

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

N°...../SNV/2016

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

HADDOU Fairouz et BESSEGHIR Djamila

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

En Hydrobiologie Marine et Continentale

Spécialité: EXPLOITATION ET PROTECTION DES RESSOURCES
MARINES VIVANTES

THÈME

**Contribution à l'étude biochimique et microbiologique des
coproduits de la mer : cas du thon rouge *Thunnus thynnus* (Linné,
1758)**

Soutenu publiquement le 02 /07 /2017

DEVANT LE JURY

Président	M^{er}. BACHIR BOUIADJRA.B	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	M^{me}. SOUALILI. D.L	Pr	U. Mostaganem
Examineurs	M^r. BOUZAZA. Z	MAA	U. Mostaganem
Co .Encadreur	M^{elle}. OULHIZ. A	MAA	U. Mostaganem

Année universitaire : 2016 /2017

REMERCIEMENTS

Je remercie « Allah » de m'avoir donnée la santé, le courage et la volonté pour achever notre travail

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, je remercie Dr.Bouiadjra.B, En tant que Président des jurés. Mm Soualili .D l'encadreur qui m'a guidé dans mon travail et m'a aidé à trouver des solutions pour avancer. Mr Bouzaza.Z l'examineur. Melle Oulhiz co.encadreur.

Je remercie aussi Mr Benkhelfa.M et Mr Azzouz.R les techniciens de laboratoire, sans oublié le responsables des labos Mr Soanne.A

DEDICACES

Je dédie ce mémoire à mon honorable mère qui est le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Pour mon père qui tout au long de sa vie n'a ménager ces efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères et sœurs qui étaient à mes côtés dans les moments les plus difficiles

A tous mes amis Karima, Djamila et Hamza je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

fairouz

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

*Celui qui représente pour moi l 'exemple du courage et de la générosité,
mon très cher papa*

*Celle pour laquelle je dois tout et je ne rendrais jamais assez, ma très
chère Mama.*

*Dieu merci de m 'avoir donné ces deux personnes qui n 'ont cessé de
veiller à mon bien être, à m 'assurer un cadre de vie agréable et une
éducation exemplaire.*

*A ma très chères (sœurs/frères) : Toujours à mes côtés tout au
long de mon itinéraire universitaire, en me prodiguant des conseils et
avis de façon continue*

A mes oncles, tentes, Toute ma grande famille :

A toutes mes amies : Karima,fairouz :

A tous mes professeurs, toute ma promotion d'EPRMV

Djamila

Sommaire

Tableau de matière

Liste des figures.....	a
Liste des tableaux.....	b
Liste des abréviations.....	c
Introduction	01

Chapitre I partie I : Généralité sur le thon

I. Généralité sur le thon.....	02
I.1 Le thon rouge et son exploitation.....	02
I.1.1 Présentation de l'espèce étudiée.....	03
I.1.2 Classification.....	03
-Description.....	04
I.1.3. Mode de vie.....	04
I.1.4 Répartition géographique.....	05
I.1.5 Valeur nutritive	06
I.1.6. Composition biochimique du thon.....	07
• Acides gras oméga-3.....	07
• Protéines.....	07
• Phosphore.....	08
• Sélénium.....	08
• Acide pantothénique.....	08
• Vitamine A.....	08
• Vitamine B1.....	09
• Vitamine B2.....	09
• Vitamine B3.....	09
• Vitamine B5.....	09
• Vitamine B6.....	09
• Vitamine B12.....	10
• Vitamine D.....	10
• Magnésium.....	10
• Fer.....	10

Sommaire

I.1.7 Reproduction en captivité.....	11
-Taille, poids maximum (publiés).....	11
-Les origines du thon	12

