, 2004).

I.2.2.1.2. Enzymes d'origine végétales

L'utilisation des plantes comme source de protéase est régie par plusieurs facteurs tels que la disponibilité des terres pour la culture et les conditions climatiques adéquates pour la croissance. En outre, la production de protéases à partir des plantes est un processus fastidieux (Gençkal, 2004). Les protéases d'origine végétale ont des applications dans l'industrie alimentaire et l'industrie des détergents (Gaur et *al*, 2010). La papaïne extraite d'une plante équatoriale et tropicale, la bromélaïne isolée de l'ananas, la ficine issue de la figue et la kératinase produite par certains groupes botaniques pour dégrader la kératine sont un exemple d'enzymes d'origine végétale.

I.2.2.1.3. Enzymes d'origine microbienne

Les microbes représentent une excellente source de protéases en raison de leurs croissance rapide (Gaur et *al*, 2010), de leur large diversité biochimique, et de leur susceptibilité à la manipulation ce qui les rend préférées aux enzymes d'origine végétale et animale (Krishna et *al*, 2009). Les protéases microbiennes représentent environ 40 % du totale des ventes mondiales d'enzymes (Gupta et *al*, 2002). Elles peuvent être produites par les bactéries, les champignons, les levures, et les virus. Ces protéases sont de plus en plus étudiées à cause de leurs importances et de leurs applications ultérieures dans l'industrie et la biotechnologie (Krishna et *al*, 2009). Les enzymes d'origine microbienne possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour des applications biotechnologiques.

Le tableau I-3 liste les différentes protéases utilisées pour l'hydrolyse de différentes matières premières ainsi que l'utilisation des hydrolysats.

Tableau I- 3 : Protéases utilisées pour l'hydrolyse de coproduits de poissons (Djalloul, 2018)

Enzyme	Substrat	Température °C	pH	Utilisation
Origine végétale				
Papaïne	Viscères de morue Arêtes de thon Têtes et viscères de sardine	30-80	5-9	Source azotée Intérêt nutritionnel Libération des lipides
Bromélaïne	Viscères de morue	20-65	5-8	Source azotée
Origine animale				
Pepsine	Arêtes de colin Arêtes de saumon et morue	37-45	2-4	Bioactivité Intérêt nutritionnel
Trypsine Chymotrypsine	Arêtes de thon Arêtes de thon	37-50 37	7,5-8 8	Bioactivité Bioactivité
Origine bactérienne et fongique				
Alcalase	Arêtes de saumon et morue Viscères de morue Coproduits de saumon Squelette de thon Viscères de seiches et sardine Têtes et gonades de hareng Têtes et viscères de	35-70	6-10,4	Intérêt nutritionnel Source azotée Intérêt nutritionnel Bio activité Intérêt nutritionnel Intérêt nutritionnel Libération des lipides

Protamex	sardine Chair de saumon	35-57	5,5-8	Intérêt nutritionnel
	Viscères de morue Viscères de seiches et sardine Squelette de saumon Peau de poissons Viscères de sardine Têtes et viscères de sardine Arêtes de morue			Source azotée Intérêt nutritionnel Sources de protéines Bioactivité Libération des lipides Libération des lipides Bioactivité
Flavourzyme	Squelette de colin Viscères de morue Viscères de seiches et sardine Viscères de sardine Chair de saumon	40-60	5-8	Intérêt nutritionnel Libération des lipides Intérêt nutritionnel Libération des lipides Intérêt nutritionnel
	Viscères de morue Têtes, peau, viscères, squelette de merlan Squelette de thon Arêtes de saumon et morue			Source azotée Source azotée Bioactivité Intérêt nutritionnel

I.2.2.2. Les bactéries protéolytiques et leurs enzymes

Les bactéries protéolytiques sont des bactéries qui peuvent utiliser les protéines comme source de carbone et d'énergie. Ils sécrètent des protéases qui hydrolysent les protéines et les polypeptides en acides aminés. Ceux-ci sont ensuite transportés dans la cellule et métabolisés (Lansing et *al*, 2003). Des Protéases d'origine bactérienne : il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés (Frazier, 1967).

Les protéases bactériennes neutres sont actives dans une gamme de pH étroit (pH 5 à 8), et ont une faible thermotolérance, tandis que les protéases bactériennes alcalines sont caractérisées par une température optimale d'activité à 60°C (Rao et *al.*, 1998).

Les protéases bactériennes représentent les enzymes les plus exploitées dans le secteur industriel en raison de leur croissance rapide, de leur large diversité biochimique, et de leur susceptibilité à la manipulation génétique (Gaur et *al*, 2010). Elles sont utilisées dans divers processus tels que l'agro-alimentaire, l'industrie pharmaceutique et thérapeutique, le cuir, le textile, les détergents et l'alimentation animale (Singh et *al*, 2016).

Quelques exemples de bactéries protéolytiques incluent : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *Virgibacillus sp. SK33*, *Synergistes sp.*, *Bacillus brevis* et *Bacillus aryabhattai* (Devi et al, 2008).

I.2.3. Composition nutritionnelle des hydrolysats protéolytiques des co-produits de crevettes

Depuis les années 70, les recherches se sont tournées vers les hydrolysats de coproduits de la mer, montrant que les intérêts nutritionnels et la composition de ces produits pouvait être incorporés en alimentation humaine ou animale dans des régimes spécifiques.

I.2.3.1. La fraction protéique

Les hydrolysats de coproduits d'origine aquatique sont riches en protéines. Ils contiennent en moyenne 60 à 90% de protéines (Choi et al, 2009) et sont donc plus riches que les farines de poisson. La digestibilité des peptides issus de protéines hydrolysées présente un avantage pour la nutrition de personnes dont le système digestif est en dysfonctionnement, car l'assimilation intestinale de ces peptides est meilleure.

En effet, le taux de protéines solubles est important et la composition en acides aminés est équilibrée. Ces hydrolysats ont donc été convoités pour leur grande valeur nutritionnelle, parfois supérieures à celles des régimes synthétiques. En plus de leur intérêt nutritionnel, les hydrolysats de co-produits marins peuvent conférer aux produits auxquels ils sont associés une augmentation du rendement de la cuisson (en diminuant les pertes en eau et en protéines occasionnées) et des propriétés antioxydantes (Shahidi et al.1995).

I.2.3.2. 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. 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 soluble 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).

I.3. Application des hydrolysats protéolytiques des co-produits de crevettes dans l'alimentation pour poissons

Dans le domaine de l'aquaculture, les hydrolysats sont les plus valorisés, étant donnée l'absence d'aliments adaptés aux différents stades larvaires de poissons et de crustacés et qui constitue un

facteur limitant dans le secteur aquacole. Depuis les années 1970, les études sur les besoins nutritionnels des larves de poissons et crustacés d'aquaculture se sont multipliées face à un développement important de ce secteur, mettant en évidence les comportements alimentaires ainsi que les besoins nutritionnels des juvéniles (Kanazawa 1970). En effet en aquaculture, la charge récurrente la plus importante est la source protéique apportée aux animaux. Les protéines des co-produits de crevettes hydrolysées, en plus de leur faible coût, sont d'une grande digestibilité. De plus, de nombreuses études ont montré que certains hydrolysats de poisson possédaient des propriétés nutraceutiques (Cordova-mureata et Garcia-carreno, 2002).

I.3.1. Effets des hydrolysats protéiques sur la croissance

Les hydrolysats protéolytiques de coproduits de la crevette sont des ingrédients potentiels pour la formulation de régimes aquacoles, remplaçant la farine de poisson comme source de protéines. Les premiers régimes d'élevage en aquaculture nécessitent une grande quantité de protéines, qui sont généralement incorporées dans la farine de poisson de hareng, d'anchois, de sardines ou d'espèces maigres. À cet égard, le remplacement partiel de la farine de poisson par des hydrolysats protéiques présente un certain nombre d'avantages pour le développement des larves et des individus juvéniles. Chez les larves, l'assimilation des protéines est déficiente en raison du développement incomplet du système digestif et de la faible activité de la trypsine et d'autres protéases (Hamre et al, 2013). Cet inconvénient peut être atténué par l'incorporation d'hydrolysats protéiques dans les régimes alimentaires. À cet égard, Kotzamanis et al. (2007) recommandent la supplémentation de régimes aquacoles avec des peptides compris entre 500 et 2500 Da.

I.3.2. Effet des hydrolysats protéiques sur le système immunitaire

Outre leur valeur nutritionnelle, les hydrolysats protéiques peuvent exercer plusieurs activités biologiques. Notamment, dans le cas de l'aquaculture, de nombreuses recherches ont été consacrées à la recherche de stimulateurs naturels qui renforcent la réponse immunitaire des poissons d'élevage contre les agents pathogènes. La vaccination des individus matures est difficile et l'incorporation d'antibiotiques dans les régimes aquacoles n'est pas recommandée car ils augmentent la résistance bactérienne. À cet égard, certaines études ont conclu que certains peptides spécifiques pourraient renforcer le système immunitaire des poissons en situation d'élevage. Par exemple, Tang et al. (2008) ont incorporé des niveaux croissants d'hydrolysats de protéines de poisson (5%, 10% et 15% en poids) dans les régimes à base de poudre de maigre (*Pseudosciaena crocea*). Les auteurs ont signalé une augmentation de l'activité du lysozyme ainsi que des taux d'immunoglobulines dans le sang, qui sont deux paramètres associés à une résistance immunitaire plus forte.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Les co-produits de crevette

II.1.1.1.1. Origine et collecte

Les co-produits de la crevette blanche (*Parapenaeus longirostris*), utilisée dans cette étude, sont constitués de la tête, de la carapace et de la queue. Environ 5 kg de cette espèce ont été achetée de poissonnerie de Bou-Ismaïl en vue de leur disponibilité et de leur prix raisonnable comparé aux autres espèces de crevettes.

II.1.1.1.2. Préparation de la poudre de co-produits de crevettes

Afin de produire une poudre à partir des co-produits de la crevette, ceux-ci sont lavés abondamment à l'eau de robinet puis bouillis dans de l'eau à 90 °C pendant 20 min. Cette dernière étape a pour but d'éliminer les enzymes endogènes de la crevette qui peuvent constituer une interférence par rapport aux enzymes utilisées dans l'hydrolyse (Djellouli, 2018). Après égouttage, les co-produits sont séchés à une température de 50 °C pendant 24h et broyés pour obtenir une poudre homogène d'une taille de particules inférieure à 1,23 mm (Jabeur et *al.*, 2020) (Annexe I-figure 3).

II.1.2. Micro-organismes

II.1.2.1. Origine des souches bactériennes

Les deux souches bactériennes ont été fournies gracieusement par laboratoire de chimie des produits naturels et biomolécules (LNPC-BioM), faculté des sciences, université de Blida 1. L'isolement de ces deux souches a été fait (antérieurement lors des travaux de thèse de Dr. Hamiche S). À partir de l'algue brune *Zonaria tournefortii*, récoltée sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique la « corne d'Or » à Tipaza (36°37' 12 " NR, 2°39' 00 " E). Les deux souches S13 et S14, utilisée dans ce travail, ont été sélectionnées après un criblage d'une vingtaine de souches à dégrader un substrat protéique : la kératine. La souche S13 identifiée via le séquençage du gène codant de l'ARNr 16S en tant que *Bacillus amyloliquefaciens* (Hamiche et *al.*, 2018), tandis que la souche S14 est encore en cours l'identification.

II.1.3. Milieux de cultures

Différents milieux sont préparés pour la conservation des souches bactériennes, le criblage et la dégradation de substrat protéique par les protéases bactériennes. Leurs compositions sont indiquées comme suit :

- **Luria-Bertani (LB)** : 10 g peptone ; 5 g extrait de levure ; 30 g NaCl dans 1L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à $7,0 \pm 0,2$ avec une solution de la soude caustique de 1 mol/L. Pour la préparation du LB solide, 20g d'agar sont ajoutées au milieu. Le milieu est stérilisé à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 20 min.
- **Gélose nutritive au lait (GNL)** : 5 g peptone ; 3 g extrait de levure et 20 g d'agar dans 750 mL d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à $7,0 \pm 0,2$ avec du NaOH (1 mol/L). Après stérilisation à l'autoclave à une température de 121 °C pendant 20 min et refroidissement du milieu à une température avoisinante 50 °C, on ajoute 250 mL du lait écrémé commercial (stérile) et on mélange bien les deux solutions.
- **M1** : 15 g de la poudre de déchet de crevette (PDC) dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec une solution d'acide chlorhydrique de 1 mol/L. Le milieu est stérilisé à l'autoclave dans les mêmes conditions.
- **M2** : 15 g PDC et 10 g glucose dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec d'une solution HCl (1 mol/L). Le milieu est stérilisé à l'autoclave dans les mêmes conditions.
- **M3** : 15 g PDC ; 1.5 g K_2HPO_4 ; 1.5 g KH_2PO_4 ; 1.5 g $MgSO_4$ et 1.5 g NaCl dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec une solution d'acide chlorhydrique (1 mol/L). Le milieu est stérilisé à l'autoclave dans les mêmes conditions.
- **M4** : 15 g PDC et 10 g sucre roux dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec une solution d'acide chlorhydrique de 1 mol/L. Le milieu est stérilisé à l'autoclave dans les mêmes conditions.
- **H1** : 18 g de caséine ; 3 g de lait écrémé en poudre et 0,5g K_2HPO_4 dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec une solution de NaOH (1 mol/L). Le milieu est stérilisé à l'autoclave dans les mêmes conditions.
- **H2** : 1,5 g PDC ; 0,05 g de K_2HPO_4 dans 95 mL d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à $7 \pm 0,4$ avec une solution de HCl (1 mol/l). Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min. 5ml de lait écrémé liquide stérile est ajouté au milieu après refroidissement à 50 °C.

- **H3** : 15 g PDC, 5 g de caséine ; 0,5 g K_2HPO_4 dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à $7 \pm 0,4$ avec une solution de l'acide chlorhydrique (1 mol/L). Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min.
- **Mt** : 15 g PDC dans 1 L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 7,4 avec une solution de l'acide chlorhydrique (1 mol/L). Le milieu est stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min. Ce milieu a été utilisé comme milieu témoin sans inoculation avec la souche S14.

100 mL de chaque milieu est préparé dans erlenmeyers de 500 mL, auxquels on ajoute 2 à 5 % (v/v) de préculture des souches bactériennes (préparées selon II.2.3). Les cultures ont incubés à 37 °C et une agitation de 150 tr/min dans un incubateur agitateur.

II.2. Méthodes

II.2.1. Conservation et vérification de la pureté des souches

A partir des cultures anciennes des souches bactériennes (ramenées du laboratoire LCSN-BioM, Université Blida 1), on prend un fragment de colonies, devant un bec bunsen, et on fait un repiquage par stries ou par quadrant dans des boîtes de pétri contenant du milieu LB solide. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24-48 h. Après développement bactérien, les boîtes sont conservées à +4°C pendant une à deux semaines (conservation à courte terme). La purification des souches est vérifiée par la présence d'une seule forme de colonies et par observation microscopique (forme unique bacille des cellules). Pour cela, un fragment de colonies est déposé sur une lame mouillée avec quelques gouttes d'eau physiologique stérile, ensuite recouverte par la lamelle. La visualisation au microscope est maintenue à un agrandissement de 400 fois (état frais).

