



**HAL**  
open science

# Optimisation d'un procédé de valorisation de coproduits d'abattage par hydrolyse enzymatique : propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats

Michel Linder

## ► To cite this version:

Michel Linder. Optimisation d'un procédé de valorisation de coproduits d'abattage par hydrolyse enzymatique : propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des hydrolysats. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1996. Français. NNT : 1996INPL012N . tel-01776359

**HAL Id: tel-01776359**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776359v1>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

13600 15219

96 IN PL 012 N

**Institut National Polytechnique de Lorraine**

**THESE**

présentée à

M. 1336 LINDER, H.

**L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

pour obtenir le grade de Docteur de l'I. N. P. L.

Spécialité

**BIOTECHNOLOGIES ET INDUSTRIES ALIMENTAIRES**

par

*Michel LINDER*

**OPTIMISATION D'UN PROCÉDE DE VALORISATION  
DE CO-PRODUITS D'ABATTAGE PAR HYDROLYSE  
ENZYMATIQUE. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES ET  
NUTRITIONNELLES DES HYDROLYSATS.**

Soutenue publiquement le 18 janvier 1996 devant la commission d'examen

Service Commun de la Documentation  
INPL  
Nancy-Brabois

Membres du jury :

Président : J. HARDY, Professeur (ENSAIA- INPL, Nancy)  
Rapporteurs : J.-B. GROS, Professeur (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)  
R. PHAN-TAN-LUU, Professeur (LMRE, Marseille)  
Examineurs : M. PARMENTIER, Professeur (ENSAIA- INPL, Nancy)  
C. PILET, Professeur (ENV Maisons-Alfort)  
D. LOISEAU, Président Directeur Général "Daniel Loiseau Gamme"  
P. REGNAULT, Président Directeur Général "Les Salaisons d'Orly"

*A mes parents, pour leur soutien*

*Merci à Hélène et Claude, pour toujours répondre présent, même dans les coups durs!*

*Enfin, je dédie ce travail à ma femme, Sylvie et à notre fils, Arnaud,*

*qui a su attendre un jour de pleine lune où je travaillais à Orly pour venir au monde.*

*Qu'Hakuna Matata soit sa devise!*

## *AVANT-PROPOS*

Ce travail a été réalisé dans sa grande majorité au Laboratoire de Physicochimie et Génie Alimentaires de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, sous la direction de Monsieur Michel Parmentier, Professeur à l'Institut National Polytechnique de Lorraine.

Je tiens particulièrement à lui exprimer ma reconnaissance pour l'aide et le soutien qu'il m'a apportés au cours des cinq années de ma formation pluridisciplinaire acquise au laboratoire. Je le remercie pour sa disponibilité "quasi immédiate", son soutien scientifique, ainsi que l'autonomie qu'il a su me donner pour concrétiser les objectifs de cette étude.

Je remercie sincèrement Monsieur Joël Hardy, Professeur à l'Institut National Polytechnique de Lorraine, de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire, de ses précieux conseils scientifiques et de l'honneur qu'il me fait de présider ce jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Jean-Bernard Gros, Professeur à l'Université Clermont-II et à Monsieur Roger Phan-Tan-Luu, Professeur à l'Université de Marseille, tous deux Membres de la Commission d'Examen, qui me font l'honneur de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Charles Pilet, Professeur à l'E.N.V. de Maisons-Alfort et à Monsieur Daniel Loiseau, Président Directeur Général de la Société "D.L.G." pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu' Examineurs. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche avec la Société "Les Salaisons d'Orly". Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Pierre Régnault, Président Directeur Général de la société "Les Salaisons d'Orly", pour son soutien financier, ses conseils, la passion et la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ce travail.

Je ne saurais oublier de remercier Monsieur Jean-Pierre Vadelorge et Mademoiselle Marie-Pierre Jourdain pour leur disponibilité lors de mon travail à Paris.

Je tiens également à remercier très sincèrement Monsieur Jacques Fanni, Maître de Conférence au Laboratoire de Physicochimie et Génie Alimentaires, pour ses précieux conseils scientifiques, notamment dans la langue de Shakespeare et pour l'intérêt permanent qu'il a porté à mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du laboratoire, particulièrement en les personnes de Marie-Noëlle Maucourt, Angèle Colas, pour leur gentillesse et leur disponibilité et Sylvie et Stéphane Desobry pour leur soutien moral. Je ne saurais oublier Marie-Laure pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée tout au long de cette étude, et tous les chercheurs Docteurs ou Doctorants qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Un grand Merci à Karine pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci à Madame Gelot du Laboratoire de Chimie Clinique du CHR de Nancy, Monsieur Villaume et Mesdemoiselles Rozan et Lamghari El Kossori, de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et Madame Thirion du centre de documentation, qui m'ont conseillé et assisté techniquement.

## ***ABBREVIATIONS***

AAI	acides aminés indispensables
AE	activité émulsifiante
B	consommation de base (NaOH)
$B'_n$	consommation réelle de base calculée après le $n^{\text{ème}}$ prélèvement
$B_n$	consommation théorique de base calculée après le $n^{\text{ème}}$ prélèvement
CE	capacité émulsifiante
$CE_{\text{max}}$	capacité émulsifiante maximale
CEP	coefficient d'efficacité protéique
CEPN	coefficient d'efficacité protéique net
$C_{\text{min}}$	conductivité minimale de la solution
$C_s$	conductivité de la solution initiale
D	diamètre de la lecture
$D_0$	diamètre du puits (mesure de l'activité enzymatique résiduelle)
DA	digestibilité apparente
ddl	degré de liberté
DH ou X	degré d'hydrolyse
DO	densité optique
DR	digestibilité réelle
E / S	rapport enzyme / substrat présent dans le réacteur
E	concentration en enzyme
$f_N$	facteur de conversion protéique Kjeldahl
$G''$	module de cisaillement visqueux
$G'$	module de cisaillement élastique
$G^*$	module de cisaillement complexe
h	nombre de liaisons peptidiques rompues
htot	nombre de liaisons peptidiques totales
IAE	indice d'activité émulsifiante
IC	indice chimique
ISE	indice de stabilité émulsifiante
$K_M$	constante de Michaelis
M	masse totale du mélange réactionnel
NNP	azote non protéique
NS	azote soluble
NT	azote total
p	degré de signification (statistique)
pet food	aliments pour animaux domestiques
Q	mesure de l'hydrophobicité moyenne de peptides

$R^2$ ou $R^2$	coefficient de corrélation
S	concentration en protéines
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SE	stabilité émulsifiante
t	temps
TCA	acide trichloroacétique
$T_m$	température de fusion
TNBS	acide trinitrobenzène sulfonique
TT	traitement thermique
UA	unité Anson
UPN	utilisation protéique nette
V	volume élué (chromatographie d'exclusion)
$V_0$	volume mort de la colonne (chromatographie d'exclusion)
VB	valeur biologique
VD	volume prélevé
VSM	viande séparée mécaniquement
$X_n$	variable n
$Y_n$	réponse expérimentale n
*	analyse statistique $P < 0,05$
**	analyse statistique $P < 0,01$
***	analyse statistique $P < 0,001$
$\alpha$	degré de dissociation
$\gamma$	tension interfaciale
$\gamma_0$	tension interfaciale initiale
$\eta_n$	réponse théorique n
$\rho$	masse volumique du milieu réactionnel
$\omega$	coefficient osmotique
$\Pi$	pression de surface
$\Delta C$	différence d'osmolalité (point cryoscopique)
$\Delta C$	différence de conductivité (propriétés fonctionnelles)
$\Delta t$	différence de temps

## ***SOMMAIRE***

## **ABREVIATIONS**

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>2</b>
------------------------------------	----------

<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>8</b>
---------------------------------------	----------

I. LE POTENTIEL PROTEIQUE DES CO-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE LA VIANDE ET LEURS UTILISATIONS ACTUELLES. ....	13
--	----

II. LA VALORISATION DE LA FRACTION PROTEIQUE DES CO- PRODUITS.....	25
---	----

III. LES PROPRIETES FONCTIONNELLES ET L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE .....	45
--	----

IV. ETUDE CRITIQUE DES PRINCIPALES METHODES D'ESTIMATION DE LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES PROTEINES .....	61
--	----

V. CONCLUSION .....	75
---------------------	----

<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>76</b>
-----------------------------------	-----------

I. EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE.....	81
---	----

II. LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE EXPERIMENTALE APPLIQUEE À LA VALORISATION DE CO-PRODUITS D'ABATTAGE.....	97
---	----

III. LES PROPRIETES FONCTIONNELLES ET NUTRITIONNELLES DES HYDROLYSATS PROTEIQUES .....	105
---	-----

IV. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES.....	115
-------------------------------------	-----

V. TRAITEMENTS STATISTIQUES.....	117
----------------------------------	-----

<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>118</b>
-------------------------------------	------------

I. OPTIMISATION DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE.....	121
--	-----

II. LES HYDROLYSATS PROTEIQUES DE CO-PRODUITS DE VEAU.....	140
--	-----

III. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES HYDROLYSATS PROTEIQUES OBTENUS A L'ECHELLE DU LABORATOIRE.....	141
--	-----

IV. DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE .....	154
V. LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES HYDROLYSATS PROTEIQUES .....	165
VI. ANALYSE ECONOMIQUE DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE .....	174
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	180
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	184
<b>ANNEXES</b> .....	210
ANNEXE I : INFORMATION SUR LES ENZYMES .....	211
ANNEXE II : PLAN D'EXPERIENCES .....	220
ANNEXE III : PROCEDES.....	223

## ***INTRODUCTION GENERALE***

*Celui qui aime à apprendre est bien près de savoir.*  
(Confucius)

---

L'industrie de transformation des viandes réalise, à travers de nombreuses opérations manufacturières, le passage de la carcasse brute à la pièce commercialisable, soit en l'état, soit après une deuxième transformation comme le séchage, la cuisson, le fumage, etc... Au cours de certaines de ces opérations, comme par exemple le désossage, une quantité importante de co-produits est générée. Leur valeur globale est faible, mais si l'on analyse finement leur composition, on s'aperçoit qu'ils peuvent contenir des quantités pondérales significatives de matière noble. Celle-ci n'est dégradée que par le fait qu'elle est, dans ces produits, difficile à extraire parce que dispersée dans une matière sans valeur ou presque (os, couennes...)

A titre d'exemple, la teneur protéique des résidus de viande adhérant aux os des colonnes vertébrales en sortie de salle de désossage est estimée entre 18 et 20% du poids frais. Un tel potentiel protéique, qui présente initialement toutes les qualités sanitaires requises pour une utilisation en alimentation humaine, est actuellement considéré comme un déchet par l'industrie de transformation des produits carnés : sa valorisation industrielle à des fins alimentaires demeure encore faible, sinon marginale. En fait, ces sous-produits traités par l'industrie du "cinquième quartier", sont actuellement destinés à l'alimentation animale ou à la production de gélatine.

L'objectif général du présent travail consiste à répondre à la question suivante : de nouvelles technologies peuvent-elles permettre une valorisation de ce potentiel de protéines nobles en alimentation humaine ? De plus, dans le cas de la Société "Les Salaisons d'Orly", cette valorisation pourrait être conduite directement sur le lieu de transformation qui génère le co-produit.

Une synthèse bibliographique des procédés d'extraction protéique sur les différents tissus homogènes ou hétérogènes constituant les sous-produits d'abattage nous a conduit à choisir un procédé d'hydrolyse par voie enzymatique. Les contraintes législatives, technologiques, économiques, et de sécurité alimentaire au niveau industriel, ont été prises en compte dans le choix des protéases utilisées. La nature et la spécificité des protéases conditionnent les caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles des hydrolysats protéiques visés.

La première partie de ce travail est donc relative au paramétrage et à l'optimisation d'un procédé d'extraction protéique à partir de ces co-produits d'abattage, dans le but d'utiliser les hydrolysats en qualité d'ingrédients en formulation pour l'alimentation humaine.

Compte tenu de l'hétérogénéité du substrat (tissus musculaires, conjonctifs, osseux, matière grasse), il est impossible d'appliquer les modèles classiquement utilisés en enzymologie pour contrôler le degré d'hydrolyse au cours de la réaction. En effet, un nombre trop important de facteurs influence les rendements de solubilisation et la qualité des produits obtenus.

Parmi les différentes approches méthodologiques possibles, nous avons choisi de déterminer l'influence et les interactions des paramètres cinétiques en utilisant des modèles empiriques, la plupart du temps polynômiaux. Contrairement à la méthode traditionnelle, coûteuse en expérimentations, l'utilisation de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale, permet de modéliser le procédé d'extraction protéique en utilisant des matrices à sept niveaux différents pour les variables les plus "sensibles". A l'intérieur du domaine expérimental, on peut ainsi définir les conditions optimales de l'extraction protéique par la méthode des surfaces de réponse. La modélisation du procédé d'extraction constitue la première partie de ce travail.

Le développement d'un procédé d'extraction protéique en réacteur discontinu, rapide, efficace et peu coûteux, doit prendre d'abord en compte la qualité des hydrolysats obtenus. D'une part, du point de vue organoleptique, une hydrolyse prolongée conduit au développement de saveurs ou arômes indésirables comme l'amertume. Le contrôle du degré d'hydrolyse par différentes techniques adaptées au milieu industriel a donc constitué la première contrainte.

D'autre part, le potentiel de valorisation, donc l'avenir de ces ingrédients, est lié aux qualités qu'ils sont capables d'apporter sur l'ensemble du tryptique organoleptique, fonctionnel et nutritionnel. Les propriétés physico-chimiques, d'hydratation et d'émulsification des hydrolysats seront donc étudiées dans la deuxième partie de ce travail. En effet, le pouvoir liant recherché des additifs protéiques, fait intervenir de nombreuses propriétés fonctionnelles et, en particulier, la solubilité, les propriétés d'hydratation et le pouvoir émulsifiant. Une méthode de mesure de la capacité, de l'activité et de la stabilité émulsifiante, utilisant le même appareillage, sera détaillée.

Le troisième objectif de ce travail consiste à montrer la faisabilité de la production de ces hydrolysats protéiques à l'échelle industrielle (réacteur de 400 litres), en mettant en évidence les facteurs à piloter pour obtenir spécifiquement des caractéristiques différentes, recherchées en fonction du type d'utilisation souhaitée.

Dans toutes ces hypothèses de valorisation, il est nécessaire de déterminer la valeur nutritionnelle de produits qui sont le résultat de différents traitements technologiques, et ce sera l'objet de la dernière partie du mémoire. La qualité nutritionnelle et la digestibilité de ce

type d'hydrolysat atomisé ont été déterminées *in vivo* et *in vitro*, par méthode chimique, enzymatique ou mixte. Enfin, des analyses microbiologiques ont été effectuées tout au long des différents traitements technologiques dans le but de déterminer la qualité sanitaire des hydrolysats.

Une évaluation économique du procédé d'extraction protéique en réacteur discontinu, limitée au coûts de production à l'échelle pilote est proposée, l'analyse étant toujours conduite dans l'hypothèse d'une valorisation en interne, donc à partir de matériels déjà existants.

Ce travail a donné lieu directement aux publications suivantes :

### PUBLICATIONS

- 1- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., Sergent, M. and Phan-Tan-Luu, R. 1995. Protein Recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. **J. Food Sci.** 60 (5) : 949 - 952, 958.
- 2- Linder, M., Parmentier, M., Sergent, M., Phan-Tan-Luu, R. 1995. Application de la méthode des surfaces de réponse à l'optimisation d'un procédé d'extraction enzymatique de sous-produits d'abattage. In : **Stratégie expérimentale et procédés biotechnologiques**. Lavoisier Technique et Documentation Paris n° 36 (9) : 55 - 60.
- 3- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. Functional properties of veal bone protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, ms 4515, accepté le 20/11/1995.

### BREVET D'INVENTION

Linder M., Fanni, J., Parmentier, M., Regnault, P. Procédé d'obtention d'une base protéique d'origine animale présentant des propriétés nutritionnelles, aromatisantes et gélifiantes adaptées à la formulation de produits alimentaires ; demande de brevet français , **n°95 09 789** du 9 août 1995.

### COMMUNICATIONS AVEC ACTES / CONGRES INTERNATIONAUX

- 1- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. 1994. Recovery and utilisation of by-product protein of meat industry. Process optimization using response-surface methodology. **40th International Congress of Meat Science and Technology**. The Hague, The Netherlands. W-6A.07 : 1-5. 28th August- 2nd September 1994.
- 2- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. 1994. Functional properties of protein hydrolysates extracted from beef bones. **Food Macromolecules and Colloids**.(Dijon, 23 - 25 mars 1994).

3- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. 1995. Enzyme use as protein recovery tool on veal bones. 7<sup>ième</sup> **Congrès Européen de Biotechnologie**. (Nice 19-23 février 1995).

*PRIX DE L'INNOVATION TECHNOLOGIQUE*

La société "Les Salaisons d'ORLY" s'est vu décerner le prix de **l'innovation technologique 1993 de la région Ile de France** pour ses travaux de valorisation de co-produits d'abattage par voie enzymatique (1<sup>er</sup> décembre 1993).

## ***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

*Ecouter et choisir entre les avis, voilà le premier pas de la connaissance ;  
voir et réfléchir sur ce qu'on a vu, voilà le second pas de la connaissance.*

(Confucius)

---

I. Le potentiel proteique des co-produits de l'industrie de la viande et leurs utilisations actuelles.....	13
I.1. Les différentes catégories de sous-produits : déchets ou co-produits ?.....	13
I.1.1. Les rejets et déchets.....	13
I.1.2. Les co-produits.....	14
I.1.3. La valorisation du sang.....	16
I.2. Composition physico-chimique des os et valorisations actuelles.....	17
I.2.1. Composition des carcasses en os.....	18
I.2.2. Les protéines musculaires.....	18
I.2.3. Les os.....	18
I.2.3.1. La fraction inorganique de l'os.....	19
I.2.3.2. La fraction organique de l'os.....	19
I.2.3.2.a. Le collagène.....	19
I.2.3.2.b. La gélatine.....	21
I.2.4. Utilisation des tissus conjonctifs et de la gélatine en formulation de plats cuisinés : les hydrolysats de collagène.....	22
II. La valorisation de la fraction protéique des co-produits.....	25
II.1. Les procédés chimiques.....	25
II.1.1. Les concentrats protéiques.....	25
II.1.2. Les isolats protéiques.....	25
II.1.3. Les hydrolysats chimiques.....	26
II.2. Les procédés mécaniques.....	27
II.3. Les procédés enzymatiques.....	27
II.3.1. Les enzymes utilisées en technologie alimentaire.....	28
II.3.2. Mesure de l'activité d'une solution enzymatique.....	30
II.3.3. Mécanismes et cinétiques des procédés d'hydrolyse enzymatique.....	30
II.3.3.1. Le substrat.....	31
II.3.3.2. La nature de l'enzyme, sa spécificité et son activité catalytique.....	33
II.3.3.3. Le rapport enzyme-substrat.....	34
II.3.3.4. Le pH et la température.....	35
II.3.4. La mesure du degré d'hydrolyse.....	36

---

II.3.5. Développement d'amertume lié au procédé d'hydrolyse enzymatique.....	39
II.3.6. Elimination de l'amertume dans les hydrolysats protéiques.....	41
II.3.6.1. Les techniques de séparations sélectives.....	41
II.3.6.2. Utilisation d'exopeptidases.....	42
II.3.6.3. Synthèse de plastéines .....	42
II.3.6.4. Modification chimique .....	43
II.3.6.5. Masquage de l'amertume .....	43
III. Les propriétés fonctionnelles et l'hydrolyse enzymatique .....	45
III.1. Les propriétés d'hydratation : la solubilité.....	46
III.2. Les propriétés émulsifiantes.....	47
III.2.1. Définition d'une émulsion.....	47
III.2.2. La capacité émulsifiante (CE).....	49
III.2.3. Influence d'une hydrolyse enzymatique sur la capacité émulsifiante.....	51
III.2.3.1. L'activité émulsifiante (AE) .....	53
III.2.3.1.a. L'indice d'activité émulsifiante (IAE).....	53
III.2.3.1.b. La conductivité.....	55
III.2.3.2. La stabilité émulsifiante (SE).....	55
III.2.3.2.a. Indice de stabilité émulsifiante .....	56
III.2.3.2.b. La granulométrie.....	57
III.2.3.2.c. La conductivité.....	57
III.2.3.3. Pression de surface développée à l'interface huile / solution protéique.....	58
III.2.4. Mesure de l'hydrophobicité.....	59
III.2.5. L'osmolalité.....	59
IV. Etude critique des principales méthodes d'estimation de la valeur nutritionnelle des protéines.....	61
IV.1. L'évolution des méthodes in vivo .....	61
IV.2. Développement des méthodes in vitro pour l'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines.....	66
IV.3. Les méthodes mixtes.....	68
IV.3.1. Indice Chimique.....	70

---

IV.3.2. Coefficient d'efficacité protéique-calculé.....	71
IV.3.3. Indice Chimique corrigé de la digestibilité ou Index Di-Sco.....	71
IV.4. Relation entre qualité nutritionnelle et composition en acides aminés de sources protéiques non conventionnelles .....	72
V. Conclusion .....	75

***LES DIFFERENTS CO-PRODUITS DE  
L'INDUSTRIE DE LA VIANDE***

---

## **I. LE POTENTIEL PROTEIQUE DES CO-PRODUITS DE L'INDUSTRIE DE LA VIANDE ET LEURS UTILISATIONS ACTUELLES.**

Les sous-produits et les co-produits de l'industrie de la viande ne font pas, à ce jour, l'objet de statistiques nationales régulières par les organisations professionnelles : Office National Interprofessionnel des Viandes de l'Élevage et de l'Aviculture (OFIVAL) ; la Fédération Nationale des Exploitants d'Abattoirs et Prestataires de services (FNEAP) ; le Syndicat des Protéines et Corps Gras (SPCGA), en raison de la difficulté d'évaluation des gisements en jeu au niveau industriel. Cependant, il est important de prendre en compte ces études statistiques, vis à vis de l'évolution de la politique agricole, mais aussi de la politique de gestion des co-produits. Actuellement, les structures de production gèrent leurs sous-produits d'abattage par un partenariat avec l'industrie du "cinquième quartier" (traitement des peaux, fonte des graisses, nettoyage et préparation des boyaux, équarissage), qui assure la valorisation de ces produits.

### **I.1. Les différentes catégories de sous-produits : déchets ou co-produits ?**

#### **I.1.1. Les rejets et déchets**

Les sources de pollution des eaux (eaux de lavage d'abattoirs, par exemple) sont considérées comme des déchets au sens strict du terme, donc non valorisables hors filière équarissage et agriculture. En effet, l'industrie de la viande représente 13% de la pollution organique du secteur agro-alimentaire en se classant au cinquième rang des activités industrielles polluantes avec 128,2 tonnes / jour de matière organique (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie : ADEME, 1993).

Les rejets et déchets sont principalement composés de lisiers, de fumier de stabulation et de sang. Il est nécessaire d'y adjoindre les matières organiques solides qui, en fonction des contraintes économiques, sanitaires et industrielles, deviennent des déchets (graisses, viscères, cornes, onglons, cuirs et peaux, os).

Les tableaux I.1. et I.2. rassemblent les estimations de gisements des déchets et co-produits de l'industrie d'abattage au niveau national (ADEME, 1993), ainsi que le pourcentage de ces sous - produits par rapport au "poids vif abattoir" des animaux de boucherie.

**Tableau I.1. :** Composition et pourcentage (%) des co-produits par rapport au "poids vif abattoir" des animaux de boucherie.

% poids vif abattoir	Vaches	Bovins mâles	Veaux	Porcins	Ovins Caprins	Agneaux
<b>poids vif abattoir</b>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
carcasse froide	50,00	57,00	60,00	75,50	45,00	52,00
os brut	8,85	6,75	11,80	6,70	7,40	8,90
graisse	8,40	6,75	2,95	17,95	10,90	12,50
déchets	2,60	2,80		6,00		
viande nette	29,50	40,00	44,30	44,00	26,00	27,00
lisiers et fumiers	2,50	2,50	3,00	2,00	4,00	4,00
contenu digestif	15,00	10,00	4,00	7,00	11,00	9,00
pertes	5,50	5,50	5,00	3,00	3,00	3,00
<b>Co-produits</b>	<b>29,50</b>	<b>27,50</b>	<b>31,00</b>	<b>14,50</b>	<b>41,00</b>	<b>36,00</b>
sang	2,60	2,45	2,00	3,50	3,80	4,55
graisses	5,50	5,50	2,80			
poils / soies	0,25	0,25	0,23	0,70	0,76	0,60
peau / cuir	6,00	5,75	7,00	7,60	9,00	17,00
abats rouges	5,40	5,60	8,60	4,25	9,00	9,80
abats blancs	8,10	6,00	5,30	4,70	6,60	8,10

d'après FNEAP 1989 (source : ADEME, 1993)

**Tableau I.2. :** Gisements des différents déchets et co-produits d'abattage exprimés en tonnes, au niveau national (source : ADEME, 1993 : chiffres 1990 SCEES / FNEAP).

	Gros Bovins	Veaux	Ovins Caprins	Porcins	Equidés
fumiers / lisiers	68087	12555	6250	42831	911
sang d'abattage	68961	9289	6855	74955	933
matières stercoraires	353482	18578	14645	149910	933
suifs, saindoux et autres graisses	359574	26706	18976	1005469	1365
os bruts	217676	54806	13399	143485	2275
cuirs et peaux	160172	32512	23993	162760	1843
déchets divers	72717	-	-	128494	-
cornes et onglons	69	11	13	43	-
soies et poils	6786	1068	985	14991	182

### I.1.2. Les co-produits

Les performances économiques de l'industrie de la viande, depuis l'abattage-découpe jusqu'au secteur de la transformation, dépendent de la valorisation du cinquième quartier. Les co-produits représentent en général une charge pour la majorité des entreprises, mais restent un potentiel protéique intéressant pour l'alimentation humaine si les conditions d'hygiène sont respectées et la technologie adaptée à la valorisation. A l'heure actuelle, ces produits sont

directement dirigés vers les industries d'équarrissage ou d'alimentation pour animaux de compagnie.

La production de l'industrie du cinquième quartier et de l'équarrissage est résumée dans le tableau I.3. selon les estimations du Syndicat des Protéines et Corps Gras (SPCGA).

**Tableau I.3.** : Estimation de la production de suifs et de farines de viande (importation, exportation) pour l'année 1994.

1994 sources :	production (tonnes) SPCGA	importation (tonnes) Statistiques	exportation (tonnes) douanières
Suifs alimentaires	40 500	7 631,50	17 110,00
Suifs industriels	165 800	40 397,60	56 551,30
Saindoux*	28 000	5 235,10	6 285,80
Autres graisses	237 500		
Farines et poudres de viande **	575 000	52 878,70	80 809,40

\* saindoux et autres graisses de porc fondues, pressées ou extraites à l'aide de solvants.

\*\* sous forme de pellets, de viandes ou d'abats, impropres à l'alimentation humaine ; cretons.

En 1994, 57000 tonnes de farines de viande ont été produites selon les estimations du SPCGA à partir des sous-produits d'abattage, toutes origines confondues. En effet, de nombreuses sources de matières premières sont utilisées à cette fin, comme le montre le tableau I.4. ci-dessous.

**Tableau I.4.** : Production et rendements (%) des farines obtenues à partir de co-produits d'abattage (source : ADEME, 1993).

Matière première	rendement moyen en farine	protéines brutes	matière grasse	eau	cendres	digestibilité totale
plumes de volaille en général mouillées	30 - 40	80 - 90	3 - 4	7 - 10	1,5 - 5,5	85
Boyaux, viscères, têtes, pattes	35 - 45	50 - 65	12 -15	4 - 8	13 -17	60 - 90
sang entier	18 - 20	80 -87	1	7 -9	3 - 6	95
os, carcasses	45 - 50	33 - 38	-	-	40 - 50	-
mélange d'abats, de viscères, de plumes et de sang	30 - 40	58 - 66	12 - 18	8	8 - 16	75 - 80

Les estimations ci-dessus montrent que les rendements d'obtention de farines à partir de co-produits d'abattage demeurent relativement faibles lors des récupérations classiques de

protéines. Le faible coût de vente des co-produits (Tableau I.5.) devrait inciter les industriels à valoriser ces produits par l'utilisation de technologies nouvelles, mises en place au sein même des entreprises.

**Tableau I.5. :** Exemples de prix de valorisation de co-produits du cinquième quartier.

Produits destinés à l'alimentation humaine	(prix à la pièce des issus de bovin)
tête avec os et cervelle	55 - 60 F
langue	42 F
fresure complète	100 F
abats blancs	35 - 40 F
boyaux	13 F
sang	0,40 - 0,60 F / kg
Produits pour animaux de compagnie:	
foies, poumons, coeurs, petites viandes	2,5 - 4 F / kg
sang	0,40 - 0,60 F / kg
les prix varient sensiblement suivant l'état de la viande (à l'état frais ou congelé)	
Produits opothérapiques :	
bile	1,5 - 2 F / l
pancréas	4 F / kg
Cuir :	
vache	190 - 260 F
jeune bovin	220 - 300 F
os (os venant et os nus)	0,10 - 0,35 F / kg
suifs	0,25 - 0,80 F / kg
cornes et onglons	0,30 - 1,20 F / kg

(Source : ADEME 1993. Dossier FNEAP).

### I.1.3. La valorisation du sang

Malgré la pollution et le coût engendré par les consommations en eau dans les effluents et la non récupération (25 à 30% selon le CEMAGREF, 1990 in ADEME, 1993), le sang reste cependant un co-produit hautement valorisable en raison de ses propriétés fonctionnelles intrinsèques (Quaglia et Massacci, 1982 ; Grigorov *et al.*, 1989 ; Leconte, 1989 ; Auvinen et Oy, 1992 ; Sephton et Clegg, 1993). Le gisement théorique annuel s'élève à 210000 tonnes, soit près de 37000 tonnes de protéines. Le sang potentiel valorisable représente 5% du poids vif, en fonction des conditions de récupération et de traitement, d'hygiène et de réglementation. Actuellement, environ la moitié du sang récupérable (120000 tonnes) est traitée par les équarisseurs pour la production de farine de viande, représentant 50 à 54% de la production totale. L'alimentation pour animaux reste un secteur plus valorisant avec 23000 tonnes de sang brut (8000 tonnes de sang frais, 15000 tonnes de sang congelé), où il est

utilisé pour son taux protéique et son pouvoir liant (Tableau I.6.).

L'industrie du "pet food" (aliments pour animaux de compagnie) en valorise 22000 tonnes en utilisant environ 12000 tonnes de plasma. Les conditions de vente du sang brut restent variables en fonction des quantités collectées (0,25 à 0,55 F / l). Les technologies de traitement destinées à la production de farine pour l'alimentation animale utilisent 5% du sang collecté, dont la majeure partie (75 - 80%) est destinée à l'alimentation directe du bétail.

**Tableau I.6.** : Compositions physicochimiques des différents constituants du sang.

Pourcentage	Sang	Plasma	Cruor
Eau	80 - 85	90 - 92	70 - 78
Matière azotée	15 - 18	5 - 8	21 - 29
Matière grasse	0,15	0,10	0,2
Glucides	0,10	0,10	
Matières minérales	1,05	1,40	0,2
Matière sèche	15 - 20	8 - 10	22 - 30

(Source: Marigny, 1994)

Ces farines sont caractérisées par une forte teneur protéique (90 - 95 %), elles sont riches en acides aminés essentiels (8 - 9 % de lysine) et possèdent une digestibilité proche de 90%.

Cependant, bien que la production soit importante, le marché de la farine de sang est fortement lié à celui de la farine de viande qui tend à se restreindre en raison d'une suspicion d'épizootie (Encéphalite Bovine Spongiforme ou BSE).

Environ 50000 tonnes de sang de qualité irréprochable (présence de germes < 50000 / g pour le sang de gros bovins et pour le sang de porc < 100000 / g) sont valorisées pour l'alimentation humaine. Les utilisations courantes du sang alimentaire (Sephton et Clegg, 1993) restent la salaison - charcuterie où il entre dans la formulation de boudin, saucisse (5 - 10 %), pâté de foie (2 - 3 %), cervelas (12 %). Le plasma frais, congelé ou séché, représentant 15 à 20 % du sang collecté, peut être utilisé pour ses propriétés fonctionnelles dans la fabrication des steacks hachés et la formulation des plats cuisinés (ADEME, 1993).

## **I.2. Composition physico-chimique des os et valorisations actuelles**

Les co-produits majeurs de l'industrie de transformation de la viande sont les graisses, les couennes, les tissus conjonctifs et les os (sur lesquels adhère un potentiel protéique important). En 1973, Duerr et Earle énumèrent les différentes possibilités d'exploitation des

os et leurs applications, au niveau de l'alimentation humaine et animale.

### I.2.1. Composition des carcasses en os

La viande est un milieu très hétérogène, constitué essentiellement de tissus musculaires, adipeux et conjonctifs. La composition des différents tissus (muscles, graisses, os) des carcasses évolue en fonction de l'âge de l'animal et le pourcentage d'os diminue sensiblement de 1 % pour 30 kg de carcasse, en moyenne selon les races (Keane, 1990).

### I.2.2. Les protéines musculaires

Les tissus musculaires contiennent entre 55 et 78% d'eau, 15 à 22% de protéines, 1 à 15 % de lipides, 1 à 2% de glucides et environ 1% de sels minéraux. Strmiskova *et al.* (1993) ont déterminé la composition minérale de viande de boeuf séparée mécaniquement (VSM) à l'aide d'un séparateur hydraulique (type Inject-Star, Laska, Autriche), à partir de viande adhérent aux os de côtes de boeuf (Tableau I.7.). Les résultats ci-dessous montrent l'importance relative du calcium, du potassium et du phosphore présents dans les VSM par rapport aux viandes obtenues par désossage manuel.

**Tableau I.7. :** Composition minérale de viande de boeuf séparée mécaniquement (Strmiskova *et al.*, 1993) par comparaison au désossage manuel (Djujic, 1979).

		Strmiskova <i>et al.</i> , 1993	Djujic, 1979
		VSM	désossage manuel
cendres	(%)	1,81	0,92 - 1,04
Na	(g / kg)	1,56	0,38 - 0,83
K	(g / kg)	2,59	3,64 - 4,82
Ca	(g / kg)	3,09	0,28 - 1,89
Mg	(g / kg)	0,24	0,11 - 0,25
P	(g / kg)	2,86	1,24 - 2,24
Fe	(mg / kg)	40,90	21,60 - 28,60
Zn	(mg / kg)	43,70	19,80 - 25,70
Cu	(mg / kg)	2,02	0,82 - 2,08
Mn	(mg / kg)	0,18	0,15 - 0,22
Matière sèche	(%)	40,10	-

### I.2.3. Les os

Actuellement, les os sont essentiellement destinés à la fabrication de gélatine et de farine destinée à la supplémentation en minéraux pour l'alimentation animale. L'os frais comporte

---

en moyenne 49% d'eau, 16% de lipides (en particulier des phospholipides qui jouent un rôle dans la minéralisation et le métabolisme des os), 12% de protéines et 23% de sels minéraux.

### **I.2.3.1. La fraction inorganique de l'os**

Les os sont formés d'un tissu conjonctif, dont la rigidité est assurée par le dépôt ordonné de sels minéraux. Les fibres osseuses sont composées d'une protéine, le collagène, dans laquelle est incrustée une substance minérale cristalline, le sel d'os. La matrice extra cellulaire organique des os constitue approximativement 35% des tissus en poids, 65% étant représenté par la fraction inorganique (Zarkadas *et al.*, 1995). La fraction inorganique des os est constituée de cristaux de sels complexes de calcium et de phosphate incrustés dans les fibres de collagène. Le sel d'os se présente sous la forme d'apatites naturelles,  $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaX}_2$ , où X peut représenter divers types d'ions. En dehors du calcium et du phosphore, l'os contient du magnésium, du sodium, du potassium, des carbonates, des chlorures et des fluorures (Fourman et Royer, 1969). La fraction inorganique constituée par le sel d'os ne représente que la moitié du poids de l'os frais.

### **I.2.3.2. La fraction organique de l'os**

La matrice organique de l'os est représentée à 95% par le collagène (Fourman et Royer, 1969). Les fibres de collagène sont plongées dans une substance fondamentale, essentiellement constituée d'une mucoprotéine combinée à des aminopolysaccharides (glycoaminoglycans). L'un des plus représentés dans le cartilage et le collagène est le sulfate de chondroïtine, composé de N-acétyl-galactosamine, d'acide glucuronique et de groupements sulfates.

#### **I.2.3.2.a. Le collagène**

C'est la protéine la plus abondante chez les mammifères où elle représente 30% des protéines de l'organisme (Bonnet et Kopp, 1986, 1992). Le collagène est le principal composant fibreux de la peau, des os, des cartilages, des tendons, des vaisseaux sanguins. En fonction du type de tissu, le motif structural de base du collagène est modifié (Miller et Gay, 1987). Quatre types de collagène ont été identifiés (Tableau I.8.).

**Tableau I.8.** : Les différents types de collagène.

Type	Composition	Distribution
I	$[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2$	Peau, tendon, os, cornée
II	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	Cartilage, disque intervertébral, corps vitré
III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	Peau fœtale, système cardiovasculaire
IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_3$	Membrane basale

(Source : Stryer, 1985).

L'unité structurale de base du collagène est le tropo-collagène (poids moléculaire de l'ordre de 300000), formé de trois chaînes polypeptidiques de même dimension (environ 1000 résidus chacune) présentant une conformation hélicoïdale à pas gauche. Les trois brins s'enroulent pour former une super-hélice à torsion droite, stabilisée par des liaisons hydrogène (Etherington et Sims, 1981). Des liaisons covalentes intra- et intermoléculaires entre les résidus de lysine stabilisent cette structure, formant ainsi des fibres (300 nm de longueur ; 1,5 nm de diamètre) ou des réseaux, au sein de la matrice extra-cellulaire des tissus conjonctifs.

Le collagène de type I est le plus répandu, notamment dans la peau où il représente 80% de la matière sèche et 90% en ce qui concerne les tendons, ligaments et os (Swan et Torley, 1991). Le collagène de type II est le composant structural majeur des cartilages et des disques intervertébraux. Contrairement au collagène de type I qui est constitué de 2 chaînes appelées  $\alpha 1(\text{I})$  et  $\alpha 2$ , les autres types ont 3 chaînes identiques.

La séquence primaire des molécules de collagène contient une proportion importante de résidus glycine (1 / 3) situés au centre de la triple hélice en raison du faible encombrement stérique que présente cet acide aminé. La séquence Gly -X - Y apparaît régulièrement, X et Y étant la proline et l'hydroxyproline. La glycine, la proline, l'hydroxyproline et l'alanine (acides aminés non essentiels) constituent les 2 / 3 des résidus. Les acides aminés essentiels (méthionine, tyrosine et histidine) sont rares, la cystine et le tryptophane étant généralement absents.

Deux acides aminés rares sont une particularité du collagène : l'hydroxylysine, sur laquelle sont liées des unités glucidiques par liaison covalente et l'hydroxyproline qui représente environ 14% de la matière sèche du collagène (Etherington et Sims, 1981).

Les tissus conjonctifs sont également riches en protéoglycans qui constituent la substance fondamentale. Ces composés, formés d'unités polyosidiques (95%) et protéiques (5%),

interviennent dans les propriétés élastiques des articulations et des structures soumises à des déformations mécaniques. D'après Swan et Torley (1991), le collagène cartilagineux contient environ 3% d'unités osiques alors que les autres types n'en contiennent que 0,4%.

La réglementation du rapport collagène / protéines dans de nombreux produits carnés (steack hachés, rillettes, pâtés de viande...) est basée sur la détermination du collagène dont il existe de nombreuses méthodes de détection et d'estimation (Woessner, 1976 ; Etherington et Sims, 1981). On peut citer notamment un dosage colorimétrique très rapide, après hydrolyse acide (HCl 6M, 110°C, 18 - 24h) ou en milieu perchlorique (100°C, 2 - 4h).

La proline représente environ 20% de la composition totale en acides aminés. Près de la moitié est hydroxylée en 4-hydroxyproline immédiatement après la synthèse de la chaîne polypeptidique (Etherington et Sims, 1981). C'est la raison pour laquelle le dosage de l'hydroxyproline est utilisé pour quantifier le collagène. Cependant, Zarkadas *et al.* (1988 a) ont montré que la 5-hydroxylysine, exclusivement présente dans le collagène, serait un meilleur marqueur. Selon Miller et Gay (1987) et Zarkadas *et al.* (1988 a, 1988 b, 1995), un coefficient moyen tenant compte de la proportion des différents types de collagène, peut être utilisé en utilisant l'hydroxyproline :

Collagène = 4-hydroxyproline x 8,03 (Zarkadas *et al.*, 1995)

Collagène = 4-hydroxyproline x 7,1 (Laser-Reuterswärd *et al.*, 1982).

Malgré la réglementation en matière de produits carnés selon le code de la Charcuterie-Salaison et Conserves de Viande (taux d'hydroxyproline x par un facteur = 8), il serait plus rationnel d'exprimer les résultats en teneur d'hydroxyproline en raison de la variabilité présentée par cet acide aminé dans les différents types de collagène : type I : 11,3% ; type II : 12,9% ; type III : 15% ; type IV : 14,3% (Etherington et Sims, 1981).

#### **I.2.3.2.b. La gélatine**

Lorsqu'une solution de collagène est soumise à un traitement thermique, d'importantes modifications de ses propriétés physiques apparaissent. L'agitation thermique déstabilise les interactions coopératives et conduit à une structure désorganisée appelée gélatine.

Les os représentent environ 50% de l'origine de la gélatine produite, l'autre moitié provenant des peaux et des couennes fraîches de porc. Outre son débouché alimentaire (60% de production de gélatine), la gélatine est utilisée, selon sa qualité, pour la synthèse d'émulsions photographiques (18%), en industrie pharmaceutique et cosmétologique (12%), ainsi que

dans les domaines de la fabrication des textiles, colles et papiers (10%) (Lang, 1990).

Le principe général consistant à transformer le collagène insoluble en gélatine soluble est largement décrit dans la littérature (Veis, 1964 ; Courts, 1980 ; Ledward, 1986). L'extraction de la gélatine s'effectue en multiples étapes à partir des peaux de bovins et ovins, des couennes fraîches de porc et d'os. Les procédés d'extraction des gélatines sont relativement longs, qu'elles soient de type A (os concassés, déminéralisés et dégraissés ; extraction acide ; point isoélectrique compris entre pH 6,3 et 9,5) ou de type B (extraction alcaline ; point isoélectrique compris entre pH 4,5 et 5,2).

L'un des critères de stabilité du collagène est sa température de fusion ( $T_m$ ) pour laquelle on considère que la moitié de la structure hélicoïdale est dénaturée. Cette température dépend du type de collagène et de la nature du tissu étudié. Horgan *et al.* (1991) ont montré que la température de transition thermique, mesurée par calorimétrie différentielle, sur du collagène intramusculaire et du tendon de muscle *Longissimus dorsi* de bovin, diminue en fonction du pH de 62°C (pH 7,4) à 57°C (pH 4,25). Laser-Reuterswärd *et al.* (1985) montrent qu'un traitement thermique de 74°C pendant 30 mn permet d'améliorer la digestibilité de la couenne de porc et de tendon de bovin.

#### **I.2.4. Utilisation des tissus conjonctifs et de la gélatine en formulation de plats cuisinés : les hydrolysats de collagène**

Dans le secteur alimentaire, la gélatine est utilisée comme un aliment et non comme additif (à l'exception de la charcuterie où sa teneur est limitée). Dans l'industrie des produits carnés, des études montrent que l'incorporation de tissus conjonctifs dans des mêlées ne modifie pas leur stabilité mais permet de diminuer la proportion de matière grasse incorporée (Eilert *et al.*, 1993). La gélatine est principalement utilisée comme liant dans la formulation de plats cuisinés (Thirot, 1991). Elle est souvent incorporée dans les émulsions de viande, les jambons démoulés cuits, les épaules cuites, les gelées, où elle limite l'exsudation d'eau et de matière grasse (Swan et Torley, 1991). La gélatine est utilisée comme stabilisateur dans les laits gélifiés, les desserts lactés, les glaces, mais aussi en tant que gélifiant dans les gommages, caramels, nougats...

En raison de sa structure particulière (Cheftel, 1977), le collagène est extrêmement résistant, sous sa forme native, à la protéolyse enzymatique *in vitro* (à l'exception de l'utilisation de collagénases : Swan et Torley, 1991). De nombreux auteurs ont étudié la solubilisation du collagène par hydrolyse enzymatique. Les traitements enzymatiques combinant la pepsine

---

(2 h ; pH 1,5 ; 37°C), puis la pancréatine (2 h ; pH 6,8 ; 37°C), suivis d'un traitement chimique (TCA, concentration finale de 25%), permettent d'obtenir une solubilisation du collagène comprise entre 81 et 97% (Laser-Reuterswärd, 1985).

L'hydrolyse du collagène dépend de nombreux paramètres comme l'âge de l'animal, la nature des tissus conjonctifs, le traitement thermique préalable, ainsi que la durée du traitement et la nature des enzymes utilisées (Laser-Reuterswärd, 1985).

Chomarat *et al.* (1994) ont comparé l'action de la proctase d'*Aspergillus niger* à celle de la pepsine sur les rendements et les propriétés du collagène et de la gélatine obtenus à partir de peau de bovin. Les deux enzymes aboutissent à un rendement voisin, mais de nombreuses altérations physico-chimiques apparaissent avec la proctase, malgré l'intérêt porté à cette enzyme en raison de son faible coût.

L'utilisation de solutions enzymatiques (Petersen, 1981 ; Carbonneil, 1986 ; Wassef *et al.*, 1988) permet de réduire considérablement la viscosité et d'éliminer le pouvoir gélifiant de solutions de collagène ou de gélatine destinées à la formulation de desserts et de boissons.

Des études récentes, menées en Allemagne par l'Institut Fédéral de Recherche sur la Viande (Anonyme, 1993), ont montré que l'addition d'un hydrolysate de collagène (ayant perdu ses propriétés gélifiantes) à des produits à base de viande, permet de réduire de 20% les teneurs en sels.

Les saveurs ne sont pas affectées et sont distribuées plus uniformément dans les produits rendus plus homogènes. L'utilisation d'hydrolysats de collagène comme ingrédient de formulation ne nécessite pas de numéro conventionnel devant figurer sur l'étiquetage, si ce n'est l'appellation gélatine. Néanmoins, une étude menée par Hofmann et Marggrander (1989) montre que l'addition d'hydrolysats de gélatine (2%) à différents produits à base de viande, en tant que substitut de sels, dépend de la nature et de la composition du produit testé.

***LES PROCEDES DE VALORISATION  
DES CO-PRODUITS D'ABATTAGE***

---

## **II. LA VALORISATION DE LA FRACTION PROTEIQUE DES CO-PRODUITS**

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont été menées sur le développement de procédés devant déboucher sur la valorisation de co-produits d'origine végétale, animale ou issus du milieu marin (Le Roux, 1982 ; Weir, 1986 ; Davidek, 1990 ; Dave *et al.*, 1991).

### **II.1. Les procédés chimiques**

L'extraction protéique par voie chimique a été appliquée très largement à la viande de qualité moyenne ou médiocre, aux organes divers tels que poumons, rumens et estomacs (Young et Lawrie, 1974, 1975 ; Gault et Lawrie, 1980), ainsi qu'aux résidus de viande adhérant aux os (Jelen *et al.*, 1979 ; Dondero *et al.*, 1987). A ce propos, les auteurs déterminent les conditions optimales (types d'acide, température, concentration, pH) pour obtenir des rendements compris entre 75 et 81%.

#### **II.1.1. Les concentrats protéiques**

Les conditions d'obtention de concentrés protéiques (Nash et Mathews, 1971 ; Toledo, 1973) par élimination des constituants non protéiques (eau, matière grasse, substances minérales) restent drastiques : utilisation de solvants organiques, traitements thermiques sévères, réactifs chimiques. Ces méthodes affaiblissent considérablement les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des produits obtenus.

#### **II.1.2. Les isolats protéiques**

Différents procédés d'extraction protéique permettant la valorisation de co-produits de viande séparée mécaniquement se sont développés au cours des années soixante-dix. La production d'isolats améliore les propriétés fonctionnelles du fait de conditions d'extraction plus douces. Dans un premier temps, les protéines sont solubilisées, puis elles sont séparées du co-produit insoluble. Elles sont ensuite récupérées sélectivement préservant au mieux leurs propriétés physicochimiques. Young et Lawrie (1974) ont étudié les conditions d'extraction (pH, température, concentration en sels) permettant d'améliorer la récupération des protéines à partir des sous-produits de la viande bovine et ovine (estomac, poumon, rumen), en caractérisant les isolats protéiques par électrophorèse (Young et Lawrie, 1975). Young

(1975, 1976) obtient des isolats à partir de co-produits de volaille (tête, cou, carcasse...) mis en suspension dans des solutions salines (maléate de sodium 0,1 M, pH 7, NaCl force ionique 0,5). Cette étape permet la solubilisation des protéines résiduelles sous agitation très rapide, suivie d'une phase de repos (2 heures à 2°C). Une précipitation des protéines contenues dans le milieu d'extraction est ensuite effectuée par différentes méthodes douces, préservant ainsi leurs propriétés fonctionnelles (précipitation isoélectrique, relargage par modification de la force ionique, coagulation par la chaleur). Les faibles valeurs de solubilité (<10%) peuvent être légèrement améliorées en modifiant la force ionique, ainsi que par addition de polyphosphates. Kijowski *et al.* (1985) obtiennent des isolats de sous-produits de volailles (3% de protéines en solution) en milieu salin (6% NaCl ; 0,015% NaNO<sub>2</sub> ; 0,05% ascorbate de sodium ; 0,3% pyrophosphate de sodium) puis étudient les propriétés fonctionnelles et rhéologiques sur des saucisses. Les résultats obtenus montrent des améliorations au niveau de la couleur, de la consistance (augmentation de la résistance au cisaillement), ainsi que de la flaveur.

Husain et Chaudhry (1991, 1992) déterminent les conditions d'extraction optimale de protéines de foie dans un tampon phosphate pour compléter les régimes protéiques infantiles au Pakistan.

### II.1.3. Les hydrolysats chimiques

De nombreux procédés de récupération protéique utilisant la voie alcaline ont été mis au point. Des isolats protéiques de poumons peuvent être préparés par homogénéisation en milieu basique (pH 10,5, T<10°C) suivie d'une précipitation par addition de HCl jusqu'à pH 5,0 (Arêas *et al.*, 1993). Les auteurs montrent que l'extraction par des solvants organiques de polarité différente (tétrachlorure de carbone, chloroforme, dichlorométhane, isopropanol et méthanol) affecte les propriétés de solubilité (mesurée à pH 6,0 ; 280 nm) et d'hydrophobicité en fonction de la quantité résiduelle de lipides. En Inde, Babu *et al.* (1993) utilisent la voie alcaline (2 h ; pH 10 ; précipitation à pH 4,5) pour produire des isolats protéiques de poumon et de rumen d'ovins à incorporer dans des pâtés (jusqu'à 20%), sans modification de leur acceptabilité. Des résultats similaires ont été obtenus par Jelen *et al.* (1982), sur des protéines de volailles obtenues par extraction alcaline.

Parmi les divers procédés d'extraction protéique par voie chimique cités ci-dessus, très peu sont exploités à l'échelle industrielle. En outre, Lawrence *et al.* (1982) montrent que le transfert à l'échelle pilote, l'extraction alcaline (pH 10) et la précipitation acide (pH 5,3) sur des co-produits de volaille, entraînent des problèmes d'ordre mécanique et des pertes de

rendement protéique. Ces problèmes sont étudiés par Mc Curdy *et al.* (1986) qui déterminent les paramètres influençant l'extraction protéique alcaline à l'échelle pilote (broyage, température, vitesse de centrifugation). Afin de déterminer les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des isolats, Ozimek *et al.* (1986) procèdent à des extractions protéiques de co-produits de poulet en milieu alcalin (20% NaOH, pH 10,5 ; 23°C ; 30 mn) suivies d'une neutralisation à pH 5,4, selon la méthode de Lawrence *et al.* (1982). Les indices de solubilité protéique obtenus par ce procédé d'extraction, restent relativement faibles et varient peu (de 11,1 à 12,7 en passant de l'eau à NaCl 2,0 M). En 1991, Opiacha *et al.* montrent que l'utilisation d'un procédé d'extraction par voie alcaline (Jelen *et al.*, 1979 ; Lawrence et Jelen, 1982) permet d'obtenir des valeurs de digestibilité comprises entre 85 et 89%, proche de la protéine de référence (caséine: 93,5%). Cependant, l'hydrolyse chimique entraîne une destruction de certains acides aminés (tryptophane, acide aspartique, phénylalanine, sérine, acide glutamique) diminuant la valeur nutritionnelle du produit (Fik et Surowka, 1986). D'autre part, Swingler et Lawrie (1979) ainsi que Lawrence et Jelen (1982) indiquent que les procédés d'extraction protéique par voie alcaline entraînent la formation de lysino-alanine. Des concentrations relativement importantes de ce di-peptide toxique apparaissent au delà d'une heure au dessus de 50°C (Davidek, 1990 ; Finley, 1989).

## II.2. Les procédés mécaniques

Un procédé utilisant des hydrocyclones a été développé par Hansen et Finn (1992) pour récupérer la fraction protéique d'os broyés (taille moyenne des résidus : 20 mm), puis mis en suspension à raison de 5 à 25% de matière sèche. Ce procédé, compatible avec un traitement enzymatique du substrat permet d'obtenir, après séchage, une fraction riche en protéines (70% de matière sèche) et une fraction riche en os (contenant encore 40% d'ossein). Des procédés d'extraction sous pression (2,2 kg / cm<sup>2</sup>, 2 h) sont utilisés pour préparer des isolats protéiques à partir de viande adhérant encore aux os de boeuf (Abdel-Gawwad *et al.*, 1990). Un procédé similaire est utilisé par Polic *et al.* en 1991. Dans les deux cas, les isolats atomisés, utilisables dans des produits à base de viande, contiennent sensiblement 92% de protéines.

## II.3. Les procédés enzymatiques

Les procédés enzymatiques offrent des possibilités d'applications plus importantes que l'hydrolyse par voie acide ou alcaline (Petersen, 1981). Ils permettent la valorisation de matière protéique comme agent ou exhausteur de saveurs dans la formulation de plats

cuisinés (Lieske et Konrad, 1994), en alimentation spécifique dans le milieu médical (Fenwick, 1991 ; Schmidl *et al.*, 1994) ou en tant que supplémentation protéique dans l'industrie de la boisson ou l'alimentation sportive (Frokjaer, 1994). Plusieurs raisons expliquent la supplantation des voies chimiques par ces procédés. Les modifications protéiques effectuées par des enzymes spécifiques, les conditions de réaction incomparablement plus rapides et moins sévères (faible température, diminution du coût), constituent des avantages certains sur la préservation des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des produits (Webster *et al.*, 1982 ; Andrews, 1986 ; Hamada, 1992).

Nous ne développerons pas ici les procédés d'obtention d'autolysats (Lieske et Konrad, 1994), produits traditionnels importants dans l'alimentation des populations du sud-est asiatique (Weir, 1986). De même, l'utilisation de protéases exogènes, accélérant la maturation des viandes (Pintauro, 1979 ; Dransfield et Etherington, 1981 ; Wilson *et al.*, 1992 ; Takagi *et al.*, 1992) ou l'action des protéases endogènes, intervenant dans les processus de maturation, ne seront pas abordés (Ouali *et al.*, 1988).

Dans la plupart des cas, les études de récupération protéique par voie enzymatique sont menées sur des substrats végétaux (Wassef *et al.*, 1988 ; Marquez Moreno et Fernandez Cuadrado, 1993) et les produits de la mer (Owens et Mendoza, 1985 ; Quaglia et Orban, 1987 a et 1987 b ; Kirk et Gordon, 1988 ; Yu et Tan, 1992 ; Gildberg, 1993). Les produits laitiers (Motion, 1992 ; Schmidt et Markwijk, 1993) sont notamment utilisés pour la production de peptides hypoallergéniques (Mahmoud *et al.*, 1992 ; Nakamura *et al.*, 1993 ; Cordle, 1994). Les produits carnés restent cependant un potentiel protéique non négligeable (O'Meara et Munro, 1984 a, 1985).

Les procédés d'hydrolyse enzymatique développés au stade pilote ou industriel sont, en majeure partie, de type discontinu. Classiquement utilisé pour optimiser les procédés, l'hydrolyse en batch présente l'avantage de limiter le développement bactérien en raison de la rapidité de la réaction enzymatique. En effet les basses températures de la réaction protéolytique, ainsi que les valeurs de pH proche de la neutralité, peuvent favoriser les développements microbiens. Bien qu'il soit nécessaire d'inactiver les protéases, ces procédés discontinus restent plus rentables que les procédés utilisant des enzymes immobilisées, utilisables uniquement pour des substrats liquides homogènes (Cheftel *et al.*, 1971 ; Haque et Mozaffar, 1992 ; Sannier *et al.* 1993 ; Lahl et Braun, 1994).

### **II.3.1. Les enzymes utilisées en technologie alimentaire**

L'utilisation d'enzymes en technologie alimentaire n'est pas une nouveauté. Neidleman (1991) relate les principales études effectuées et méthodes employées depuis 1752 sur les

propriétés catalytiques des enzymes. Tous les secteurs de l'industrie agro-alimentaire (boulangerie, brasserie, distillerie, jus de fruits, laits et dérivés, vinification) sont concernés, soit pour faciliter les procédés, améliorer la conservation, les caractéristiques organoleptiques ou nutritionnelles, soit pour permettre la valorisation de certains sous-produits (Eriksen, 1989 ; Ducastaing et Adrian, 1990 ; Frost, 1992).

Il n'est pas dans notre intention d'énumérer la liste et les secteurs d'utilisation des enzymes utilisées dans le domaine industriel. Bien que le nombre d'enzymes connues soit supérieur à 2000, une douzaine de classes d'enzymes sont utilisées industriellement, ce qui représente une trentaine d'enzymes différentes dont 80% sont des hydrolases (Ducroo, 1992). Des travaux exhaustifs font le point sur ce sujet (Hale, 1969 ; Cowan, 1983 ; Ory *et al.*, 1989 ; Frost, 1992 ; Wiseman, 1993). O'Meara et Munro (1984 b) étudient l'efficacité protéolytique (temps d'hydrolyse de 3 à 5 heures, température d'utilisation, coût de l'enzyme) de 13 protéases sur de la viande de boeuf dégraissée afin de sélectionner l'enzyme ayant les meilleures caractéristiques pour une utilisation industrielle.

Les procédés enzymatiques au niveau industriel n'exigent pas d'enzymes pures. On utilise surtout des préparations de pepsine, de trypsine et de chymotrypsine (origine animale) ; la papaïne et la ficine sont les principales préparations enzymatiques d'origine végétale. Compte tenu d'un coût moindre, les enzymes microbiennes extraites de levures, de bactéries ou de moisissures, sont de plus en plus employées à l'échelle industrielle (Frost, 1986). Ce sont principalement des "préparations enzymatiques" exemptes d'activité contaminante ou technologiquement gênante. Les préparations enzymatiques utilisées dans l'industrie alimentaire sont soumises à autorisation (Codex alimentarius de la F.A.O. / O.M.S. ou de la Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes) et doivent provenir de micro-organismes non pathogènes et non toxicogènes.

Les hydrolysats partiels de protéines ou protéolysats ménagés, destinés à servir d'ingrédients d'apport protéique dans la fabrication de certains aliments pour l'alimentation humaine, sont soumis à une législation particulière (Journal Officiel de la République Française, 1989). Les seules enzymes pouvant être utilisées dans la production d'un hydrolysats sont les suivantes :

- pepsine, chymotrypsine, trypsine, extraits de muqueuses intestinales, extraits pancréatiques, chymosine et papaïne.
- les protéases à résidu sérine de *Bacillus Subtilis*, de *Bacillus licheniformis*, de *Aspergillus oryzae* et de *Aspergillus wentii*.
- les protéases acides de *Aspergillus oryzae*, de *Aspergillus wentii*, de *Mucor Miehei*, de *Mucor pusillus* et de *Endothia parasitica*.

### II.3.2. Mesure de l'activité d'une solution enzymatique

Il existe un grand nombre de méthodes permettant de quantifier le niveau d'activité d'une enzyme, utilisant des substrats naturels (hémoglobine, caséine) ou synthétiques (N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine éthylester : BAEE ; p-toluènesulfonyl-L-arginine méthyl ester : TAME). L'activité catalytique s'exprime généralement en unité de substrat hydrolysé, dans des conditions bien définies : temps, température, pH, concentration, et rapport enzyme / substrat. De nombreuses unités sont utilisées à cette égard (Unité Internationale, Anson, BAEE, TAME), bien que dans un but de standardisation, le Katal (Kat) ait été proposé (Le Roux, 1982). Le Katal est défini comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion d'une mole de substrat par seconde (1 UI = 16,67 nanokatal).

### II.3.3. Mécanismes et cinétiques des procédés d'hydrolyse enzymatique

De nombreux auteurs se sont intéressés aux mécanismes des réactions d'hydrolyse de substrats protéiques solubles et homogènes, tels que le poisson (Archer *et al.*, 1973 ; Pigott *et al.*, 1978), le lactose (Yang et Okos, 1989), la caséine (Krause *et al.*, 1992 ; Rubio *et al.*, 1993) les protéines végétales (Marquez Moreno et Fernandez Cuadrado, 1993) ou la viande (O'Meara et Munro, 1981, 1984 b, 1985). De nombreux paramètres agissent sur les mécanismes d'hydrolyse, à savoir le pH, la durée d'hydrolyse, la température, la concentration enzyme / substrat et la concentration protéique.

L'influence de ces facteurs a été étudiée par O'Meara et Munro (1984 b), sur de la viande dégraissée (Alcalase<sup>®</sup> 0,6L ; pH 7 - 9,5 ; durée : 0,25 - 5h ; température : 50-70°C). Les résultats montrent que la majeure partie de la viande est hydrolysée au cours de la première heure. Les cinétiques s'expliquent par la spécificité d'action des protéases sur les liaisons peptidiques les plus accessibles au début de la réaction. En 1985, les mêmes auteurs étudient les mécanismes d'hydrolyse de protéines myofibrillaires et de tissus conjonctifs par l'Alcalase<sup>®</sup> 0,6L pour optimiser le procédé d'extraction protéique à partir d'un substrat hétérogène. L'inhibition est évaluée par les produits de la réaction, l'adsorption et l'inactivation de la protéase.

Deux modèles cinétiques sont proposés : le premier est Michaelien, alors que le second prend en compte l'adsorption de l'enzyme sur le substrat avant la réaction. Cependant, de nombreuses hypothèses sont avancées par les auteurs :

- la vitesse d'hydrolyse des liaisons peptidiques est constante
- le complexe enzyme-substrat est stable
- la formation du complexe enzyme-inhibiteur est indépendante de la liaison peptidique
- l'inactivation de l'enzyme est du premier ordre.

En 1993, O'Meara et Munro déterminent les mécanismes d'hydrolyse de protéines végétales par l'Alcalase<sup>®</sup> 0,6L (pH 8 ; 50°C) en réacteur discontinu. Les auteurs développent un modèle faisant apparaître une inhibition par le substrat et une inactivation enzymatique du second ordre, dépendant de la concentration en substrat. Des résultats similaires sont obtenus par Rubio *et al.* (1993) qui étudient les facteurs intervenant au cours de la réaction d'hydrolyse d'une solution de caséine en réacteur discontinu de 250 ml (Alcalase<sup>®</sup> 0,6L ; pH 8 ; 50°C). L'étude du degré d'hydrolyse (méthode du pH-stat), de la concentration en enzyme et en protéine, ainsi que de la durée d'hydrolyse conduit à l'élaboration d'un modèle où l'inactivation de l'enzyme serait du deuxième ordre.

### II.3.3.1. Le substrat

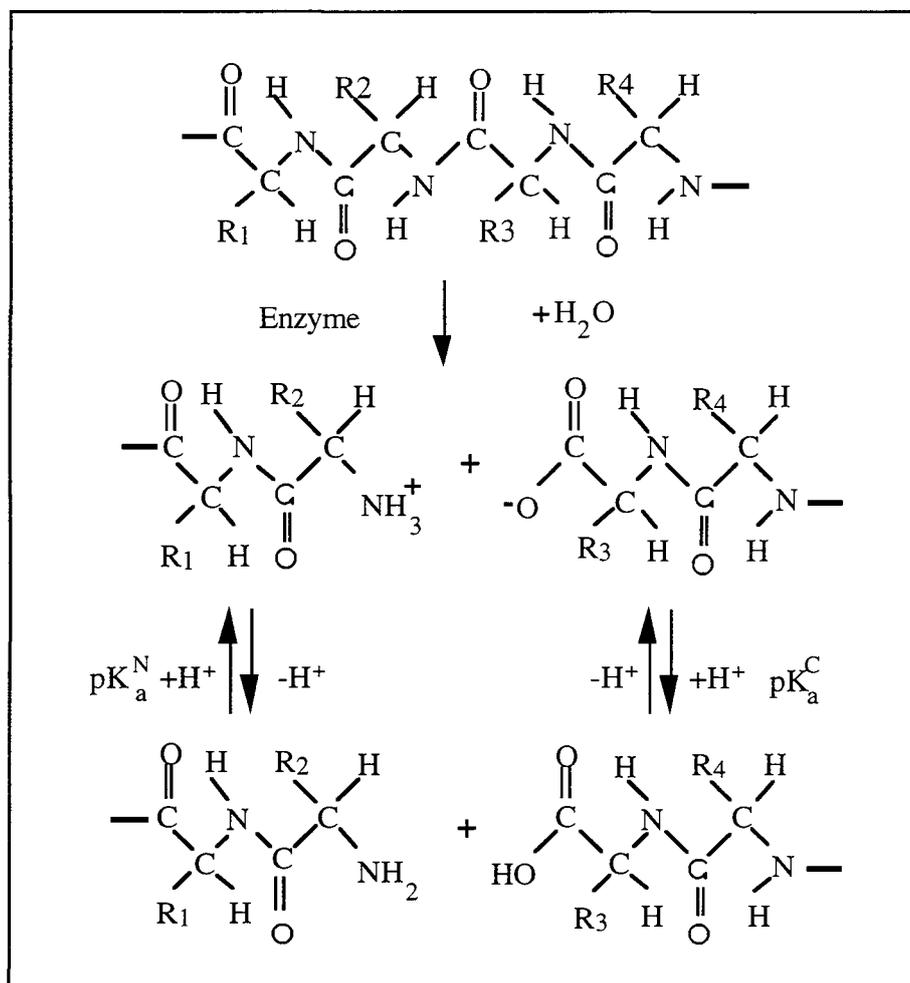
La structure tridimensionnelle des protéines natives offre une résistance certaine à la protéolyse (Adler-Nissen, 1976). Les protéines, assemblages complexes d'acides aminés, associent fréquemment de nombreux groupes de nature glucidique, lipidique ou phosphorique (Lehrman, 1990). Le clivage des liaisons peptidiques par les protéases entraîne l'apparition de produits dont les caractéristiques cinétiques dépendent du substrat et de la nature de l'enzyme utilisée (Adler-Nissen, 1976).

La rupture des liaisons peptidiques entraîne une augmentation du nombre de groupements polaires ( $-\text{NH}_3^+$ ) et ( $-\text{COOH}$ ) se traduisant par une augmentation de l'hydrophilie totale du produit, une modification de la configuration moléculaire, ainsi que par une diminution concomitante du poids moléculaire des chaînes polypeptidiques.

En fonction du pH de la réaction, le pourcentage de dissociation  $\alpha$  des groupements carboxyles et aminés libérés, dépend de leurs pK respectifs (O'Meara et Munro, 1984). Selon Steinhardt et Beychok (1964), les valeurs de pK à 25°C des groupements ( $-\text{COOH}$ ) et ( $-\text{NH}_3^+$ ) sont respectivement estimés entre 3,1 - 3,6 et 7,5 - 7,8. Selon le type de protéase utilisée et de son pH optimal, la réaction d'hydrolyse libère ou consomme des équivalents  $\text{H}^+$ , ce qui entraîne une variation de pH, excepté pour les valeurs comprises entre pH 5 et 6.

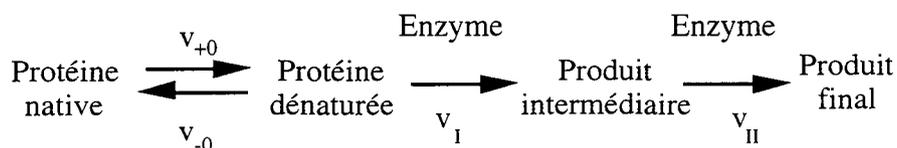
Au cours de la réaction d'hydrolyse, les enzymes catalysent la coupure des liaisons

peptidiques de substrats protéiques selon la réaction suivante :



(Margot *et al.*, 1994)

En 1952, Linderström-Lang propose que l'hydrolyse initiale du substrat peut conduire à deux types de réactions en fonction de la vitesse de dénaturation :



La vitesse de réaction de dénaturation s'exprime par la réaction suivante :  $v_0 = v_{+0} - v_{-0}$   
 si  $v_0 \ll v_{\text{I}}$  : la première réaction est limitante et l'hydrolyse aura lieu selon une cinétique imposée par  $v_0$ . Le mélange réactionnel sera principalement composé de protéines natives et

de produits terminaux. Cette réaction est du type "one by one" selon la terminologie de Linderström-Lang.

si  $v_I \ll v_O$  : le substrat initial est rapidement converti en produits intermédiaires, avant d'être dégradé en produits terminaux. Cette réaction est dite de type "zipper". En fait, la réaction de protéolyse réelle est une réaction intermédiaire entre ces deux états (Adler-Nissen, 1976).

L'utilisation de la voie enzymatique est devenue progressivement l'un des moyens les plus attrayants pour valoriser le potentiel protéique que représentent les co-produits d'origine animale. Les co-produits de volailles restent un substrat particulièrement valorisé par ce procédé (Galvao et Beraquet, 1992). Par exemple, Fik et Surowka (1986) déterminent les conditions optimales de production à l'échelle pilote d'hydrolysats protéiques de tête de poulet par la papaine (60°C ; pH 7 ; 2 g d'enzyme par kg de substrat). Ils obtiennent 7 kg de concentré et 19,2 kg de résidus à partir de 100 kg de substrat, au cours d'une hydrolyse optimale de 4 heures. En 1992, ces mêmes auteurs déterminent l'influence du type de protéase sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles des hydrolysats protéiques de poulet en utilisant une neutrase de *Bacillus subtilis* (55°C ; pH 7 ; 6 h) et en 1994, la pepsine (55°C ; pH 1,5 ; 5 h).

Cependant une connaissance approfondie et la régulation des nombreux paramètres intervenant au cours des procédés enzymatiques sont nécessaires pour parvenir à des produits de qualité (Adler-Nissen, 1982 ; O'Meara et Munro, 1984).

### **II.3.3.2. La nature de l'enzyme, sa spécificité et son activité catalytique**

La sélection de la protéase ou du système multi-enzymatique doit tenir compte de la nature du substrat à hydrolyser, mais aussi des conditions expérimentales (O'Meara et Munro, 1984). Un procédé d'obtention d'hydrolysats, à partir de viande adhérant aux os de boucherie, a été breveté en 1972 par Moss et Trautman, à l'échelle industrielle (traitement de 1500 kg par "batch"). Les auteurs utilisent la papaine, la pancréatine ou la ficine (concentration en enzyme : 0,2%) pour obtenir des hydrolysats au bout de 40 heures, l'hydrolyse est suivie d'une inactivation à 100°C pendant 15 mn. Concentrés à 50%, les produits subissent un traitement acide (acide chlorhydrique pendant 16 heures) avant neutralisation à la soude. La formation de NaCl permettrait, selon les auteurs de masquer l'amertume et développer le goût de viande.

Webster *et al.* (1982), Brady *et al.* (1983) ainsi que Ledward et Lawrie (1984) utilisent des enzymes spécifiques à 50°C (Alcalase<sup>®</sup> pH 8,5 ; Neutrase<sup>®</sup>, pH 7,0 ; papaine, pH 5,5 ;

pepsine, pH 3,0 ; durée d'hydrolyse 4 h) pour préparer des hydrolysats de sang, de poumon et de rumen (rendement de 45 à 85%). Les auteurs montrent que lorsque les paramètres E / S, durée d'hydrolyse et concentration en substrat sont fixés, la spécificité de la protéase reste déterminante sur les propriétés fonctionnelles des hydrolysats obtenus. Bien que la papaine reste l'enzyme la plus efficace, les auteurs remarquent que seuls les produits obtenus par hydrolyse en présence de Neutrase<sup>®</sup> contiennent de fortes proportions en gélatine. Lors du refroidissement, les produits ne gélifient pas. Hafiz *et al.* (1993) optimisent à l'échelle du laboratoire les conditions d'extraction protéique à partir de co-produits (poumon) par la pepsine ( pH 2 ; 50°C ; 24h).

Behnke *et al.*, (1984) déterminent les conditions optimales pour valoriser les fractions protéiques adhérant aux os de porc et de boeuf en utilisant 4 préparations enzymatiques différentes (protéase alcaline, thermitase, pancréatine et enzyme de *Bacillus amyloliquefaciens*). Il semble que la thermitase (60°C ; 6 h) reste la protéase la plus efficace pour la production d'hydrolysats "exhausteurs de goût de viande".

L'optimisation des conditions opératoires permet de diminuer considérablement la durée pour atteindre un degré d'hydrolyse souhaité. Il faudra tenir compte de la nature du substrat étudié car les valeurs rapportées par les différents auteurs ont souvent été obtenues avec des substrats purifiés tel que la caséine ou l'hémoglobine (Petersen, 1981). Bien que la spécificité enzymatique soit considérée comme le critère le plus important, de nombreux facteurs, comme le pH optimal, la thermostabilité, le coût et la législation, interviennent aussi.

### **II.3.3.3. Le rapport enzyme-substrat**

Des études menées par Quaglia et Orban (1987a, 1987b) portant sur la valorisation de protéines de sardine par hydrolyse enzymatique (papaine, Neutrase<sup>®</sup>, Alcalase<sup>®</sup>), montrent que le rapport enzyme / substrat (E / S) influence le taux d'hydrolyse en fonction de l'enzyme utilisée, ainsi que la taille des peptides résiduels. En effet, les auteurs montrent que la vitesse de protéolyse est fonction de la concentration en enzyme. L'influence de ce paramètre a été étudiée par O'Meara et Munro (1984) sur l'hydrolyse de viande dégraissée. Il semble que pour des rapports enzyme / viande assez élevés (80 mg / g), une solubilisation supérieure à 80% ne peut être obtenue, en raison de la spécificité d'action de l'enzyme.

Chambers et Rasmussen (1988) utilisent un rapport enzyme / substrat compris entre 2 et 3% de la fraction protéique pour obtenir des hydrolysats avec des rendements proches de 70 % et ne présentant pas d'amertume. Jepsen et Rasmussen (1988) ainsi que Sorensen et Rasmussen (1989) développent le procédé à l'échelle industrielle. Les auteurs obtiennent des

hydrolysats destinés à l'alimentation humaine en utilisant la Neutrase®. En 1990, Rasmussen et Rancke-Madsen déposent un brevet sur un procédé enzymatique permettant de traiter les viandes séparées mécaniquement. Le procédé utilise des endo-protéases à large spectre, proche de la neutralité. L'augmentation de la viscosité de la suspension est mise à profit pour déterminer la durée de l'hydrolyse optimale, avant dénaturation des protéases.