Partie II : valorisation des coproduit

II. Valorisation des coproduit de poissons.....	13
II.1. les co-produits de poisson.....	13
II.2 Utilisation des co-produits de poisson.....	14
II.3 Importance et valorisation des coproduits.....	15
II.3.1 Farine et huile de poisson.....	16
II.3.1.1. La farine de poisson.....	16
II.3.1.2 L'huile de poisson.....	17
II.3.1.3.Fabrication de farine et de l'huile de poisson.....	18
II.3.2 Les isolats de protéines légèrement modifiées par hydrolyse	20
II.3.3 Hydrolysats.....	21
II.3.3.1 Hydrolyse chimique.....	21
II.3.3.2 Hydrolyse enzymatique.....	21
II.3.3.3 Autolysats.....	22

Partie III : les milieux de culture

III. Les milieux de culture du domaine de la microbiologie	23
III.1 Définition d'un milieu de culture.....	23
III.1.1 Milieu de culture minimum..... ;.....	24
III .1.2Milieu de culture empirique.....	14
III.2 Milieu d'isolement.....	24
III.2.1 Milieux d'identification.....	24
III.2.2 Milieux de conservation.....	25

Sommaire

➤ Milieu de culture sélectif.....	25
➤ Milieu de culture enrichi.....	25
➤ Milieu synthétique.....	25
➤ Milieu semi-synthétique.....	26
➤ Milieu ordinaire.....	26
➤ Milieu différentiel.....	26
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1 Présentation de l'échantillon.....	27
II.1 Collecte des co-produits de thon.....	27
II.1.2 Préparation des déchets à analysés.....	27
II.1.3 Préparation de l'isolat protéique.....	28
II.1.4 Préparation de l'hydrolysate chimique.....	30
II.1.4.1 L'hydrolyse acide.....	30
II.1.4.2 L'hydrolyse alcaline.....	30
II.2 Les analyses biochimiques des échantillons.....	32
II.2.1 Dosage de la teneur en eau.....	32
II.2.2 Dosage de la teneur en cendres.....	33
II.2.3 Dosage de la teneur en protéines (méthode de Kjeldahl).....	33
II.2.4 Dosage de la teneur en matière grasse.....	36
II.3 L'étude microbiologique.....	37
II.3.1 Préparation de la solution mère et les dilutions décimales.....	37
II.3.2. Dénombrement de FTAM, levure et de champignon.....	38
II.3.3. Préparation des milieux de culture.....	39
✚ Composition des milieux de culture (MRS – TGEA - OGA et PCA).....	39
➤ Préparation des Milieux de culture MRS.....	39
➤ Préparation des Milieux de culture TGEA.....	39
➤ Milieu de culture OGA.....	40
➤ Préparation des milieux de culture PCA.....	40

Sommaire

La préparation d'un milieu de culture pour des bactéries lactiques	40
La Préparation d'un milieu de culture pour des bactéries E. coli	40
II. 3.4.1 Les souches bactérienne utilisées.....	41
➤ Bactéries lactiques.....	41
➤ Escherichia coli.....	41
II.3.5 Utilisation de la poudre du thon comme source de bactéries lactiques.....	42
Chapitre III : Résultat et discussion	
III.1Préparation des hydrolysats et isolat protéique.....	44
III.3 L'analyses microbiologiques.....	46
III.3.1 Evaluation de la charge microbienne de l'échantillon (déchet de thon).....	46
III.3.2 Evaluation de la contamination par les champignons et levures de l'échantillon (déchet de thon).....	47
III.3.2.1 Isolement de la souche de levure retrouvée.....	48
III.3.4 l'étude microbiologique sur les milieux de culture modifiés.....	48
III.3.4.1 les milieux de culture pour une bactérie non exigeante (gélose TGEA).....	49
III.3.4.2 les milieux de culture pour une bactérie lactique (gélose MRS).....	50
III.3.5 Déchet de poisson comme source de bactéries lactiques	52

Sommaire

Résumé

Résumé

Dans les dernières décennies, la demande en excès pour le thon rouge en méditerranée, pose un problème de déversement des déchets (coproduits) dans les différents environnements ce qui accentue la pollution.

Donc, notre travail a pour objectif de valoriser ces coproduits dans le domaine de la microbiologie, afin de les utiliser comme source de protéines composant des milieux de culture pour microorganismes. Puis nous avons étudié la possibilité d'utiliser les coproduits du thon comme source de bactéries à intérêt industriel entre autres les bactéries lactiques.