Pour une conservation à moyenne terme, des tubes contenant le milieu LB solide incliné sontensemencés en stries par les souches bactériennes, puis incubés à 37°C jusqu'au développement des stries des bactéries (48 h), puis conservés à +4 °C.

II.2.2. Criblage préliminaire de l'activité protéolytique

Pour sélectionner la souche la plus performante, les boîtes de pétri contenant le milieu GNL sontensemencées en point central avec les souches bactériennes S13 et S14, puis incubées à 37°C pendant 24-48h (Allala, 2021). L'activité protéolytique des souches bactériennes se distinguent par l'apparition d'un halo translucide autour de la pique, qui traduit la production de l'enzyme caséinase (qui hydrolyse la caséine du lait).

Plus le diamètre du halo est grand, plus la souche est performante dans la production de protéase extracellulaire.

II.2.3. Réactivation de la souche performante

Un fragment de colonies de la souche performante estensemencé dans un milieu LB liquide de volume de 30-100 mL, dans les conditions aseptiques. Les cultures sont incubées à 37°C et une agitation de 150 tr/min (ou en statique) pendant une nuit. Dans ces conditions, la densité optique (à 600 nm) des cultures sera située entre 0.6 -1, ce qui garantit de prélever un inoculum du débit de la phase logarithmique de croissance bactérienne (Annexe I- Figure 4).

II.2.4. Production d'hydrolysats protéiques par la souche performante

Deux techniques de production d'hydrolysats protéiques ont été testées, en utilisant la souche performante et sa protéase. Le but est de comparer les rendements de production de chaque technique.

II.2.4.1. Production brute

Dans cette technique, la production de protéase et l'hydrolyse de substrat protéique se fait simultanément. Plusieurs milieux de production ont été testés afin de produire le maximum d'hydrolysats protéiques.

5 mL d'inoculum de la souche performante a été ajouté dans les milieux M1, M2, M3 (Figure II-1). Un suivi journalier de la production de la protéase a été effectué pour une période de 5 jours. A la fin, les milieux sont filtrés à travers un papier filtre, le filtrat a été récupéré et congelé à -18 °C puis lyophilisé. Les hydrolysats protéiques obtenus sont stockés à un endroit sec jusqu'à une utilisation ultérieure (caractérisation biochimique).

Les rendements de production d'hydrolysats de la matière ont été estimés (pour les milieux M2 et M3) par mesure la masse résiduelle des co-produits de crevette après élimination du culot bactérien. Pour cela, le résidu des milieux est séché à 105 °C à poids constant (1-2 heures), ensemble avec 1,5 g de PDC. Ils ont ensuite refroidi au dessiccateur puis pesés. Les essais sont réalisés en duplicatas. La quantité de substrat protéique hydrolysée est donnée par la formule suivante :

$$Q = \frac{M - M_{\text{résidu}}}{M} \times 100$$

Q : La quantité de la matière hydrolysée (%).

M : le poids moyen des deux répliquats de PDC séchés.

M résidu : le poids moyen des deux répliquats de PDC résiduelle de M2 ou M3.



Figure II- 1 : Les milieux de production brute

II.2.4.2. Hydrolyse enzymatique

Dans la deuxième technique, l'hydrolyse enzymatique se fait en deux étapes : la production de la protéase dans des milieux plus favorable, qui contiennent des substrats plus assimilables (caséine, poudre de lait), et l'hydrolyse enzymatique proprement dit (méthode pH-Stat).

II.2.4.2.1. Préparation de l'extrait enzymatique

La souche bactérienne performante produit un maximum de protéase dans un milieu optimal (H1, sa composition a été optimisée antérieurement par une doctorante du laboratoire LCSN-BioM). 2,5 mL d'inoculum a été ajouté à 100 mL de ce milieu. La cinétique de production a été suivie pendant 3 jours. La culture a été ensuite centrifugée (à 6000 tr/min pendant 20 min), le surnageant a été récupéré, utilisé immédiatement ou stocké à -18 °C jusqu'à son utilisation dans l'étape d'hydrolyse (pour une période qui ne dépasse pas une semaine).

Les protéases d'autres milieux (H2, H3, et H4) ont été aussi extraites pour les utiliser dans l'hydrolyse enzymatique.

II.2.4.2.2. Hydrolyse enzymatique *via* la méthode pH-Stat

Dans un erlenmeyer de 250 mL, 40 g de PDC a été mélangée avec 60 mL de solution tampon de Tris-HCl (sa préparation est mise dans II.2.5.1) et 60 mL d'extrait enzymatique puis mis à l'agitateur magnétique chauffant (Figure II.2) pendant 2h avec un pH 9 et une température de 60 °C (facteurs optimales de la réaction enzymatique). Pour maintenir un pH constant, on ajout quelques gouttes d'une solution de NaOH (1 mol/L) dès que le pH mètre affiche une petite déviation de la valeur 9 (pas plus de 0.1 unité) (Djellouli, 2018). Le volume de la soude consommée permet de calculer le degré d'hydrolyse.

Après 2 heures, la réaction enzymatique est stoppée par passage au bain marie à 90°C pendant 10 min (Djellouli, 2018) (Annexe I- figure 9). L'extrait a été centrifugé (à 6000 tr/min pendant 20 min) (Annexe I-figure 10), puis le surnageant a été récupéré (Annexe I-figure 11), congelé et lyophilisé (Annexe I-figure 12 et 13). Le culot a été récupéré à son tour pour subir une hydrolyse successive dans les mêmes conditions.



Figure II- 2 : Dispositif d'hydrolyse enzymatique selon la méthode pH-Stat.

Les différentes étapes d'hydrolyse sont résumées dans la figure suivante :

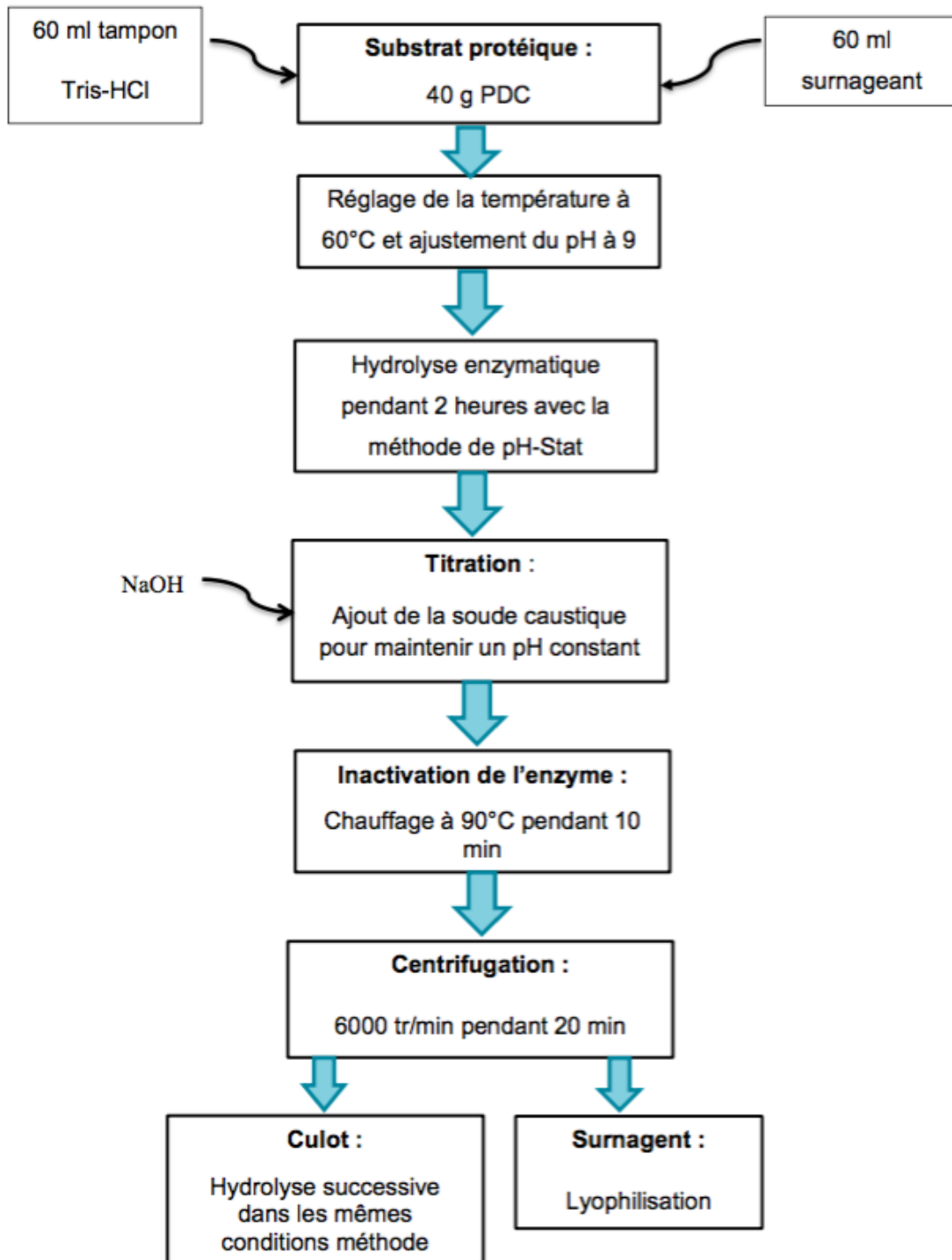


Figure II- 3 : Étapes de l'hydrolyse enzymatique des co-produits de crevette par la protéase de la souche performante

II.2.5. Méthodes analytiques

II.2.5.1. Dosage de l'activité protéolytique :

L'activité protéolytique, plus précisément l'activité caséinolytique, est mesurée dans le surnageant des milieux (M1, M2, M3, H1, H2 et H3) selon le protocole suivant :

1- Préparation du tampon (T) :

Une solution de tris de 50 mmole/L est préparée en ajoutant exactement 6,06 g de tris-base à 1 L d'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 9 avec une solution concentrée de HCl.

2- Préparation de substrat Caséine (C) :

Une solution de 0,2 g de caséine est préparée dans 20 mL de la solution de tampon. La caséine est peu soluble dans l'eau, un chauffage à une température à 80 °C (dans l'agitateur magnétique) pendant une durée pas moins de 15 min est indispensable pour une solubilisation maximale du substrat.

3- Préparation de l'enzyme dilué (ED) :

Plusieurs dilutions des surnageant, basée sur la concentration de l'enzyme, sont effectuées. Les dilutions sélectionnées sont 5, 10, 20, 50 et 100. Elles sont préparées dans la solution de tampon. A titre d'exemple, pour la dilution de 5 fois, on prend 1 mL de surnageant et on complète à 5 mL avec la solution du tampon. Pour la dilution 20, on prend 0,2 mL (à l'aide d'une micropipette) on complète à 10 mL avec le tampon. Chaque dilution est préparée en duplicatas. (Annexe I-figure 7)

4- Protocole de la réaction enzymatique :

Ce protocole consiste à mélanger, à l'aide d'une macropipette, 1,5 mL du tampon, 1,5 mL de l'enzyme dilué et 1,5 mL de la caséine dans des tubes à essai. Les tubes sont incubés au bain-marie à 60 °C pendant 10 min (conditions optimales de l'activité de cette enzyme). La réaction enzymatique est arrêtée rapidement par ajout de 1,5 mL d'une solution d'acide trichloracétique (TCA) d'une concentration de 100 g/L. Les tubes sont bien mélangés puis incubés à température ambiante pendant 15 min (Annexe I-figure 8). Les mélanges résultants sont centrifugés (à 6000 tr/min pendant 20 min) et filtrés pour récupérer les surnageants. L'activité protéolytique des surnageants est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 280 nm.

Un témoin de la réaction enzymatique est préparé de la même manière que les échantillons sauf que le surnageant de culture est ajouté après addition du TCA.

L'activité protéolytique A est exprimée par U unités de tyrosine libérées lors de l'hydrolyse enzymatique de la caséine par 1 mL de surnageant. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$A \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{ABS \times D \times d}{(t \times P)}$$

Avec :

$$ABS = AE - AT$$

T : le temps d'incubation au bain marie (10 min),

P : c'est la pente de la courbe d'étalonnage de la tyrosine, P=0,0055

D : dilution initiale de l'enzyme (5, 10, etc.),

D : dilution de l'enzyme dans le milieu réactionnel, D= 4,5/1,5

AE : Absorbance moyenne des deux repliquats des surnageants,

AT : Absorbance du témoin.

II.2.5.2. Évaluation de la croissance de la bactérie

En parallèle avec la mesure quantitative de l'activité protéolytique, une évaluation de la croissance de la bactérie performante dans les différents milieux a été effectuée par dénombrement sur milieu solide.

La technique se résume comme suit :

A la fin des expériences, la croissance bactérienne dans les différents milieux, à base de la poudre de crevette, a été évaluée par la méthode de dénombrement des colonies bactériennes. A l'aide d'une micropipette portant des embouts stériles et devant le bec bunsen, on prélève 1 mL de chaque culture que l'on ajoute à 9 mL de l'eau physiologique (NaCl à 9 g/L) dans des tubes ; soit la dilution 10^{-1} . A partir de cette dilution, on ajoute 1 mL à 9 mL de l'eau physiologique (en utilisant un autre embout stérile) ; soit la dilution 10^{-2} . On continue à diluer les cultures de la même façon jusqu'à atteindre la dilution souhaitée (cela dépend de la charge bactérienne initiale estimée). A chaque étape, on homogénéise le contenu des tubes après introduction de l'inoculum par agitation douce dans le vortex (d'environ 5 secondes). Par la suite, 0,2 mL de la suspension bactérienne contenue dans chaque tube est étalée sur la totalité de la surface des boîtes de Pétri (deux boîtes de Pétri par dilution) contenant un milieu LB solide (Figure II.4).

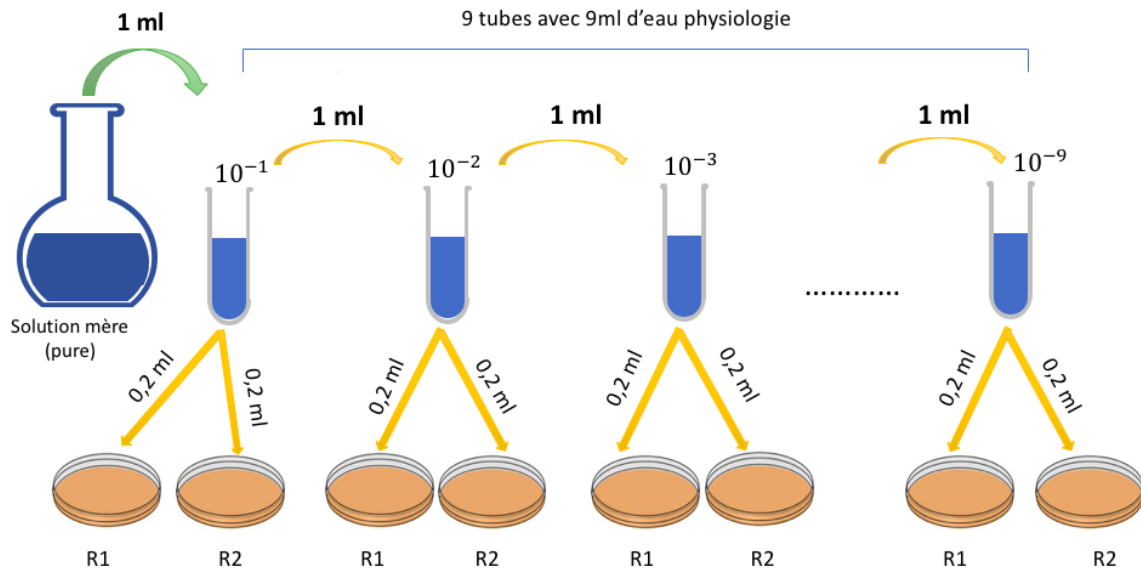


Figure II- 4 : Méthode de dénombrement en surface des colonies bactériennes sur milieu LB solide.