#### II.3.3.4. Le pH et la température

Chaque protéase possède un pH optimal autorisant un faible domaine de variation, de l'ordre de 0,5 à 1,0 unité pH. Le facteur température est directement lié à la durée de la réaction d'hydrolyse (Petersen, 1981 ; O'Meara et Munro, 1984). Ainsi, la solubilisation de la viande en présence d'Alcalase® 0,6L doit-elle être effectuée à des températures comprises entre 55 - 60°C, durant plus de 3 heures, en raison de la dénaturation progressive des tissus conjonctifs. Les traitements thermiques nécessaires pour dénaturer les protéases en fin de réaction varient, entre autres, selon la nature des substrats, le type et la concentration de l'enzyme utilisée (Tableau I.9.).

**Tableau I.9.** : Barème d'inactivation (temps / température) des enzymes en fonction des conditions expérimentales et du substrat utilisé.

Auteurs	enzymes	substrats	barème temps / température
Moss et Trautman (1972)	papaïne, pancréatine, ficine	viande adhérent aux os de boeuf	10 - 20 mn ; 100°C (pour la papaïne)
Jepsen et Rasmussen, (1988)	Alcalase®	viande adhérent aux os de boeuf	3 mn ; 85°C
Petersen (1981)	Neutrase® Alcalase®		2 mn ; 85°C 15 s ; 95°C
O'Meara et Munro (1985)	Alcalase®	viande dégraissée	pH 8,5 ; 60°C dépend du substrat
Sorensen et Rasmussen (1989)	Alcalase®	viande adhérent aux os de boeuf	6mn ; 85°C
Surowka et Fik (1992) (1994)	neutrase pepsine	co-produits de poulets	15 mn ; 95°C 15 mn ; 95°C
Webster <i>et al.</i> (1982) Brady <i>et al.</i> (1983)	Alcalase®	poumon, rumen	30 mn ; 90°C

L'utilisation de protéases dont l'activité catalytique maximale se situe à pH acide conduit à des hydrolysats pouvant être utilisés comme exhausteurs de goût ou additifs protéiques, mais dont les propriétés fonctionnelles restent limitées (Ledward et Lawrie, 1984). D'autre part, la neutralisation peut entraîner la formation d'une quantité importante de chlorure de sodium

qui, selon les applications, peut être appréciée pour son rôle conservateur (Lieske et Konrad, 1994) ou ne pas convenir pour des aliments diététiques par exemple. Archer *et al.* (1973) montrent qu'il est possible d'éliminer la production de sels lors de la régulation du pH en utilisant de l'hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH).

Les expérimentations, réalisées sans régulation de pH, entraînent souvent une acidification du milieu réactionnel, diminuant l'activité protéolytique des enzymes (Duarte *et al.* 1988 ; Margot *et al.*, 1994).

#### II.3.4. La mesure du degré d'hydrolyse

L'hydrolyse enzymatique de protéines peut être aisément contrôlée par différentes techniques. La mesure de la libération des groupements  $\alpha$ -aminés se fait généralement par dosage spectrophotométrique, par réaction avec la ninhydrine (Moore et Stein, 1954 ; Adler-Nissen, 1976), l'acide trinitobenzène sulfonique (Satake *et al.*, 1960 ; Fields, 1971 ; Adler-Nissen, 1979), la titration au formol (Clegg et McMillan, 1974 ; Kuehler et Stine, 1974 ; Stanley, 1981 ; Spender, 1990), ou par réaction avec le glutaraldéhyde (Ukeda *et al.*, 1991).

La méthode la plus utilisée dans ce domaine est la technique du pH-stat, décrite par Jacobsen *et al.* (1957), largement appliquée en milieu neutre ou alcalin (Adler-Nissen, 1976 ; Mietsch *et al.*, 1989 ; Yeom *et al.*, 1994). Au cours de la réaction, la diminution du pH peut être facilement détectée et maintenue à une valeur pré-définie par addition d'une base. La consommation de base sera proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques clivées. La protéolyse en milieu acide de sérumalbumine bovine (pH compris entre 1,5 et 3,5), peut être suivie et contrôlée par la même méthode (Diermayr et Dehne, 1990).

La mise en oeuvre, la précision et la répétabilité de ces techniques, adaptées au procédé utilisé, permettent de déterminer un degré d'hydrolyse (DH), exprimé le plus souvent en pourcentage de liaisons peptidiques rompues mesuré par la méthode du pH-stat (Adler-Nissen, 1986 a).

En effet le nombre de liaisons peptidiques clivées durant la protéolyse (appelé "*hydrolysis equivalents, h*", exprimé en équivalent par kg de protéine) reflète l'activité et la spécificité de la protéase utilisée. Le nombre total de liaisons peptidiques ( $h_{\text{tot}}$ ) est déterminé à partir de la composition en acides aminés du substrat initial. Le degré d'hydrolyse s'exprime alors par l'équation suivante (Adler-Nissen, 1977) :

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

De nombreux auteurs déterminent le DH à partir de rapports azotés. Mahmoud *et al.* (1992) déterminent l'influence du DH sur les propriétés physiques, antigéniques, l'hydrophobicité et l'activité émulsifiante d'hydrolysats de caséine (enzyme pancréatique porcine), pour des formulations hypoallergéniques. Le DH est déterminé selon l'équation suivante :

$$DH (\%) = \frac{NA_h - NA_c}{NT \times P_f} \times 100$$

dans laquelle  $NA_h$  et  $NA_c$  représentent respectivement le % d'azote  $\alpha$ -aminé de l'hydrolysats et de la caséine native (déterminé par une titration au formol) ;  $NT$  représentant le pourcentage moyen d'azote total de la caséine native et de tous les hydrolysats ;  $P_f$  est un facteur de correction (0,777 déterminé à partir du profil d'acides aminés) représentant l'azote qui n'est pas converti en azote  $\alpha$ -aminé.

Margot *et al.* (1994) préfèrent utiliser la solubilité des hydrolysats protéiques durant la réaction de protéolyse. Cette méthode de mesure est, selon ces auteurs, plus facilement transposable à l'échelle industrielle. L'indice d'azote non protéique est obtenu par précipitation dans l'acide trichloracétique (TCA), dans des conditions déterminées (13,6% poids / poids). Une corrélation non linéaire est obtenue entre l'azote soluble et la quantité de base ajoutée, car la concentration en peptides formés n'est pas une fonction linéaire des liaisons clivées :

$$NNP - NNP_0 (\%) = a_1 n_{Bm} - a_2 n_{Bm}^2$$

où  $NNP_0$  est la fraction azotée non protéique initiale et  $n_{Bm}$  le nombre de moles de base forte ajoutée par unité de masse de protéine ( $\mu\text{mol} / \text{g}$ ).

Hoyle et Merritt (1994) déterminent le DH d'hydrolysats protéiques de poisson, après précipitations des fractions protéiques dans du TCA (10%) et centrifugation à 10000 tr / mn selon l'équation suivante :

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

Une autre méthode beaucoup moins utilisée, quoique très efficace, reste l'osmométrie. L'utilisation de la conductivité couplée à l'osmolarité d'une solution permet, en mesurant l'abaissement du point de congélation de solutions protéiques, d'obtenir une rapide estimation du DH (Adler-Nissen, 1984 ; Spendler, 1991). Adler-Nissen définit le DH (%) à partir de l'augmentation de l'osmolarité  $\Delta C$  :

$$DH (\%) = \frac{\Delta C}{S(\%) \times f_{osm}} \times \frac{1}{\omega} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad \text{où}$$

$\Delta C$  est mesuré directement en milli-osmol / kg de solution protéique

$f_{osm}$  est le facteur de conversion des % en g par kg d'eau

$\omega$  = coefficient osmotique (approximation : 0,96)

$h_{tot}$  = nombre de liaisons peptidiques dans le substrat protéique (environ : 7,6 eqv / kg)

S (%) concentration en protéines (NT x 6,25).

La rapidité de mesure du point de congélation d'un hydrolysate de sang (papaine ; pH 8 ; 9% de protéines ; E / S = 4%) est corrélée linéairement avec la méthode du pH-stat (pour des valeurs de DH comprises entre 0 - 10%) par Duarte *et al.* (1988).

Chambers et Rasmussen (1988) maintiennent le DH entre 5 et 10% en contrôlant différents paramètres (durée d'hydrolyse, concentrations en enzyme et substrat, température) pour éviter l'apparition de goûts parasites défavorables. En effet, le contrôle du degré d'hydrolyse est particulièrement important si l'on veut éviter l'apparition de goût amer en cas de protéolyse trop poussée.

Les différentes techniques utilisées pour mesurer le degré d'hydrolyse d'une solution protéique en présence d'une ou plusieurs enzymes sont résumées dans le tableau I.10.

**Tableau I.10.** : Les différentes méthodes de mesure du degré d'hydrolyse (DH).

Auteurs	Méthodes de suivi du degré d'hydrolyse de solutions protéiques	substrat / enzymes	Corrélations entre les méthodes utilisées
Duarte <i>et al.</i> (1988)	pH-stat point de congélation	sang papaine	
Margot <i>et al.</i> (1994)	azote non protéique pH-stat	protéines sériques trypsine pancréatique	$NNP - NNP_0 (\%) = a_1 n_{Bm} - a_2 n_{Bm}^2$
Spendler (1991)	osmométrie / méthode au TNBS / pH-stat	caséine Alcalase®	
Mietsch <i>et al.</i> (1989)	méthode du pH-stat méthode au TNBS	caséine Alcalase® 0,6L Neutrase® 0,5L	Alcalase®: $R^2=0,976$ pH-stat= $-4,65 \text{ TNBS} + 1,06$ Neutrase®: $R^2=0,958$ pH-stat= $-5,51 \text{ TNBS} + 1,32$
Mahmoud <i>et al.</i> (1992)	méthode du pH-stat méthode osmométrique	caséine	Osmolalité= f(DH) $R^2=0,94$
Webster <i>et al.</i> (1982)	méthode du pH-stat méthode au TNBS	poumon / Alcalase® poumon / Neutrase® rumen / Alcalase® rumen / Neutrase®	$DH_{base}=0,14 \text{ DH}_{TNBS} - 0,91$ $DH_{base}=0,14 \text{ DH}_{TNBS} - 0,13$ $DH_{base}=0,93 \text{ DH}_{TNBS} - 0,31$ $DH_{base}=1,05 \text{ DH}_{TNBS} + 0,69$

### **II.3.5. Développement d'amertume lié au procédé d'hydrolyse enzymatique**

Lors de la réaction enzymatique, le clivage des liaisons peptidiques libère des peptides et des acides aminés libres, pouvant entraîner l'apparition de goût amer. De nombreux travaux, parus dans les années cinquante (Cuthbertson, 1950 ; Munray et Baker, 1952), ont permis d'expliquer l'apparition de cette amertume liée à la composition en acides aminés du mélange protéique, ainsi qu'aux paramètres de la cinétique d'hydrolyse (origine de l'enzyme, spectre de spécificité, durée du traitement).

Dans une protéine globulaire native, les chaînes hydrophobes sont orientées majoritairement vers l'intérieur de la structure tridimensionnelle et ne peuvent donc interagir avec les papilles gustatives. Lorsque la protéine est hydrolysée, des peptides de taille variable se forment et les sites hydrophobes développant un goût amer peuvent alors favoriser ce contact. Les peptides de taille comprise entre 3000 et 6000 sont capables de masquer leurs sites hydrophobes en formant des "clusters". La libération et l'exposition de ces sites entraînent une amertume maximale lorsque les acides aminés (hydrophobes) exposés ont leurs fonctions terminales engagées dans une liaison peptidique. Elle diminue lorsque l'acide aminé en question est en position terminale et elle devient minimale quand ce dernier est libre (Adler-Nissen, 1986b). Selon les modèles proposés par Okai et Belitz (in: Glenn, 1992), le développement de l'amertume serait dû à des interactions entre groupements hydrophobes et électrophiles.

L'amertume d'un hydrolysats peut être prédite par la valeur Q, déterminée en 1971 par Ney. Cette valeur correspond à l'énergie libre moyenne nécessaire au transfert d'une chaîne peptidique de "l'éthanol vers l'eau" (Adler-Nissen, 1986b). L'auteur montre que les peptides amers présentent une valeur Q supérieure à 1400 cal / mole alors que les peptides non amers ont une valeur Q inférieure à 1300 cal / mole (Tableau I.11.). Entre ces deux valeurs, aucune prédiction ne peut être faite.

En 1972, Ney extrapole la règle Q (corrélation empirique entre l'hydrophobicité et l'amertume) aux hydrolysats protéiques, en fonction de la composition en acides aminés. Après hydrolyse enzymatique, les valeurs Q de la caséine (1605), de la protéine de soja (1540) et de la zéine (1480) indiquent la présence de peptides amers, alors que l'hydrolyse du collagène (1280) et des protéines musculaires (1300) n'en prédisent pas.

Cependant le phénomène est beaucoup plus complexe lorsqu'il s'agit d'un mélange de peptides (Adler-Nissen, 1986b). Contrairement à Ney (1971, 1972) qui tient compte de la moyenne des valeurs Q, Adler-Nissen (1986b) prend en compte la distribution de

l'hydrophobicité des peptides. Il montre que l'apparition d'amertume est liée à la présence et à la concentration de certains peptides hydrophobes. Ainsi, les valeurs Q rapportées par Ney seraient surestimées (Tableau I.12.).

**Tableau I.11.** : valeur d'hydrophobicité d'acides aminés (cal / mole à 25°C) d'après Tanford (1962), Nozaki et Tanford (1971) et Bigelow et Channon (1976), in : Adler-Nissen (1986a).

acides aminés	Tanford (1962)	Nozaki et Tanford (1971)	Bigelow et Channon (1976)
Glycine	0	0	0
Alanine	730	500	500
Valine	1690	1500	1500
Leucine	2420	1800	1800
Isoleucine	2970	-	2950
Phénylalanine	2650	2500	2500
Tyrosine	2870	2300	2300
Tryptophane	3000	3400	3400
Sérine	40	-300	-300
Thréonine	440	400	400
Acide aspartique	540	-	0
Asparagine	-10	-	0
Acide glutamic	550	-	0
Glutamine	-100	-	0
Lysine	1500	-	1500
Arginine	730	-	750
Histidine	-	500	500
Méthionine	1300	1300	1300
Cystine / Cystéine	-	-	1000
Proline	2600	-	2600
Hydroxyproline	-	-	1800

**Tableau I.12.** : Hydrophobicité de différentes sources protéiques selon Ney (1979) et Adler-Nissen (1985).

protéines	valeur - Q (cal / mole) Ney (1979)	valeur - Q (cal / mole) Adler-Nissen (1985)
gélatine	1280	1030
boeuf	1300	1180
protéine de soja	1540	1170
gluten	1420	1280
maïs	1480	1380
caséine	1600	1400

De nombreux travaux en analyse sensorielle des acides aminés (Kirimura *et al.* 1969 ; Yamaguchi *et al.*, 1971 ; Adler-Nissen et Olsen, 1982 ; Tamura *et al.*, 1990 ; Kemp et Birch,

1992) ont permis d'améliorer la connaissance sur le développement et la quantification de l'amertume. Bumberger et Belitz (1993) ont isolé des peptides particuliers, responsables du développement de l'amertume, ainsi que les facteurs susceptibles de la développer (Lemieux et Simard, 1991). D'autre part, on a pu montrer que la nature et la spécificité des enzymes utilisées influencent le développement de l'amertume des hydrolysats protéiques (Vegarud et Langsrud, 1989 ; Adler-Nissen, 1986 a).

### **II.3.6. Elimination de l'amertume dans les hydrolysats protéiques**

Le développement de l'amertume au cours des procédés d'hydrolyse reste un obstacle à l'utilisation potentielle de ces produits dans le domaine alimentaire. De nombreux procédés, basés sur l'extraction des peptides hydrophobes, ou sur des transformations enzymatiques, permettent d'éliminer ou de masquer cette propriété indésirable.

#### **II.3.6.1. Les techniques de séparations sélectives**

Les premiers travaux sur l'amertume des hydrolysats protéiques ont été conduits par Murray et Baker en 1952. Ces auteurs montrent que le goût amer d'un hydrolysats de caséine peut être diminué après un traitement sur charbon actif. Ce procédé, fondé sur la rétention des composés hydrophobes, présente plusieurs inconvénients. Il est relativement onéreux et entraîne une diminution des rendements, ainsi que de la valeur nutritionnelle des hydrolysats. Il existe d'autres procédés d'élimination de l'amertume basés sur le caractère hydrophobe des peptides responsables.

Helbig *et al.* (1980) éliminent l'amertume d'hydrolysats de caséine destinés à la formulation de boissons par différents traitements d'adsorption, notamment la chromatographie d'affinité hydrophobe, l'adsorption sur colonne Séphadex® (G-10 et G-25), l'utilisation de talc, de cyclodextrine, de fibre de verre ainsi que la chromatographie d'adsorption hydrophobe.

Ma *et al.* (1983) améliorent le procédé développé par Heilbig *et al.* (1980) pour adsorber les peptides amers d'hydrolysats de caséine sur charbon actif, après traitement à l'Alcalase® 0,6L. La quantité de charbon actif nécessaire à l'élimination complète de l'amertume d'un hydrolysats (DH = 45 - 48%) représente 40% de la quantité initiale de protéine. Cependant pour des raisons économiques, Adler-Nissen et Olsen (1982) montrent qu'il n'est pas recommandé d'utiliser plus de 2% de charbon actif pour éliminer l'amertume d'hydrolysats de soja.

### II.3.6.2. Utilisation d'exopeptidases

De nombreuses études montrent que le degré d'amertume obtenu par hydrolyse, dépend des conditions d'hydrolyse et, plus particulièrement, de la nature des protéases utilisées.

En 1974, Clegg et McMillan montrent que l'addition d'exopeptidases à des hydrolysats de caséine ou de blanc d'oeuf (préparé par addition de ficine / trypsine) augmente le degré d'hydrolyse et réduit l'apparition d'amertume. La diminution de l'amertume résulte de l'hydrolyse de peptides spécifiques, la teneur en acides aminés libres augmentant de 34 à 50% pour la caséine et de 21 à 57% pour le blanc d'oeuf.

L'utilisation de carboxypeptidases, enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique d'un acide aminé en position C-terminale (Thibault et Monsan, 1989 ; Umetsu *et al.*, 1983) ou de Corolase<sup>®</sup> obtenue à partir d'*Aspergillus oryzae* (Przybyla, 1989), permettent de réduire l'amertume des hydrolysats.

Une enzyme protéolytique (Molsin) permet d'obtenir de bons rendements en hydrolysat de soja non amer (Roozen, 1989, in Glenn, 1992). Sproessler (1990, in Glenn, 1992) obtient une réduction de l'amertume d'un hydrolysat de lait, initialement amer, en passant d'un DH = 11,4% à un DH = 4,2%, en utilisant des aminopeptidases (d'*Aspergillus sojae*) partiellement inactivées à 50 - 80°C. Watanabe *et al.* (1990) diminuent l'amertume d'hydrolysat de caséine à faible température (5°C) en utilisant des aminopeptidases provenant d'*Erwinia ananas*. Des hydrolysats de gluten non amers à des DH de 30% peuvent être obtenus en utilisant la Corolase<sup>®</sup> (Przybyla, 1989).

Bien que l'emploi d'exopeptidases permette de limiter les pertes de matière azotée, ces procédés restent onéreux à l'échelle pilote en raison du coût relativement élevé de ces enzymes purifiées. D'autre part, l'utilisation de la voie enzymatique pour éliminer l'amertume conduit à des hydrolysats protéiques avec des DH élevés, principalement composés d'acides aminés libres et de petits peptides, limitant leur utilisation potentielle (Pedersen, 1994).

### II.3.6.3. Synthèse de plastéines

L'identification et l'isolement des peptides hydrophobes ont permis une meilleure compréhension du développement de l'amertume (Watanabe et Arai, 1988,1992).

La synthèse de plastéines par des endopeptidases judicieusement utilisées sur des hydrolysats protéiques permet la réduction ou l'élimination de l'amertume. Les réactions de condensation ou de transpeptidation sont réalisées à partir de tetra, penta et hexa-peptides et permettent de synthétiser des fractions de poids moléculaire compris entre 2000 et 3000 (Watanabe et Arai,

1988). Selon les auteurs (Watanabe et Arai, 1992), ces réactions ne peuvent avoir lieu que si l'hydrolysate est préalablement concentré (20 à 40% poids / volume). Une addition d' $\alpha$ -chymotrypsine à pH légèrement acide (5,0 - 6,0), à un hydrolysate de soja préalablement concentré, permet de diminuer significativement l'amertume au cours de la formation de plastéines (Yamashita *et al.*, 1970 in : Watanabe et Arai, 1992). Lorenzen et Schlimme (1992) montrent qu'à partir d'un hydrolysate tryptique de caséinate de sodium à faible concentration protéique (5%), il est possible d'obtenir des propriétés structurales et fonctionnelles identiques à celles obtenues par synthèse de plastéines. Raghunath et McCurdy (1991) valorisent une source non conventionnelle de protéines de poisson (autolysate, 30°C, 3 jours, DH = 65 - 70%) par formation de plastéines dont le rendement maximal est obtenu avec la pepsine (20 - 22%).

Cependant ce type de réaction permettant d'éliminer l'amertume reste trop coûteux pour être utilisé à l'échelle industrielle.

#### **II.3.6.4. Modification chimique**

Une réduction de l'amertume d'un hydrolysate de soja (DH = 10%), obtenu sous bromélaïne (50°C ; pH 7,5 ; E / S = 1 / 5), a pu être réalisée par acétylation d'un résidu lysine bloquant l'un des groupements électrophiles nécessaires au développement de l'amertume (Okai et Belitz, in Glenn, 1992 ; Yeom *et al.*, 1994). Tamura *et al.* (1990) montrent que la modification chimique de la structure de certains acides aminés (bloquage par des résidus aspartyl, acétyl et glutamyl) permet de diminuer l'amertume.

#### **II.3.6.5. Masquage de l'amertume**

L'amertume d'hydrolysats protéiques peut être masquée par de nombreux composés tels que la cyclodextrine ou l'amidon (Tamura *et al.*, 1990 ; Glenn, 1992). L'addition de polyphosphates à un hydrolysate de caséine (Tokita, 1969) ou de gélatine pendant l'hydrolyse enzymatique de protéines inhibe le développement de l'amertume (Schwille *et al.*, 1976 in Stanley, 1981).

Stanley (1981) a pu réduire significativement l'amertume d'un hydrolysate de viande de poulet (Pancréatine : 4,3% par rapport au substrat ; 60°C ; pH = 8,55 ; KCl 0,6M), en ajoutant de la gélatine (rapport 1 : 1). Kirimura *et al.*, (1969) ont montré que l'addition de glycine (acide aminé édulcorant présent en grande proportion dans la gélatine) a un effet similaire. Ils en concluent que le mécanisme d'action de la gélatine pourrait être dû à la présence de glycine endogène, capable de masquer l'amertume.

## ***LES PROPRIETES FONCTIONNELLES***

L'utilisation d'une base protéique nouvelle en industrie alimentaire nécessite la connaissance de ses caractéristiques physicochimiques, mais aussi de ses propriétés fonctionnelles. En effet, " la fonctionnalité des macromolécules alimentaires représente l'expression et la participation des propriétés physiques et physicochimiques au niveau des qualités sensorielles des aliments qui les contiennent " (Lorient, 1988). Tout changement environnemental susceptible d'agir sur la conformation des protéines entraîne la modification de leurs propriétés fonctionnelles. En particulier, c'est le cas lors des transformations technologiques (traitements thermiques, procédés d'hydrolyse). De nombreuses méthodes permettent de quantifier la fonctionnalité d'une protéine ou d'un produit alimentaire, en fonction de son domaine d'utilisation et des caractéristiques organoleptiques recherchées. Pour les protéines alimentaires, ce sont les propriétés d'hydratation (solubilité, rétention d'eau, viscosité), interfaciales (propriétés moussantes et émulsifiantes), ou texturales (gélification, coagulation, viscoélasticité), qui sont particulièrement recherchées. Bon nombre de synthèses bibliographiques, articles et ouvrages font référence en la matière (Hermansson, 1975a, 1975b, 1975c ; Kinsella, 1976, 1982 ; Halling, 1981 ; Whiting, 1988 ; Smith, 1988). En raison de la nature du substrat protéique étudié et du domaine d'application potentiel des hydrolysats protéiques de viande, nous nous intéresserons essentiellement à la solubilité et aux propriétés interfaciales (en particulier les propriétés émulsifiantes).

### III. LES PROPRIETES FONCTIONNELLES ET L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Les propriétés fonctionnelles de protéines peuvent être améliorées par des modifications enzymatiques. Parmi les travaux les plus complets dans ce domaine, il faut citer les recherches de Arai et Watanabe (1985), Adler-Nissen (1986 a), Hamada (1992), Haque (1993), Mahmoud (1994).

Les hydrolysats protéiques utilisés en formulation nutritionnelle sont généralement classés en deux grandes catégories : "partiellement" ou "fortement" hydrolysés, conférant ainsi au produit final des propriétés et des utilisations différentes. Ce dernier groupe est composé essentiellement de di et tri-peptides, beaucoup plus digestes que leur équivalent en acides aminés libres (Siemensma *et al.*, 1993). Ils sont utilisés dans la formulation de produits hypoallergéniques (Thomas et Löffler, 1994 ; Mahmoud, 1994). Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières, ainsi que leurs hydrolysats protéiques ont fait l'objet d'études très vastes (Haque, 1993). En général, on admet que des conditions d'hydrolyse ménagées conduisent à l'amélioration des propriétés fonctionnelles. Cependant, de nombreux

paramètres interviennent, comme le type et la nature des enzymes utilisées, la nature du substrat initial et les conditions d'hydrolyse (Adler-Nissen, 1986). En effet le clivage des liaisons peptidiques entraîne une augmentation des groupements ionisables ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{COO}^-$ ), une diminution de la masse moléculaire, ainsi qu'une destruction de la structure tertiaire de la protéine initiale, libérant les sites hydrophobes. On sait que la distribution du poids moléculaire dépend du mécanisme de protéolyse ("zipper" ou "one by one"). Dans le premier cas, il y a formation de produits intermédiaires alors que ne subsistent, dans le second cas, que le substrat initial et les produits terminaux (Danilenko et Braudo, 1992).

### **III.1. Les propriétés d'hydratation : la solubilité**

La solubilité d'une protéine alimentaire reste le paramètre le plus important à déterminer, car les propriétés fonctionnelles dépendront étroitement de la capacité de la protéine à se solubiliser lors de son utilisation. Elle est définie comme étant le pourcentage d'azote dans le surnageant, par rapport à la quantité d'azote de la protéine initiale, après centrifugation durant une période déterminée. Une concentration initiale de 1% est utilisée afin de minimiser les interactions protéine-protéine et protéine-matière grasse (Regenstein, 1984).

Adler-Nissen (1976) montre que la fonctionnalité des protéines dépend de leur capacité à se solubiliser. Cette propriété peut être améliorée par un traitement enzymatique déstabilisant la structure tridimensionnelle des protéines lors de l'hydrolyse des liaisons peptidiques. De nombreux travaux attestent une amélioration de la solubilité sur une large gamme de pH, de température et de conditions ioniques, notamment au voisinage du point isoélectrique (Mahmoud, 1994). La solubilité de protéines de soja non modifiées (inférieure à 10% pour un pH compris entre 3 et 5), peut être considérablement accentuée (80%) par une hydrolyse enzymatique ménagée (DH = 8,3% ; pH 8 ; Alcalase<sup>®</sup>), permettant ainsi d'utiliser ce potentiel protéique en alimentation humaine (Petersen, 1981). La valorisation de produits issus de la mer, par hydrolyse enzymatique a fait l'objet d'un grand nombre de travaux (Gildberg, 1993). Destinés à l'alimentation humaine, ces hydrolysats doivent posséder de bonnes propriétés fonctionnelles et organoleptiques. Quaglia et Orban (1987 b) obtiennent des hydrolysats protéiques de sardine (rendement de 60 à 70 %) par traitement enzymatique contrôlé (DH = 5% ; 10% ; 15% ; 20% ; Alcalase<sup>®</sup> 0,6L NOVO).

Différents indices de solubilité (%) des hydrolysats peuvent être obtenus en fonction du degré d'hydrolyse et de la force ionique du milieu (ajustée par addition de NaCl). Pour des pH compris entre 5 et 9, tous les hydrolysats testés possèdent une solubilité proche de 90%. Cependant l'augmentation de la force ionique diminue la solubilité. Les procédés d'hydrolyse

enzymatique de hareng frais (Alcalase<sup>®</sup> 2,4L ; 50-55°C ; pH 8,0-8,5) permettent d'atteindre des valeurs de solubilité supérieures à 93% (Hoyle et Merritt, 1994). Par ailleurs, nombre de travaux font appel à l'hydrolyse pour améliorer la solubilité de protéines issues de co-produits de l'industrie de la viande. En fonction des conditions opératoires et du type d'enzymes utilisées (Neutrase<sup>®</sup> pH 7,0 ; pepsine pH 3,0 ; Alcalase<sup>®</sup> pH 8,5), Webster *et al.* (1982) obtiennent des rendements d'hydrolysats solubles compris entre 45 et 85%. Smith et Brekke (1984) étudient l'influence de l'amélioration de la solubilité d'hydrolysats de protéines de coeur de boeuf et de sous-produits de volaille (obtenus sous protéase acide : Milezyme AFP 2000 ; 1% p / p, pH 3,2, 50 - 60°C), incorporés dans des produits à base de viande émulsifiée de type saucisse de Francfort (1985). La solubilité, augmentée par traitement enzymatique (protéines myofibrillaires : 46% ; actomyosine : 57%), améliore les rendements de cuisson. Surowka et Fik (1992) obtiennent de forts indices de solubilité pour des hydrolysats de sous-produits de volailles : 79,5% (séchés sous vide) et 88,4% (lyophilisés) dans les conditions suivantes: Neutrase<sup>®</sup> 0,2%, 55°C, pH 7, 6 h. Ces produits peuvent être destinés à la formulation de soupes concentrées ou de sauces. En 1994, les mêmes auteurs montrent qu'un traitement à la pepsine (55°C ; 5 h ; pH 1,5) permet d'obtenir une solubilité proche de 100 % en milieu acide. Cependant, après neutralisation, la solubilité diminue de 33%.

De manière générale, les traitements hydrothermiques contribuent à diminuer la solubilité des fractions protéiques. La technologie enzymatique améliore leur solubilité et conduit à une thermostabilité notable des hydrolysats (Haque, 1993) et ceci, malgré les traitements thermiques ultérieurs, nécessaires à la dénaturation des enzymes utilisées (Britten et Gaudin, 1994).

## III.2. Les propriétés émulsifiantes

### III.2.1. Définition d'une émulsion

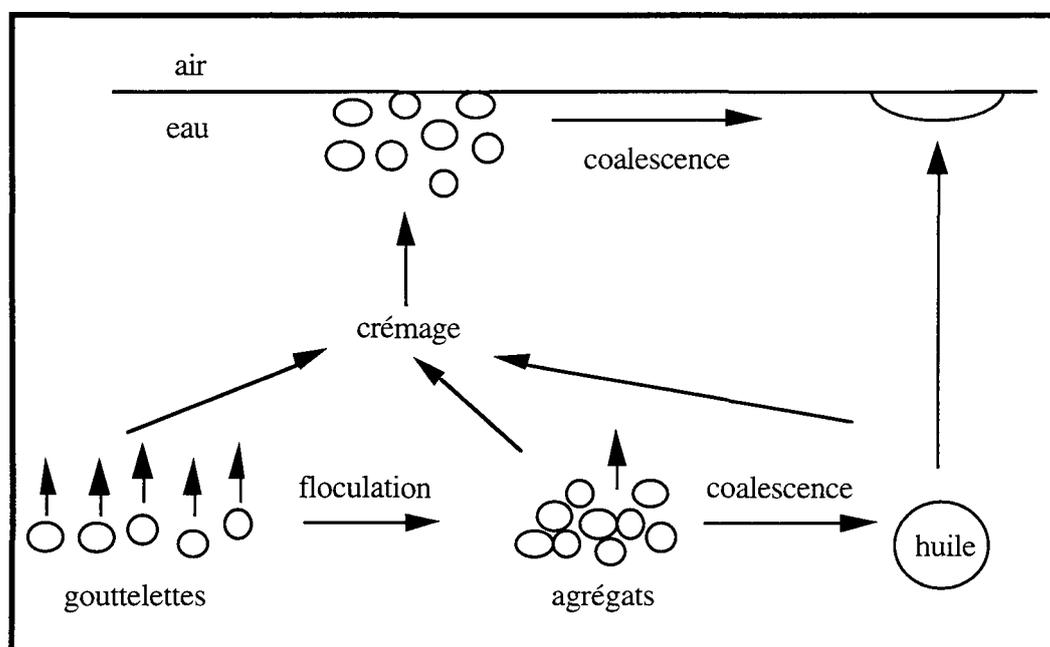
Selon Becher (1965), "une émulsion est un système hétérogène comportant au moins un liquide non miscible, intimement dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes dont le diamètre varie entre 0,1 et plusieurs  $\mu\text{m}$ ".

La définition d'une émulsion "huile dans eau" ou "eau dans huile" dépend de la nature et de la proportion de la phase dispersée (généralement la phase lipidique).

La formation d'une émulsion nécessite un apport d'énergie mécanique important qui contribue à la création d'une aire interfaciale considérable. En s'adsorbant au niveau de l'interface eau / lipide, les protéines provoquent un abaissement de la tension interfaciale, ce

qui conduit à la formation de l'émulsion. Cependant le système obtenu reste thermodynamiquement instable (Pearce et Kinsella, 1978) en raison de la forte énergie libre de l'interface (Cameron *et al.*, 1991). Les gouttelettes formées ont tendance à coalescer, ce qui provoque la séparation des phases. L'évolution du système vers une diminution de l'aire interfaciale conduit à une déstabilisation plus ou moins rapide de l'émulsion.

Des phénomènes tels que la floculation, le crémage et la coalescence intervenant au cours de ce processus ont été décrits (Becher, 1965 ; Halling, 1981 ; Stainsby, 1986). La figure I.1. schématise les différentes phases de déstabilisation d'une émulsion protéique, d'après Tornberg et Hermansson (1977).



**Figure I.1. :** Phénomènes de déstabilisation d'une émulsion.

Les phénomènes responsables de la séparation des phases aqueuse et lipidique interviennent généralement de façon concomitante. Le rapprochement des gouttelettes sous l'influence de forces attractives (Van-Der-Waals) et répulsives (électrostatiques, stériques) des constituants filmogènes des globules, explique la floculation. Quant au phénomène de crémage, il résulte de la séparation des phases en fonction de leur différence de densité.

La caractérisation du "pouvoir émulsifiant" d'une solution protéique et, en particulier, d'un hydrolysat protéique, peut être évaluée par la capacité émulsifiante, l'activité émulsifiante et la

stabilité émulsifiante.

Les méthodes de mesure des propriétés émulsifiantes sont nombreuses et fournissent des résultats variables selon les techniques de préparation des émulsions et la nature des phases aqueuses et lipidiques en présence. De nombreuses synthèses bibliographiques énumèrent les différentes techniques utilisées (gravimétrie, mesure des teneurs en matières grasses et en eau, méthodes optiques, RMN, conductimétrie...), leurs potentialités respectives, et leurs applications en fonction du type d'émulsion à caractériser (Cante *et al.*, 1979 ; Regenstein, 1984 ; Stainsby, 1986 ; Curt, 1994).

### III.2.2. La capacité émulsifiante (CE)

La capacité émulsifiante est définie comme étant le volume de phase lipidique pouvant être émulsifié par gramme de protéine. Elle est déterminée par la mesure de la quantité d'huile nécessaire pour émulsifier une dispersion protéique, avant le point d'inversion de phase permettant le passage "huile dans l'eau" à une émulsion "eau dans l'huile". Swift *et al.* (1961) étudient la capacité émulsifiante de protéines de viande et détectent le point d'inversion par le changement de viscosité de l'émulsion. Le manque de fiabilité de cette technique conduit au développement de la mesure de la résistivité d'un courant électrique (Webb *et al.*, 1970). Le point d'inversion de l'émulsion peut être aussi détecté visuellement (Tsai *et al.*, 1972), ou en utilisant des pigments solubles (Galluzzo et Regenstein, 1978). Crenwelge *et al.* (1974) mesurent l'augmentation de la puissance fournie au moteur de l'agitateur. L'inversion de phase se détecte par la chute brutale de l'intensité en fonction de la viscosité de l'émulsion. Regenstein (1984), utilisant une méthode basée sur le phénomène de crémage, fait varier différents paramètres influençant la capacité émulsifiante de protéines myofibrillaires (vitesse d'agitation du mixeur Omni-Mixer (Sorvall) ; débit d'huile ; volume et concentration des échantillons ; influence de l'addition de NaCl), afin de standardiser les méthodes de détermination de la capacité émulsifiante.

Actuellement, les méthodes les plus employées se fondent sur la mesure de la conductivité des solutions (Dumay et Cheftel, 1986 ; Vuilleumard *et al.*, 1990 ; Hung et Zayas, 1991 ; Konrad et Lieske, 1992). La mesure de conductivité (unité : le Siemens ou  $\mu\text{mho} / \text{cm}$ ) est réalisée à l'aide d'une cellule, composée de deux électrodes isolées l'une de l'autre et dont le rapport surface / distance définit sa constante. Dans le cas d'une émulsion huile dans l'eau, la solution protéique présente une valeur de conductivité élevée qui dépend de la concentration protéique et ionique (McRitchie, 1978). Au cours de l'addition de la phase lipidique, la valeur de conductivité de la solution diminue jusqu'à un minimum qui détermine le point d'inversion

de phase. Cependant, l'hétérogénéité des résultats décrits dans la littérature provient de la disparité des méthodologies et des conditions expérimentales utilisées. En effet, de nombreux paramètres influencent la mesure de la capacité émulsifiante d'une dispersion protéique : la température qui, si elle n'est pas régulée au cours de l'expérience, agit en diminuant la viscosité (l'agitation augmente naturellement la température) ; la présence ou non d'une quantité déterminée d'huile avant agitation ; la nature de la phase lipidique ajoutée pendant l'agitation et son débit. Pour standardiser les méthodes de mesure de la capacité émulsifiante, Vuilleumard *et al.* (1990) proposent un protocole expérimental basé sur l'augmentation de la résistivité au point d'inversion de phase de l'émulsion (Ultra-turrax<sup>®</sup>: 15000 t / mn ; débit d'huile 25 ml / mn ; 25°C). Les auteurs montrent que le volume d'huile ajouté pendant l'émulsification de protéines laitières est proportionnel au volume initial de la dispersion protéique (la phase lipidique devant être additionnée au cours de la réaction). A ce propos, Konrad et Lieske (1992) étudient l'influence de nombreux paramètres : concentration protéique, pH, vitesse d'incorporation de l'huile, vitesse et durée d'agitation sur la mesure de la capacité émulsifiante de protéines laitières, avec des coefficients de variation proche de 2%. De nombreuses équations permettent de quantifier la capacité émulsifiante d'une solution émulsionnée. Crenwelge *et al.* (1974) expriment la valeur en pourcentage du volume de phase lipidique nécessaire pour obtenir le point d'inversion, par rapport au volume total de l'émulsion, alors que Swift *et al.* (1961) la déterminent en grammes. Carpenter et Saffle (1964) évaluent la capacité émulsifiante spécifique (g d'huile additionné par mg de protéine). Vuilleumard *et al.* (1990) déterminent un point d'inversion en émulsifiant une solution témoin (40,2 g d'huile sont nécessaires pour obtenir le point d'inversion de 50 ml d'eau) et définissent une capacité émulsifiante maximale pour limiter l'influence du type d'huile :

$$CE_{\max} = \frac{\text{quantité d'huile émulsifiée - témoin}}{\text{quantité de protéines}}$$

Britten et Giroux (1990) déterminent les propriétés émulsifiantes de solutions de caséine, en utilisant un montage expérimental constitué par une cellule à volume constant, pour limiter la présence d'air et de mousse. Le volume d'huile injecté (1,25 ml / mn), homogénéisé à l'aide d'un Ultra-Turrax<sup>®</sup> (20000 tr / mn), permet d'obtenir un volume de phase émulsionnée identique à la sortie de l'enceinte. La capacité émulsifiante est déterminée par la chute brutale de conductivité au point d'inversion de phase, selon l'équation :

$$C E = \frac{\Phi_c}{(1 - \Phi_c).C}$$

où  $\Phi_c$  est la fraction de la phase lipidique au point d'inversion et C, la concentration protéique initiale.

Les auteurs montrent que la capacité émulsifiante, exprimée en ml d'huile / mg de protéine, diminue linéairement ( $CE = 2,21 \times C^{-0,636}$  ;  $R^2 = 0,98$ ) avec la concentration protéique (0,2 à 2,0 mg / ml). Ils émettent l'hypothèse selon laquelle cette diminution serait en relation avec la formation de la membrane. Les protéines s'adsorbent à l'interface huile / eau à une vitesse proportionnelle à leur concentration (McRitchie, 1978). Une fois adsorbées, les protéines s'étaient en fonction de la surface disponible (Mitchell *et al.*, 1970 in : Britten et Giroux, 1990). Cependant, si la vitesse d'adsorption est très supérieure à la vitesse d'étalement (concentrations élevées), la surface de la gouttelette d'huile est rapidement saturée empêchant ainsi l'étalement. Inversement, à faible concentration, la vitesse d'adsorption étant plus lente, les protéines ont le temps de se dérouler à la surface, ce qui limite le phénomène d'adsorption. Beaucoup moins de molécules sont nécessaires pour couvrir la même surface, améliorant ainsi la capacité émulsifiante.

### **III.2.3. Influence d'une hydrolyse enzymatique sur la capacité émulsifiante**

Les procédés d'hydrolyse modérée permettent d'accroître la rétention de phase lipidique, en augmentant la capacité émulsifiante de la solution protéique. Cette propriété conduit à diminuer l'activité de l'eau dans les formulations à base de viande additionnées d'hydrolysat protéique (Vallejo-Cordoba *et al.* in : Haque, 1993). De nombreux travaux illustrent l'influence d'une protéolyse ménagée sur des substrats très variés. Petersen (1981) utilise la voie enzymatique (Alcalase<sup>®</sup>) pour améliorer la capacité émulsifiante (ml d'huile / g N x 6,25 ; pH = 7) de protéines de soja. La capacité émulsifiante est maximale pour un DH = 5%, avant de chuter pour des valeurs de DH plus élevées. Smith et Brekke, montrent que la capacité émulsifiante de protéines de coeur de boeuf (1984) et de viande de volaille séparée mécaniquement (1985), peut être accentuée par hydrolyse ménagée (protéase acide), et présente un maximum pour un indice de solubilité de 42%. Les auteurs montrent que l'augmentation de la solubilité, la diminution de la taille des chaînes peptidiques favorisent la migration et le réarrangement plus rapide des peptides à l'interface huile / eau, ce qui améliore la capacité émulsifiante. Ils soulignent cependant que celle-ci diminue après avoir atteint un maximum. Ce phénomène serait lié à l'augmentation de la solubilité et à la réorganisation conformationnelle des peptides. En 1990, Quaglia et Orban démontrent que l'hydrolyse enzymatique de sardine par l'Alcalase<sup>®</sup> 0,6L, diminue la capacité et la stabilité émulsifiante

des hydrolysats en fonction du DH (maximum pour un DH = 5%). Huidobro et Tejada (1993) étudient l'évolution de la solubilité et de la capacité émulsifiante sur différentes espèces de poisson en fonction des conditions de conservation au froid. Ils montrent qu'il existe une relation linéaire entre les deux paramètres ( $R^2 > 0,80$ ), elle dépend de la composition de la matière grasse musculaire. Surowka et Fik (1992, 1994) montrent que des hydrolysats de sous-produits de volailles obtenus après 6 heures d'hydrolyse (pH 7 ; 55°C, neutrase de *Bacillus subtilis*) ou par traitement à la pepsine (55°C ; pH 1,5 ; 5 h), possèdent de faibles propriétés émulsifiantes en raison de leur teneur élevée en tissu conjonctif partiellement hydrolysé.

Montero et Borderias (1991) étudient l'influence de la teneur en tissus conjonctifs de deux espèces de poisson sur la capacité émulsifiante des protéines. Les expériences sont conduites à différents pH (1 - 7) et concentrations en NaCl (0,0 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 3,0%). Une augmentation de la concentration en collagène favorise l'élévation de la capacité émulsifiante (exprimée par rapport au poids de l'homogénéisat) mais diminue considérablement si elle est exprimée en g d'huile pour 100 mg de protéines solubles. Les auteurs expliquent ces résultats par le facteur de dilution et montrent que la concentration en protéines solubles joue un rôle important, dépendant du pH. La concentration en NaCl affecte légèrement la capacité émulsifiante.

Les travaux conduits par Turgeon *et al.* (1991) ainsi que par Suttiprasit *et al.* (1992) montrent que l'activité de surface de solutions protéiques, mesurée par la tension superficielle, est dépendante de l'état de structure (stabilité, flexibilité), de la concentration et de la taille des peptides.

Turgeon *et al.* (1991) étudient l'influence de l'hydrolyse enzymatique (trypsine, chymotrypsine) sur la capacité émulsifiante de fractions peptidiques de sérum traitées thermiquement. Ils montrent que le traitement thermique (90°C, 10 mn, pH 2,5) n'affecte pas la capacité émulsifiante qui est, par contre, diminuée par la protéolyse. Cependant, une élimination des petits peptides et des acides aminés par ultrafiltration, améliore cette propriété. En outre, on observe, en fonction de la protéolyse, une diminution de la vitesse d'adsorption à l'interface air / solution, ce qui permet d'établir une corrélation entre la capacité émulsifiante (y) et la vitesse d'adsorption (x) selon l'équation :

$$y = 3,942 * x^{1/2}$$

L'amélioration de la capacité émulsifiante d'une solution protéique, après hydrolyse très ménagée, peut s'expliquer par l'exposition des groupements hydrophobes (initialement protégés) qui favoriseraient la formation d'un film interfacial entre les résidus hydrophobes

de la phase lipidique et les groupements hydrophiles de la phase aqueuse (Turgeon *et al.*, 1992).

### III.2.3.1. L'activité émulsifiante (AE)

L'activité émulsifiante détermine la capacité des protéines étudiées à former et stabiliser une émulsion. Différentes méthodes sont utilisées pour la déterminer. En particulier, certaines méthodes optiques permettent de quantifier le niveau de déstabilisation de l'émulsion par des mesures du changement de propagation de la lumière (Curt, 1994). Il existe une relation entre la turbidité et l'aire interfaciale d'une émulsion dans certaines conditions (Kerker, 1969).

La turbidité d'un échantillon est donnée par la relation :

$$T = \frac{2,303 \times A}{l}$$

où A est l'absorbance lue à 500 nm et l, la largeur de la cuve de mesure.

#### III.2.3.1.a. L'indice d'activité émulsifiante (IAE)

Pearce et Kinsella (1978) étudient la turbidité d'émulsions protéiques en fonction du type et de la concentration de solutions protéiques, du degré d'homogénéisation, du pH, de la force ionique, et de la nature de la phase lipidique. Les auteurs définissent un Indice d'Activité Emulsifiante (IAE) qui représente la surface d'interface (exprimée en m<sup>2</sup>) couverte par unité de poids.

$$IAE = \frac{2 \times T}{\Phi \times C}$$

où C est la concentration protéique avant que l'émulsion ne soit formée, T la turbidité et  $\Phi$  la fraction volumique de la phase lipidique. Cet indice a été utilisé par de nombreux auteurs pour caractériser l'activité émulsifiante sur des hydrolysats protéiques de protéines laitières. Bertran-Harb *et al.* (1989) ont étudié l'influence du type d'appareillage (Polytron ou Waring) et de la nature de l'huile utilisée (huile de colza ou de soja), sur la mesure de l'IAE de protéines de lactosérum et de leurs hydrolysats tryptiques (DH = 2,5 ; 3,9 ; 5,3%). Les auteurs montrent que cet indice est dépendant de la fraction volumique de l'huile, de la concentration protéique et de la taille des globules produits. Il est plus souvent dicté par les moyens mécaniques utilisés que par l'émulsifiant lui-même. L'indice maximal est obtenu pour les hydrolysats protéiques préparés en milieu alcalin. D'un autre côté, en limitant

l'hydrolyse trypsique d'une solution de sérum albumine bovine, l'IAE peut être augmenté de 40% par rapport à la solution initiale (Saito *et al.*, 1993). Mietsch *et al.* (1989) montrent qu'une hydrolyse ménagée de caséines et de protéines de soja (DH<10%) avec la Neutrase® 0,5L et l'Alcalase® 0,6L ([S] : 80 g.kg<sup>-1</sup> ; [E] 47 He .kg<sup>-1</sup>; 50°C ; pH 8,0) améliore l'IAE et ISE. Cependant, une diminution de l'absorption d'eau par les hydrolysats en fonction de l'augmentation du DH est observée (DH 0 : 454 g d'eau / 100 g ; DH 7 : 70 g d'eau / 100 g). Mahmoud *et al.*, (1992) indiquent que l'IAE de la caséine diminue linéairement ( $R^2 = 0,96$ ) avec le DH (de 51,5 à 24,4 m<sup>2</sup> / g pour un DH de 58%). Mais de nombreuses précautions (longueur d'onde utilisée, taille des globules) doivent être prises lors de l'utilisation de cette équation, notamment dans le cas d'émulsion obtenue par homogénéisation sous haute pression (Pearce et Kinsella, 1978). D'autre part, les auteurs soulignent que le crémage et la floculation rendent difficile l'obtention de résultats reproductibles. Des mesures d'AE sur des solutions d'hydrolysats de protéines laitières, montrent que les faibles valeurs de DH et la nature de l'enzyme utilisée (Maxatase, Corolase® PS, Novozym) restent les facteurs déterminants pour augmenter cet indice (Vegarud *et al.*, 1991).

L'optimisation des paramètres pour la production d'isolats de soja par hydrolyse chimique ménagée a été étudiée par N'Guyen Thi Quynh *et al.* (1992). Pour améliorer les propriétés tensioactives des produits obtenus, les auteurs utilisent un plan d'expériences (matrice d'Hadamard à 2 niveaux), afin de déterminer l'influence des facteurs sur l'IAE. La stabilité des émulsions est fortement influencée négativement par le pH et la concentration en sel.

En 1991, Cameron *et al.* apportent une correction à l'indice d'activité émulsifiante utilisé par Pearce et Kinsella (1978). Les auteurs déterminent l'aire interfaciale d'une émulsion diluée en mesurant la distribution de taille de particules par diffusion de la lumière. Ils déterminent un nouvel indice selon la formule suivante :

$$IAE_{\text{corrigé}} = \frac{2.T}{C.(1 - \Phi)}$$

où C est exprimé en gramme par mètre cube de la phase aqueuse initiale.

La formule originale surestimait l'aire interfaciale pour des émulsions avec de faibles fractions volumiques d'huile. Le nouvel indice permet de comparer des émulsions contenant différentes fractions volumiques de phase lipidique. D'autre part, Jackman *et al.* (1989), en caractérisant les cinétiques de rupture de l'émulsion, montrent qu'il est nécessaire de répéter de nombreuses fois les expériences afin de ne pas biaiser les estimations des paramètres IAE et stabilité émulsifiante.

Les données concernant les méthodes utilisées pour la détermination des propriétés

fonctionnelles abondent, mais les différentes approches utilisées rendent les comparaisons de tests difficiles.

### III.2.3.1.b. La conductivité

La conductivité peut être utilisée pour évaluer l'AE d'une émulsion protéique, sans avoir recours à des dilutions, nécessaires pour les méthodes optiques. Kato *et al.* (1985) déterminent l'activité émulsifiante de 10 solutions protéiques à des concentrations de 0,1% (tampon phosphate, pH 7,0). La conductivité de l'émulsion est enregistrée pendant l'homogénéisation de 15 ml de solution protéique avec 5 ml d'huile durant 1 mn à 12000 tr / mn. L'activité émulsifiante est déterminée à partir des courbes de conductivité. Bien que la quantité d'huile émulsionnée soit constante dans toutes les expériences, la diminution de la conductivité dépend de l'activité des solutions protéiques. En effet, la conductivité chute rapidement pendant l'homogénéisation en raison de l'incorporation d'une phase lipidique non conductrice. Les auteurs déterminent l'activité émulsifiante selon l'équation suivante :

$$AE = C_s - C_e$$

où  $C_s$  est la conductivité de la solution initiale et  $C_e$  la conductivité minimale de l'émulsion, une minute après homogénéisation. Une bonne corrélation ( $R^2 = 0,89$  ;  $p < 0,01$ ) entre la méthode d'évaluation de l'activité émulsifiante par conductimétrie et par turbidimétrie est obtenue (Pearce et Kinsella, 1978). Suttiprasit *et al.* (1993) utilisent la même méthode pour déterminer l'activité émulsifiante de l' $\alpha$ -lactalbumine, de la  $\beta$ -lactalbumine et de la sérum albumine bovine à des concentrations comprises entre 0,1 et 20 mg / ml. Les valeurs obtenues par ces auteurs sont en accord avec celles de Kato *et al.* (1985), mais elles demeurent très basses en raison des conditions expérimentales utilisées (tampons et homogénéisation). Les auteurs montrent, par ailleurs, que l'activité émulsifiante augmente avec la concentration protéique des solutions émulsionnées. En effet, selon McRitchie (1978), pendant l'homogénéisation, les protéines s'adsorbent à l'interface huile / eau à une vitesse proportionnelle à leur concentration.

### III.2.3.2. La stabilité émulsifiante (SE)

La stabilité émulsifiante est la propriété d'une émulsion à rester stable et inchangée au cours du temps. La durée pendant laquelle l'émulsion reste inchangée a été évaluée par différentes techniques ; en effet, le crémage et la floculation conduisent à une augmentation de la taille des gouttelettes qui peut être suivie par des mesures de turbidité.

### III.2.3.2.a. Indice de stabilité émulsifiante

Pearce et Kinsella (1978) définissent un Indice de Stabilité de l'Emulsion (ISE) :

$$ISE = T \times \frac{\Delta t}{\Delta T}$$

où  $\Delta T$  est la variation de turbidité  $T$ , pendant l'intervalle de temps  $\Delta t$ . Cependant, cet indice dépend de l'intervalle de temps choisi pour les mesures.

D'autres méthodes d'évaluation de la stabilité se fondent sur des traitements thermiques et / ou mécaniques (centrifugation). Ainsi, Inklaar et Fortuin (1969) étudient l'influence des paramètres habituels sur la mesure de l'activité et de la stabilité émulsifiante d'ingrédients de formulation à base de viande. Ils incorporent, sous agitation, 50 g d'huile de soja dans une dispersion protéique (5 g dans 90 ml d'eau distillée). Après un chauffage de 15 mn à 85°C, la solution est centrifugée 15 mn à 3000 tr / mn. Le résultat est exprimé en pourcentage d'huile éliminée par rapport à la quantité initiale. Cette méthode est toujours d'actualité. En effet, Hung et Zayas (1991) expriment la stabilité émulsifiante de protéines laitières et de germes de maïs, non pas en volume d'huile, mais en teneur en eau, selon la formule suivante:

$$SE = \frac{\text{ml d'eau de la suspension} - \text{ml d'eau séparée}}{\text{ml d'eau de la suspension}} \times 100$$

Tornberg et Hermansson (1977) évaluent la stabilité d'une émulsion préalablement mise au repos (24h, 20°C) par centrifugation à 180 x g, 15 minutes. 5 ml du culot de centrifugation ("F test") sont prélevés et la quantité de phase lipidique résiduelle (SR) est mesurée, puis rapportée à la quantité initiale d'huile dans le mélange ("F<sub>original</sub>") :

$$SR = \frac{F_{\text{test}}}{F_{\text{original}}} \times 100$$

Les caractéristiques physicochimiques de la solution protéique mises à part, de nombreux facteurs influencent la formation et la stabilité d'une émulsion. Tornberg et Hermansson (1977) ont étudié l'influence de 4 types d'agitateur (Ultra-Turrax®, mixeur Sorvall®, homogénéisateur à valve, ultrasons) sur la stabilisation de la dispersion. Les auteurs en concluent que la durée et l'intensité de l'agitation, le type d'appareillage utilisé, conditionnent la stabilité de l'émulsion.

Dans le cas de protéines de lactosérum, Dumay et Cheftel (1986) définissent la stabilité d'une émulsion (40 % p / p d'huile par rapport à l'émulsion finale), après agitation (3750 tr / mn, 2 mn), comme étant le pourcentage de phase émulsifiée après centrifugation (270 g 15 mn),

une heure après agitation. Les auteurs soulignent à quel point les conditions expérimentales adoptées pour l'évaluation des propriétés fonctionnelles influencent les mesures (volume d'huile, appareillage utilisé, concentration protéique).

### III.2.3.2.b. La granulométrie

La mesure du diamètre d'une population de globules gras dans la phase dispersée permet d'établir une distribution de taille à l'aide d'un microscope optique. Dumay et Cheftel (1986) évaluent selon cette méthode le diamètre moyen de gouttelettes d'huile d'une émulsion fraîchement préparée, en fonction de la concentration en protéines (6  $\mu\text{m}$  pour une concentration de 0,38% de caséinate de sodium, à 3,9  $\mu\text{m}$  pour 5%). Mais les coefficients de variation restent importants (8,5%). Avec un compteur de particules (Optomax), les auteurs obtiennent des valeurs plus précises (2,7  $\mu\text{m}$  pour une concentration de 5%). Vuilleumard *et al.* (1990) montrent à l'aide d'un compteur de particules (Nicomp Submicon instrument), que 99% des globules gras ont un diamètre inférieur à 5  $\mu\text{m}$ , après dilution dans une solution de glycérol contenant 0,1% (poids / volume) de SDS. Les auteurs obtiennent un diamètre moyen de 2,5  $\mu\text{m}$  (agitation de 15000 tr / mn). Ces mesures rapides permettent de mettre en évidence le phénomène de coalescence qui déstabilise l'émulsion par augmentation de la taille des particules. D'autres méthodes basées sur la mesure discontinue du diamètre des globules par analyse d'image nécessitent des dilutions, voire des colorations et restent malgré tout des techniques destructives.

### III.2.3.2.c. La conductivité

Les potentialités des mesures de conductivité, utilisées pour la mesure de la capacité émulsifiante, restent applicables à l'évaluation de la stabilité d'une émulsion protéique. Kato *et al.* (1985) définissent la stabilité d'une émulsion selon l'équation suivante :

$$SE = (C_s - C_e) \times \frac{\Delta t}{\Delta C}$$

où  $C_s$  est la conductivité de la solution initiale,  $C_e$  la conductivité minimale de l'émulsion 1 mn après homogénéisation, et  $\frac{\Delta t}{\Delta C}$  le rapport inverse de la pente initiale des courbes de conductivité. La valeur de conductivité obtenue à la fin de l'homogénéisation dépend de la concentration protéique et de la nature de la protéine étudiée. Une estimation de la stabilité est obtenue par la mesure de la pente initiale de la courbe de conductivité après homogénéisation, en fonction du temps (Kato *et al.* 1985). La pente de la courbe est d'autant plus faible que

l'émulsion est stable, puisque la valeur de conductivité est directement liée à la vitesse de remontée des globules gras. Les auteurs montrent, par ailleurs, que la mesure de conductivité peut être corrélée à la méthode turbidimétrique de Pearce et Kinsella (1978), avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,91$  ( $p < 0,01$ ). Pour leur part, Suttiprasit *et al.* (1993) utilisent la totalité de la courbe de conductivité pour définir la stabilité de l'émulsion. Après arrêt de l'émulsion, les auteurs utilisent l'équation de Kato *et al.* (1985) pour la partie de la courbe à forte pente initiale. Ils utilisent l'équation  $C - C_0 = a.t^b$ , où  $C$  est la conductivité,  $t$  le temps et  $C_0$  la conductivité mesurée à la fin de l'homogénéisation, pour les valeurs de la courbe atteintes lorsque les mesures de conductivité se stabilisent. Les constantes  $a$  ( $\mu\text{mho} / \text{cm.mn}^b$ ) et  $b$  (sans dimension) sont fonction du type de protéine et de la concentration. Les auteurs définissent ainsi une nouvelle expression de la stabilité selon l'équation :

$$SE_{\text{nouvelle}} = (C_p - C_0) / [-ab (b-1)t_i^{b-2}]$$

où  $C_p$  est la conductivité de la solution initiale et  $t_i$  le point d'intersection entre les tangentes des deux régions de la courbe de conductivité.

Latreille et Paquin (1990) utilisent une méthode de centrifugation couplée à la conductimétrie pour déterminer la stabilité de solutions protéiques :

$$\Delta C = C_t - C_0$$

où  $C_t$  représente la conductivité du culot de centrifugation d'une émulsion préparée à base de lait et  $C_0$  la valeur de conductivité de l'émulsion native.

Dans le cas d'hydrolysats protéiques, la stabilité émulsifiante diminue avec l'augmentation du degré d'hydrolyse (Mahmoud, 1994).

### III.2.3.3. Pression de surface développée à l'interface huile / solution protéique

Dans une solution protéique, la nature différente des molécules de solvant et des solutés en présence, fait apparaître une énergie interfaciale dont l'origine provient de l'inégalité des forces attractives au sein des deux liquides. Cette énergie libre correspond à un travail par unité de surface et s'exprime en  $\text{J} / \text{m}^2$  ou  $\text{N} / \text{m}$ . La technique la plus couramment employée pour mesurer la tension superficielle dynamique reste la méthode de la lame mouillable de Wilhelmy (Cante *et al.*, 1979), qui permet de déterminer une vitesse d'adsorption des molécules. La diffusion et l'adsorption ne sont pas des phénomènes instantanés et la vitesse dépend de la concentration protéique de la solution (Dagorn-Scaviner, 1986 ; Lorient et Colas, 1988). La pression de surface  $\pi = \gamma - \gamma_0$  ( $\gamma$  et  $\gamma_0$  étant les tensions interfaciales en

l'absence et en présence de protéines) représente l'abaissement de la tension superficielle. Dumay et Cheftel (1986) déterminent la tension interfaciale entre une phase lipidique et des solutions aqueuses protéiques, à l'aide d'un tensiomètre (GUASTALIA, 1971). La concentration protéique (0,001 à 0,1%) influence la pression de surface qui augmente en fonction de l'intervalle de temps écoulé après la formation de l'interface huile / solution protéique. Les auteurs montrent que les propriétés tensioactives des caséinates augmentent très fortement les pressions de surfaces en fonction de leur solubilité. Le phénomène peut s'expliquer par la nature des molécules et la répartition des zones hydrophobes et hydrophiles qui facilitent la diffusion et l'étalement à l'interface eau / huile.

La diffusion des protéines vers l'interface constitue le facteur limitant de leur adsorption à l'interface eau / huile, phénomène qui dépend de la concentration en protéine.

#### III.2.4. Mesure de l'hydrophobicité

Li-Chan *et al.* (1984) utilisent une méthode fluorométrique, avec l'acide cis-parinarique comme marqueur, permettant de déterminer la mesure de l'hydrophobicité de solutions protéiques. En 1984, Li-Chan *et al.*, obtiennent de bonnes corrélations entre la capacité émulsifiante et l'hydrophobicité de surface ( $R^2 = 0,82$ ), ainsi que pour l'indice d'activité émulsifiante ( $R^2 = 0,70$ ) pour des protéines de viande (muscle *semimembranosus* et adducteurs). Cependant, les procédés d'hydrolyse enzymatique diminuent fortement l'hydrophobicité en fonction du degré d'hydrolyse (Quaglia et Orban, 1990 ; Mahmoud *et al.*, 1992), ce qui permet de conclure que ce paramètre joue un rôle important au niveau des propriétés fonctionnelles.

#### III.2.5. L'osmolalité

L'osmolalité est une caractéristique physique importante pour la formulation de produits alimentaires (Ziajka *et al.*, 1992). L'augmentation du degré d'hydrolyse provoque une élévation de l'osmolalité d'une solution protéique (exprimée en milliosmoles par kg d'eau : mOsm / kg d'eau), en raison de l'augmentation de la concentration en petits peptides et en acides aminés dans la solution. Mahmoud (1994) montre une corrélation linéaire entre l'osmolalité et le degré d'hydrolyse ( $R^2 = 0,94$ ), pour des hydrolysats de caséine, de sérum et de protéines de soja. Des résultats similaires ont été obtenus par Ziajka *et al.* (1992). Ces auteurs étudient l'influence de l'hydrolyse à forte concentration pepsique (pH 2,2 ; 37°C ; E / S = 5-20%) et trypsique (pH 8,0 ; 37°C) sur la solubilité et, plus particulièrement, sur l'osmolarité d'hydrolysats de caséine.

## ***LES PROPRIETES NUTRITIONNELLES***

Parmi les différents nutriments, les protéines tiennent une place particulièrement importante dans le régime alimentaire de l'Homme. Les réserves de l'organisme en acides aminés étant relativement restreintes, "l'équilibre dynamique stationnaire" doit être maintenu par un apport protéique, notamment en acides aminés essentiels. Il est admis que la valeur nutritionnelle des protéines d'un aliment peut être définie comme étant l'aptitude de cet aliment à faire face aux besoins quantitatifs et qualitatifs de l'organisme en matière azotée.

Il est cependant nécessaire que les protéines (qui peuvent être soumises à des modifications physiques, enzymatiques ou chimiques orientées) doivent présenter une composition équilibrée en acides aminés, une non-toxicité et de bonnes qualités organoleptiques (Cuq et Lorient, 1992). L'utilisation de procédés d'hydrolyse par voie enzymatique améliore la digestion et l'absorption de substrat protéique en raison de la diminution de la taille des fractions protéiques et l'obtention de profils peptidiques bien définis (Lahl et Braun, 1994). L'absorption gastro-intestinale d'hydrolysats protéiques, en particulier de di et tri-peptides, est plus efficace comparée au substrat initial (Frokjaer, 1994). A ce sujet, Siemensma *et al.*, (1993) montrent que les di et tri-peptides sont plus facilement absorbés par rapport à la quantité équivalente d'acides aminés. Ils proposent une nouvelle méthode de mesure de la longueur des chaînes peptidiques.

#### **IV. ETUDE CRITIQUE DES PRINCIPALES METHODES D'ESTIMATION DE LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES PROTEINES**

La fonction primordiale d'une protéine alimentaire est de fournir les acides aminés nécessaires à l'anabolisme des tissus. Les méthodes d'évaluation de la qualité des protéines apprécient plus ou moins directement l'efficacité relative avec laquelle la protéine à tester satisfait aux besoins en acides aminés essentiels de l'organisme. On classe en trois grands groupes les méthodes d'analyse nutritionnelle.

Ce sont d'abord les méthodes dites "biologiques", qui font appel à l'expérimentation animale et que l'on considère comme des méthodes de référence, malgré le coût et les délais d'obtention des mesures. On trouve ensuite les techniques de nature "chimique" et "physico-chimique" qui semblent mieux adaptées aux contrôles de routine, en raison de la rapidité des mesures et de leur reproductibilité. Cependant, l'imprécision des données obtenues sur la fraction réellement disponible au niveau nutritionnel, entraîne un développement "des procédés mixtes", alliant les avantages propres aux techniques *in vivo* et *in vitro*.

##### **IV.1. L'évolution des méthodes *in vivo***

Dans le domaine des études nutritionnelles, l'expérimentation sur l'Homme demeure limitée,

pour des raisons d'éthique et pour les contraintes expérimentales qu'elle exige. Les méthodes *in vivo* reposent presque exclusivement sur l'expérimentation animale et prennent en compte l'ensemble des facteurs susceptibles d'intervenir au cours de l'ingestion et de la digestion d'un produit alimentaire (transit, capacité d'absorption intestinale...).

La mise au point du dosage de l'azote par Dumas en 1831, amélioré par Kjeldahl en 1883, permit aux nutritionnistes animaux de déterminer "la balance azotée" de l'animal en comparant les quantités d'azote ingérées et rejetées. Dès 1909, on utilise la notion de la valeur biologique, définie comme étant le pourcentage de l'azote absorbé dans l'intestin qui est retenu par l'organisme (Thomas, 1909 ; Mitchell, 1924 ; Dillon, 1991) :

$$\text{Valeur Biologique} = \frac{\text{Azote retenu}}{\text{Azote absorbé}}$$

Une procédure de pesée des animaux, développée par Osborne *et al.* (1919), permet d'enregistrer le gain de poids de jeunes rats en croissance sur une période de 28 jours. Le Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) compare la valeur nutritionnelle de protéines par rapport à une protéine standard : la caséine (Dillon, 1991) :

$$\text{C E P} = \frac{\text{gain de poids}}{\text{protéine ingérée}}$$

Les résultats obtenus sont très variables en raison de l'utilisation de différentes lignées de rats, de la consommation protéique des animaux et du régime utilisé (Satterlee *et al.*, 1979). Pour ces raisons, la valeur nutritionnelle des protéines est comparée à la caséine de référence corrigée par un facteur 2,5 - CEP (pour limiter les variations non contrôlées entre les essais). Le CEP enregistre le gain de poids en croissance et ne mesure donc pas l'aptitude à couvrir les besoins d'entretien. Bender et Doell (1957) déterminent le Coefficient d'Efficacité Protéique Net en utilisant la protéine à tester à deux niveaux (0 et 10%). Ce coefficient permet alors de prendre en compte les besoins de croissance et d'entretien, avec un groupe de rats nourri avec un régime exempt de protéine :

$$\text{C E P N} = \frac{\text{gain de poids} + \text{perte de poids du groupe sans protéine}}{\text{protéine consommée}}$$

Une autre méthode consiste à déterminer le bilan azoté chez le rat par minéralisation de la carcasse ou par la teneur en eau, là encore mesurée par pesée (Bender et Miller, 1953 ; Miller et Bender, 1955). La proportion d'azote ingéré est déterminée par un coefficient appelé Utilisation Protéique Nette (UPN) :

$$U P N = \frac{\text{Azote carcasse}_{\text{groupe test}} - \text{Azote carcasse}_{\text{groupe sans protéine}}}{\text{Azote ingéré}_{\text{groupe test}}}$$

En raison de l'hétérogénéité des facteurs, liée aux tests biologiques, les nutritionnistes reconnaissent que cette méthode est beaucoup plus adaptée à la détermination des besoins en acides aminés des rats et reste difficilement extrapolable à l'Homme. En effet, le rat en croissance a des besoins beaucoup plus élevés en acides aminés soufrés.

La qualité d'une protéine dépend de sa composition en acides aminés, de la disponibilité biologique de ses acides aminés, mais aussi de sa digestibilité. L'évaluation de la digestibilité d'une protéine par voie animalière, consiste à soustraire l'azote fécal (F) de l'azote ingéré (I) et à exprimer cette valeur en pourcentage de l'azote ingéré : cela conduit à une valeur approchée que l'on appelle "digestibilité apparente" :

$$\text{Digestibilité apparente (\%)} = \frac{\text{Azote absorbé}}{\text{Azote ingéré}} = \frac{I - F}{I} \times 100$$

Pour connaître la "digestibilité réelle", il est nécessaire de prendre en compte la quantité d'azote excrété lorsque le rat est alimenté avec un régime sans protéine ( $F_E$ ). La digestibilité réelle s'exprime par la relation suivante :

$$\text{Digestibilité réelle (\%)} = \frac{I - (F - F_E)}{I} \times 100$$

Samman et Farias (1993) développent une méthode animalière permettant néanmoins d'estimer la qualité nutritionnelle en 28 heures. En mesurant la perte de poids des rats, après un jeûne de 4 heures, consécutif à une alimentation de 24 heures, les auteurs obtiennent de bonnes corrélations avec les méthodes animalières classiques à partir de 46 sources protéiques différentes :

$$\text{Valeur biologique} = 219,5 - 95,6 \times \log(\text{perte de poids \%}) \quad (R^2 = 0,96)$$

$$\text{Utilisation protéique nette} = 211,8 - 95,1 \times \log(\text{perte de poids \%}) \quad (R^2 = 0,89)$$

Une autre méthode de prédiction de la digestibilité d'une source protéique consiste à doser les acides aminés et l'azote des digestats recueillis dans l'iléon. Skilton *et al.* (1991) déterminent la digestibilité apparente et la digestibilité vraie de plusieurs farines de viande, en dosant l'azote et les acides aminés dans les digestats prélevés au niveau de l'iléon de rat, au bout de 14 jours. Les résultats montrent, malgré de larges variations de composition en acides aminés des farines de viande, une bonne similitude entre la digestibilité apparente iléale (0,54 - 0,75)

et la digestibilité azotée des échantillons.

L'utilisation de la digestibilité réelle obtenue par voie animalière reste le paramètre de référence pour établir des corrélations entre les méthodes *in vivo* et *in vitro* (Swaisgood et Catignani, 1991).

De nombreux facteurs sont susceptibles d'induire les résultats obtenus par voie animalière et, notamment, le type d'animal retenu. L'animal usuellement employé est le rat Wistar, sélectionné pour sa sensibilité aux facteurs nutritionnels. Les résultats sont généralement transposables à l'Homme, à l'exception des besoins en acides aminés soufrés, supérieurs chez un animal à fourrure. Le stade physiologique de l'animal influence énormément les réponses obtenues en ce qui concerne les besoins en phase de croissance pour le rat pris au sevrage et les besoins d'entretien pour l'animal adulte (Adrian et Potus, 1993). Le régime alimentaire, commun à tout les lots d'une même expérience, reste la principale source de variabilité des résultats entre différentes études. Le tableau I.13. montre la disparité des méthodes employées en animalerie pour la détermination des paramètres nutritionnels, ce qui rend difficile la comparaison des résultats expérimentaux obtenus par les différents auteurs.

Les méthodes biologiques sont coûteuses, longues à mettre en oeuvre et demandent des quantités importantes d'échantillons. Les résultats obtenus sont rarement transposables du rat à l'Homme. Or, l'industrie alimentaire a besoin de méthodes peu coûteuses, rapides, simples à mettre en oeuvre et qui pourraient être appliquées à une grande variété de produits.