D'après les résultats obtenus à travers les analyses biochimiques, on a trouvé que la poudre de déchet de thon (farine de poisson) et l'isolat protéique obtenu ont une haute valeur biologique suivi par les hydrolysats chimiques avec des caractéristiques biochimiques non négligeables. Les résultats de préparation des milieux de culture nous a confirmés les même résultats biochimique : les deux produits (poudre et isolat protéique) peut remplacer les éléments de base dans la préparation des milieux de culture destinés à la microbiologie et la croissance bactérienne et fongique.

Mot clés : thon rouge, *Thunnus thynnus*, coproduit, valorisation, hydrolysats, microbiologie.

Résumé

Summary

In recent decades, the excess demand for bluefin tuna in the Mediterranean , has created a problem of waste dumping (co-produced) in different environments, which accentuates pollution.

So our job is to enhance co-products in the field of microbiology, In order to use them as a source of proteins composing culture media for microorganisms. We then studied the possibility of using tuna by-products as a source of bacteria of industrial interest, including lactic acid bacteria.

From the results obtained through biochemical analyzes, it has been found that the tuna waste powder (fish meal) and the obtained protein isolate have a high biological value followed by chemical hydrolysates with biochemical characteristics which are not negligible. The results of preparation of the culture media confirmed the same biochemical results: The two products (powder and protein isolate) can replace the basic elements in the preparation of culture media for microbiology and bacterial and fungal growth.

Key words: bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, co-produced, valorisation, hydrolysates, microbiology.

Liste des figures

Figure 01 : Technique de pêche par senne (source IFREMER).....	03
Figure 02 : Thon rouge de l'Atlantique.....	04
Figure 03 : Zone d'habitat du thon rouge (Source : CICTA).....	06
Figure 04 : Produits principaux et co-produits provenant de la filière de transformation du thon.....	13
Figure 05 : Schéma illustrant la composition des co-produits de thon, exprimée en pourcentage du poids.....	14
Figure 06 : Farine de poisson.....	16
Figure 07 : L'utilisation mondiale de farine (Schippe, 2008).....	17
Figure 08 : Huile poisson sous forme liquide et gélule.....	18
Figure 09 : L'utilisation mondiale de l'huile de poisson (Schippe, 2008).....	18
Figure 10 : Schéma de fabrication de la farine et huile de poisson (Ifremer 2009).....	19
Figure 11 : Le thon rouge et la partie rejetée (les coproduits).....	27
Figure 12 : Diagramme de fabrication d'un isolat protéique.....	29
Figure 13 : Diagramme de préparation des hydrolysats chimiques.....	31
Figure 14 : Appareil de minéralisation.....	34
Figure 15 : montage de l'appareil de distillation.....	35
Figure 16 : le titrage.....	35
Figure 17 : Ampoule à décanter et Rote à vape.....	36
Figure 18 : Méthode de préparation des dilutions décimales.....	37
Figure 19 : image macroscopique de levure.....	47
Figure 20 : Aspect macroscopique de la souche de levure isolée.....	48
Figure 21 : Aspect macroscopique de la souche <i>E. Coli</i> sur la gélose TGEA témoin.....	49
Figure 22 : résultats d'ensemencement des bactéries lactiques (A) sur la gélose MRS témoin, (B) la gélose MRSM (la poudre) et (C) la gélose MRSM (Isolat protéique), (D) la gélose	

Liste des figures

MRSM (A. Acétique), (E) la gélose MRSM (NaOH) et (F) la gélose MRSM (HCl) après l'incubation.....	49
Figure 23: Aspect de la souche sur la gélose MRS témoin.....	50
Figure 24 : résultats d'ensemencement des bactéries lactiques (A) sur la gélose MRSM1, (B) la gélose MRS témoin a pré l'incubation.....	50
Figure 25 : Aspect des colonies (A) sur la gélose de MRSM2 de l'isolat protéique, (B) sur la gélose MRS témoin.....	51
Figure 26 : La croissance de la bactérie lactique sur les milieux modifiés par les hydrolysats protéiques obtenus par la méthode chimique : (A) MRSM3, (B) MRSM4 et MRSM5.....	52
Figure 27 : résultat positif de la présence des bactéries lactiques sur MRS bouillon.....	52
Figure 28 : (A) Aspet de la bactérie lactique en milieu MRS, (B) resultat de coloration de grame de la bacterie.....	53