Les boîtes sont laissées quelques minutes se séchées devant le bec bunsen puis inversés et incubés à 37 °C pendant 48h.

Après cette période, les colonies développées dont le nombre par boîte est situé entre 15 et 300 colonies sont comptés.

Le nombre de germes par mL (Unité formant colonies UFC) est déterminé selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0,1 n2)d \times v}$$

N : nombre de microorganismes en UFC/mL.

$\sum C$: la somme des colonies dénombrées dans les boîtes des deux dernières dilutions.

v : volume de l'inoculum prélevé (0,2 mL).

d : la première dilution successive (par exemple, 10^{-5}).

n1 : nombre de boîtes dénombrables de la première dilution successive (entre 1 et 2).

n2 : nombre de boîtes dénombrables de la deuxième dilution successive (entre 1 et 2).

II.2.5.3. Calcul du degré d'hydrolyse

Le DH permet de caractériser l'étendue de l'hydrolyse enzymatique des protéines. Il est estimé par le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques coupées (h) par rapport au nombre de liaisons peptidiques totales (h_{tot}) contenu dans les co-produits de crevette. Il est obtenu par la formule :

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

Où h_{tot} : équivaut à 8,6 meq/kg de protéines (Adler-Nissen, 1986) et h : correspond au nombre de liaisons peptidiques coupées pendant hydrolyse enzymatique.

Selon Adler-Nissen (1977), quand le pH réactionnel est au-dessus du pKa du groupement α -NH₂, le DH est obtenu suivant l'équation :

$$\%DH = (h/h_{tot}) \times 100 = (BN_b / \alpha h_{tot}MP) \times 100$$

Où B : représente la quantité de base en ml ; N_b : la normalité de la base ; α : le facteur de dissociation du groupement α -NH₂ et MP : la masse de protéines en grammes.

Le degré de dissociation α est estimé suivant la formule :

$$\alpha = (10^{pH - pK}) / (1 + 10^{pH - pK})$$

Le pK à différentes températures (Kelvin) est calculé selon l'équation suivante (Steinhardt et Beychock, 1964)

$$pK = 7.8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400$$

II.2.5.4. Caractérisation biochimique

La caractérisation biochimique est effectuée sur la poudre de déchet des crevettes, les hydrolysats protéiques résultats de deux techniques, ainsi que deux culots. Avant les analyses, les échantillons sont tous lyophilisés.

II.2.5.4.1. Dosage des protéines

Méthode de Kjeldahl

Cette méthode est réalisée au niveau du laboratoire biochimie marine 2 à L'ENSSMAL, et le protocole utilisé est celui décrit par Dr. AKROUR-Aissou (2019)

- Principe

La caractérisation par la méthode Kjeldahl permet de déterminer la teneur en protéines totales d'échantillon par le dosage de l'azote contenu dans celui-ci. Il s'effectue en trois étapes.

- Manipulation

Minéralisation :

2g de chaque échantillon sont placés dans cinq matras de Kjeldahl et un autre pour le blanc, ensuite 7g de sulfate de potassium (K₂SO₄), 5 mg de sélénium (Se) catalyseur de la réaction, 1 mL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 60%, 10 mL d'acide sulfurique (H₂SO₄) et 2-3 petits morceaux de pierre ponce sont ajoutés. Les matras sont placés dans le dispositif de minéralisation et chauffés progressivement jusqu'à l'apparition des fumées noires (pendant 3

heures) (Figure II.5). Cette étape est terminée lorsque le contenu des matras devient limpide, donc Le chauffage est arrêté et les matras sont laissés se refroidir.



Figure II- 5 : Étape de minéralisation.

Après refroidissement des matras, le contenu de chaque matras est filtré à travers un papier filtre vers des fioles jaugées de 100 mL, ensuite les matras sont rincés par l'eau distillé et avec ce l'eau de rinçage on a complété à 100 mL. A la fin, les minéralisâtes filtrés et dilué sont conservés au réfrigérateur à 4 °C.

Distillation :

20 mL de chaque minéralisâtes filtrés et le blanc sont ajoutés dans des matras et placés dans le distillateur, puis 40 mL de la soude (NaOH) à 40% est ajoutés directement dans le matras par l'appareil à l'aide d'un bouton et la distillation commence. Le distillat est récupéré dans un erlenmeyer de 100 mL contenant 20 mL d'acide borique à 4% de pH déjà déterminé (pH = 3,684). La distillation est terminée lorsque 100 mL de solution est récupéré (Figure II.6).



Figure II- 6 : Système de distillation.

Titrage :

10 gouttes de la solution d'indicateur de Tashiro est ajoutés aux distillats, ensuite un titrage avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,2 mol/L est fait jusqu'à l'obtention du pH initial de la solution d'acide borique et le virage de la couleur au rose (Figure II-7).

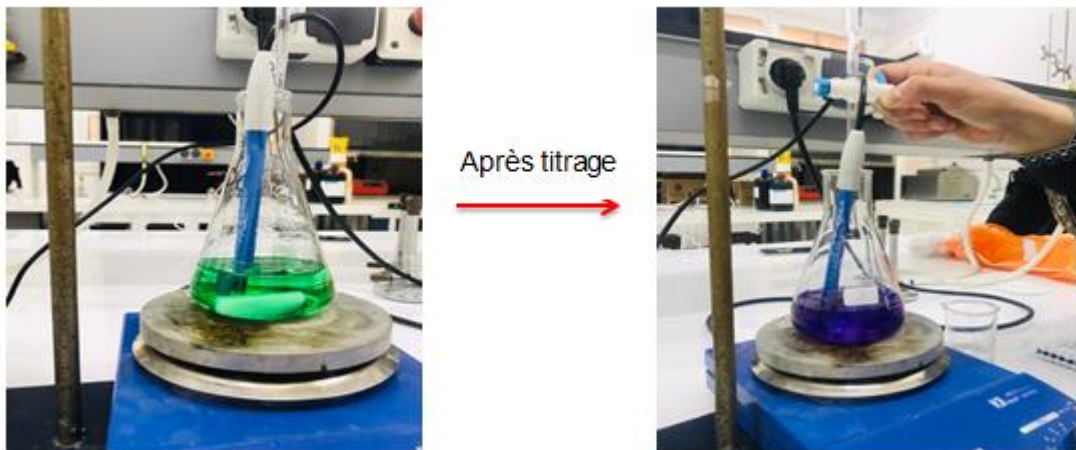


Figure II- 7 : Étape de titrage.

- Calcul

La teneur en azote est obtenue par la formule suivante :

$$N\% = \frac{2,8 \times V \times 100}{1000 \times M}$$

N% : la teneur en azote total.

V : le volume en (ml) de HCl titrant le distillat.

M : la masse d'échantillon en (g).

La teneur en protéines totales (P%) des échantillons est obtenue en utilisant le facteur de conversion 6,25. Elle s'écrit :

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

Méthode de Lowry :

Cette méthode a été utilisée pour confirmer les résultats de la méthode précédente (méthode de Kjeldahl). Elle est effectuée dans le laboratoire physico-chimie au niveau du CNRDPA selon le protocole suivant :

- Principe

La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par Lowry et *al.*, (1951). Il s'agit d'une méthode de mesure de la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le réactif Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du Biuret.

- Manipulation

Une quantité de 1 g de substrat protéique (PDC, RDC résiduel et hydrolysats) est additionnée à 10 mL d'eau distillée, le mélange est vortexé à vitesse élevée et centrifugé à 6000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et dilué proprement (selon le taux de protéine présumé).

Les dilutions préparées sont portées dans le tableau suivant :

Tableau II- 1 : les dilutions préparées pour le dosage dans la méthode de Lowry

Échantillon	Dilution
PDC	50 ; 100
Hydrolysats des milieux de production	50 ; 100 ; 200
Hydrolysats de la méthode pH-stat	50 ; 100 ; 200
Culot 1 (PDC résiduel)	50 ; 100 ; 140
Culot 2 (PDC résiduel)	50 ; 100 ; 140
PDC sans prétraitement	100 ; 200 ; 400

1 mL des surnageants dilués proprement est ajouté à 5 mL de réactif Lowry (dont la composition est citée en bas). Après l'homogénéisation, les tubes ont été mis au repos pendant 10 min. 0,5 mL du réactif Folin-Ciocalteu dilué deux sont extemporanément, additionné au mélange. Après l'agitation, l'ensemble est mis au repos à l'obscurité pendant au moins 30 min (Annexe I-figure15). L'absorbance de cette solution est lue à 660 nm dans le spectrophotomètre UV-visible, en utilisant un blanc d'eau distillée (au lieu des surnageants) traité de la même façon.

Le réactif Lowry est préparé en mélangeant 50 mL Lowry A (1 g Na₂CO₃ + 50 mL NaOH à 0,1 mol/l) avec 1 mL Lowry B (5g CuSO₄, 5H₂O + 10g Tartrate de Na et K, 1 litre d'eau distillée).

Une gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum d'albumine bovine (SAB) étalon mère à 500 µg/mL. Des dilutions de la solution mère sont préparées (entre 100 et 500 µg/mL) pour établir la courbe d'étalonnage voire Annexe I-figure 2. 1 mL de chaque dilution est préparé de la même manière que les échantillons.

- Calcul

L'équation de la courbe d'étalonnage a été utilisée pour déduire la concentration des protéines :

$$C \text{ (mg/ml)} = P \times ABS \times D$$

Avec :

C : Concentration des protéines dans 1 mL de l'échantillon,

P : la pente de la courbe d'étalonnage,

ABS : l'absorbance de l'échantillon dilué,

D : Dilution de l'échantillon

La concentration des protéines en % (ou g protéine/100 g échantillon) est calculée par la formule suivante :

$$C (\%) = C (\text{mg/mL}) \times 10^{-3} \times 100$$

II.2.5.3.2. Dosage des lipides

La détermination de la teneur en matière grasse des échantillons est effectuée par deux méthodes suivantes :

Méthode de Folch :

Cette méthode est réalisée au niveau du laboratoire biochimie marine 2 à l'ENSSMAL, selon le protocole reporté par Ramalhosa et al. (2012), proposé et modifié par notre promoteur :

- Principe

C'est une méthode gravimétrique pour l'extraction des lipides totaux à partir des échantillons lyophilisés, elle basée sur une extraction à froid par un mélange de solvants de différente polarité.

- Manipulation

Cette méthode est appliquée aux mêmes échantillons lyophilisés pour extraire les lipides totaux. 1g de chaque échantillon est additionné à 50 mL de mélange Chloroforme/Méthanol (2:1, v/v). L'ensemble est bien homogénéisé dans un agitateur magnétique pendant 30 minutes (sous hotte chimique). Centrifuger le mélange à 3000 tr/min pendant 10 min et le filtrer. Transvaser le contenu dans une ampoule à décanter. Fermer bien l'ampoule avec son bouchon en verre et l'agiter un moment (environ 30 secondes) puis ouvrir le robinet pour permettre le dégazage des vapeurs de solvant. Refermer l'ampoule et répéter à nouveau les opérations d'agitation et de dégazage jusqu'à vous entendez plus de vapeurs de solvant s'échappant de l'ampoule. Ajouter 5 mL d'eau distillée, laisser le mélange décanté, puis éliminer la phase aqueuse qui se trouve en bas de l'ampoule et récupérer la phase organique (rincer bien l'ampoule avec 10mL de solvant) qui contient de lipides extraits dans erlenmeyer. Ajouter un peu de sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 pour éliminer les traces d'eau puis transférer le contenu de l'erlenmeyer dans un ballon taré. Évaporer le ballon à 45 °C jusqu'à élimination total du solvant et peser le ballon.

- Calcul

Soit P le poids des lipides extrait, le report en pourcentage (g lipides/100 g d'échantillon) est fait selon la formule suivante :

$$\% \text{ lipides} = \frac{P}{m} \times 100$$

Avec :

$$P = P_f - P_i ,$$

P_f : le poids final du ballon (avec de la matière grasse) ;

P_i : le poids initial du ballon vide

m : la masse initiale de l'échantillon

Méthode de Soxhlet

Cette méthode est utilisée dans le but de vérifier le résultat de dosage en matière grasse d'échantillon hydrolysate protéique (technique de pH-Stat) par la première méthode. Elle est réalisée au niveau du laboratoire biochimie marine 2 à L'ENSSMAL, et le protocole utilisé est décrit par Dr. AKROUR-Aissou (2019).

- Principe

La méthode Soxhlet est une méthode d'extraction solide-liquide qui permet d'extraire la matière grasse d'un échantillon solide déshydraté en utilisant un solvant. Elle est aussi une méthode gravimétrique, car l'échantillon est pesé au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

L'extraction par solvant organique et dépend deux facteurs : la nature du solvant et le temps d'extraction ou le nombre de cycles nécessaire. Donc on a utilisé deux solvants :

1. Éther de pétrole pendant 6 heures mais on a fait 3 heures d'extraction, et le jour suivant les autres 3 heures restées sont complétées
2. Éther éthylique pendant 5 heures à la fois.

- Manipulation

Tout d'abord le réfrigèrent est allumé à 2°C, ensuite 2g d'échantillon pesés dans une cartouche de cellulose préalablement tarée, puis placé dans le réservoir Soxhlet (Figure II-8). Un ballon vide est pesé (P_0) et placé sur une plaque chauffante, après 160mL de l'éther de pétrole ou l'éther

éthylrique sont versés dans le réservoir Soxhlet jusqu'à le ballon est rempli. L'appareil est allumé à température de 100°C jusqu'à l'ébullition du solvant, ensuite la température est réduite à 60°C afin que les vapeurs montent dans le tube de retour de distillation et se condensent. L'appareil est atteint après une extraction d'une durée de 6h pour l'éther de pétrole, et 5h par éther éthylique. Le ballon est laissé refroidir puis traiter à l'aide d'un rota-vapeur à 40°C et à une vitesse de rotation de 6 à 7 tr/min pour éliminer le solvant. À la fin le ballon est séché dans l'étuve à 37°C pendant 10 min puis refroidis dans un dessiccateur, et pesé (P) pour quantifier la masse d'extrait total.

Même traitement d'extraction est appliqué pour le blanc.

- Calcul

Le taux de la matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$MG\% = \frac{P - P_0}{M} \times 100$$

P_0 : le poids du ballon vide.

P : le poids du ballon après extraction.

M : la masse de la prise d'essai.

MG% : le taux de la matière grasse en pourcentage.



Figure II- 8 : Appareil de Soxhlet.

II.2.5.3.3. La teneur en cendres

- Principe

La teneur en cendres correspond à la masse du résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération complète de prise d'essais contenant des substances organiques dans un four à moufle à 550°C.