**Tableau I.13. :** Détermination de la qualité nutritionnelle de source protéique par méthodes animalières.

Auteurs	T (°C)	Acclim. (jours)	régime protéique	Lignée de rat	âge ou poids	nombre de rat/essai	isolement	réponses
Pedersen et Eggum, 1983 Eggum, 1973	-	-	150 mg N et 10 g de MS par jour	Wistar	68 g	5	-	DR
Hsu <i>et al.</i> , 1977	-	4	9%	weanling albino	21- 22 jours	-	-	DA
Marshall <i>et al.</i> , 1979	-	4	10%	Holtzman	21 jours	-	-	DA
Laser-Reuterswärd <i>et al.</i> , 1982-1985	25	4	Eggum 1973	Sprague Dawley	-	5	indiv.	DR, VB, UPN
Ozimek <i>et al.</i> , 1986	25			Sprague Dawley	21- 28 jours	10	indiv.	CEP, UPN, DR
Hegedüs <i>et al.</i> , 1983 - 1990	-	10	-	Laty Cfy	67,8±1 g	6	6	UPN
Kabirullah <i>et al.</i> , 1991	-	-	-	Long Evans	50- 57 g	10	-	CEP, UPN, DR, VB
Skilton <i>et al.</i> , 1991	22±2	7	-	Sprague Dawley	200 g	36 pour l'étude	-	DA et DR iléale
Sakamoto <i>et al.</i> , 1992	-	3	7%	Wistar	100-120 g	6	-	UPN
Campos et Arêas 1993	-	-	-	Rattus norvegicus	45 g	8	indiv.	UPN, BV
Samman et Farias, 1993	21±1	10 jours	10%	Sprague Dawley	60±1g	6	indiv.	perte de poids, VB, UPN
Wu <i>et al.</i> , 1995	22±1	4	15 g / jour	Sprague Dawley	60±5 g	40 pour l'étude	indiv.	DA, DR index Di-sco

CEP : coefficient d'efficacité protéique ; UPN : utilisation protéique nette ; DR : digestibilité réelle ; DA : digestibilité apparente ; VB : valeur biologique.

## IV.2. Développement des méthodes *in vitro* pour l'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines

Les méthodes *in vitro* sont des méthodes rapides, qui ne demandent pas un investissement comparable à celui d'une animalerie. La reproductibilité des résultats fait qu'elles sont de plus en plus utilisées comme méthodes de contrôle. Différentes techniques, de conception variable, utilisent des réactions enzymatiques pour obtenir des valeurs de digestibilité. Elles sont, certes toujours inférieures à celles obtenues *in vivo*, mais les corrélations avec les méthodes animalières restent très acceptables.

De nombreuses synthèses bibliographiques développent les différentes techniques prédictives de la digestibilité *in vitro*, ainsi que les évolutions actuelles (Boisen et Eggum, 1991 ; Swaisgood et Catignani, 1991). Nous nous intéresserons plus particulièrement aux méthodes enzymatiques, simulant la protéolyse qui a lieu au cours de la digestion. Des systèmes multi-enzymatiques pepsine-pancréatine utilisés en cellule de dialyse (Savoie et Gauthier, 1986), fournissent des informations sur les vitesses de protéolyse et de libération de peptides et d'acides aminés. La méthode consiste à doser les acides aminés et l'azote libéré au cours d'une période de 6 heures, sur les dialysats obtenus après passage sur une membrane dont le seuil de coupure est de 1000 D (voir tableau I.13.). Cette technique a été utilisée par Savoie *et al.* (1991) pour évaluer l'effet d'un traitement alcalin sur la libération d'acides aminés et la modification de certains acides aminés (lysino-alanine en particulier).

Une autre méthode d'évaluation de la digestibilité des protéines consiste à enregistrer la chute de pH d'une solution protéique, après addition d'un système multi-enzymatique. Cette technique a été développée principalement par Satterlee et ses collaborateurs (Hsu *et al.*, 1977 ; Satterlee *et al.*, 1979). Après addition de trypsine pancréatique, chymotrypsine pancréatique et de peptidase intestinale, à 37°C et à pH 8, le pH est enregistré au bout de 10 minutes. Satterlee *et al.*, en 1979, proposent une modification du protocole précédent, concernant la prédiction de la digestibilité. Ils utilisent le système enzymatique de Hsu *et al.* (1977), suivi de l'addition de protéase bactérienne (*Streptomyces griseus*, type VI ; 7,95 mg / ml). La réaction enzymatique est suivie à 55°C. Le pH est enregistré après les 10 minutes suivant l'addition de la protéase bactérienne.

Des corrélations significatives ( $R^2 > 0,90$ ) entre la digestibilité apparente, obtenue par méthode animalière et la méthode enzymatique, sont obtenues à partir de 23 sources protéiques différentes (Hsu *et al.*, 1977). Cependant, en 1983, Mozersky et Panettieri

n'obtiennent pas les mêmes résultats que Satterle *et al.* (1979). Ils montrent que la chute du pH ne permet pas d'estimer correctement le degré d'hydrolyse, ce dernier dépendant de nombreux facteurs comme, par exemple, la valeur des pK des acides aminés libérés ou le pouvoir tampon des protéines. D'autre part, la chute de pH provoquée par la réaction d'hydrolyse diminue l'efficacité des protéases agissant à des valeurs optimales de pH.

En 1983, Pedersen et Eggum améliorent la technique enzymatique de Hsu *et al.* (1977), en utilisant la technique du pH-stat. Le pH de la réaction est maintenu à une valeur préétablie par addition de base (NaOH 0,1N). Les auteurs établissent de très bonnes corrélations ( $R^2 > 0,96$ ) entre les méthodes animalières et enzymatiques à partir de 30 sources protéiques animales et végétales (voir Tableau I.13.). Les équations obtenues seront largement utilisées par la suite par un bon nombre d'auteurs et, notamment, pour des études de validation inter-laboratoires (McDonough *et al.*, 1990).

Cependant, il semble qu'une meilleure prédiction de la digestibilité *in vitro* soit obtenue lorsque les équations de corrélation sont adaptées à la source protéique testée (Marshall *et al.*, 1979). Les corrélations entre la digestibilité apparente et la méthode de Hsu *et al.* (1977), obtenues à partir de 33 sources protéiques animales et végétales diffèrent en fonction de la nature protéique :

Digestibilité apparente =  $139,60 - 7,21 \times \text{pH}_{10 \text{ mn}}$  (source protéique animale)

$$R^2 = 0,44$$

Digestibilité apparente =  $229,97 - 20,70 \times \text{pH}_{10 \text{ mn}}$  (source protéique végétale)

$$R^2 = 0,76$$

Digestibilité apparente =  $221,52 - 19,72 \times \text{pH}_{10 \text{ mn}}$  (combinaison)

$$R^2 = 0,77$$

De même, les équations de corrélation obtenues par Pedersen et Eggum en 1983, utilisant la méthode du pH-stat, montrent la différence de digestibilité en fonction de la source protéique utilisée :

source protéique animale : Digestibilité vraie =  $74,33 + 53,21 \times B_{10}$

$$(R^2 = 0,98 ; n = 10) \quad (B_{10}: \text{volume de base à } 10 \text{ mn})$$

source protéique végétale : Digestibilité vraie =  $78,61 + 40,29 \times B_{10}$

$$(R^2 = 0,95 ; n = 13)$$

De nouvelles méthodes *in vitro*, utilisant toujours des enzymes gastriques, pancréatiques ou intestinales, tendent à prendre en compte l'influence des traitements enzymatiques successifs,

ainsi que les différents modes d'agitation. A ce propos, Veenstra *et al.* (1993), ont mis au point un appareillage automatisé, composé de 4 bioréacteurs simulant le tractus intestinal. Une validation des résultats expérimentaux, obtenus à partir de nombreuses sources protéiques, est en cours.

Parmi les nombreux paramètres susceptibles d'influencer les prédictions des méthodes *in vitro*, nous ne citerons que les principaux facteurs :

- la spécificité des enzymes utilisées en fonction du substrat protéique étudié
- le type, l'activité et le nombre de protéases injectées dans le milieu réactionnel
- l'ordre d'incorporation des enzymes et la durée de la protéolyse
- la température, le pH
- le type de substrat, sa présentation (soluble ou hétérogène), sa concentration ainsi que le mode d'agitation
- les techniques séparatives utilisées.

Moughan *et al.* (1989) ont montré que la chute de pH, utilisée pour la prédiction de la digestibilité de 20 échantillons de farine de viande et de poudre d'os, sous-estime très fortement les résultats obtenus *in vivo*. En effet, la forte concentration minérale (275 g de cendre par kg de produit) augmente la capacité tampon des solutions protéiques. La prédiction par la méthode du pH-stat permet cependant d'obtenir de bonnes corrélations. Le tableau I.14 résume les principales méthodes enzymatiques utilisées pour la détermination de la digestibilité *in vivo*.

### **IV.3. Les méthodes mixtes**

Les exigences des nutritionnistes ont vu le développement de méthodes de mesure dites "mixtes", alliant la rapidité et la reproductibilité des mesures *in vitro*, tout en intégrant dans leur conception un indice nutritionnel à caractère biologique.

Les progrès des techniques analytiques (dosage des acides aminés soufrés et du tryptophane) et la meilleure connaissance des besoins en acides aminés de l'Homme, améliorent la significativité des résultats de prédiction de la qualité nutritionnelle des protéines, bien supérieure aux tests de croissance utilisés jusqu'à présent chez le rat.

Les méthodes actuellement utilisées tendent à prendre en compte à la fois la digestibilité de la protéine alimentaire et sa composition en acides aminés essentiels, comparée à celle des besoins humains réactualisés. A ce propos, de nombreux indices ou facteurs de correction ont été élaborés pour améliorer les résultats prédictifs.

**Tableau I.14.** : Différentes méthodes enzymatiques permettant la prédiction de la digestibilité *in vitro*.

Auteurs	Méthodologie expérimentale	Réponses	équations de corrélation
Hsu <i>et al.</i> , 1977	trypsine 1,6 ; chymotrypsine 3,1 ; peptidase 1,3 mg / ml. Solution protéique : 50 ml (1 mg N / ml) ; pH 8 ; 37°C.	enregistrement de la chute de pH (10 mn)	DA = 210,46 - 18,10 x pH détection des inhibiteurs trypsiques.
Marshall <i>et al.</i> , 1979	trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase A et B (humaine, porcine et de rat). Solution protéique: 10 ml (3,1 mg / ml) ; pH 8 ; 37°C.	méthode de Hsu <i>et al.</i> (1977). Mesure à 10 et 20 mn	enzymes pancréatiques de porc DAprotéine animale = 139,60 - 7,21 x pH. DAprotéine végétale = 229,97 - 20,70 x pH
Satterlee <i>et al.</i> , 1979	Méthode de Hsu <i>et al.</i> (1977) modifiée : trypsine - chymotrypsine - peptidase ; 37°C Addition de 7,95 mg de protéase ( <i>Streptomyces griseus</i> ) 10 mn après le début de la réaction ; 55°C.	mesure du pH (20 mn)	détermination du coefficient d'efficacité protéique - calculé (C - PER). D = 234,84 - 22,56 x pH (20mn)
Mozersky et Panettieri, 1983	trypsine 1,61 ; chymotrypsine 3,96 ; peptidase 2,36 mg / ml ; protéase de <i>Streptomyces griseus</i> (7,95 mg / ml) 10 ml (1 mg N / ml) ; 37°C ; 55°C ; pH 8 ; 10 mn.	estimation des liaisons peptidiques (Ninhydrine) TCA	DA = 234,84 - 22,56 (pH) <sub>20</sub> D = 54,36 + 22,56(8 - pH) <sub>20</sub> significativité de la méthode de Hsu <i>et al.</i> (1977)
Pedersen et Eggum, 1983	trypsine 1,61 ; chymotrypsine 3,96 ; peptidase 2,36 mg / ml ; protéase de <i>Streptomyces griseus</i> (7,95 mg / ml) 10 ml (1 mg N / ml) ; 37°C ; pH 8.	pH-stat (NaOH 0,1N)	protéines animales et végétales : DR = 76,14 + 47,77 x B <sub>10</sub> protéines animales : DR = 74,33 + 53,21 x B <sub>10</sub> protéines végétales : DR = 78,61 + 40,29 x B <sub>10</sub>
Ihekoronye, 1986	pepsine(1 mg / ml) ; pH 2 ; 8 h ; pancréatine (1 mg / ml) pH 8 ; 16 h ; papaïne - pronase E ; 40 h.	Méthode colorimétrique (TNBS) DO (420 nm)	hydrolyse enzymatique / digestibilité <i>in vivo</i> (données de Saterlee <i>et al.</i> , 1977).
Savoie et Gauthier, 1986 Savoie <i>et al.</i> , 1989	cellule de dialyse (PM 1000 ; tampon phosphate) pepsine ; 30 mn ; pancreatine ; 6 h.	D (%) = N (dialysats) / 40 en mg	étude de validation effectuée sur 19 sources protéiques
Eggum <i>et al.</i> , 1989	Méthode de Pedersen et Eggum (1983).		DR <sub>in vivo</sub> = 20,0 + 0,8 x DR <sub>in vitro</sub> (R <sup>2</sup> = 0,66) ; UPN - VB

Auteurs	Méthodologie expérimentale	Réponses	équations de corrélation
McDonough <i>et al.</i> , 1990 étude inter-laboratoire	trypsine 23100 ; chymotrypsine 186 ; peptidase 0,052 unité / ml ; 10 ml (1 mg N / ml) ; 37°C ; pH 8.	pH-stat B = volume de NaOH 0,1N	équation de Pedersen et Eggum (1983). volume de base à 5 mn protéines animales et végétales : DR = 76,14 + 47,77 x B <sub>10</sub> DR <sub>non corrigé</sub> = 79,28 + 40,74 B
Chang <i>et al.</i> , 1992	enzyme immobilisée (pepsine - trypsine - chymotrypsine). traitement alcalin des solutions protéiques.	protéolyse mesurée par spectrophotométrie ; (Ortho-phthalaldéhyde)	Evaluation de l'effet des sucres, amidon et huile sur la digestibilité <i>in vitro</i> . aucune altération de la mesure de digestibilité <i>in vitro</i> .
Minekus <i>et al.</i> , 1994 Veenstra <i>et al.</i> , 1993	méthode multi-enzymatique en réacteurs simulant l'estomac, le duodenum, le jejunum et l'ileum.	-	-
El et Kavas, 1994	-	A : chute de pH (3 enzymes) ; B : chute de pH (4 enzymes) ; C : pH-stat (3 enzymes)	indice chimique index Di-Sco B = -11,68 + 1,11 A A = 10,36 + 0,98 C C = 20,86 + 0,88 B
Wu <i>et al.</i> , 1994	méthode de Satterlee <i>et al.</i> (1979)	mesure du pH	digestibilité <i>in vitro</i> C-PER ; index DI-Sco

#### IV.3.1. Indice Chimique

Block et Mitchell (1946) proposèrent une méthode de calcul appelée Indice Chimique (I.C.), reposant sur l'idée que l'absence totale d'un acide aminé indispensable (AAI) a pour conséquence l'indisponibilité complète de la protéine pour la synthèse des protéines corporelles. Cet indice est défini selon la relation suivante :

$$I. C. = \frac{\text{mg d'acide aminé essentiel limitant par g de protéine étudiée}}{\text{mg d'acide aminé essentiel limitant par g de protéine idéale}}$$

Ce rapport, exprimé en pourcentage, est effectué sur les 9 acides aminés essentiels. Le rapport le plus faible constitue l'index ou score chimique de la protéine, déterminant ainsi l'acide aminé limitant. Cet indice dépend uniquement de la teneur en AAI limitant et ne prend en compte ni la disponibilité des acides aminés, ni les éventuels excès par rapport aux besoins.

### IV.3.2. Coefficient d'efficacité protéique-calculé

Satterlee *et al.* (1979) définissent un coefficient d'efficacité protéique calculé, établi sur la digestibilité *in vitro* associée au pourcentage de chaque acide aminé essentiel, par rapport au profil type de la FAO / OMS (1973). Il permet d'obtenir une estimation de la digestibilité en moins de 72 heures. Cependant, les pourcentages d'AAI digestibles, exprimés par rapport à la FAO / OMS (1973) sont affectés de coefficients préétablis, d'autant plus élevés que l'acide aminé considéré est plus éloigné du modèle.

### IV.3.3. Indice Chimique corrigé de la digestibilité ou Index Di-SCO

Cet indice compare la composition en acides aminés essentiels de la protéine testée, à un profil de référence correspondant le plus exactement aux besoins en acides aminés essentiels de l'Homme, en fonction de l'âge (nourrissons, enfants d'âge pré-scolaire, adolescents, adultes).

$$\text{Index DI - SCO} = \text{Index Chimique} \times \text{digestibilité.}$$

Ces profils-types, mis au point par un comité d'experts (FAO / OMS / UNU, 1985) sont présentés dans le tableau I.15. Les résultats sont exprimés en mg d'acides aminés par g d'azote ou par g de protéine (en employant exclusivement le facteur de conversion de 6,25). Le profil-type le plus couramment utilisé reste celui proposé par le Comité FAO / OMS / UNU, (1985) pour les besoins de l'enfant d'âge pré-scolaire.

**Tableau I.15. :** Besoins en acides aminés essentiels pour l'Homme en fonction de l'âge (FAO / OMS / UNU, 1985).

Acides aminés (mg / g de protéine)	enfant 2 - 5 ans	adolescent 10 - 12 ans	adulte
Histidine	19	19	16
Isoleucine	28	28	13
Leucine	66	44	19
Lysine	58	44	16
Méthionine + Cystéine	25	22	17
Phénylalanine + Tyrosine	63	22	19
Thréonine	34	28	9
Tryptophane	11	9	5
Valine	35	25	13

source : Madl (1993)

Sakamoto *et al.*, en 1992, déterminent une relation entre la composition en acides aminés de 30 sources protéiques différentes et le coefficient d'utilisation protéique net (souche : Wistar ; régime alimentaire : 7% de protéines).

$$\text{UPN}_{\text{théorique}} = 10^{1,88} \times Q_{\text{Lys}}^{0,44} \times Q_{\text{aaS}}^{0,12} \times Q_{\text{Trp}}^{0,10} \quad R^2 = 0,93$$

$Q = a / a_{\text{ref}}$

$a$  = acide aminé (mg) / N (g) de l'aliment

$a_{\text{ref}}$  = acide aminé (mg) / N (g) de la protéine de référence

aaS = acides aminés soufrés

Malgré un régime protéique à 7%, en raison de la forte teneur en céréales des sources protéiques, les auteurs obtiennent un coefficient de corrélation de 0,93 entre le coefficient UPN obtenu *in vivo* et le coefficient UPN théorique :

$$\text{UNP} = 0,89 \text{ UNP}_{\text{théorique}} + 0,67$$

Le tableau I.16. résume les différentes caractéristiques des méthodes *in vivo*, comparées aux méthodes *in vitro* et mixtes.

**Tableau I.16. :** Comparaison des différentes procédures pour l'évaluation de la qualité nutritionnelle des produits.

Critères	Méthodes <i>in vivo</i>	Méthodes <i>in vitro</i>	Méthodes mixtes
Coût investissement de fonctionnement	très élevé	faible	faible
délai de réponse	très long	très court	court
Reproductibilité	moyenne	excellente	bonne
Signification des résultats	excellente	très faible	bonne prévision d'utilisation nutritionnelle

#### IV.4. Relation entre qualité nutritionnelle et composition en acides aminés de sources protéiques non conventionnelles

De nombreux travaux d'évaluation de la qualité protéique de co-produits (farines de viande, d'os, de sang et de plumes de volailles) ou de mélanges de co-produits, ont été réalisés (par voie animale) dans le but d'améliorer la formulation de ces produits destinés à l'alimentation animale ou humaine (Hegedus *et al.*, 1983, 1990 ; Campos et Arêas, 1993 ; Zarkadas *et al.*, 1995). Bien que les procédés d'extraction par voie alcaline entraînent une diminution des propriétés nutritionnelles (destruction et racémisation de certains acides aminés : cystéine, cystine, arginine et méthionine), Ozimek *et al.* (1986) obtiennent des valeurs comparables à la protéine de référence (caséine) pour des isolats de protéines obtenus à partir d'os de poulet (Tableau I.17.). Le tableau ci-dessous montre la valeur nutritionnelle des différentes sources protéiques utilisées à cet effet.

**Tableau I.17. :** Composition physicochimique (%) et aminogrammes de différentes sources protéiques non conventionnelles. Les résultats sont exprimés en g / 16 g azote total.

	isolat protéique de viande de boeuf Zarkadas <i>et al.</i> , 1995	farine de poumon lyophilisée Campos et Arêas, 1993	farine de viande Hegedus <i>et al.</i> , 1983	farine d'os Hegedus <i>et al.</i> , 1983-1990	farine de sang Hegedus <i>et al.</i> , 1983-1990	protéines de poulet (extraction alcaline et neutralisation) Ozimek <i>et al.</i> , 1986	farine de plumes de volaille Hegedus <i>et al.</i> , 1983-1990
matière sèche		86	94,7	97,6 - 97,6	90,0 - 90,0	97,47	91,8 - 91,8
protéines		74,8	57,5	24,9 - 24,9	70,5 - 80,5	50,06	80,3 - 80,3
Matière grasse		16,3	14,7	10,3 - 10,3	14,1 - 4,1	42,63	3,3 - 6,3
cendres		4,5	19,5	59,2 - 59,2	5,3 - 4,3	3,72	7,2 - 5,2
Ala	7,10	2,93	7,44	8,38	7,29	5,3	4,99
Arg	6,44		6,82	7,35	5,20	6,2	6,76
Asp	5,30		7,56	6,83	8,47	8,5	6,62
Cys	0,20	1,19	1,08	0,24 - 0,10	1,12 - 1,20	-	4,44 - 4,00
Glu	9,44		12,40	11,09	10,30	13,4	10,45
Gly	16,28		12,33	17,55	5,57	4,2	8,38
His	1,08		1,70	1,13	4,04	2,7	0,68
Ile	1,54		3,36	2,13 - 1,50	3,85 - 1,30	4,5	4,59 - 4,60
Leu	3,43	8,76	6,33	4,70 - 3,50	9,09 - 11,80	8,2	7,73 - 7,70
Lys	3,72	6,38	5,08	4,38 - 4,20	7,06 - 9,60	7,8	2,19 - 1,70
Met	1,24	1,90	1,50	1,14 - 0,70	1,39 - 1,40	2,5	0,68 - 0,60
Phe	2,19	4,62	3,00	2,50 - 2,20	5,00 - 5,00	5,1	4,18 - 4,40
Pro	9,81		8,00	9,93	4,39	3,7	9,58
Ser	2,34		4,91	3,47	3,92	3,9	10,62
Thr	1,17	4,28	3,32	2,43 - 2,00	4,17 - 4,50	4,3	4,24 - 3,90
Tyr	1,08	3,13	2,20	1,44 - 1,00	2,69 - 4,10	3,8	2,59 - 2,10
Val	2,69	4,32	5,19	3,70 - 2,90	6,43 - 8,00	4,8	7,56 - 7,30
Trp	0,15	1,90	1,41	0,30 - 0,20	0,39 - 1,30	-	0,86 - 0,70

L'aminogramme des isolats de co-produits de volaille, étudié par Zarkadas *et al.* (1995), est proche de la composition en acides aminés de tissus conjonctifs de type I. Les auteurs montrent que 50% des acides aminés sont représentés par la glycine (20%), la proline, l'hydroxyproline et l'alanine ; la cystéine et le tryptophane restent les acides aminés les moins représentés. Les profils d'acides aminés essentiels (AAE) sont très inférieurs (1496 - 1550 mg AAE / g d'azote) au profil de référence pour l'alimentation humaine (3215 mg AAE / g d'azote) pour l'oeuf, en raison du déficit en tryptophane et en acides aminés aromatiques. Les données présentées ci-dessus montrent que les produits à forte teneur en collagène destinés à l'alimentation humaine, peuvent être additionnés en complément à des préparations à base de viande ou de volaille, sans pour autant diminuer leur valeur nutritionnelle (Zarkadas *et al.*, 1995). Rogov *et al.* (1992) ont montré, par simulation à partir des besoins en acides aminés

essentiels, que la valeur biologique des protéines de boeuf pouvait être augmentée en incorporant 15 à 20% de collagène par rapport à la quantité de protéines musculaires.

L'utilisation de tissus conjonctifs provenant de couennes de porc et de tendons présentant de fortes proportions en thréonine, glycine, alanine, isoleucine, méthionine, leucine, lysine, arginine et hydroxyproline (Tableau I.18.), a été étudiée par Laser-Reutersward *et al.*, (1985), en tant qu'ingrédient de formulation. Les préparations de produits à base de viande de boeuf (*biceps femoris*) avec différents pourcentages de collagène (complémenté ou non en méthionine 0,4% et tryptophane 0,15%), montrent une digestibilité minimale de 95%, quelque soit le diamètre des particules et ceci, bien que la valeur biologique et le coefficient UPN (y) diminuent linéairement en fonction du % de collagène (x) selon l'équation :

$$y = 82,8 - 0,6 * x$$

Une incorporation de 50% de collagène de couenne de porc à de la viande de boeuf, permet d'obtenir une digestibilité de 99%, sans être affectée par un traitement thermique de 74°C pendant 30 mn (Laser-Reutersward *et al.*, 1982).

**Tableau I.18. :** Composition en acides aminés de couennes de porc et de tendons après traitement thermique (74°C, 30 mn), exprimé en g / 18 g d'azote (100 g de protéines). D'après Laser-Reutersward *et al.* (1985).

Acides aminés	Couennes de porc			Tendon		
	4 mois	6 mois	5 ans	veau	vache	collagène insoluble
Acide aspartique	6,90	6,60	7,20	6,10	6,30	6,30
Thréonine	2,40	2,30	2,40	2,10	2,10	2,00
Sérine	4,30	4,10	4,60	3,50	3,60	3,60
Acide glutamique	11,40	10,80	12,00	10,20	10,50	10,60
Proline	12,90	13,70	14,70	12,50	13,00	13,90
Glycine	21,60	22,10	22,90	21,70	22,90	25,40
Alanine	9,20	9,10	10,00	9,30	9,70	10,40
Cystine	0,76	0,25	0,52	traces	0,20	traces
Valine	3,10	2,90	3,10	2,60	2,70	2,60
Méthionine	1,70	1,20	1,10	0,82	0,89	0,97
Isoleucine	1,80	1,60	1,80	1,70	1,70	1,60
Leucine	4,10	3,70	4,00	3,60	3,60	3,30
Tyrosine	1,30	1,10	1,20	0,81	0,72	0,69
Phénylalanine	2,50	2,40	2,50	2,10	2,10	2,10
Histidine	1,00	0,98	0,98	0,77	0,75	0,76
Lysine	4,20	4,10	4,30	3,20	3,40	2,90
Hydroxylysine	0,78	0,93	0,72	2,20	1,80	2,60
Arginine	8,70	8,50	9,30	8,50	8,90	9,00
Hydroxyproline	10,40	10,70	11,20	13,20	13,50	13,60
Tryptophane	0,09	0,16	0,17	0,07	traces	0,00

## V. CONCLUSION

Les nombreux travaux de recherche présentés dans ce chapitre, permettent de mettre en avant une évolution certaine, tant sur le plan technologique (au niveau des procédés d'extraction), que sur les méthodes de quantification des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles de fractions protéiques.

Au cours de ces vingt dernières années, les procédés d'extraction protéique par voie enzymatique ont largement supplanté les méthodes chimiques, considérées comme plus drastiques. La raison du succès de l'utilisation de protéases dans le secteur agro-alimentaire, réside dans l'efficacité, la commodité d'emploi, la rapidité, le rapport coût-performance, ainsi que la compatibilité de tels procédés avec l'environnement.

La profonde mutation des industries de transformation du secteur alimentaire, la compétitivité et la rentabilité économique, sont à l'origine d'innovations technologiques. La valorisation des co-produits de matières premières traitées, présentant une garantie d'hygiène irréprochable, permettrait au secteur alimentaire d'utiliser directement de nouveaux produits alimentaires intermédiaires (P.A.I.). En effet, les co-produits représentent un potentiel protéique important dans le secteur de la transformation des produits carnés. Valorisés par des procédés enzymatiques, adaptés au niveau industriel, les hydrolysats devraient améliorer les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des produits élaborés.

Nombreux sont les travaux réalisés au niveau laboratoire, en réacteurs discontinus (à petite échelle), permettant d'optimiser les paramètres influents sur les réactions et les mécanismes d'hydrolyse enzymatique (temps, température, concentration protéique et rapport enzyme / substrat). Cependant, ces facteurs font partie d'une liste non exhaustive (vitesse d'agitation, volume du réacteur, temps d'inertie des traitements thermiques, présentation du substrat protéique, etc...), ce qui entraîne l'apparition de biais dans la prédiction des modèles cinétiques. A ce propos, il est intéressant de noter que les substrats les plus couramment utilisés restent des substrats homogènes, solubles (protéines laitières, végétales, sang, abats), facilement mis en suspension. Peu d'études prenant en compte les différentes contraintes technologiques (agitation, traitements thermiques) et temporelles, sont réalisées à l'échelle industrielle. Les durées d'hydrolyse relevées dans la littérature sont souvent trop longues pour être appliquées en industrie.

L'amélioration des propriétés fonctionnelles est dépendante du degré de dénaturation du substrat protéique. Les nombreuses méthodes développées au stade du laboratoire et utilisées pour suivre la réaction d'hydrolyse sont, pour la plupart, difficilement transposables à l'échelle industrielle. Les produits obtenus doivent, d'autre part, conserver leurs qualités nutritionnelles, évaluées dans la littérature par un grand nombre de méthodes.

## ***MATERIELS ET METHODES***

*La connaissance est le début de l'action ; l'action, l'accomplissement de la connaissance.*  
(Wang-Yang-Ming)

---

I. EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE.....	81
I.1. Viande résiduelle de veau adhérente aux os .....	81
I.2. Prélèvement et broyage du substrat .....	81
I.2.1. Préparation et conditionnement du substrat pour l'étude à l'échelle du laboratoire .....	81
I.2.2. Utilisation du substrat à l'échelle pilote.....	81
I.3. Le procédé d'hydrolyse enzymatique.....	82
I.3.1. Enzymes utilisées et législation.....	82
I.3.1.1. La subtilisine Carlsberg (Alcalase® 2,4L) .....	82
I.3.1.2. La protéase neutre (Neutrase® 0,5L) .....	83
I.3.2. Mesure de l'activité enzymatique des protéases .....	83
I.4. Le suivi de la réaction enzymatique .....	84
I.4.1. La méthode du pH-stat utilisée à l'échelle du laboratoire .....	84
I.4.1.1. Calcul du degré d'hydrolyse.....	84
I.4.1.2. Détermination du htot .....	85
I.4.2. La méthode colorimétrique au TNBS .....	86
I.4.3. Corrélation entre la méthode du pH-stat et la méthode au TNBS.....	86
I.4.4. La méthode cryoscopique couplée à la conductimétrie.....	88
I.5. Les réacteurs enzymatiques discontinus .....	90
I.5.1. Expérimentation à l'échelle du laboratoire .....	90
I.5.2. Expérimentation à l'échelle pilote .....	91
I.6. Mesure de l'activité enzymatique résiduelle .....	91
I.7. Les traitements thermiques appliqués avant le procédé enzymatique .....	92
I.7.1. Traitement thermique à l'échelle du laboratoire .....	92
I.7.2. Traitements thermiques à l'échelle pilote .....	92
I.7.2.1. Passage du broyat au grill .....	92
I.7.2.2. Traitement thermique de la solution protéique hétérogène dans le réacteur.....	92

---

I.7.3. Inhibition de l'activité enzymatique par traitement thermique .....	92
I.7.3.1. Inactivation à l'échelle du laboratoire .....	92
I.7.3.2. Inactivation à l'échelle pilote .....	93
I.8. Séparation, dégraissage et clarification des produits .....	93
I.8.1. Filtration à l'échelle du laboratoire .....	93
I.8.2. Filtration à l'échelle pilote .....	93
I.8.3. Dégraissage et clarification à l'échelle du laboratoire .....	93
I.8.4. Dégraissage et clarification des hydrolysats à l'échelle pilote .....	93
I.9. Conservation des produits .....	94
I.9.1. Lyophilisation .....	94
I.9.2. Atomisation .....	94
II. LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE EXPERIMENTALE APPLIQUEE À LA VALORISATION DE CO-PRODUITS D'ABATTAGE .....	97
II.1. La démarche séquentielle de la méthodologie et les différentes modélisations .....	97
II.2. Utilisation des modèles empiriques .....	98
II.2.1. Utilisation des réseaux uniformes de Doehlert .....	99
II.2.2. Paramétrage et définition du domaine expérimental .....	99
II.2.3. Les réponses expérimentales .....	100
II.3. Optimisation du procédé d'extraction protéique par voie enzymatique : étude des surfaces de réponse .....	101
III. LES PROPRIETES FONCTIONNELLES ET NUTRITIONNELLES DES HYDROLYSATS PROTEIQUES .....	105
III.1. Les propriétés fonctionnelles .....	105
III.1.1. La solubilité .....	105
III.1.2. Les propriétés émulsifiantes .....	105
III.1.2.1. La capacité émulsifiante .....	105
III.1.2.2. La distribution de taille des globules gras .....	106

---

III.1.2.3. L'activité émulsifiante .....	107
III.1.2.4. La stabilité émulsifiante .....	107
III.1.3. La tension interfaciale.....	107
III.1.5. La distribution de taille des hydrolysats protéiques .....	108
III.1.6. Le comportement rhéologique des hydrolysats protéiques .....	109
III.2. Les propriétés nutritionnelles des hydrolysats protéiques. ....	111
III.2.1. Utilisation des méthodes dites <i>in vivo</i> .....	111
III.2.2. Les méthodes dites <i>in vitro</i> .....	112
III.2.2.1. La méthode du pH-stat .....	112
III.2.2.2. Utilisation de la cellule de dialyse .....	113
III.2.3. Les corrélations entre les méthodes de prédiction de la digestibilité protéique <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	113
III.3. Qualité microbiologique des hydrolysats obtenus .....	114
IV. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES.....	115
IV.1. Mesure du pH.....	115
IV.2. Détermination de la matière sèche totale .....	115
IV.3. Dosage des matières azotées .....	115
IV.4. Dosage et analyse de la matière grasse .....	115
IV.5. Dosage des minéraux .....	116
IV.6. Dosage des acides aminés .....	116
IV.7. Dosage du collagène .....	116
V. TRAITEMENTS STATISTIQUES.....	117

***EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE  
ENZYMATIQUE***

## **I. EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE**

### **I.1. Viande résiduelle de veau adhérente aux os**

Au cours de cette étude, nous avons exclusivement utilisé des os de veau garnis de viande résiduelle (travers et colliers), parmi les nombreux substrats mis à notre disposition à la Société des Salaisons d'Orly (boeuf, mouton, porc, volailles....). La quantité résiduelle de viande sur ce type de co-produit est importante après l'étape de découpe (Annexe III. Figures 1 et 2). L'analyse physico-chimique révèle la présence de 2,8 à 3,5% d'azote total, ce qui représente une quantité de protéines comprise entre 18 et 21% (NT x coefficient de Kjeldahl égal à 6,25 pour la viande).

### **I.2. Prélèvement et broyage du substrat**

Les os, récupérés dans des chariots en acier inoxydable de 150 litres, à la sortie de la salle de découpe, sont immédiatement entreposés en salle conditionnée à -4°C. Une fois réfrigérés à cette température, les os sont concassés à l'aide d'un broyeur CODIMAA (Cusset) d'une capacité de 500 litres, en utilisant uniquement un couteau simple face et deux grilles (diamètre 12). La durée du broyage pour une quantité d'os de 100 kg n'excède pas 15 minutes, ce qui permet d'obtenir un substrat dont la température reste toujours inférieure à 4°C, afin de préserver les qualités microbiologiques.

#### **I.2.1. Préparation et conditionnement du substrat pour l'étude à l'échelle du laboratoire**

Les os et la viande (100 kg) sont concassés, puis broyés finement pour obtenir des morceaux ne dépassant pas 5 mm. Ils sont ensuite conditionnés sous vide en emballage de 1 kg avant d'être congelés à -30°C. Toutes les expériences réalisées à l'échelle du laboratoire ont été effectuées sur le même lot de substrat.

#### **I.2.2. Utilisation du substrat à l'échelle pilote**

Des essais de récupération protéique sur des os non concassés ont montré que l'étape de broyage est indispensable pour assurer un bon fonctionnement des pales d'agitation du réacteur. D'autre part, le concassage des os a pour avantage d'augmenter la surface de contact avec les protéases, facilitant ainsi la réaction enzymatique.

Au cours des différents essais d'optimisation du procédé à l'échelle pilote, les os de veau sont immédiatement utilisés après concassage. A la sortie du broyeur, la taille des morceaux est alors comprise entre 2 et 5 cm.

### **I.3. Le procédé d'hydrolyse enzymatique**

#### **I.3.1. Enzymes utilisées et législation**

Au cours de cette étude, nous avons principalement utilisé des endopeptidases d'origine bactérienne et de qualité alimentaire, conformes aux spécifications recommandées par la législation (Journal Officiel de la République Française du 7 janvier 1989, arrêté du 21 décembre 1988). Cet arrêté est relatif aux hydrolysats de protéines dans la fabrication des aliments destinés à une alimentation particulière, ainsi qu'à la réglementation des produits. Les enzymes pouvant être utilisées dans la production d'un hydrolysat sont citées dans le chapitre "Synthèse bibliographique".

##### **I.3.1.1. La subtilisine Carlsberg (Alcalase<sup>®</sup> 2,4L)**

Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des subtilisines (EC.3.4.21.14a), protéases alcalines (Wells et Estell, 1990). L'Alcalase<sup>®</sup> 2,4L est produite à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. La qualité microbiologique est conforme aux normes de la FAO / OMS et reste inférieure à  $5 \times 10^4$  / g pour la flore aérobie mésophile et de  $10^2$  / g pour les moisissures (Annexe I : fiche produit). Le poids moléculaire de la subtilisine Novo est compris entre 27200 et 27537 selon Markland et Smith (1971). La subtilisine est une endopeptidase à sérine, elle hydrolyse également les liaisons esters et peut catalyser des réactions de transestérification et de transpeptidation. Contrairement à d'autres protéases à sérine comme la trypsine, les subtilisines présentent une spécificité très large (Walsh et Wilcox, 1970). De plus, la spécificité d'une protéase peut être influencée non seulement par la nature des acides aminés situés de part et d'autre de la liaison peptidique, mais aussi par la nature des résidus se trouvant proches de la liaison en relation avec la structure tertiaire de la protéine. Cowan (1983) signale une spécificité marquée de l'Alcalase<sup>®</sup> Novo pour les liaisons peptidiques dans lesquelles la fonction carboxylique est portée par les acides aminés hydrophobes.

##### **Les différents modes d'inhibition**

Toutes les subtilisines sont inhibées irréversiblement par le diisopropylfluorophosphate (DFP) jusqu'à moins de 1% d'activité résiduelle. La subtilisine Carlsberg est très fortement inhibée par le fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF), l'activité résiduelle est alors inférieure à 0,1%. D'après Ottensen et Svendsen (1970), les subtilisines se dénaturent en milieu acide (pH = 1 ou 2) ainsi qu'aux pH très alcalins. Un traitement thermique au-delà de 60°C dénature très rapidement l'enzyme. Les courbes d'activité et de stabilité de l'Alcalase<sup>®</sup> 2,4L sont représentées en Annexe I.

### **I.3.1.2. La protéase neutre (Neutrase® 0,5L)**

La Neutrase® 0,5L (EC.3.4.24.4f) est une protéase bactérienne produite par une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis*. Son poids moléculaire est compris entre 27000 (Uehara *et al.*, 1979) et 39500 (Maentsaelae et Zalkin, 1980). Son activité est de 0,5 UA / g. C'est une endopeptidase qui hydrolyse les liaisons dans lesquelles le groupement aminé est apporté par un acide aminé hydrophobe comme la leucine, la valine, l'isoleucine et la norleucine, ainsi que les liaisons dont le groupement carboxylique est porté par la proline. C'est une métalloprotéase comportant un atome de zinc, essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme. Elle est stabilisée par la présence d'ions calcium (Cf Annexe I).

#### **Les différents modes d'inhibition**

En l'absence d'ion  $Ca^{++}$ , l'enzyme perd 50% d'activité après 15 mn à 60°C (Feder *et al.*, 1971). Elle est inhibée par un agent chélatant tel que l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), du cyanure ou des acides aminés comme la cystéine et l'histidine (Mc Conn *et al.*, 1964) ainsi que par l'o-phénantroline et les ions phosphates (Yasunobu et Mc Conn, 1970).

Les courbes d'activité et de stabilité de la Neutrase® sont rapportées en Annexe I.

Les conditions de manipulation des préparations enzymatiques pour la Neutrase® 0,5L et l'Alcalase® 2,4L sont présentées en Annexe I.

### **I.3.2. Mesure de l'activité enzymatique des protéases**

Les activités protéolytiques des solutions enzymatiques de Neutrase® 0,5L et d'Alcalase® 2,4L sont mesurées par la méthode Anson (1939), légèrement modifiée par le laboratoire Novo Nordisk en 1978.

De l'hémoglobine dénaturée est protéolysée sous certaines conditions (pH 7,5 ; 25°C ; 10 mn) et précipitée par l'acide trichloroacétique (TCA). Un dosage spectrophotométrique à 750 nm est effectué sur la phase soluble en présence de réactif phénolique de Folin et Ciocalteu.

L'unité Anson (AU) est la quantité d'enzyme produisant une coloration correspondant à un milli-équivalent de tyrosine par minute à partir d'un hydrolysate d'hémoglobine soluble dans le TCA.

## I.4. Le suivi de la réaction enzymatique

### I.4.1. La méthode du pH-stat utilisée à l'échelle du laboratoire

Cette technique, utilisée dans le domaine de l'hydrolyse enzymatique a été mise au point par le Carlsberg Laboratory (Jacobsen *et al.*, 1957) et largement développée par Adler-Nissen (1976, 1977, 1982, 1984, 1986 a).

Le broyat d'os et de viande est introduit dans le réacteur thermostaté et la concentration protéique est ajustée par addition d'eau. Le pH, défini par les conditions opératoires, est régulé par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (P9 200 2, Biolafitte) (Annexe III. Fig. 5), par addition d'une solution de soude relativement concentrée (NaOH, 4 N) afin de limiter son apport à moins de 10% du volume réactionnel.

Une fois le pH stabilisé, la solution enzymatique est injectée dans le réacteur et la cinétique d'hydrolyse est suivie par la consommation de solution alcaline nécessaire au maintien du pH à la valeur présélectionnée.

#### I.4.1.1. Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse est défini par Adler-Nissen (1977) comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées ( $h$ ) sur le nombre de liaisons peptidiques totales ( $h_{\text{tot}}$ ).

Dans des conditions d'hydrolyse neutre ou alcaline, la dissociation du groupement aminé devient significative et, si aucune base n'est ajoutée, le pH diminue (Cf. chapitre "Synthèse bibliographique"). La relation entre le DH et la consommation de solution alcaline est donnée par la formule suivante :

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

où  $B$  = volume de solution alcaline ajoutée (ml)

$N_B$  = normalité de la solution alcaline

$\text{MP}$  = masse de protéines ( $\text{NT} \times 6,25$ ) présente dans le milieu réactionnel (g).

$h_{\text{tot}}$  = nombre total de liaisons peptidiques du substrat, déterminé à partir de sa composition en acides aminés (meqv/g de protéines)

$\alpha$  = degré de dissociation moyen des fonctions amines libérées :

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

où le pK représente le pK moyen des fonctions  $\alpha$ -aminées libérées durant l'hydrolyse.

Pour les polypeptides, le pK des groupements  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> est de 7,5 à 25°C avec une enthalpie d'ionisation comprise entre 40 et 50 kJ équ<sup>-1</sup> de NH<sub>2</sub>. Il peut être corrigé en fonction de la température selon la formule établie par Steinhardt et Beychok en 1964 :

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

où T est la température exprimée en Kelvin.

#### I.4.1.2. Détermination du h<sub>tot</sub>

Le nombre total de liaisons peptidiques peut être déterminé à partir de la composition en acides aminés du substrat. Pour la majeure partie des protéines alimentaires, le poids moyen des acides aminés est de l'ordre de 125 g / mole, ce qui conduit à un h<sub>tot</sub> d'environ 8 équivalents par kg de protéines (NT x 6,25) (Adler-Nissen, 1977).

Une exception notable apparaît avec la gélatine dont le h<sub>tot</sub> est de 11,1 par kg de protéines (5,55 x NT).

Nous avons calculé le poids moléculaire moyen sur le broyat d'os et de viande de veau à partir de la composition en acides aminés (Tableau II.1.).

**Tableau II.1. :** Composition en acides aminés (a.a.) du broyat d'os et de viande de veau en g a.a. / 100g (N x f<sub>N</sub>) sur différents substrats d'après Adler-Nissen (1986 a).

acides aminés	Broyat d'os et de viande de veau	Caséine	viande de boeuf	hémoglobine	Gélatine	PM
Alanine	7,44	3,07	5,84	8,48	11,30	90
Arginine	6,96	3,75	6,32	4,13	8,90	174
Acide aspartique	6,52	7,13	8,99	12,21	6,60	133
1/2 cystine	1,21	0,36	1,28	0,79	0,00	120
Acide glutamique	11,52	22,04	15,28	8,56	11,40	147
Glycine	14,16	1,97	4,86	5,03	27,60	75
Histidine	3,01	2,92	3,41	7,88	0,76	209
Hydroxyproline	6,98	-	-	-	14,40	131
Isoleucine	2,10	5,41	4,82	0,63	1,70	131
Leucine	5,24	9,51	8,11	14,44	3,36	131
Lysine	6,93	8,12	8,90	8,93	5,74	146
Méthionine	0,55	2,79	2,70	0,99	0,82	149
Ornithine	0,28	-	-	-	-	132
Phénylalanine	2,81	5,24	4,40	7,02	2,33	165
Proline	8,28	11,57	3,78	3,50	16,50	115
Sérine	3,58	6,03	4,03	4,43	4,15	105
Thréonine	3,42	4,66	4,59	3,41	2,27	119
Tyrosine	1,78	5,82	3,60	2,39	0,23	181
Valine	3,18	6,74	5,01	9,54	2,63	117
Tryptophane	nm*	1,68	1,54	2,05	0,00	204
facteur Kjeldahl f <sub>N</sub>	6,25	6,38	6,25	6,25	5,55	
htot recommandé (méq/g)		8,2	7,6	8,3	11,1	

\*(non mesuré)

$$\text{Le poids moléculaire moyen} = \frac{\sum (\text{a.a.} \times \text{PM})}{100} = 126,9 \text{ g/mole}$$

$$\begin{aligned} \text{Le nombre de liaisons peptidiques en équivalent par kg de protéines} \\ = \frac{1000}{126,91} = 7,88 \end{aligned}$$

Cependant, la technique du pH-stat est parfois inadaptée, voire inefficace dans le cas des hydrolyses enzymatiques se déroulant entre pH 5 et pH 6 où le gain et la perte de protons ont tendance à s'équilibrer mutuellement.

#### I.4.2. La méthode colorimétrique au TNBS

La méthode utilisant le TNBS développée en 1960 par Satake *et al.* est très utilisée pour suivre le degré d'hydrolyse au cours du temps. On l'emploie également pour déterminer le DH d'un hydrolysats préparé antérieurement, par dosage des groupements aminés libérés au cours de la réaction (Fields, 1971 ; Adler-Nissen, 1979).

Des aliquotes de la fraction soluble sont prélevées dans le réacteur sous agitation par un système de filtration, elles sont dissoutes dans du SDS (solution aqueuse à 1%) à chaud (75°C, 15 mn). Après dilution dans un tampon phosphate (pH 8,2) et addition de TNBS (0,1%), les solutions sont placées dans un bain d'eau à 50°C pendant 60 mn. La réaction est stoppée par addition d' HCl 0,1N. L'absorbance est lue à 340 nm (spectrophotomètre Beckman DU<sup>®</sup>-70) contre une gamme étalon de L-leucine (solution mère : 1,5mM dans du SDS à 1%).

#### I.4.3. Corrélation entre la méthode du pH-stat et la méthode au TNBS

En raison des prélèvements effectués au cours du temps pour le dosage au TNBS, il est nécessaire d'apporter une correction à la consommation de solution alcaline. Le volume de soude enregistré au cours de l'hydrolyse (B') est plus faible que la consommation théorique (B), en raison de la diminution du volume réactionnel. La valeur de B peut être calculée à partir de la formule récurrente suivante : (Novo Industri A/S, IB-number 102-GB, 1978)

$$B = B_n + (B' - B'_n) \times \frac{M}{M - n \times VD \times \rho}$$

avec :

VD : volume prélevé (ml)

B<sub>n</sub> : consommation théorique de base calculée après le n<sup>ième</sup> prélèvement (ml)

B'<sub>n</sub> : consommation réelle de base calculée après le n<sup>ième</sup> prélèvement (ml)

$\rho$  : masse volumique du milieu réactionnel, négligeable si VD est suffisamment petit (g/ml)

M : masse totale du milieu réactionnel (g)

$$\text{Si } n = 0 : \quad B = B' \quad (\text{équation 1})$$

$$\text{Si } n = 1 : \quad B = B_1 + (B' - B'_1) \times \frac{M}{M - 1 \times VD \times \rho} \quad (\text{équation 2})$$

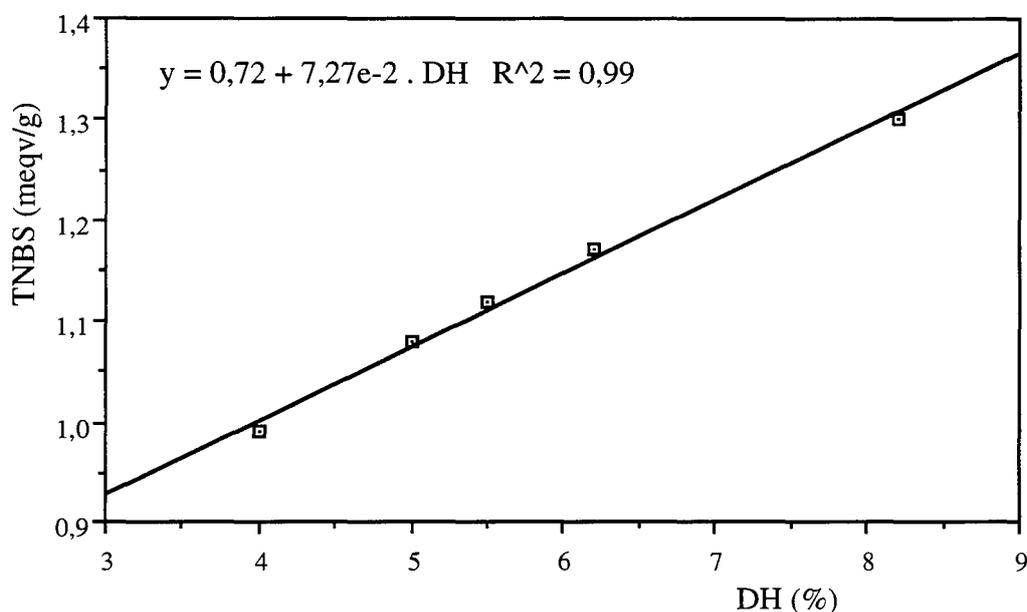
et  $B_1 = B'_1$  d'après (1)

$$\text{Si } n = 2 : \quad B = B_2 + (B' - B'_2) \times \frac{M}{M - 2 \times VD \times \rho}$$

$$\text{l'équation 2 permet d'obtenir : } B_2 = B_1 + (B'_2 - B'_1) \times \frac{M}{M - 1 \times VD \times \rho}$$

Nous avons, d'autre part, utilisé la méthode développée par Humbert *et al.* (1990) utilisant un réactif de transparisation breveté (TNBS 0,1% ; 37°C ; acide acétique ; DO = 420 nm).

La figure II.1. montre la droite de corrélation entre le degré d'hydrolyse (DH) évalué par la méthode du pH-stat et par la méthode au TNBS (y).



**Figure II.1. :** Corrélation entre le degré d'hydrolyse (DH) évalué par la méthode du pH-stat et la méthode colorimétrique au TNBS, à pH = 7,0.

La droite de corrélation obtenue ne passe pas par l'origine car la méthode au TNBS mesure les groupements  $\alpha$  et  $\epsilon$  aminés des acides aminés libres et des peptides présents. Cependant cette technique colorimétrique reste néanmoins mal adaptée pour suivre une cinétique (durée minimale de la réaction colorimétrique : 60 mn).

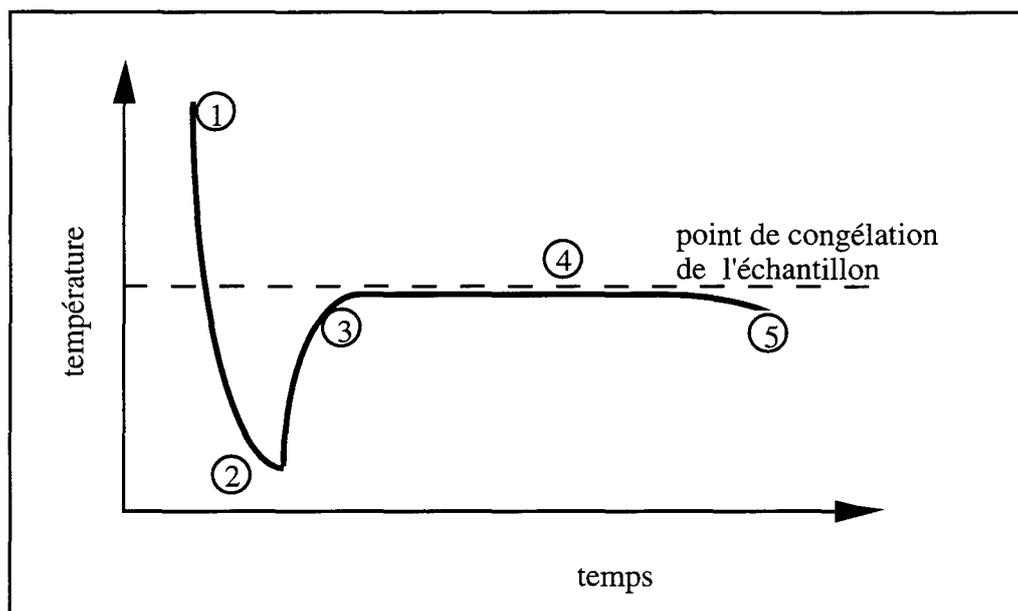
#### I.4.4. La méthode cryoscopique couplée à la conductimétrie

La cinétique d'hydrolyse enzymatique peut être suivie par la mesure de l'osmolarité de la solution au cours du temps (Adler-Nissen, 1984 ; Spendler, 1991).

Le cryoscope (Fiske MS™, Massachusetts USA) permet de déterminer le point de congélation d'une solution en 3 minutes avec une précision de  $\pm 0,001^\circ\text{C}$ . Au cours de la réaction d'hydrolyse, des fractions aliquotes (2 ml) sont prélevées dans le milieu réactionnel après filtration. Les mesures sont réalisées après calibration de l'appareil avec des solutions standard (100 et 500 mOsm/kg).

point de congélation ( $^\circ\text{C}$ )	Chlorure de sodium (g/kg)	osmolarité (mOsm/kg)
-0,185	3,097	100
-0,929	15,932	500

La figure II.2. illustre l'évolution de la température d'un échantillon au cours d'un cycle de mesure du point cryoscopique.



phase 1 : refroidissement rapide de l'échantillon sous faible agitation pour réduire les gradients de température qui affecteraient la précision de la mesure.

phase 2 : une fois la température de surfusion programmée, la solution est brusquement agitée, ce qui provoque la congélation de l'échantillon.

phase 3 : élévation rapide de la température de l'échantillon jusqu'à proximité du point de congélation en raison de la chaleur de fusion.

phase 4 : établissement d'un équilibre entre la phase glace et la phase eau au point de congélation. C'est à ce moment que la température de l'échantillon est enregistrée.

phase 5 : si l'échantillon était maintenu dans la chambre de refroidissement de l'appareil, de la chaleur serait extraite par le bain de refroidissement, et la température de l'échantillon recommencerait à descendre.

**Figure II.2.** : Les différentes phases de mesure du point cryoscopique d'un échantillon.

Le nombre de peptides augmente au cours de la réaction d'hydrolyse, ce qui a pour conséquence d'abaisser le point de congélation de la solution protéique. En raison de la rapidité de mesure, nous avons corrélé cette technique avec la méthode du pH-stat. Cependant, une correction doit être apportée aux valeurs obtenues, du fait de la surestimation due à l'addition de soude nécessaire à la régulation du pH. Des dispersions de broyat de veau dont la concentration protéique est comprise entre 7,0 et 9,0% et de sel (0,00 à 1,50 % de NaCl), permettent d'atteindre des corrélations élevées ( $R^2 = 0,99$ ) entre la conductivité et l'osmolarité des solutions (Figure. II.3).

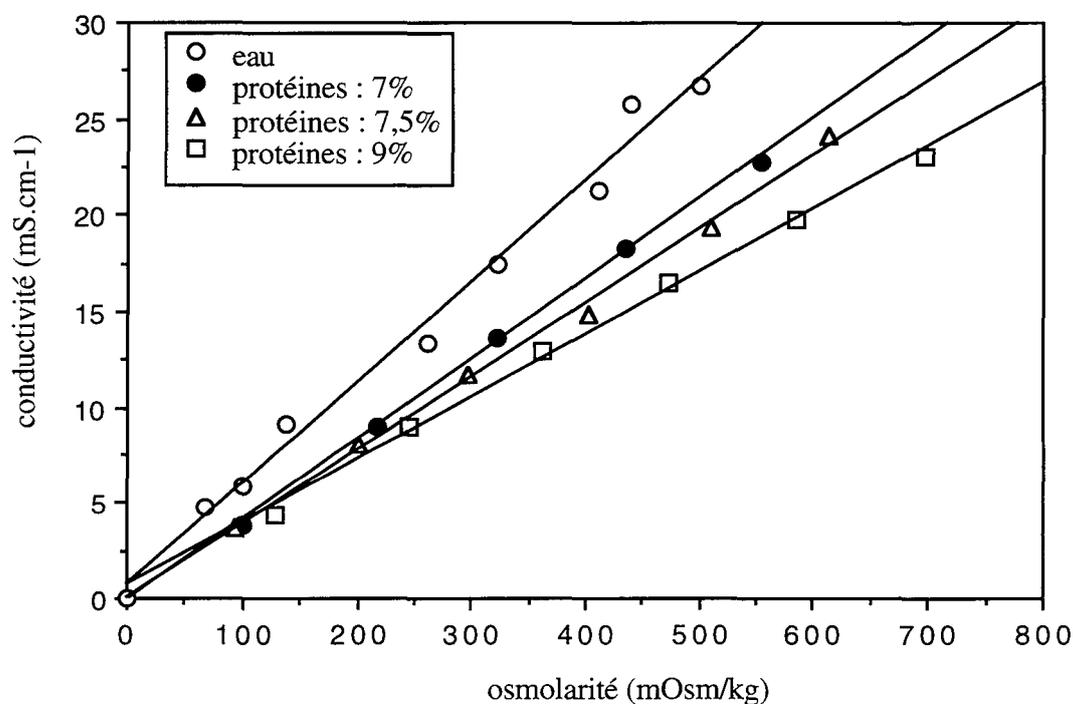
La température de congélation des échantillons est directement proportionnelle à l'osmolarité des solutions :

$$\text{mOsm / kg} = 1,858 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$$

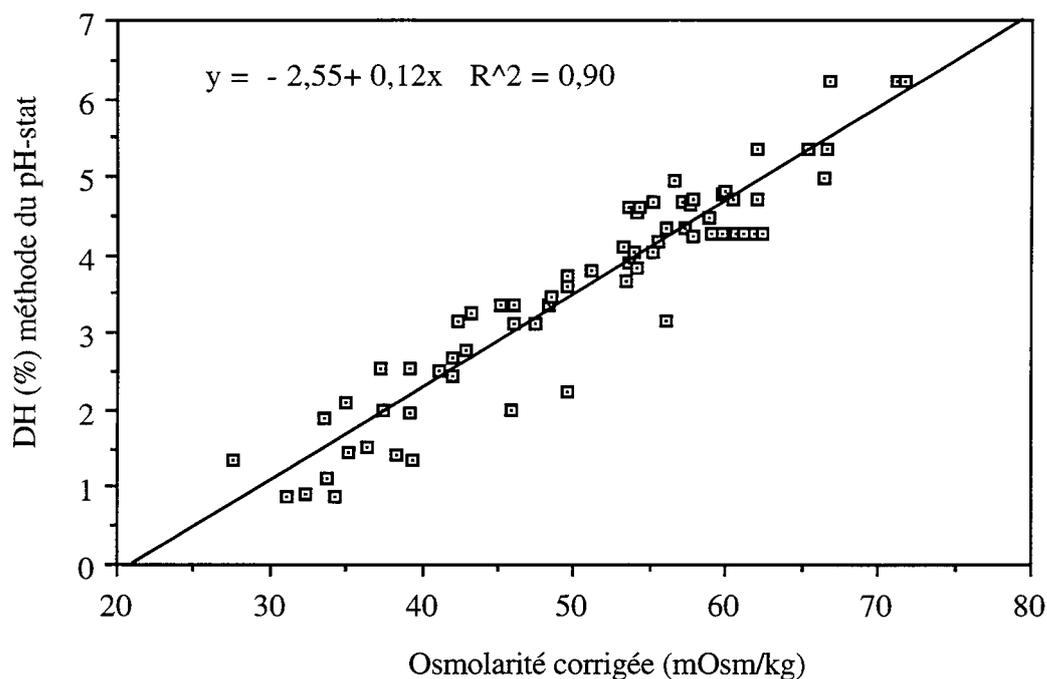
La conductivité des solutions est mesurée à l'aide d'un conductimètre / résistivimètre Tacussel (type CDRV 62 E571, Villeurbanne France).

Il est donc possible d'obtenir une corrélation (Figure II.4.) entre la méthode du pH-stat et l'osmolarité corrigée, tenant compte de l'addition de base dans le réacteur en appliquant la formule suivante d'après Spendler (1991) :

$$\text{osmolarité}(\text{corrigée}) = \text{osmolarité}(\text{échantillon}) - \text{osmolarité}(\text{NaCl})$$



**Figure II.3. :** Corrélations entre la conductivité et l'osmolarité de solutions protéiques : (7 ; 7,5 ; 9 %) et salines (0,00 ; 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,00 ; 1,25 ; 1,50 % de NaCl).



**Figure II.4. :** Corrélation entre la méthode du pH-stat (mesurant le degré d'hydrolyse par addition de base) et l'osmolarité d'une solution hétérogène de broyat d'os et de viande en suspension (mesurée par cryoscopie et conductivité).

### I.5. Les réacteurs enzymatiques discontinus

La plupart des procédés d'hydrolyse enzymatique de protéines sont développés au stade industriel en réacteur discontinu. Ce procédé classique présente certains avantages, tant au niveau du matériel (investissement), que technologiques (possibilité d'étude cinétique, facilité de régulation, nettoyage). La durée relativement brève de la réaction d'extraction, permet de limiter le développement bactérien dans le milieu réactionnel. En effet, une hydrolyse réalisée en présence de Neutrase<sup>®</sup> et d'Alcalase<sup>®</sup>, à des températures comprises entre 45 et 65°C, représente des conditions favorables au développement bactérien. D'autre part, le faible coût des solutions enzymatiques utilisées autorise leur inactivation par un traitement thermique, ce qui aura comme avantage de stériliser les hydrolysats avant les opérations de filtration et de centrifugation.

#### I.5.1. Expérimentation à l'échelle du laboratoire

L'évaluation des facteurs influents et l'optimisation du procédé de valorisation des co-produits d'abattage sont réalisées au laboratoire dans un réacteur de 2 litres stérilisable

et thermostaté (Biolaffitte), comportant un système d'agitation contrôlée, injection de vapeur de qualité alimentaire et régulation du pH (Annexe III Fig.5).

### I.5.2. Expérimentation à l'échelle pilote

Après concassage, le substrat est introduit dans un réacteur de 400 litres (CAPIC, Quimper) équipé d'un mélangeur commandé par un variateur de vitesse (0 à 70 tr / mn). La concentration en protéines dans le réacteur est ajustée par addition d'eau (Annexe III. Fig. 6). La température est régulée par l'intermédiaire d'une sonde de température (PT 100) plongée dans le milieu réactionnel. Une injection directe de vapeur de qualité alimentaire (3 bars) dans la solution protéique hétérogène est utilisée pour élever rapidement la température.

### I.6. Mesure de l'activité enzymatique résiduelle

La détection de l'activité protéolytique résiduelle des enzymes sur les hydrolysats, après traitement thermique, est effectuée selon la méthode Novo (1979) adaptée d'après les travaux de Santarius et Ryan (1977).

Le principe consiste à introduire un échantillon (5 µl) d'hydrolysat protéique dans un puits ménagé dans un gel contenant de la gélatine, de la caséine et de la N,N-diméthylcaséine. La quantité d'enzyme encore active diffuse dans le gel radialement et dégrade la caséine pendant 18 heures à 37,5°C. Il se forme alors une zone circulaire opaque visible après précipitation du caséinate de calcium, proportionnelle à l'activité protéolytique résiduelle. Il est possible de calibrer cette méthode en utilisant des quantités connues d'enzyme (Tableau II.2.).

**Tableau II.2.** : Détermination de l'activité protéolytique de la Neutrase<sup>®</sup> 0,5L et de l'Alcalase<sup>®</sup> 2,4L par diffusion dans un gel de gélatine et de caséines (boîte de Pétri contenant 10 ml de solution ; puits de 6 mm de diamètre (D<sub>0</sub>) ; solution enzymatique 5 µl ; lecture du diamètre (D) de la zone opaque après 18 h à 37,5°C).

Activité protéolytique Unité Anson / ml	Neutrase <sup>®</sup> 0,5L D-D <sub>0</sub> (mm)	Alcalase <sup>®</sup> 2,4L D-D <sub>0</sub> (mm)
dilutions		
10 <sup>-3</sup>	15,0	13,5
10 <sup>-4</sup>	8,5	8,0
10 <sup>-5</sup>	6,0	4,0
10 <sup>-6</sup>	0,0	2,0
régressions linéaires		
Neutrase <sup>®</sup> : log (activité) = 0,206 (D-D <sub>0</sub> ) - 6,014	R <sup>2</sup> = 0,98	
Alcalase <sup>®</sup> : log (activité) = 0,249 (D-D <sub>0</sub> ) - 6,214	R <sup>2</sup> = 0,93	

## **I.7. Les traitements thermiques appliqués avant le procédé enzymatique**

L'hydrolyse enzymatique est précédée par un traitement thermique du broyat d'os et de viande en solution à une température de 85°C pendant 15 mn (Annexe III. Fig. 8). Ce traitement a pour effet de séparer les graisses qui pourront être éliminées par centrifugation, ainsi que de solubiliser partiellement les tissus conjonctifs pour faciliter l'attaque enzymatique.

### **I.7.1. Traitement thermique à l'échelle du laboratoire**

L'augmentation de la température du fluide circulant dans la double paroi du réacteur thermostaté (98°C) permet d'atteindre en 10 mn la température de 85°C au cœur de la solution protéique sous agitation. Le réacteur est fermé pour éviter toute évaporation qui pourrait engendrer une modification de la concentration protéique.

### **I.7.2. Traitements thermiques à l'échelle pilote**

#### **I.7.2.1. Passage du broyat au grill**

Avant d'introduire le substrat dans le réacteur, il est possible de lui faire subir une étape de cuisson rapide pour développer des arômes de "grillade", favorisant par la même occasion une solubilisation partielle des graisses (Annexe III. Fig. 4).

#### **I.7.2.2. Traitement thermique de la solution protéique hétérogène dans le réacteur**

Le traitement thermique (85°C, 15 mn), nécessaire à la solubilisation du tissu conjonctif et au dégraissage partiel, est effectué par injection de vapeur de qualité alimentaire dans la solution protéique sous agitation (60 tr / mn).

### **I.7.3. Inhibition de l'activité enzymatique par traitement thermique**

#### **I.7.3.1. Inactivation à l'échelle du laboratoire**

Parmi les différentes méthodes existantes pour inactiver les protéases à la fin de la réaction enzymatique, nous utilisons l'injection de vapeur vive dans la solution protéique sous agitation lorsque le degré d'hydrolyse souhaité est atteint. Cette opération s'effectue par l'intermédiaire de la chaudière d'un percolateur à café (Krups) pouvant délivrer une pression de 15 bars. Le temps nécessaire pour passer de 50 à 90°C n'excède pas 3 à 4 mn.

L'activité résiduelle sur des hydrolysats obtenus avec la Neutrase<sup>®</sup> 0,5L (E / S = 7% ; protéine = 7% ; pH = 7,0 ; 50°C ; 60 mn) et l'Alcalase<sup>®</sup> 2,4L (E / S = 0,3% ; protéine = 7% ; pH = 8,4 ; 60°C ; 60 mn) a été déterminée sur les lyophilisats. Des traitements

thermiques de 4 mn pour la Neutrase<sup>®</sup> 0,5L et de 10 mn pour l'Alcalase<sup>®</sup> 2,4L à 80°C, conduisent respectivement à une activité résiduelle de  $2,612 \times 10^{-2}$  et  $1,986 \times 10^{-3}$  Unité Anson / g de lyophilisat. Un barème de température de 85°C appliqué pendant 15 minutes conduit, dans les deux cas, à l'absence d'activité résiduelle.

### **I.7.3.2. Inactivation à l'échelle pilote**

La réaction enzymatique est stoppée par injection de vapeur alimentaire dans la solution protéique sous agitation ainsi que par augmentation de la température du fluide chauffant le réacteur. La température de 98°C appliquée pendant une durée minimale de 15 mn est atteinte aisément, elle peut être augmentée en fonction des caractéristiques fonctionnelles du produit souhaité (Annexe III. Fig. 9). Ce barème de température permet d'obtenir une inactivation totale des protéases, ainsi qu'une pasteurisation haute des hydrolysats.

## **I.8. Séparation, dégraissage et clarification des produits**

### **I.8.1. Filtration à l'échelle du laboratoire**

Les hydrolysats protéiques sont récupérés à chaud. Un tamisage grossier, à l'aide d'un chinois en acier inoxydable, permet de récupérer les résidus osseux et cartilagineux. Une seconde filtration à l'aide d'un filtre calibré (30 mesh) conduit à l'obtention d'un jus protéique qui sera ensuite centrifugé (15 mn, 2°C, 1000 x g).

### **I.8.2. Filtration à l'échelle pilote**

Le mélange réactionnel est filtré à la température de 98°C en inclinant le réacteur de 400 litres sur un chariot équipé d'un tamis en acier inoxydable dont la maille n'excède pas 18 mesh. Le temps de filtration de la totalité du réacteur ne dépasse pas 15 minutes.

### **I.8.3. Dégraissage et clarification à l'échelle du laboratoire**

Le dégraissage de la solution protéique hétérogène est effectué à chaud (80°C) par centrifugation (15 mn, 1000 x g), il est suivi d'une phase de refroidissement permettant une élimination de la matière grasse solidifiée.

### **I.8.4. Dégraissage et clarification des hydrolysats à l'échelle pilote**

Le dégraissage des hydrolysats protéiques obtenus s'effectue par centrifugation à chaud (80°C) suivi par un refroidissement rapide sur échangeur à plaques (Vicarb, Saint Martin d'Heres, France) raccordé au réseau d'eau glycolée de l'entreprise (Annexe III

Fig. 14). Les hydrolysats protéiques récupérés à une température de 20°C sont ensuite entreposés dans des chambres réfrigérées à -4°C.

L'utilisation d'un séparateur à bol auto-débourbeur SA1 (Westfalia separator, Château-Thierry, France) et un décanteur-clarificateur CA 150-01-33 (Westfalia separator, Château-Thierry, France) (Annexe III. Fig. 13) permettent de dégraisser complètement les jus protéiques et de les clarifier (séparation de la fraction protéique lourde contenant la majeure partie des pigments hémiques).

Le pourcentage relativement faible de fraction protéique lourde nous a conduit à choisir un clarificateur-séparateur Westfalia (type NA7) alimenté par une pompe au débit de 420 litres / heure (vitesse du bol : 8520 tr / mn ; pression d'alimentation : 2 bars ; débouillage effectué toutes les 6 minutes ; diaphragme : 85) (Annexe III. Fig. 14).

La figure II.5. présente les différentes opérations unitaires utilisées à l'échelle pilote, pour la production d'hydrolysats protéiques à partir de co-produits d'abattage.

## **I.9. Conservation des produits**

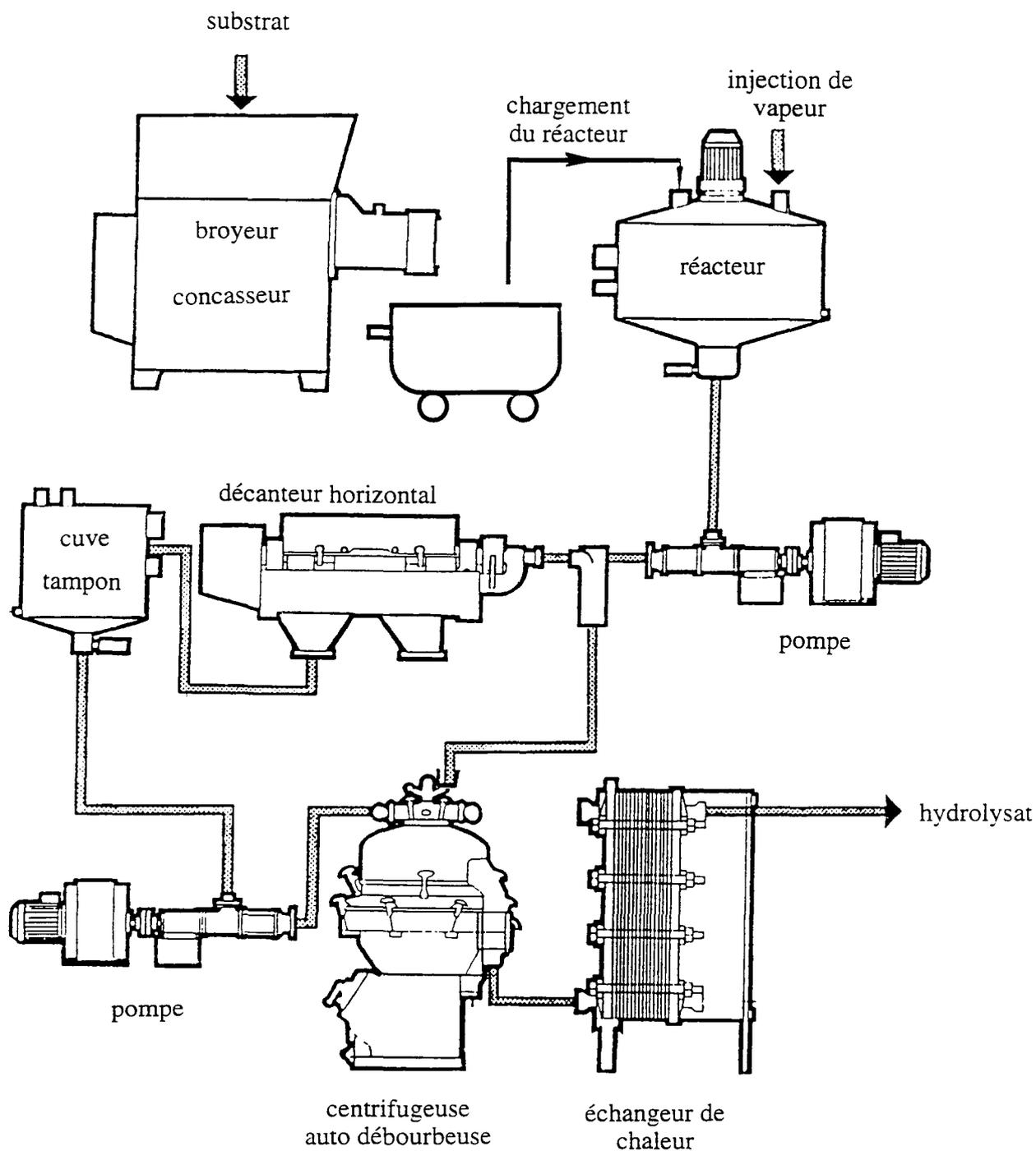
### **I.9.1. Lyophilisation**

Tous les hydrolysats, ainsi que les fractions protéiques lourdes obtenus à partir de la planification expérimentale conduite à l'échelle du laboratoire, sont conservés à -30°C après lyophilisation. Les jus protéiques sont congelés très rapidement dans des ballons plongés dans un mélange de carbo-glace et d'acétone avant d'être mis en dépression sur un lyophilisateur Lyovac modèle GT3 (Leybold-Heraeus, Orsay) pendant 24 heures.