Liste des Tableau

Tableau 01 : Le thon est aussi une source indispensable de protéines.....	11
Tableau 02 : Utilisation potentielle des co-produits.....	15
Tableau 03 : Les rendements massiques pour l'isolat protéique et hydrolysate chimique.....	44
Tableau04 : Résultat des analyse biochimiques (eau, cendre, lipide, protéine) exprimé en (%) des différents échantillons.....	45
Tableau 05 : Nombre de colonies de la flore mésophiles obtenue dans les différentes dilutions du déchet de thon.....	47

Liste des abréviations

HCl: Chlorure d'hydrogène.

NaOH: Hydroxide sodium.

°C : Degré Celsius.

PH : Potentiel d'hydrogène.

PCA: Plate Count Agar.

OGA : Oxytétracycline (base OGA) - Gélose glucosée – Agar.

MRS : De Man ; Rogosa et Sharpe medium.

MRSM : De Man ; Rogosa et Sharpe modifié.

TGEA : Tryptone glucose Extrait de levure Agar.

TGEA : Tryptone glucose Extrait de levure Agar modifié.





INTRODUCTION
GÉNÉRALE

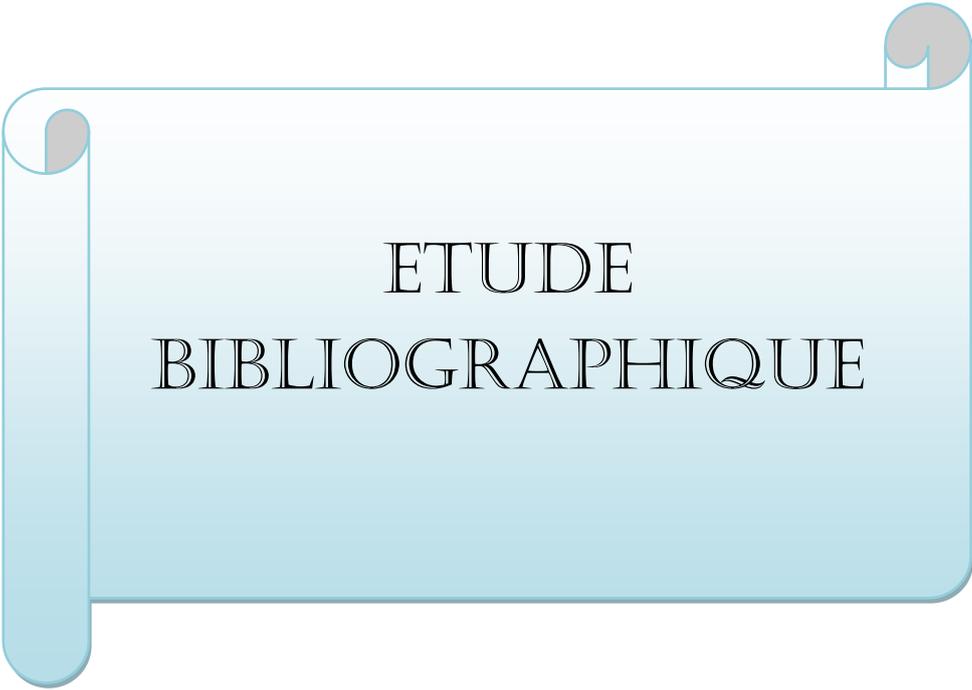
Introduction

La production mondiale du thon provenant des pêches a été estimée à 5 millions de tonnes en 2006 (FAO, 2008). En Méditerranée, la pêche au thon rouge est sous haute surveillance ; Les quotas autorisés dans la pêche au thon ont été augmentés cette année 2017 dont 2 000 t pour la Méditerranée, se qui génèrent une quantité importante de déchets estimée à 50% du volume total du poisson. Malgré leurs qualités intrinsèques, comme par exemple une grande richesse en protéines, très souvent ces déchets ne font l'objet d'aucun traitement spécifique et sont directement rejetés dans l'environnement, entraînant des problèmes de contaminations.