- Manipulation

1 g d'échantillon lyophilisé est mise dans un creuset en porcelaine, préalablement taré. L'échantillon est placé dans le four à moufle à 550 °C pendant 4 heures. Après refroidissement (de quelques heures dans le four à moufle), les échantillons sont placés dans le dessiccateur puis pesés de leurs teneurs en cendre (Annexe I-figure 14).

- Calcul

La teneur en cendres est calculée selon la formule suivante :

$$C\% = \left(\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \right) \times 100$$

Avec :

M_0 : poids du creuset vide

M_1 : poids du creuset avec l'échantillon lyophilisé avant incinération,

M_2 : poids du creuset avec l'échantillon après incinération à 550 °C.

CHAPITRE III : Résultats et discussions

III.1. Sélection de la souche performante en production de protéase

III.1.1. Aspect macroscopique des souches bactériennes utilisées

L'aspect visuel des deux souches S13 et S14 se concorde entre notre observation (Figure III.1) et celle de Hamiche (2020) et montre des colonies sous forme rhizoïde avec une couleur crème-blanche, d'une opacité opaque, d'une surface rugueuse, un contour irrégulier, une élévation semi bombée et bombée respectivement pour la souche S13 et S14, et une consistance crémeuse pour la souche S13 et visqueuse pour la souche S14. La description phénotypique et biochimique complète des deux souches a été décrite par Hamiche (2020) (Annexe II-Tableau 1 et 2).



Figure III- 1 : Aspect visuel des colonies des souches bactériennes cultivée dans le milieu LB, après 48 h d'incubation.

D'après ces résultats, la souche S13 et S14 sont très proche phénotypiquement. L'indentification génotypique par séquençage du gène de l'ARNr 16S de la souche S13 montre son affiliation au *Bacillus amyloliquefaciens* (Hamiche et al. 2019) (Annexe I-figure 1). La souche S14 est en cours d'identification par l'équipe du Professeur Badis A. du laboratoire LCSN-BioM de l'Université de Blida 1 qui détient la propriété intellectuelle de cette souche.

III.1.2. Criblage préliminaire de l'activité protéolytique sur milieu solide

Un criblage enzymatique sur milieu solide GNL (à base de lait) a permis de sélectionner la souche la plus productrice de protéase. A travers ce test, nous avons constaté que la souche S14 présente une activité protéolytique très importante par rapport à la souche S13. Ceci est reflété par un diamètre d'halo plus grand avec la souche S14, qui témoigne de l'hydrolyse de la protéine du lait par la protéase de cette souche (Figure III.2). De ce fait, la souche S14 a été sélectionnée pour la suite du travail pour produire les hydrolysats enzymatiques à base des co-produits de crevettes.

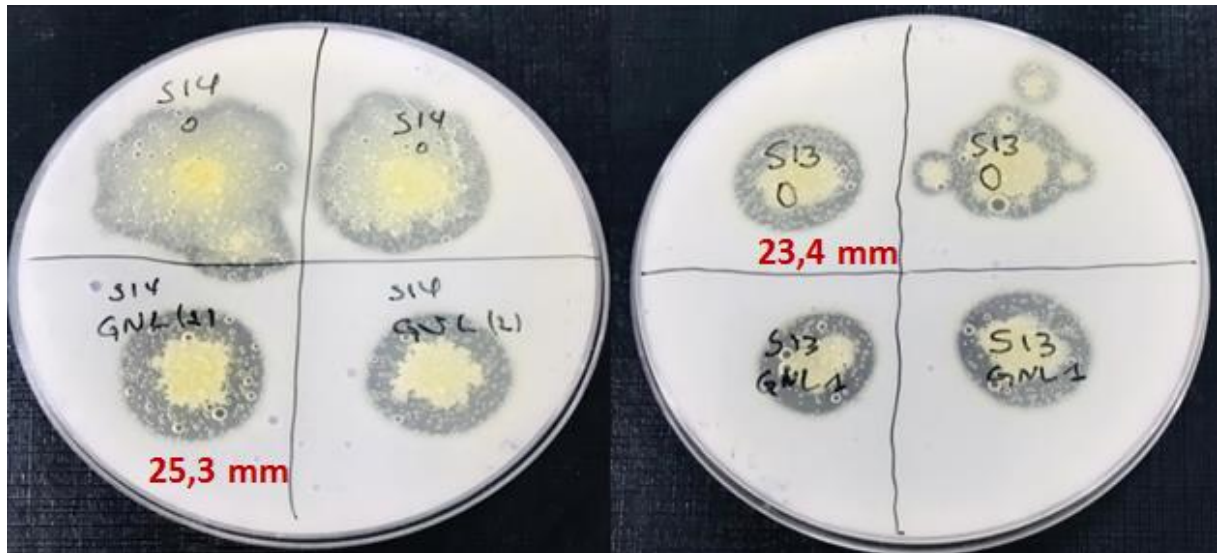


Figure III- 2 : Mise en évidence de la production de la protéase par les deux souches S13 et S14 sur milieu GNL.

III.2. Optimisation de la production de la protéase de la souche performante en présence des co-produits de crevettes

La production d'hydrolysats enzymatiques est basée sur la déprotéinisation des co-produits de crevettes. 2 kg de la crevette blanche ont donné environ 100 g de poudre sèche (Figure III.3). L'utilisation de la poudre est plus avantageuse à la bactérie productrice de la protéase par rapport aux co-produits en raison d'une surface spécifique plus grande qui améliore la disponibilité du substrat à la bactérie.



Figure III- 3 : Farine des co-produits de crevette obtenue.

III.2.1. Effet de l'ajout des co-produits de crevettes seuls

Nous avons suivi la cinétique de production de la protéase de la souche S14 dans un milieu à base des co-produits de crevettes seuls (M1) et ce, en comparaison avec le même milieu sans inoculum Mt (Figure III.4).

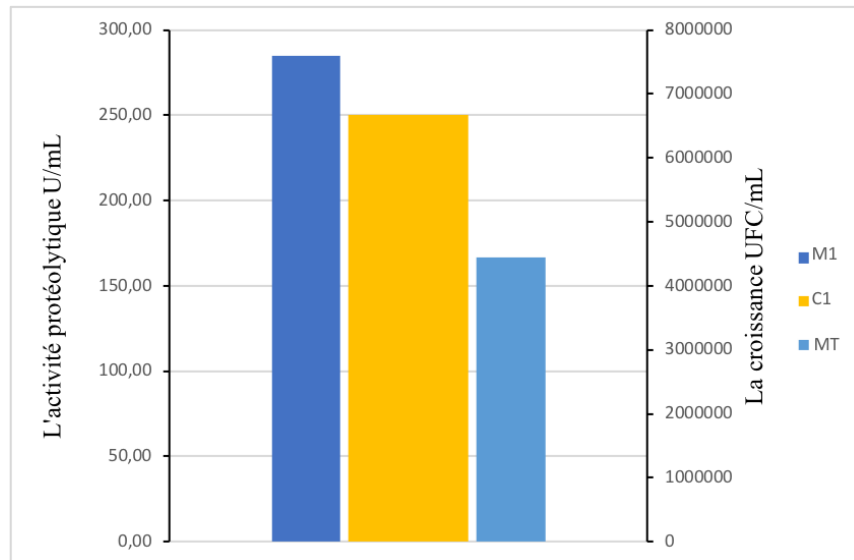


Figure III- 4 : Activité protéolytique dans les milieux à base de PDC seul et croissance de la souche S14.

Les résultats montrent que l'activité protéolytique est plus stimulée en présence de la souche S14 qu'en son absence (Protéase Mt = 166,9091 U/mL). Cette bactérie protéolytique a la capacité d'hydrolyser les protéines des co-produits des crevettes par rapport aux autres bactéries non protéolytiques ; la protéase sécrétée dans le milieu augmente en fonction du temps (A = 37,636 U/mL au premier jour, A = 154,409 U/mL au deuxième jour, A = 234 U/mL au troisième jour) pour atteindre une valeur maximale de 284,727 U/mL au quatrième jour en dépit de la complexité de ce substrat.

Les co-produits de crevette constituent donc un substrat complexe favorable pour la croissance et la production de protéase par la souche S14. Par conséquent, cette souche est capable d'obtenir leurs besoins en source de carbone et d'azote directement à partir de la PDC (Annexe I-figure 6). L'activité protéolytique de cette bactérie est associée à une bonne croissance de la souche S14. Le dénombrement de la flore bactérienne dans le milieu M1 a donné un nombre de $6,67 \times 10^6$ UFC/mL ce qui montre une bonne croissance de cette bactérie (Figure III.4).

Comparativement aux résultats rapportés par Jabeur (2018), utilisant la souche *Anoxybacillus kamchatkensis* pour dégrader la farine des co-produits de la crevette *Metapenaeus monoceros* comme seule source d'azote, de carbone et de sels minéraux, la concentration de l'activité protéolytique est de 2000 U/mL achevée à une concentration optimale de PDC de 25 g/L. L'effet des concentrations croissantes en farine de co-produits de crevettes sur la croissance et la production de protéases par cette souche (une gamme de concentration de PDC entre 10 à 40 g/L) a montré que l'activité protéolytique augmente avec la concentration en farine de co-produit jusqu'à une concentration de 25 g/L.

Jellouli et *al.* (2008) a étudié l'effet des concentrations de poudre des co-produits de crevettes sur la production de la protéase par la souche *P. aeruginosa* MN7. Des cultures ont été effectuées des milieux contenant différentes concentrations de PDC. Les résultats ont montré que la production de protéase augmente avec l'augmentation de la PDC et atteint une valeur maximale à 60 g/l (de l'ordre de 15000 U/mL). Au-delà de 60 g/l, l'activité protéolytique diminue. Les résultats obtenus indiquent que la PDC est un excellent substrat pour la croissance de *P. aeruginosa* MN7 et la production de protéase.

III.2.2. Effet de l'ajout du sucre inducteur sur la production de protéases

Avec l'addition d'un sucre facilement assimilable pour la sécrétion de la protéase, nous avons étudié l'effet de l'ajout du glucose sur l'activité protéolytique de la souche S14. Plusieurs dosages d'activité protéolytique ont ainsi été réalisés pendant plusieurs jours. Les résultats de la protéase dans le quatrième jour et le dénombrement dans le dernier jour (5ème jour) sont présentés dans la figure III.5

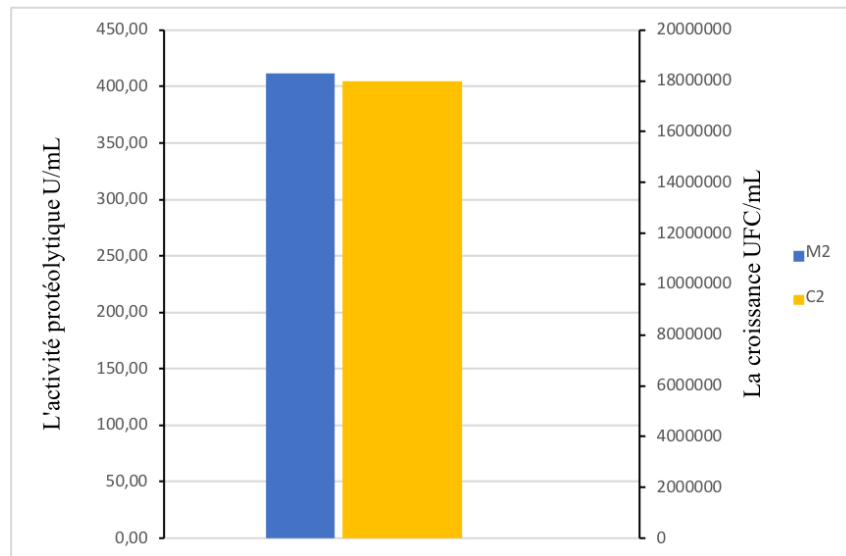


Figure III- 5 : Activité protéolytique dans un milieu à base de la PDC et du glucose et croissance de la souche S14.

On constate que l'activité protéolytique dans le milieu M2 atteint un niveau plus élevé que celui dans le milieu M1 sans glucose ($A = 411,818$ U/mL). La protéase sécrétée dans le milieu augmente en fonction du temps ($A = 226,909$ U/mL au jour 1, $A = 252$ U/mL au jour 2 et $A = 291,818$ U/mL au jour 3). Le glucose a donc amélioré la production de la protéase ainsi que la croissance bactérienne. Ceci est confirmé par le résultat du dénombrement de la flore bactérienne dans le milieu M2 qui a donné un nombre de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL et qui montre une bonne croissance de cette bactérie (Figure III.5).

Dans le travail de Jabeur (2018), l'ajout de saccharose et de glucose ont amélioré la production de l'activité protéolytique ainsi que la croissance bactérienne et ont donné des activités de l'ordre

de 5000 et 5300 U/mL, respectivement (en l'absence du sucre l'activité protéolytique été de l'ordre de 1200 U/mL).

Une autre expérience a été faite avec le sucre roux (source de saccharose et d'éléments nutritifs). Les résultats de cette expérience ont donné des niveaux de protéase de 191,455 U/mL au 1^{er} jour, 214,363U/mL au 2^{em} jour, 416,727 U/mL au 3^{em} jour et 438,545 U/mL au 5^{em} jour.

III.2.3. Effet de l'ajout des sels minéraux

Dans notre travail, nous avons étudié l'effet de l'ajout des sels minéraux sur la production de protéase de la souche S14 et sa croissance. Plusieurs dosages d'activité protéolytique ont été réalisés pendant plusieurs jours. Les résultats obtenus au quatrième jour et le dénombrement dans le dernier jour (jour 5) sont présentés dans la figure III.6.

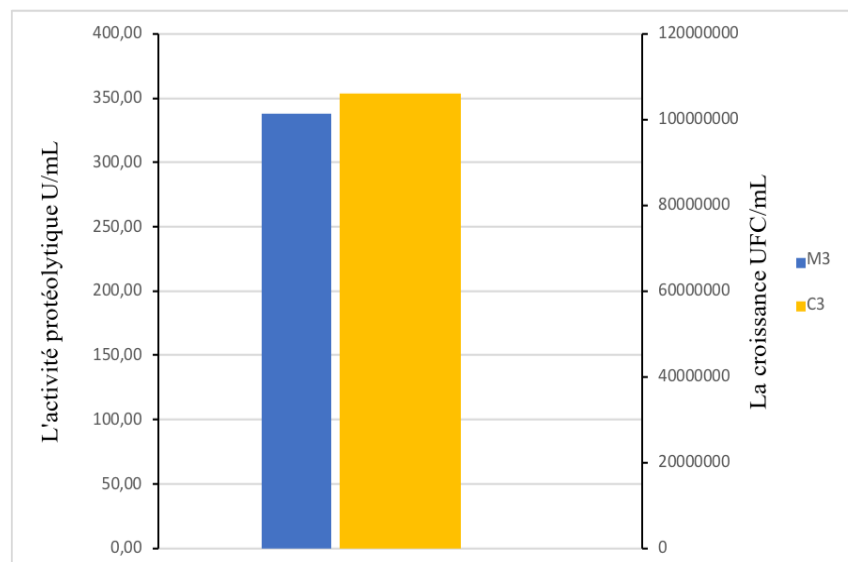


Figure III- 6 : Activité protéolytique dans le milieu M3 avec la présence des sels minéraux et croissance de la souche S14.