A l'échelle pilote, les fractions lourdes récupérées à la sortie du décanteur sont également lyophilisées pour l'étude des propriétés nutritionnelles *in vivo* et *in vitro*.

### **I.9.2. Atomisation**

Dans le but d'étudier les propriétés fonctionnelles des hydrolysats obtenus à l'échelle pilote, les solutions protéiques sont atomisées (Niro atomizer mobile MINOR Copenhagen Danemark). L'opération consiste à faire passer à travers une turbine entraînée par air (pression : 5,2 kg / cm<sup>2</sup>) tournant à très haute vitesse (27000 tours / mn), une solution protéique à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex) au débit de 1,5 litres / heure. Cette étape permet d'augmenter la surface d'échange entre les gouttelettes de liquide et l'air chaud pulsé à 80 kg / h dans la chambre d'atomisation (température d'entrée : 175°C ; température de sortie : 85°C). Le volume de la chambre de séchage (800 mm de diamètre ; 600 mm de hauteur ; angle du cône : 60 degrés) permet un séchage quasi-instantané des protéines qui sont ensuite récupérées par l'intermédiaire d'un cyclone.



**Figure II.5. :** Procédé d'extraction protéique à partir de co-produits d'abattage par voie enzymatique.

## ***UTILISATION DES PLANS D'EXPERIENCES***

*Stratégie vaut toujours mieux que témérité.*  
(Confucius)

## **II. LA METHODOLOGIE DE LA RECHERCHE EXPERIMENTALE APPLIQUEE À LA VALORISATION DE CO-PRODUITS D'ABATTAGE**

La planification expérimentale n'est pas une technique nouvelle. Les premiers à s'être posé le problème de l'organisation des essais furent les agronomes qui ont compris l'intérêt des plans d'expériences. Il s'agissait surtout de réduire le nombre des essais prenant en compte de nombreux paramètres (type de terrain, ensoleillement, exposition, nature de l'espèce...). Dans les années trente, Fisher, Yates ainsi que des statisticiens comme Plackett, Burmann, Hotteling et Scheffé, développèrent de nouveaux "outils mathématiques" permettant de diminuer le nombre des essais sans pour autant perdre de la précision (plan carré latin, plan carré gréco-latin, analyse de variance ...). Cependant, l'aspect trop théorique et la complexité des calculs de l'approche proposée ont retardé l'utilisation de ces méthodes dans le monde industriel, malgré de nombreux ouvrages de vulgarisation (Vigier, 1988 ; Goupy, 1988 ; Sado et Sado, 1991 ; Lochner et Matar, 1992). Aujourd'hui, grâce au progrès informatique, les plans d'expériences représentent un outil indispensable à tout industriel soucieux d'améliorer la qualité de ses produits et d'accélérer la mise au point de ses procédés. Cette méthodologie se développe de plus en plus dans le secteur des biotechnologies (Roseiro *et al.*, 1992 ; Saval *et al.*, 1993 ; Chen, 1994) et de l'agro-alimentaire (Rustom *et al.*, 1991 ; Cun *et al.*, 1991 ; Noël *et al.*, 1991 ; Pierre *et al.*, 1992 ; Guillou et Floros, 1993 ; Camire *et al.*, 1994 ; Hsu, 1995).

### **II.1. La démarche séquentielle de la méthodologie et les différentes modélisations**

Le principe de la modélisation consiste à traduire par un ou plusieurs modèles mathématiques les relations de cause à effet entre les variables indépendantes (facteurs) et les variables dépendantes (réponses).

L'objectif est d'obtenir un canevas qui se substitue à la trop grande complexité des phénomènes, notamment dans le secteur agro-alimentaire. Les modèles mathématiques ne sont pas nécessairement des modèles quantitatifs (Cheruy, 1985). Un modèle peut aussi synthétiser, sous forme condensée, des résultats expérimentaux et nous sommes alors en présence de modèles descriptifs. L'objectif de la méthodologie de la recherche expérimentale consiste à maîtriser, décrire, prévoir ou expliquer le phénomène étudié. La modélisation implique un jugement, un point de vue pour cautionner les traits essentiels du modèle. Une stratégie de recherche, soigneusement élaborée avant l'expérimentation, permet souvent de très importantes économies ainsi qu'une interprétation plus fiable et plus aisée du phénomène, en accordant une place prépondérante à la réflexion, "au détriment" de l'expérimentation (Fargin *et al.*, 1985).

L'un des objectifs de ce travail consiste à développer un modèle descriptif "prévisionnel" multicritère basé sur l'expérimentation, dans le but d'optimiser le procédé et de limiter le nombre de facteurs à contrôler au stade pilote et industriel. En effet, le procédé d'extraction protéique par voie enzymatique, appliqué à un substrat aussi complexe et hétérogène que le broyat d'os et de viande, ne permet pas d'utiliser les modèles théoriques de cinétique enzymatique classique.

Au cours de cette étude, nous n'avons pas envisagé d'utiliser une matrice de "screening", attribuant généralement deux niveaux aux différentes variables, pour ne pas risquer d'éliminer les effets des interactions entre les facteurs. La stratégie de modélisation et d'optimisation du phénomène d'hydrolyse enzymatique aurait conduit à un modèle théorique erroné. D'autre part, l'un des objectifs de ce travail consiste à évaluer l'influence et les interactions des facteurs qui pourront être visualisés par la méthode des surfaces de réponse, en utilisant un modèle "prévisionnel" dans le but d'optimiser le procédé d'extraction.

## **II.2. Utilisation des modèles empiriques**

Les modèles empiriques postulés sont, pour la plupart, des modèles polynomiaux qui autorisent une démarche séquentielle. Ils permettent, à partir des réponses expérimentales obtenues dans des conditions opératoires précises, d'obtenir plusieurs possibilités d'équations:  $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$  qui déterminent mathématiquement la valeur des réponses en des points où aucune expérience n'a été réalisée (Annexe II. terminologie).

Nous avons utilisé un modèle polynomial quadratique pour modéliser le procédé d'extraction sur un espace suffisamment restreint, dans lequel le phénomène reste continu et où les surfaces de réponses ne sont pas trop complexes (éviter la présence de nombreux optima locaux). Il est important de signaler que la représentation polynomiale de la fonction réponse n'est valable qu'à l'intérieur du domaine expérimental. L'extrapolation de cette dernière à l'extérieur du domaine conduirait à un modèle théorique erroné. Nous voyons là l'importance qu'il faut accorder à la définition du domaine expérimental.

En nous appuyant sur les résultats expérimentaux obtenus au cours de l'étude des facteurs influents sur le procédé de protéolyse enzymatique, selon la méthode classique (Linder, 1992), nous avons postulé un modèle quadratique, car de nombreuses réponses présentaient une courbure non négligeable.

### II.2.1. Utilisation des réseaux uniformes de Doehlert

Pour estimer les coefficients du modèle prévisionnel, nous avons choisi d'utiliser parmi les nombreuses matrices (matrices composites centrées, équiradiales, Box-Benken, Hocke) mises à notre disposition (Feneuille *et al.*, 1983), les réseaux uniformes de Doehlert (1970) qui ont l'avantage de présenter des propriétés très intéressantes. Ce type de matrice, générée à partir d'un simplexe (Sado et Sado, 1991), présente une distribution uniforme des points expérimentaux dans l'espace des facteurs normés, augmentant ainsi la qualité du modèle prévisionnel. La précision du modèle peut être améliorée en fonction de la densité des points, disposés suivant un réseau rhombique. Le nombre d'expériences (N) à réaliser est déterminé par le nombre de paramètres (k) pris en compte :

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

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

### II.2.2. Paramétrage et définition du domaine expérimental

A partir de la liste non exhaustive des facteurs susceptibles d'agir sur le procédé d'extraction protéique par voie enzymatique (Linder, 1992), nous avons retenus 5 facteurs influents, en tenant compte des contraintes imposées par le procédé, réalisé en réacteur discontinu à l'échelle du laboratoire :

- la température : 5 niveaux de valeurs comprises entre 40 et 60°C sont attribués à cette variable (U1).

- le pH : afin de déterminer l'influence de cette variable (U2), contrôlée par les méthodes du pH-stat et osmométrie, 7 valeurs différentes sont retenues avec un domaine de variation compris entre pH 5,7 et 7,5.

- le rapport enzyme / substrat (E / S) dans le réacteur (variable U3) varie entre 2 et 8% sur 7 niveaux différents.

- La durée du traitement enzymatique (variable U4) est comprise entre 30 et 180 minutes sur 7 niveaux.

- la concentration en protéines (S) dans le réacteur (variable U5), doit être la plus élevée possible sans pour autant avoir un effet inhibiteur sur l'activité de la solution enzymatique, ou engendrer des problèmes mécaniques au niveau de l'agitation. Seuls 3 niveaux ont été retenus entre 6 et 9% par rapport à la masse totale du volume

réactionnel. Les niveaux des différents facteurs retenus ainsi que le domaine expérimental défini, sont présentés dans le tableau II.3.

**Tableau II.3.** : Domaine expérimental et niveaux des facteurs retenus pour l'optimisation du procédé d'extraction protéique à l'échelle du laboratoire.

facteurs	unités	domaine expérimental	niveaux
température (U1)	°C	40 45 <b>50</b> 55 60	5
pH (U2)	-	5,7 6,0 6,3 <b>6,6</b> 6,9 7,2 7,5	7
E / S (U3)	%	2,0 2,8 4,3 <b>5,0</b> 5,7 7,2 8,0	7
temps (U4)	mn	30 45 90 <b>105</b> 120 165 180	7
S (U5)	%	6,0 <b>7,5</b> 9,0	3

E : enzyme ; S : substrat protéique.

Nous avons été amenés à construire une matrice de Doehlert comprenant 31 essais distincts où les conditions expérimentales varient de manière programmée (tableau II.4.).

Des répétitions d'expériences (31a, 31b, 31c) ont été réalisées pour déterminer l'erreur expérimentale (analyse de la variance), erreur qui est intégrée dans le calcul de l'estimation des effets des facteurs. Ces expériences ont été réalisées au centre du domaine d'intérêt afin de déceler une dérive éventuelle liée au facteur "temps" ou à une diminution possible de l'activité de la solution enzymatique utilisée (contrôlée au cours de l'expérimentation).

### II.2.3. Les réponses expérimentales

Afin d'évaluer l'influence des 5 facteurs sur le procédé d'extraction protéique, plusieurs réponses expérimentales ( $\eta$ ) ont été retenues:

- a) les cinétiques du DH (%) en fonction du temps, mesurées par la méthode du pH-stat à 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 135, 150, 165, 180 minutes en fonction des conditions opératoires.

- b) les mesures du point cryoscopique, permettant de calibrer la méthode de prédiction du DH (%) par osmolarité.

- c) le rendement de récupération protéique :

$$\text{NT (hydrolysate)} / \text{NT (substrat protéique initial)}$$

- d) la masse de résidus présents dans le réacteur, exprimée en g de matière sèche par kg de substrat frais.

- e) la masse du culot de centrifugation (1000 x g, 4°C, 10 mn) après filtration des résidus, exprimée en g de lyophilisat par kg de substrat frais.

- f) la masse du surnageant de centrifugation (1000 x g, 4°C, 10 mn) après filtration des résidus, exprimée en g de lyophilisat par kg de substrat frais.

- g) la masse totale de poudre de lyophilisat d'hydrolysate protéique, exprimée en g de poudre par kg de substrat frais.

- h) le degré de protéolyse permettant de quantifier la proportion d'acides aminés libres et de petits peptides. Cette réponse est exprimée par le rapport :

$$\text{NNP (surnageant)} / \text{NT (surnageant)}.$$

- i) le rapport NT (culot de centrifugation) / NT (jus protéique), représentant le pourcentage de macropeptides dans l'hydrolysate. Cette réponse permet de paramétrer le procédé en fonction des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles recherchées.

Nous représenterons par  $\eta$  la valeur de la réponse théorique en l'absence de l'erreur expérimentale:  $\eta = f(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5)$ .

Chacune des réponses peut être représentée par une équation polynomiale du second degré valable uniquement sur l'ensemble du domaine expérimental :

$$\eta_j = \beta_{j0} + \sum_{i=1}^5 \beta_{ji} X_i + \sum_{i=1}^5 \beta_{jii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 \beta_{jij} X_i X_j$$

où  $\eta_j$  représente les variables dépendantes,  $X_i$  les variables indépendantes,  $\beta_{j0}$  le terme constant,  $\beta_{ji}$  les coefficients linéaires du premier ordre,  $\beta_{jii}$  les termes carrés,  $\beta_{jij}$  les termes d'interaction. Il est important de prendre en compte les 21 coefficients de l'équation polynomiale pour obtenir la meilleure estimation prédictive du phénomène.

### II.3. Optimisation du procédé d'extraction protéique par voie enzymatique : étude des surfaces de réponse

Le but de l'optimisation consiste à trouver l'ensemble des variables opératoires qui entraîne un état souhaité pour le système. A partir du modèle polynomial, il est possible de prédire la valeur de la réponse pour différentes valeurs expérimentales. Le tracé des isoréponses, définies comme des courbes de niveau, permet de visualiser à l'intérieur du domaine expérimental, toutes les conditions opératoires qui aboutissent à une même valeur de réponse. On définit les isoréponses comme des courbes de niveau de la surface de réponse, telles que la fonction  $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$  soit égale à une constante. Les courbes d'isoréponses sont représentées en fonction des différentes variables, en prenant en compte deux paramètres.

**Tableau II.4. :** Plan d'expérimentation.

Exp. n°	T (°C)	pH	E / S (%)	durée (mn)	S (%)
	U1	U2	U3	U4	U5
1	60	6,6	5,0	105	7,5
2	40	6,6	5,0	105	7,5
3	55	7,5	5,0	105	7,5
4	45	5,7	5,0	105	7,5
5	55	5,7	5,0	105	7,5
6	45	5,7	5,0	105	7,5
<b>31a</b>	<b>50</b>	<b>6,6</b>	<b>5,0</b>	<b>105</b>	<b>7,5</b>
7	55	6,9	8,0	105	7,5
8	45	6,3	2,0	105	7,5
9	55	6,3	2,0	105	7,5
10	50	7,2	2,0	105	7,5
11	45	6,9	8,0	105	7,5
12	50	6,0	8,0	105	7,5
<b>31b</b>	<b>50</b>	<b>6,6</b>	<b>5,0</b>	<b>105</b>	<b>7,5</b>
13	55	6,9	5,7	180	7,5
14	45	6,3	4,3	30	7,5
15	55	6,3	4,3	30	7,5
16	50	7,2	4,3	30	7,5
17	50	6,6	7,2	30	7,5
18	45	6,9	5,7	180	7,5
19	50	6,0	5,7	180	7,5
20	50	6,6	2,8	180	7,5
<b>31c</b>	<b>50</b>	<b>6,6</b>	<b>5,0</b>	<b>105</b>	<b>7,5</b>
21	55	6,9	5,7	120	9,0
22	45	6,3	4,3	90	6,0
23	55	6,3	4,3	90	6,0
24	50	7,2	4,3	90	6,0
25	50	6,6	7,2	90	6,0
26	50	6,6	5,0	165	6,0
27	45	6,9	5,7	120	9,0
28	50	6,0	5,7	120	9,0
29	50	6,6	2,8	120	9,0
30	50	6,6	5,0	45	9,0
<b>31</b>	<b>50</b>	<b>6,6</b>	<b>5,0</b>	<b>105</b>	<b>7,5</b>

T : température ; E : enzyme ; S : substrat protéique.

Il est impossible de représenter la surface de réponse pour plus de deux paramètres. La représentation graphique est obtenue en traçant autant de diagrammes qu'il y a de couples possibles  $x_i, x_j$ . Pour chaque couple, on fixe toutes les autres variables à des valeurs constantes (dans notre cas : au centre du domaine). En fonction du nombre de facteurs, 10 couples de paramètres possibles permettent de tracer 10 surfaces de réponse pour chaque réponse expérimentale étudiée. Les représentations graphiques des surfaces de réponse sont obtenues en générant, par le logiciel NEMROD (Mathieu et Phan-Tan-Luu, 1992), autant de diagrammes qu'il y a de couples de facteurs différents et de valeurs imposées aux 3 autres variables.

***LES PROPRIETES FONCTIONNELLES ET  
NUTRITIONNELLES DES HYDROLYSATS***

### III. LES PROPRIETES FONCTIONNELLES ET NUTRITIONNELLES DES HYDROLYSATS PROTEIQUES

#### III.1. Les propriétés fonctionnelles

##### III.1.1. La solubilité

La solubilité des hydrolysats lyophilisés est déterminée à partir des dispersions protéiques (1% NT poids / volume) en fonction du pH. Le pH des solutions est ajusté au moyen de HCl et NaOH 0,1 et 0,01 N, sous agitation pendant 15 mn, jusqu'à stabilisation. La dilution entraînée par addition de solution alcaline ou d'acide est prise en compte dans l'ajustement du volume final. Les solutions sont centrifugées à 28000 x g pendant 30 mn à 4°C. Le pourcentage d'azote soluble (NS) pour chaque valeur de pH est calculé à partir de la formule suivante (Regenstein, 1984) :

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

##### III.1.2. Les propriétés émulsifiantes

Les propriétés émulsifiantes sont évaluées par mesure de la conductivité électrique spécifique ( $\mu\text{mho} / \text{cm}$ ) sur les émulsions obtenues à partir des hydrolysats protéiques et de l'huile de maïs (marque : Epi d'Or, France), dont la composition en acides gras est la suivante :

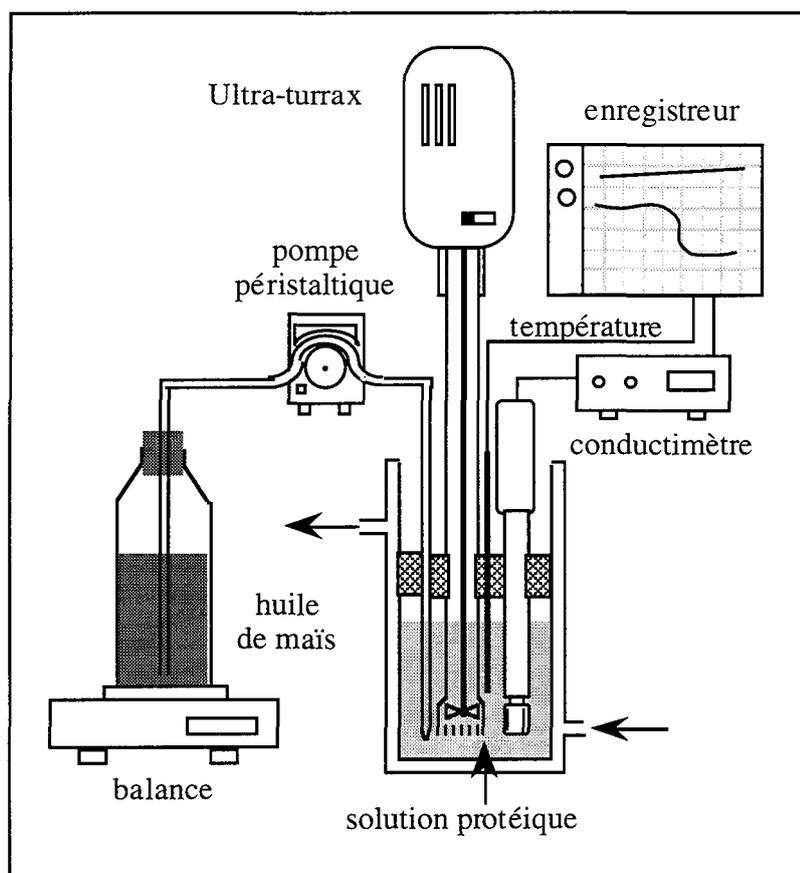
C18:2 = 60,85% ; C18:1 = 27,12% ; C16 = 12,03% ; densité de l'huile = 0,91 (conductivité de l'huile :  $49 \times 10^{-9}$  mho/cm).

L'homogénéisation des dispersions protéiques est effectuée à l'aide d'un Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA<sup>®</sup> - Labortechnik) à 20000 tr / mn. Les solutions sont préparées à partir des hydrolysats lyophilisés solubilisés dans de l'eau distillée, puis elles sont ajustées à pH 7 à l'aide de NaOH ou HCl 0,1N, selon la méthode modifiée de Vuilleumard *et al.* (1990).

La figure II.6. montre l'appareillage utilisé pour la mesure de toutes les propriétés émulsifiantes.

##### III.1.2.1. La capacité émulsifiante

La capacité émulsifiante (CE) est déterminée selon la méthode de Vuilleumard *et al.* (1990) légèrement modifiée. Les cinétiques de mesure de conductivité des émulsions au cours du temps sont mesurées à l'aide d'un conductimètre / résistivimètre Tacussel type CDRV 62 équipé d'une électrode T100 (constante = 1).



**Figure II.6.** : montage expérimental pour la mesure des propriétés émulsifiantes.

L'addition d'huile dans les solutions (50 ml) à différentes concentrations protéiques (0,05 ; 0,10 ; 0,15 ; 0,20%), s'effectue par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique au débit de 16,5 g / mn jusqu'à l'obtention de l'inversion de phase, déterminée par la chute rapide de conductivité.

Afin de limiter l'élévation de température pendant la phase d'homogénéisation, nous utilisons une cuve thermostatée. La capacité émulsifiante des hydrolysats protéiques est exprimée selon la formule suivante :

$$CE (\%) = \frac{\left( \begin{array}{c} \text{masse d'huile émulsifiée dans} \\ 50 \text{ ml de solution protéique} \end{array} \right) - \left( \begin{array}{c} \text{masse d'huile émulsifiée} \\ \text{dans 50 ml d'eau} \end{array} \right)}{\text{masse de protéines initiale}} \times 100$$

### III.1.2.2. La distribution de taille des globules gras

La distribution de taille des globules gras formés au cours des émulsions est déterminée à l'aide d'un granulozétamètre Master Sizer Malvern® équipée d'une cellule MS1, sous agitation continue. Des fractions aliquotes sont prélevées directement dans l'émulsion

juste avant l'inversion de phase et sont diluées dans un tampon ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ; 0,01M ; pH 7,0) contenant 0,1% de SDS afin de limiter la floculation et la coalescence des globules gras.

### III.1.2.3. L'activité émulsifiante

L'activité émulsifiante (AE) et la stabilité émulsifiante (SE) sont évaluées par la mesure de la conductivité des émulsions obtenues par homogénéisation (20000 tr / mn ; 25°C ; 1,5 mn) de 50 ml de solution protéique à 0,1% (pH 7) et 15 ml d'huile, en utilisant le montage expérimental utilisé précédemment.

L'activité émulsifiante est définie par Kato *et al.* (1985) et Suttiprasit *et al.* (1993), comme étant la différence entre la conductivité initiale de la solution protéique ( $C_S$ ) et la conductivité minimale ( $C_{\min}$ ) de l'émulsion après 90 secondes d'homogénéisation.

$$AE = C_S - C_{\min} \quad (\text{équation 1})$$

### III.1.2.4. La stabilité émulsifiante

La stabilité émulsifiante est estimée à partir de la pente initiale de la courbe de mesures de conductivité suivant l'équation définie par Kato *et al.* (1985) :

$$SE = (C_S - C_{\min}) \Delta t / \Delta C \quad (\text{équation 2})$$

avec  $\Delta t / \Delta C$  = inverse de la pente initiale de la courbe de conductivité.

La différence entre les mesures de conductivité de la solution initiale et de l'émulsion, 5 minutes après l'arrêt de l'homogénéisation, permet de quantifier la stabilité de l'émulsion. En effet, plus l'écart entre ces deux valeurs est important, plus les phénomènes de coalescence et de floculation seront retardés.

### III.1.3. La tension interfaciale

La vitesse d'adsorption des solutions protéiques, reconstituées à partir des hydrolysats lyophilisés, est déterminée par des mesures de tension superficielle à l'interface solution / air selon la méthode de Suttiprasit *et al.* (1992). Nous avons utilisé la méthode de la lame de Wilhelmy avec un tensiomètre à affichage digital Krüss de type K10ST (Hambourg, Allemagne) ayant une précision de  $\pm 1$  mN / m, couplé à un enregistreur. Des solutions protéiques (25 ml) prélevées à partir d'une solution mère (0,1% NT x 6,25 ; pH 7,0 ; hydrolysats lyophilisés, DH différents obtenus sous Neutrase<sup>®</sup> 0,5L), sont introduites dans le cristallisateur du tensiomètre (préalablement nettoyé au bichromate de potassium sulfurique). Un agitateur magnétique assure l'homogénéité des

échantillons pendant 10 mn à la température de  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Les mesures de tension interfaciale sont enregistrées sur une durée de 120 mn.

La tension superficielle initiale du solvant  $\gamma_0$  (eau distillée) est de  $72,1 \text{ mNm}^{-1}$ . A partir des cinétiques de tension interfaciale, il est possible de déterminer la vitesse d'adsorption des fractions peptidiques, notamment en déterminant la pente à l'origine selon la méthode de Turgeon *et al.* (1991).

L'évolution de la tension superficielle des solutions en fonction de la concentration protéique est obtenue par addition successive de fractions (10  $\mu\text{l}$ ) de la solution protéique mère dans la cuve contenant initialement le solvant (eau distillée). Après une agitation de 10 mn dans les conditions décrites plus haut, la lame de platine est introduite dans la cuve puis la mesure est effectuée. Cette opération est ensuite reproduite jusqu'à l'obtention de la concentration micellaire critique (CMC).

### III.1.5. La distribution de taille des hydrolysats protéiques

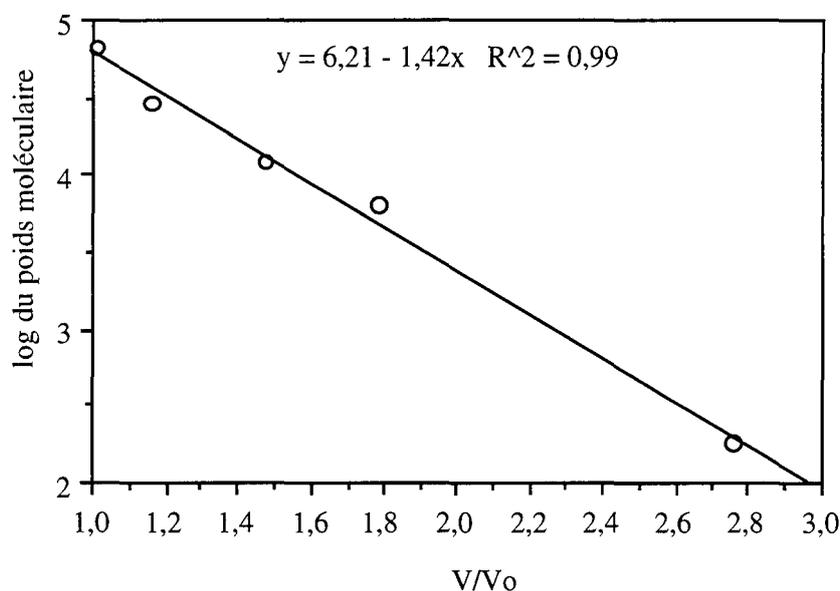
Les profils de distribution de taille des hydrolysats protéiques et des fractions protéiques lourdes ont été réalisés par chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex<sup>®</sup> G50-F (Scopes, 1982 ; Warzecha *et al.*, 1990). Les produits lyophilisés sont mis en solution dans un tampon Tris-HCl (50 mM ; pH 7,5) à la concentration de 1 mg / ml, puis filtrés (filtre Millipore<sup>®</sup> de 0,22  $\mu\text{m}$ ) avant d'être élués sur colonne (hauteur : 100 cm ; diamètre : 1 cm) sous débit contrôlé par une pompe péristaltique (0,5 ml / mn).

#### Rappel du principe de la chromatographie d'exclusion sur gel

Ce type de chromatographie est basé sur les possibilités différentes des fractions protéiques à pénétrer dans le réseau de la phase stationnaire constitué par le gel. Contrairement aux grosses molécules qui traversent rapidement la colonne, les petites molécules sont ralenties par leur trajet à l'intérieur des pores du gel en fonction de leur taille et sont éluées dans l'ordre décroissant de leurs masses moléculaires.

L'absorbance est mesurée en continu toutes les 10 secondes dans l'ultraviolet à 280 et 208 nm. En effet, l'absorption du groupement phénol de la tyrosine et indole du tryptophane est maximale à 280 nm. Cependant la concentration de ces acides aminés dans les hydrolysats étant très faible, la longueur d'onde de 208 nm a été retenue après avoir effectué un balayage entre 190 et 280 nm des différentes fractions de 3 ml collectées à la sortie du spectrophotomètre. L'usage de cette longueur d'onde est en accord avec les résultats de Adler-Nissen (1986 a) qui détermine les profils d'éluion d'hydrolysats à 206 nm. La figure II.7. montre la calibration de la colonne effectuée à l'aide d'un kit d'étalonnage Sigma n° MW-GF-70 "Gel filtration molecular weight

markers" (Bleu dextran : 2000000 ; Albumine : 66000 ; Anhydrase carbonique : 29000 ; Cytochrome C : 12400 ; Aprotinine : 6500 ; Tyrosine : 181).



**Figure II.7.** : Calibration de la colonne chromatographique d'exclusion sur gel Séphadex® G50-F (1 mg / ml ; Tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 ; débit 0,5 ml / mn ; V<sub>0</sub> : volume mort de la colonne ; V : volume élué).

### III.1.6. Le comportement rhéologique des hydrolysats protéiques

Les propriétés gélifiantes des hydrolysats protéiques, recherchées pour leur utilisation en formulation de plats cuisinés, sont caractérisées à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée (Rhéomètre plan - cône : Carri Med 1000 C). Le caractère viscoélastique des solutions est mesuré en fonction d'une cinétique de refroidissement de 20 à 0°C, pour une concentration protéique donnée. Le tableau II.5 résume les conditions opératoires.

La contrainte oscillatoire est assez faible pour que toutes les mesures soient effectuées dans un régime viscoélastique linéaire. Nous pouvons, par ailleurs, supposer que la contrainte  $\tau$  et la vitesse de cisaillement  $\varepsilon$  sont constantes dans tout l'espace occupé par le plateau (Clark and Ross-Murphy, 1987).

$$\tau = \frac{3 \times M}{2 \times \pi \times R^3} \quad \varepsilon = \frac{\omega}{\alpha \text{ (radian)}}$$

$$\sigma = G'_{\gamma} + \left( \frac{G''}{\omega} \right) \dot{\gamma} \quad \text{avec } \dot{\gamma} = \gamma_0 \omega \cos(\omega t)$$

**Tableau II.5 :** Conditions opératoires pour la mesure du comportement rhéologique des hydrolysats protéiques présentant une propriété gélifiante.

Rhéomètre plan - cône logiciel version 4.3	type : <b>Carri Med 1000 C</b> oscillation : balayage température
géométrie du cône n° 5164	diamètre = 60 mm ; $\alpha = 2,0^\circ$ (0,0349 rad) $F_\gamma = 28,65$ ; $F_t = 0,0177$
entrefer	52 $\mu\text{m}$
volume échantillon	2,4 ml
densité de l'échantillon	1,02 g/ml
température initiale	20°C
température finale	0°C
nombre de points	20
mesures par point	6
temps de stabilisation de la température pour chaque point	2 mn
déformation imposée*	$10 \times 10^{-3}$ radians (0,16%)
inertie	44,10 micro N.m / s <sup>2</sup>
fréquence *	1,00 Hz

\* le choix de ce couple déformation/fréquence permet d'obtenir un nombre de mesures important tout en limitant la déstructuration du réseau protéique pendant la gélification.

La partie réelle du module complexe  $G'$  (module élastique) est une mesure de l'énergie stockée puis libérée par cycle de déformation. La partie imaginaire du module complexe  $G''$  (module visqueux) est une mesure de l'énergie dissipée sous forme de chaleur par cycle de déformation. Ces deux composants, fonction de la fréquence, sont définis par :

$$G' = \left( \frac{\sigma_o}{\gamma_o} \right) \cos(\delta) \quad G'' = \left( \frac{\sigma_o}{\gamma_o} \right) \sin(\delta)$$

Un module de cisaillement complexe  $G^*$  peut être défini :

$$G^* = \frac{\sigma_o}{\gamma_o} = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

Une autre fonction, très utilisée dans la caractérisation du comportement viscoélastique est la tangente ( $\delta$ ) définie par :

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$$

A partir de toutes les équations précédentes il est possible de déterminer le comportement rhéologique de la solution d'hydrolysats protéique.

### III.2. Les propriétés nutritionnelles des hydrolysats protéiques.

L'étude des propriétés nutritionnelles des hydrolysats a été réalisée en collaboration avec l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale : service du Professeur Nicolas, Unité 308 Mécanismes et régulation du comportement alimentaire.

#### III.2.1. Utilisation des méthodes dites *in vivo*

Des essais nutritionnels effectués sur des groupes de 10 rats Wistar de sexe mâle pesant  $45 \pm 5$  g ont été effectués sur une période de 28 jours. Le tableau II.6. donne la composition centésimale du régime expérimental.

**Tableau II.6. :** Composition du régime alimentaire des lots de rats Wistar pour la détermination des paramètres C.E.P., C.E.P.N., DA, DR, sur une période de 28 jours.

Composition		pourcentage du régime	
protéines : caséines		10	
méthionine		0,2	
huile de maïs		ajusté à 9%	
cellulose		5	
mélange minéral		5	
vitamines		2	
amidon de blé q.s.p.		100	
mélange minéral (g)			
CaHPO <sub>4</sub>	430	KCl	100
NaCl	100	MgO	10,5
MgSO <sub>4</sub>	50	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	5	oligo-éléments	10
q.s.p.	1000	(amidon de maïs gélatinisé)	
vitamines (mg ou UI/kg)			
inositol :	11	chlorhydrate de pyridoxine	2
niacine :	10	acide folique :	0,2
pantothénate de calcium :	6	acide ascorbique :	100
vitamine A :	2000 U.I.	acide p-aminobenzoïque :	11
chlorure de choline :	166	thiamine :	2
riboflavine :	2	vitamine D :	200 U.I.
vitamine B12 :	0,03	biotine :	0,04
ménadione :	5		

Le Test du Coefficient d'Efficacité Protéique (C.E.P.) proposé par Osborne et Mendel en 1919 consiste à enregistrer sur 28 jours le gain de poids du lot de jeunes rats en croissance et s'exprime par la relation :

$$C E P = \frac{\text{gain de poids}}{\text{protéine ingérée}}$$

$$C E P N = \frac{\text{gain de poids} + \text{perte de poids du groupe sans protéine}}{\text{protéine consommée}}$$

La prise alimentaire, le gain de poids, la teneur en azote des fèces des rats, récoltées au cours des 8 derniers jours de l'expérience, ont permis de calculer différents paramètres : la digestibilité apparente (DA) et la digestibilité réelle (DR) qui sont calculées à partir des formules suivantes :

$$\text{digestibilité apparente} = \frac{N \text{ dans le régime (g)} - N \text{ dans les fèces (g)}}{N \text{ dans le régime}} \times 100$$

$$\text{digestibilité réelle} = \frac{N_{\text{régime}} - (N_{\text{feces}} - N_{\text{feces (régime sans protéine)}})}{N_{\text{régime}}}$$

### III.2.2. Les méthodes dites *in vitro*

Une prédiction de la digestibilité des hydrolysats, beaucoup plus rapide, reproductible et moins coûteuse que les méthodes animalières a été réalisée à partir d'une méthode dite *in vitro*.

#### III.2.2.1. La méthode du pH-stat

Nous avons utilisé, parallèlement aux essais animaliers, la technique du pH-stat selon la méthode de Pederson et Eggum (1983) légèrement modifiée, sur différentes sources protéiques d'origine animale et végétale (Tableau II.7.).

**Tableau II.7. :** Les différentes sources protéiques utilisées pour calibrer la méthode de prédiction de la digestibilité *in vitro*.

sources protéiques lyophilisées	pourcentage d'azote
caséine (C 8654 Sigma)	14,50 ± 0,50
gélatine (4078 Merck)	15,76 ± 0,30
base protéique gélatineuse	11,75 ± 0,15
soja ( <i>King soy</i> )	11,37 ± 0,50
soja chauffé	11,33 ± 0,25
lupin blanc doux ( <i>Ares</i> )	13,12 ± 0,25
lupin blanc doux chauffé	12,13 ± 0,41
tourteaux de colza ( <i>Brassica napus</i> )	6,68 ± 0,05
tourteaux de colza TFTC	6,50 ± 0,98

Un "cocktail" enzymatique contenant de la trypsine (T-7418 Sigma), de la chymotrypsine (C-4129, Sigma) et une peptidase (P 7500, Sigma), est préparé suivant la méthode de McDonough *et al.* (1990).

Une quantité suffisante d'enzymes lyophilisées est dissoute dans de l'eau distillée pour obtenir, par ml de solution : 23100 unités de trypsine, 186 unités de chymotrypsine, 0,052 unité de peptidase. Le "cocktail" enzymatique est préparé en quantité suffisante pour une série de 10 expériences et son activité est contrôlée sur une solution de caséinate de sodium (Sigma C 8654) à 1 mg d'azote par ml de solution.

La consommation de solution alcaline (NaOH 0,1 N) est enregistrée pendant 10 mn après injection de 5 ml de solution enzymatique dans un réacteur thermostaté à 37°C, contenant 50 ml de solution protéique (1 mg N / ml), ajustée à pH 8,0 selon Hsu *et al.* (1977). Le pH est maintenu à cette valeur pendant toute la durée de l'hydrolyse enzymatique. Les volumes de solutions enzymatiques et de solutions protéiques sont 5 fois plus importants que ceux utilisés par McDonough *et al.* (1990) afin de limiter les erreurs expérimentales et ceci, malgré le coût important des enzymes. Chaque expérience est répétée 3 fois.

### III.2.2.2. Utilisation de la cellule de dialyse

La vitesse de libération de peptides est évaluée par dosage de l'azote au cours du temps sur une période de 6 heures selon la méthode décrite par Savoie et Gauthier (1986), utilisant une cellule de dialyse. La technique consiste à dialyser les solutions protéiques (seuil de coupure de la membrane : 1000 daltons) soumises à l'action protéolytique d'un système multi-enzymatique pepsine-pancréatine.

### III.2.3. Les corrélations entre les méthodes de prédiction de la digestibilité protéique *in vivo* et *in vitro*

Des corrélations entre les paramètres (CEP, CEPN, digestibilités apparente et réelle) obtenus par la méthode *in vivo* ont été établies avec la méthode enzymatique (volume de base ajouté au bout de 10 mn d'hydrolyse, degré d'hydrolyse) pour les protéines animales et végétales.

Nous avons, d'autre part, utilisé les équations de régression obtenues par Pedersen et Eggum (1983), à partir de 31 sources de protéines (n) différentes.

Corrélations obtenues par Pedersen et Eggum (1983) pour la digestibilité :

Protéines animales (n = 10) r = 0,98

$$\text{digestibilité} = 74,33 + 53,21 \times B_{10}$$

Protéines végétales (n = 13) r = 0,95

$$\text{digestibilité} = 78,61 + 40,29 \times B_{10}$$

Toutes sources protéiques confondues (n = 30)  $r = 0,96$   
digestibilité =  $76,14 + 47,77 \times B_{10}$

B<sub>10</sub> étant la quantité de solution alcaline ajoutée au bout de 10 mn.

Cette dernière équation a été reprise par 6 laboratoires pour valider la méthode du pH-stat dans le cadre d'une étude inter-laboratoire sur 17 sources protéiques d'origine animale et végétale (McDonough *et al.* 1990).

### III.3. Qualité microbiologique des hydrolysats obtenus

Des prélèvements sur le substrat à la sortie du broyeur, pendant les réactions d'hydrolyse, ainsi qu'à la fin du traitement thermique sont réalisés pour contrôler la qualité microbiologique des produits. Les analyses sont effectuées au sein de l'entreprise par le laboratoire de contrôle, ainsi qu'à l'échelle expérimentale au Laboratoire de Physico-chimie et Génie Alimentaires de l'E.N.S.A.I.A. Le tableau II.8. récapitule les différentes normes françaises utilisées au cours de cette étude (Journal Officiel de la République Française n° 1488-I : Hygiène alimentaire. Texte généraux, 1990 ; AFNOR : Contrôle de la qualité des produits alimentaires, 1990).

**Tableau II.8.** : Récapitulatif des normes françaises homologuées utilisées pour l'analyse microbiologique de viandes et produits à base de viande.

Viandes et produits à base de viande	Normes
Adaptation des directives générales	NF V 04-502
Echantillonnage et préparation des échantillons	ISO 3100-2
Produits déshydratés	NF 08-301
Aérobies Mésophiles	NF V 04-502 ISO 2293
Bactéries lactiques	NF V 04-503
Anaérobies sulfito-réducteurs	M.O.4.6
Anaérobies sulfito-réducteurs (Spores)	V 59-106
Coliformes	NF V 04-502 ISO 3811
Coliformes fécaux (dénombrement)	NF V 04-502
<i>Clostridium perfringens</i>	NF V 08-019 ISO 7937
<i>Escherichia coli</i>	ISO 6391
<i>Escherichia coli</i> présumé (Dénombrement)	ISO 3811
<i>Staphylococcus aureus</i>	NF V 04-502
<i>Salmonella</i> (recherche)	NF V 04-502 ISO 3565
<i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 5552
<i>Pseudomonas</i>	NF V 04-503

## **IV. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES**

### **IV.1. Mesure du pH**

Le pH est mesuré pendant la réaction d'hydrolyse en plongeant directement la sonde dans le réacteur, la précision est de 0,02 unité pH.

### **IV.2. Détermination de la matière sèche totale (MST)**

Les extraits secs du broyat d'os et de viande, des hydrolysats et des fractions protéiques lourdes sont déterminés par dessiccation à l'étuve à  $102\pm 1^\circ\text{C}$  jusqu'à poids constant.

### **IV.3. Dosage des matières azotées**

L'azote total (NT) et l'azote non protéique (NPN) du substrat initial, des hydrolysats sous forme liquide, lyophilisés ou atomisés sont estimés par la méthode de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984).

En raison de l'hétérogénéité du broyat d'os et de viande (tissus conjonctifs, protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques, matière grasse, substance minérale), la détermination de l'azote total s'effectue après deux étapes de broyage à l'aide d'un broyeur ménager (diamètre des trous de la grille : 4 mm). Les résultats exprimés représentent la moyenne de 6 déterminations indépendantes, au cours desquelles des échantillons d'environ 500 mg pesés exactement, sont minéralisés durant 2 heures à  $420^\circ\text{C}$  (Gerhardt, Kjeldatherm) puis distillés sur un appareil Vapodest 4S Gerhardt.

La quantité de protéines peut être obtenue en multipliant la quantité d'azote total par le facteur 6,25. Cependant, en raison de l'hétérogénéité des tissus protéiques, tous les résultats seront exprimés en % d'azote total.

L'azote non protéique des hydrolysats liquides, lyophilisés ou atomisés, est déterminé sur le surnageant des solutions à 10% de concentration finale en acide trichloracétique, après centrifugation à  $4^\circ\text{C}$ ,  $28000 \times g$  durant 30 mn (ultracentrifugeuse Beckman L5 50B classe H, rotor 50 Ti).

### **IV.4. Dosage et analyse de la matière grasse**

La teneur en matière grasse des échantillons est déterminée par extraction à l'éther de pétrole selon la méthode Soxhlet (A.O.A.C., 1984).

La composition des principaux acides gras contenus dans la matière grasse, recueillie après centrifugation est déterminée par chromatographie en phase gazeuse (A Girdel modèle 30, détecteur à ionisation de flamme ; colonne 20% de Carbowax 20m sur Chromosorb W 60/80 mesh) couplée à un intégrateur Amilabo (Lyon, France).

Un gramme de matière grasse est ajouté à 9 ml d'éther de pétrole et 0,5 ml de potasse méthanolique (12,9 g de KOH dans 100 ml de méthanol anhydre), on agite fortement pendant 10 secondes. La composition en acides gras est déterminée sur la phase étherée.

#### IV.5. Dosage des minéraux

Les teneurs en calcium, magnésium, sodium et potassium sont mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin-Elmer 1100) sur les cendres du broyat d'os et de viande, ainsi que sur les hydrolysats, obtenus après minéralisation à 520°C pendant 12 heures. Avant dosage, les cendres sont diluées dans une solution contenant 10% de chlorure de lanthane comme correcteur d'interactions (concentration : 116 g de LaCl<sub>3</sub> dans 1 litre de HCl concentré dilué au 1/4).

Le dosage du phosphore s'effectue sur les cendres solubilisées dans une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, en présence de molybdate d'ammonium. La teneur en phosphore est obtenue par lecture spectrophotométrique à 660 nm contre une gamme étalon de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

#### IV.6. Dosage des acides aminés

Les compositions en acides aminés du broyat d'os et de viande de veau, ainsi que des hydrolysats ont été effectuées au Laboratoire de Chimie Clinique du C.H.R. de Nancy par chromatographie sur colonne de résines échangeuses d'ions (Analyseur automatique haute performance Beckman<sup>®</sup> 7300). Les acides aminés, élués sous gradient de NaCl, subissent la réaction à la ninhydrine. La lecture photométrique est réalisée à 570 nm pour l'ensemble des acides aminés et à 440 nm pour la proline et l'hydroxyproline. Le dosage du tryptophane et de la cystéine est effectué selon la méthode de Yamada *et al.* (1991)

Afin de doser les acides aminés libres, les protéines sont éliminées par défécation à l'acide sulfosalicylique à 5% (200 µl d'acide pour 200 µl d'extrait). Le mélange est filtré (porosité 0,22µm) après centrifugation. Pour le dosage des acides aminés totaux, les échantillons sont hydrolysés à 105°C pendant 15 h (2,5 mg pour 1 ml HCl 6N) selon la méthode de Simpson *et al.* (1976).

#### IV.7. Dosage du collagène

Le collagène est dosé selon la méthode de Bonnet et Kopp (1984, 1986, 1992) par mesure colorimétrique (550 nm) en présence de réactif de Herlich. La réaction est calibrée par une gamme étalon de 4-L-hydroxyproline dont l'équation est la suivante :

$$y = 1,48.10^{-3} + 2,85.10^{-2} x \quad R^2 = 0,99$$

avec y l'absorbance à 550 nm et x la concentration en hydroxyproline ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ).

L'hydrolyse des échantillons liquides ou lyophilisés est effectuée en milieu perchlorique (15 ml) pendant 4 h à 100°C.

## V. TRAITEMENTS STATISTIQUES

Les résultats expérimentaux au niveau du laboratoire et présentés dans cette étude, sont des moyennes effectuées à partir de 3 essais. Les déterminations physico-chimiques concernant le substrat initial (broyat d'os et de viande) sont évaluées à partir de 6 répétitions. Les analyses de variance ont été effectuées en utilisant le logiciel StatView SE+Graphics™.

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

- analyse de variance, régression multilinéaire, analyse des résidus (REGSIA).
- les effets des facteurs principaux et des interactions (MEFFET)
- les surfaces de réponse (SUREPE).

## ***RESULTATS ET DISCUSSION***

*Savoir que l'on sait ce que l'on sait, et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas :  
voilà la véritable science.*

(Confucius)

---

I. OPTIMISATION DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE.....	121
I.1. Utilisation de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale.....	121
I.2. Définition de la stratégie expérimentale .....	122
I.2.1. Utilisation actuelle du potentiel protéique des co-produits au sein de l'entreprise .....	122
I.2.2. Nature, composition physico-chimique du substrat et qualité microbiologique.....	122
I.3. Les objectifs de l'étude.....	124
I.4. Choix des protéases .....	125
I.4.1. La réaction d'hydrolyse enzymatique à l'échelle laboratoire .....	125
I.4.2. Utilisation d'un pré-traitement thermique .....	126
I.5. Définition du domaine expérimental.....	130
I.6. Evaluation des contraintes matérielles.....	130
II. LES HYDROLYSATS PROTEIQUES DE CO-PRODUITS DE VEAU.....	140
II.1. Composition physico-chimique des hydrolysats.....	140
II.2. Composition en acides aminés .....	140
III. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES HYDROLYSATS PROTEIQUES OBTENUS A L'ECHELLE DU LABORATOIRE.....	141
III.1. La solubilité des hydrolysats .....	142
III.2. Les propriétés émulsifiantes des hydrolysats.....	144
III.2.1. La capacité émulsifiante (CE).....	144
III.2.2. Détermination de la distribution de taille des globules gras .....	146
III.2.3. L'activité émulsifiante .....	147
III.2.4. la stabilité émulsifiante des hydrolysats .....	149
III.3. Distribution de taille des hydrolysats.....	151
III.4. Cinétique de tension superficielle à l'interface solution protéique - air.....	152

---

IV. DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE .....	154
IV.1. Mesure et contrôle de la réaction d'hydrolyse.....	155
IV.1.1. Evolution du pH au cours de la réaction d'hydrolyse.....	155
IV.1.2. Evaluation du degré d'hydrolyse.....	156
IV.2. Bilan massique des opérations et composition des différentes fractions .....	157
IV.2.1. Evolution de la matière sèche pendant le procédé d'extraction.....	158
IV.2.2. Evolution de la teneur azotée.....	160
IV.2.3. Solubilisation des tissus conjonctifs .....	160
IV.2.3.1. Distribution de taille de l'hydrolysats protéique .....	161
IV.2.3.2. Mise en évidence de la propriété gélifiante de l'hydrolysats protéique .....	162
IV.3. Qualité sanitaire des co-produits de veau au cours des procédés technologiques .....	164
V. LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES HYDROLYSATS PROTEIQUES .....	165
V.1. Détermination de l'indice chimique : aminogrammes et acides aminés essentiels de l'hydrolysats protéique .....	166
V.2. Les méthodes animalières.....	167
V.2.1. Evolution du poids des rats en fonction du régime protéique.....	167
V.2.2. Valeur des différents coefficients caractérisant la qualité nutritionnelle de l'hydrolysats protéique obtenu à partir de co-produits de veau.....	169
V.3. Les méthodes enzymatiques.....	170
VI. ANALYSE ECONOMIQUE DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE .....	174
VI.1. Analyse des coûts de production.....	175
VI.2. Identification et analyse des coûts .....	176
VI.2.1. Evaluation du coût de production d'hydrolysats protéiques à partir de co-produit d'abattage en réacteur enzymatique discontinu .....	177
VI.2.2. La capacité de production actuelle.....	177

## **I. OPTIMISATION DU PROCÉDE D'EXTRACTION PROTÉIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE**

Suite à la revue des différents modes d'extraction protéique (concentrats, isolats, hydrolysats acides ou basiques) effectuée dans le chapitre synthèse bibliographique, il apparaît que la voie enzymatique est la plus adaptée au secteur industriel. Elle est la plus rapide, la moins coûteuse en énergie et en nombre d'opérations unitaires pour obtenir des produits de qualité.

Cependant, c'est un procédé difficile à contrôler en raison de sa rapidité et du nombre de paramètres qui interviennent au cours des mécanismes de la réaction d'hydrolyse des substrats protéiques. Malgré le nombre important d'études conduites au stade expérimental en laboratoire, très peu de transferts technologiques se sont concrétisés vers l'industrie, en particulier dans le domaine de la valorisation en alimentation humaine de co-produits carnés à très faible valeur ajoutée (substrat sensible du fait des manipulations qu'il a subies auparavant).

La prise en compte des mécanismes cinétiques des réactions enzymatiques étudiés sur des substrats simples permet l'élaboration de modèles théoriques dont la complexité dépend du stade d'expérimentation, du nombre de facteurs contrôlés et des hypothèses initiales. De nombreuses techniques d'optimisation existent et sont généralement basées sur la quantification d'une seule variable à la fois. D'un point de vue industriel, il est important de considérer l'ensemble du procédé d'extraction et ses facteurs de variation.

Au cours de notre travail, nous avons pris la décision de modéliser le procédé d'extraction protéique d'un substrat complexe (principalement composé de broyats de colonnes vertébrales de veau) à partir des informations extraites de résultats expérimentaux.

### **I.1. Utilisation de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale**

Les objectifs du travail effectué dans un premier temps au Laboratoire de Physico-chimie et Génie Alimentaires, étaient de paramétrer le procédé d'extraction à l'échelle du laboratoire. Les méthodes "classiques" généralement utilisées, coûteuses en expérimentations, ne permettent pas de quantifier l'influence et les interactions entre les facteurs, puisqu'elles étudient l'influence d'un paramètre en fixant le niveau de tous les autres. La détermination de l'influence et des interactions possibles entre les nombreux facteurs intervenant au cours d'une hydrolyse enzymatique sur un substrat complexe hétérogène, est rendue possible par l'utilisation de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale. Plutôt que des modèles théoriques, qui à partir d'hypothèses, confrontent les grandeurs mesurables obtenues par simulation aux résultats expérimentaux, nous

avons préféré des modèles empiriques qui sont, pour la plupart, des modèles polynomiaux.

## **I.2. Définition de la stratégie expérimentale**

Dans le but de limiter le nombre de variables à contrôler au stade industriel, la méthode empirique (basée sur l'expérimentation) nécessite de bien définir le problème, les objectifs à atteindre, ainsi que les contraintes inhérentes au procédé. La démarche consiste dans un premier temps, à choisir les facteurs à étudier, puis à définir le domaine expérimental dans lequel les informations inconnues seront extraites. La définition du domaine expérimental pour chacun des facteurs est réalisée à partir des résultats d'une étude effectuée sur les paramètres susceptibles d'avoir une influence sur le procédé et les produits obtenus (Linder, 1992). Les résultats sont présentés au chapitre "Matériels et Méthodes" au tableau II.3.

### **I.2.1. Utilisation actuelle du potentiel protéique des co-produits au sein de l'entreprise**

La société "Les Salaisons d'Orly" produit en moyenne 30 à 35 tonnes de co-produits (couennes et os) par mois, toutes viandes confondues (boeuf, veau, mouton, porc, volaille).

année	1992	1993	1994
co-produits (tonnes)	378	394	414

Une partie (en moyenne 4 tonnes par mois) est valorisée dans l'usine sous forme de bouillon utilisé en tant qu'ingrédient de formulation de plats cuisinés : les os concassés ou non, sont introduits dans un réacteur, additionnés d'eau puis portés à ébullition pendant 7 à 9 heures. Un jus clair, légèrement aromatisé est obtenu, mais une grande quantité de viande (plus de 60% de la quantité initiale adhérente à l'os) n'est pas récupérée. Les co-produits sont ensuite destinés à la fabrication de farine pour alimentation du bétail (Société Charvet).

### **I.2.2. Nature, composition physico-chimique du substrat et qualité microbiologique**

Nous avons exclusivement utilisé des co-produits de veau (colonnes vertébrales, colliers) dont les compositions physico-chimique, minérale, et la qualité microbiologique sont respectivement détaillées dans les tableaux III.1., III.2., III.3. La composition moyenne en acides aminés du substrat initial est donnée au chapitre "Matériels et Méthodes" au tableau II.1. (pour le calcul du nombre total de liaisons peptidiques).

**Tableau III.1.** : Lots de broyats de colonnes vertébrales de veau conditionnés sous vide en paquet de 400 g avant congélation à -20°C.

substrat	date	
Azote total (%)	lot I (octobre 1992)	2,78 ; $\sigma = 0,11$ ; CV = 4,05
	lot II (janvier 1993)	3,01 ; $\sigma = 0,13$ ; CV = 4,50
	lot III (juillet 1993)	3,15 ; $\sigma = 0,12$ ; CV = 3,80
Protéines (x 6,25) en %	lot I (octobre 1992)	17,4± 0,7
	lot II (janvier 1993)	18,8± 0,8
	lot III (juillet 1993)	19,7± 0,7
Matière sèche (%)	lot I (octobre 1992)	44,93 ; $\sigma = 0,28$ ; CV = 0,64
	lot II (janvier 1993)	45,73 ; $\sigma = 0,33$ ; CV = 0,73
	lot III (juillet 1993)	42,37 ; $\sigma = 0,40$ ; CV = 0,94
Matière grasse (%)	lot I (octobre 1992)	15,64 ; $\sigma = 0,28$ ; CV = 1,80
	lot II (janvier 1993)	13,20 ; $\sigma = 0,41$ ; CV = 3,10
	lot III (juillet 1993)	11,41 ; $\sigma = 0,35$ ; CV = 3,06
cendres (%) (par rapport au poids de substrat frais)	lot I (octobre 1992)	10,15 ; $\sigma = 0,40$ ; CV = 3,94
	lot II (janvier 1993)	12,33 ; $\sigma = 0,42$ ; CV = 3,40
	lot III (juillet 1993)	11,07 ; $\sigma = 0,59$ ; CV = 5,32

moyenne effectuée à partir de 6 échantillons indépendants;  $\sigma$  = écart-type ; CV = coefficient de variation.

La variabilité physico-chimique du substrat entre les différents lots apparaît négligeable, et les résultats globaux sont en accord avec ceux de Dondero *et al.* (1987). Ces co-produits représentent un potentiel protéique important comparable à la teneur protéique d'un steak haché avec près de 19 % de protéines (NT x 6,25). La fraction minérale du substrat présentée au tableau III.2. montre une proportion importante de calcium et de phosphore. Contrairement à l'extraction par voie mécanique (viande séparée mécaniquement), la valorisation de tels substrats protéiques par voie enzymatique présente l'intérêt de fournir des hydrolysats protéiques faiblement minéralisés.

**Tableau III.2.** : Composition en éléments minéraux principaux du substrat (colonnes vertébrales de veau).

Sodium (g / kg)	Potassium (g / kg)	Magnésium (g / kg)	Fer (g / kg)	Calcium (g / kg)	Phosphore (g / kg)
1,9±0,2	1,7±0,2	0,9±0,2	0,2±0,1	35,6±3,2	16,8±2,1

La matière première utilisée provenant des salles de désossage doit présenter toutes les "garanties" souhaitables au niveau sanitaire (absence de flore pathogène). Les différentes manipulations du substrat protéique (concassage, broyage et rôtissage) peuvent toutefois

être à l'origine de contaminations microbiennes. Le tableau III.3. présente les analyses microbiologiques effectuées sur les co-produits de veau.

**Tableau III.3. :** Analyses microbiologiques sur un lot de 100 kg de substrat (colonnes vertébrales de veau) après broyage à 4°C.

	dénombrement	milieux temps (h), T (°C)	normes
Aérobies mésophiles	$3 \cdot 10^6$ / g	PCA 72 h, 30°C	V 04-502 ISO 2293
Anaérobies sulfitoréducteurs	0 < 10 par g	TSN 24 h ; 37°C	
Bactéries lactiques (dénombrement)	$5 \cdot 10^3$ 420.000 / g	ROGOSA 72 h ; 25°C	V 04-503
Coliformes	$10^3$	Vert Brillant 48 h ; 30°C	V 04-502 ISO 3811
Coliformes fécaux (dénombrement)	$10^3$ 1640 / g	Lauryl 48 h ; 44°C	V 04-502
Enterobacteriaceae	$2 \cdot 10^4$ 4100 / g	VRBG 24 h ; 30°C	ISO 5552
<i>Escherichia coli</i>	$10^3$	Lauryl + eau tryptonée	V 04-502 ISO 6391
Pseudomonas (dénombrement)	$4 \cdot 10^6$ 23.000.000 /g	King A (48 h ; 37°C) King B (72 h ; 25°C)	V 04-503
<i>Salmonella</i> (recherche) /25 g	absence absence	sélénite + tétrathionate	V 04-502 ISO 3565
<i>Staphylococcus aureus</i> (dénombrement)	$10^3$ 3800 / g	Baird Parker 48 h ; 37°C	V 04-502
<i>Listeria</i>	absence	gélose Oxford	directive 92

Dans le même but, les temps d'arrêt entre chaque opération unitaire et les volumes tampons doivent être limités au maximum, tout en permettant la souplesse nécessaire à une régulation optimale des paramètres au niveau industriel.

### I.3. Les objectifs de l'étude

Le premier objectif de cette étude est la valorisation du potentiel protéique représenté par la viande adhérant aux os en sortie de salle de désossage. La "liquéfaction des chairs", effectuée par voie enzymatique, permet la séparation des résidus osseux et des graisses. Différents modes d'utilisation de ces fractions riches en protéines sont envisageables dans l'alimentation humaine sous forme texturée ou liquide. En fonction des caractéristiques recherchées dans la formulation et l'élaboration de produits alimentaires (plats cuisinés), et notamment au cours de traitements technologiques (cuisson, stérilisation, stockage), l'utilisation des hydrolysats comme additifs pour leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles, est une voie de valorisation de ces co-produits.

Compte tenu de la forte proportion en tissus collagéniques des co-produits, un deuxième objectif consiste à élaborer une base protéique, présentant en plus des propriétés nutritionnelles et aromatisantes, des propriétés gélifiantes, largement recherchées en formulation.

#### **I.4. Choix des protéases**

Dans une telle voie, le processus enzymatique ne vise pas à créer des saveurs ou des arômes. Au contraire, il doit restituer au mieux les saveurs initiales du produit frais sans développer de goût ou d'arôme parasite (amertume). Nous avons utilisé pour cette raison deux endopeptidases : Neutrase<sup>®</sup>0,5L et Alcalase<sup>®</sup>2,4L de qualité alimentaire des laboratoires Novo. Ce choix a été déterminé à partir de nos études antérieures et de la bibliographie (O'Meara et Munro, 1984), en raison de leur faible coût (52 francs le litre pour la Neutrase<sup>®</sup>0,5L et 155 francs pour l'Alcalase<sup>®</sup>2,4L), et de leur large spécificité. Il n'a pas été utilisé de protéases dont l'activité optimale se situe à un pH acide afin d'éviter les manipulations de produit acide au niveau industriel.

Les domaines de température sont définis à partir de la spécificité de chacune des protéases. La détermination des facteurs influents et l'optimisation du procédé d'extraction de protéines de viande ont été conduites en utilisant la Neutrase<sup>®</sup>0,5L, en raison du deuxième objectif de ce travail consistant à obtenir une base gélifiante. Webster *et al.* (1982, 1984) ont montré que la pepsine, la papaïne, la Neutrase<sup>®</sup> et l'Alcalase<sup>®</sup> avaient une efficacité différente sur l'hydrolyse du collagène de co-produits (poumon et rumen). Ces auteurs montrent que la Neutrase<sup>®</sup> est une enzyme beaucoup moins efficace que l'Alcalase<sup>®</sup> au niveau de la solubilisation des tissus protéiques. Cependant, elle se révèle plus performante pour l'hydrolyse du collagène. En effet, la liaison la plus susceptible d'être hydrolysée par la Neutrase<sup>®</sup> est la liaison peptidique arginine - glycine, très fréquente dans le collagène alors que les principales liaisons peptidiques hydrolysées par l'Alcalase<sup>®</sup> (leucine - tyrosine et phénylalanine - tyrosine) sont beaucoup moins représentées (Veis, 1964 in : Webster *et al.*, 1982).

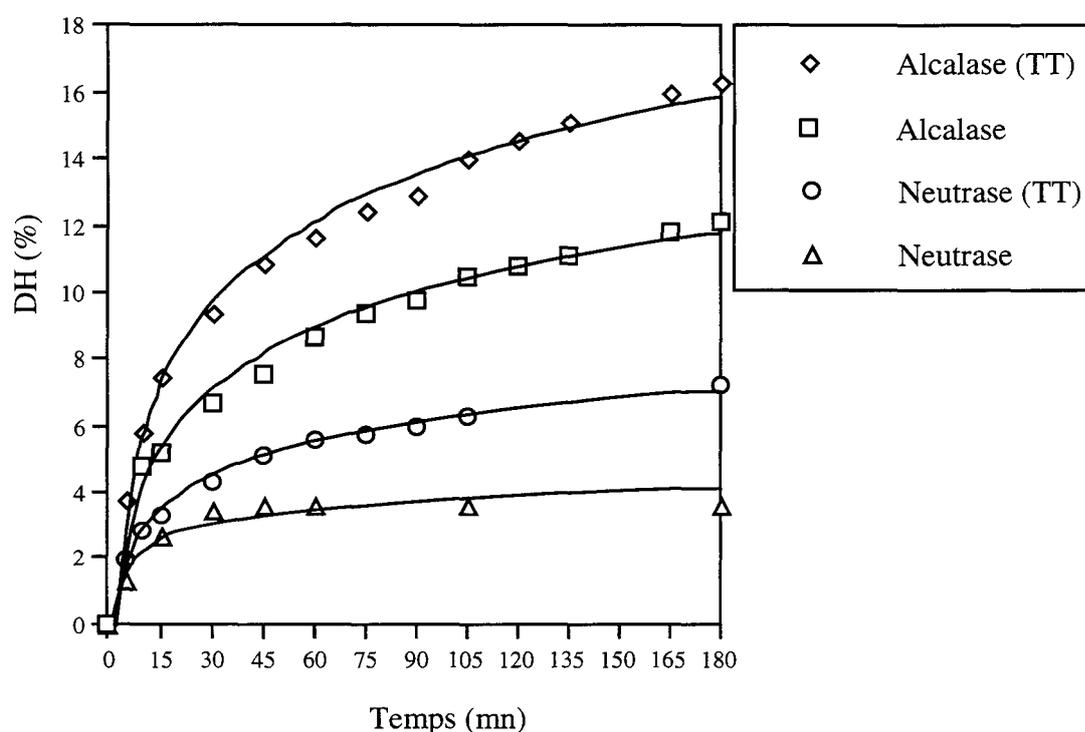
##### **I.4.1. La réaction d'hydrolyse enzymatique à l'échelle laboratoire**

Les premières expérimentations réalisées en réacteur discontinu avec la suspension hétérogène de broyat d'os à 7% de protéine, ont permis de mettre en évidence l'influence de la température aux différents stades du procédé technologique. En effet, l'élévation de la température de la suspension protéique hétérogène maintenue sous agitation constante (400 tour / mn), pour atteindre l'activité optimale du système enzymatique utilisé (température inférieure à 60°C), provoque l'apparition de filaments blanchâtres

enchevêtrés formant un réseau pouvant bloquer l'agitation du réacteur. Ce phénomène a déjà été mis en évidence par O'Meara et Munro (1984, 1985). Cette solubilisation partielle des fibres du tissu conjonctif peut être accélérée par un pré-traitement thermique.

#### 1.4.2. Utilisation d'un pré-traitement thermique

L'une des évolutions importantes proposée par rapport aux procédés de récupération protéique par voie enzymatique, consiste à faire subir au substrat un traitement de dénaturation avant d'effectuer l'hydrolyse enzymatique. Un traitement thermique à 85°C pendant 10 mn de la suspension protéique sous agitation, a été retenu. Il améliore la réaction de protéolyse, en démasquant les sites d'hydrolyse consécutivement à une modification de conformation des protéines et à un dégraissage partiel de l'ordre de 50% (rôtissage, pré-traitement thermique). Ce phénomène est illustré par la figure III.1. où le degré d'hydrolyse a été mesuré au cours d'une réaction enzymatique, précédée ou non d'un pré-traitement thermique (85°C, 10 mn). Pour la Neutrase®0,5L, comme pour l'Alcalase®2,4L, les profils cinétiques sont semblables mais avec des valeurs de DH beaucoup plus élevées pour les expériences avec un pré-traitement thermique.



**Figure III.1.** : Effet d'un traitement thermique (TT) avant réaction enzymatique sur l'évolution du degré d'hydrolyse (DH) en fonction du temps. Les points représentent la moyenne de trois répétitions. Conditions opératoires de la réaction enzymatique : (Alcalase® 2,4L ; 52°C ; pH = 8,4 ; E/S = 2,63% ; S = 6,3%) (Neutrase® 0,5L ; 50°C ; pH = 7,0 ; E/S = 7% ; S = 7,0%).

Le barème temps / température utilisé modifie la conformation des protéines du tissu conjonctif et contribue par un effet de pasteurisation à l'inactivation d'éventuels micro-organismes contaminants. Une modification de la coloration de la suspension protéique peut être observée au cours du traitement thermique. La couleur rouge vif initiale évolue vers le brun en raison de l'oxydation du fer des protéines hémiques de l'état (II) à l'état (III). Il semble d'autre part, que la forte proportion de moelle osseuse du substrat (colonne vertébrale de veau) intervient dans la coloration de la suspension protéique (Field, 1988) (Annexe III. Figures 8 et 9). Par ailleurs, les composés glucidiques de la moelle osseuse peuvent conduire au développement de couleurs et de composants d'arôme par la réaction de Maillard, transformation qui trouve des applications en formulation de sauces.

Afin de déterminer l'influence des paramètres : concentration en protéines dans le réacteur (S) et le rapport enzyme / substrat (E / S), sur les mécanismes de la réaction d'hydrolyse par les enzymes Neutrased<sup>®</sup>0,5L et Alcalase 2,4L<sup>®</sup>, nous avons travaillé en réacteur discontinu agité (175 ± 2 tour / mn). Les résultats ainsi obtenus permettent de définir le domaine expérimental.

Le mécanisme d'hydrolyse d'un substrat protéique reste complexe en raison de la diversité du type de liaisons peptidiques, de la spécificité d'action de la protéase utilisée et de l'accessibilité du site actif de l'enzyme, facteur qui dépend en partie de la concentration en substrat.

L'équation du bilan concernant le substrat dans un bioréacteur discontinu est de la forme :

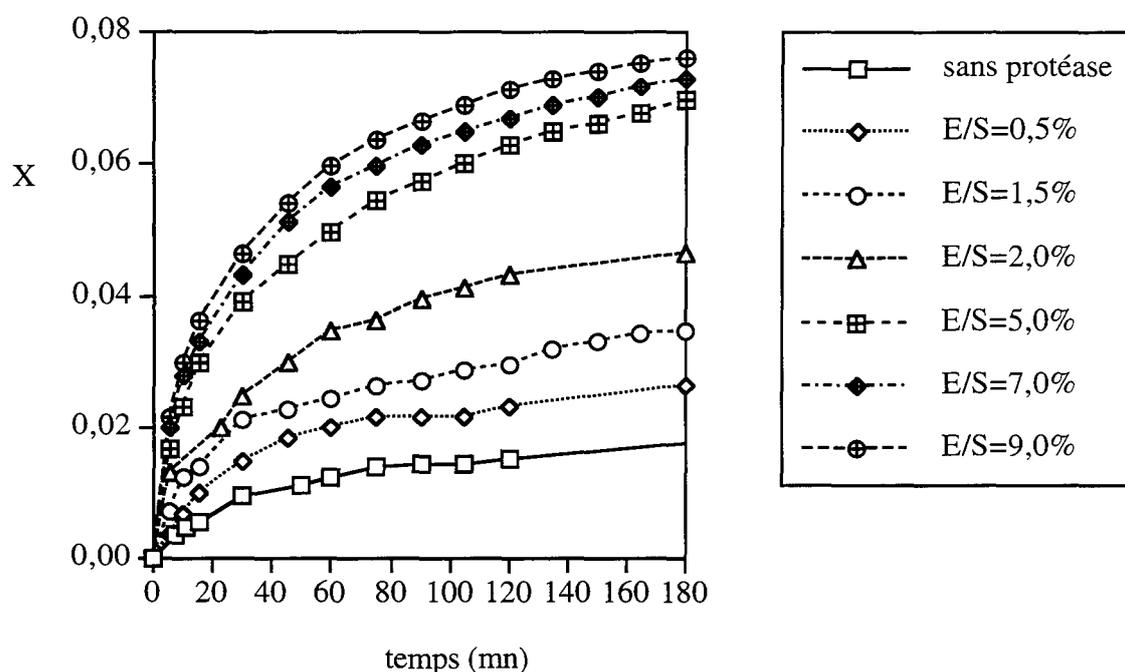
$$-\int_{S_0}^{S_f} dS = \int_0^{t_f} r \cdot dt$$

où  $S_0$  est la concentration initiale dans le réacteur et  $S_f$  la concentration finale,  $r$  est la vitesse de la réaction et  $t_f$  le temps final de la réaction.

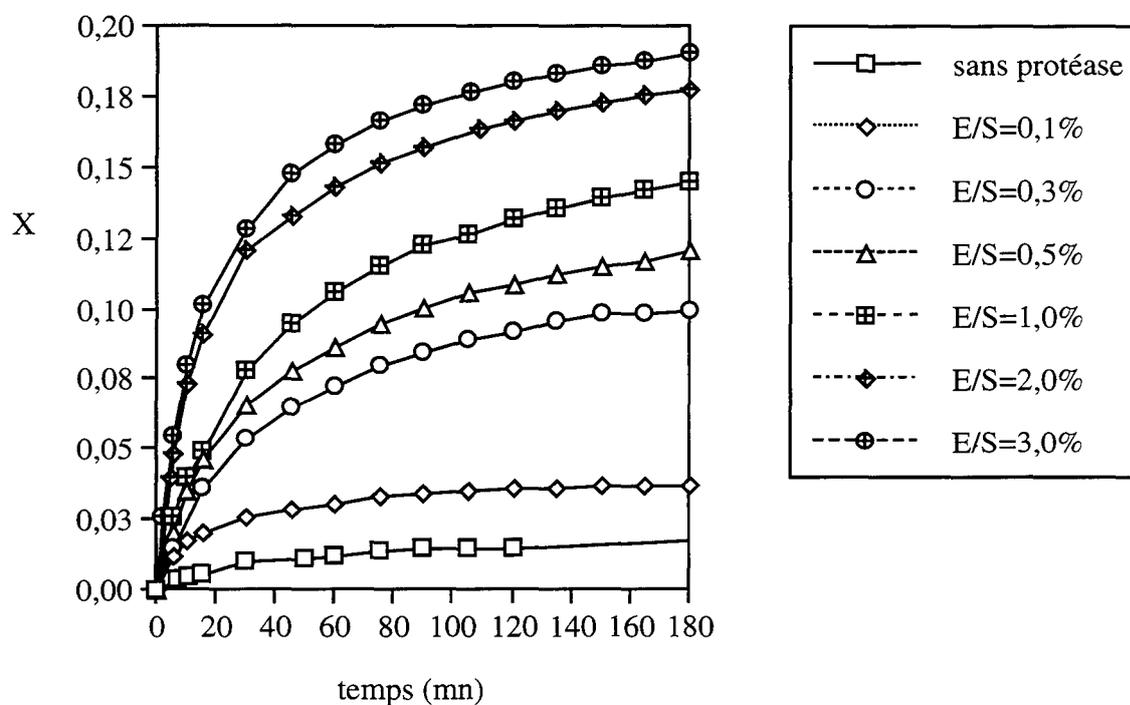
Le réacteur étant fermé pour éviter l'évaporation, le volume est supposé constant. Nous nous intéresserons donc à la vitesse de la réaction. Rappelons que le degré d'hydrolyse est donné par l'équation (Cf. "Matériels et Méthodes") :  $X = BN_B \frac{1}{\alpha} \frac{1}{MP} \frac{1}{h_{tot}}$

L'évolution du degré d'hydrolyse (DH) mesurée par la méthode du pH-stat, en fonction du temps pour différents rapports enzyme / substrat, est présentée sur la Figure III.2. pour la réaction d'hydrolyse en présence de Neutrased<sup>®</sup> et sur la figure III.3. en présence d'Alcalase<sup>®</sup>.