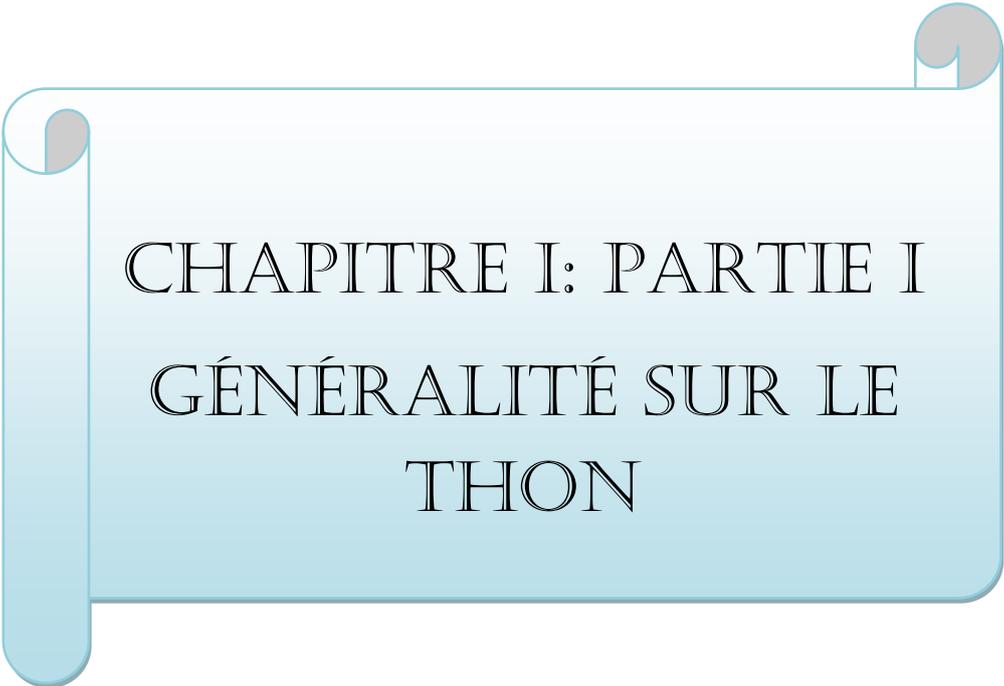
Par ailleurs, les voies de valorisation des coproduits représentent une solution pour ces déchets. A l'heure actuelle, les coproduits de la filière produits de la mer sont valorisés selon des modes faiblement générateurs de valeur ajoutée. En général, les coproduits du thon sont destinés à la production de farine, d'huile ou de hachis pour l'alimentation animale. Cependant, il existe d'autres solutions, notamment dans les secteurs de la nutraceutique, des cosmétiques et de la pharmaceutique qui permettraient de dégager plus de valeur ajoutée. Cela pourrait améliorer les performances économiques de la filière et contribuer à dynamiser l'activité sur les territoires d'implantation traditionnels de la filière fortement dépendants de l'activité littorale (zones portuaires) (**Gourlay et Le Grel , 2009**). Par ailleurs, les préoccupations environnementales qui sont de plus en plus pressantes, que ce soient en matière de tri des déchets, de leur recyclage ou de minimisation des impacts environnementaux, vont dans le sens d'une valorisation des sous-produits et s'inscrivent donc dans une perspective de développement durable pour les territoires considérés. Donc, si certaines précautions sont prises, ces déchets peuvent devenir des coproduits valorisables avec une valeur ajoutée et une amélioration des performances économique.