D'après les résultats de la figure III.6, l'ajout des sels minéraux a donné une activité protéolytique de l'ordre 337,64 U/mL (moins que celle dans le milieu M2 et plus que celle dans le milieu M1). La protéase sécrétée dans le milieu M3 augmente en fonction du temps (A = 232,09 U/mL au premier jour, A= 248,181 U/mL au deuxième jour et A = 315,818 U/mL au troisième jour). Le dénombrement de la microflore bactérienne, a donné un nombre de $1,06 \times 10^8$ UFC/mL. La souche S14 se développe donc bien dans ce milieu plus que les milieux M1 et M2.

Par conséquent, l'ajout de suppléments (sucre ou sels minéraux) aux co-produits de crevette améliore la croissance bactérienne et l'activité protéolytique. Il parue que la croissance est bien stimulée par l'addition des sels minéraux (essentiellement des sels de phosphates et

d'oligoéléments) tandis que l'induction de l'enzyme est plus stimulée par les sucres. Toutefois, l'étude des paramètres influençant la croissance bactérienne et la sécrétion de l'enzyme, que nous avons fait reste limitée et ne nous donnera que des indications sur ce sujet. Une optimisation plus complète utilisant des plans d'expérience, qui définissent en première étape les paramètres les plus influençant (plan de criblage des paramètres) suivie par une étape d'optimisation des concentrations des paramètres choisis (plan d'optimisation) s'avère important afin d'améliorer l'efficacité du procédé.

III.3. Hydrolyse enzymatique des co-produits de crevette

III.3.1. Hydrolyse indirecte à partir des milieux de production

Les co-produits de crevettes peuvent être utilisés comme substrats de bon marché aux bactéries pour la production des hydrolysats protéiques, des lipides, de la chitine, et des minéraux. Ils constituent une source de carbone, de nutriments et induisent la synthèse des enzymes – des protéases entre autres (Cahyaningtyas et al. 2021). A la fin des expériences, les surnageants issus des milieux M1, M2, M3, H2 et H3 ont été récupérés et lyophilisés (Figure III.7). La production d'hydrolysats dans ces milieux a été évaluée en termes de concentrations, et les résultats sont portés dans la figure III.8.

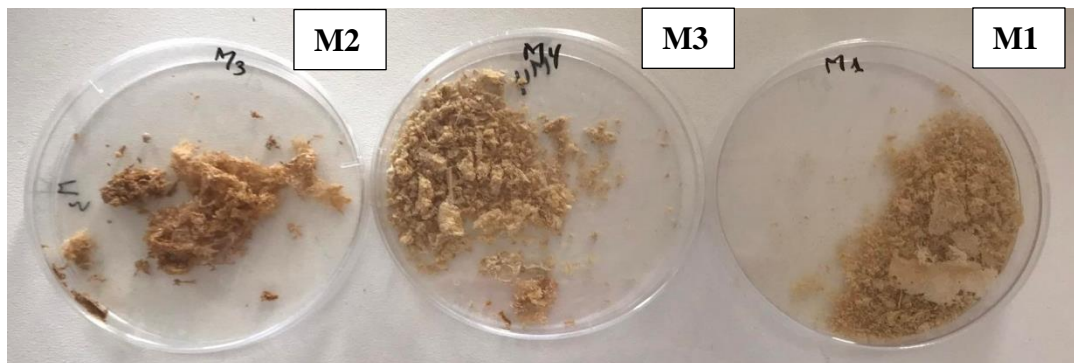


Figure III- 7 : Hydrolysats protéiques issus de la culture de la souche S14 dans les milieux M1, M2 et M3 à base des co-produits de crevettes

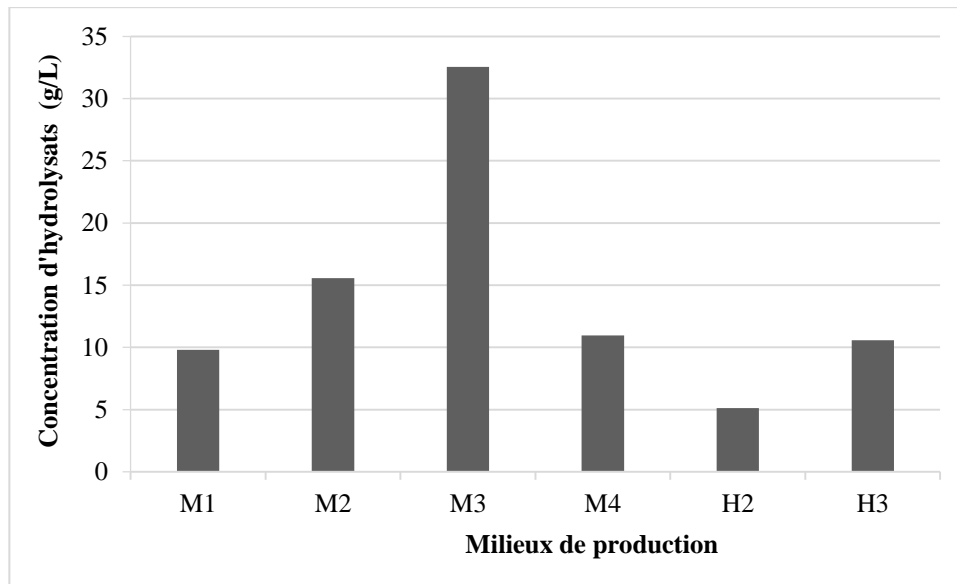


Figure III- 8 : Concentrations d’hydrolysats protéiques obtenus à partir de la culture de la souche S14 dans les différents milieux à base des co-produits de crevettes.

Nous remarquons que la composition des milieux de production affecte directement la concentration d’hydrolysats obtenus. Le milieu M3 (à base des sels minéraux) donne un maximum d’hydrolysats protéique (33 g/L), suivi par le milieu M2 (à base de glucose). Le milieu M4 à base sucre roux donne un faible rendement par rapport au milieu à base du glucose. L’ajout d’un co-substrat protéique (la caséine) n’a pas stimulé au tant la production d’hydrolysats (cas des milieux H2 et H3). Ainsi, la souche S14 semble pouvoir utiliser les co-produits de crevettes seuls pour la synthèse des protéines plus solubles et l’induction de la protéase.

Nous avons tenté d’estimer les rendements d’hydrolyse de la matière en comparant les quantités initiales de la PDC introduites dans les milieux H2 et H3 et résiduelles, récupérées à la fin des expériences. Les résultats donnent un rendement de 50% pour H2 et 56% pour H3.

III.3.2 Hydrolyse direct moyennant la méthode pH-stat

III.3.2.1. Production de la protéase de la souche S14 dans des milieux favorables

Avant de procéder à l’hydrolyse des co-produits de crevettes moyennant la méthode pH-Stat, nous avons suivi la cinétique de l’activité protéolytique de la souche S14 dans des milieux favorables contenant des substrats protéiques assimilables par les bactéries protéolytiques. Le milieu qui donnera un maximum de protéase sera sélectionné pour digérer la poudre des co-produits de crevette.

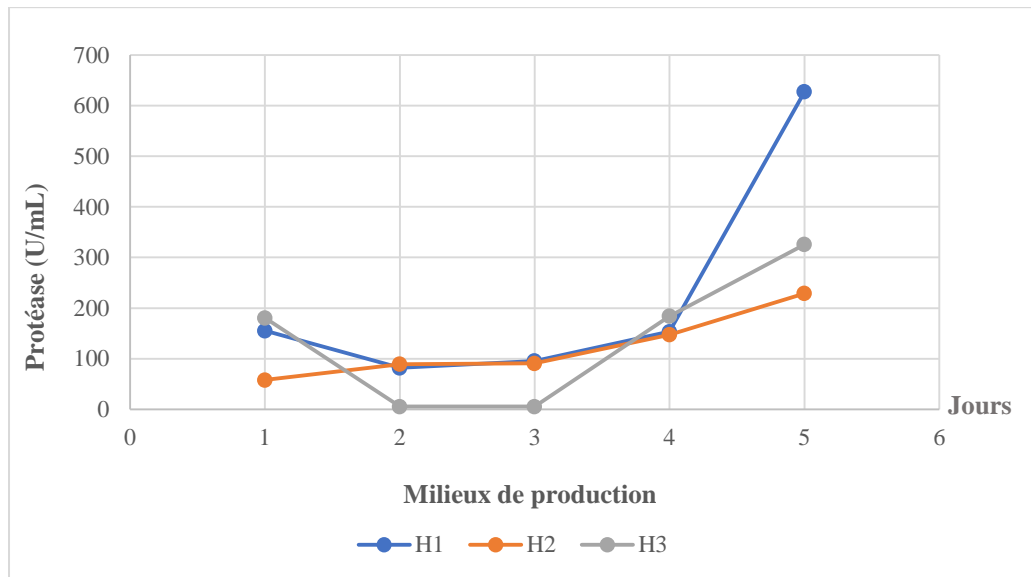


Figure III- 9 : Cinétique de l'activité de la protéase sécrétée par la souche S14 dans les différents milieux de production.

D'après les résultats de la figure III.9, nous constatons que la sécrétion de la protéase dans les trois milieux est faible dans les quatre premiers jours. Au-delà, nous remarquons une meilleure activité dans le milieu H1 ($A = 627,272$ U/mL) par rapport aux autres milieux. Il semblerait que la caséine seule (sans PDC) est plus stimulante de l'activité protéolytique par rapport à sa combinaison avec les co-produits de crevette (Annexe I-figure 5). Lorsque l'activité protéolytique est au maximum (5ème jour), nous procéderons l'hydrolyse moyennant la méthode de pH-Stat.

Dans une étude similaire, Roudj (2011) a trouvé une bonne activité protéolytique (dosée par la méthode de zymogramme) en présence des souches bactériennes de genre *Lactobacillus* inoculées dans des milieux de culture à base de caséine et de lait écrémé.

III.3.2.2. Degré de la première hydrolyse

L'hydrolyse des protéines a été effectuée à partir de surnageant du milieu qui a donné le maximum de protéase (milieu H1). L'expérience a été répétée sept fois ; la reproductibilité des résultats reste acceptable (un coefficient de variation de 16%). Après deux heures d'hydrolyse, nous avons obtenu un $DH (\%) = 0,94 \pm 0,16$. Ce taux est faible et montre qu'une fraction mineure des protéines a été découpée en acides aminés. Cela pourrait être expliqué par plusieurs raisons : le rapport substrat/enzyme n'est pas été optimisé, il se pourrait que la quantité de substrat (PDC) soit plus grand par rapport à la quantité de l'enzyme introduite. De plus, dans cette expérimentation nous avons utilisé le surnageant qui représente l'enzyme brut non purifié. Généralement, ce type d'expériences est faite par une protéase sous forme solide après plusieurs

étapes de purification. Aussi, nous avons réalisé l'expérience dans des conditions de température et de pH de l'enzyme que nous avons assumée (et ne pas tester) d'après des études faites sur des enzymes similaires à la nôtre (Protéase de la souche S13).

III.3.2.3. Hydrolyse successive

Dans le but d'obtenir des quantités plus importantes d'hydrolysats protéiques, nous avons traité le culot résiduel de la PDC de la première hydrolyse avec un surnageant frais issu du milieu H1. L'expérience a été répétée quatre fois. Le degré d'hydrolyse obtenu est de $0,15 \pm 0,06$ %. Ce taux est plus faible par rapport aux résultats de la première hydrolyse et montre que la fraction majoritaire des protéines a été solubilisée durant la première hydrolyse.

III.3.2.4. Hydrolyse combinée

Nous avons aussi essayé de combiner les deux techniques (hydrolyse indirecte et pH-Stat) dans le but toujours d'obtenir des rendements plus élevés d'hydrolysats protéiques. Pour cela, nous avons utilisé deux hydrolysats M2 et M3 comme enzymes brutes à introduire dans le mélange réactionnel de la méthode pH-Stat. Les résultats sont présentés dans le tableau III-1.

Tableau III- 1 : Degré d'hydrolyse obtenu à partir des surnageants H2 et H3.

DH-M2 (%)	0,95
DH-M3 (%)	0,78

Le tableau montre un degré d'hydrolyse similaire à celui obtenu par la première hydrolyse. Cela vaut dire que l'incorporation d'hydrolysats du milieu de fermentation n'améliore pas davantage la coupure des protéines en acides aminés qui se trouvent liés avec la structure complexe des exosquelettes de la PDC.

III.3.2.5. Concentrations d'hydrolysats protéiques obtenus par la méthode pH-Stat

En termes de rendements obtenus par cette méthode, nous avons obtenu des concentrations plus élevées d'hydrolysats par rapport à la méthode indirecte (Tableau III-2). Cela montre que la méthode pH-Stat est plus efficace dans le traitement des co-produits de crevettes afin d'obtenir des quantités importantes en hydrolysats protéiques. L'aspect d'hydrolysat obtenue de cette méthode est présenté dans la figure III-10.

Tableau III- 2 : Concentrations en hydrolysats protéiques obtenues à partir de la méthode pH-Stat.

Type d'hydrolyse	Hydrolyse première + successive	Hydrolyse combiné	
		H2	H3
Concentration d'hydrolysat (g/l)	41,85 ± 17,83	62,72	35,33

**Figure III- 10** : Hydrolysats obtenues moyennant la méthode pH-stat.

III.4. Caractérisation biochimique des co-produits de la crevette blanche et des hydrolysats protéiques

III.4.1. Composition biochimique des co-produits de la crevette blanche

Les co-produits de la crevette constituent par la poudre de co-produits des crevettes (la crevette blanche) qui a subi un prétraitement, a été analysée de sa valeur nutritionnelle comme l'indique le tableau suivant :

Tableau III- 3 : Composition biochimique des co-produits de la crevette blanche (*Parapenaeus longirostris*).

Composition biochimique	Méthode d'analyse	PDC
Protéines (%)	Kjeldahl	5,25
	Lowry	2,84
Lipides (%)	Folch	16,56
Matières minérales (%)	Pertes au feu	26,45

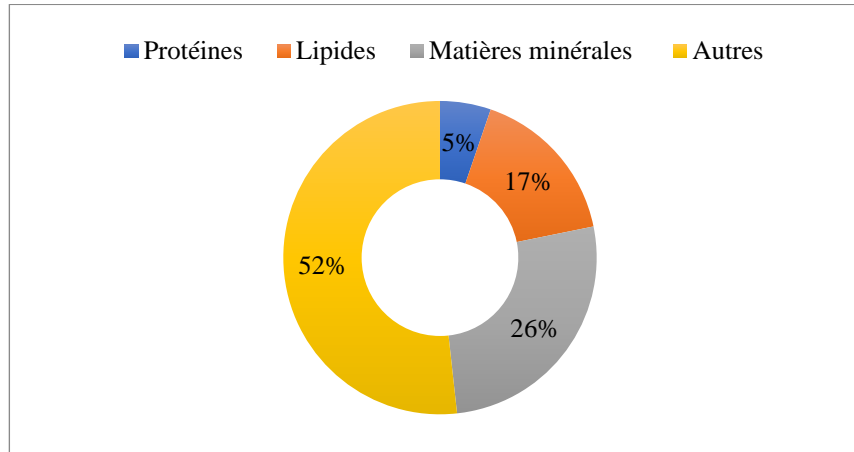


Figure III- 11 : Distribution biochimique des fractions dans les co-produits de la crevette blanche (*Parapenaeus longirostris*) (en %) par rapport au poids sec.