La régulation de température à ±1°C et du pH à 0,1 unité pH, permet d'obtenir des résultats très reproductibles (les points expérimentaux représentent la moyenne de 3 essais indépendants), et ceci malgré l'hétérogénéité du substrat.



**Figure III.2.** : Evolution du degré d'hydrolyse (X) en fonction du temps (mn) pour différents rapports enzyme / substrat protéique (E / S %). Conditions expérimentales : Neutrase® 0,5L ; T = 50°C ; pH = 7,0 ; S = 7% de protéines. Les points représentent la moyenne sur 3 essais.



**Figure III.3.** : Evolution du degré d'hydrolyse (X) en fonction du temps (mn) pour différents rapports enzyme/substrat protéique (E / S %). Conditions expérimentales : Alcalase® 2,4L ; T = 60°C ; pH = 8,4 ; S = 7% de protéines. Les points représentent la moyenne sur 3 essais.

Les données montrent que la vitesse d'hydrolyse diminue en fonction de la durée de protéolyse. Les cinétiques obtenues peuvent être modélisées par les équations suivantes :

$$\frac{dX}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot X) \quad \text{après intégration de l'équation nous obtenons}$$

$$X = \frac{1}{b} \cdot \ln(1 + a \cdot b \cdot t) \quad \text{en accord avec Camacho Rubio } et al. (1993).$$

Les valeurs de a et b sont obtenues en traçant  $\ln\left(\frac{dX}{dt}\right) = a - b \cdot X$  et sont résumées dans le tableau III.4. avec les coefficients de corrélation.

**Tableau III.4.** : Cinétique d'hydrolyse de co-produits de veau par la Neutrase®0,5L et l'Alcalase® 2,4L, en fonction du rapport enzyme / substrat (E / S).

Neutrase®0,5L	a (mn <sup>-1</sup> )	b	R <sup>2</sup>
sans protéase	0,00107	229	0,63
E/S = 1,5%	0,00259	113,7	0,80
E/S = 2,0%	0,00568	94,7	0,85
E/S = 5,0%	0,00729	62,05	0,97
E/S = 7,0%	0,0128	68,3	0,98
Alcalase® 2,4L			
sans protéase	0,000819	186,2	0,79
E/S = 0,1%	0,00175	160,2	0,95
E/S = 0,3%	0,00652	35	0,96
E/S = 0,5%	0,00970	32,97	0,94
E/S = 1,0%	0,00996	26,14	0,95
E/S = 2,0%	0,04845	31,11	0,96
E/S = 3,0%	0,04683	28,045	0,95

Il est ainsi possible de préciser la cinétique de la réaction d'hydrolyse et de déterminer la vitesse de cette réaction grâce à l'équation ci-dessous :

$$r = S_0 \cdot \frac{dX}{dt}$$

La concentration en protéines (S<sub>0</sub>) utilisée au cours de ces expériences est de 7%. Des études similaires sur les mécanismes de la réaction de protéolyse de substrat végétaux (Marquez Moreno et Fernandez Cuadrado, 1993) ou des protéines laitières (Camacho Rubio *et al.*, 1993) ont conduit à la modélisation du degré d'hydrolyse en fonction du temps et du rapport E / S. Cependant les auteurs montrent que la valeur du coefficient b obtenue peut être assimilable à une constante et que le modèle peut être utilisé à l'échelle industrielle. Tel n'est pas le cas avec les substrats que nous valorisons, compte tenu de la

forte variation négative du coefficient  $b$  en fonction de l'accroissement du rapport  $E / S$ , pour les deux enzymes étudiées.

Chaque profil de courbe est caractérisé par une forte vitesse de réaction initiale, suivi d'une rapide diminution de la vitesse qui tend à se stabiliser. L'évolution de la courbe peut être attribuée à différents mécanismes, prenant en compte une diminution progressive du nombre de liaisons peptidiques susceptibles d'être hydrolysées, une inhibition de l'enzyme par des produits de la réaction ou une dénaturation de la protéase sous l'action de la température. Des durées optimales d'hydrolyse de 3 heures (O'Meara et Munro, 1984) jusqu'à 40 heures (Moss et Trautman, 1972), sont signalées dans la littérature, mais apparaissent industriellement non rentables pour ce type de substrat. Le choix du rapport  $E / S$  est un paramètre important qui sera pris en compte dans l'optimisation du procédé, en raison de ses implications dans la durée de l'opération d'extraction, le coût de l'enzyme mais aussi la qualité des hydrolysats obtenus.

### **I.5. Définition du domaine expérimental**

Le domaine expérimental et les niveaux des variables, retenus pour l'étude de la modélisation du procédé d'extraction protéique par la Neutrase<sup>®</sup> 0,5L (présentés dans le chapitre "Matériels et Méthodes" Tableau II.3.), ont été déterminés à partir des expérimentations préliminaires.

L'estimation des mesures de degré d'hydrolyse dans le domaine expérimental a été rendue possible par la mise au point d'une méthode de corrélation entre l'abaissement du point cryoscopique et la méthode du pH-stat. En effet dans la zone de pH comprise entre 5 et 6, la méthode du pH-stat n'est pas fiable (Cf. chapitre "Synthèse bibliographique").

### **I.6. Evaluation des contraintes matérielles**

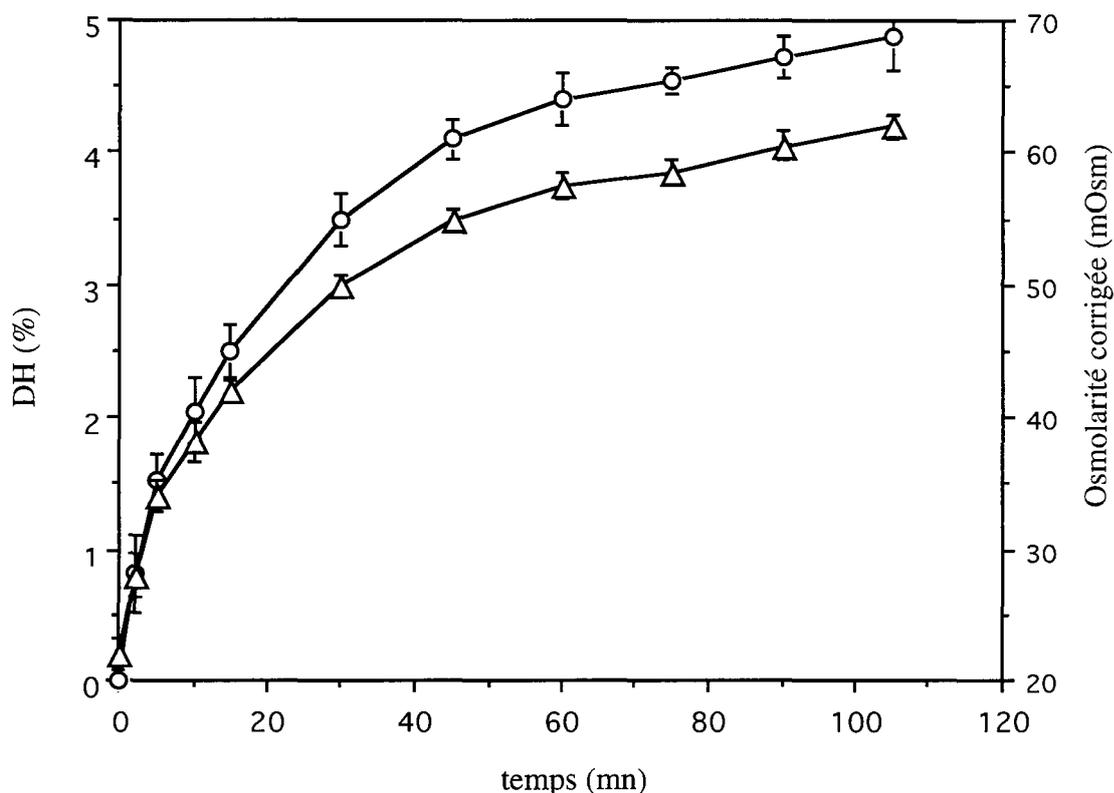
La définition des niveaux de variation des paramètres du plan d'expériences (stade laboratoire), nécessite la prise en compte des contraintes matérielles (broyeur, réacteurs, mesure et contrôle du degré d'hydrolyse) à l'échelle industrielle.

Ainsi, des essais préliminaires en réacteur discontinu à l'échelle pilote ont permis de tester à partir de suspensions de broyat d'os et de viande (100 kg) :

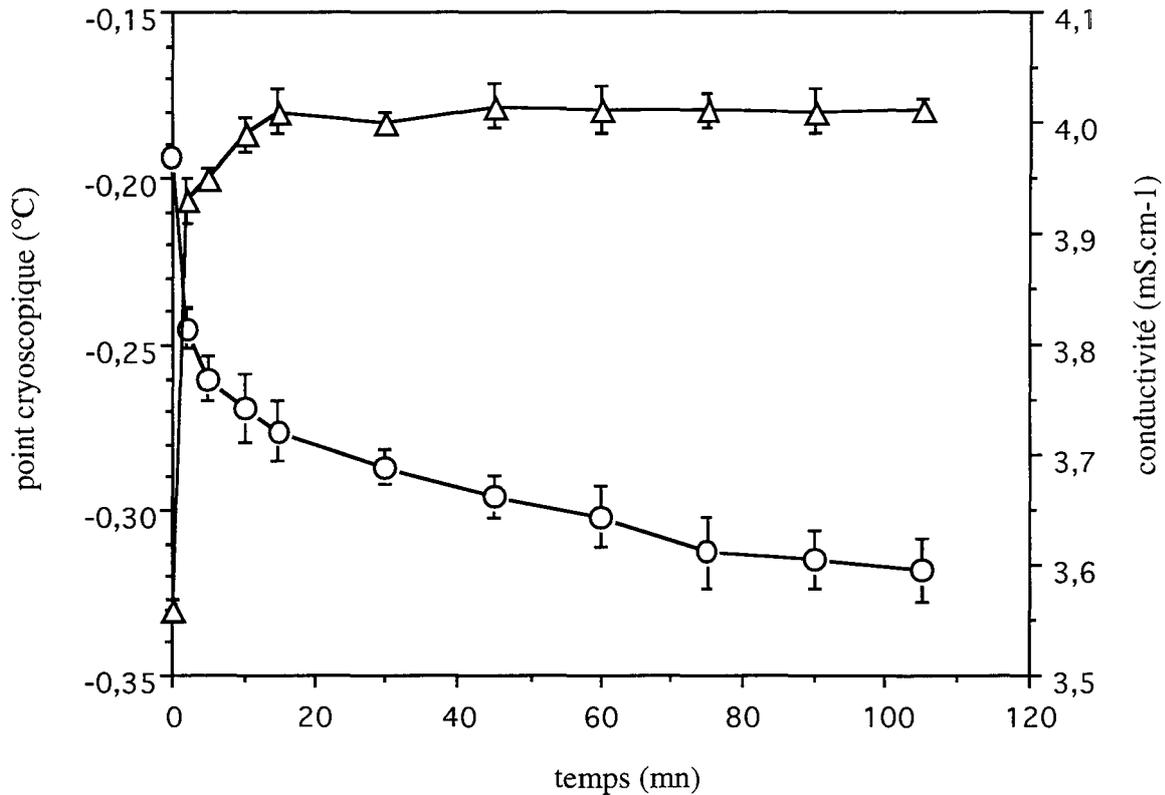
- la solubilisation des graisses après l'étape de rôtissage
- la possibilité de traiter industriellement des concentrations élevées de substrat, en réacteur sous agitation
- le pré-traitement thermique (vitesse de montée en température : 1°C / mn)
- le temps de refroidissement de 85°C à 50°C (valeur choisie à partir de la littérature) par addition de glace (10 mn)

- le temps de dénaturation de l'enzyme par injection de vapeur vive dans le réacteur : passage de 50 à 90°C en 10 mn.
- l'utilisation de la méthode du pH-stat à l'échelle industrielle (maintien du pH à 7 par addition de lessive de soude)
- la méthode de dégraissage (élimination de la couche superficielle de matière grasse et centrifugation des hydrolysats)
- le refroidissement des hydrolysats sur échangeur à plaques.

La droite de corrélation entre le DH (%) mesuré par la méthode du pH-stat et l'osmolalité corrigée est construite à partir de mesures réalisées sur l'ensemble du domaine expérimental. La figure III.4. montre l'exemple de l'évolution du degré d'hydrolyse et des mesures de l'osmolalité corrigée en fonction du temps, pour des expérimentations effectuées au centre du domaine expérimental. La mesure du point cryoscopique (Figure III.5.), très rapide, est particulièrement adaptée au suivi du degré d'hydrolyse au niveau industriel, et sera testée à l'échelle pilote.



**Figure III.4.** : Evolution du degré d'hydrolyse (DH %) (o) et de l'osmolalité corrigée (mOsm) (Δ) d'une dispersion de co-produit (colonnes vertébrales de veau) par la Neutrase<sup>®</sup> 0,5L. Conditions opératoires : 50°C ; pH = 6,6 ; S = 7,5% ; E / S = 5,0%.



**Figure III.5.** : Evolution du point de congélation (°C) (O) et de la conductivité (mSiemens.cm<sup>-1</sup>) (Δ) de la suspension protéique (colonnes vertébrales de veau) traitée par la Neutrase<sup>®</sup>0,5L. Conditions opératoires : 50°C ; pH = 6,6 ; S = 7,5% ; E / S = 5,0% ; aliquote prélevé = 2 ml.

Trois réponses expérimentales ont été mesurées à l'intérieur du domaine à partir des expérimentations dictées par la matrice de Doehlert (Tableau III.5.).

- Le rendement de récupération protéique ( $\eta_1$ ) exprimé par le rapport de la quantité d'azote total de l'hydrolysate sur la quantité d'azote total initial.
- La proportion en azote total dans le surnageant après centrifugation de l'hydrolysate, par rapport à la quantité d'azote total de l'hydrolysate ( $\eta_2$ ).
- Le degré d'hydrolyse ( $\eta_3$ ) exprimé en %.

Chacune de ces réponses peut être représentée par une équation polynomiale du second degré, valable sur l'ensemble du domaine expérimental et comprenant 21 coefficients :

$$\eta_j = \beta_{j0} + \sum_{i=1}^5 \beta_{ji} X_i + \sum_{i=1}^5 \beta_{ji} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 \beta_{jij} X_i X_j$$

où  $\eta_j$  représente les variables dépendantes,  $X_i$  les variables indépendantes,  $\beta_j 0$  le terme constant,  $\beta_j i$  les coefficients linéaires du premier ordre,  $\beta_j ii$  les termes carrés,  $\beta_j ij$  les termes d'interaction. Les valeurs sont récapitulées dans le tableau III.6.

**Tableau III.5.** : valeurs expérimentales pour les réponses : rendement protéique ( $\eta_1$ ), indice de protéolyse sur les hydrolysats ( $\eta_2$ ), et degré d'hydrolyse ( $\eta_3$ ) ; enzyme utilisée : Neutrase® 0,5L.

Exp. n°	$\eta_1$ (%)	$\eta_2$ (%)	$\eta_3$ (%)
1	50,89	65,61	4,95
2	49,45	65,28	4,72
3	41,15	63,11	4,32
4	48,18	67,09	4,98
5	48,74	68,86	4,92
6	50,83	66,11	4,78
31a	47,18	67,34	4,91
7	53,24	69,99	6,47
8	47,11	59,81	3,85
9	52,47	63,11	6,20
10	46,85	62,47	4,19
11	53,75	69,68	6,80
12	52,47	69,61	6,10
31b	47,93	67,45	4,92
13	55,69	68,62	6,38
14	47,65	59,48	4,90
15	49,23	67,06	5,10
16	46,07	62,61	4,01
17	42,27	61,99	3,13
18	50,80	69,88	4,74
19	52,27	72,09	6,17
20	49,83	68,43	4,70
31c	45,81	66,78	4,80
21	53,60	59,92	6,51
22	53,15	69,07	6,95
23	54,12	71,86	6,80
24	45,72	69,38	6,90
25	54,91	72,39	7,90
26	54,91	71,72	8,05
27	51,60	63,58	5,70
28	51,52	68,88	5,15
29	44,20	59,98	3,67
30	44,14	58,01	3,44
31	47,10	66,37	4,85

**Tableau III.6.** : Estimation des coefficients des modèles quadratiques pour les réponses : Rendement protéique (Y1), indice de protéolyse sur les hydrolysats (Y2) et degré d'hydrolyse (Y3).

Estimation des coefficients	Y1	Y2	Y3
b0	47,00***	66,99***	4,87***
b1	0,67	0,71	0,37
b2	-1,69	-1,98*	-0,20
b3	2,76*	3,98***	0,97**
b4	4,03**	4,32***	0,93**
b5	-2,29*	-5,69***	-1,57***
b11	3,17	-1,54	-0,04
b22	-0,76	-0,41	-0,15
b33	5,36*	-1,32	1,14*
b44	2,00	-0,49	-0,16
b55	4,68*	-0,22	1,93**
b12	-5,91	-2,75	-0,23
b13	-1,50	-0,86	-1,56
b14	4,64	-4,36	1,40
b15	2,32	-2,02	0,83
b23	1,42	-0,16	0,93
b24	0,64	-1,14	0,00
b25	4,74	-3,81	0,41
b34	8,71*	2,01	2,65*
b35	3,68	0,88	0,98
b45	2,22	3,66	0,45

\*\*\* significatif à 1% ; \*\* significatif à 5% ; significatif à \* à 10%.

L'analyse de variance et la régression multilinéaire sur les différentes réponses expérimentales sont respectivement présentées aux tableaux III.7. et III.8.. Les répétitions effectuées au centre du domaine expérimental, à différents intervalles de temps, sont utilisées pour le calcul de l'erreur expérimentale.

**Tableau III.7. :** Analyse de variance des différentes réponses expérimentales étudiées : Rendement protéique (Y1), indice de protéolyse sur les hydrolysats (Y2) et degré d'hydrolyse (Y3).

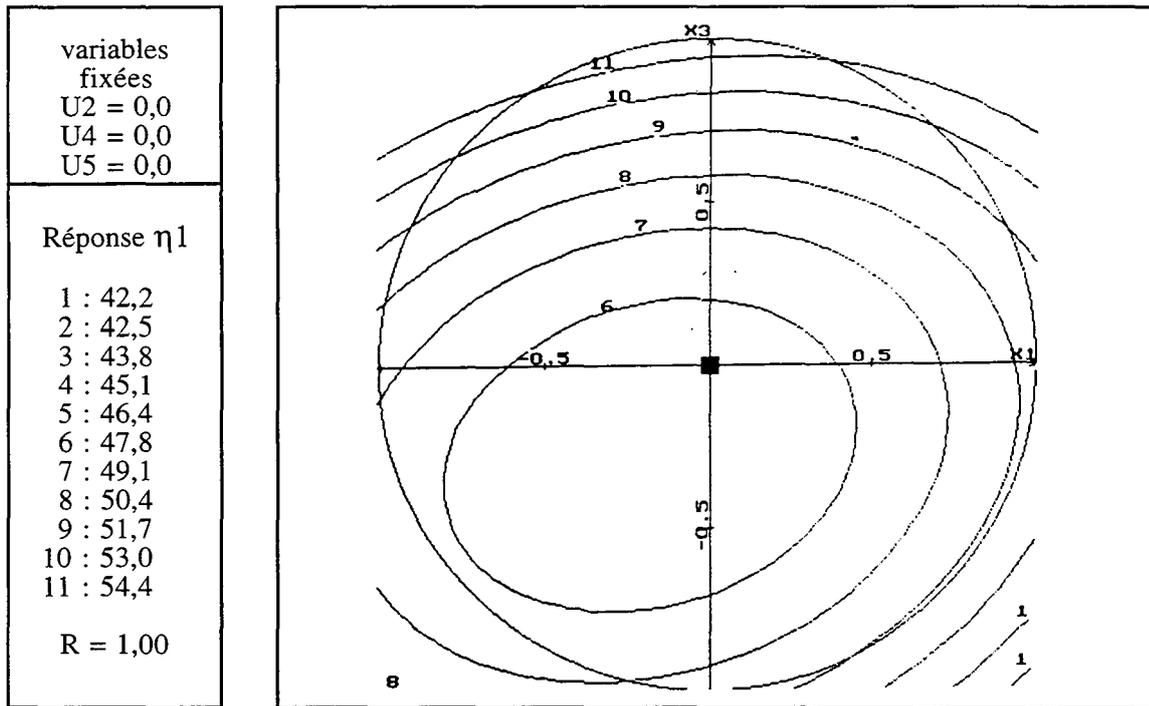
source de variation	degré de liberté	somme des carrés			carré moyen		
		Y1	Y2	Y3	Y1	Y2	Y3
régression	20	382,27	495,45	44,13	19,11*	24,77***	2,21**
résidu	13	87,96	42,55	5,65	6,76	3,27	0,44
validité	10	85,64	41,79	5,64	8,56*	4,18*	0,56***
erreur	3	2,32	0,76	0,009	0,77	0,25	0,00
total	33	470,23	538,00	49,78			

**Tableau III.8. :** Régressions multilinéaires sur les différentes réponses expérimentales étudiées : Rendement protéique (Y1), indice de protéolyse sur les hydrolysats (Y2) et degré d'hydrolyse (Y3).

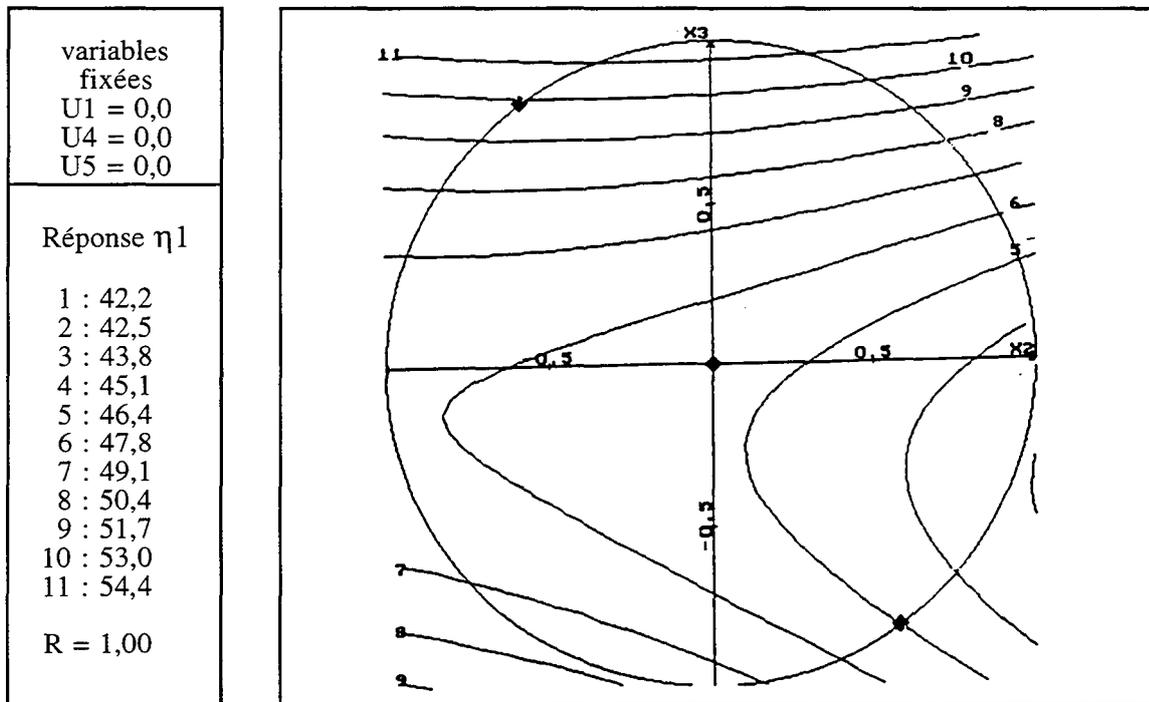
	Y1	Y2	Y3
coefficient de régression multiple ( $R^2$ )	0,82	0,93	0,89
coefficient de régression multiple ajusté ( $R^2A$ )	0,52	0,80	0,71
degrés de liberté	13	13	13

La matrice de Doehlert permet une étude séquentielle de l'influence des paramètres sur le système étudié : les effets de la température et du pH sont déterminés après l'exécution des sept premières expériences (tous les niveaux des autres facteurs étant fixés au centre du domaine expérimental). Après interprétation des résultats, on étudie l'effet additionnel de la concentration en enzymes sur les réponses du système (exécution des 7 expériences suivantes) avant d'intégrer successivement les variables temps et concentration protéique. Les résultats expérimentaux sont édités sous forme de courbes d'isorréponses générées par le logiciel NEMROD à partir des modèles quadratiques. Seules quelques courbes d'isorréponses seront présentées à titre d'exemple. L'exploitation de ces courbes permet de visualiser et déterminer les conditions optimales de l'hydrolyse enzymatique, exclusivement "dans le domaine expérimental".

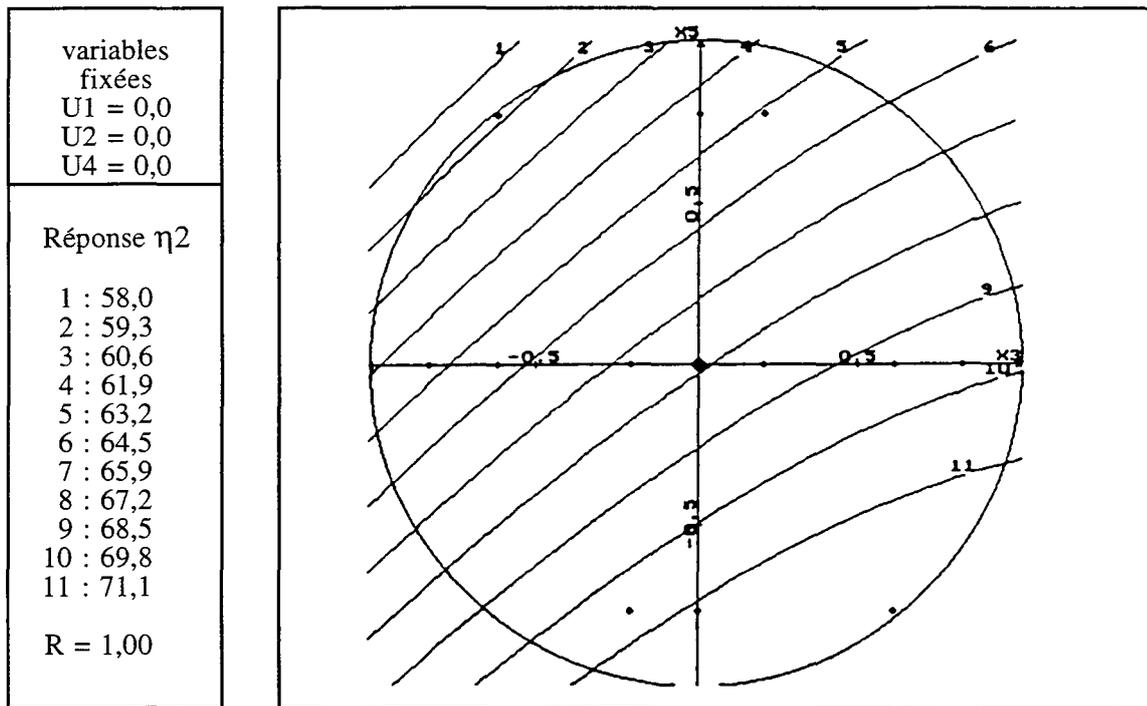
En fixant le niveau de trois facteurs au centre du domaine expérimental, il est possible de suivre l'évolution des paramètres deux à deux. Les estimations et tests des effets des différentes variables montrent que les variations du pH (Figure III.6.), et de la température n'ont pratiquement aucun effet sur les réponses  $\eta_1$ ,  $\eta_2$ ,  $\eta_3$ .



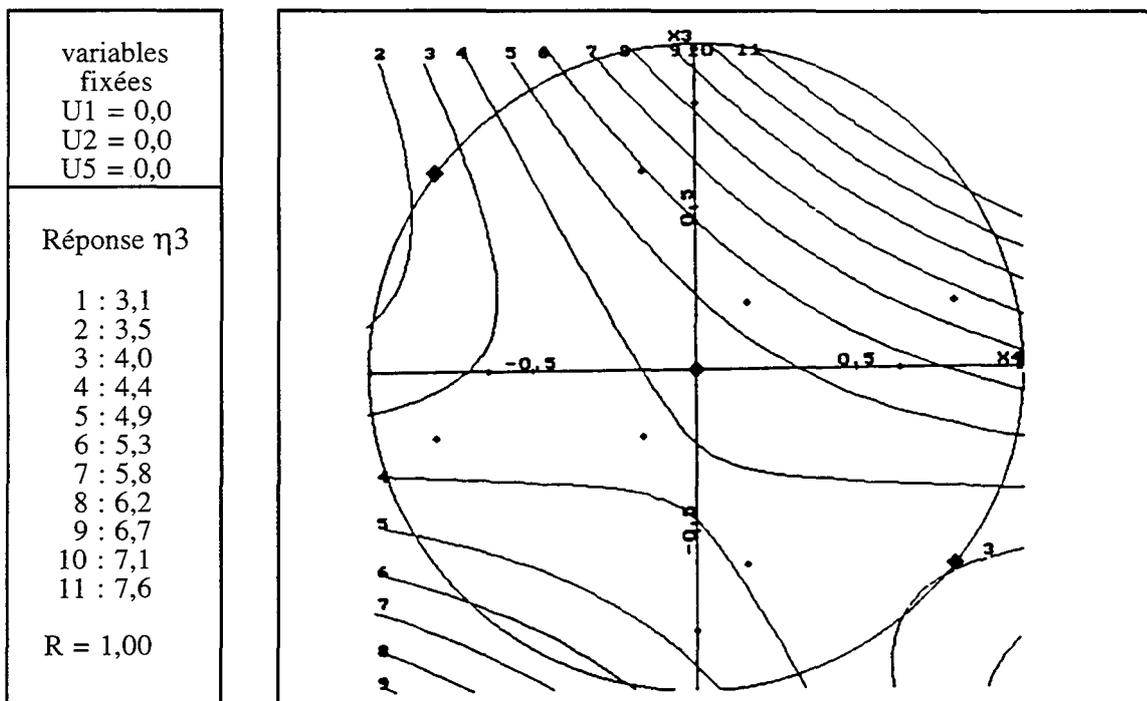
**Figure III.6.** : Courbes d'isoréponses du rendement protéique ( $\eta_1$ ). Tracé de la température (U1) en fonction de la concentration en enzymes (U3). Les valeurs de pH (U2), de temps (U4) et de la concentration en protéines (U5) sont maintenues au niveau 0 (centre du domaine).



**Figure III.7.** : Courbes d'isoréponses du rendement protéique ( $\eta_1$ ). Tracé du pH (U2) en fonction de la concentration en enzymes (U3). Les valeurs de température (U1), de temps (U4) et de la concentration en protéines (U5) sont maintenues au niveau 0 (centre du domaine).



**Figure III.8.** : Courbes d'isorréponses du rendement protéique ( $\eta_2$ ). Tracé de la concentration en enzyme ( $U_3$ ) en fonction de la concentration en protéines ( $U_5$ ). Les valeurs de température ( $U_1$ ), de pH ( $U_2$ ) et de temps ( $U_4$ ) sont maintenues au niveau 0 (centre du domaine).



**Figure III.9.** : Courbes d'isorréponses du degré d'hydrolyse ( $\eta_3$ ). Tracé de la durée ( $U_4$ ) en fonction de la concentration en enzyme ( $U_3$ ). Les valeurs de température ( $U_1$ ), de pH ( $U_2$ ) et de concentration en protéines ( $U_5$ ) sont maintenues au niveau 0 (centre du domaine).

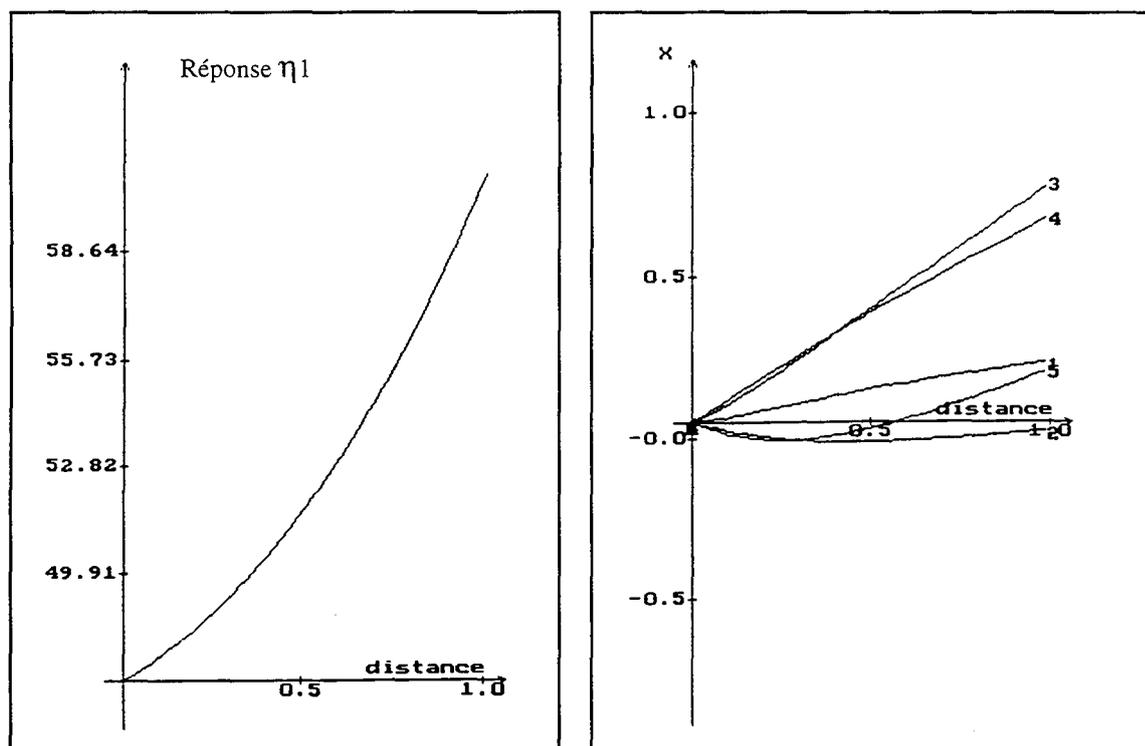
L'analyse des effets obtenus pour les différentes réponses, montre que la température (U1), la concentration en enzyme (U3), et la durée du traitement d'hydrolyse (X4) ont une influence positive sur la réaction d'hydrolyse. La valeur  $b_0$  représente la valeur moyenne de la réponse au centre du domaine expérimental. La valeur négative de l'effet de la concentration en protéines (U5) est conforme à l'effet inhibiteur de cette variable sur la réaction d'hydrolyse, effet étudié notamment par O'Meara et Munro (1985), Adler-Nissen (1986), Marquez Moreno et Fernandez Cuadrado (1993).

Les courbes d'isoréponses pour la réponse  $\eta_2$  (Figure III.8.) montrent une maximalisation de la réponse lorsque l'on augmente la concentration en enzymes (U3) et que l'on diminue la concentration en protéines (U5). Parmi les nombreux paramètres qui peuvent être à l'origine de cette inhibition, 2 sont pertinents dans le cas présent : une agitation non homogène dans le réacteur pour les fortes concentrations protéiques, et une concentration minérale élevée (calcium, phosphore) en raison de la présence de tissus osseux. Les résultats obtenus concernant l'influence du pH laissent supposer que le procédé d'hydrolyse peut être conduit au niveau industriel sans régulation de ce facteur (Figure III.7.).

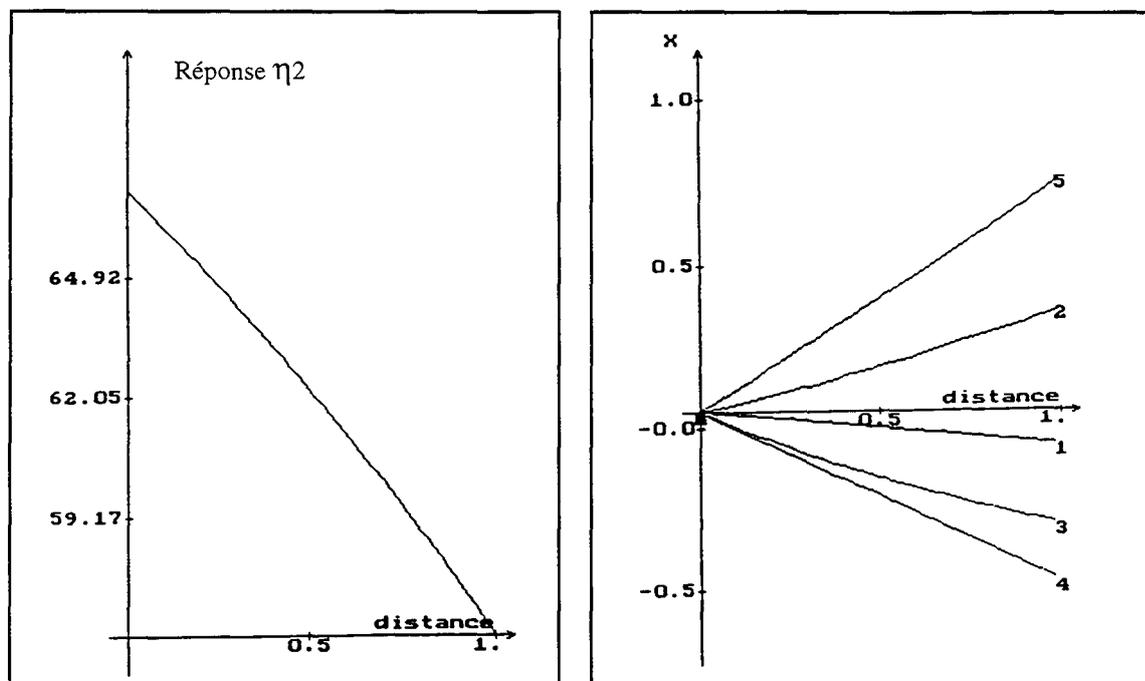
Un exemple de courbes d'isoréponses concernant le degré d'hydrolyse est montré sur la Figure III.9. Les valeurs expérimentales, comprises entre 3,7 et 8,1%, permettent d'éviter l'apparition de goût amer, et surtout préservent les propriétés des produits initiaux. Les valeurs obtenues restent inférieures à 10% en accord avec Chambers et Rasmussen (1988). En conséquence, les rendements de récupération protéique sont faibles, inférieurs à 55% pour la réponse  $\eta_1$ . Différentes fractions protéiques avec des rendements entre 60 et 73% pour la réponse  $\eta_2$ , peuvent être obtenues en fonctions des conditions expérimentales et des qualités fonctionnelles et nutritionnelles recherchées pour les hydrolysats.

L'analyse de l'ensemble des courbes d'isoréponses montre que les facteurs, concentration en enzyme et temps d'hydrolyse, sont les plus influents pour augmenter les réponses. Une température comprise entre 52 et 55°C fournit le meilleur compromis rendements élevés / degré d'hydrolyse faible. Afin de limiter le phénomène d'inhibition des protéases par le substrat, une concentration en protéines dans le mélange réactionnel de 7,5% sera retenue, concentration compatible avec les contraintes technologiques.

Il faut noter d'autre part, une forte interaction positive (effet de 2,65) entre la durée d'hydrolyse (U4) et la concentration en enzymes (U3) pour la mesure du degré d'hydrolyse ( $\eta_3$ ), ainsi que pour le rendement protéique ( $\eta_1$ ). Le tracé des courbes de "chemin optimal" (Figures III.10. et III.11.) permet de visualiser le paramètre principal et le sens dans lequel le faire varier, afin d'atteindre le plus rapidement possible l'objectif de maximalisation ou de minimisation d'une réponse (Cun *et al.*, 1991).



**Figure III.10.** : Chemin optimal pour maximiser le rendement protéique de valorisation des co-produits d'abattage par voie enzymatique ( $\eta_1$ ). Les variables température (U1), pH (U2), concentration en enzymes (U3), durée d'hydrolyse (U4) et concentration en protéines (U5), sont présentées en variables centrées réduites.



**Figure III.11.** : Chemin optimal pour minimiser la teneur en azote total dans la phase soluble des hydrolysats ( $\eta_2$ ). Les variables température (U1), pH (U2), concentration en enzymes (U3), durée d'hydrolyse (U4) et concentration en protéines (U5), sont présentées en variables centrées réduites.

## II. LES HYDROLYSATS PROTEIQUES DE CO-PRODUITS DE VEAU

### II.1. Composition physico-chimique des hydrolysats

Les caractéristiques physico-chimiques de l'hydrolysats lyophilisé, obtenu par hydrolyse avec la Neutrase® 0,5L dans les conditions opératoires définies au centre du domaine expérimental (50°C ; S = 7,5% ; E / S = 5% ; durée d'hydrolyse = 105 mn ; pH = 6,6) sont présentées ci-dessous dans le tableau III.9. :

**Tableau III.9.** : Composition physico-chimique des différentes fractions d'un hydrolysats protéique obtenu à partir de co-produits de veau. Les conditions expérimentales étant : Neutrase® 0,5L ; 50°C ; S = 7,5% ; E / S = 5% ; durée d'hydrolyse = 105 mn ; pH = 6,6).

produits	Teneur en eau (%)	Cendres (%)	NT (%)	NNP (%)
hydrolysats initial	0,96±0,04	9,43±0,09	12,45±0,27	11,97±0,05
surnageant de l'hydrolysats 15 mn ; 2°C ; 1000 x g	2,09±0,02	7,58±0,08	13,25±0,27	12,09±0,09
culot de centrifugation	0,09±0,01	16,00±0,10	10,32±0,15	6,23±0,20

NT : azote total ; NNP : azote non protéique.

Des essais préliminaires sans addition de solution enzymatique (pH = 7,0 ; 50°C ; S = 7,5% ; 105 mn) ont conduit à l'obtention d'hydrolysats protéiques lyophilisés présentant une concentration d'azote total de 9,5% avec un taux d'azote non protéique de 3,1%. Ces résultats montrent l'influence de la solubilisation protéique par les protéases dans les mêmes conditions (NT = 12,45% ; NNP = 11,97%).

### II.2. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés (Tableau III.10.) des co-produits de veau (substrat) et de l'hydrolysats lyophilisé obtenu par hydrolyse avec la Neutrase® 0,5L, révèle une forte proportion en alanine, arginine, acide aspartique et leucine. Les concentrations en acide glutamique, glycine, hydroxyproline et proline, acides aminés présents dans les tissus conjonctifs, montrent que le substrat protéique est particulièrement riche en tissus collagéniques. A partir du dosage de l'hydroxyproline (selon le coefficient multiplicatif employé, Cf. chapitre "Synthèse bibliographique") la proportion de tissus conjonctifs représente 40 - 50%. L'aminogramme de l'hydrolysats obtenu en utilisant les conditions expérimentales définies au centre du domaine, montre que les traitements enzymatiques et thermiques que subit le substrat protéique, affectent peu la qualité nutritionnelle du produit obtenu.

**Tableau III.10.** : Composition en acides aminés exprimée en g / 16 g NT, du substrat (co-produits : colonnes vertébrales de veau en sortie de salle de désossage) et des hydrolysats lyophilisés (conditions d'extraction : Neutrase® 0,5L ; 50°C ; S = 7,5% ; E/S = 5% ; durée d'hydrolyse = 105 mn ; pH = 6,6). Les résultats exprimés dans le tableau ci-dessous représentent la moyenne sur deux dosages.

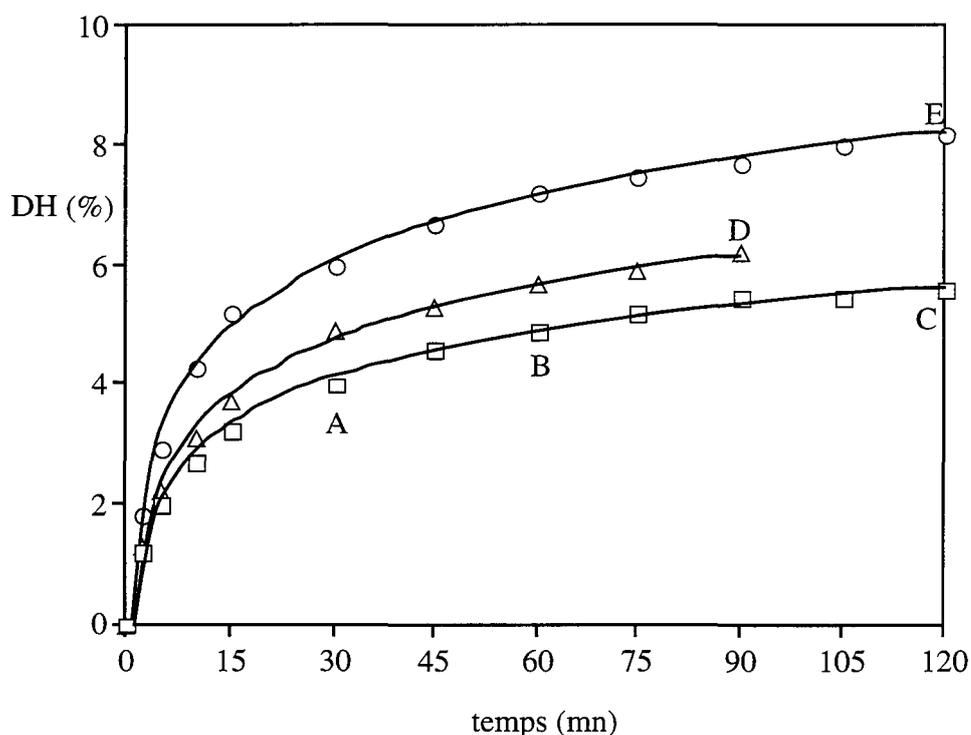
acides aminés	co-produit HCl 6N 110°C 24h d'hydrolyse	HCl 6N 110°C 24h d'hydrolyse	hydrolysats lyophilisés hydrolyse methane- sulfonique	acides aminés libres
Alanine	7,44	7,11	6,97	0,22
Arginine	6,96	6,84	5,53	0,04
Acide aspartique	6,52	6,41	6,64	0,04
1/2 cystine	1,21	0,19	0,52	0,00
Acide glutamique	11,52	11,00	11,38	0,26
Glycine	14,16	13,33	13,13	0,16
Histidine	3,01	2,05	2,14	0,03
Hydroxyproline	6,98	6,44	5,36	0,00
Isoleucine	2,10	1,79	1,04	0,03
Leucine	5,24	5,01	4,47	0,07
Lysine	6,93	4,62	3,98	0,06
Méthionine	0,55	0,04	1,18	0,06
Ornithine	0,28	0,07	0,14	0,03
Phénylalanine	2,81	2,08	2,07	0,04
Proline	8,28	8,01	7,58	0,06
Sérine	3,58	3,41	3,47	0,06
Thréonine	3,42	3,35	3,12	0,03
Tyrosine	1,78	1,41	1,43	0,02
Valine	3,18	2,45	2,40	0,03
Tryptophane	nm*	nm*	1,84	nm*
*(non mesuré)				

### III. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES HYDROLYSATS PROTEIQUES OBTENUS A L'ECHELLE DU LABORATOIRE

L'optimisation du procédé d'extraction protéique par voie enzymatique permettant de limiter les facteurs à contrôler constitue la première partie de ce travail. Dans l'hypothèse d'une valorisation industrielle, il est également nécessaire d'étudier l'influence de la protéolyse sur les propriétés fonctionnelles des hydrolysats obtenus.

La voie enzymatique est un procédé d'extraction protéique rapide, mais qui doit être contrôlée, afin de ne pas conduire au développement de goûts indésirables. Pour cette raison, nous avons étudié l'influence du degré d'hydrolyse sur la solubilité et les différentes propriétés émulsifiantes (mis à part les propriétés moussantes relativement faibles), en produisant 5 types d'hydrolysats à partir de co-produits de viande de veau (A, B, C, D, E). Les différentes cinétiques des réactions d'hydrolyse sont présentées sur la figure III.12. Les DH (4,0 ; 5,0 ; 5,5 ; 6,2 ; 8,2%) sont obtenus en faisant varier le

temps d'hydrolyse et le rapport enzyme / substrat (E / S). Le contrôle de la protéolyse est effectué par la méthode du pH-stat. Aucune différence significative n'est observée entre les productions d'un même type de produit ( $p < 0,05$ ). Le DH des différentes poudres lyophilisées obtenues, est ensuite contrôlé par la méthode au TNBS (Cf. Figure II.4. : chapitre "matériels et méthodes").



**Figure III.12.** : Effet de la durée d'hydrolyse et du rapport enzyme/substrat (E / S) sur le degré d'hydrolyse (DH) d'une dispersion de broyat de co-produit d'abattage par la Neutrase®0,5L (conditions de réaction : pH = 7,0 ; 55°C ; S = 7,5% ; A, B, C (E / S = 6%) ; D (E / S = 10%) ; E (E / S = 20%)). Chaque point est la moyenne de 3 essais indépendants.

Des cinétiques d'hydrolyse similaires sont obtenues sur des protéines de poisson par Quaglia et Orban (1987 b) ou sur des co-produits de boeuf par Webster *et al.* (1982) qui établissent des corrélations entre la méthode de mesure du DH (pH-stat - TNBS).

### III.1. La solubilité des hydrolysats

L'hydrolysat obtenu se présente sous la forme d'une poudre blanchâtre après séchage par atomisation ou lyophilisation, et se solubilise totalement aux pH compris entre 4 et 8. Pour chacun des hydrolysats lyophilisés, la solubilité en fonction du pH a été étudiée comparativement à des protéines de référence (caséinate de sodium et gélatine). La solubilité des hydrolysats protéiques dépend du pH, de la force ionique ainsi que de nombreux autres facteurs : présence de composés issus de la moelle épinière, nature de la

fraction protéique... La solubilité des hydrolysats lyophilisés de protéines de viande de veau en fonction du pH est présentée dans le tableau III.11., ci-dessous. Elle se caractérise par une courbe, dite en V plus ou moins prononcée. L'hydrolyse enzymatique améliore considérablement la solubilité des protéines natives dans la zone de pH 4 - 5 (valeur obtenue pour le caséinate). Elle présente un minimum (supérieur à 74%), quel que soit le DH. De part et d'autre de ce minimum, la solubilité est d'autant plus importante que l'on s'éloigne du point "isoélectrique". Par ailleurs, les points isoélectriques et les niveaux de solubilisation varient en fonction du degré d'hydrolyse, la solubilité restant toujours forte (entre 78 et 98%).

**Tableau III.11** : Influence du pH sur la solubilité d'hydrolysats protéiques préparés à partir de co-produits d'abattage, exprimée en %, présentant différents degrés d'hydrolyse (DH), ainsi que sur la gélatine et le caséinate de sodium.

Produits	pH $\pm$ 0,1 unité							
	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
hydrolysats								
DH (%)								
4,0	82,1 <sup>a</sup>	79,2 <sup>a</sup>	<b>74,5<sup>b</sup></b>	78,5 <sup>a</sup>	87,6 <sup>c</sup>	93,3 <sup>d</sup>	97,7 <sup>d</sup>	97,3 <sup>d</sup>
5,0	82,7 <sup>a</sup>	81,5 <sup>a</sup>	<b>75,0<sup>b</sup></b>	90,4 <sup>c</sup>	95,5 <sup>d</sup>	96,7 <sup>d</sup>	97,2 <sup>d</sup>	97,3 <sup>d</sup>
5,5	83,7 <sup>a</sup>	81,6 <sup>a</sup>	<b>80,5<sup>b</sup></b>	91,3 <sup>c</sup>	97,3 <sup>d</sup>	97,0 <sup>d</sup>	97,8 <sup>d</sup>	98,6 <sup>d</sup>
6,2	88,0 <sup>a</sup>	<b>86,0<sup>b</sup></b>	87,6 <sup>a</sup>	92,0 <sup>c</sup>	96,1 <sup>d</sup>	97,2 <sup>d</sup>	98,5 <sup>d</sup>	98,6 <sup>d</sup>
8,2	94,5 <sup>a</sup>	<b>86,9<sup>b</sup></b>	93,2 <sup>a</sup>	94,7 <sup>a</sup>	98,0 <sup>c</sup>	98,2 <sup>c</sup>	98,3 <sup>c</sup>	98,8 <sup>c</sup>
Caséinate	92,1 <sup>a</sup>	85,5 <sup>b</sup>	<b>2,2<sup>*c</sup></b>	2,3 <sup>c</sup>	67,5 <sup>d</sup>	78,4 <sup>e</sup>	78,0 <sup>e</sup>	77,8 <sup>e</sup>
Gélatine	95,0 <sup>a</sup>	93,3 <sup>b</sup>	92,4 <sup>b</sup>	90,2 <sup>c</sup>	<b>88,3<sup>d</sup></b>	92,7 <sup>b</sup>	95,5 <sup>a</sup>	98,4 <sup>e</sup>

\* : pH = 4,5 ; a - e : moyenne effectuée sur trois déterminations. Pour chaque ligne, les moyennes présentant des lettres différentes en exposant sont significativement différentes à  $p < 0,05$ . Les valeurs en gras représentent les valeurs de solubilité minimale pour chacun des produits testés.

Les valeurs obtenues montrent que la solubilité des solutions protéiques obtenues par ce procédé enzymatique augmente en fonction du degré d'hydrolyse (DH), en accord avec les résultats d'Adler-Nissen (1976) et Smith et Brekke (1985). L'amélioration de cette propriété fonctionnelle pour les hydrolysats peut s'expliquer par une diminution de la taille des polypeptides (Turgeon *et al.*, 1992) et par l'amélioration de l'hydrophilicité des hydrolysats, via une révélation de plus en plus importante des groupements aminés et carboxyliques ionisables en fonction du DH.

### III.2. Les propriétés émulsifiantes des hydrolysats

Les propriétés émulsifiantes sont les propriétés les plus intéressantes dans le domaine des produits carnés où ces ingrédients entrent dans la formulation de plats cuisinés. Les méthodes d'évaluation de la capacité, de l'activité, et de la stabilité émulsifiante de solutions protéiques sont nombreuses et les résultats obtenus rarement exploitables, en raison de la disparité des conditions expérimentales utilisées (Halling, 1981 ; Stainsby, 1986). Plusieurs facteurs influencent la mesure de la capacité et de la stabilité émulsifiante de solutions protéiques : la forme de la cellule d'agitation, la vitesse, la source protéique (concentration, solubilité), la température, le pH, la nature et le débit de l'huile additionnée, la présence de sucre...). Ces facteurs contribuent à la dispersion des résultats signalés dans la littérature (Inklaar et Fortuin, 1969 ; Tornberg et Hermansson, 1977).

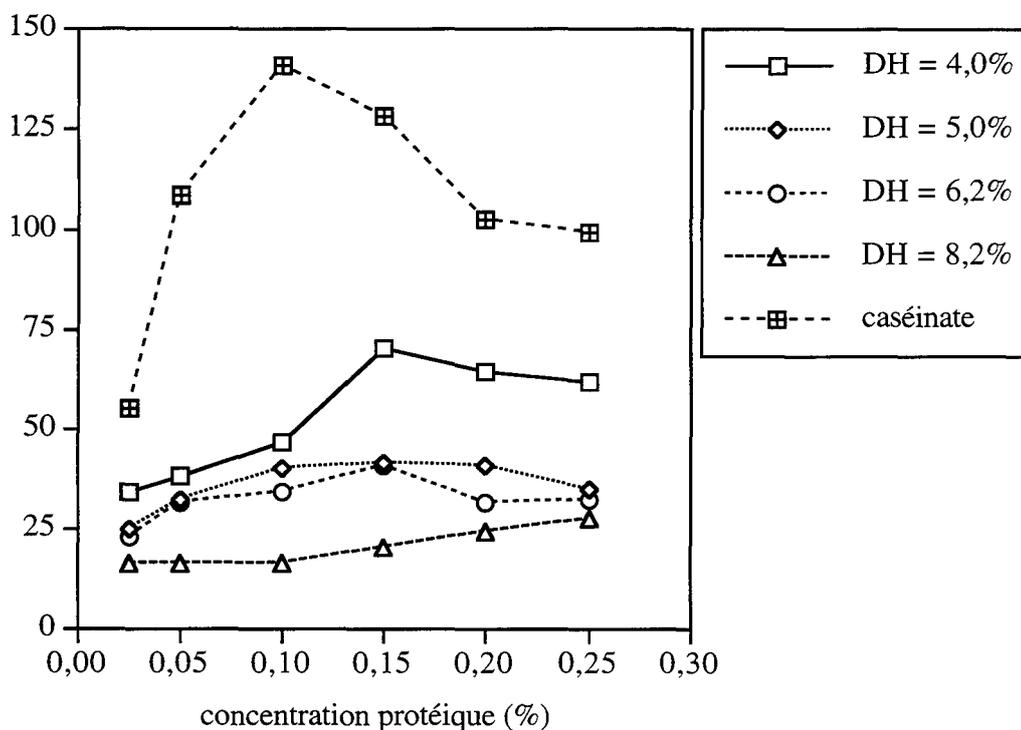
Au cours du présent travail, une méthode standardisée, rapide, basée sur la variation de la conductivité au cours de la formation d'une émulsion (Vuilleumard *et al.*, 1990) a été utilisée. Nous avons étudié l'influence du degré d'hydrolyse (DH) et de la concentration protéique sur la capacité émulsifiante (CE) des solutions préparées à partir d'hydrolysats de co-produits de veau (Figure III.13.).

#### III.2.1. La capacité émulsifiante (CE)

La capacité émulsifiante représente le volume de phase lipidique pouvant être émulsifié par unité massique de protéine. Quel que soit le produit étudié, la capacité émulsifiante augmente en fonction de la concentration protéique, atteint un maximum puis diminue. La valeur maximale, notée  $CE_{max}$ , dépend de la nature de la solution protéique et du degré d'hydrolyse. Des profils de courbes similaires de capacité émulsifiante ont été obtenus par Vuilleumard *et al.* (1990) sur des protéines laitières, et la valeur  $CE_{max}$  obtenue en calibration avec le caséinate de sodium (140,2 g d'huile / 100 mg de protéines pour une concentration protéique de 0,10%), est en accord avec ces auteurs. La concentration de 0,1% est aussi utilisée par Turgeon *et al.* (1991) pour étudier l'influence de l'hydrolyse enzymatique sur la capacité émulsifiante de protéines sériques.

Le DH influence négativement la capacité émulsifiante, quelle que soit la concentration protéique des solutions d'hydrolysat. Une valeur maximale de la capacité émulsifiante (70,3 g d'huile pour 100 mg de protéines) est obtenue pour un DH = 4,0% (concentration protéique 0,15%), et chute à une valeur de  $CE_{max} = 27,3$  g d'huile pour 100 mg de protéines, pour un DH = 8,2% (concentration protéique de 0,25%). Ce phénomène a déjà été observé par Adler-Nissen et Olsen (1979) qui notent une diminution de la capacité émulsifiante d'isolats protéiques de soja, lorsque le DH des solutions passe de 5,0 à 9,0%.

CE ( (g d'huile - blanc) / 100 mg de protéines)



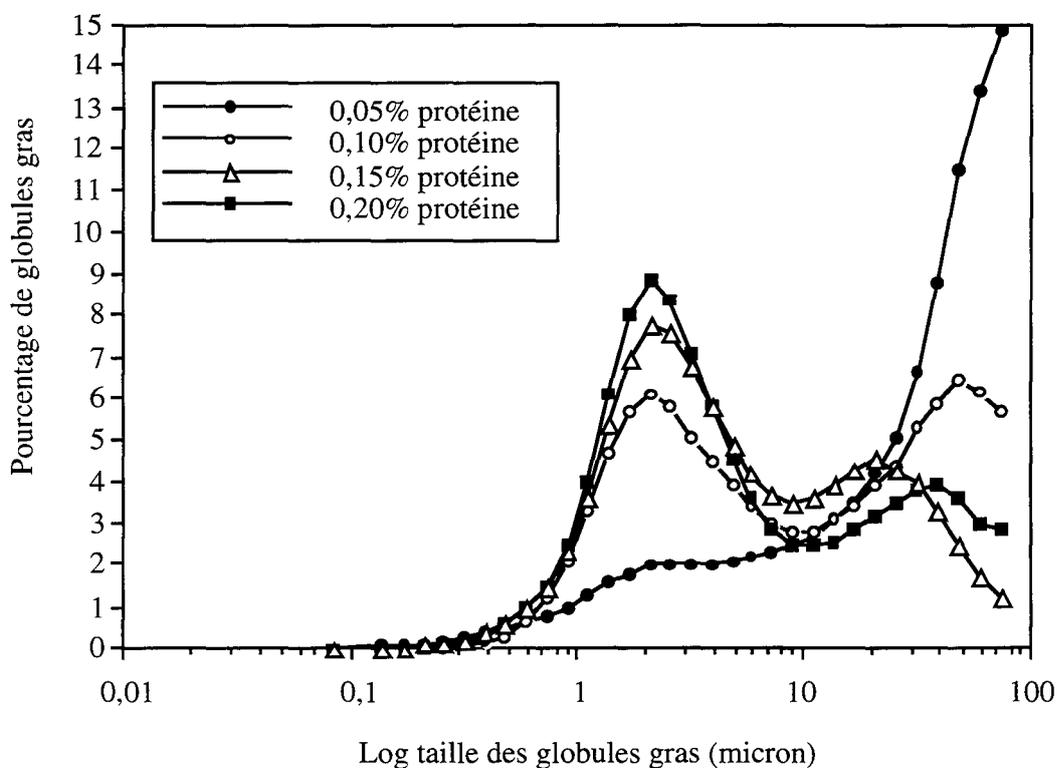
**Figure III.13. :** Influence du degré d'hydrolyse (DH) et de la concentration protéique sur la capacité émulsifiante (CE) d'hydrolysats protéiques obtenus à partir de co-produits d'abattage (colonnes vertébrales de veau).

L'hydrolyse ménagée permet une libération des groupements hydrophobes des chaînes polypeptidiques initialement protégés, et favorise la formation d'un film interfacial par phénomène d'adsorption entre ces groupements hydrophobes et la phase lipidique (Turgeon *et al.*, 1992). La diminution de CE en fonction de l'augmentation du DH peut s'expliquer par l'encombrement stérique et la longueur des chaîne peptidiques, pour une concentration protéique donnée. Après adsorption des fractions peptidiques à la surface des globules gras, la structure formée se stabilise par les interactions latérales existantes entre les différents peptides. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une différence entre les vitesses de formation des globules gras et le phénomène de coalescence, avant le point d'inversion de phase. La diminution de la capacité émulsifiante en fonction de la concentration protéique croissante (pour des DH faibles), peut s'expliquer par la formation de membranes. Les fractions peptidiques s'adsorbent à l'interface huile / solution aqueuse proportionnellement à leur concentration. Si la vitesse d'adsorption est plus rapide que la vitesse de recouvrement du globule gras, la surface de la gouttelette est rapidement saturée, limitant ainsi le déploiement de la chaîne polypeptidique. Aux faibles concentrations protéiques (vitesse d'adsorption plus faible), la cinétique de couverture de

la même surface du globule gras par les polypeptides est plus lente, ce qui augmente CE (Britten et Giroux, 1990). La différence significative observée entre les valeurs de CE du caséinate de sodium et des hydrolysats protéiques, peut être attribuée à la destruction de la structure tridimensionnelle des protéines par le clivage enzymatique, ainsi qu'à la présence de composés amphiphiles provenant de la moelle osseuse.

### III.2.2. Détermination de la distribution de taille des globules gras

Dans les conditions expérimentales utilisées (condition d'agitation, débit d'huile, géométrie de la cellule), la distribution de taille des globules gras de la phase émulsionnée d'un hydrolysat protéique (DH = 4,0%) est présentée à la figure III.14.



**Figure III.14.** : Effet de la concentration protéique (0,05 ; 0,10 ; 0,15 ; 0,20%) sur la distribution de taille des globules gras (microns) d'une émulsion, préparée à partir d'un hydrolysat protéique (DH =4,0%). Les prélèvements sont effectués juste avant l'inversion de phase (conditions opératoires : vitesse de l'Ultra-turrax® 20000 tr / mn ; 20°C ; débit d'huile = 16,5 g / mn). Chaque valeur représente la moyenne sur 3 expérimentations indépendantes.

Un diamètre moyen des globules gras compris entre 1,8 et 2,3  $\mu\text{m}$  est mesuré sur des aliquotes prélevés, juste avant l'inversion de phase. Des valeurs similaires sont obtenues par Vuillemand *et al.* (1990) pour des émulsions de protéines laitières. Il apparaît que la proportion de globules gras (diamètre : 2  $\mu\text{m}$ ) augmente, en fonction de la concentration

protéique (0,05 à 0,20%), influençant directement la stabilité de l'émulsion (Jackman *et al.*, 1989). Les phénomènes de floculation et de coalescence peuvent être ainsi retardés pour des concentrations protéiques supérieures à 0,05%.

### III.2.3. L'activité émulsifiante

L'activité émulsifiante permet de quantifier la faculté des protéines à stabiliser l'aire interfaciale dès sa formation, en fonction de l'adsorption des fractions protéiques à l'interface eau / phase lipidique, et de leur déploiement selon leurs particularités de structure (protéolyse ménagée).

Au cours de ce travail, nous avons utilisé le même appareillage que pour déterminer CE, dans le but de standardiser la mesure des propriétés émulsifiantes. Nombreux sont les travaux utilisant des méthodes optiques, comme Pearce et Kinsella (1978), mais cette méthode, même corrigée, est biaisée par les prélèvements d'émulsion diluée dans un tampon SDS, et la durée qui s'écoule avant la lecture de la densité optique.

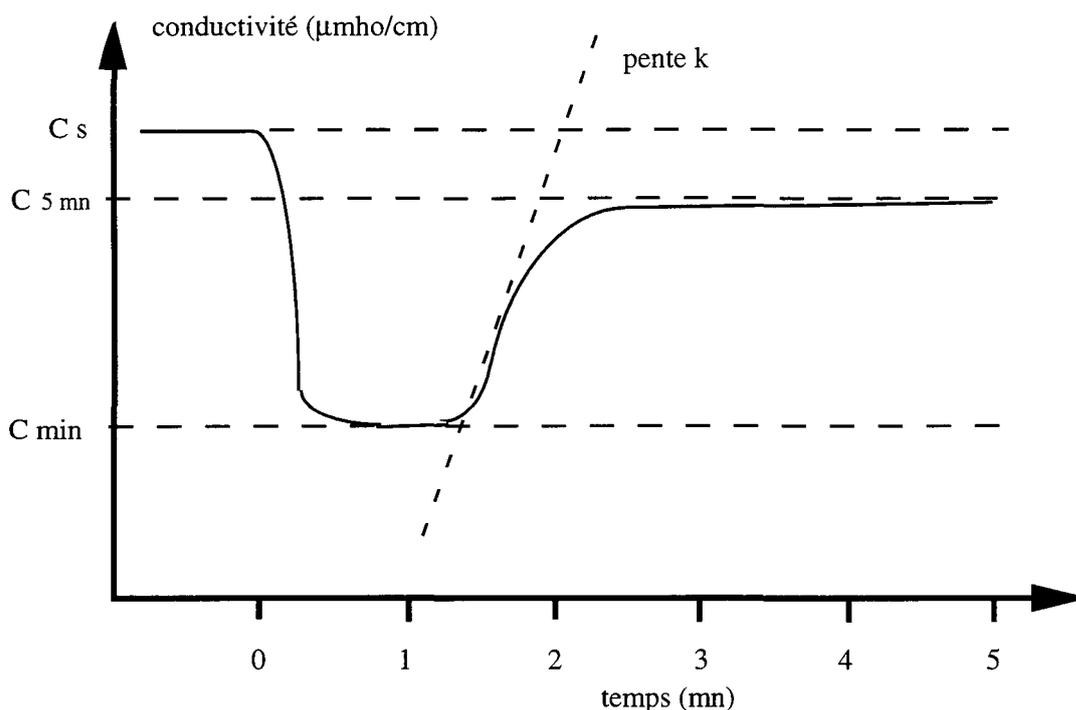
La méthode conductimétrique permet d'obtenir des mesures rapides, reproductibles selon le type de cellule utilisée en limitant l'incorporation d'air (Britten et Giroux, 1990).

L'activité émulsifiante d'un hydrolysats de co-produit de veau augmente linéairement avec la concentration protéique ( $R^2 = 0,99$ ) selon la relation ci-dessous, valable pour de faibles concentrations protéiques (0,02 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,15 ; 0,20%) :

$$AE (\mu\text{mho} / \text{cm}) = - 2,48 + 1379 \times \text{concentration protéique (\%)}$$

Des résultats similaires ont été obtenus par Suttiprasit *et al.* (1993) sur des protéines laitières. Le profil général de la mesure de conductivité pendant la formation de l'émulsion est montré sur la figure III.15.

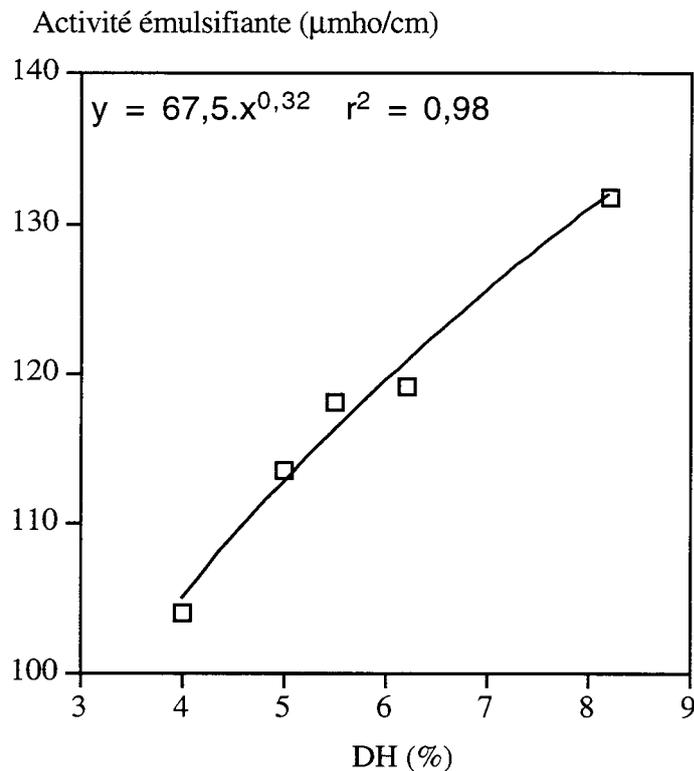
L'homogénéisation des phases lipidique et aqueuse provoque une chute brutale de la conductivité ( $\mu\text{mho}/\text{cm}$ ), en raison de l'incorporation d'une phase non conductrice. Les valeurs de conductivité obtenues sont inférieures à celles observées par Kato *et al.* (1985), car les dispersions protéiques sont préparées avec de l'eau distillée et non dans un tampon, afin d'éliminer l'influence des concentrations salines sur la mesure de conductivité.



**Figure III.15.** : Evolution de la conductivité initiale ( $C_s$ ) d'une solution protéique en fonction du traitement d'homogénéisation à l'aide d'un Ultra-Turrax<sup>®</sup> : 20000 tr / mn (1 mn : conductivité minimale ( $C_{min}$ ) ; conductivité après 5 mn ( $C_{5\text{ mn}}$ )).

Dans des conditions de protéolyse limitée (DH inférieur à 10), l'activité émulsifiante augmente avec le DH. Une corrélation significative ( $R^2= 0,98$ ) entre le DH et l'activité émulsifiante d'hydrolysat de co-produit de veau, est obtenue à la figure III.16.

Des travaux menés par Mietsch *et al.* (1989) sur des hydrolysats protéiques de soja et de caséine (Neutrase<sup>®</sup>0,5L ; DH compris entre 1 et 14%), ont montré que l'activité émulsifiante était maximale pour des valeurs de DH comprises entre 2 et 8 %, selon la nature du substrat protéique. En fonction du degré de protéolyse et donc de la taille des fragments, les petits peptides et acides aminés hydrophobes diffusent et s'adsorbent plus rapidement à l'interface eau / phase lipidique, que les chaînes polypeptidiques. Dans des conditions d'homogénéisation drastiques (20000 tr / mn), le volume de la phase lipidique, inférieur au minimum de la capacité émulsifiante, provoque la formation de petits globules gras, ce qui augmente l'énergie libre de surface.



**Figure III.16.** : Effet du degré d'hydrolyse (DH) sur l'activité émulsifiante (AE) d'hydrolysats protéiques obtenus à partir de co-produits d'abattage, mesurée par conductivité ( $EA = C_S - C_{min}$  ; concentration protéique = 0,1%).

#### III.2.4. la stabilité émulsifiante des hydrolysats

Une fois l'homogénéisation terminée, la stabilité des émulsions peut être estimée par la mesure de la conductivité. En accord avec Kato *et al.* (1985) et Suttiprasit *et al.* (1993), la pente de la région linéaire de la courbe (Figure III.15.) représente la vitesse de remontée et le phénomène de coalescence des globules gras de l'émulsion au repos.

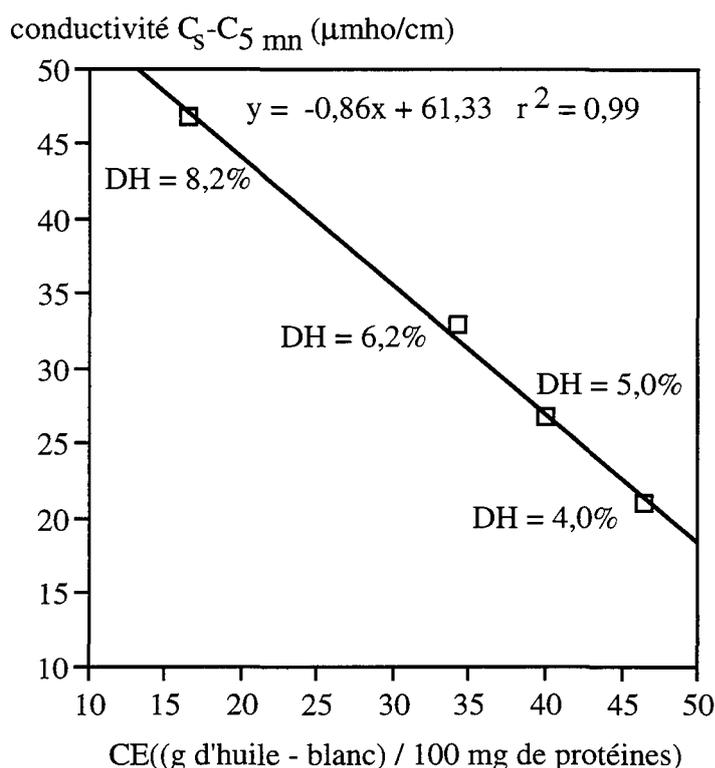
Les faibles augmentations de valeurs de la pente obtenues selon l'équation de Kato *et al.* (1985) en fonction du DH pour les différentes émulsions, montrent qu'une hydrolyse limitée n'a pas un effet significatif sur l'augmentation de la stabilité émulsifiante (DH = 4,0 : 0,39 ; DH = 8,2 : 0,71 mn). La pente, mesurée sur la seconde partie de la courbe (plateau pseudo - stationnaire) par Suttiprasit *et al.* (1993), ne peut être exploitée dans notre cas en raison de sa très faible valeur, souvent inférieure à l'erreur expérimentale.

Dans le cadre de ce travail, nous avons évalué ES par la différence entre la mesure de conductivité de la solution initiale ( $C_S$ ) et la valeur après 5 mn, en tenant compte de la correction liée à l'augmentation de la température. Cette méthode s'apparente à celle utilisée par Latreille et Paquin (1990) où la stabilité est définie comme la différence entre

la conductivité mesurée sur le culot de centrifugation et la solution initiale. Une relation linéaire ( $R^2 = 0,99$ ) est obtenue entre la capacité émulsifiante et la stabilité, en fonction du DH (Figure III.17.).

La différence de conductivité représente la quantité d'huile émulsifiée résiduelle, après homogénéisation. En fonction de l'augmentation du DH (dans des conditions de protéolyse ménagée), CE diminue alors que la stabilité augmente. Ceci peut s'interpréter par l'adsorption plus rapide des peptides à l'interface eau / huile (encombrement stérique moins important) qui entraîne une stabilisation des globules gras, retardant ainsi le phénomène de crémage consécutif à la coalescence.

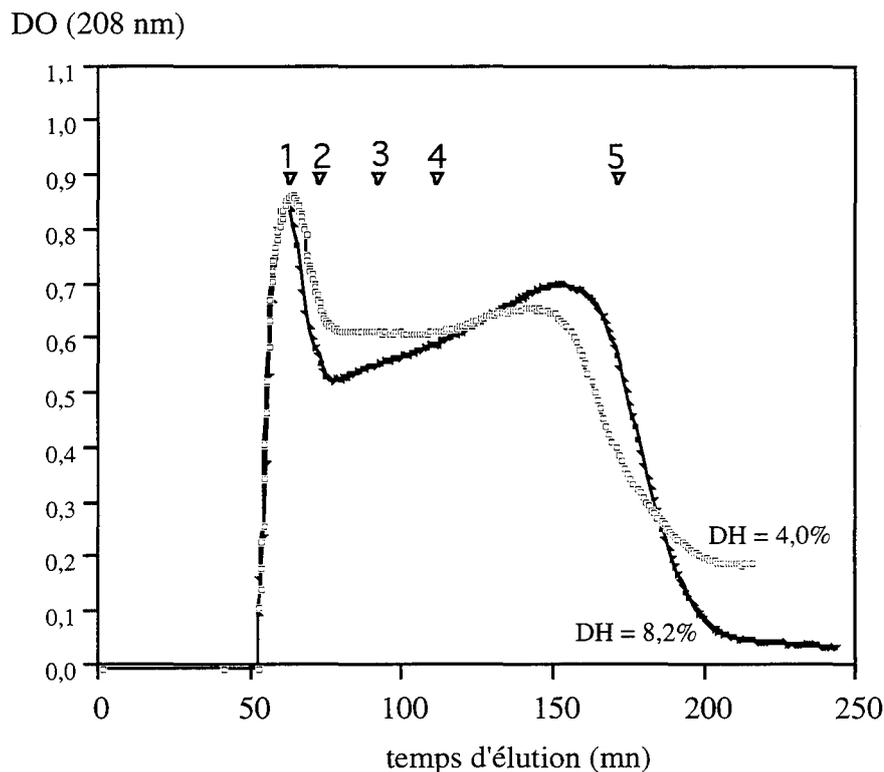
D'autre part, les hydrolysats contiennent des composés lipidiques complexes (moelle osseuse) susceptibles d'influencer la stabilité des émulsions préparées. Ces composés s'adsorbent à l'interface des globules gras compétitivement avec les fractions protéiques à caractère hydrophobe (DH élevé) et augmentent la cohésion du système ainsi formé.



**Figure III.17.** : Corrélation entre la capacité émulsifiante (CE) et la stabilité émulsifiante (SE) mesurée par différence de conductivité entre la solution d'hydrolysate protéique initiale et la conductivité mesurée 5 mn après homogénéisation ( $C_{5mn}$ ) pour différents degrés d'hydrolyse (DH). Les conditions opératoires sont : pH = 7,0 ; concentration protéique = 0,1% ; valeurs moyennes effectuées sur trois expérimentations.

### III.3. Distribution de taille des hydrolysats

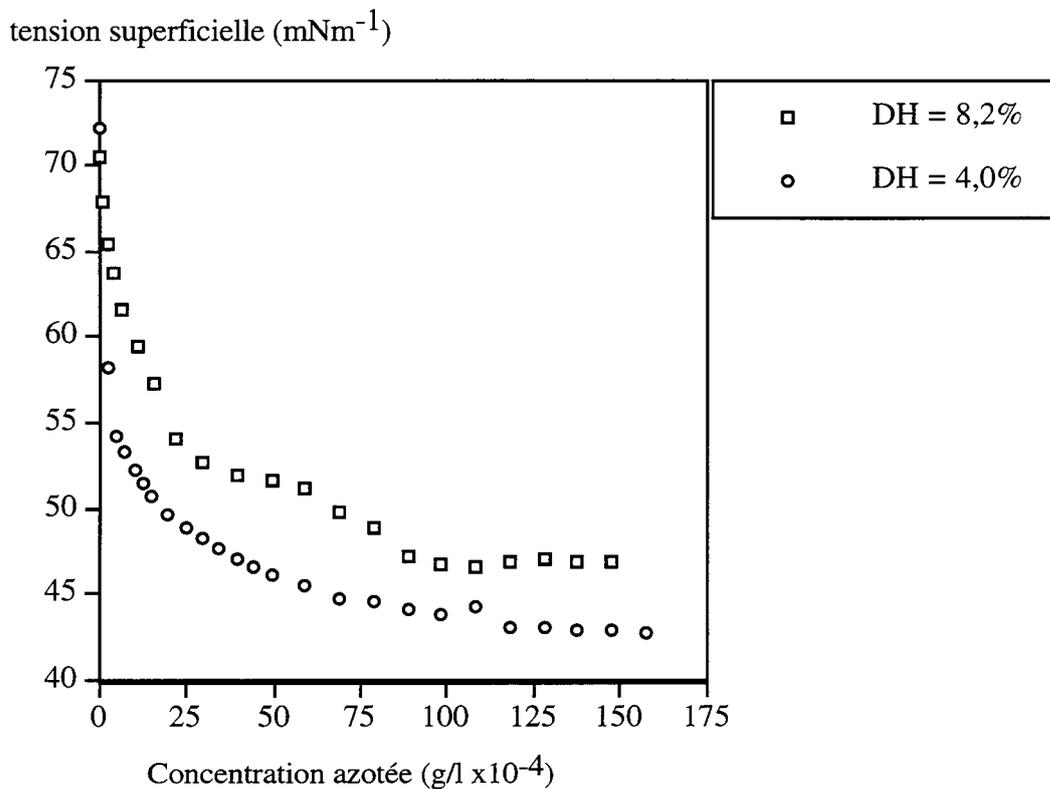
La taille des fractions peptidiques obtenues à divers degrés d'hydrolyse est évaluée par chromatographie d'exclusion sur gel. La distribution de taille de la fraction soluble des hydrolysats (DH = 4,0 et DH = 8,2%), présentée sur la figure III.18., montre une large distribution de poids moléculaires. La proportion de fractions comprises entre 29000 et 200 daltons, dépend du degré d'hydrolyse, comme le montre la figure ci-dessous. En fonction de cette distribution, les hydrolysats entrent dans différentes catégories de composés utilisés en formulation nutritionnelle (Mermelstein, 1992 ; Mahmoud, 1994). Des degrés très élevés (autours de 60%) sont utilisés pour éliminer l'allergénicité de protéines de lait pour l'alimentation infantile dont 96% des fractions peptidiques ont un poids moléculaire inférieur à 500 daltons (Mahmoud *et al.*, 1992).



**Figure III.18. :** Profils de distribution de poids moléculaires d'hydrolysats protéiques (DH = 4,0 et 8,2%) obtenus par hydrolyse enzymatique, et lyophilisés (Neutrase<sup>®</sup> 0,5L ; marqueurs : 1 = 66000 ; 2 = 29000 ; 3 = 12400 ; 4 = 6500 ; 5 = 181 ; débit 0,5 ml / mn ; Sephadex G-50F).

### III.4. Cinétique de tension superficielle à l'interface solution protéique - air

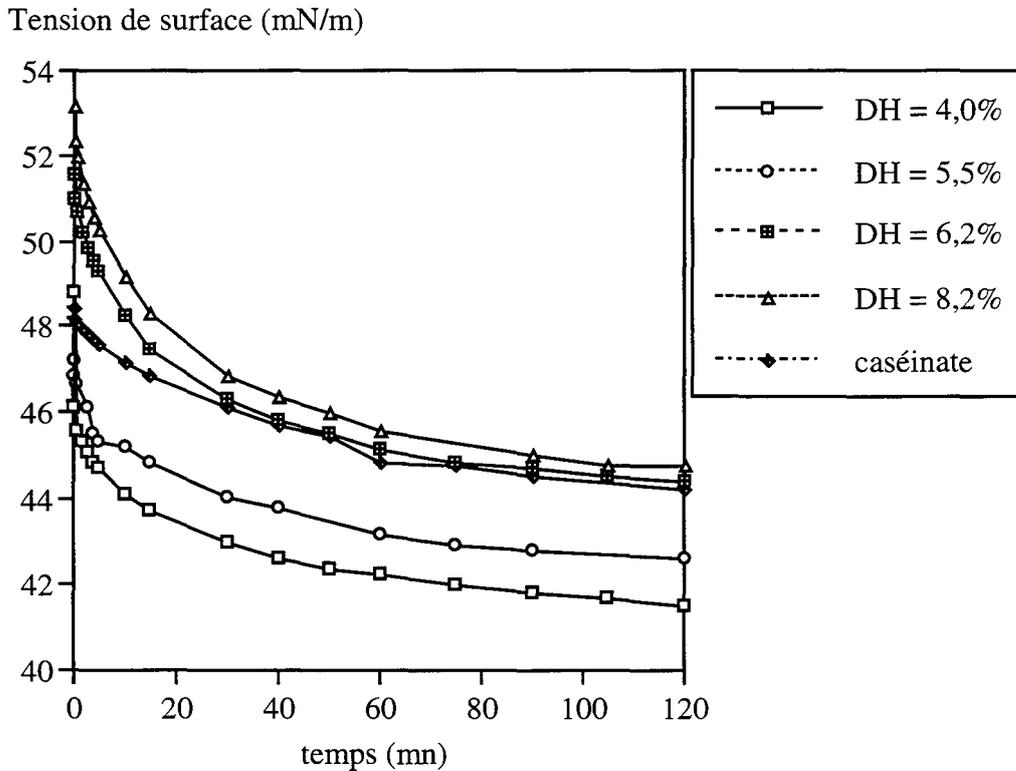
La taille des peptides influence également la tension de surface des solutions d'hydrolysats protéiques. La figure III.19. présente les courbes  $\gamma = f(t)$  pour les hydrolysats de co-produits et le caséinate de sodium. L'abaissement de la tension superficielle  $\gamma$  apparaît d'autant plus importante que la concentration en protéine de la phase aqueuse est élevée (Figure III.19.), avant d'atteindre une valeur seuil pour de fortes concentrations protéiques. L'hydrolyse enzymatique des protéines diminue la tension superficielle des solutions, en raison de la différence de conformation et du poids moléculaire des fractions par rapport à l'état natif (Turgeon *et al.*, 1991).



**Figure III.19.** : Evolution de la tension superficielle (mNm<sup>-1</sup>) d'une solution d'hydrolysat en fonction de la concentration protéique et du degré d'hydrolyse (DH). Chaque point est la moyenne de deux observations indépendantes. Les conditions opératoires sont : addition successive d'aliquotes de 10  $\mu$ l de solution protéique mère (0,5% à 25 ml d'eau distillée à 20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C ; la mesure étant prise après 2 mn d'agitation et 10 mn de stabilisation de la lame de Wilhelmy.

Nous avons étudié l'influence du DH sur la tension superficielle d'une solution à 0,1% de protéine, valeur où la capacité émulsifiante est maximale. L'hydrolyse enzymatique de

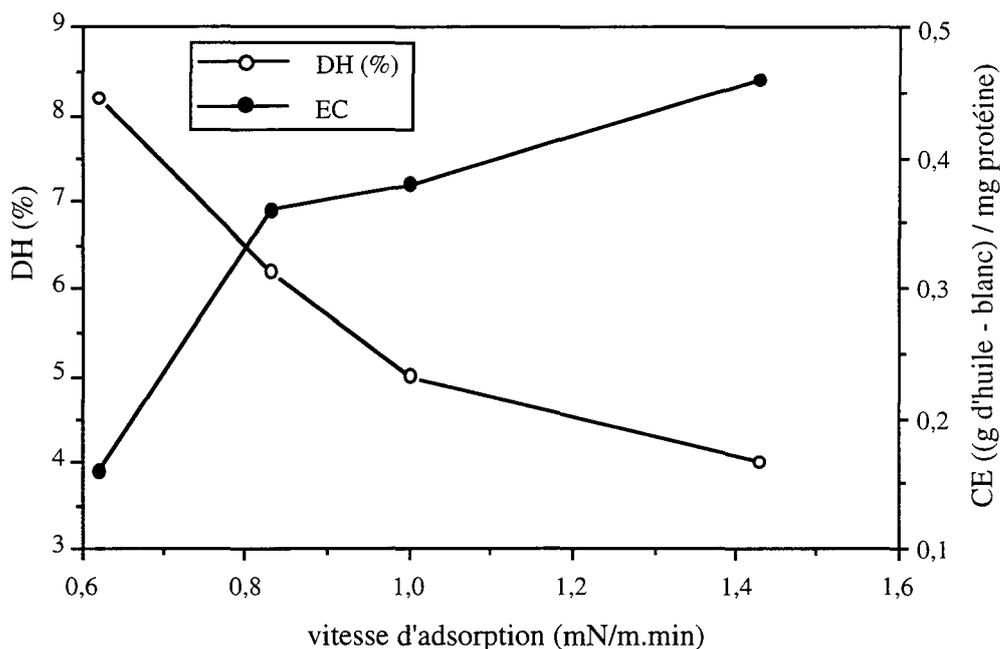
solution protéique entraîne une diminution de la tension superficielle en relation avec le degré de dénaturation de la protéine (Figure III.20.).



**Figure III.20.** : Evolution de la tension de surface de différentes solutions protéiques (pH = 7,0 ; concentration protéique = 0,1% ; volume : 50 ml) en fonction du degré d'hydrolyse (DH). Chaque valeur représente la moyenne de trois expérimentations.

La vitesse d'adsorption des fractions peptidiques à l'interface, mesurée par la pente à l'origine, diminue en fonction de la protéolyse (Figure III.21.). Ce phénomène peut s'expliquer par l'action de "recouvrement et d'étalement" des polypeptides à l'interface, bien que les petits peptides et acides aminés libres s'adsorbent plus vite. L'affinité des chaînes peptidiques plus forte peut entraîner une désorption des acides aminés, phénomène déjà observé par Turgeon *et al.* en 1991, sur des protéines sériques, après hydrolyse trypsique et chymotrypsique.

La figure III.21. montre également une corrélation entre la vitesse d'adsorption et la capacité émulsifiante qui peut s'expliquer par la conformation des fractions protéiques (flexibilité, hydrophobicité, poids moléculaire).



**Figure III.21.** : Relation entre la vitesse d'adsorption de solutions protéiques préparées à partir d'hydrolysats de co-produits de veau, la capacité émulsifiante (CE) et le degré d'hydrolyse (DH).

#### IV. DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE

Actuellement peu de procédés de valorisation sur ce type de produits ont réellement été appliqués en entreprise. Le développement de la technologie mise au point en laboratoire dans le but d'utiliser les propriétés exposées ci-dessus est tributaire du succès de son transfert vers l'industrie, évidemment liée à l'efficacité des procédés utilisés. Pour ce qui nous concerne, les procédés discontinus ou "batch" permettent une grande souplesse de conduite en vue de l'obtention d'hydrolysats de qualité (problèmes de contamination, facilité de régulation et de nettoyage). Ils seront retenus, de préférence à l'hydrolyse en continu, notamment développée sur substrats solubles. La technologie utilisée au stade industriel (Fig. II.5.) est reportée en Annexe III.

Les résultats présentés ci-dessous concernent un exemple de production d'un type d'hydrolysat protéique à caractère gélifiant. Le paramétrage des conditions d'extraction fait référence aux conditions optimales obtenues dans la première partie de ce travail et dépend du temps alloué à l'extraction (30 ou 60 mn) en fonction des contraintes industrielles :

- protéase : Neutrase<sup>®</sup> 0,5L
- concentration protéique : 7,5%
- rapport enzyme / substrat protéique : 3 ou 5%
- température d'extraction protéique : 50 ou 55°C
- durée d'extraction : 30 ou 60 mn
- température de dénaturation et de solubilisation des tissus conjonctifs : 95°C
- durée du traitement thermique : 60 mn.
- masse de substrat : 100 kg
- volume réactionnel final : 250 litres

Une modification du procédé pour ce type de produit, consiste à supprimer le pré-traitement thermique (10 mn, 85°C), en raison de la durée très limitée de la phase enzymatique avant le traitement d'inactivation.

## IV.1. Mesure et contrôle de la réaction d'hydrolyse

### IV.1.1. Evolution du pH au cours de la réaction d'hydrolyse

Nous avons mesuré la variation du pH au cours du temps (Tableau III.12), pendant une réaction d'extraction protéique sur 100 kg de co-produit (broyat de colonnes vertébrales de veau) en réacteur discontinu de 400 litres (conditions opératoires : Neutrase<sup>®</sup> 0,5L ; 30 mn ; 55°C ; E / S = 1% et 3% ; S = 7,5%).

**Tableau III.12.** : Evolution du pH au cours de la réaction d'hydrolyse de co-produits de veau.

temps (mn)	valeur initiale	1	5	10	15	30	45	60
E / S = 1%	6,6	6,40	6,30	6,25	6,20	6,13	6,09	6,10
E / S = 3%	6,57	6,43	6,30	6,22	6,15	6,10	-	-

La faible diminution du pH dès l'addition de la préparation enzymatique, montre la forte capacité tampon du milieu réactionnel.

L'activité de la Neutrase<sup>®</sup> 0,5L, stable sur une large échelle de valeur de pH (Cf. Annexe I.) permet d'éviter une régulation de ce facteur. Des expérimentations avec contrôle du DH par la méthode du pH-stat (addition de lessive de soude) pour maintenir le pH à la valeur optimale de la protéase, n'améliorent pas les performances catalytiques de ce type

d'endoprotéase. En revanche, cette opération a pour inconvénient majeur d'entraîner la présence de sels sodiques dans les hydrolysats protéiques.

L'utilisation d'un procédé enzymatique améliore considérablement la solubilité du substrat protéique. Cependant cette solubilisation affecte en partie le tissu conjonctif, donc se fait au détriment des propriétés gélifiantes. En effet la Neutrase<sup>®</sup> 0,5L hydrolyse les chaînes de collagène aux sites de jonction, riches en acides aminés hydrophobes et la solution d'hydrolysat ne peut plus gélifier, même à basse température (Ledward et Lawrie, 1984).

Afin de ne pas perdre cet avantage fonctionnel constitué par l'aptitude à la gélification, il a été choisi de procéder en 2 temps : solubiliser rapidement les fractions protéiques pour leur qualité nutritionnelle par un traitement enzymatique, puis procéder à un traitement thermique dont l'effet sera triple : dénaturation des protéases, stérilisation du milieu réactionnel, et solubilisation des tissus conjonctifs n'ayant pas été hydrolysés.

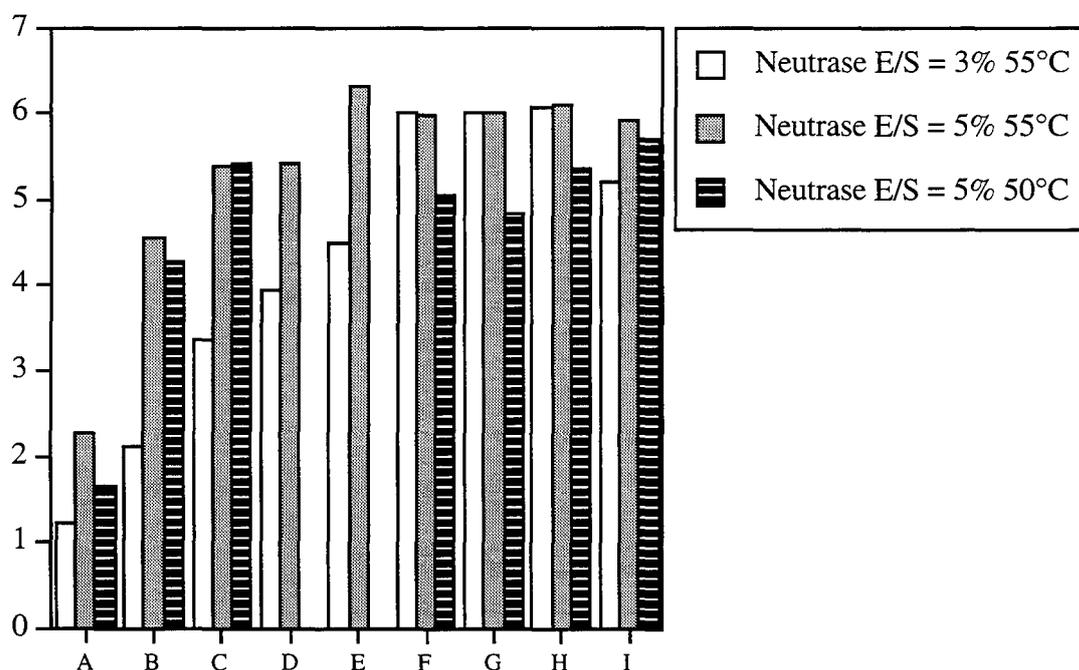
#### **IV.1.2. Evaluation du degré d'hydrolyse**

Le contrôle de la réaction d'hydrolyse des co-produits de veau mis en suspension peut être effectué par mesure du point cryoscopique directement au niveau du réacteur en temps réel. Cette méthode, déjà employée dans la première partie de ce travail (Cf. Fig.II.4. chapitre "Matériels et Méthodes"), permet d'estimer directement le degré d'hydrolyse, dans le but de limiter le développement d'amertume. Une méthode similaire (cryoscopique) est utilisée par Pedersen *et al.* (1994) pour mesurer le DH, concernant la production d'hydrolysats de co-produits de boeuf et de porc (viande adhérent aux os), destinés à l'alimentation humaine.

Des prélèvements de 200 ml au cours du procédé sont immédiatement congelés à -40°C (pour stopper la réaction) et analysés pour déterminer par réaction colorimétrique au TNBS, le degré de protéolyse (Figure III.22.).

Les résultats obtenus montrent que la protéolyse augmente en fonction de la durée de la réaction et de la concentration en enzyme. Sur les 30 premières minutes du traitement enzymatique, la température est un facteur beaucoup moins influent que la concentration en enzyme. Au cours du traitement thermique, on observe une légère diminution d'Equivalent Leucine / ml de solution en raison de l'injection de vapeur. Les hydrolysats obtenus dans ces conditions ont un degré d'hydrolyse inférieur à 6%.

Equivalent Leucine.  $10^{-5}$  / ml de solution



**Figure III.22.** : Cinétique du degré de protéolyse de co-produit de veau déterminée par la méthode colorimétrique au TNBS sur le surnageant obtenu par centrifugation (1000 x g ; 10 mn)

**A** : initial ; **B** : 15 mn d'hydrolyse (TH) ; **C** : 30 mn TH ; **D** : 45 mn TH ; **E** : 60 mn TH ; **F** : traitement thermique à 95°C (TT) initial ; **G** : 30 mn TT ; **H** : 60 mn TT ; **I** : hydrolysats après clarification.

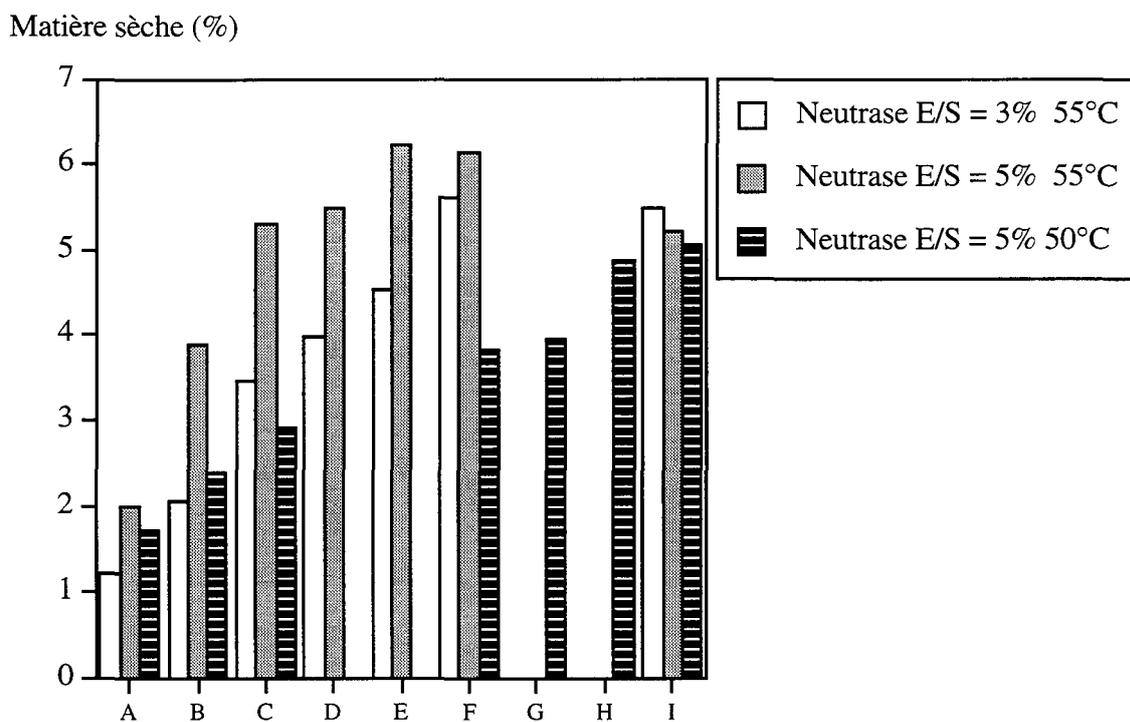
#### IV.2. Bilan massique des opérations et composition des différentes fractions

Les co-produits d'abattage (Annexe III Figures 1 et 2) sont principalement utilisés pour la production de bouillons plus ou moins gélatineux, destinés à la préparation des sauces (aromatisées ou non) dans la formulation de plats cuisinés.

La méthode traditionnelle consiste à laisser bouillir durant toute la nuit le substrat additionné d'eau, pour le laisser "réduire". A partir de 100 kg de substrat et 150 kg d'eau, sont obtenus 96 kg d'un mélange hétérogène viande - os, et 160 kg de jus protéique. Après clarification et décantation sur décanteur horizontal (6780 tr / mn) on sépare du jus clair 14 kg de fractions protéiques "lourdes" (31% de matière sèche) et  $14 \pm 3$  kg de matière grasse.

#### IV.2.1. Evolution de la matière sèche pendant le procédé d'extraction

Des prélèvements de bouillon au cours de la réaction d'hydrolyse permettent de mesurer l'évolution de la solubilisation des fractions protéiques des co-produits de veau (Figure III.23.)



**Figure III.23** : Evolution de la matière sèche des hydrolysats protéiques de co-produits de veau mesurée sur le surnageant obtenu par centrifugation (1000 x g ; 10 mn).  
**A** : initial ; **B** : 15 mn d'hydrolyse (TH) ; **C** : 30 mn TH ; **D** : 45 mn TH ; **E** : 60 mn TH ;  
**F** : traitement thermique à 95°C (TT) initial ; **G** : 30 mn TT ; **H** : 60 mn TT ; **I** : hydrolysats après clarification.

On observe un profil cinétique similaire à celui de la mesure de la protéolyse. Il faut noter que les faibles valeurs de matière sèche présentées sur la figure représentent l'extrait sec du surnageant des prélèvements centrifugés (1000 x g, 10 mn).

A partir des essais d'extraction d'hydrolysats réalisés à l'échelle pilote, nous avons effectué un bilan massique sur les différents produits obtenus au cours du temps (Tableau III.13.).

Les composés insolubles peuvent subir une extraction complémentaire, ou être destinés soit à l'alimentation animale soit à des fins non alimentaires (Annexe III. Figure 18).

L'hydrolysats protéique dégraissé obtenu possède la composition physico-chimique donnée au tableau III.14.

La matière grasse est obtenue après centrifugation sur décanteur auto-débourbeur (pression 2 bars ; 450 l / h ; diaphragme : 85 ; température entrée : 80°C). Sa composition

est la suivante : C12 : 1,15 ; C14 : 7,2 ; C16 : 24,3 ; C16-1 : 6,1 ; C18 : 10,88 ; C18-1 : 41,2 ; C18-2 : 6,3 % d'ester méthylique (Annexe III. Figure 17). Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par Anderson (1988) pour le veau , les différences pouvant être attribuées à la méthodologie ou à la présence de composés issus de la moelle osseuse.

**Tableau III.13.** : Bilan massique obtenu sur la production d'hydrolysat dégraissé à partir de co-produits de veau à l'échelle pilote (moyenne effectuée à partir de 3 extractions en utilisant la Neutrase® 0,5L).

opérations technologiques	produits	masse (kg)	produits fractionnés	masse (kg)
mélange (S = 7,5%) dégraissage partiel	broyat d'os eau	100 150	élimination du surnageant	10±2

Hydrolyse enzymatique : E / S = 5% ; durée = 30 mn ; traitement thermique = 60 mn.

filtration (Annexe III Fig. 12) décanteur-clarificateur (Annexe III Fig. 16) centrifugation refroidissement	"jus protéique"	163±5	résidus osseux	72±4
			extrait protéique (30% MS)	7,5±0,5
			hydrolysats	160±5
			matière grasse	6±0,5
			hydrolysats dégraissés (Annexe III. Figure 20)	150±5*

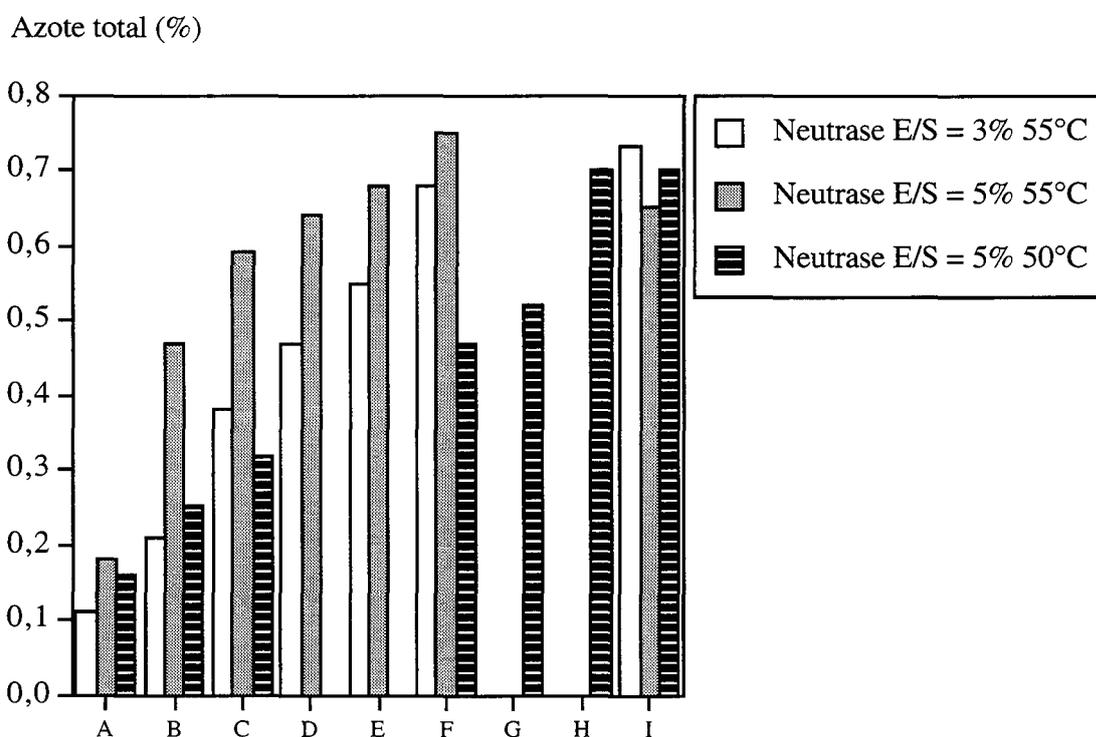
MS : matière sèche ; \* : variation due à l'opération de centrifugation.

**Tableau III.14.** : Composition physico-chimique et teneur minérale d'un hydrolysats protéique liquide après un traitement enzymatique (Neutrase® 0,5L ; E / S = 5% ; 30 mn ; S = 7,5% ; 55°C), suivi d'un traitement thermique (60 mn à 95°C).

matière sèche (%)	5,13± 0,08	pH	7,4
point cryoscopique (°C)	-0,358 ± 3x10 <sup>-3</sup>	Phosphore	220 mg/l
cencre (%)	0,53 ± 0,03	Magnésium	140 mg/l
NT (%)	1,20 ±0,03	Sodium	1,3 g/l
NPN (%)	0,80 ± 0,01	Calcium	110 mg/l
protéines (NT x 6,25)	7,50 ± 0,18	Potassium	1,2 g/l

#### IV.2.2. Evolution de la teneur azotée

La figure III.24. montre l'évolution de la concentration en azote de la phase soluble pendant le procédé d'extraction protéique. Nous pouvons remarquer que le traitement thermique, nécessaire à la dénaturation des protéases, continue à accroître la concentration azotée notamment lorsque la protéolyse est effectuée pendant 30 mn. Ce graphique montre qu'il est inutile de poursuivre le traitement enzymatique durant 1 heure, le maximum des tissus musculaires étant solubilisé dans la première demi-heure. La solubilisation du collagène ayant résisté à la protéolyse s'effectue au cours du traitement thermique.



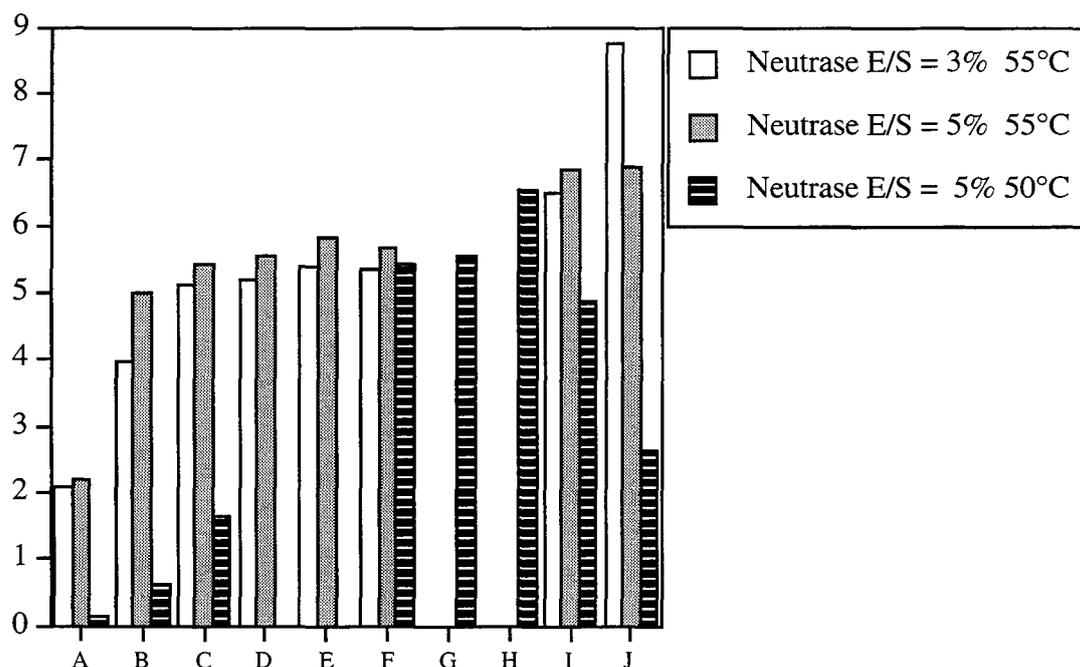
**Figure III.24.** : Evolution de la matière azotée des hydrolysats protéiques de co-produits de veau mesurée sur le surnageant obtenu par centrifugation (1000 x g ; 10 mn). **A** : initial ; **B** : 15 mn d'hydrolyse (TH) ; **C** : 30 mn TH ; **D** : 45 mn TH ; **E** : 60 mn TH ; **F** : traitement thermique à 95°C (TT) initial ; **G** : 30 mn TT ; **H** : 60 mn TT ; **I** : hydrolysats après clarification.

#### IV.2.3. Solubilisation des tissus conjonctifs

La cinétique d'hydrolyse des tissus conjonctifs au cours de la réaction de protéolyse de co-produits de veau est suivie par dosage de l'hydroxyproline (Figure III.25.). Les valeurs obtenues, proches de 6,5 g pour 100 g de protéines, montrent que les hydrolysats protéiques contiennent une forte proportion de tissu conjonctif (près de 50%) issu des disques intervertébraux. Cependant, il faut noter que si la teneur en hydroxyproline est

sensiblement identique au début du traitement thermique à 95°C, la structure des tissus conjonctifs est différente : à l'issue d'une hydrolyse de 30 mn, le collagène, difficilement hydrolysable, possède encore sa structure primaire plus ou moins préservée et l'hydrolysats présentera un caractère gélifiant. Cette propriété diminuera proportionnellement à l'augmentation de la durée d'hydrolyse.

Hydroxyproline (g / 16 g NT)

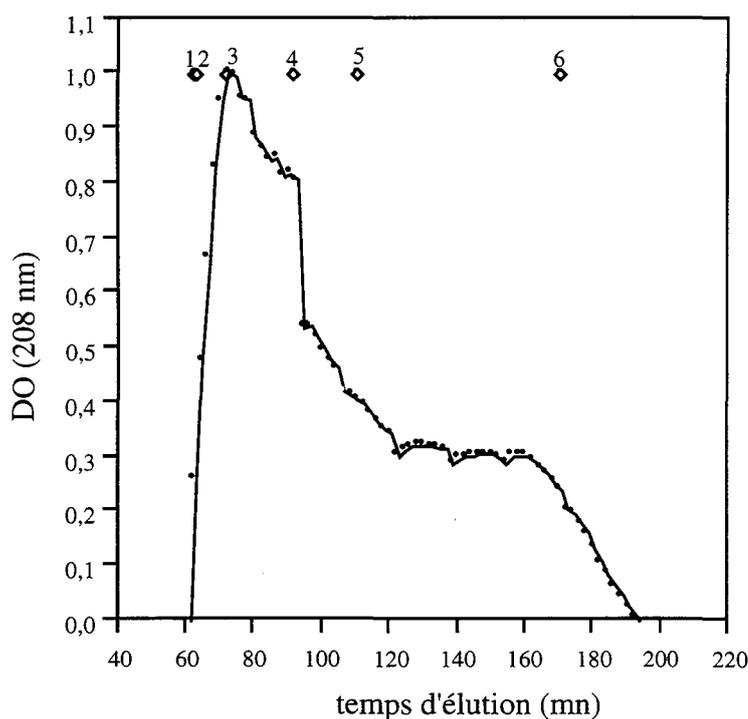


**Figure III.25.** : Evolution de la teneur en hydroxyproline de co-produits d'abattage au cours de différents traitements enzymatiques (rapports enzyme/substrat E / S = 3 et 5% ; S = 7,5% ; durée d'hydrolyse 30 et 60 mn) et thermique (95°C, 60 mn) sur le surnageant du mélange réactionnel.

**A** : initial ; **B** : 15 mn d'hydrolyse (TH) ; **C** : 30 mn TH ; **D** : 45 mn TH ; **E** : 60 mn TH ; **F** : traitement thermique à 95°C (TT) initial ; **G** : 30 mn TT ; **H** : 60 mn TT ; **I** : hydrolysats après clarification ; **J** : teneur en hydroxyproline des résidus osseux.

#### IV.2.3.1. Distribution de taille de l'hydrolysats protéique

La figure III.26 présente la distribution de poids moléculaires d'un hydrolysats de co-produits de veau, atomisé, où la proportion de fractions peptidiques comprises entre 30000 et 10000 daltons reste importante. Ceci peut s'expliquer par la solubilisation pendant le traitement thermique des tissus conjonctifs non hydrolysés.



**Figure III.26.** : Profil de distribution des poids moléculaires des fractions protéiques d'un hydrolysat obtenu industriellement et atomisé (Neutrase<sup>®</sup> 0,5L ; marqueurs : 1 = 2000000 ; 2 = 66000 ; 3 = 29000 ; 4 = 12400 ; 5 = 6500 ; 6 = 181 ; débit 0,5 ml / mn ; Sephadex G-50F).

#### IV.2.3.2. Mise en évidence de la propriété gélifiante de l'hydrolysat protéique

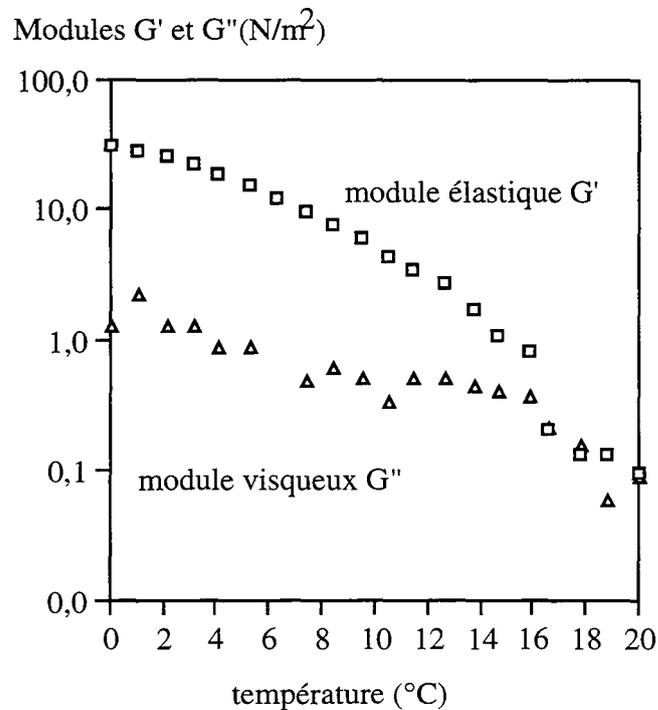
Le caractère gélifiant (Annexe III. Figure 19) de ce type d'hydrolysat (composition physico-chimique : Tableau III.15.) peut être mis en évidence et comparé à la fermeté d'un gel préparé à partir de gélatine en solution à différentes concentrations (Tableau III.16.). La solution d'hydrolysat commence à gélifier à une concentration de 0,4% d'azote à la température de 4°C (température choisie arbitrairement : conservation des produits en grande et moyenne surface). Les figures III.27 et III.28. montrent l'évolution, en fonction de la température, du module élastique (G') et du module visqueux (G'') de l'hydrolysat protéique de co-produit de veau. Il faut préciser cependant qu'un seul couple déformation / fréquence a été utilisé et qu'il serait nécessaire de faire varier ce paramètre pour préciser le comportement viscoélastique de ce type de produit.

**Tableau III.15.** : Composition physico-chimique d'hydrolysats protéique atomisé après un traitement enzymatique (Neutrase<sup>®</sup> 0,5L ; E / S = 5% ; 30 mn ; S = 7,5% ; 55°C), suivi d'un traitement thermique (1h à 95°C).

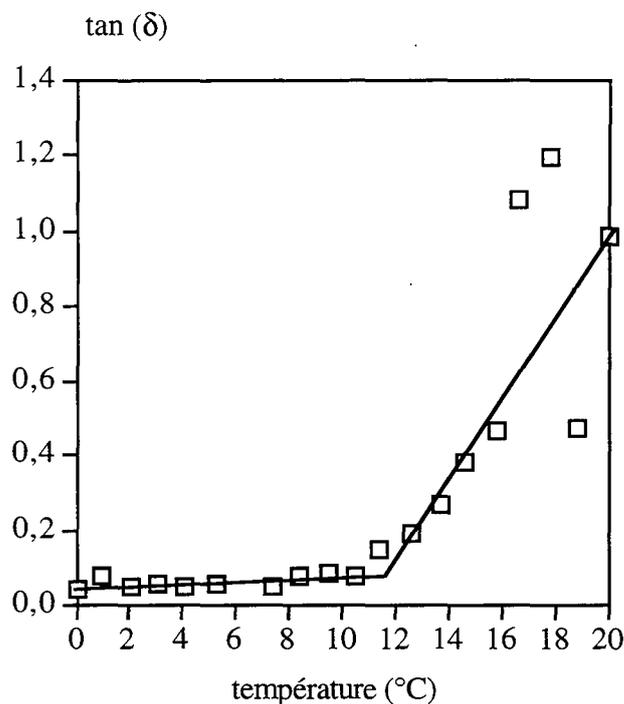
humidité (%)	4,80± 0,42	cendre (%)	7,10 ± 0,05
matière grasse (%)	0,35 ± 0,08	NT (%)	12,56 ±0,15

**Tableau III.16.** : Mesure de la fermeté à 4°C d'un gel protéique de gélatine et d'hydrolysats protéique (Neutrase<sup>®</sup> 0,5L ; E / S = 5% ; 30 mn ; S = 7,5% ; 55°C ; Traitement thermique = 1h à 95°C) en fonction de la concentration en azote. (Conditions expérimentales : Machine de compression uni axiale INSTRON ; vitesse de la traverse : 5 mm / mn ; diamètre de la sonde : 8 mm). Les résultats représentent la mesure moyenne sur 3 échantillons différents, obtenue au point de rupture du gel.

NT (%)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Fermeté (N) d'une solution de gélatine	0,08 ±0,01	0,50 ±0,04	1,11 ±0,10	1,93 ±0,07	3,05 ±0,15
Fermeté (N) d'un hydrolysats protéique (atomisé)	-	0,15 ±0,01	0,35 ±0,08	0,61 ±0,05	1,10 ±0,10



**Figure III.27.** : Evolution du module élastique (G') et du module visqueux (G'') d'un hydrolysats protéique de co-produit de veau en fonction de la température.



**Figure III.28.** : Caractérisation du comportement viscoélastique d'un hydrolysats protéique de co-produit de veau en fonction de la température.

### **IV.3. Qualité sanitaire des co-produits de veau au cours des procédés technologiques**

Malgré les nombreuses manipulations du substrat protéique (désossage, concassage...) pouvant entraîner une contamination microbienne, les différents traitements thermiques avant extraction (rôtissage, solubilisation, dégraissage), et après extraction enzymatique (inactivation de l'enzyme, solubilisation du tissu conjonctif) font que les hydrolysats protéiques présentent une qualité microbiologique conforme à la législation. Les résultats d'analyses effectuées immédiatement au laboratoire de l'usine, sur des prélèvements de substrat protéique avant et pendant l'extraction, sont donnés à titre d'exemple au tableau III.17.

**Tableau III.17.** : Détermination de la qualité microbiologique du substrat concassé à 4°C (co-produits d'abattage : colonne vertébrale de veau) et du mélange réactionnel pendant l'extraction enzymatique.

Produits	A	B	C	TE 15	TE 30	TE 45	TE 60	TT 60
Flore totale 30°C - par gramme	2700000	145000	360	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Bactérie lactiques 25°C - par gramme	2400	1580	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
A.S.R. 46°C - par gramme	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Spore d'A.S.R. par gramme	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Coliformes totaux 30°C - par gramme	430	130	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Coliformes fécaux 44°C - par gramme	100	10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i> 37°C - par gramme	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Salmonelles dans 25 grammes	absence	absence	absence	absence	absence	absence	absence	absence
Entérobactéries 37°C - par gramme	40	20	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Pseudomonas 25°C - par gramme	12450000	1220000	70	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

A = broyat d'os et de viande (colonnes vertébrales de veau) à 4°C.

B = broyat d'os et de viande + eau (50°C).

C = mélange réactionnel ayant subi un traitement thermique (85°C, 10 mn) + addition de la solution enzymatique (temps initial).

TE 15 = après 15 mn de traitement enzymatique du mélange réactionnel

TE 30 = après 30 mn ; TE 45 = après 45 mn ; TE 60 = après 60 mn

TT = traitement thermique du mélange réactionnel pour dénaturer les protéases et solubiliser les tissus conjonctifs résiduels (60 mn).

## V. LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES HYDROLYSATS PROTEIQUES

La valeur nutritionnelle des hydrolysats obtenus à l'échelle pilote a été déterminée par des méthodes animalières (CEP, CEPN, DA, DR), mixtes (aminogrammes, score chimique, index Di-sco) et enzymatiques (méthode du pH-stat, cellule de dialyse).

Dans le cadre d'un contrôle de routine, il n'est pas nécessaire de faire les tests de digestibilité, les valeurs pour les sources protéiques les plus courantes pouvant être trouvées dans la littérature. Cependant, dans le cadre d'un produit nouveau ou ayant subi un quelconque traitement au cours du procédé d'obtention, il est indispensable d'avoir recours aux mesures de digestibilité réelle chez le rat (Dillon, 1992).

### V.1. Détermination de l'indice chimique : aminogrammes et acides aminés essentiels de l'hydrolysat protéique

Les compositions en acides aminés du substrat protéique (co-produits de veau) et d'un hydrolysat à caractère gélifiant sont présentés dans le tableau III.18., en même temps que les aminogrammes de différentes sources protéiques. Il est important de noter la forte proportion d'acide glutamique, de glycine, de proline et d'hydroxyproline, acides aminés très largement rencontrés dans la composition du collagène. Il faut noter par ailleurs la richesse en thréonine, en cystéine et en arginine des produits.

La teneur en acides aminés essentiels de l'hydrolysat obtenu (Tableau III.19.) permet de déterminer son score chimique. L'indice chimique ou score chimique est calculé à partir des 9 acides aminés essentiels (enfant de 2 - 5 ans : voir Tableau III.19.). Dans le cas de la gélatine, les acides aminés limitants sont la méthionine et la cystéine. Compte tenu du profil-type des besoins de l'enfant d'âge préscolaire (exprimé en mg par g de protéine), l'index chimique fournit une valeur de 33%. L'hydrolysat protéique de veau présente un profil dont l'acide aminé limitant est l'isoleucine. L'index chimique (13,1 / 28) donne une valeur de 46,8% comparativement à la caséine (protéine de référence), dont les acides aminés limitants sont la méthionine et la cystéine avec un score de 1,26% (27,9+3,6 / 25).

**Tableau III.18.** : Composition en acides aminés (g d'acide aminé pour 100 g de protéines), contenu en protéines et en collagène de différents co-produits d'abattage.

Acides aminés	co-produit de veau (colonne vertébrale)	Hydrolysat obtenu à l'échelle pilote	Gélatine Eastoe et Leach 1977	farine de viande et d'os Zarkadas et al., 1995	Tendon de boeuf Laser-Retersward, 1985	Caséine Eggum, 1989
Acide aspartique	6,52	6,41	6,60	5,31	6,10	7,13
Thréonine	3,42	3,20	2,27	1,99	2,10	4,66
Sérine	3,58	3,36	4,15	2,68	3,50	6,03
Acide glutamique	11,52	11,13	11,40	9,47	10,20	22,04
Proline	8,28	6,70	16,50	9,78	12,50	11,57
Glycine	14,16	11,07	27,60	17,01	21,70	1,97
Alanine	7,44	6,65	11,30	7,03	9,30	3,07
Cystéine	1,21	0,40	0,00	0,22	trace	0,36
Valine	3,18	2,52	2,63	2,71	2,60	6,74
Méthionine	0,55	0,47	0,82	1,27	0,82	2,79
Isoleucine	2,10	1,31	1,70	1,55	1,70	5,41
Leucine	5,24	4,93	3,36	3,48	3,60	9,51
Tyrosine	1,78	1,53	0,23	1,09	0,81	5,82
Phénylalanine	2,81	2,36	2,33	2,19	2,10	5,24
Histidine	3,01	1,77	0,76	1,02	0,77	2,92
Lysine	6,93	3,88	5,74	3,48	3,20	8,12
Arginine	6,96	5,18	8,90	6,25	8,50	3,75
Tryptophane	nm*	0,05	0,00	0,14	0,07	1,68
Hydroxyproline	6,98	6,21	14,40	8,19	13,20	-
tissu conjonctif**	48,91	43,51	100,9	57,39	92,5	-

nm\* : non mesuré ; \*\*quantité de tissu conjonctif d'après Laser-Reutersward (1985).

**Tableau III.19. :** Acides aminés essentiels (AAE) et scores chimiques de différentes sources protéiques issues de co-produits d'abattage. Comparaison avec le profil d'AAE proposé pour les besoins nutritionnels Humains.

acides aminés essentiels	enfant en age pré-scolaire (2 - 5 ans) (a)	adultes (a)	farine de viande et d'os Zarkadas et al., 1995	Farine de viande Hegedus et al., 1990	Gélatine Eastoe and Leach, 1977	Co-produits de veau (colonne vertébrale de veau)	Hydrolysats à partir de co-produit de veau
Milligrammes d'acide aminé par gramme de protéines							
Histidine	19	16	12,1	-	7,6	30,1	17,7
Isoleucine	28	13	18,2	15	17,0	21,0	13,1
Leucine	66	19	40,9	35	33,6	52,4	49,3
Lysine	58	16	41,0	42	57,4	69,3	38,8
Méthionine et Cystine	25	17	17,5	8	8,2	17,6	12,7
Phénylalanine et Tyrosine	63	19	38,7	22	25,6	45,9	38,9
Thréonine	34	9	23,4	20	22,7	34,2	32,0
Tryptophane	11	5	1,7	2	0,0	nm*	nm*
Valine	35	13	31,9	29	26,3	31,8	25,2
total incluant His	339	127	225,4	-	198,4	302,3	227,7
moins His	320	111	213,3	173	190,8	272,2	210,0

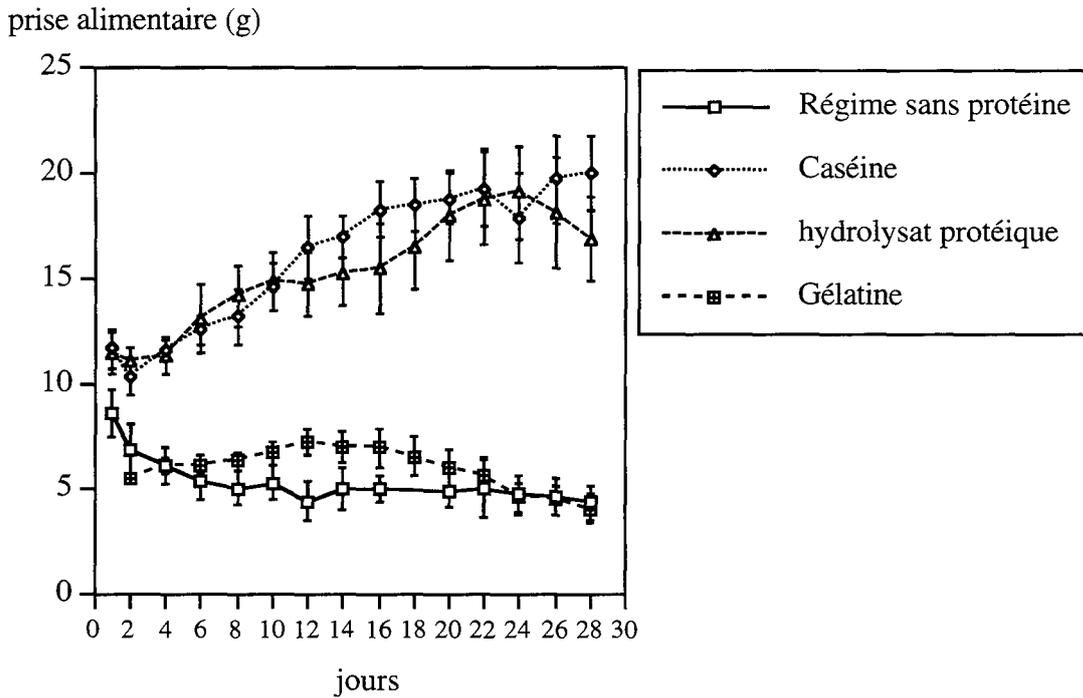
(a) Profil suggéré par la FAO / WHO ( in : Madl, 1993).  
nm\* : non mesuré.

## V.2. Les méthodes animalières

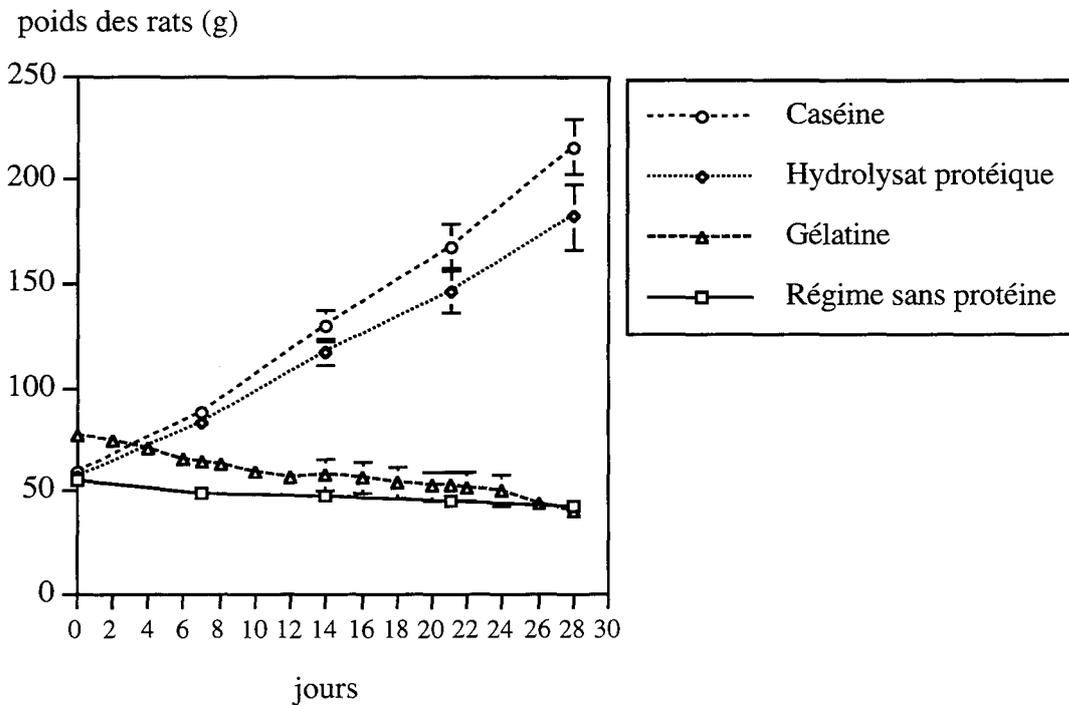
### V.2.1. Evolution du poids des rats en fonction du régime protéique

La valeur nutritionnelle d'une protéine alimentaire peut être déterminée par des méthodes animalières, coûteuses et peu rapides. La plus utilisée et la plus simple reste la méthode du Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) qui consiste à enregistrer le gain de poids d'un lot de rats sur 28 jours. La figure III.29 montre l'évolution de la prise alimentaire de différents groupes de rats sur 28 jours en fonction de la nature protéique de la source azotée. L'analyse du graphique montre que le régime à base de gélatine est sensiblement identique au régime sans protéine, les animaux ingérant la quantité minimale nécessaire au maintien des fonctions vitales. Concernant l'hydrolysats protéique de co-produit de veau dont la concentration en gélatine avoisine les 45%, la prise alimentaire est légèrement inférieure à la protéine de référence qui est la caséine.

L'évolution de la prise de poids des rats est pratiquement similaire à celle de la prise alimentaire (Figure III.30.). Nous pouvons constater une perte de poids des animaux sur 28 jours avec le régime protéique à base de gélatine.



**Figure III.29** : Evolution de la prise alimentaire de groupes de 10 rats (souche Wistar) sur une période de 28 jours pour déterminer le coefficient d'efficacité protéique (CEP). Les valeurs exprimées représentent la moyenne sur dix mesures indépendantes.



**Figure III.30** : Evolution de la prise de poids de groupes de 10 rats (souche Wistar) sur une période de 28 jours pour déterminer le coefficient d'efficacité protéique (CEP). Les valeurs exprimées représentent la moyenne sur dix mesures indépendantes.

La détermination du coefficient d'efficacité protéique, du coefficient d'efficacité protéique net (qui prend en compte la capacité de la protéine à satisfaire le besoin d'entretien), de la digestibilité apparente et réelle, nécessite de connaître l'azote ingéré et l'azote fécal pour chaque lot de rat en fonction du régime alimentaire (Tableau III.20.)

**Tableau III.20.** : Détermination des mesures azotées moyennes permettant de déterminer les paramètres nutritionnels dans les méthodes dites "biologiques" (CEP ; CEPN ; DA ; DR).

	protéines ingérées (g/j) *	Gain de poids des rats (g/j) *	azote ingéré (g/j) **	azote fécal (g/j) **
Caséine	1,61±0,09	5,59±0,45	0,152±0,02	0,03±0,01
Gélatine	0,32±0,03	- 0,33±0,06	0,03±0,01	0,02±0,00
Hydrolysats protéique	1,52±0,13	4,48±0,65	0,149±0,02	0,06±0,02

\* durant 28 jours ; \*\* entre le 18<sup>ème</sup> et le 26<sup>ème</sup> jour. La perte de poids du groupe de 10 rats nourri avec un régime sans protéine sur 28 jours est de - 0,456 g/j.

### V.2.2. Valeur des différents coefficients caractérisant la qualité nutritionnelle de l'hydrolysats protéique obtenu à partir de co-produits de veau

En comparaison avec la protéine de référence qu'est la caséine, l'hydrolysats protéique obtenu par le procédé technologique de valorisation de co-produit possède une bonne digestibilité (Tableau III.21.), supérieure à celle de la gélatine.

**Tableau III.21** : Evaluation nutritionnelle (voie animale : groupe de dix rats de souche Wistar) d'un hydrolysats protéique obtenu à partir de co-produits de veau (colonnes vertébrales), comparée à la caséine et à la gélatine (protéines de référence).

source protéique	CEP (%)	CEP corrigé (%)	CEPN	DA (%)	DA corrigée (%)	DR (%)	DR corrigée (%)
Caséine	3,47 ±0,19	2.5 ±0.14	3.19	79.52 ±3.54	100.0 ±4.5	81.78 ±3.4	100.1 ±4.1
Gélatine	-1,05 ±0,28	<b>-0,97</b> ±0,20	<b>-2,46</b>	46,87 ±6,58	58,83 ±10	54,91 ±6,10	67,31 ±7,5
Hydrolysats protéique de veau	2.95 ±0.22	2.10 ±0.16	2.65	63.40 ±8.3	79.73 ±10.5	65.7 ±8.5	80.34 ±10.4

CEP : coefficient d'efficacité protéique ; CEP corrigé : coefficient d'efficacité protéique corrigé par rapport à la protéine de référence (caséine) ; DA : digestibilité apparente ; DR : digestibilité réelle.

Les méthodes classiques d'évaluation de la qualité nutritionnelle d'un produit sont basées sur des études métaboliques faites sur le rat. Cette approche n'est pas entièrement satisfaisante en raison du nombre de procédures différentes et de la reproductibilité des mesures (Cf. chapitre "Synthèse bibliographique"). Une nouvelle méthode proposée par un Comité Mixte d'Experts F A O / O M S, consiste à prendre en compte à la fois la digestibilité réelle et son index chimique.

Dans le cas de la gélatine, il est maintenant possible de déterminer son index DI-SCO. Compte tenu du profil-type des besoins de l'enfant d'âge préscolaire (exprimé en mg par g de protéine), l'index chimique fournit une valeur de 33%, soit un index DI-SCO de 18,15% (en tenant compte de la digestibilité réelle mesurée *in vivo*).

L'hydrolysat protéique de veau présente un index chimique de 46,8% soit un index DI-SCO de 37,5%, deux fois supérieur à celui de la gélatine mais très inférieur à celui de la caséine (protéine de référence), dont l'index DI-SCO est de 103%. L'une des raisons qui permettent d'expliquer ces performances réside dans le nombre et la sévérité des différents traitements technologiques subis par l'hydrolysat finalement ingéré.

L'utilisation de cet index permet de déterminer la quantité de protéines (ou plus précisément d'azote total) utilisable dans une ration alimentaire. Il suffit de multiplier la quantité de protéines (g) par cet index pour connaître le taux protéique utilisable (g). Cette méthode est rapide, standardisée, peu coûteuse et fiable, contrairement à l'évaluation d'un CEP demandant un investissement sur 6 semaines.

### **V.3. Les méthodes enzymatiques**

Contrairement à la voie animalière, l'utilisation de méthodes enzymatiques dites *in vitro* permet d'estimer ces propriétés plus rapidement, et à moindre coût.

Nous avons principalement utilisé la méthode du pH-stat (Pederson et Eggum, 1983), en utilisant le "cocktail enzymatique" mis au point par Hsu *et al.* (1977) et repris par McDonough *et al.* (1990) dans une étude inter laboratoire. Les quatre figures ci-dessous montrent l'importance du contrôle du pH dans ce type de réaction (Figure III.31) (Cf. chapitre "Synthèse bibliographique"). La figure III.32. illustre l'influence du volume d'enzyme injecté pendant la réaction, qui peut entraîner des biais dans la comparaison des résultats inter-laboratoires. La composition du "cocktail enzymatique" détermine l'efficacité de digestion du substrat au cours du temps (Figure III.33.).

Le substrat de référence utilisé pour les expérimentations représentées sur les 4 figures ci-dessous est la caséine.

La détermination par la technique de dialyse développée par Savoie et Gauthier (1986) (Figure III.34) montre que l'hydrolysat protéique de veau est plus rapidement assimilable

que la caséine, au cours des 4 premières heures. La valeur de digestibilité trouvée est supérieure à celle de la gélatine. Les résultats des méthodes *in vitro* sont résumés dans le tableau III.22.

Les cinétiques de l'hydrolyse enzymatique appliquée à l'hydrolysats protéique obtenu à partir de co-produits de veau, à la caséine et à la gélatine sont représentées à la figure III.35. La caséine, protéine de référence est rapidement hydrolysée malgré sa structure native, de même que la gélatine. Le plateau obtenu à partir de 4 mn pour la gélatine montre que les liaisons peptidiques susceptibles de subir un clivage par les enzymes sont rapidement hydrolysées, alors que la gélatine résiste à la protéolyse de par sa structure primaire.

L'évolution de la cinétique d'hydrolyse du produit à caractère gélifiant, obtenu à partir de co-produits de veau, montre que les chaînes polypeptidiques, comprises entre 30000 et 10000 daltons (Figure III.26) possèdent encore des liaisons susceptibles d'être clivées, par ce type d'enzyme.

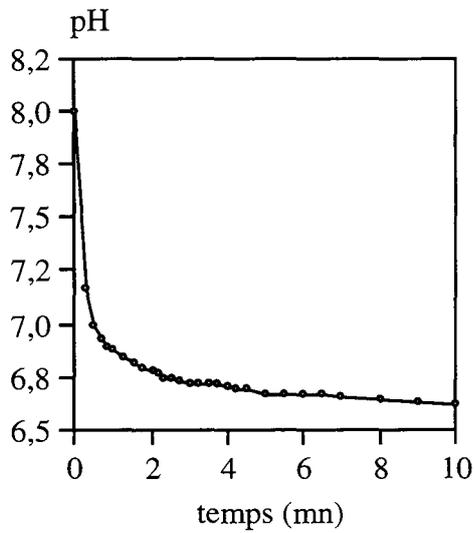
**Tableau III.22 :** Estimation de la digestibilité de la caséine, de la gélatine et d'un hydrolysats protéique de co-produit de veau par deux méthodes *in vitro* (pH-stat et cellule de dialyse).

produits	méthode du pH-stat			cellule de dialyse
	NaOH (ml) 1 mn	NaOH (ml) 5 mn	NaOH (ml) 10 mn	N dialysé (%)
caséine	1,64±0,08	2,55±0,1 2,72 <sup>a</sup>	2,85±0,1	48,0±0,1 44,8±2,3 <sup>c</sup>
gélatine	0,85±0,1	1,22±0,02	1,35±0,03	33,87±4,07
hydrolysats protéique de co-produit de veau	0,70±0,1	1,41±0,1	1,92±0,1	26,43±0,4

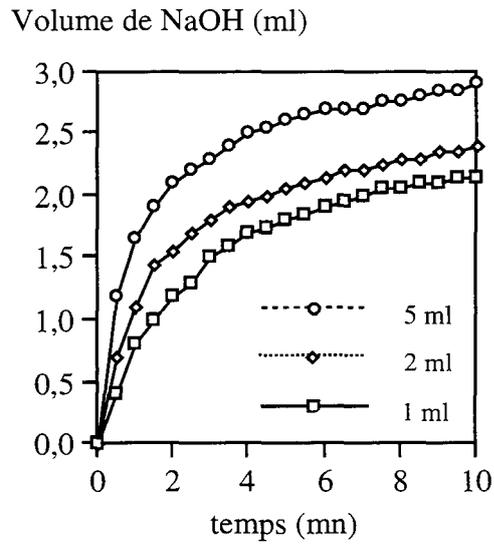
moyenne ± écart type effectuée à partir de trois essais

a) McDonough *et al.* (1990) : volume moyen de NaOH (ml) à 5 mn.

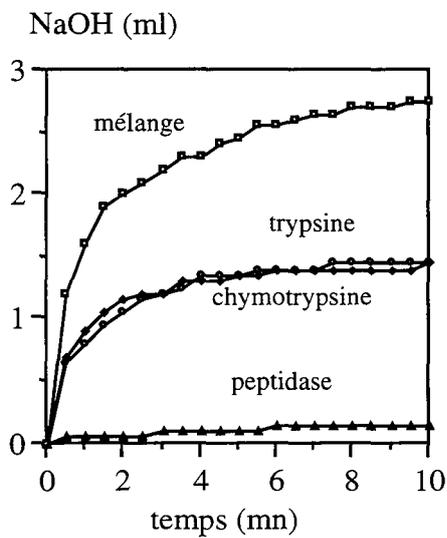
c) Savoie *et al.* (1989)



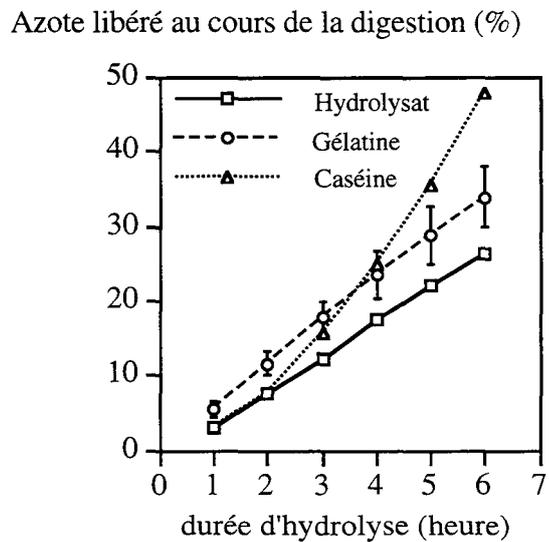
**Figure III.31 :** Evolution du pH au cours de la réaction d'hydrolyse.



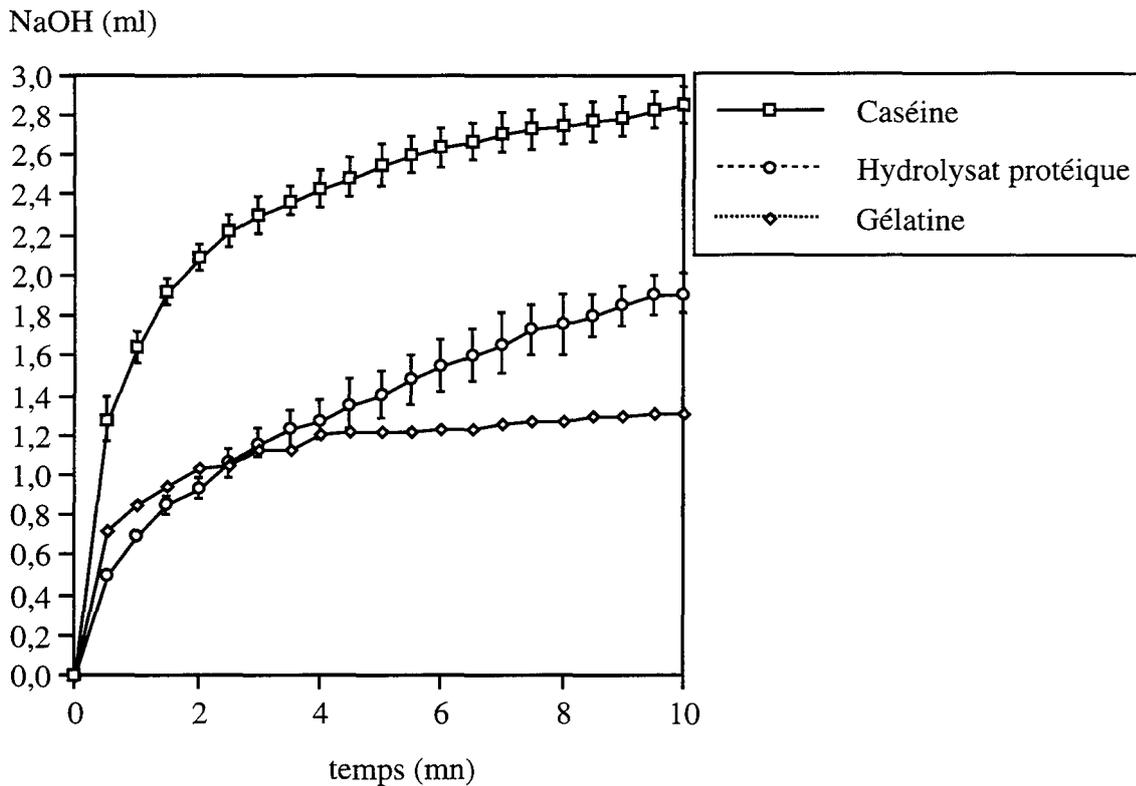
**Figure III.32 :** Influence de la quantité d'enzymes utilisée au cours de la réaction.



**Figure III.33 :** Influence de la nature de la protéase et de la combinaison du mélange enzymatique sur la consommation de base.