III.4.1.1. La teneur en protéines

La lecture du tableau III-3 laisse observer que la teneur en protéine des co-produits de crevette *Parapenaeus longirostris* est très faible en employant les deux méthodes d'analyse. Cette teneur est inférieure à celle mentionnée dans l'étude de Hmissi et Sadok (2015) (13,4%) pour la même espèce. Comparativement à d'autres espèces, Oulhiz (2018) a trouvé un taux de protéine (méthode Kjeldahl) de 31% pour les co-produits de la crevette rouge (*Aristeus antennatus*). Jabeur (2018) a reporté un taux de protéine de 12,29 % dans les co-produits de la crevette mouchetée (*Metapenaeus monoceros*). Cette faible teneur en protéines pourrait être expliquée par la mauvaise période de la récolte, du stade de maturité de l'échantillon prélevé (chevrettes dont les protéines des exosquelettes se dénaturent plus facilement à celles dans les individus adultes) (Garcia, 1988) ou pourrait être due aux faibles taux de protéines de l'espèce de crevette récoltée de cette région.

Nous avons soupçonné de l'influence du prétraitement dont les échantillons ont subi (traitement à l'eau bouillante pendant 20 min), bien qu'il soit largement rapporté dans la littérature (Djellouli et al., 2008 ; Mechri et al., 2019 ; Hamdi et al., 2017). Les résultats n'ont montré pas de déviation par rapport à l'échantillon PDC (un taux de protéine de 3 % en employant la méthode Lowry).

III.4.1.2. La teneur en matière grasse

Nous remarquons que les co-produits de la crevette (*P. longirostris*) sont riches en composés lipidiques (16,56 %) par rapport au taux de lipides rapporté par Hmissi et Sadok (2015) pour la

même espèce (5,7%). Comparativement à d'autres espèces, une proportion de lipides de 25,2% a été trouvée dans les co-produits de la crevette nordique (*Pandalus borealis*) (Simpson et Haard, 1985).

III.4.1.3. La teneur en matières minérales

En ce qui concerne la teneur en matière minérale, la valeur obtenue est de 26,45% en poids sec. Cette valeur est très proche à celle obtenue par Hmissi et Sadok (2015) (26%) pour la même espèce. Ainsi, une teneur en cendre de 28,08% a été rapportée dans les co-produits de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (Oulhiz, 2018). Les teneurs élevés de minéraux trouvés dans les espèces de crevettes ainsi que d'autres crustacés est dû à la présence de carbonate de calcium (CaCO₃) ; un élément majeur des carapaces de crevette, permettant la calcification de leur exosquelettes (Oulhiz, 2018).

III.4.2. Composition biochimique des hydrolysats

La caractérisation biochimique des hydrolysats permet d'étudier l'influence des deux techniques d'hydrolyse, en utilisant la protéase de la souche S14, sur la composition biochimique de chaque fraction (protéine, lipides et cendres).

Tableau III- 4 : Composition biochimique globale des hydrolysats résultants des deux méthodes.

Composition biochimique	Méthode D'analyse	Hydrolysats de la méthode indirecte (HMI)	Hydrolysats de la méthode pH-Stat (HMPS)	
Protéines (%)	Kjeldahl	6,5	4,6	
	Lowry	8,1	7,1	
Lipide (%)	Folch	11,5	93,86	
	Soxhlet	/	Extraction par l'éther de pétrole	19,22
			Extraction par l'éther éthylique	23,7
Matières minérales (%)	Pertes au feu	46,54	4,19	

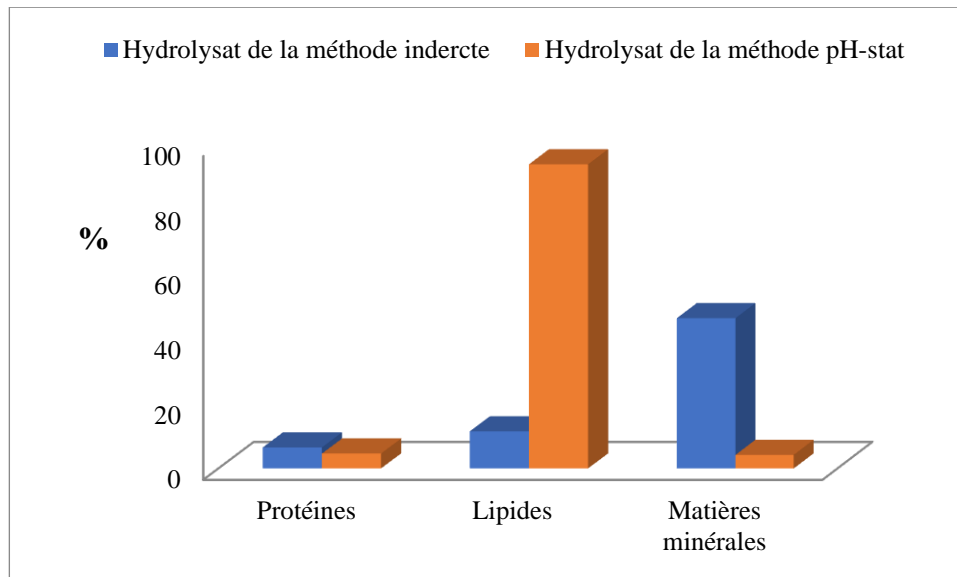


Figure III- 12 : Distribution des protéines, lipides et matières minérales dans les deux hydrolysats.

III.4.2.1. La teneur en protéines

Au regard des résultats du tableau III-4, les deux hydrolysats contiennent une faible teneur en protéines, bien que l'hydrolysat de la méthode indirecte (6,5%) soit plus élevé par rapport à l'hydrolysat de la méthode pH-Stat (4,6%).

Cette faible teneur en protéines dans les hydrolysats pourrait être expliquée par la pauvreté de la PDC en protéine (5,25%). De plus, les faibles teneurs en protéines trouvées sont en concordance avec le degré d'hydrolyse obtenu (de l'ordre de 1 %). La faible disponibilité des protéines (associée au faible taux de protéines de la PDC) est le facteur déterminant de cette déficience en protéines des hydrolysats. Ainsi, d'autres paramètres comme le ratio PDC/Protéase, la purification de la protéase de la souche S14 avant sa mise en mélange et la température et le pH optimaux du procédé pH-Stat, l'agitation et la composition du milieu dans la méthode indirecte ont une influence directe sur la solubilisation des protéines. Le processus d'hydrolyse des protéines est complexe du fait de l'inaccessibilité de certaines liaisons à cause du linkage des protéines avec d'autres substances telles que la chitine, l'astxanthine ou les lipides (RANDRIAMAHATODY, 2010).

Les teneurs de protéines trouvées ici demeurent faibles par rapport à celles obtenues avec les co-produits de la crevette mouchetée *Metapenaeus monoceros* hydrolysés par des protéases microbiennes (35,7%) (Jabeur, 2018). En outre, Djellouli (2018) a trouvé un taux de protéine de 24,85% avec l'hydrolyse des carapaces de la crevette blanche du pacifique (*Penaeus vannamei*) par l'extrait enzymatique de la souche *E. faecalis DM19* en utilisant la méthode pH-Stat. Dans

une autre étude, des teneurs en protéines élevées ont été obtenues par une hydrolyse avec des enzymes commercialisées (Pepsine, Savinase, Delvolase, Novozym 37020) en utilisant la méthode pH-Stat. Ces teneurs varient entre 48,1 % à 64,7 % pour les têtes de la crevette *Penaeus monodon* (Randriamahatody, 2011). Des teneurs plus élevées (57,75 à 67,9 %) pour les co-produits de crevette rouge *Aristeus antennatus* ont été rapportées par Oulhiz (2018).

III.4.2.2. La teneur en matière grasse

En ce qui concerne les lipides, les deux hydrolysats sont riches en lipides mais la méthode pH-Stat a donné un taux très élevé (93,83 %) par rapport à la méthode indirecte (11,5 %). Ces teneurs sont supérieures à celles rapportées dans la littérature. En effet, des teneurs entre 0,96 % à 1,52 % pour les hydrolysats des co-produits de la crevette rouge et 8,98% à 20,12 % pour les hydrolysats des co-produits de thon ont été rapportées par Oulhiz (2018). Une valeur très faible (1,2 %) pour les hydrolysats des co-produits de la crevette mouchetée ont été signalés dans l'étude menée par Jabeur (2018). Quant à Randriamahatody (2011), 5% à 12% de lipides ont rapportés.

L'hydrolyse enzymatique ne mène pas toujours à une solubilisation dominante des protéines. En effet, Kechaou et *al.*, (2009) ont rapporté que la protéolyse entraîne plutôt, une solubilisation des lipides, due à la rupture des tissus. Des hydrolyses menées sur des têtes et viscères de la sardine ont ainsi permis la solubilisation d'au moins 60% des lipides (Dumay, 2006). Ainsi que, avant extraire et doser les lipides, il faut une dépigmentation car l'asthaxantine est soluble dans les mêmes solvants .

La Figure III-13 montre l'aspect gras des hydrolysats de la méthode pH-Stat.



Figure III- 13 : La quantité des lipides extraite à partir des hydrolysats de la méthode pH-Stat moyennant le protocole de Folch.

III.4.2.3. La teneur en matières minérales

D'après les résultats obtenus, la méthode indirecte a donné des hydrolysats riches en cendre ; environ dix fois plus que ceux de la méthode pH-Stat. La valeur de cette dernière (4,6%) est inférieure à celle rapportée par Jung et Kim (2007) lors de l'hydrolyse de la crevette *P. monodon* en condition acide (41,1%). L'hydrolyse de la crevette *A. antennatus* en condition acide a donné un taux de cendres de 45,1 % selon OULHIZ (2018). La faible teneur des matières minérales obtenues dans notre cas par la méthode pH-Stat pourrait être expliquée par les conditions alcalines qui règnent l'expérience (l'ajout du NaOH pendant la protéolyse afin de maintenir un pH constant), alors que l'acidité favorise (pour des protéases fonctionnant à pH optimale acide) la solubilisation des sels de calcium impliqués dans la structure des exosquelettes de crevette (Jung et Kim, 2007 ; Thiansilakul et al., 2007 ; Nguyen, 2009).

Conclusion et perspectives

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des co-produits de la pêche et particulièrement les co-produits de crevette par mise en œuvre d'un procédé innovant d'extraction et de récupération de fractions peptidiques, destinés à la nutrition des poissons et des crustacés d'élevage. Ainsi, l'utilisation des méthodes non agressives alliant une consommation énergétique modérée et un coût acceptable est fortement recherchée. Ce procédé est basé sur l'utilisation des protéases microbiennes (produites par des souches bactériennes isolées localement dans notre cas) qui actionnent l'hydrolyse des protéines des exosquelettes en peptides et acides aminés de petites tailles, directement dans les milieux de fermentation ou via un dispositif fonctionnant à pH et température optimaux de l'enzyme (comme celui du pH-Stat).

Dans un premier temps, nous avons fait un criblage de l'activité protéolytique de deux souches bactériennes (*Bacillus amyloliquefaciens* S13 et la bactérie non identifiée S14) sur milieu gélosé à base de lait. Les résultats obtenus montre que la souche S14 est plus performante dans la production des protéases (un diamètre d'halo de 25,3 mm).

Nous avons utilisé cette souche et sa protéase pour hydrolyser les protéines des co-produits de la crevette blanche (*Parapenaeus longirostris*) avec les deux procédés enzymatiques. Dans la première méthode indirecte, plusieurs milieux de production à base des co-produits de crevette (PDC), avec ou sans l'addition de suppléments (glucose ou sels minéraux), ont été testés en présence de la biomasse de souche S14. L'activité protéolytique et la croissance de la bactérie sont analysées et les résultats obtenus montrent que l'addition des sucres au milieu fermentatif donne une meilleure production de protéase (plus de 411,818 U/mL). L'addition des sels minéraux conduit un rendement de production d'hydrolysats deux fois plus supérieur et une croissance bactérienne presque dix fois plus élevée par rapport au milieu contenant le glucose (33 g/L d'hydrolysats produits et une croissance de $1,8 \times 10^7$ UFC/mL). Il convient de noter que la souche S14 peut même utilisée la PDC comme seule source de nutriments (A = 285 U/mL, N = $6,67 \times 10^6$ UFC/mL et 10 g/L d'hydrolysats produits).

Dans le deuxième procédé pH-Stat et avant la mise en mélange de l'extrait protéolytique, nous avons suivi la cinétique de production de la protéase dans des milieux favorables contenant la caséine avec ou sans PDC. Un milieu, nommé H1, composé de substrats caséiniques et de sel de phosphate a donné un maximum de protéase (A = 627 U/mL). L'hydrolyse enzymatique de la PDC en utilisant le surnageant de ce milieu a abouti à un faible degré d'hydrolyse (DH = 0,94 %). Une hydrolyse successive du culot résiduel de la PDC a faiblement augmenté le degré d'hydrolyse (DH = 0,15 %), indiquant que la déprotéinisation du substrat a été quasiment achevée durant le premier stade d'hydrolyse. Ainsi, une hydrolyse combinée (utilisant des surnageants hydrolysés) a conduit à un résultat similaire de la première hydrolyse (DH : 0,78 –

0,95%). En terme de rendements, la méthode pH-Stat s'avère plus efficace dans la production d'hydrolysats (35 à 63 g/L).

La caractérisation biochimique a révélé un faible taux de protéine de la PDC de cette espèce (*Parapenaeus longirostris*) (2,84 à 5,25 g/100 g selon le protocole d'analyse employé). Ceci a été répercuté sur la teneur en protéine des hydrolysats produits, qui a enregistré de faibles valeurs (4,6 à 8,1 g/100 g selon le protocole d'analyse et le procédé d'hydrolyse employés). Les autres fractions ont affichés des teneurs très variables : le taux de lipide et des matières minérales sont respectivement 11,5% et 46,5% pour les hydrolysats des milieux et 93,9% et 4,2% pour les hydrolysats de la méthode pH-Stat.

Comme perspectives au profit de cette thématique, il serait intéressant de :

- Rechercher d'autres co-produits de la pêche ou de l'aquaculture qui sont disponibles dans le marché et qui recèlent un taux de protéine plus élevé.
- Établir l'optimisation de la production de protéase de cette souche en utilisant les plans d'expérience afin de sélectionner les paramètres et les concentrations qui influencent l'hydrolyse des co-produits de crevette.
- Purifier la protéase de cette souche bactérienne et optimiser les facteurs influençant le procédé pH-Stat (rapport substrat/enzyme, temps d'hydrolyse, température et pH de l'enzyme).
- Isoler et identifier d'autres bactéries protéolytiques à partir des niches locales.
- Incorporer les hydrolysats protéiques dans l'alimentation des juvénile de poisson par plusieurs formulation.