**Figure III.34 :** Cinétique de libération de l'azote en utilisant une cellule de dialyse.

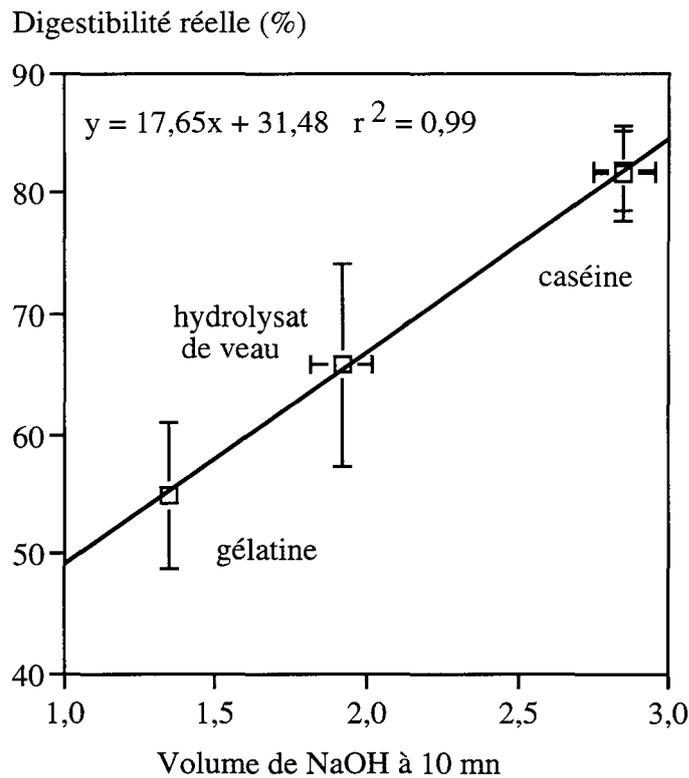


**Figure III.35.** : Cinétiques d'hydrolyse d'un hydrolysats de co-produit de veau, de la caséine et de la gélatine par un "cocktail" enzymatique contenant de la trypsine (T-7418 Sigma), de la chymotrypsine (C-4129, Sigma) et une peptidase (P 7500, Sigma), préparé suivant la méthode de McDonough *et al.* (1990): 23100 unités de trypsine, 186 unités de chymotrypsine, 0,052 unité de peptidase.

Une relation entre la digestibilité réelle (mesurée sur animal) et la méthode enzymatique du pH-stat (volume de base ajouté au bout de 10 mn d'hydrolyse) montre une bonne corrélation ( $R^2 = 0,99$ ) pour des sources protéiques animales (Figure III.36). Pour d'autres sources protéiques, des différences notables sont observées par Pedersen et Eggum (1983) :

Protéines animales (n= 10)	$r = 0,98$	digestibilité = $74,33 + 53,21 \times B_{10}$
Protéines végétales (n = 13)	$r = 0,95$	digestibilité = $78,61 + 40,29 \times B_{10}$

Il semble préférable de déterminer par voie animalière la digestibilité réelle des produits, notamment pour des hydrolysats au lieu d'utiliser l'équation générale obtenue par Pedersen et Eggum (1983) :  
 digestibilité =  $76,14 + 47,77 \times B_{10}$  pour toutes sources protéiques confondues (n = 30 ;  
 $r = 0,96$ ) reprise comme référence dans une étude inter-laboratoires (McDonough *et al.*, 1990). En effet, quelle que soit la source protéique étudiée, la digestibilité minimale serait de 76%, ce qui n'est pas le cas pour la base protéique à caractère gélifiant.



**Figure III.36.** : Corrélation entre la digestibilité réelle mesurée *in vivo* et la méthode enzymatique pour un hydrolysat obtenu à partir de co-produit de veau (atomisé), ayant des propriétés gélifiantes (conditions opératoires : Neutrase® 0,5L ; 55°C ; S = 7,5% ; E / S = 5% ; 30 mn d'hydrolyse ; traitement thermique 60 mn à 95°C).

## VI. ANALYSE ECONOMIQUE DU PROCEDE D'EXTRACTION PROTEIQUE PAR VOIE ENZYMATIQUE

Nous nous proposons de jeter les bases d'une étude économique sur l'utilisation d'un procédé discontinu de valorisation de co-produits d'abattage par voie enzymatique.

L'évaluation de la rentabilité du procédé doit tenir compte de différents paramètres, les uns se rapportant aux coûts d'obtention des hydrolysats, et les autres prenant en compte le niveau de valorisation que l'on peut espérer en fonction de la qualité nutritionnelle, fonctionnelle et d'usage des produits obtenus.

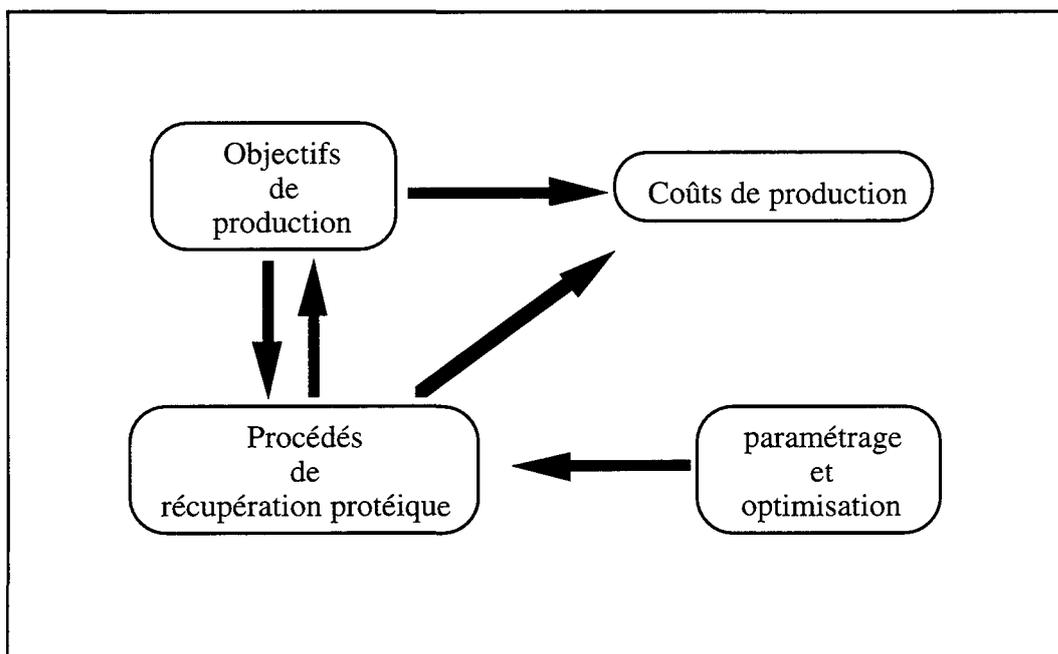
Dans un premier temps, ces paramètres seront évalués dans l'hypothèse simplificatrice d'une production et d'une valorisation optimale des bases protéiques au sein de l'entreprise. Cette analyse a l'intérêt double de permettre l'utilisation du matériel existant et du point de vue valorisation, de travailler sur des produits transformés dont les tonnages et la capacité d'incorporation en hydrolysats ou bouillons sont déjà connus. Le procédé d'extraction enzymatique pourrait dans cette hypothèse directement remplacer la

méthode classique de fabrication des bouillons, particulièrement longue, coûteuse en énergie et temps de travail, tout en améliorant les propriétés et la teneur globale en nutriments azotés.

Dans un deuxième temps une étude de faisabilité technique, financière et calendaire du procédé sera abordée en évaluant les risques et les incertitudes. Toutefois, cette étude ne prétend pas fournir tous les éléments nécessaires à une analyse économique détaillée du procédé. Nous ne nous intéresserons qu'à l'analyse des coûts de production, sans dresser de comptes d'exploitation ni de plan de financement prévisionnel, autant d'éléments qui seraient nécessaires si le procédé devait faire l'objet d'un investissement séparé devant prouver sa propre rentabilité financière.

### VI.1. Analyse des coûts de production

Au stade initial il est nécessaire d'effectuer une analyse de la situation actuelle (le marché potentiel de ces co-produits ; les besoins de l'entreprise ; les qualités des produits obtenus ; les coûts de production ; les contraintes connues (norme, législation,...), représentée sur la figure ci-dessous (Figure III.37.).



**Figure III.37.** : Schématisation des facteurs influençant l'évaluation des coûts de production d'une base protéique.

Le procédé évalué doit prendre en compte toutes les étapes successives conduisant de l'os brut au produit valorisable : concassage, extraction protéique, filtration, clarification et réfrigération. La capacité maximale de production a été déterminée en fonction des

contraintes technologiques (volume du réacteur déjà existant), et des caractéristiques et spécificités propres des hydrolysats à préparer (aromatisants, gélifiants ...).

## VI.2. Identification et analyse des coûts

Les coûts de production d'un hydrolysate protéique sont évalués en fonction du volume d'activité de l'entreprise, divisés en coûts variables et coûts fixes, et exprimés en francs par kg d'hydrolysate obtenu. Les coûts variables comprennent les matières premières et les matériaux consommés au cours du procédé (solutions enzymatiques, produits de nettoyage, produits chimiques) ainsi que les utilités (eau, électricité, vapeur). Les coûts fixes sont représentés principalement par l'amortissement, l'administration, les taxes, la main-d'oeuvre indirecte, les assurances ...

Le coût total (CT) qui doit être pris en compte dans l'étude économique est représenté par la somme des différents coûts définis ci-dessous :  $CT = CI + C_{md} + C_m + C_d$

formule dans laquelle :

- Le coût du montant de l'investissement (CI) comprend les investissements intermédiaires prévisibles (remplacement normal de certains éléments) ou imprévisibles.

- Le coût de la conduite des installations et de la maintenance ( $C_m$ ) consiste essentiellement en un contrôle du bon état des différents éléments de l'installation, du fonctionnement des organes de sécurité, et au remplacement des pièces défectueuses. Le coût de ces opérations est difficile à chiffrer et on l'estimera par rapport à l'investissement, soit 1 à 2% de l'investissement initial I (Monchy, 1991).

- Le coût effectif de la main d'oeuvre ( $C_{md}$ ) : en France, la durée annuelle théorique de travail est de  $(52 - (5 + 1,5))$  semaines de 39 heures, soit 1775 heures par an, soit encore 227 jours d'activité sur 365. La durée annuelle de travail effectif est une donnée très variable en fonction des secteurs d'activité prenant en compte diverses minorations (jours de congé supplémentaires, absence autorisée, pauses journalières ...) et dépend des conventions collectives. Dans le secteur, la durée annuelle de travail est proche de 1560 heures.

Après avoir estimé la durée du travail, il faut prendre en compte le coût horaire effectif de la main d'oeuvre utilisée :

$$\text{Coût horaire} = \frac{\text{salaire} + \text{charges sociales} + \text{coût indirects}}{\text{nombre d'heures de travail effectif}} \quad \text{d'après Marty (1991).}$$

L'évaluation du coût horaire du poste varie avec la nature des équipements utilisés, et de la qualification de l'agent de conduite. Les coûts indirects de main d'oeuvre sont représentés par la formation continue, le transport, les comités divers...

- Le coût des divers ( $C_d$ ) correspond aux frais d'administration, taxes, assurances. Il peut être estimé par rapport à l'investissement initial.

### VI.2.1. Evaluation du coût de production d'hydrolysats protéiques à partir de co-produit d'abattage en réacteur enzymatique discontinu

Nous avons déterminé dans un premier temps les durées de chacune des opérations technologiques (concassage, réaction enzymatique, traitements thermiques...), à partir de la capacité maximale de production journalière, en tenant compte des contraintes et de l'utilisation potentielle des hydrolysats obtenus.

Dans une première approche, les coûts variables ont été évalués sur la base de l'utilisation de matériels déjà en place. Dans un deuxième temps, les investissements nécessaires et les coûts fixes relatifs à une installation indépendante incluant toutes les phases du procédé pourront être estimés en fonction de la capacité prévue en base protéique.

### VI.2.2. La capacité de production actuelle

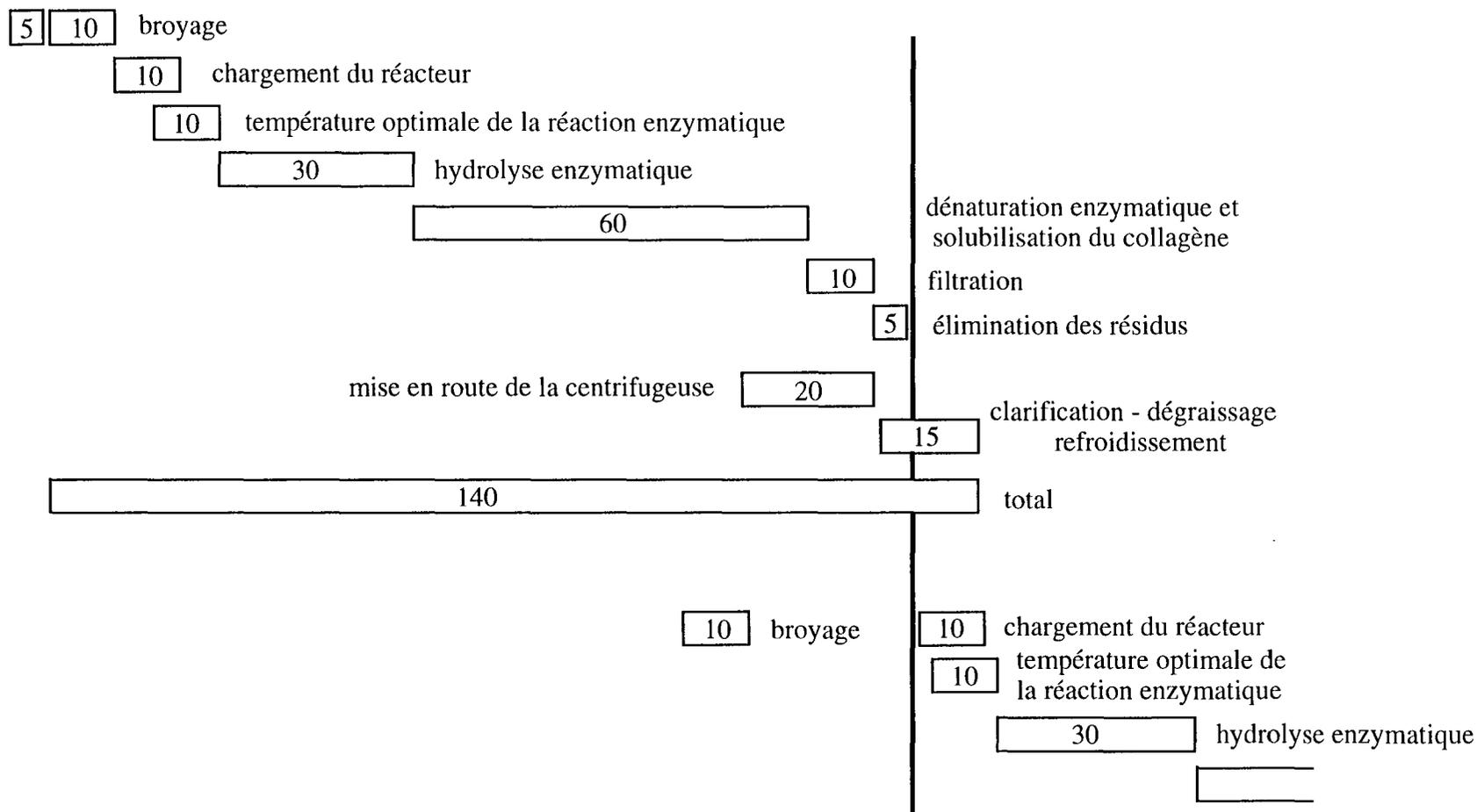
Il est possible d'effectuer 4 opérations d'extraction protéique par jour en utilisant le réacteur de 400 litres (capacité limitante). Une extraction protéique dure en moyenne 2 heures avec une durée de nettoyage intermédiaire de 5 mn par injection de vapeur, ce qui permet de traiter une quantité de 400 à 500 kg par jour, à raison de 8 heures de travail.

Le nombre d'opérations annoncé permet d'estimer le tonnage journalier d'hydrolysats protéiques obtenus sous forme liquide entre 800-1000 kg, ceci sur 333 jours par an.

Pour chacune des opérations (Tableau III.23.), l'estimation des coûts variables est effectuée à partir des temps de fonctionnement des différentes machines sur la base d'une production journalière dont les conditions opératoires sont résumées sur la Figure III. 38.

**Tableau III. 23.** : Conditions opératoires du procédé d'extraction protéique à partir de co-produits d'abattage pour la production de base protéique à caractère gélifiant.

opérations	conditions opératoires
concassage du substrat	température initiale -4°C ; température finale < 4°C
chargement du réacteur	100 kg de substrat ; 150 kg d'eau chaude concentration protéique 7,5%
agitation du réacteur chauffage par bain d'huile	60 tr / mn 55°C
hydrolyse enzymatique	agitation : 60 tr / mn ; température : 55°C durée : 30 mn ; E/S : 3% - 5%
dénaturation enzymatique	agitation : 60 tr / mn ; chauffage : injection de vapeur température : 90°C ; durée 20 mn
solubilisation collagène	agitation : 60 tr / mn ; chauffage : injection de vapeur température : 96°C ; durée : 60 mn
filtration	tamis inox : élimination des résidus
clarification - dégraissage	température entrée : 80°C ; température sortie : 15°C
nettoyage de l'installation	produit détergent ; NEP



**Figure III.38.** : Evaluation de la durée (mn) des différentes opérations du procédé en vue de l'obtention d'une base protéique possédant des propriétés gélifiantes

La contribution au coût de production des consommations en solutions enzymatiques, en utilités (électricité, vapeur, eau) sont résumées dans le tableau III.24.

L'électricité consommée par les moteurs est calculée sur la base d'une puissance consommée égale à 0,6 fois la puissance nominale.

**Tableau III.24.** : Evaluation d'un exemple des coûts variables (extraction et clarification) lié à la mise en oeuvre du procédé discontinu pour une production journalière d'un hydrolysats protéique de co-produits de veau à caractère gélifiant.

Utilités	prix	étape	opération	temps (h)	PN (kW/h)	PC = PN x 0,8	coût (Francs)
électricité	F / kW		broyage	0,66	22	11,7	3,74
		extraction	agitation	8	1,1	7	2,24
			chauffage	8	33 (50%)	132	42,24
		clarification	pompe	2	0,75	1,2	0,38
			centrifugeuse	2	4	6,4	2,05
vapeur				5		130	41,60
eau	14,8 F / m <sup>3</sup>	extraction	milieu réactionnel				
		clarification	centrifugation	utilisation de 1 m <sup>3</sup>			14,80
total =							0,13
F/kg hydrolysats liquide							

PN : puissance nominale des moteurs ; PC : puissance consommée

Matières premières et consommables		prix	concentration	quantité journalière utilisée	coût (Francs)
substrat	veau	0,31 F / kg	7,5%	400 kg	124,00
enzymes	Neutrase® 0,5L	50 F / kg	3%	2 kg	100,00
total =					0,28
F/kg hydrolysats liquide					

Le tableau ci-dessus donne une estimation des coûts variables pour la production d'hydrolysats protéique sous forme liquide, soit moins de 0,5 franc par kg d'hydrolysats (0,13 F d'utilités + 0,28 F de matières premières et de consommables).

## ***CONCLUSION GENERALE***

*Dépasser le but, c'est comme ne pas l'atteindre.*  
(Confucius)

L'objectif de cette étude était de développer, à partir de co-produits en sortie de salle de désossage, un procédé d'extraction protéique conduisant à des hydrolysats qui présentent les qualités requises pour une valorisation en alimentation humaine.

Ce travail, réalisé dans le cadre d'un contrat industriel avec la société "Les Salaisons d'Orly", a fait l'objet d'une étude préliminaire à l'échelle du laboratoire, étude portant sur le paramétrage et l'optimisation du procédé d'extraction protéique par voie enzymatique.

Cette étude par la méthode classique des facteurs influents (température, pH, concentration en enzymes, concentration en protéines, durée de la réaction) sur les rendements de récupération des différentes fractions et le degré d'hydrolyse, a fourni les informations nécessaires à la délimitation du domaine expérimental.

L'utilisation de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale a permis de quantifier l'influence de ces facteurs et de leurs interactions sur la réaction enzymatique en réacteur discontinu, par le développement d'un modèle empirique. Cette approche de la modélisation a été effectuée en raison de l'hétérogénéité du substrat, qui interdit l'approche cinétique enzymatique mécanistique.

A partir des résultats obtenus par une planification expérimentale développée à partir d'une matrice de Doehlert, les modèles quadratiques générés montrent que les facteurs les plus importants à maîtriser sont le rapport concentration en enzyme / concentration en protéines et la durée d'hydrolyse. Un phénomène d'inhibition de l'enzyme par le substrat est la cause d'une diminution du rendement en hydrolysats. L'influence du pH sur l'efficacité catalytique des protéases utilisées est apparue négligeable et en conséquence, le contrôle de ce facteur au niveau industriel n'est pas indispensable.

L'étude des surfaces de réponse permet, à partir des modèles polynomiaux, de visualiser et d'optimiser les niveaux des variables pour obtenir des hydrolysats ne présentant pas d'amertume tout en maximisant le rendement de récupération protéique.

Les résultats de cette première étude, réalisée à l'échelle du laboratoire, ont permis de déterminer les paramètres les plus influents sur les réponses : rendements protéiques et degré d'hydrolyse, afin de limiter le nombre de variables à contrôler lors du transfert au niveau industriel.

La mesure et le contrôle du degré d'hydrolyse (méthode du pH-stat, TNBS, méthode cryoscopique) ont conduit à la production de différents types d'hydrolysats afin de préciser l'influence du degré de dénaturation des protéines sur les propriétés d'hydratation et émulsifiantes. Dans des conditions de protéolyse ménagée, empêchant le développement de l'amertume (degré d'hydrolyse inférieur à 10%), les hydrolysats obtenus présentent un indice de solubilité minimum de 74% sur une large gamme de pH (2 - 9). Les propriétés émulsifiantes (capacité, activité et stabilité) mesurées avec le même appareillage, diminuent en fonction de la protéolyse.

Les limites du procédé d'hydrolyse, permettant de préserver les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques étant connues, le deuxième objectif de ce travail a été de produire à l'échelle pilote (réacteur discontinu de 400 litres) des hydrolysats présentant des caractéristiques différentes, selon la nature des besoins potentiels de l'entreprise. Ce transfert de la technologie sur pilote industriel a été mené de façon à déterminer les variables de conduite permettant la production d'hydrolysats à fonctionnalité spécifique.

Un des points forts de cette partie du travail a été la production d'un hydrolysats présentant des caractéristiques gélifiantes particulièrement recherchées dans l'entreprise. Le procédé technologique consiste à solubiliser les tissus protéiques musculaires adhérant aux os dans une première étape dont la durée est comprise entre 30 et 60 minutes (fonction de la concentration en enzymes et des propriétés recherchées). La deuxième étape, constituée par un traitement thermique (95°C ; 60 minutes) nécessaire entre autres à l'inactivation enzymatique, permet à son tour de solubiliser les tissus conjonctifs n'ayant pas été hydrolysés, préservant ainsi leur pouvoir gélifiant.

D'autre part, l'incorporation de tels produits en alimentation humaine nécessitait une évaluation de leur qualité nutritionnelle. En effet les différents traitements (mécanique, enzymatique, thermique) modifient la structure des protéines, induisant des effets pervers.

L'évaluation des propriétés nutritionnelles de ce type d'hydrolysats protéiques (sous forme atomisée) par méthode animalière montre que les produits présentent un coefficient d'efficacité protéique de 2,1% comparé à celui de la protéine de référence (caséine : 2,5%) et une digestibilité réelle de 80%.

La détermination des aminogrammes conduit à un indice chimique de 46,8%, prenant en compte les besoins en acides aminés des enfants en âge préscolaire, ce qui confère au produit

---

un index DI-SCO de 37,5%, comparé à celui de la gélatine (index DI-SCO = 18,1), ingrédient largement utilisé dans la formulation des produits carnés cuisinés.

L'évaluation de la digestibilité a d'autre part été réalisée par des méthodes enzymatiques (méthode du pH-stat et cellule de dialyse) qui permettent d'estimer la qualité nutritionnelle de ces produits en moins de 24 heures, contrairement aux méthodes *in vivo* nécessitant au minimum 28 jours.

Les perspectives d'utilisation de ces hydrolysats obtenus à partir de co-produits d'abattage en sortie de salle de désossage (dans notre travail : colonnes vertébrales de veau) sont nombreuses. L'incorporation de ces produits pour la fabrication de sauces ou jus permettrait de limiter l'addition de gélatine. Le paramétrage du procédé d'extraction protéique en vue d'une telle application nécessiterait des études plus fines de caractérisation du comportement viscoélastique, simplement évoquées au cours de ce travail. L'utilisation de ces produits dans les mêlées ou dans les sauces d'accompagnement des pièces de viande cuites sous vide, devrait améliorer la jutosité des produits. Par ailleurs, comme n'est utilisée aucune régulation du pH induisant la formation finale de chlorure de sodium dans les hydrolysats, une incorporation en qualité d'ingrédient de renforcement protéique en régimes spéciaux non salés ou en nutrition parentérale est particulièrement intéressante. Enfin des domaines d'applications spécifiques tels que la nutrition des sportifs, pourraient être intéressés par de tels produits, en raison de leurs propriétés élevées d'assimilation et de digestibilité.

***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abdel-Gawwad, A. I., Shalaby, M. T., Hussein, M. A., and Lasztity, R. 1990. Functional properties of protein isolate extracted from beef bones. *Periodica Polytechnica* 33 : 225 - 233.
- Adler-Nissen, J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.* 24 : 1090 - 1093.
- Adler-Nissen, J. 1977. Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochem.* 8 : 18 - 23,32.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *J. Food Chem.* 27 : 1256 - 1262.
- Adler-Nissen, J. 1982. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32 : 138 - 156.
- Adler-Nissen, J. 1984. Control of the proteolytic reaction and the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32 : 138 - 156.
- Adler-Nissen, J. 1986 (a). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers. London.
- Adler-Nissen, J. 1986 (b). Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures, chap. 4 : 97 - 122. In : *Protein tailoring for food and medical uses*. (Eds.) R. E. Feeney and J. R. Whitaker, USA, New York.
- Adler-Nissen, J. and Olsen, H. S. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. Chap.7 In : *Functionality and protein structure* , (Ed.) A. Pour-El ,pp. 125 - 146. American Chemical Society, Symposium Series 92, Washington, D.C.
- Adler-Nissen, J. and Olsen, H. S. 1982. Taste and taste evaluation of soy protein hydrolysates, pp. 149 - 169. In : *Chemistry of food and beverages: recent developments*. (Eds.) G., Charalambous and G. Inglett. Academic Press. New York.
- Adrian, J. et Potus, J. 1993. L'évaluation des propriétés nutritionnelles : une comparaison entre les méthodes *in vivo* et *in vitro*. pp. 49 - 57 AGORAL.
- AFNOR, 1990. Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Contrôle microbiologique. Recueil des normes françaises. DGCCRF.
- Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME). 1993. Evaluation du gisement des sous-produits et déchets des industries agricoles et alimentaires. Fascicule 1 : Filière viande : abattage, découpe, 5<sup>ème</sup> quartier, équarrissage.
- Anderson, B. A. 1988. Composition and nutritional value of edible meat by-products. pp. 15 - 42. In : *Edible meat by-products. Advances in Meat Research*. Vol. 5 (Eds.) A. M. Pearson and T. R. Dutson. Elsevier applied science.

- Andrews, A. T. 1986. Enzymic modification of dairy and other food proteins. In : *Chemical aspects of food enzymes*. 63 : 230 - 258. Royal Soc. Chem., London.
- Anonyme. 1993. Food Engineering Int'L.
- Anonyme. 1993. Ingredients : reducing salt in meat products. Food Engineering Int'L 17 - 18.
- Anonyme. 1994. Focus on enzymes. IFI 4 : 46 -51.
- Anonyme. 1994. Valorisation des déchets agro-alimentaires. Déchets : une ressource de la filière viande. Process 50 n° 1090.
- Anson, M. L. 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22 : 79 - 89.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis*, 14th. ed. Association of Official Analytical Chemists Arlington, VA.
- Arai, S. and Watanabe, M. 1985. An enzymatically modified protein as a new surfactant and its function to interact with water and oil in an emulsion system. pp. 49 - 64. In : *Properties of Water in Foods in relation to Quality and Stability*. (Eds.) D. Simatos and J.L. Multon. Martinus Nijhoff Publishers.
- Archer, M. C., Ragnarsson, J. O., Tannenbaum, S. R., and Wang, D. I. C. 1973. Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: Process and kinetic considerations. Biotechnol. Bioengineering 15 : 181 - 196.
- Arêas, J. A. G., Alcocer, M. J. C. and Mota, E. M. A. 1993. Effect of organic solvent and the lipid content on functionality of bovine lung protein isolates. Food Chem. 48 : 285 - 290.
- Auvinen, J. and Oy, P. 1992. Globin. A new functional protein for the food industry. IFI 2 : 10 - 13.
- Babu, S. G., Rao, V. K. and Kowale, B. N. 1993. Recovery of proteins from ovine lungs and rumen for their incorporation in meat patties. J. Food Sci. Technol. 30 : 176 - 179.
- Becher, P. 1965. *Emulsions: Theory and Practice*; Rheinhold. New York.
- Behnke, U., Ackermann, E., and Ruttloff, H. 1984. Preparation and utilization of enzymatic protein hydrolysates of bone scrap residues from mechanical fleshing assemblies. Part I: Studies on the enzymatic hydrolysis of beef bone scrap. Die Nahrung 28 : 397 - 407.
- Bender, A. E. and Doell, B. H. 1957. Biological evaluation of proteins : a new aspect. Br. J. Nutr. 11 : 140 - 148.
- Bender, A. E. and Miller, D. S. 1953. A new brief method of estimating net protein value. Biochem. J. 53 : 7 - 8.

- Bertrand-Hard, C., Chobert, J.-M., and Nicolas, M.-G. 1989. Influence of mixing apparatus on whey protein emulsifying activity measurement. *Sci. Aliments* 9 : 195 - 202.
- Blenford, D. E. 1993. The role of enzymes in the last decade of the 20th century. *IFI* 4 : 16 - 20.
- Block, R. J. and Mitchell, H. H. 1946. The correlation of the amino acid composition of proteins with their nutritive value. *Nutr. Abstr. Rev.* 16 : 249 - 278.
- Boisen, S. and Eggum, B. O. 1991. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutri. Res. Rev.* 4 : 141 - 162.
- Bonnet, M. et Kopp, J. 1984. Dosage du collagène dans les tissus conjonctifs, la viande et les produits carnés. *Cah. Techn. INRA.* 5 : 19 - 30.
- Bonnet, M. et Kopp, J. 1992. Préparation des échantillons pour le dosage et la caractérisation qualitative du collagène musculaire. *Viandes et Prod. Carnés* 3 : 87 - 91.
- Bonnet, M., et Kopp, J. 1986. Dosage du collagène dans les tissus conjonctifs la viande et les produits carnés. *Viande Prod. Carnés.* 7 : 263 - 266.
- Brady, A.-M., Ledward, D. A., and Lawrie, R. A. 1983. Protein hydrolysates from bovine lung. *Proceeding 29th Meeting of Meat. Research workers Parma.* 62 : 771 - 776.
- Britten, M. and Gaudin, V. 1994. Heat-treated whey protein hydrolysates: emulsifying and foaming properties. *Milchwissenschaft* 49 : 688 - 692.
- Britten, M. and Giroux, J. 1990. Use a flow cell apparatus to determine the emulsifying properties of casein. *J. Food Sci.* 55 : 1152 - 1156.
- Bumberger, E. and Belitz, H.-D. 1993. Bitter taste of enzymic hydrolysates of casein. I. Isolation, structural and sensorial analysis of peptides from tryptic hydrolysates of  $\beta$ -casein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 197 : 14 - 19.
- Camacho Rubio, F., Gonzalez Tello, P., Paez Duenas, M., Marquez Moreno, M. C., and Fernandez Cuadrado, V. 1993. Hydrolysis of casein by alcalase. *Revista Espanola de Ciencia y Tecnologia de Alimentos.* 33 : 59 - 70.
- Cameron, D. R., Weber, M. E., Idziak, E. S., Neufeld, R. J., and Cooper, D. G. 1991. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. *J. Food Chem.* 39 : 655 - 659.
- Camire, M. E., Ismail, S., Work, T. M., Bushway, A. A., and Halteman, W. A. 1994. Improvement in canned lowbush blueberry quality. *J. Food Sci.* 59 : 394 - 398, 415.
- Campos, M. A., and Arêas, J. A. G. 1993. Protein nutritional value of extrusion-cooking defatted lung flour. *Food Chem.* 47 : 61 - 66.
- Cante, C. J., Franzen, R. W., and Saleeb, F. Z. 1979. Proteins as emulsifiers: Methods for assessing the role. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 56 : 71A - 77A.

- Carbonneil, C. 1986. Etude de l'hydrolyse contrôlée de la gélatine par des protéases libres et immobilisées. Thèse INSA Toulouse.
- Carpenter, J. A. and Saffle, R. L. 1964. A simple method of estimating the emulsifying capacity of various sausage meats. *J. Food Sci.* 29 : 774-781.
- Chambers, J. and Rasmussen, P. B. 1988. Enzymic treatment of bones. In : *Food group meat panel symposium annual discussion meeting - New developments in meat.* *J. Sci. Food Agric.* 42 : 87 - 94.
- Chang, H. I., Catignani, G. L., and Swaisgood, H.E. 1992. Effects of sucrose, starch and oil on the in vitro determination of protein digestibility using the immobilized digestive enzyme assay (idea) system. *J. Food Biochem.* 16 : 133 - 140.
- Cheftel, C., Ahern, M., Wang, D. I. C., and Tannenbaum, S. R. 1971. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *J. Agric. Food Chem.* 19 : 155 - 161.
- Cheftel, J. C. 1977. Chemical and nutritional modifications of food proteins due to processing and storage. In : *Food Proteins.* (Eds.) J. R. Whitaker, and S. R. Tannenbaum. pp. 401 - 445. Westport, Connecticut : Avi Publishing Company Incorporated.
- Chen, H-C. 1994. Response-surface methodology for optimizing citric acid fermentation by *Aspergillus foetidus*. *Process Biochem.* 29 : 399 - 405.
- Cheruy, A. 1985. Méthodologie de la modélisation illustrée par une analyse critique de plusieurs modèles relatifs à un procédé de production d'antibiotique. *Bio-sci.* 4 : 93 -97.
- Chomarat, N., Robert, L., Seris, J. L., and Kern, P. 1994. Comparative efficiency of pepsin and proctase for the preparation of bovine skin gelatin. *Enzyme Microb. Technol.* 16 : 756 - 760.
- Clark, A. H. and Ross-Murphy, S. B. 1987. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. Chap. 3. In : *Advances in polymer science* 83. Springer-Verlag Heidelberg Berlin.
- Clegg, K. M. and McMillan, A. D. 1974. Dietary enzymatic hydrolysates of protein with reduced bitterness. *J. Food Technol.* 9 : 21 - 29.
- Cordle, C. T. 1994. Control of food allergies using protein hydrolysates. *Food Technol.* 48: 72 - 76.
- Courts, A. 1980. Properties and uses of gelatin. pp. 1 : 28. In : *Applied Protein Chemistry.* . (Ed.) R. A Grant, Applied Science Publishers LTD. London.

- Cowan, D. 1983. Proteins. Chap. 4 ,pp. 352 - 374. In : *Industrial Enzymology*. The application of enzymes in industry. (Eds.) T.Godfrey and J. Reichelt. The nature Press, New-York.
- Crenwelge, D. D., Dill, C. W., Tybor, P. T., and Landmann, W. A. 1974. A comparaison of the emulsification capacities of some protein concentrates. *J. Food Sci.* 39 : 175 - 177.
- Cun, C., Sergent, M., Lesgards, G., et Phan Tan Luu, R. 1991. Application de la méthodologie de la recherche expérimentale à la mise en évidence des interactions entre la pectine de pomme, les ions calcium et le cholestérol. *Analisis* 19 : 167 - 174.
- Cuq, J. L. et Lorient, D. 1992. Influence de traitements technologiques sur la valeur nutritionnelle des protéines alimentaires. pp. 93 - 155. In : *Les cahiers de L'ENSBANA n° 8*.
- Curt, C. 1994. Revue : méthodes d'évaluation de la stabilité des émulsions. *Sci. Aliment* 14 : 699 - 724.
- Cuthbertson, D. P., 1950. Amino-acid and protein hydrolysates in human and animal nutrition. *J. Food Agric.* 1 : 35 - 41.
- Dagorn-Scaviner, C. 1986. Etude des propriétés tensioactives des globulines du pois. Application aux isolats protéiques utilisés comme agents d'émulsification ou de moussage. Thèse, Univ. Nantes, 294 pp.
- Danilenko, A. N. and Braudo, E. E. 1992. Control of functional properties of protein preparations through their limited proteolysis. pp. 190 : 194. In : *Food Proteins. Structure and Functionality*. (Eds.) K. D. Schwenke and R. Mothes. New-York.
- Danzart, M. 1993. Une méthode d'optimisation multicritère. *AGORAL* : 87 - 95.
- Dave, R. I., Joshi, N. S., Patel, J. R., and Thakar, P. N. 1991. Protein hydrolysates - A review. *Indian J. Dairy Sci.* 44 : 557 - 564.
- Davidek, J. 1990. Proteins. pp. 1 - 57. In : *Developments in Food Science. Chemical changes during Food Processing*. (Eds.) J. Davidek, J. Velisek and J. Pokorny. Elsevier.
- Diermayr, P., and Dehne, L. 1990. Controlled enzymatic hydrolysis of proteins at low pH values. 1. Experiments with bovine serum albumin. *Lebensm. Unters. Forsch.* 190 : 516 - 520.
- Dill, C. W. and Landmann, W. A. 1988. Food grade proteins from edible blood pp. 127 - 143. In : *Edible meat by-products . Advances in Meat Research*. Vol. 5 (Eds.) A. M. Pearson and T. R. Dutson. Elsevier applied science.
- Dillon, J. C. 1991. Les méthodes d'évaluation de la valeur nutritive des protéines en alimentation humaine. Evolution des concepts et des méthodes. *Cah. Nutr. Diét.* 26 : 224 - 229.

- Dillon, J. C. 1992. Les méthodes d'évaluation de la valeur nutritive des protéines en alimentation humaine. Cah. Nutr. Diét. 27 : 54 - 58.
- Direction Générale de l'Alimentation (DGAL - Ministère de l'Agriculture), Service de la Qualité Alimentaire. 35,rue Saint Dominique 75007 Paris.
- Djujic, J., Djordjevic, V., and Mihajlovic, B. 1979. 25th European meeting of meat res. workers, Proc. III, II 4, 859. Budapest.
- Doehlert, D.H. 1970. Uniform shell designs. Appl. Statistics 19 : 231 - 239.
- Dondero, M. C., Robledo, E. R., Tarky, W. O., and Kaiser, S. L. 1987. Aprovechamiento de subproductos carnicos. II. Recuperacion y utilizacion de la proteina muscular adherida a huesos de vacuno. 12 : 29 - 35.
- Dransfield, E. and Etherington, D. 1981. Enzymes in the tenderisation of meat. Chap. 9. pp. 177 - 194. In : *Enzymes and Food Processing*. (Eds.) G. G. Birch and K. J. Parker. Applied Science Publishers.
- Duarte, F. J., Arroyo, O., Beristain, C. I., Argaiz, A., and Garcia, H. S. 1988. Enzymatic hydrolysis of whole bovine blood and its relationship to some colligative properties. J. Food Sci. 53 : 272 - 273.
- Ducastaing, A. et Adrian, J. 1990. Revue bibliographique. Les enzymes en technologie alimentaire. Sciences des aliments 10 : 231 - 254.
- Ducroo, P. 1992. Utilisation des enzymes en technologie alimentaire Chap. 21 : 463 - 480. In : *Additif et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires*. (Ed.) J. -L. Multon. 2<sup>ème</sup> édition Tec & Doc - Lavoisier.
- Duerr, P. E. and Earle, M. D. 1973. The utilisation of bones. Food Technol. in New Zealand. 6 : 28 - 31.
- Dumay, E. et Cheftel, J. C. 1986. Propriétés émulsifiantes de concentrés protéiques de lactosérum. Corrélations entre diverses méthodes d'évaluation. Sci. Aliments. 6 : 147 - 176.
- Eastoe, J. E. 1967. Treaties on collagen, Vol 1. Ed. Ramachandran, G. N. Academic Press. London.
- Edwards, J. H. and Shipe, W.F. 1978. Characterization of plastin reaction products formed by pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, and papain treatment of egg albumin hydrolysates. J. Food Sci. 43 : 1215 - 1218.
- Eggum, B. O. 1973. A study of certain factors influencing protein utilization in rats and pigs. Report of National Institute of Animal Science, Copenhagen. n°406. Copenhagen : National Institute of Animal Science.

- Eggum, B., O., Hansen, I., and Larsen, T. 1989. Protein quality and digestible energy of selected foods determined in balance trials with rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 39: 13 - 21.
- Eilert, S. J., Blackmer, D. S., Mandigo, R. W., and Calkins, C. R. 1993. Meat batters manufactured with modified beef connective tissue. *J. Food Sci.* 58 : 691 - 696.
- El, S. N. and Kavas, A. 1994. Protein digestibility - corrected amino acid score. Method for assessing protein quality or rainbow trout. W-1.18. 40th ICoMST. The Hague, Netherlands.
- Eriksen, S. 1989. Enzyme use in the food industry with potential applications to vegetable protein utilization in human foods. pp. 503 - 506. Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuff's (Singapore).
- Etherington, D. J. and Sims, T. J. 1981. Detection and estimation of collagen. *J. Sci. Food Agric.* 32 : 539 - 546.
- Fargin, E., Sergent, M., Mathieu, D., et Phan Tan Luu, R. 1985. Approche méthodologique de la recherche expérimentale. *Bio-Sci.* 4 : 77 -82.
- Feder, J., Keay, L., Garrett, L.R., Cirulis, N., Moseley, M.H., and Wildi, B.S. 1971. *Bacillus cereus* neutral protease. *Biochem. Biophysic. Acta* 251 : 74 - 78.
- Fédération Nationale des Exploitants d'Abattoirs et Prestataires de services (FNEAP) 1989. 91, av. de la République. 75540 Paris Cedex 11.
- Feneuille, D., Mathieu, D., et Phan-Tan-Luu, R. 1983. *Méthodologie de la Recherche Expérimentale*. Etude des surfaces de réponse. Laboratoire de prospective réactionnelle et d'analyse de l'information. Marseille Le Merlan 13311 Marseille cedex 14.
- Fenwick, F. M. 1991. Hydrolysed protein products as food ingredients. *Food Research Quaterly.* 51 : 126 - 128.
- Field, R. A. 1988. Mechanically separated meat, poultry and fish. pp. 83 - 119. In : *Edible meat by-products . Advances in Meat Research*. Vol. 5 (Eds.) A. M. Pearson and T. R. Dutson. Elsevier applied science.
- Fields, R. 1971. The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem. J.* 124 : 581 - 590.
- Fik, M. and Surowka, K. 1986. Preparation and properties of protein concentrate from broiler chicken heads. *J. Sci. Food Agric.* 37 : 445 - 454.
- Finley, J. W. 1989. Effects of processing on proteins : An Overview. In : *Protein quality and the effects of processing*. (Eds.) R. D. Phillips and J. W. Finley. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Fourman, P. et Royer, P. 1969. Calcium et tissu osseux (biologie et pathologie) Chap. I. Editions médicales Flammarion. Paris.
- Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.* 10 : 86 - 88.
- Frost, G. M. 1986. Commercial production of enzymes. Chap 3. In : *Developments in food proteins - 4.* (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science Publishers London.
- Frost, G. M. 1992. Applications of enzymes in food. Chap. 10. pp. 307 - 362. In : *Biochemistry of food proteins.* (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science, London.
- Galluzzo, S. J., Regenstein, J. M. 1978. *J. Food Sci.* 43 : 1757 - 1760.
- Galvao, M. T. E. L. and Beraquet, N. J. 1992. Recovery of protein from bone residues of mechanically separated chicken meat: a review. *Colet. ITAL, Campinas* 22 : 118 - 127.
- Gault, N. F. S. and Lawrie, R. A. 1980. Efficiency of protein extraction and recovery from meat industry by-products. *Meat Sci.* 4 : 167 - 190.
- Gildberg, A. 1993. Review : Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.* 28 : 1 - 15.
- Glenn, R. 1992. Bitterness: reduction and inhibition. *Trends in food Sci. and Technol.* 3 : 85 - 91.
- Goupy, J. 1988. *La méthode des plans d'expériences. Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats.* Dunod Lavoisier, Paris.
- Grigorov, V., Markov, E., Stoeva, N., and Okoliyski, A. 1989. Optimization of the technology of manufacturing dry enzymic blood hydrolysate. pp. 884 - 888. 35th Inter. Cong. Meat Sci. Technol. Copenhagen.
- Guillou, A. A. and Floros, J. D. 1993. Multiresponse optimization minimizes salt in natural cucumber fermentation and storage. *J. Food Sci.* 58 : 1381 - 1389.
- Hafiz, A. H., Malik, M. A., Chaudhary, M. I., and Javed, M. A. 1993. Protein hydrolysates from meat industry by-products: I. *Lungs. Sci. Int. (Lahore)* 5 : 265 - 268.
- Hale, M. B. 1969. Relative activities of commercially-available enzymes in the hydrolysis of fish protein. *Food Technol.* 23 : 107 - 110.
- Halling, P. J. 1981. Protein-Stabilized Foams and Emulsions. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15 : 155 - 203.
- Hamada, J. S. 1992. Modification of food proteins by enzymatic methods. Chap. 8 pp. 249 - 270. In : *Biochemistry of Food Proteins.* (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science, London.

- Hansen, S. and Finn, S. 1992. Process for producing protein product from bone-containing animal material. United States Patent US. 5 141 763.
- Haque, Z. U. 1993. Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: A review J. Dairy Sci. 76 : 311 - 320.
- Haque, Z. U. and Mozaffar, Z. 1992. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. Food Hydrocolloids. 5 : 559 - 571.
- Hegedüs, M., Bokori, J., and Hadobas, K. 1983. Protein quality of mixtures of animal protein meals. Animal Feed Sci. and Technol. 9 : 79 - 87.
- Hegedüs, M., Bokori, J., Andrasofszky, E., and Kovari, L. 1990. Optimizing protein quality of mixtures of blood meal, feather meal and bone meal. Acta Veterinaria Hungarica 38 : 143 - 152.
- Helbig, N. B., Ho, L., Christy, G.E., and Nakai, S. 1980. Debittering of skim milk hydrolysates by adsorption for incorporation into acidic beverages. J. Food Sci. 45 : 331 - 335.
- Hermansson, A. M. 1975 (a). Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. Effect of concentration and temperature on water-binding properties of model meat systems. J. Food Sci. 40 : 595 - 602.
- Hermansson, A. M. 1975 (b). Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. Effect of salt on water-binding properties of model meat systems. J. Food Sci. 40 : 603 - 610.
- Hermansson, A. M. 1975 (c). Functional properties of added proteins correlated with properties of meat systems. Effect on texture of a meat product. J. Food Sci. 40 : 611 - 614.
- Hofmann, K. and Marggrander, K. 1989. Reducing the common salt content of meat products by using collagen hydrolysates. Fleischwirtsch. 69 : 1135 - 1138.
- Horgan, D. J., Kurth, L. B., and Kuypers, R. 1991. pH effect on thermal transition temperature of collagen. J. Food Sci. 5 : 1203 - 1204, 1208.
- Hoyle, N. T. and Merrit, J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). J. Food Sci. 59 : 76 - 79, 129.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., and Miller, G. A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. J. Food Sci. 42: 1269 - 1273.
- Hsu, S. Y. 1995. Optimization of the surimi processing system with a central composite design method. J. Food Engineering 24 : 101 - 111.
- Huidobro, A. and Tejada, M. 1993. Emulsifying capacity of fish mince from several species during frozen storage. J. Sci. Food Agric. 61 : 333 - 338.

- Humbert, G., Guimgamp, M. F., Kouomegner, R., and Linden, G. 1990. Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent. *J. Dairy Res.* 57 : 143 - 148.
- Hung, S. C. and Zayas, J. F. 1991. Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour. *J. Food Sci.* 56 : 1216 - 1218, 1223.
- Husain, S. J. and Chaudhry, H. M. 1991/1992. Preparation and composition of liver-tissue protein concentrate. *Pakistan Journal of Scientific Research.* 43/44 : 95 - 99.
- Ihekoronye, A. I. 1986. Rapid in vitro enzymic predictive model for the in vivo digestibility of food proteins. *J. Food Technol.* 21 : 81 - 87.
- Inklaar, P. A. and Fortuin, J. 1969. Determining the emulsifying and emulsion stabilizing capacity of protein meat additives. *Food technol.* 23 : 103 -107.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., and Paulson, A. T. 1989. Characterization of the kinetics of breakdown of protein stabilised oil in water emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 37 : 600 - 604.
- Jacobsen, C. F., Léonis, J., Linderstrom-Lang, K., and Ottesen, M. 1957. In : *Methods of Biochemical Analysis*.. Chap. 4 : 187 - 202 (Ed.) D. Glick, Interscience Publ. Inc., New York.
- Jelen, P., Earle, M., and Edwardson, W. 1979. Recovery of meat protein from alkaline extracts of beef bones. *J. Food Sci.* 44 : 327 - 331.
- Jelen, P., Lawrence, R. A., and Cerrone, M. 1982. Evaluation of alkali extracted chicken protein for use in luncheon meats. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 15 : 289 - 293.
- Jepsen, S. J. and Rasmussen, P. B. 1988. Enzymatic bone cleaning, scrap meat recovery and stick water viscosity reduction. Novo, A-06036.
- Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. 1985. Energy and protein requirements technical report series n° 724. Geneva, Switzerland.
- Journal Officiel de la République Française. 1989 (7 janvier). Arrêté du 21 décembre 1988 relatif aux hydrolysats de protéines dans la fabrication des aliments destinés à une alimentation particulière. pp. 279 - 281.
- Journal Officiel de la République Française. 1990. Hygiène alimentaire. Textes généraux n° 1488 - tome I.
- Kabirullah, M., Rukonuddin, A., Khan, S. A., Rubi, S. F., and Faruque, O. 1991. A comparative study on the nutritive value of bangladesh FPC type-B and norwegian FPC type-B and their potency to supplement a cereal-pulse diet. *J. Sci. Ind. Res.* 26 : 8 - 18.

- Kato, A. and Nakai, S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 624 :1 - 13.
- Kato, A., Fujishige, T., Matsudomi, N., and Kobayashi, K. 1985. Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. *J. Food Sci.* 50 : 56 - 58, 62.
- Keane, M. G. 1990. Bone content of beef carcasses. *Farm and Food Research.* 2 : 16 - 18.
- Kemp, S. E. and Birch, G. 1992. An intensity / time study of the taste of amino acids. *Chemical senses.* 17 : 151 - 168.
- Kerker, M. 1969. *The scattering of light and other electromagnetic radiation.* Academic press, London.
- Kijowski, J., Niewiarowicz, A., Laskowska, M., and Matuszak, H. 1985. Use of protein extract from bone residue in poultry meat processing. *J. Food Technol.* 20 : 51 - 56.
- Kinsella, J. E. 1982. Protein structure and functional properties: emulsification and flavor binding effects. pp. 301 - 326. In : *Food Protein Deterioration: Mechanisms and functionality.* (Ed.) J. P. Cherry. Am. Chem. Soc., Washington DC.
- Kinsella, J. E., 1976. Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Food Sci. Nutr.* 8 : 219 - 280.
- Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T., and Katsuya, N. 1969. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 17 : 689 - 695.
- Kirk, W. and Gordon, J. J. 1988. Protein extracts. PCT WO 88/05633.
- Konrad, G. and Lieske, B. 1992. An improved method for determining the maximum value of emulsifying capacity of protein solution. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 195 : 320 - 325.
- Krause, W. G. A., Ludwig E., and Seiler, M. 1992. Hydrolysis of casein and casein components by acid proteases with milk clotting properties - Kinetic investigations. pp. 87 - 92. In : *Food Proteins. Structure and Functionality.* (Eds.) K. D. Schwenke and R. Mothes. New York.
- Kuehler, C. A. and Stine, C. M. 1974. Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein. *J. Food Sci.* 39 : 379 - 382.
- Lahl, W. and Braun, D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 10 : 68 - 71.
- Lamy-Dehove. 3<sup>ième</sup> mise à jour 1992. *Réglementation des produits.* pp. 52 - 55. Qualité et Répression des Fraudes.

- Lang, O. 1990. Valorisation non alimentaire du cinquième quartier des abattoirs. IAA 10 : 951 - 957.
- Laser-Reuterswärd, A. 1984. Nutritional value of collagen in meat products. thèse. Department of Food Chemistry and Department of Nutrition. Lund University. Sweden.
- Laser-Reuterswärd, A. 1985. Solubilization of pigskin and bovine tendon after pepsin and pancreatin treatment. Effect of incubation condition and age of animal. J. Food Technol. 20 : 129 - 143.
- Laser-Reuterswärd, A., Asp, N. G., Björck, I., and Rudéus, H. 1982. Effect of collagen content and heat treatment on protein digestibility and biological value of meat products. J. Food Technol. 17 : 115 - 123.
- Laser-Reuterswärd, A., Asp, N.G., and Björck, I. 1985. Protein digestibility of pigskin and bovine tendon in rats. J. Food Technol. 20 : 745 - 752.
- Latreille, B. and Paquin P. 1990. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. J. Food Sci. 55 : 1666 -1668.
- Lawrence, R. A. and Jelen, P. 1982. Formation of Lysino-alanine in alkaline extracts of chicken protein. J. Food Protect. 45 : 923 - 924.
- Lawrence, R. A., Jelen, P., and Fedec, P. 1982. Pilot plant extraction of protein from mechanically separated poultry residues. Can. Inst. Food Technol. 15 : 325 - 328.
- Lawrie, R. A. and Ledward, D. A. 1988. Edible protein recovery and upgrading of meat packinghouse waste. pp. 231 -256. In : *Edible meat by-products . Advances in Meat Research*. Vol. 5 (Eds.) A. M. Pearson and T. R. Dutson. Elsevier applied science.
- Le Roux, P. 1982. Extraits et hydrolysats protéiques de poisson, de viande et de leurs sous-produits. In : *Protéines animales. Extraits, concentrés et isolats en alimentation humaine*. chap. 7. pp. 274 - 305. (Eds) C. M. Bourgeois et P. Le Roux. Collection Sciences et Techniques Agro-Alimentaire. Lavoisier.
- Le Roux, P. 1991. L'analyse enzymatique pp. 325 - 342. In : *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. (Ed.) G. Linden. Collection sciences et techniques agro-alimentaire Volume 2. Lavoisier - Tec & Doc.
- Leconte, D. 1989. Contribution à l'étude de la valorisation du cruor des abattoirs : application de l'ultrafiltration à la préparation d'hydrolysats peptidiques à partir de l'hémoglobine bovine. Thèse Université Technologique de Compiègne.
- Ledward, D. A. 1986. Gelation of gelatin. In : *Functional properties of food macromolecules*. Chap. 4 pp. : 171 - 201. (Eds.) J. R. Mitchell and D. A. Ledward. Elsevier applied science publishers. London.

- Ledward, D. A. and Lawrie, R. A. 1984. Recovery and utilisation of by-product proteins of the meat industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34B : 223 - 228.
- Lehrman, S. R. 1990. Protein structure. pp. 9 - 38. In : *Fundamentals of protein biotechnology*. (Ed.) S. Stein. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Lemieux, L. and Simard, R.E. 1991. Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait* 71 : 599 - 636.
- Li-Chan, E., Nakai, S., and Wood, D. F. 1984. Hydrophobicité and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J. Food Sci.* 49 : 345 - 350.
- Lieske, B. and Konrad, G. 1994. Protein hydrolysis - The key to meat flavoring systems. *Food Reviews International.* 10 : 287 - 312.
- Linder, M. 1992. Valorisation des protéines de sous-produits d'abattage par voie enzymatique : optimisation et paramétrage du procédé de récupération. 60 pages. Rapport du diplôme d'études approfondies (DEA) en biotechnologies et industries alimentaires.
- Linderstrom-Lang, K. U. 1952. Proteins and enzymes. III. The initial stages in the breakdown of proteins by enzymes. *Lane Medical Lectures*, Stanford University Press, California 6 : 53 - 72.
- Lochner, R. H. et Matar, J. E. 1992. *Conception de la qualité : les plans d'expériences*. AFNOR gestion.
- Lorenzen, P. C. and Schlimme, E. 1992. Functional and structural properties of aggregates formed during plastein-like reactions. pp. 76 - 81. In : *Food proteins. Structure and functionality*. (Eds.) K. D. Schwenke and R. Mothes. Development from the 4th symposium on food proteins "Structure-functionality relationships" held at Reinhardtsbrunn, Germany.
- Lorient, D. 1988. Les propriétés fonctionnelles : interface entre propriétés physique, physicochimique et sensorielle ? pp. 1 - 7. In : *Les cahiers de l'ENS.BANA. Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires*. (Eds.) D. Lorient, B. Colas, M. Lemeste. Lavoisier Tec Doc.
- Lorient, D. et Colas, B. 1988. Propriétés des protéines aux interfaces ; Relations avec les propriétés émulsifiantes et moussantes. pp. 33 - 47. In : *Les cahiers de l'ENS.BANA. Propriétés fonctionnelles des macromolécules alimentaires*. (Eds.) D. Lorient, B. Colas, M. Lemeste. Lavoisier Tec Doc.
- Ma, C. Y., Amantea, G.F., and Nakai, S. 1983. Production of nonbitter, desalted milk hydrolysate for fortification of soft drinks and fruit juices. *J. Food Sci.* 48 : 897 - 899.
- MacRitchie, F. 1978. Proteins at interfaces. *Adv. Protein Chem.* 32 : 283-288.

- Madl, R. L. 1993. Evolution of protein quality determination. *Cereal Food World*. 38 : 576 - 577.
- Maentsaelae and Zalkin, 1980. In : *Subtilisin Enzyme handbook* n° 5. Gesellschaft für Biotechnologische Forschung ; Schomburg, D., Sallzmann, M. 1991.
- Mahmoud, I. M. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* 10 : 89 - 95.
- Mahmoud, I. M., Malone, W. T., and Cordle, C. T. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* 57 : 1223 - 1229.
- Margot, A., Flaschel, E., and Renken, A. 1994. Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with nitrogen content. *Process Biochem.* 29 : 257 - 262.
- Marigny, F. 1994. Spécial Environnement. Valorisation des déchets d'abattoirs : environnement réglementaire. *Le magazine des abattoirs des entreprises viande* 97 : 15 - 35.
- Markland, F. S. and Smith, E. L. 1971. In : *The Enzymes*, 3rd (Ed.) P. D. boyer. 3 : 561 - 609. In *Enzyme Handbook* n° 5. 1991. Chap. Subtilisin ; Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (Eds.) D. Schomburg and M. Salzmann.
- Marquez Moreno, M. C., and Fernandez Cuadrado, V. 1993. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochem.* 28 : 481 - 490.
- Marshall, H. F., Wallace, G. W., and Satterlee, L. D. 1979. Prediction of protein digestibility by an in vitro procedure using human, porcine, and rat pancreatin preparations. *Nutrition reports international.* 19 : 901 - 913.
- Marty, C. 1991. *Le mieux produire*. Approche productive du management. Chap. 6 pp. 143 - 194. Lavoisier.
- Mathieu, D., et Phan-Tan-Luu, R. 1992. Laboratoire de Prospective Réactionnelle et d'Analyse de l'Information (LPRAI). Université d'Aix-Marseille. NEMROD®: New Efficient Methodology for Research using Optimal Design.
- Mc Conn, J. D., Tsuru, D., and Yasunobu, K. T. 1964. Bacillus subtilis Neutral Proteinase. *J. Biological Chem.* 239 : 3706 - 3715.
- McCurdy, S. M., Jelen, P., Fedec, P., and Wood, D. F. 1986. Laboratory and pilot scale recovery of protein from mechanically separated chicken residue. *J. Food Sci.* 51 : 742 - 747, 755.
- McDenough, F. E., Sarwar, G., Steinke, F. H., Slump, P., Garcia, S., and Boisen, S. 1990. In vitro essay for protein digestibility : interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 4 : 622 - 625.

- McDonough, F. E., Sarwar, G., Steinke, F. H., Slump, P., Tno, C., Garcia, S., and Boisen, S. 1990. In vitro Assay for protein digestibility: interlaboratory study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 622 - 625.
- Mermelstein, N. H. 1992. Medical Foods. Food Technol. 4 : 87 - 96.
- Mietsch, F., Feher, J., and Halasz, A. 1989. Investigation of functional properties of partially hydrolysed proteins. Die Nahrung 33 : 9 - 15.
- Miller, D. S. and Bender, A. E. 1955. The determination of the net utilization of protein by a shortened method. Br. J. Nutr. 9 : 382 - 388.
- Miller, E. J. and Gay, S. 1987. The collagens: an overview and update. Methods Enzymol. 144 : 3 - 41.
- Minekus, M., Havenaar, R., Marteau, P., and Huis In'T Veld, J. H. J. 1994. An in vitro gastro-intestinal tract model for microbiological and nutritional studies. W- 1.15. 40th ICoMST. The Hague, Netherlands.
- Mitchell, H. H. 1924. A method for determining the biological value of protein. J. Biol. Chem. 58 : 873 - 903.
- Montero, P. and Borderias, J. 1991. Emulsifying capacity of collagenous material from the muscle and skin of Hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb): effect of pH and NaCl concentration. Food Chem. 41 : 251 - 267.
- Moore, S. and Stein, W. H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem. 211 : 907 - 913.
- Moss, V. G. and Trautman, J. C. 1972. Method of preparing meaty-flavored protein hydrolyzates from meat carcass components. United states Patent Office. 3,692,538.
- Motion, R. L. 1992. Hydrolysates of milk proteins. Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand 17 : 56 - 63.
- Moughan, P. J., Schrama, J., Skilton, G. A., and Smith, W. C. 1989. In-vitro determination of nitrogen digestibility and lysine availability in meat and bone meals and comparison with in-vivo ileal digestibility estimates. J. Sci. Food Agric. 47 : 281 - 292.
- Moy, J. et Takerkart, G. 1989. Procédé continu d'obtention de gélatine à partir de poudre d'os et gélatine obtenue. Demande de brevet d'invention. FR 2625412 A1.
- Mozersky, S. M. and Panettieri, R. A. 1983. Is pH drop a valid measure of extent of protein hydrolysis ? J. Agric. Food Chem. 31 : 1313 - 1316.
- Murray, T. K. and Baker, B.E. 1952. Studies on protein hydrolysis. I. Preliminary observations on the taste of enzymatic protein hydrolysates. J. Sci. Food Agric. 3 : 470 - 475.

- N Guyen Thi Quynh, A., Biyaoula, D., Demeaux, M., and Lorient D. 1992. Tensio active properties of soy proteins: improvement by limited chemical hydrolysis. *Sci. Aliments* 12 : 117 - 130.
- Nakamura, T., Syukunobe, Y., Sakurai, T., and Idota, T. 1993. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwissenschaft* 48 : 11 - 14.
- Nash, H. A. and Mathews, R. J. 1971. Food protein from meat and bone meal. *J. Food Sci.* 36 : 930 - 935.
- Neidleman, S. L. 1991. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technol.* 1 : 88 - 91.
- Ney, K. H. 1971. Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Aminosäurezusammensetzung. *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.* 147 : 64 - 71.
- Ney, K. H. 1972. Aminosäure-Zusammensetzung von Proteinen und die Bitterkeit ihrer Peptide. *Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch.* 149 : 321 - 323.
- Ney, K. H. 1979. Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. *ACS Symp. Ser.* 115 : 149 - 173.
- Noël, Y., Durier, C., Lehembre, N., et Kobilinski, A. 1991. Etude multifactorielle de la coagulation mixte du lait analysée par viscoélasticimétrie. *Lait* 71 : 15 - 39.
- Novo Industri. 1978. A/S, IB-number 102-GB.
- Novo Industri. 1978. Analytical method. Anson hemoglobin method for determination of Alcalase activity. AF 4.3/5-GB.
- Novo Industri. 1979. Method for detection of residual proteolytic activity. 195 a - GB.
- O'Meara, G. M. and Munro, P. A. 1981. Enzyme hydrolysis of waste meat tissue. pp. 511 - 518. 9th Australasian conference on chemical engineering christchurch, New Zealand.
- O'Meara, G. M. and Munro, P. A. 1984 a. Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by Alcalase. *Meat Sci.* 11 : 227 - 238.
- O'Meara, G. M. and Munro, P. A. 1984 b. Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. *Enzyme Microb. Technol.* 6 : 181 - 185.
- O'Meara, G. M. and Munro, P. A. 1985. Kinetics of the hydrolysis of lean meat protein by Alcalase: derivation of two alternative rate equations and their fit to experimental data. *Biotechnol. Bioengineering* 27 : 861 - 869.
- Office National Interprofessionnel des Viandes de l'Elevage et de l'Aviculture (OFIVAL).  
Tour Maine-Montparnasse. 33, av. du Maine. 75755 Paris Cedex 15.
- Opiacha, J. O., Mast, M. G., and MacNeil, J. H. 1991. In-vitro protein digestibility of dehydrated protein extract from poultry bone residue. *J. Food Sci.* 56 : 1751 - 1752.

- Ory, R. L., Flick, G. J., and Cook, R. Y. 1989. Enzymes that affect protein quality of foods. Chap. 10 : 291 - 314. In : *Protein Quality and the Effects of Processing*. (Eds.) R. D. Phillips and J. W. Finley. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Osborne, T. B., Mendel, L. B., and Ferry, E. L. 1919. A method for expressing numerically the growth-promoting effect of proteins. *J. Biol. Chem.* 37 : 223 - 229.
- Ottensen, M. and Svendsen, J. 1970. The Subtilisins. *Methods Enzymology*. 19 : 199 - 215.
- Ouali, A., Dufour, E., Obled, A., Deval, C., and Valin, C. 1988. Action des protéinases musculaires sur les myosines rapide et lente. Relation avec la protéolyse post-mortem dans des muscles de type contractile variable. *Reprod. Nutr. Develop.* 28 : 839 - 844.
- Owens, J. D. and Mendoza, L. S. 1985. Enzymically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *J. Food Technol.* 20 : 273 - 293.
- Ozimek, G., Jelen, P., Ozimek, L., Sauer, W., and McCurdy, S. M. 1986. A comparaison of mechanically separated and alkali extracted chicken protein for functional and nutritional properties. *J. Food Sci.* 51 : 748 - 753.
- Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26 : 716 - 723.
- Pedersen, B. 1994. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol.* 10 : 96 - 98 ; 76.
- Pedersen, B. and Eggum, B. O. 1983. Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermittelkd.* 49 : 265 - 277.
- Pedersen, H., Olsen, H., and Nielsen, P. 1994. Method for production of a meat hydrolyzate and a use of the meat hydrolysate. WO 94/01003.
- Petersen, B. R. 1981. The impact of the hydrolysis process on recovery and use of proteins. pp. : 149 - 175. In : *Enzymes anf food processing*. (Eds.) G. G. Birch, N. Blakebrough, and K. J. Parker. Elsevier Applied Science Publishers. London.
- Pierre, A., Legraet, Y., Fauquant, J., Piot, M., Durier, C., et Kobilinsky, A. 1992. Evaluation du rôle des facteurs physicochimiques dans la clarification du lactosérum. *Lait* 72 : 405 - 420.
- Pigott, G. M., Bucove, G. O., and Ostrander, J. G. 1978. Engineering a plant for enzymatic production of supplemental fish proteins. *J. Food Process and Preservation* 2 : 33 - 54.
- Pintauro, N. D. 1979. Enzyme tenderization processes. In : *Food Processing Enzymes. Recent developments*. *Food Technology Review* 52 : 231 - 262.
- Polic, M., Tisljarek, D., Milanovic-Stevanovic, M., and Basovic. 1991. M. Tehnologija Mesa. 32 : 155 - 158.

- Przybyla, A. N. 1989. Enzymes used for protein hydrolysate. Debittering. *Food Eng.* 9 : 51 - 52.
- Quaglia, G. B. and Massacci, A. 1982. Proteolysates from slaughter-house blood. *J. Sci. Food Agric.* 33 : 634 - 638.
- Quaglia, G. B. and Orban, E. 1987 (a). Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *J. Sci. Food Agric.* 38 : 263 - 269.
- Quaglia, G. B. and Orban, E. 1987 (b). Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from Sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.* 38 : 271 - 276.
- Quaglia, G. B. and Orban, E. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *J. Food Sci.* 55 : 1571 - 1573, 1619.
- Raghunath, M. R., and McCurdy, A. R. 1991. Synthesis of plasteins from fish silage. *J. Sci. Food Agric.* 54 : 655 - 658.
- Rasmussen, P. B. and Rancke-Madsen, A. 1990. Method for upgrading of MRM (Mechanically recovered meat). Int. Patent Application WO 90/05462A1.
- Regenstein, J. M. 1984. Protein functionality for food scientists. Chap. 27 : 274 - 335. In : *Food Protein Chemistry*. Academic Press, Inc. London.
- Rogov, I. A., Tokaev, E. S., and Kovalev Y. I. 1992. Collagen and its rational content in meat products. Part 1. Analytical studies. *Meat Sci.* 31 : 35 - 42.
- Roseiro, J. C., Esgalhado, M. E., Collaço, M. T. A., and Emery, A. N. 1992. Medium development for xanthan production. *Process Biochem.* 27 : 167 -175.
- Rustom, I. Y. S., Lopez-Leiva, M. H., and Nair, B. M. 1991. Optimization of extraction of peanut proteins with water by response surface methodology. *J. Food Sci.* 56 : 1660 -1663.
- Sado, G. et Sado, M-C. 1991. *Les plans d'expériences*. De l'expérimentation à l'assurance qualité. Chap. 7 : 109 - 123. AFNOR.
- Saito, M., Chikuni, K., Monma, M., and Shimizu, M. 1993. Emulsifying and oil-binding properties of bovine serum albumin and its enzymatic hydrolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 952 - 956.
- Sakamoto, K., Kobayashi, M., Okuda, H., and Sato, Y. 1992. Statistical Analysis of relationship between net protein utilization in rat and amino acid composition in cooked foods. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 62 : 269 - 272.
- Samman, N. and Farias, R. 1993. A 28-h method for estimating protein nutritional quality. *J. Agric. Food Chem.* 41 : 52 - 56.

- Sannier, F., Piot, J. M., Guillochon, D., Dhulster, P., and Thomas, D. 1993. Stabilization of pepsin on duolite for the continuous hydrolysis of bovine hemoglobin at pH 2 and 40°C. *Biotechnol. Tech.* 7 : 25 - 30.
- Santarius, K. and Ryan, C. 1977. Radial diffusion as a sensitive method for screening endopeptidase activity in plant extracts. *Anal. Biochem.* 77 : 1 - 9.
- Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M., and Shinoda, T. 1960. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. *J. Biochem.* 47 : 654 - 659.
- Satterlee, L. D., Hendrick, J. G., and Miller, G. A. 1977. Rapid in vitro assays for estimating protein quality. *Nutr. Reports Int.* 16 : 187 - 199.
- Satterlee, L. D., Marshall, H. F., and Tennyson, J.M. 1979. Measuring protein quality. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 56 : 103 - 109.
- Saval, S., Pablos, L., and Sanchez, S. 1993. Optimization of a culture medium for streptomycin production using response-surface methodology. *Bioresource Technol.* 43 : 19 - 25.
- Savoie, L. and Gauthier, S. F. 1986. Dialysis cell for the in vitro measurement of protein digestibility. *J. Food Sci.* 51 : 494 - 498.
- Savoie, L., Charbonneau, R., and Parent, G. 1989. In vitro amino acid digestibility of food proteins as measured by the digestion cell technique. *Plant Foods For Human Nutrition* 39 : 93 - 107.
- Savoie, L., Parent, G., and Galibois, I. 1991. Effects of alkali treatment on the in-vitro digestibility of proteins and the release of amino acids. *J. Sci. Food Agric.* 56 : 363 - 372.
- Schmidl, M. K., Taylor, S. L., and Nordlee, J. A. 1994. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.* 10 : 77 - 85.
- Schmidt, D. G. and Markwijk, B. W. 1993. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Neth. Milk Dairy J.* 47 : 15 - 22.
- Scopes, R. K. 1982. Separation in solution. Chap. 5 pp. 151 - 163. In : *Protein purification*. Springer-Verlag, New York.
- Sephton, S. W. and Clegg, A. C. 1993. Production of blood fraction hydrolysates and the use of blood and milk hydrolysates in finely comminuted meat products. *Publications Meat Industry Research Institute of New Zealand.* 919 : 33 pp.
- Siemensma, A. D., Weijer, W. J., and Bak, H. J. 1993. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends in Food Sci. Technol.* 4 : 16 - 21.

- Simpson, R. J., Neuberger, M. R., and Liu, T. Y. 1976. Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *Journal of Biological Chem.* 251 : 1936 - 1940.
- Skilton, G. A., Smith, W. C., and Moughan, P. J. 1991. The ileal digestibility of nitrogen and amino acids in meat and bone meals determined using a rat assay. *Anim. Feed Sci. Technol.* 34 : 111 - 126.
- Smith, D. M. 1988. Meat proteins: Functional properties in comminuted meat products. *Food Technol.* 4 : 116 - 121.
- Smith, D. M. and Brekke, C. J. 1984. Functional properties of enzymatically modified beef heart protein. *J. Food Sci.* 49 : 1525 - 1528.
- Smith, D. M. and Brekke, C. J. 1985. Enzymatique modification of the structure and functional properties of mechanically deboned fowl proteins. *J. Agric. Food Chem.* 33 : 631 - 637.
- SOPRORGA (SANOFI). Tour Pleyel, 153 bd Anatole France 93200 Saint Denis.
- Sorensen, N. H. and Rasmussen, P. B. 1989. Enzymatic bone cleaning and scrap meat recovery. pp. 957 - 961. 35th Inter. Cong. Meat Sci. Technol. Copenhagen.
- Spendler, T. 1990. Degree of hydrolysis determined by formol titration. Handy methods - protein. Novo A-06195.
- Spendler, T. 1991. Protein osmolality for DH determination. Novo A-06196 : 1 - 7.
- Stainsby, G. 1986. Foaming and emulsification. Chap. 7 : 315-353. In : *Functional properties of food macromolecules*. (Eds) J. R. Mitchell and D.A. Ledward. Elsevier Applied Science Publishers. London.
- Stanley, D.W. 1981. Non-bitter protein hydrolysates. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 14 : 49 - 52.
- Steffe, J. F. 1992. Viscoelasticity - Dynamic testing. Chap. 4. In : *Rheological methods in food process engineering*. Freeman press. Michigan USA.
- Steinhardt, J. and Beychok, S. 1964. Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. In : *The proteins* (Ed.) H. Neurath. Academic Press, New York vol 2 : 139 - 304.
- Steinhart, H. 1973. The course of reaction of hydrolysis of isolated soybean protein with pepsin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 152 : 332 - 335.
- Strmiskova, G. Strmiska, F., and Dubravicky, J. 1993. Mineral composition of mechanically deboned beef meat. *Die Nahrung.* 37 : 94 - 96.
- Stryer, L. 1985. Les protéines du tissu conjonctif : le collagène, l'élastine et les protéoglycannes. Chap. 9. pp. 195 - 213. In : *La Biochimie de Lubert Stryer*. 2 Ed. Flammarion Medecine - Science.

- Surowka, K. and Fik, M. 1992. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *J. Food Sci. Technol.* 27 : 9 - 20.
- Surowka, K. and Fik, M. 1994. Study on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: II. Application of pepsin to the production of protein hydrolysate. *J. Sci. Food Agric.* 65 : 289 - 296.
- Suttiprasit, P., Al-Malah, K., and McGuire, J. 1993. On evaluating the emulsifying properties of protein using conductivity measurements. *Food Hydrocolloids* 7: 241-253.
- Suttiprasit, P., Kridhasima, V., and McGuire, J. 1992. The surface activity of  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and bovine serum albumin. I. Surface tension measurements with single-component and mixed solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 154 : 316 - 326.
- Swaigood, T. D. and Catignani, G. L. 1991. Protein digestibility: in vitro methods of assessment. *Adv. Food Nutr. Res.* 35: 185 - 235.
- Swan, J. E. and Torley, P. J. 1991. Collagen: structure, function and uses. Publication Meat Industry Research Institute of New Zealand. 883 : 1 - 49.
- Swift, C. E., Lockett, C., and Fryar, A. J. 1961. Comminuted meat emulsions. The capacity of meats for emulsifying fat. *Food Technol.* 15 : 468 - 473.
- Swingler, G. R. and Lawrie, R. A. 1979. Improved protein recovery from some meat industry by-products. *Meat Sci.* 3 : 63 - 73.
- Syndicat des Protéines et Corps Gras Animaux (SPCGA). 118, av. Achille Peretti. 92200 Neuilly sur Seine.
- Takagi, H., Kondou, M., Hisatsuka, T., Nakamori, S., Tsai, Y.-C., and Yamasaki, M. 1992. Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *J. Agric Food Chem.* 40 : 2364 - 2368.
- Tamura, M., Mori, N., Miyoshi, T., Koyama, S., Kohri, H., and Okai, H. 1990. Practical debittering using model peptides and related Compounds. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 41 - 51.
- Thibault, P. A. and Monsan, P. F. 1989. Process for debittering of protein hydrolysate and the product so produced. French patent application FR 2 625 651 A1.
- Thirot, P. H. 1991. Binding agent for sauces for prepared dishes especially for vacuum packaged prepared dishes. Demande de brevet d'invention 2 658 037 A1.
- Thomas, K. 1909. Über die Biologische Wertigkeit der Stickstoffsubstanzen in verschiedenen Nahrungsmitteln ; Beiträge zur Frage nach dem physiologischen Stickstoffminimum. *Arch. Anat. u. Physiol. Abt.* 219 - 302. In : Dillon, J.C.

- Tokita, F. 1969. Enzymatische und nicht enzymatische Ausschaltung des Bittergeschmacks bei enzymatischen Eieweisshydrolysaten. *Z. Lebensm. - Untersuch. -Forsch.* 138 : 351 - 355.
- Toledo, R. T. 1973. Preparation and properties of low temperature extracted animal protein concentrates. *J. Food Sci.* 38 : 141 - 144.
- Tolstoguzov, V. B. 1992. Collagen and its rational content in meat products: Part 1. Analytical studies. *Meat Sci.* 31 : 35 - 42.
- Tomas, L. and Löffler, F. 1994. Improved protein functionalities by enzymatic treatment. *Food Marketing Technol.* 2 : 4 - 6.
- Tornberg, E. and Hermansson, A. M. 1977. Functional characterization of protein stabilized emulsions: effect of processing. *J. Food Sci.* 42 : 468 - 472.
- Tsai, R., Cassens, R. G., and Briskey, E. J. 1972. *J. Food Sci.* 37 : 286 - 288.
- Turgeon, S. L., Gauthier S. F., and Paquin, P. 1992. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.* 57 : 601 - 604, 634.
- Turgeon, S. L., Gauthier, S. F., and Paquin, P. 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *J. Food Chem.* 39 : 673 - 676.
- Uehara, H., Yamane, K., and Maruo, B. 1979. *J. Bacteriol.*, 139 : 583 - 590. In : *Bacillus subtilis neutral proteinase, Enzyme Handbook 5* ; Gesellschaft für Biotechnologische Forschung ; Schomburg, D., Sallzmann, M. 1991.
- Ukeda, H., Matsumoto, K., Katsuki, I., and Osajima, Y. 1991. A simple methode for monotoring the enzymic hydrolysis of fish meat: determination of amino groups using glutaraldehyde. *J. Agric. Chem. Soc. of Japan.* 65 : 1229 - 1231.
- Umetsu, H., Matsuoka, H., and Ichishima, E. 1983. Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxy peptidase. *J. Agric. Food Chem.* 31 : 50 - 53.
- Veenstra, J., Minekus, M., Marteau, P., and Havenaar, R. 1993. New type gastrointestinal tract model. A tool to test physiological aspects of foods. *Inter. Food Ingredients* 3 : 2 - 8.
- Vegarud, G. E., and Langsrud, T. 1989. The level of bitterness and solubility of hydrolysates produced by controlled proteolysis of caseins. *J. Dairy Res.* 56 : 375 - 379.
- Vegarud, G.E., Svenning, C., Molland, T., and Langsrud, T. 1991. Enzymatic hydrolysis of milk proteins improved functional properties. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 56 : 1649 - 1653.
- Veis, A. 1964. *Macromolecular chemistry of gelatin*. New York. Academic Press.

- Vigier, M. 1988. *Pratique des plans d'expériences. Méthodologie Taguchi*. Les éditions d'organisations, Paris.
- Vuilleumard, J. C., Gauthier, S. F., Richard, J. -P., and Paquin, P. 1990. Development of a method for the measurement of the maximum value of emulsifying capacity of milk proteins. *Milchwissenschaft* 45 : 572 - 575.
- Walsh, K. A. and Wilcox, P. E. 1970. Serine proteases. pp. 19 : 31 - 41. In : *Methods in Enzymology* : Proteolytic enzymes., (Eds.) G.E. Perlmann and L. Lorand. New-York.
- Warzecha, L. Piwowar, Z., and Bodzek, D. 1990. Gel permeation chromatography for the determination of the molecular mass distribution of some industrial proteins. *J. Chromatography*. 509 : 227 - 231.
- Wassef, E. A., Palmer, G. H., and Poxton, M. G. 1988. Protease digestion of the meals of ungerminated and germinated soya beans. *J. Sci. Food Agric.* 44 : 201 - 214.
- Watanabe, M. and Arai, S. 1988. The plastein reaction and its applications. Chap. 5. pp. 179 - 217. In : *Developments in food proteins - 6*. (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Watanabe, M. and Arai, S. 1992. The plastein reaction: fundamentals and applications. Chap. 9. pp. 271 - 305. In : *Biochemistry of food proteins*. (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Watanabe, M., Shimizu, J., and Arai, S. 1990. Debittering of a tryptic hydrolysate of casein by incubating with the ice nucleation-active bacterium, *Erwinia ananas*, and its aminopeptidase at low temperature. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 3351 - 3353.
- Webb, N. B., Ivey, F. J. Craig, H. B., Jones, V. A., and Monroe, R. 1970. The measurement of emulsifying capacity by electrical resistance. *J. Food Sci.* 35 : 501 - 504.
- Webster, J. D., Ledward, D. A., and Lawrie, R. A. 1982. Protein hydrolysates from meat industry by-products. *Meat Sci.* 7 : 147 - 157.
- Weir, G. S. D. 1986. Protein hydrolysates as flavourings. Chap. 5 pp. 175 - 217. In : *Developments in food proteins - 4*. (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science Publishers. London.
- Wells, J. A. and Estell, D. A. 1990. Subtilisin: An enzyme designed to be engineered. pp 45 - 57. In : *Proteins :Form and Function*. (Eds) R. A. Bradshaw and M. Purton. Elsevier Trends Journals.
- Wilson, S.-A., Young, O. A., Coolbear, T., and Daniel, R. M. 1992. The use of proteases from extreme thermophiles for meat tenderisation. *Meat Sci.* 32 : 93 - 103.
- Wiseman, A. 1993. Review. Designer enzyme and cell applications in industry and in environmental monitoring. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 56 : 3 - 13.

- Woessner, J. F. 1976. In : *The methodology of connective tissue research*. pp. 227 - 233. (Eds.) D.A. Hall. Joynson - Bruwers Ltd Oxford.
- Wu, W., Williams, W. P., Kunkel, M. E., Acton, J. C., Wardlaw, F. B., Huang, Y., and Grimes, L. W. 1994. Thermal effects on in vitro protein quality of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.* 56 : 1187 - 1191.
- Wu, W., Williams, W. P., Kunkel, M. E., Acton, J. C., Huang, Y., Wardlaw, F. B., and Grimes, L. W. 1995. True protein digestibility and digestibility-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 43 : 1295 - 1298.
- Yamada, H., Moriya, H., and Tsugita, A. 1991. Development of an acid hydrolysis method with high recoveries of tryptophan and cysteine for microquantities of protein. *Analytical Biochem.* 198 : 1 - 5.
- Yamaguchi, S. Yoshikawa, T., Ikeda, S., and Ninomiya, T. 1971. Measurement of the relative taste intensity of some L- $\alpha$ -amino acids and 5'-nucleotides. *J. Food Sci.* 36 : 846 - 849.
- Yamashita, M., Arai, S., Matsuyama, J., Gonda, M., Kato, H., and Fujimaki, M. 1970. *Agric. Biol. Chem.* 34 : 1492. In : Watanabe, M., and Arai, S. 1992. The plastein reaction: fundamentals and applications. Chap. 9. pp. 271 - 305. In : *Biochemistry of food proteins*. (Ed.) B. J. F. Hudson. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Yang, S.-T. and Okos, M. R. 1989. A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten-type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnol. Bioengineering* 34 : 763 - 773.
- Yasunobu, K. T. and Mc Conn, J. 1970. *Bacillus subtilis* neutral protease. Chap. 19 : 569 - 575. In : *Methods in Enzymology* : Proteolytic enzymes. (Eds.) G. E. Perlmann and L. Lorand. New-York.
- Yeom, H. W., Kim, K. S., and Rhee, J. S. 1994. Soy protein hydrolysate debittering by lysine-acetylation. *J. Food Sci.* 59 : 1123 - 1126.
- Young, L. L. 1975. Aqueous extraction of protein isolate from mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 40 : 1115 - 1118.
- Young, L. L. 1976. Composition and properties of an animal protein isolate prepared from bone residue. *J. Food Sci.* 41 : 606 - 608.
- Young, R. H. and Lawrie, R. A. 1974. Utilization of edible protein from meat industry by-products and waste. I. Factors influencing the extractability of protein from bovine and ovine stomach and lungs. *J. Food Technol.* 9 : 69 - 78.

- 
- Young, R. H. and Lawrie, R. A. 1975. Utilization of edible protein from meat industry by-products and waste. V. The characterization of extracted proteins, using polyacrylamide gel electrophoresis incorporating sodium dodecyl sulphate. *J. Food Technol.* 10 : 523 - 532.
- Yu, S. Y. and Tan, L. K. 1992. Enzymic solubilization of proteins of *Oreochromis mossambicus* by alcalase. *Asean Food J.* 7 : 157 - 158.
- Zarkadas, C. G., Drousliscos, N., and Karatzas, C. J. 1988 (a). Comparison of the total protein, nitrogen and amino acid composition of selected additives and ingredients used in composite meat products. *J. Agric. Food Chem.* 36 : 1121 - 1131.
- Zarkadas, C. G., Karatzas, C. N., Khalili, A. D., Khanizadeh, S., and Morin, G. 1988 (b). Quantitative determination of the myofibrillar proteins and connective tissue content in selected porcine skeletal muscle. *J. Agric. Food Chem.* 36 : 1131 - 1146.
- Zarkadas, C. G., Yu, Z., Zarkadas, G. C., and Minero-Amador, A. 1995. Assessment of the protein quality of beefstock bone isolates for use as an ingredient in meat and poultry products. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 77 - 83.
- Ziajka, S., Dzwolak, W., and Zbikowski, Z. 1992. The influence of enzymatic modification on some properties of casein hydrolysates. pp. 95 - 97. In : *Food Proteins. Structure and functionality*. (Eds) K. D. Schwenke and R. Mothes. New York.

***ANNEXES***

***ANNEXE I : INFORMATION SUR LES ENZYMES***

**Fiche produit****Enzyme Process Division****Neutrase®****Application**

Neutrase est une protéase qui peut être utilisée dans presque tous les cas où des matières protéiques doivent être dégradées, soit modérément, soit en peptides.

**Principales applications**

Neutrase est utilisée en *brasserie* pour renforcer les protéases du malt lorsqu'on fabrique de la bière avec de l'orge ou d'autres céréales non maltées. Neutrase n'est pas inhibée par les inhibiteurs de protéases dans l'orge.

Neutrase est utilisée en *boulangerie* pour affaiblir modérément le gluten du blé lorsque cela est nécessaire, par exemple pour la production de biscuits.

Neutrase est utilisée pour la *valorisation des protéines* d'origine végétale et animale, seule ou combinée à d'autres protéases.

Des recommandations détaillées relatives aux diverses applications sont données dans des notices spéciales disponibles sur demande.

**Types de produit**

Neutrase est disponible sous les formes standard suivantes:

Liquide:	Neutrase 0.5 L .....	0,5 AU/g
Microgranulés:	Neutrase 1.5 MG .....	1,5 AU/g

**Spécifications****Activité**

Les produits sont standardisés en Unités Anson (AU). La méthode analytique AF 4, basée sur l'hémoglobine dénaturée dans un tampon à 0,02 M  $\text{Ca}^{2+}$ , est disponible sur demande.

**Autres caractéristiques**

Les produits sont conformes aux spécifications recommandées par FAO/OMS JECFA et FCC pour les enzymes «food grade» (de qualité alimentaire). De plus, nous avons imposé une limite supérieure de  $5 \times 10^4$ /g pour les germes totaux et de  $10^2$ /g pour les moisissures.

**Description du produit**

Neutrase 0.5 L est un liquide brun limpide ayant une densité d'environ 1,25 g/ml.

Neutrase 1.5 MG est un microgranulé brun clair d'écoulement libre, sans formation de poussière et possède un diamètre moyen de particule voisin de 300 microns. Neutrase 1.5 MG se mélange facilement, par exemple avec de la farine.

**Caractéristiques**

Neutrase est une protéase bactérienne produite par une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis*.

Neutrase contient uniquement la fraction neutre des protéases de *B. subtilis* contrairement à la plupart des autres préparations commerciales qui contiennent aussi la protéase alcaline.

Neutrase est une métalloprotéase (Zn) qui est stabilisée avec le  $\text{Ca}^{2+}$  et donc inhibée par l'EDTA.

Neutrase contient une quantité non standardisée de bêta-glucanase et est libre de toute activité alpha-amylasique.

Les conditions optimales de travail sont à 45-55°C et à un pH de 5,5-7,5. Dans les Figures 1-3 les activités montrées sont mesurées selon une méthode Anson modifiée en solutions aqueuses sans l'effet stabilisant du substrat protéique.

La stabilité de Neutrase à une certaine température est influencée par le type et la concentration des protéines présentes.

Des exemples de stabilité, exprimée par le temps de décimation ( $T_D$ ) à différentes températures, à un pH de 7 et avec une concentration protéique de 8%, sont indiqués pour différents substrats à la Figure 4.

$T_D$  est le temps requis pour réduire l'activité à 1/10. L'inactivation a lieu à  $3 \times T_D$ .  
L'adjonction de  $Ca^{2+}$  à ces substrats naturels n'influence pas la stabilité de Neutrase.  
Neutrase peut être inactivée par traitement thermique, par exemple 2 minutes à 85°C.

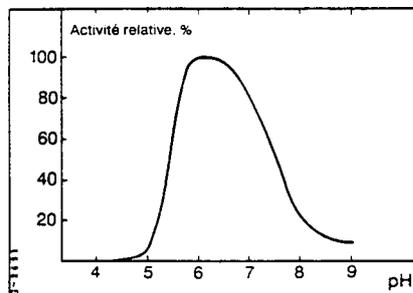


Fig. 1. Influence du pH sur l'activité de Neutrase à 45°C.

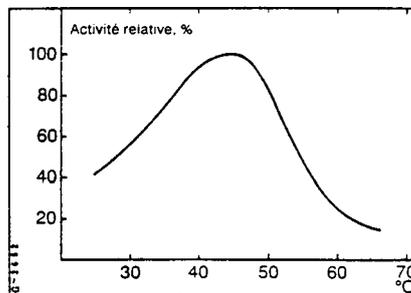


Fig. 2. Influence de la température sur l'activité de Neutrase à un pH de 6,0.

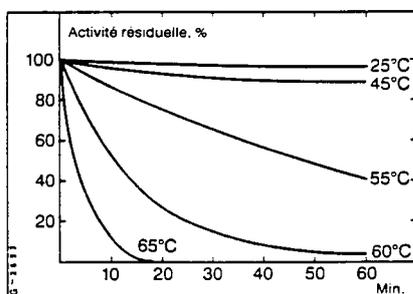


Fig. 3. Stabilité à un pH de 6,0 (tampon phosphate) de Neutrase à différentes températures.

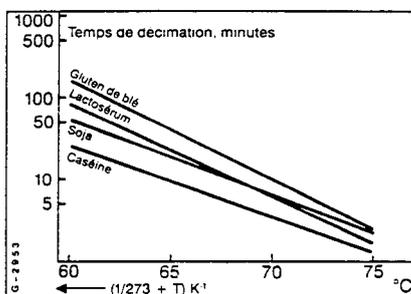


Fig. 4. Inactivation de Neutrase:  $t_d$  à un pH de 7 et avec 8% de protéine.

## Manipulation

Neutrase est formulée de façon à donner le plus haut degré de sécurité durant la manipulation.

Le produit est ininflammable, entièrement miscible à l'eau et sans risque lorsqu'il est utilisé selon les instructions. Les enzymes protéolytiques peuvent irriter la peau et les yeux et la poussière enzymatique peut causer une sensibilisation si on l'inhale.

Prendre les précautions d'usage afin d'éviter le contact direct avec le produit ou l'inhalation de poussière provenant du produit séché. En cas de fuite accidentelle et de contact avec la peau ou les yeux, rincer immédiatement à l'eau.

Les brochures spéciales «Comment manipuler les enzymes liquides Novo Nordisk – en toute sécurité» et «Comment manipuler les enzymes Novo Nordisk en poudre ou en granulés – en toute sécurité» sont disponibles sur demande.

## Stockage

Stockés à 5°C, les produits conservent leur activité déclarée pendant au mois 1 an.

Stockés à 25°C, les produits conservent leur activité déclarée pendant au moins 3 mois et la baisse d'activité mensuelle sera inférieure à 2%.

Neutrase 0.5 L doit être stockée à des températures supérieures à -10°C.

Neutrase 1.5 MG doit être stockée dans un endroit sec et à température constante afin d'éviter la condensation d'eau à l'intérieur du fût, ce qui pourrait accélérer la baisse d'activité.

## Emballage

Neutrase 0.5 L est livrée en jerrycans de 30 kg ou en fûts acier de 250 kg.

Neutrase 1.5 MG est livrée en fûts fibre de 40 kg.

Des emballages spéciaux sont disponibles sur demande.

### Enzyme Process Division

Bioindustrial Group  
Novo Nordisk A/S  
Novo Allé  
2880 Bagsvaerd  
Denmark

Tel. + 45 4444 8888  
Fax + 45 4449 0555  
Telex 37173

ENZYME LIQUIDE

NEUTRASE 0.5 L

**FICHE CONCERNANT LA SECURITE DE LA MATIERE ENZYMATIQUE**

Fabricant: Date de publication: le 1992-02-18  
 Novo Nordisk A/S  
 Novo Allé  
 DK-2880 Bagsvaerd N° de tél.pour informations:+ 45 44 44 88 88  
 Client:

**SECTION I - INFORMATIONS GENERALES**

Code du produit : 352-5058  
 Nom de produit commercial : NEUTRASE 0.5 L  
 Caractérisation chimique : Protéine enzymatique  
 Couleur : Clair - brun  
 Forme : Liquide  
 Odeur : Faible odeur de fermentation  
 Ingrédients dangereux : Poussière enzymatique < 0,1%  
 V.L.S. : Non constatée

**SECTION II - MESURES DE PROTECTION, STOCKAGE ET MANIPULATION****Mesures de protection techniques:**

Eviter la formation de poussière ou d'aérosols. Eviter l'aspersion et le lavage à haute pression. Assurer une bonne ventilation du local pendant la manipulation de ce produit. Stocker les conteneurs au frais.

**Équipement recommandé de protection personnelle:**

Protection respiratoire : Non nécessaire  
 Protection des mains : Non nécessaire  
 Protection des yeux : Non nécessaire

**Hygiène industrielle:**

Maintenir de bonnes conditions d'hygiène industrielle.

**Protection contre l'incendie et les explosions:**

Aucune exigence particulière.

**Élimination:**

Aucune méthode particulière d'élimination n'est requise, sauf celles conformes aux règlements en vigueur fixées par les autorités locales.

**SECTION III - MESURES EN CAS D'ACCIDENT ET D'INCENDIE****Après une fuite accidentelle:**

Éliminer immédiatement le produit répandu afin d'éviter la formation de poussière provenant du produit séché. Ramasser par des moyens mécaniques. Diluer abondamment le reste du produit avec de l'eau (éviter la formation d'aérosols). Assurer une ventilation suffisante.

**Moyens d'extinction adéquats:**

Eau, mousse, halons.

**Premiers secours:**

En cas de contact avec la peau, rincer abondamment avec de l'eau.  
 En cas de contact avec les yeux, rincer abondamment avec de l'eau.

*ENZYME LIQUIDE***SECTION IV - DONNEES PHYSIQUES ET DE PROTECTION**

Solubilité dans l'eau	: Facilement soluble
Solvant alternatif	: Ne s'applique pas
Valeur de pH (sol.de 1%)	: 3.8 - 8.0
Point/température d'inflammation	: Ne s'applique pas
Caratéristiques d'explosion	: Ne s'applique pas
Produits de décomposition dangereux	: Aucun

**SECTION V - INFORMATIONS SUR LA TOXICITE**

L'inhalation de poussière ou d'aérosols résultant de la manipulation contre indiquée (voir sections II et III) peut provoquer des allergies respiratoires chez les personnes prédisposées. La DL-50 -orale chez le rat > 2g/kg - classe le produit comme étant "non toxique".

**SECTION VI - INFORMATIONS SUR LES EFFETS ECOLOGIQUES**

Le produit est facilement biodégradable.

**SECTION VII - CLASSIFICATION DE TRANSPORT**

Type:		Code applicable:
Route/Chemin de fer	: Non classifié	-
Mer	: Non classifié	-
Air	: Non classifié	-

**SECTION VIII - PRESCRIPTIONS REGLEMENTAIRES**

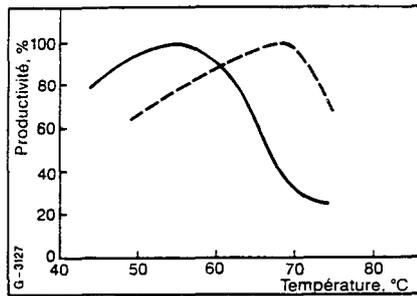
La préparation n'est pas sujette à marquage obligatoire.

**SECTION IX - INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES**

Les informations contenues dans cette fiche concernant la sécurité sont considérées, à la date de leur publication, être véritables et correctes. Cependant, l'exactitude ou l'état complet de ces informations ainsi que toute recommandation ou toute suggestion sont donnés sans garantie.

Les conditions d'utilisation étant hors du contrôle de notre société, il appartient à l'utilisateur de déterminer les conditions de l'utilisation sûre de ce produit. Les informations contenues dans cette fiche ne représentent pas des spécifications analytiques; pour ces spécifications, voir notre fiche technique.

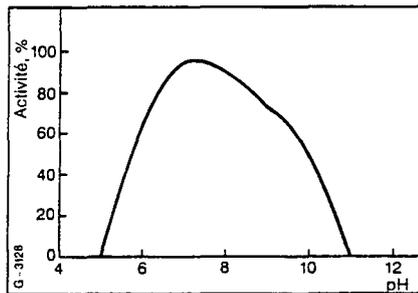




**Fig. 2. Productivité d'Alcalase 2.4 L mesurée à différentes températures en utilisant de la protéine de lactosérum et de soja, ----: protéine de lactosérum, 8%, ———: protéine de soja, 8%.**

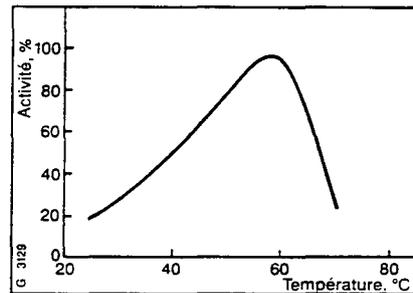
% de protéine: 8,0  
 Dosage d'enzyme (sur protéine): 0,51%  
 pH: 8,0  
 Temps de réaction: 4 heures

Il ressort de la Figure 3 que l'activité optimale d'Alcalase mesurée à différentes valeurs de pH et selon la méthode Anson/hémoglobine modifiée, est obtenue à un pH de 6,5-8,5. De même, sous des conditions analytiques, Alcalase a sa température optimale à environ 60°C (Figure 4).



**Fig. 3. Influence du pH sur l'activité d'Alcalase.**

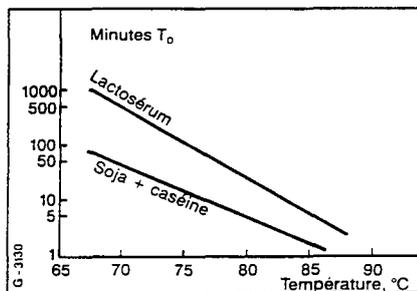
Concentration de l'enzyme: 0.06 AU/litre  
 Température: 60°C  
 Méthode: Analyse Anson/hémoglobine modifiée  
 Temps de réaction: 10 minutes



**Fig. 4. Influence de la température sur l'activité d'Alcalase.**

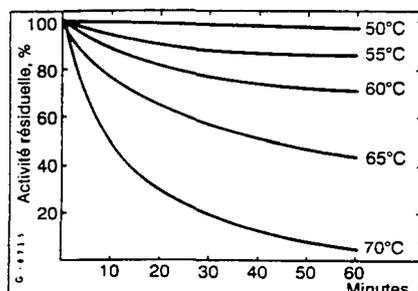
Concentration de l'enzyme: 0.06 AU/litre  
 pH: 8,0  
 Méthode: Analyse Anson/hémoglobine modifiée  
 Temps de réaction: 10 minutes

L'inactivation d'Alcalase ressort de la Figure 5, où le temps de décimation à différentes températures, à pH 7 et à 8% de protéine est illustré. Le temps de décimation est le temps nécessaire pour réduire l'activité 10 fois. Le temps d'inactivation est souvent défini comme 3 fois le temps de décimation, c'est-à-dire le temps nécessaire pour réduire l'activité enzymatique 1000 fois.



**Fig. 5. Temps de décimation ( $t_d$ ) d'Alcalase à pH 7 et 8% de protéine. Inactivation à  $3 \times t_d$ .**

La stabilité d'Alcalase dépend du type et de la concentration des protéines présentes (ce qui ressort des Figures 5 et 2). Dans la Figure 6, la stabilité d'Alcalase est mesurée sans l'effet stabilisant du substrat de protéine.



**Fig. 6. Stabilité d'Alcalase à différentes températures.**

Concentration de l'enzyme: 2,3 AU/litre  
 pH: 8,5  
 Système tampon: Tris-maléate

### Description

Alcalase 2.4 L est un liquide clair, transparent et brun rougeâtre d'une densité d'environ 1,18 g/ml. Alcalase 0.6 L est un liquide brun d'une densité d'environ 1,26 g/ml. Les deux produits sont solubles dans l'eau à toute concentration.

### Spécifications

Alcalase 2.4 L a une activité déclarée de 2,4 Unités Anson par gramme (AU/g), tandis que l'activité déclarée d'Alcalase 0.6 L est de 0,6 AU/g. Leur activité protéolytique est déterminée selon un standard analytique à l'aide de la méthode DMC. La méthode analytique (AF 162) est disponible sur demande.

Le produit est conforme aux spécifications recommandées par FAO/WHO JECFA et FCC pour les enzymes de qualité alimentaire. De plus, nous avons imposé des limites supérieures de  $5 \times 10^4$ /g pour les germes totaux et de  $10^2$ /g pour les moisissures.

### Manipulation

Alcalase est formulée d'une manière permettant de garantir le plus haut degré de sécurité pendant la manipulation.

Le produit est ininflammable, complètement miscible à l'eau, et sûr lorsqu'il est utilisé selon les instructions. La poussière enzymatique et l'aérosol contenant des enzymes peuvent provoquer une sensibilisation en cas d'inhalation. Prendre les précautions d'emploi d'usage afin d'éviter le contact direct avec le produit et l'inhalation de poussière provenant du produit séché. En cas de perte accidentelle et de contact avec la peau ou les yeux, rincer immédiatement à l'eau.

Une brochure spéciale de Novo Nordisk, «Comment manipuler les enzymes liquides Novo Nordisk – en toute sécurité» (B 144), est disponible sur demande.

### Stockage

Lorsque le produit est stocké à 5°C, il maintient l'activité déclarée pendant au moins un an. Stocké à 25°C, il maintient l'activité déclarée pendant au moins trois mois.

### Emballage standard

Alcalase 2.4 L est disponible en fûts acier contenant 250 kg et en jerrycans contenant 30 kg.

ENZYME PROTEASE LIQUIDE

ALCALASE 2.4 L, TYPE FG

---

**SECTION IV - DONNEES PHYSIQUES ET DE PROTECTION**


---

Solubilité dans l'eau	: Soluble
Solvant alternatif	: Ne s'applique pas
Valeur de pH	: 3.8 - 8.0
Point/température d'inflammation	: Ne s'applique pas
Caratéristiques d'explosion	: Ne s'applique pas
Produits de décomposition dangereux	: Aucun

---

**SECTION V - INFORMATIONS SUR LA TOXICITE**


---

L'inhalation d'aérosols résultant de la manipulation contre indiquée (voir sections II et III) peut provoquer des allergies respiratoires chez les personnes prédisposées. Le contact prolongé avec la peau peut provoquer une irritation mineure. Le produit irrite les yeux. La DL-50 - orale chez le rat > 2g/kg - classe le produit comme étant "non toxique".

---

**SECTION VI - INFORMATIONS SUR LES EFFETS ECOLOGIQUES**


---

Le produit est facilement biodégradable.

---

**SECTION VII - CLASSIFICATION DE TRANSPORT**


---

Type:		Code applicable:
Route/Chemin de fer	: Non classifié	-
Mer	: Non classifié	-
Air	: Non classifié	-

---

**SECTION VIII - PRESCRIPTIONS REGLEMENTAIRES**


---

Le produit est une préparation dangereuse dans le sens du règlement CEE (83/467) par suite de ses propriétés irritantes.

Marquage: Xi (irritant)

R-36: Irritant pour les yeux

S-26: En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

---

**SECTION IX - INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES**


---

Les informations contenues dans cette fiche concernant la sécurité sont considérées, à la date de leur publication, être véritables et correctes. Cependant, l'exactitude ou l'état complet de ces informations ainsi que toute recommandation ou toute suggestion sont donnés sans garantie.

Les conditions d'utilisation étant hors du contrôle de notre société, il appartient à l'utilisateur de déterminer les conditions de l'utilisation sûre de ce produit. Les informations contenues dans cette fiche ne représentent pas des spécifications analytiques; pour ces spécifications, voir notre fiche technique.

## ***ANNEXE II : PLAN D'EXPERIENCES***

## Terminologie nécessaire à la compréhension de la méthodologie des plans d'expériences.

**Facteur** : Ce qui peut avoir une influence sur le phénomène étudié. Ce facteur peut être une grandeur continue (température, pH, temps) ou discontinue (influence d'un réactif A ou B sur un système, vanne ouverte ou fermée).

**Facteur influent** : c'est un facteur qui, lorsqu'il est modifié modifie la réponse du système.

**Variable centrée réduite** : l'utilisation des variables centrées réduites simplifie le calcul matriciel. L'intérêt est de présenter les matrices d'expériences de la même manière, quelque soient les domaines retenus et quelque soient les facteurs. Cela revient à effectuer un changement d'origine et un changement d'unité de mesure permettant de traiter tous les facteurs (quantitatifs et qualitatifs) de la même manière. Les variables centrées réduites ne sont plus dépendantes des unités (sans dimension) et peuvent donc être comparées entre elles.

$$x_{ij} = \frac{A_{ij} - A_j^{(0)}}{C_j}$$

$x_{ij}$  = variable centrée réduite pour la variable naturelle j à l'expérience i.

$A_{ij}$  = valeur du facteur j à l'expérience i.

$A_j^{(0)}$  = valeur du facteur j au centre du domaine expérimental.

$C_j$  = facteur de réduction (ou pas de variation).

**Niveau d'un facteur** : Ce sont les états que vont prendre la variable à l'intérieur du domaine expérimental.

**Domaine expérimental**: espace dans lequel peuvent varier les facteurs, mais qui est limité par les contraintes expérimentales, techniques ou économiques.

**Domaine d'intérêt** : il est parfois nécessaire de restreindre le domaine expérimental en fonction de la connaissance que l'on a du système. Le choix de ce dernier est important car s'il est trop étendu, un modèle simple risque de ne pas bien représenter le phénomène, et par contre, s'il est trop restreint, il ne permettra pas une extrapolation.

**Plan d'expérimentation** : ensemble de conditions expérimentales représentant des expériences qui sont réalisées indépendamment les unes des autres, mais dont l'interprétation devra tenir compte de l'ensemble des réponses de ces expériences.

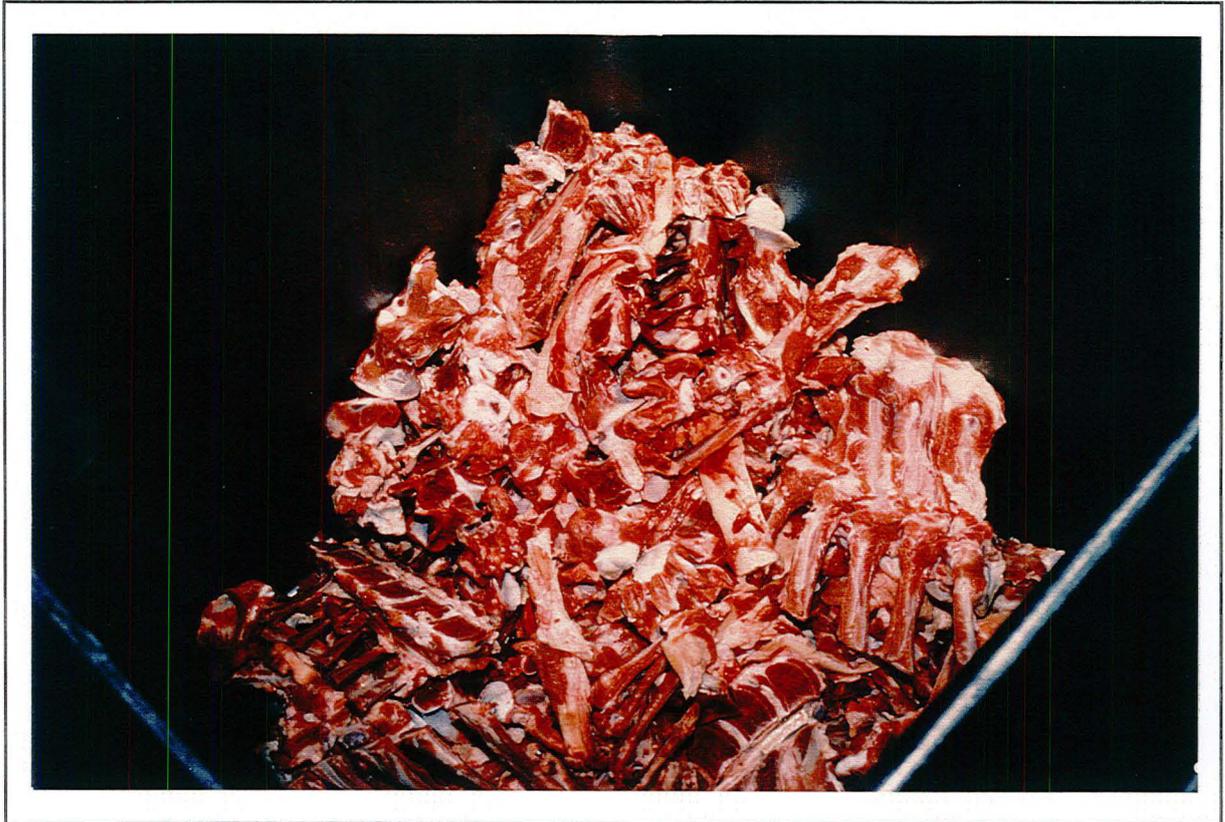
**Réponse** : c'est le résultat expérimental noté  $Y$ , d'une expérience qui peut être quantitative (rendement, pureté, teneur en azote) ou bien qualitative (présence ou non de coulure). Les réponses quantitatives sont généralement plus facile à traiter.

La réponse théorique, notée  $\eta$  est la valeur de la réponse obtenue sans la présence de l'erreur expérimentale.

**Effet d'un facteur** : c'est le changement qui se produit sur la réponse lorsque l'on change de niveau. Pour étudier l'effet d'un facteur, ce dernier doit pouvoir être fixé à au moins deux niveaux distincts.

**Interaction** : il existe une interaction entre deux facteurs A et B si l'effet de A dépend du niveau de B et inversement.

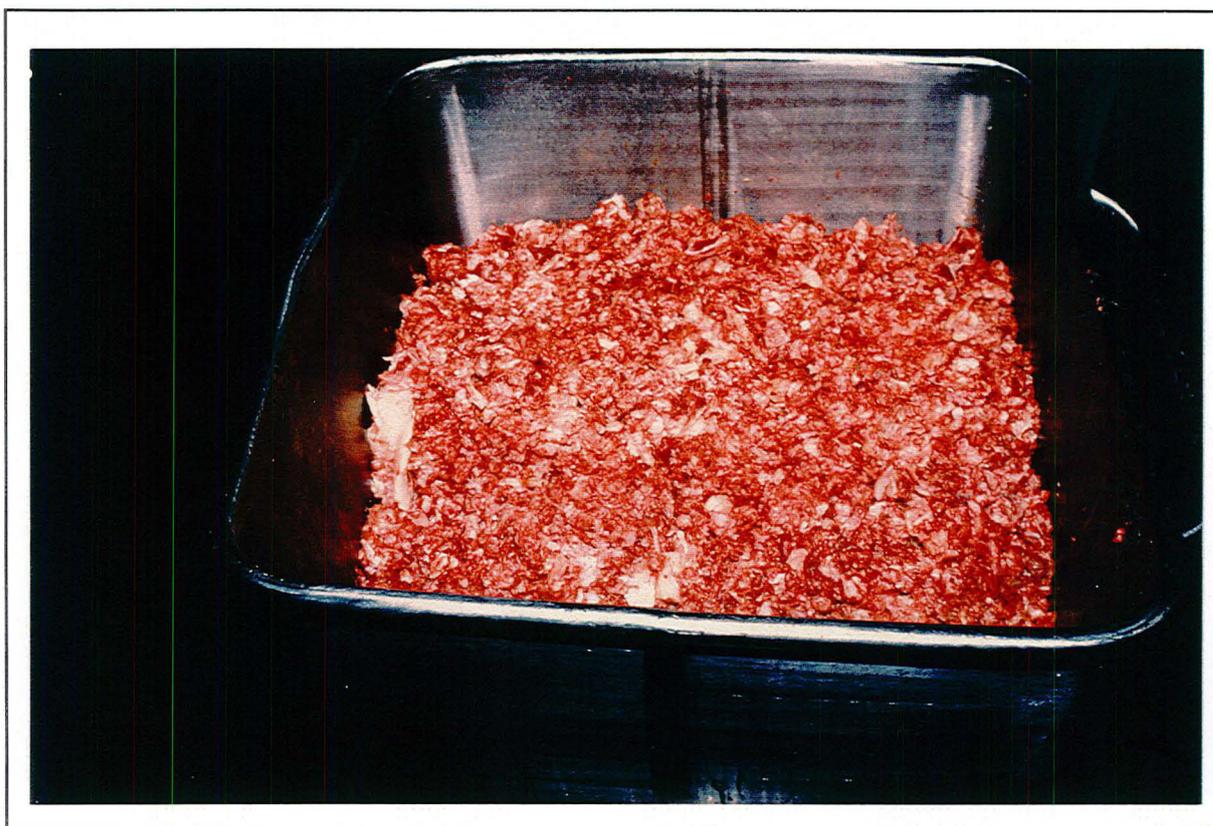
***ANNEXE III : PROCÉDES***



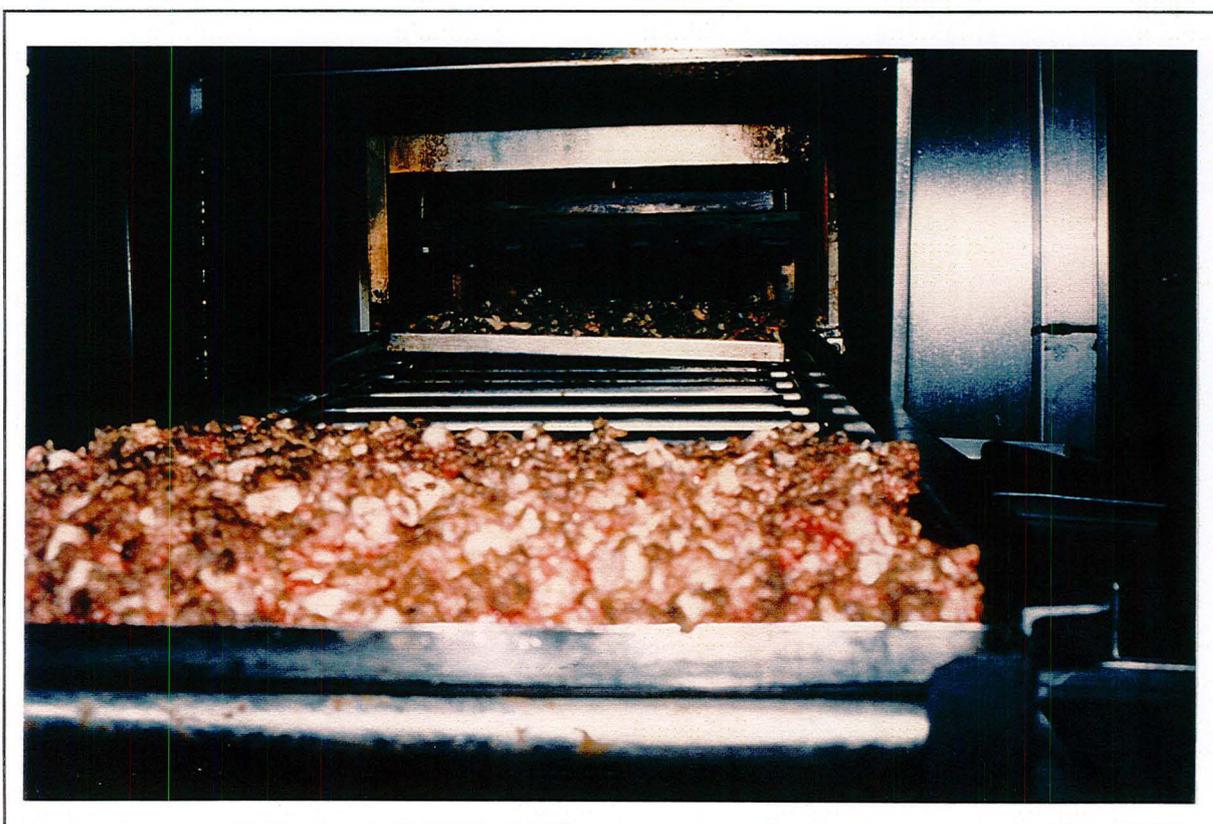
**Annexe III. Figure 1 :** Co-produits de veau en sortie de salle de désossage.



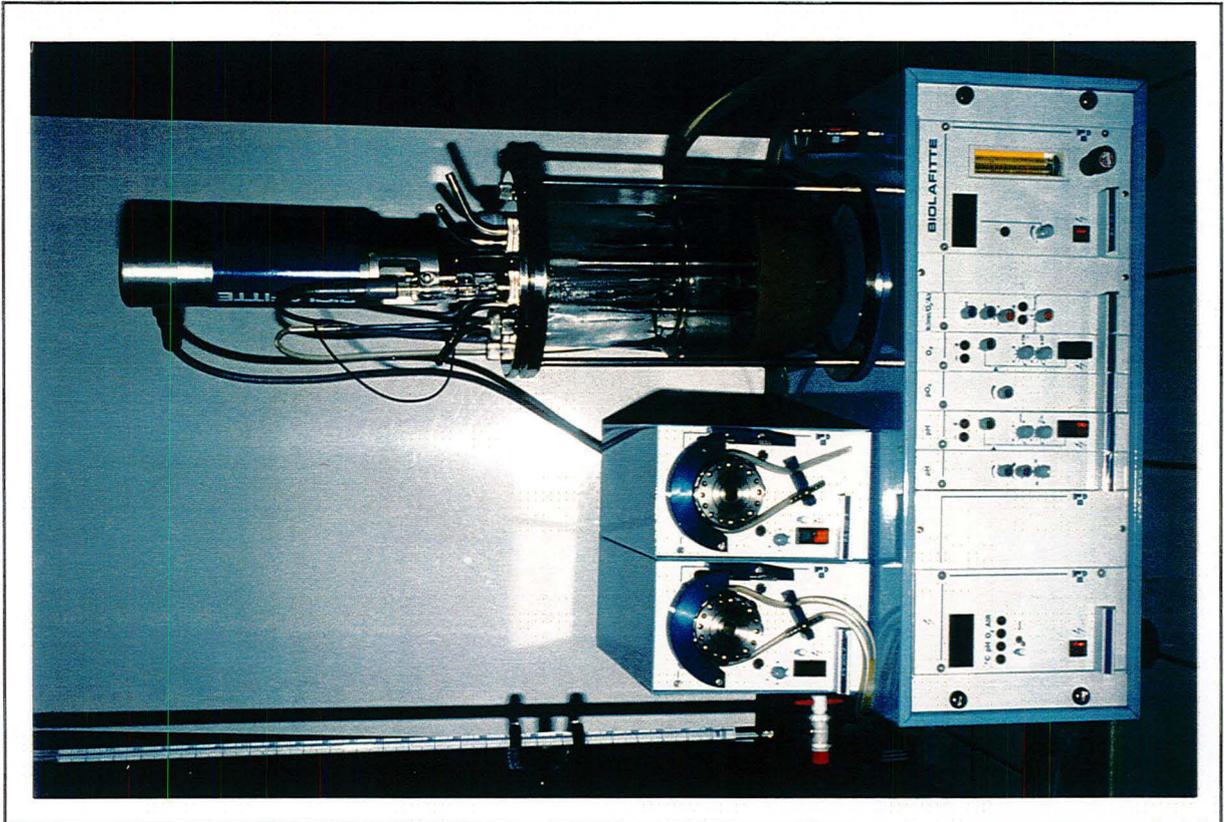
**Annexe III. Figure 2 :** Les différents types de tissus protéiques.



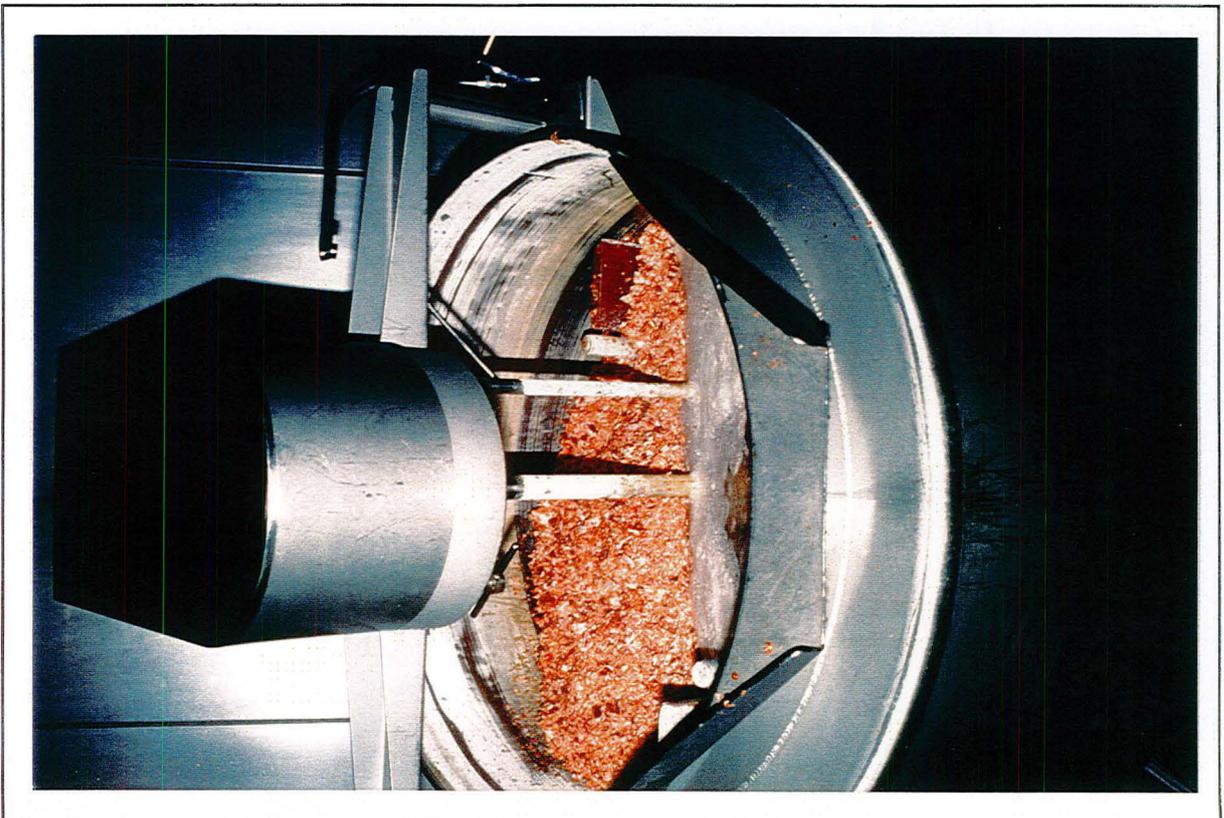
**Annexe III. Figure 3 :** Co-produits de veau concassés (taille des morceaux : 2 - 5 cm).



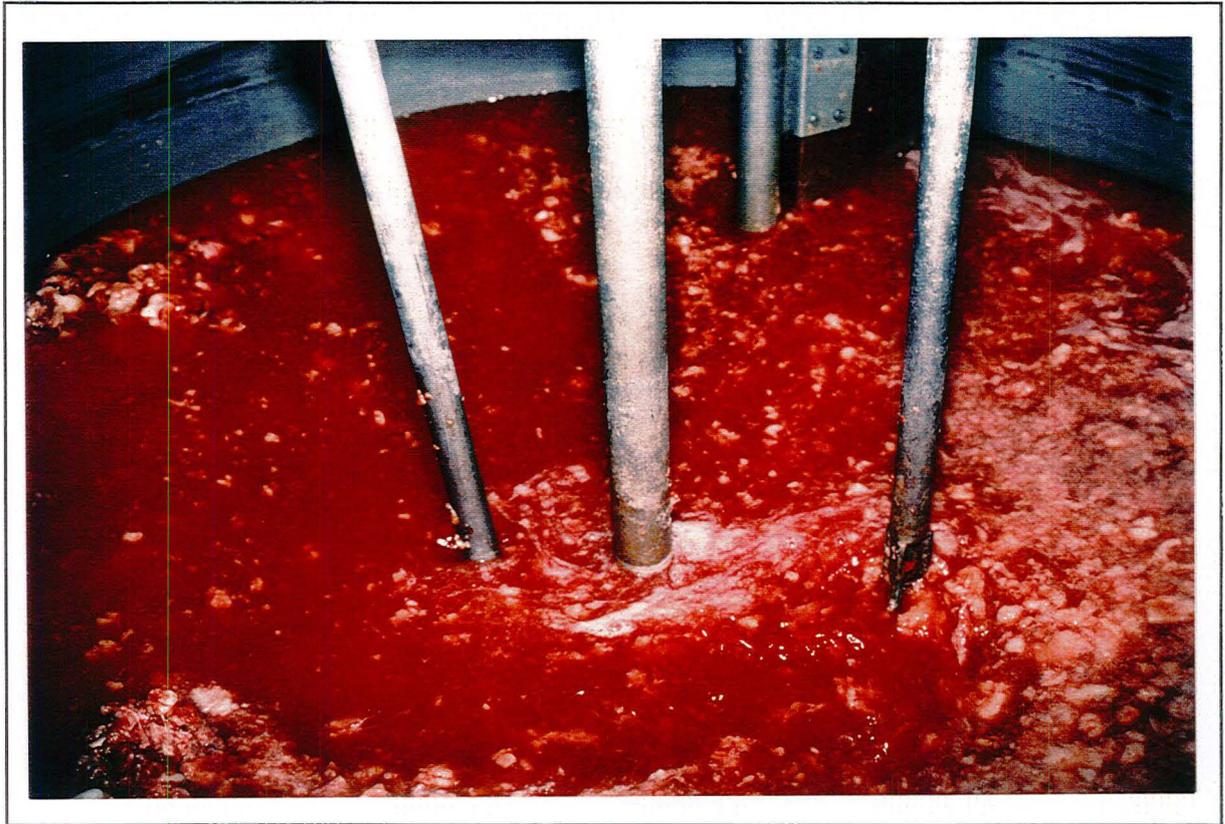
**Annexe III. Figure 4 :** Etape de rôtissage des co-produits de veau avant le procédé d'extraction protéique par voie enzymatique.



**Annexe III. Figure 5 :** Expérimentation à l'échelle du laboratoire. Réacteur de 2 litres Biolafitte thermostaté, avec agitation contrôlée et régulation de pH.



**Annexe III. Figure 6 :** Expérimentation à l'échelle pilote. Réacteur basculant de 400 litres Capic à agitation contrôlée, thermostaté, équipé d'une injection de vapeur dans la cuve.



**Annexe III. Figure 7 :** Substrat (co-produits de veau concassés en solution) sous agitation à la température de 50°C.



**Annexe III. Figure 8 :** Réaction enzymatique (55°C) après traitement thermique (85°C, 15 mn) permettant une solubilisation partielle des graisses et des tissus conjonctifs.



**Annexe III. Figure 9 :** Traitement thermique par injection de vapeur dans la solution hétérogène, nécessaire à l'inactivation enzymatique (95°C, 20 mn).



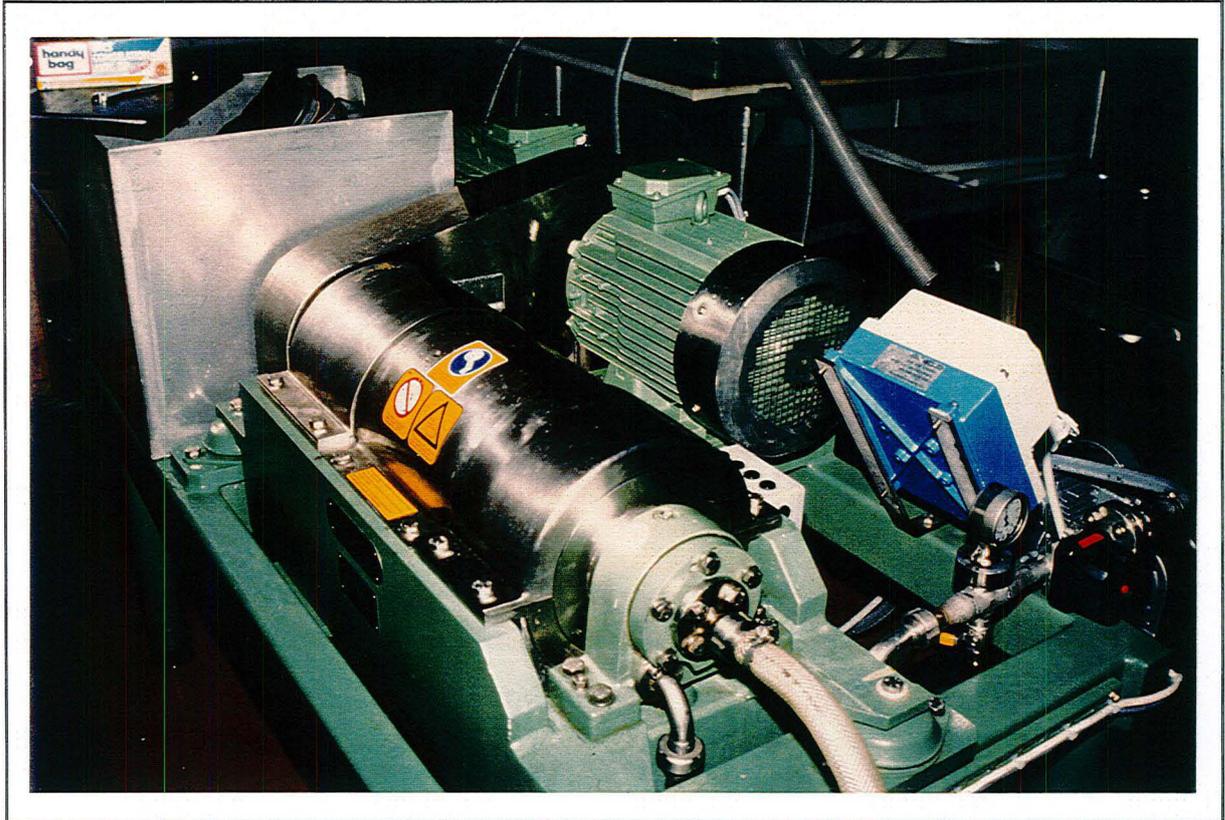
**Annexe III. Figure 10 :** Hydrolysats protéiques et résidus des co-produits de veau après traitement thermique nécessaire à la dénaturation des protéases.



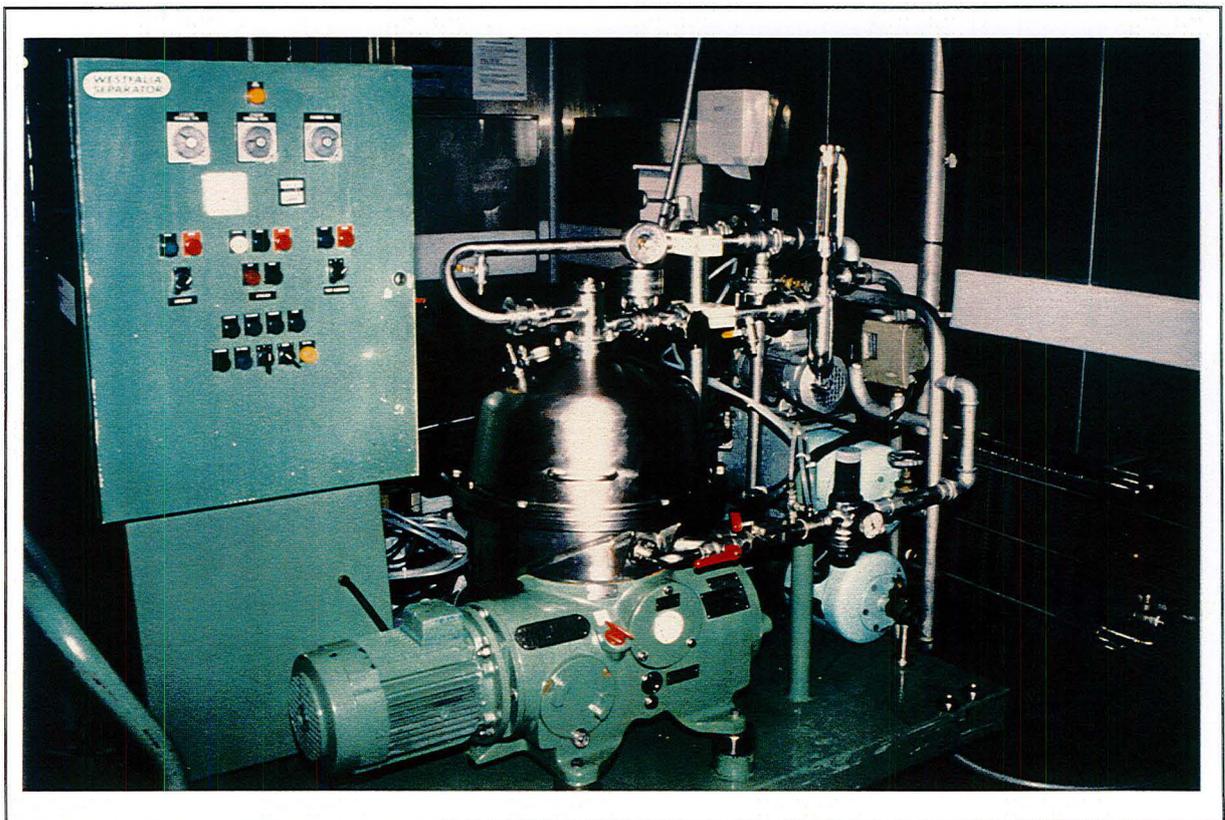
**Annexe III. Figure 11 :** Exemple de production d'hydrolysate protéique ne présentant pas de propriétés gélifiantes (proportion importante de tissus conjonctifs non hydrolysés).



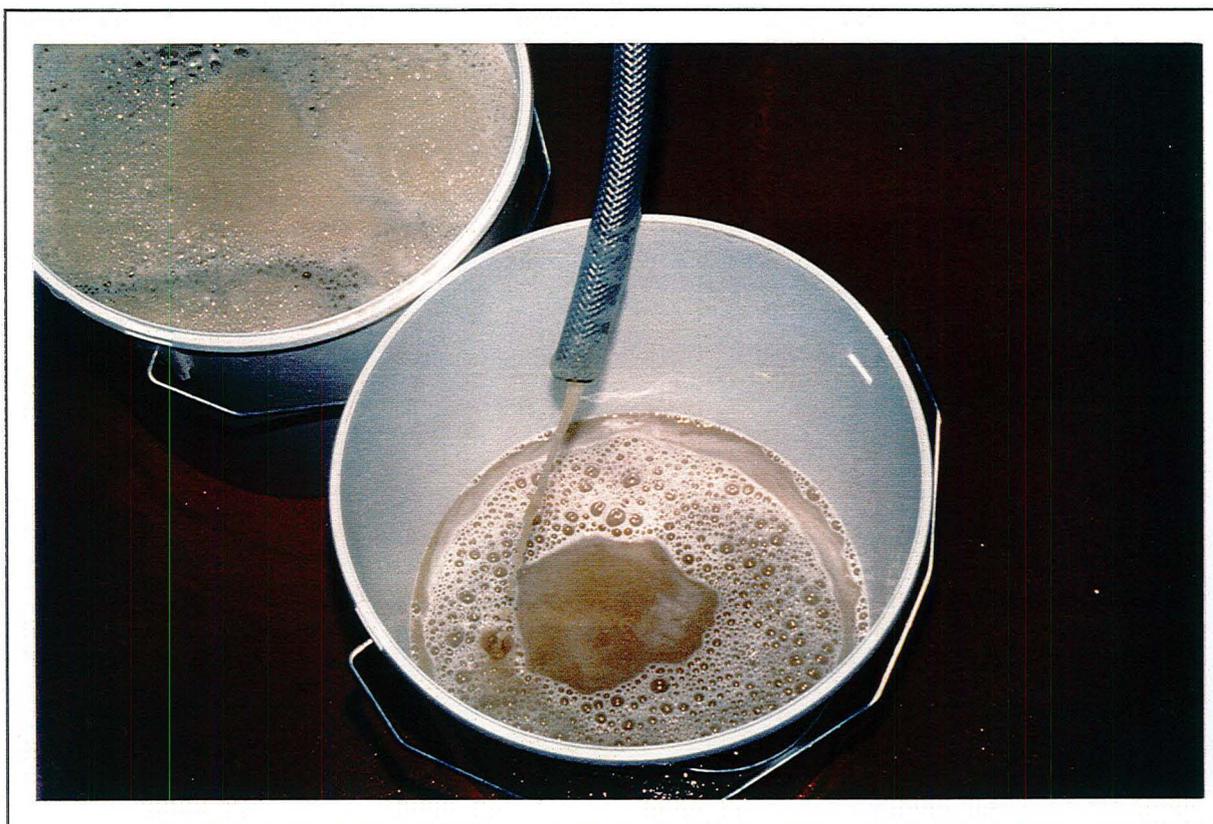
**Annexe III. Figure 12 :** Exemple de production d'hydrolysate protéique présentant un caractère gélifiant.



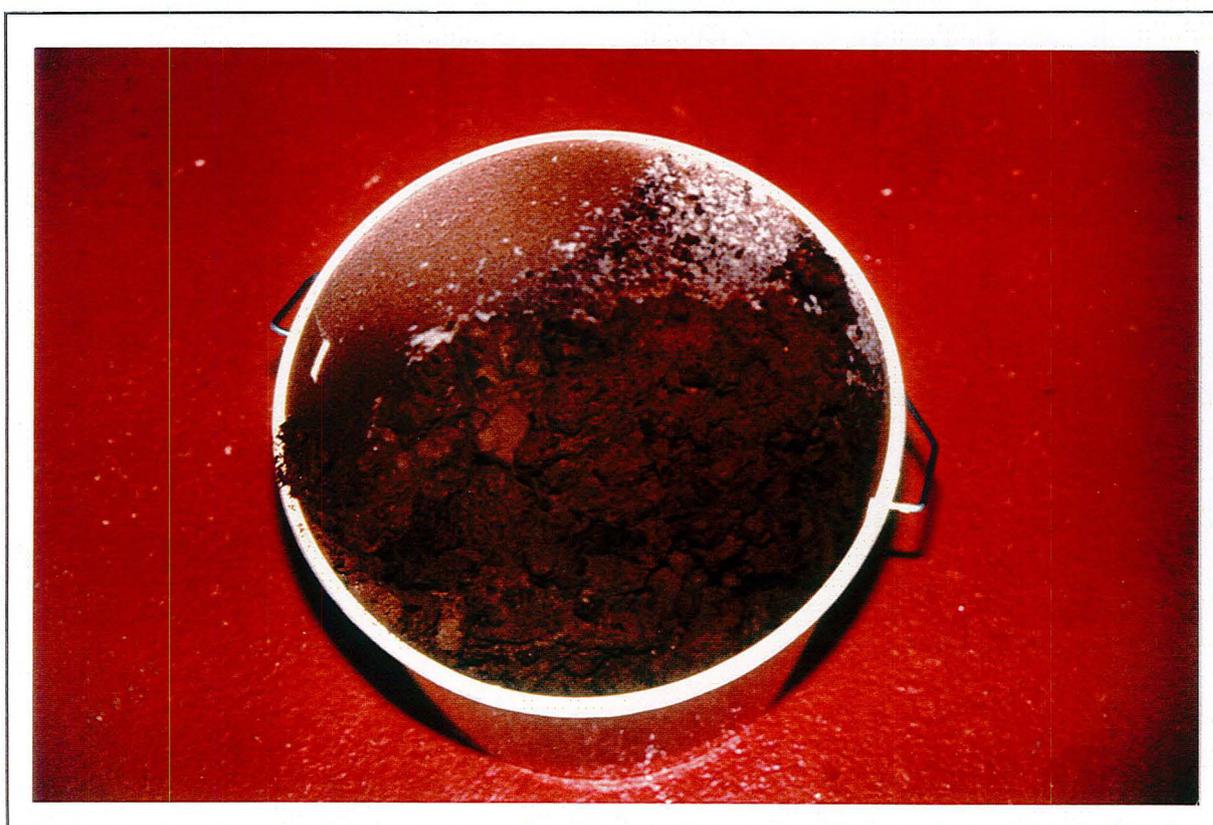
Annexe III. Figure 13 : Etape de clarification des hydrolysats de co-produits de veau sur décanteur - clarificateur (Westfalia type CA 150-01-33).



Annexe III. Figure 14 : Etape de clarification des hydrolysats de co-produits de veau sur centrifugeuse Westfalia type NA7, suivie d'un refroidissement sur échangeur de chaleur Vicarb.



**Annexe III. Figure 15 :** Hydrolysât protéique obtenu après étape de clarification (surnageant protéique).



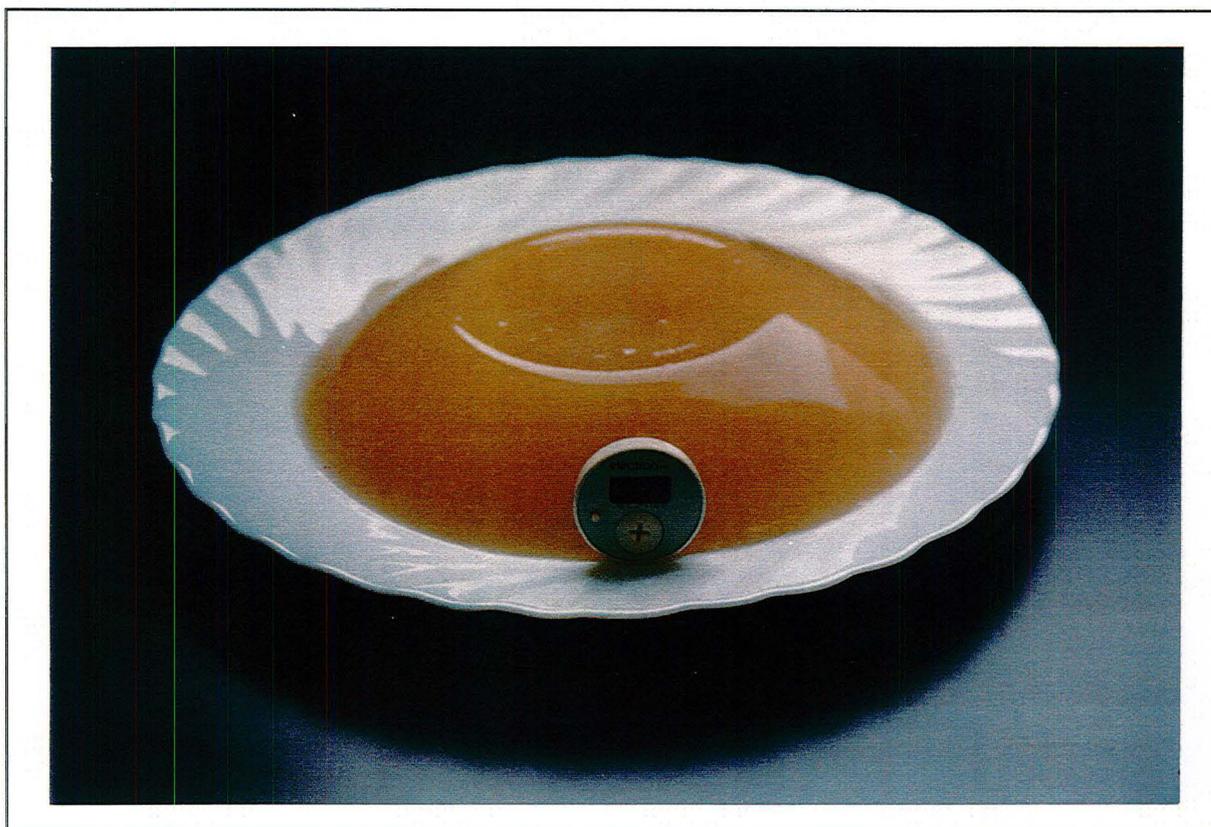
**Annexe III. Figure 16 :** Fraction protéique "lourde" obtenue à partir du décanteur horizontal.



Annexe III. Figure 17 : Fraction lipidique obtenue pendant la clarification.



Annexe III. Figure 18 : Résidus osseux et fractions protéiques non hydrolysées.



**Annexe III. Figure 19 :** Exemple d'hydrolysats protéiques dégraissés de co-produits de veau, présentant un caractère gélifiant.



**Annexe III. Figure 20 :** Exemple d'hydrolysats protéiques dégraissés de co-produit de veau, présentant un caractère gélifiant.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur GROS Jean-Bernard, Professeur, Université Clermont II,  
Monsieur PHAN-TAN-LUU Roger, Professeur, Université Marseille.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Monsieur LINDER Michel**

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Optimisation d'un procédé de valorisation de co-produits d'abattage  
par hydrolyse enzymatique. Propriétés fonctionnelles et  
nutritionnelles des hydrolysats".**

NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 5 4 5 0 1  
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE  
LORRAINE**

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, **8 Janvier 1996**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS

Pour le Président  
Le Vice-Président

  
J. Ch. CHEVRIER



**Service Commun de la Documentation  
INPL  
Nancy-Brabois**

La valorisation de co-produits d'abattage représente un enjeu économique dans les entreprises de transformation de la viande. Le premier objectif de ce travail porte sur le paramétrage et l'optimisation d'un procédé d'obtention de fractions protéiques par hydrolyse enzymatique ménagée.

L'utilisation de la Méthodologie de la Recherche Expérimentale permet de quantifier l'influence et les interactions des facteurs (pH, température, concentration en enzymes, concentration en protéines, durée d'hydrolyse), en réacteur discontinu. La modélisation par méthode empirique du procédé d'hydrolyse, utilise une matrice de Doehlert autorisant sept niveaux différents pour les variables les plus sensibles. Le modèle quadratique obtenu conduit à l'optimisation des facteurs par la méthode des surfaces de réponse. Cette première partie du travail, destinée à limiter et quantifier les facteurs influents au stade industriel, montre que la durée d'hydrolyse et la concentration en enzyme sont les paramètres importants à maîtriser.

L'étude des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles représente la deuxième partie de ce travail. Les propriétés d'hydratation et émulsifiantes d'hydrolysats protéiques issus de co-produits de veau ont été étudiées en fonction du degré d'hydrolyse et de la concentration protéique. Les résultats montrent qu'une hydrolyse enzymatique ménagée améliore les qualités fonctionnelles des hydrolysats. Les expérimentations réalisées industriellement en réacteur discontinu de 400 litres permettent, en fonction de la nature et de la spécificité de l'enzyme, d'obtenir des hydrolysats aptes à la gélification, propriété particulièrement recherchée. Un traitement thermique adapté, nécessaire à l'inactivation des protéases et à la solubilisation des tissus collagéniques, augmente la qualité microbiologique, tout en préservant les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des produits. La valeur nutritionnelle des hydrolysats industriels, destinés à l'alimentation humaine, a été mesurée *in vivo* et *in vitro*.

Enfin l'évaluation économique du procédé a été effectuée, en tenant compte de l'utilisation potentielle des hydrolysats au sein de l'entreprise.

---

Meat by-products valorization is an economical challenge for the meat industry.

In the first part of this work, the use of Response Surface Methodology led to quantify the effects and the interactions of different variables (pH, temperature, enzyme concentration, protein concentration, hydrolysis time) in a batch reactor. An empirical model using a Doehlert matrix was developed to account for the overall interactions between parameters and allow selection of the most efficient monitoring parameters on a larger scale.

In a second part, functional and nutritional properties of veal by-product hydrolysates were investigated under mild hydrolysis conditions. In a pilot batch reactor (400 L), the nature and the specificity of the protease allowed obtention of gelling hydrolysates. A specific heat treatment (improving microbiological quality as well as preservation of functional and nutritional properties), was applied for enzyme denaturation and collagen solubilisation. Nutritional value of veal by-product hydrolysates for human consumption was determined by *in vitro* and *in vivo* methods. Economical evaluation of the process was also investigated.