Références bibliographiques

- **ALLAL, F., MACHRI, S., KHELIFA, B., BOUANANE, A., HACENE, H. (2021).** Preliminary screening and characterization of novel proteolytic enzymes produced by extremophilic bacteria isolated from Tunisian and Algerian biotopes. [en ligne],. [Consulté le : 27/6/2022]. Disponible sur le web : <https://www.researchgate.net/publication/353044386>.
- **BOUKHTACHE, H. (2018).** Isolement et caractérisation des bactéries productrices de protéases à intérêt biotechnologique. Université de Sidi Bel Abbés. [en ligne],. [Consulté le : 27/6/2022]. Disponible sur le web : <http://rdoc.univ-sba.dz/handle/123456789/1997>.
- **BOUGHADDA, H. (2012).** Screening de quelques souches isolées du sol à activité protéolytique. Université de Jijel. [en ligne],. [Consulté le : 27/6/2022]. Disponible sur le web : <http://dspace.univ-jijel.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5717/M.MB.%2004-12.pdf?sequence=2>.
- **BENALLA, M. (2021).** Contribution à l'étude du polymorphisme et du régime alimentaire de la crevette rose *Parapenaeus longirostris* (Lucas 1846), de la côte Ouest Algérienne : Cas de Baie de Béni Saf. [en ligne] 80-104. [Consulté le : 17/4/2022]. Disponible sur le web : <http://rdoc.univ-sba.dz/handle/123456789/3279>.
- **Cahyaningtyas, H.A.A., Suyotha, W., Cheirsilp, B., Yano, S. (2021).** Statistical optimization of halophilic chitosanase and protease production by *Bacillus cereus* HMRSC30 isolated from Terasi simultaneous with chitin extraction from shrimp shell waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 31, 101918. [en ligne],. [Consulté le : 7/8/2022]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818121000141>.
- **Colla G., Roupheal Y., Canaguier R., Svecova E., Cardarelli M. (2014).** Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis, *Front. Plant.* [en ligne],. [Consulté le : 7/8/2022],. Disponible sur le web : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00448/full>.
- **DJELLOULI, M. (2018).** Production et caractérisation de peptides bioactifs issus de l'hydrolyse des protéines alimentaires par les protéases des bactéries lactiques : cas de protéines de coproduits marins 193. [en ligne], Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. [Consulté le : 13/4/2022]. Disponible sur le web : <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/13260>.
- **Dey, S.S., Dora, K.C. (2014).** Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal of food science and technology.* [en ligne] 51, 16-24. [Consulté le : 17/8/2022]. Disponible sur le web : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24426043/>.

- **FAO MEDSUDMED. (2013).** Stock status and potential yield of deep water *rose shrimp*. (*Parapenaeus longirostris*, Lucas 1846) in the south-central Mediterranean. [en ligne], [Consulté le : 17/4/2022]. Disponible sur le web : https://www.um.edu.mt/library/oar/bitstream/123456789/26243/1/FAO%20MedSudMed_TD2_8.pdf.
- **GBOGOUR, G. (2005).** Co-valorisation des protéines et des lipides riches en lécithine et en acides gras polyinsaturés oméga 3 à partir de têtes de saumon (*Salmo salar*) par hydrolyse enzymatique. [en ligne], [Consulté le : 6/5/2022]. Disponible sur le web : http://docnum.univ-lorraine.fr/public/INPL/2005_GBOGOURI_G_A.pdf.
- **GRINE, Z., AOUAD, H. (2020).** Extraction lipidique par méthodes chimiques et enzymatiques à partir des coproduits du thon rouge *Thunnus thynnus* (Linné, 1758). Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. [en ligne], [Consulté le : 14/5/2022]. Disponible sur le web : http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/16307/M%C3%A9moire_Grine%20et%20Aouad_Thon_Bon_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- **HAMICHE, S. (2020).** Étude chimique de métabolites (primaires et secondaires) produits par des souches bactériennes issues de niches écologiques marines 215. [en ligne], Université Saad Dahlab Blida 1. [Consulté le : 13/4/2022]. Disponible sur le web : <https://www.pnst.cerist.dz/detail.php?id=878275>.
- **HMISSI, J., SADOK, S. (2015).** *Caractérisation des co-produits de la crevette rose Parapenaeus longirostris : en vue de sa valorisation.* [en ligne], [Consulté le : 27/6/2022]. Disponible sur le web : <http://www.instm.agrinet.tn/images/Bulltin/Bull.2015-N.Sp%C3%A9cial/6.pdf>.
- **JELLOULI, K., BAYOUDH, A., MANNI, L., AGREBI, R., NASR, Y. (2008).** Purification, biochemical and molecular characterization of a metalloprotease from *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on shrimp wastes. [en ligne], [Consulté le : 21/5/2022]. Disponible sur le web : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18512057/>.
- **JABEUR, F., MECHRI, S., KRIAA, M., GHARIBI, I., BEJAOU, N., SADOK, S., JAOUADI, B. (2020).** Statistical experimental design optimization of microbial proteases production under co-Culture conditions for chitin recovery from speckled shrimp *Metapenaeus monoceros* By-Product. [en ligne], [Consulté le : 24/4/2022]. Disponible sur le web : <https://www.researchgate.net/publication/357373392>.
- **JAOUEN, P., DUMY, J., BERGE, J., BEN AMAR, R. (2009).** Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial

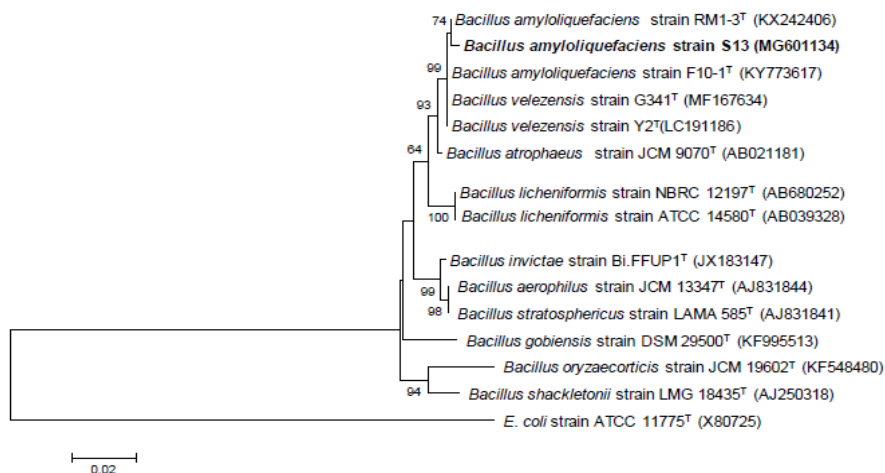
- proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. [en ligne],. [Consulté le : 6/5/2022]. Disponible sur le web : <https://www.researchgate.net/publication/24010803>.
- **KHALIFA, S., BABACAR, S. (2011).** Valorisation de co- produits de la sole tropicale (*Cynoglossus senegalensis*) par hydrolyse enzymatique : Application en nutrition avicole. [en ligne],. [Consulté le : 12/6/2022]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00057/16788/14240.pdf>.
 - **KECHAOU, E. (2011).** Bioréacteur enzymatique couplé à l’ultrafiltration pour la valorisation des co-produits issus des industries de la pêche. Application à la seiche *Sepia officinalis*. [en ligne],. [Consulté le : 12/6/2022]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00055/16645/14200.pdf>.
 - **Maruthiah, T., Palavesam, A. (2017).** Characterization of haloalkalophilic organic solvent tolerant protease for chitin extraction from shrimp shell waste. International journal of biological macromolecules. [en ligne] 97, 552-560,. [Consulté le : 17/8/2022]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813016318542>.
 - **OULHIZ, A. (2018).** Évaluation, valorisation et utilisation des coproduits de la crevette (*Penaeus japonicus*) et du thon rouge (*Thunnus thynnus*) pour l'alimentation du loup de mer d'élevage (*Dicentrarchus labrax*) 178. [en ligne], Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis. [Consulté le : 13/4/2022]. Disponible sur le web : <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/13260>.
 - **QUERO, J. (1992).** Les algues et invertébrés marins des pêches françaises (3ème partie) 165. [en ligne] 27-30. [Consulté le : 17/4/2022]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1536/>.
 - **RANDRIAMAHAOTODY, Z. (2011).** Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : utilisation de la protéolyse enzymatique pour des applications avicoles à Madagascar 236, [en ligne]. [Consulté le : 13/04/2022]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00043/15456/12831.pdf>.
 - **SILA, A. (2015).** Récupération de biomolécules d’origine aquatique en vue d’une valorisation comme ingrédients fonctionnels dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. [en ligne],. [Consulté le : 24/5/2022]. Disponible sur le web : <https://www.theses.fr/2015LIL10037>.
 - **SAADAoui, H. (2020).** Etude de fractionnement des hydrolysats protéiques de co-produits de l’industrie de transformation du thon par ultrafiltration et nanofiltration. [en ligne],. [Consulté le : 3/7/2022]. Disponible sur le web : <https://digibug.ugr.es/handle/10481/63553>.
 - **Sinthusamran, S., Benjakul, S., Kijroongrojana, K., Prodpran, T., Kishimura, H., (2020).** Protein hydrolysates from Pacific white shrimp cephalothorax manufactured with different

processes: compositions, characteristics and antioxidative activity. Waste and Biomass Valorization. [en ligne] 11, 1657-1670. [Consulté le : 17/8/2022]. Disponible sur le web : <https://www.researchgate.net/publication/329128646> Protein Hydrolysates from Pacific White Shrimp Cephalothorax Manufactured with Different Processes Compositions Characteristics and Antioxidative Activity.

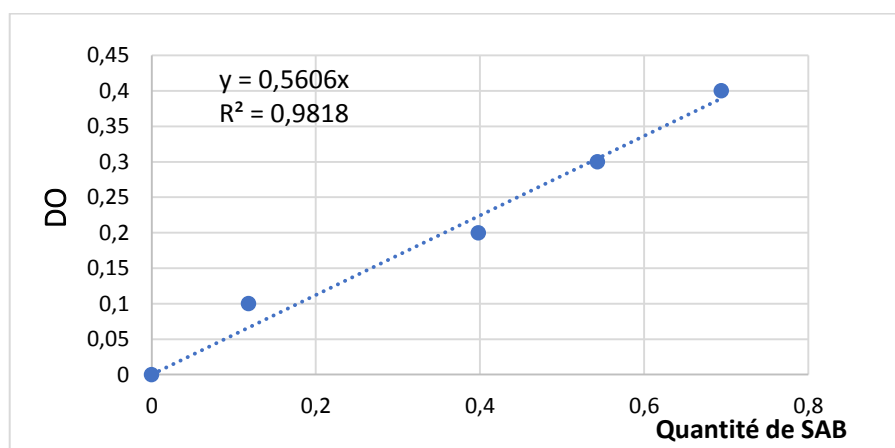
- **TIFOUR, H., DOUARA, O. (2018).** Valorisation des coproduits de la crevette rouge (*A.antennatus*) (Risso, 1816) : Utilisation du hydrolysate enzymatique. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem] . [en ligne],. [Consulté le : 14/5/2022]. Disponible sur le web : <http://e-biblio.univmosta.dz/bitstream/handle/123456789/6466/MEMOIRE%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Annexes

Annexe I



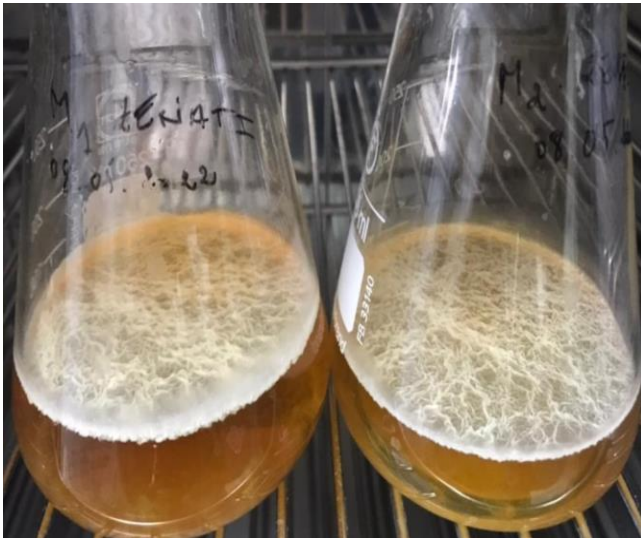
Annexe I-Figure 1 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16 montrant la position de la souche S13 (n ° d'accès : MG601134) dans genre *Bacillus* et l'espèce *amyloliquefaciens* (HAMICHE Sonia, 2022).



Annexe I-Figure 2 : Courbe d'étalonnage des protéines (présence étude).



Annexe I-Figure 3 : Étapes de prétraitement des co-produits de crevette.



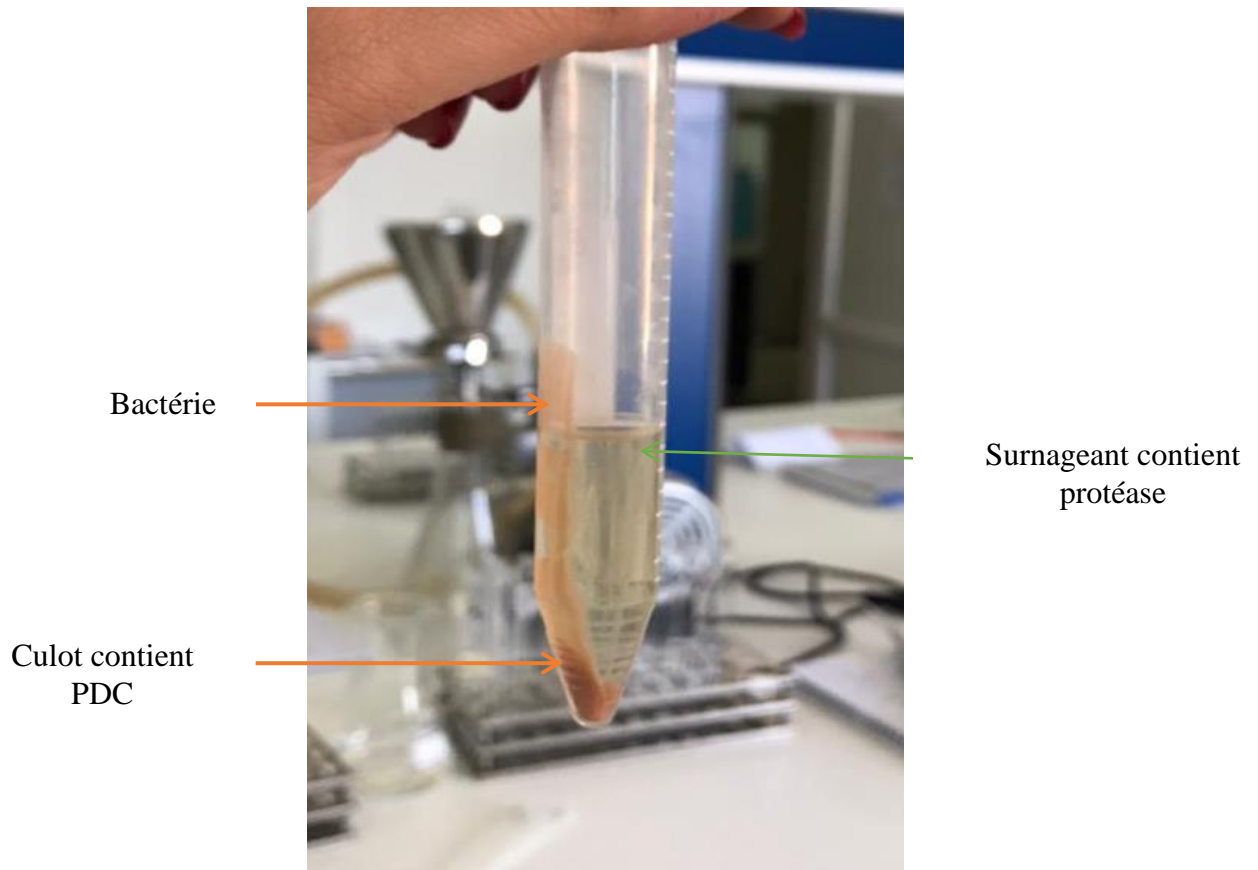
Annexe I-Figure 5 : Pré-culture de la souche S14 sur milieu LB liquide après 24h d'incubation.



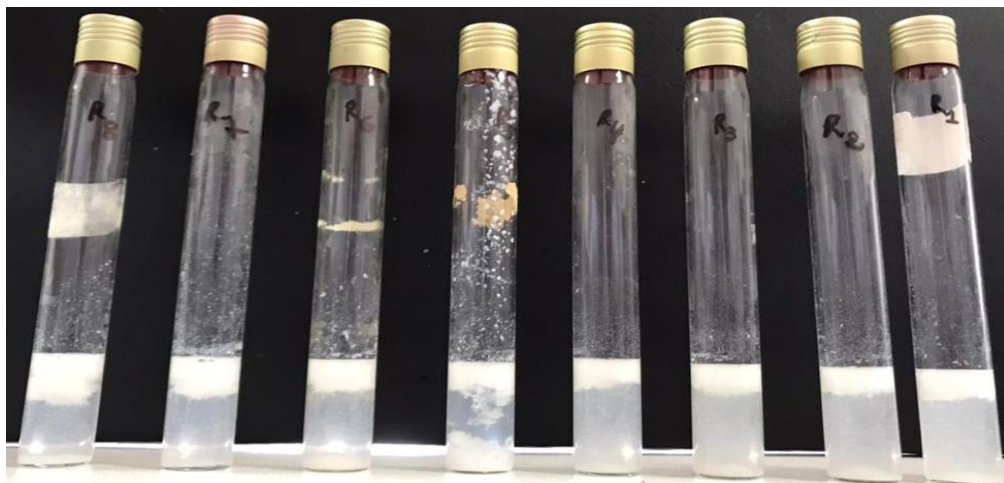
Annexe I-Figure 4 : Milieu optimale H1 après 24h d'incubation.



Annexe I-Figure 6 : Milieu M1 dans le 5ème jour d'incubation.



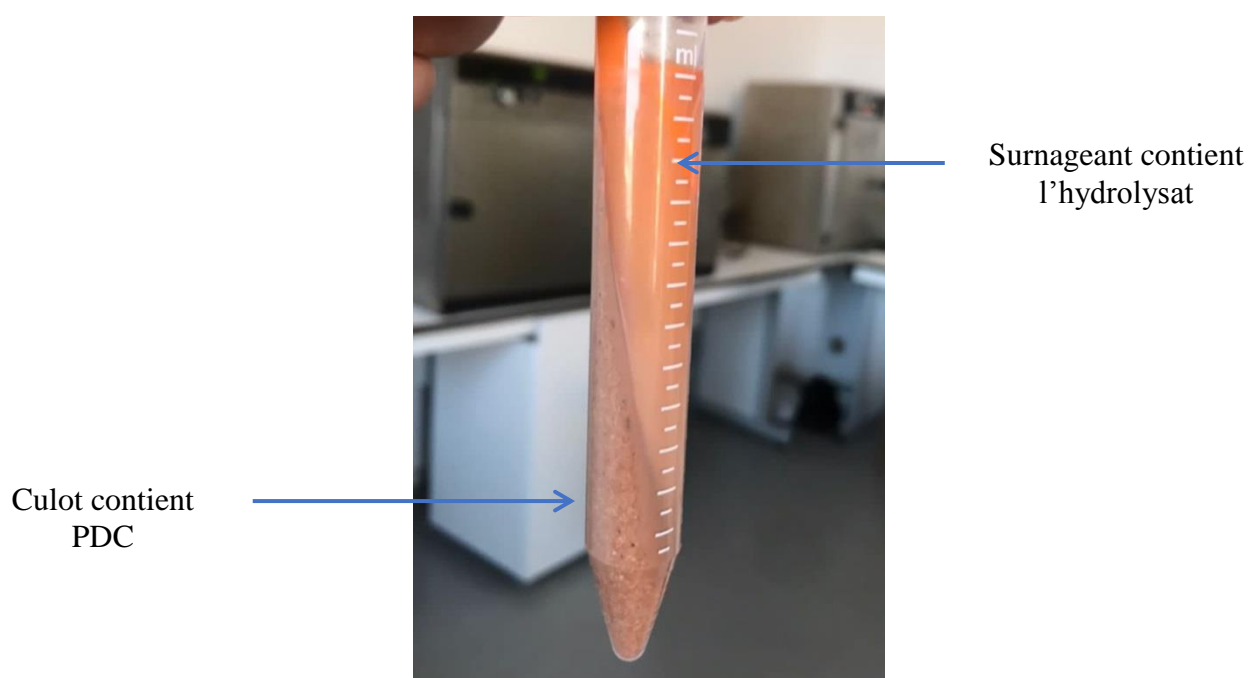
Annexe I-Figure 7 : Résultat de centrifugation du milieu de production M1



Annexe I-Figure 8 : Résultats d'étape d'incubation 15 min (après l'ajout du TCA) dans le dosage de l'activité protéolytique



Annexe I-Figure 9 : L'inactivation de l'enzyme dans le bain marie à 90°C pendant 10 min.



Annexe I-Figure 10 : Centrifugation du milieu d'hydrolyse enzymatique via la méthode pH-Stat.



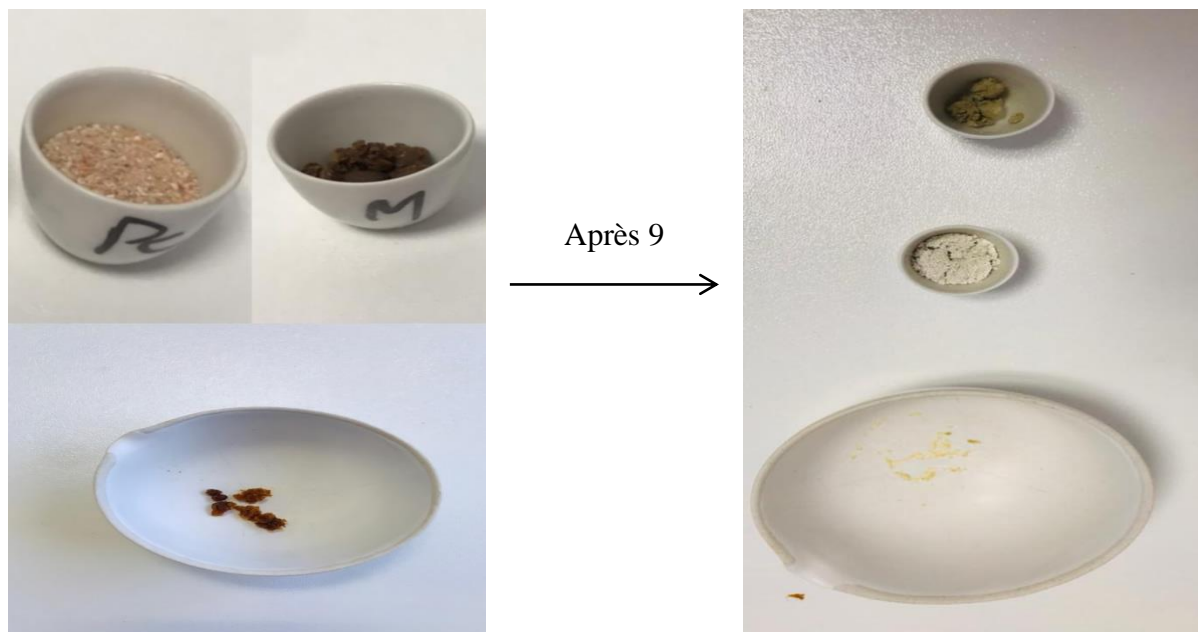
Annexe I-Figure 11 : Surnageant contient HMSP avant lyophilisation.



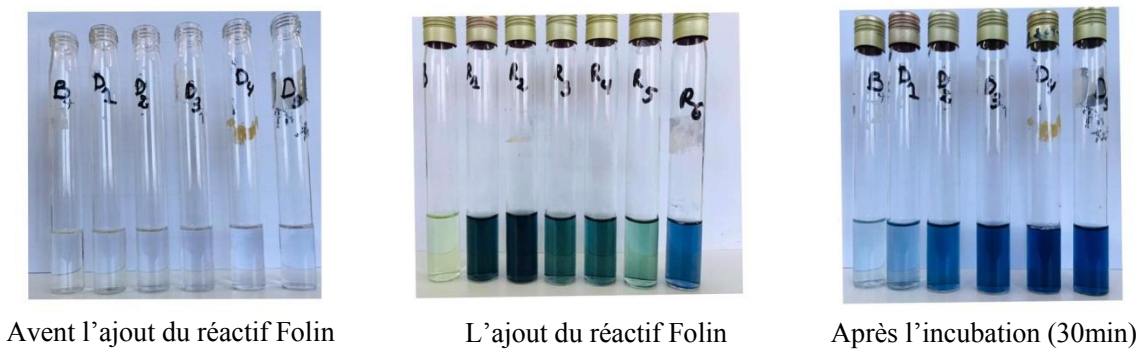
Annexe I-Figure 12 : Congélation du surnageant de HMPS destiné à lyophilisé.



Annexe I-Figure 13 : Lyophilisation des hydrolysats.



Annexe I-Figure 14 : Résultat de l'incération des échantillons dans four à moufle à 550°C.



Annexe I-Figure 15 : Résultats de la méthode du Lowry

Annexe II

Annexe II-Tableau 1 : Caractérisation macromorphologiques et micromorphologique des souches bactériennes étudiées (HAMICHE Sonia, 2022).

		Souches bactériennes	
		S13	S14
Caractères macroscopiques	Forme	Rhizoïde	Rhizoïde
	Couleur	Crème	Crème
	Opacité	Opaque	Opaque
	Surface	Rugueuse	Rugueuse
	Contour	Irrégulier	Irrégulier
	Élévation	Semi bombée	Bombée
	Consistance	Crémeuse	Visqueuse
Caractères microscopiques	Gram	+	+
	Forme	Bacille	Bacille
	Mobilité	+	+
	Sporulation	+	+
	Arrangement	Isolés	Isolés

+ : Représente un résultat positif ; - : Représente un résultat négatif.

Annexe II-Tableau 2 : caractéristiques biochimiques et métaboliques des souches bactériennes étudiées (HAMICHE Sonia, 2022).

Tests biochimiques	Souches bactériennes	
	S13	S14
Catalase	+	+
Oxydase	+	+
Mannitol	+	+
Indole	-	-
Type respiratoire	AAF	AAF
Catalase	+	+
Oxydase	+	+

+ : Représente une réaction positive ; - : Représente une réaction négative ; **AAF** : Représente un typerespiratoire aéro-anaérobie facultatif.

Résumé

L'objectif de l'étude porte sur l'extraction des fractions protéiques par hydrolyse enzymatique à partir des co-produits de la crevette blanche (*Parapenaeus longirostris*) en utilisant des protéases produites par des souches bactériennes locales. La souche bactérienne dotée d'activité protéolytique la plus importante, sélectionnée après un criblage préliminaire sur milieu solide à base de la caséine, a été mise en milieux fermentatifs à base des co-produits de crevettes et/ou de caséine. Les hydrolysats sont récupérés directement de ces milieux ou à partir d'un mélange de co-produits de crevettes et de protéase (produite séparément par la bactérie dans un milieu favorable) dans un procédé appelé pH-Stat. Les résultats ont montré que l'activité protéolytique est améliorée en présence de la caséine, des sucres et des sels minéraux. Un faible degré d'hydrolyse des protéines a été obtenu avec la méthode pH-Stat (de l'ordre de 1%) en dépit des quantités importantes d'hydrolysats récupérée (35 à 63 g/L) par rapport aux hydrolysats des milieux de fermentation (10 à 33 g/L). Les hydrolysats obtenus ont été caractérisés par de faibles teneurs en protéines (5 à 7%), et des teneurs très variables en lipides (12 à 94%) et des matières minérales (4 à 47%), respectivement pour les hydrolysats des milieux et de la méthode pH-Stat.

Mots clés : Poudre de déchet des crevettes, bactérie protéolytique, hydrolyse enzymatique, hydrolysats, caractérisation biochimique.

Abstract

The objective of this study is to extract protein fractions by enzymatic hydrolysis of white shrimp by-products (*Parapenaeus longirostris*), using proteases produced by local bacterial strains. The bacterial strain with the highest proteolytic activity, selected after a preliminary screening on casein-based solid medium, was added in fermentative media based on shrimp waste and/or casein. Hydrolysates were recovered directly from these media or from a mixture of shrimp waste and protease (produced separately by the bacteria in a favorable medium) in a process known as pH-Stat. As a result, the proteolytic activity was enhanced with the presence of casein, sugars and mineral salts. A low degree of protein hydrolysis was obtained with the pH-Stat method (is around 1%) despite large amounts of hydrolysates recovered (35 to 63 g/L) compared to the hydrolysates of the fermentation media (10 to 33 g/L). The hydrolysates obtained were therefore characterized by low protein contents (5 to 7%), and highly variable lipid contents (12 to 94%) and mineral matter contents (47 to 4%) for the media and pH-Stat hydrolysates, respectively.

Keywords: Shrimp waste powder, proteolytic bacteria, enzymatic hydrolysis, hydrolysates, biochemical characterization.

الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص أجزاء بروتينية عن طريق التحلل المائي الأنزيمي من المنتجات المشتقة من الجمبري الابيض (*Parapenaeus longirostris*) باستخدام إنزيم بروتيني الذي تنتجه سلالات البكتيرية المحلية. السلالة البكتيرية التي اعطت نشاط معتبرا في عملية التحلل البروتيني، تم اختيارها بعد القيام بفرز أولي على وسط صلب يعتمد على الكازين، تم وضعها في وسط تخمير يعتمد على بقايا الجمبري و/ أو الكازين. تم استرداد المتحللات المائية مباشرة من هذه الوسائط أو من خليط بقايا الجمبري و الإنزيم البروتيني (يتم إنتاجه بشكل منفصل بواسطة البكتيريا في وسط مفضل) في عملية تسمى-pH-Stat. أظهرت النتائج أن نشاط التحلل البروتيني تعزز في وجود الكازين والسكريات والأملاح المعدنية. تم الحصول على درجة منخفضة للتحلل المائي للبروتينات باستخدام طريقة pH-Stat (بنسبة 1%) على الرغم من الكميات الكبيرة من المتحللات المائية المستعادة (35 إلى 63 جرام/لتر) بالمقارنة مع المتحللات المائية لوسائط التخمير (10 إلى 33 جرام/لتر). وعليه، فإن المتحللات المائية التي تم الحصول عليها اتسمت بانخفاض المحتويات البروتينية (5 إلى 7%)، وبمحتويات دهنية (12 إلى 94%) ومواد معدنية (47 إلى 4%) شديدة التغير للمتحللات المائية المستخرجة من الوسائط ومن طريقة pH-Stat.

الكلمات المفتاحية: مسحوق بقايا الجمبري، البكتيريا المحللة للبروتينات، التحلل المائي الإنزيمي، المتحللات المائية، الوصف البيوكيميائي.