A cet effet, le principal objectif de ce travail est la valorisation des coproduits de thon rouge *Thunnus thynnus*. Cette étude se divise en différentes parties distinctes :

- ✓ Chapitre 1. Généralités.
- ✓ Chapitre 2. Matériel et méthodes
- ✓ Chapitre 3. Résultats et discussion



ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I: PARTIE I
GÉNÉRALITÉ SUR LE
THON

I. Généralité sur le thon

Le thon est un des principaux produits de la mer faisant l'objet d'échanges internationaux.

Il représente 5% des quantités pêchées dans le monde et destinées à l'alimentation humaine, mais compte pour plus de 10% dans la valeur des échanges internationaux (**Paquette, 1999**).

Le thon est une des espèces marines les plus importantes économiquement. Les sept espèces principales pêchées et consommées sur le marché international sont la bonite (*Katsuwonus pelamis*), le thon jaune (*Thunnus albacares*), le thon obèse (*Thunnus obesus*), le thon blanc (*Thunnus alalunga*), le thon rouge de l'Atlantique (*Thunnus thynnus*), le thon rouge du Sud (*Thunnus maccoyii*), le thon rouge du Pacifique (*Thunnus orientalis*). La capture totale de ces espèces est passée de 2,5 millions de tonnes à 4,3 millions de tonnes entre 1998-2003 (**Josupeit, 2005**). En 2006, la production mondiale de thon était d'environ 5 millions de tonnes (**Hoang, 2009**).

Le thon rouge est le plus gros de tous les thonidés. C'est une espèce fascinante, dotée de tous les atouts pour être l'un des prédateurs les plus efficaces et les mieux lotis pour garantir sa survie et la pérennité de l'espèce : vitesse de nage avoisinant les 80 km/h grâce à des qualités hydrodynamiques hors du commun (nageoires pectorales et dorsales parfaitement rétractables, corps puissant et fusiforme, ailerons stabilisateurs...), capacités de prédation hors du commun, fécondité exceptionnelle, croissance rapide, et pas ou très peu de prédateurs, hormis les grands requins et les orques. Cependant, son principal défaut réside dans la qualité de sa chair, tellement prisée par l'Homme que l'espèce est aujourd'hui surexploitée et en voie d'extinction imminente...

I.1 Le thon rouge et son exploitation

Dans la pêcherie méditerranéenne du thon rouge, l'essentiel de ces poissons sont capturés par des navires à senne coulissante qui utilisent un grand filet pour encercler des bancs entiers de thon rouge et les remorquer vers des élevages où ils sont engraisés avant d'être abattus.

En Méditerranée, la pêche au thon rouge est sous haute surveillance ; Les quotas autorisés dans la pêche au thon ont été augmentés cette année dont 2 000 t pour la Méditerranée. Le quota de pêche de thon rouge de l'Algérie pour 2017 a été porté à 1.046 tonnes, alors qu'il avait été fixé initialement à 546 tonnes par la Commission internationale pour la conservation des thonidés de l'Atlantique (Cicta), d'après la ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche, 2017.

80 % des captures de thon rouge de l'Atlantique se font en mer Méditerranée. Les engins traditionnels de pêche [madrague, ligne (canne et palangre), filet maillant (thonaille, aujourd'hui interdite)] ont été remplacés par une technique plus productive, la senne, qui assure aujourd'hui la grande majorité des captures.



Figure 01 : Technique de pêche par senne (source IFREMER)

I.1.1 Présentation de l'espèce étudiée

Le thon rouge *Thunnus thynnus* (Linné, 1758) est un poisson Téléostéen Actinoptérigien de l'ordre des Perciformes et de la famille des Scombridae, groupe des Thunnidae – Scombrinés. Avec un poids maximal situé couramment entre 250 et 620 kg, atteignant parfois presque la tonne, il est l'un des plus gros Téléostéens, d'où l'origine probable de son nom "thon" que Heldt (1926) attribue au mot phénicien *Thon* ou *Than* désignant « *les plus grands animaux aquatiques* ».

I.1.2 Classification

- Classe des Actinopterygii
- Ordre des Perciformes
- Sous ordre des scombroidei
- Famille des Scombridae
- Sous famille des scombrinae (les thonidés)
- **Nom scientifique** : *Thunnus thynnus*

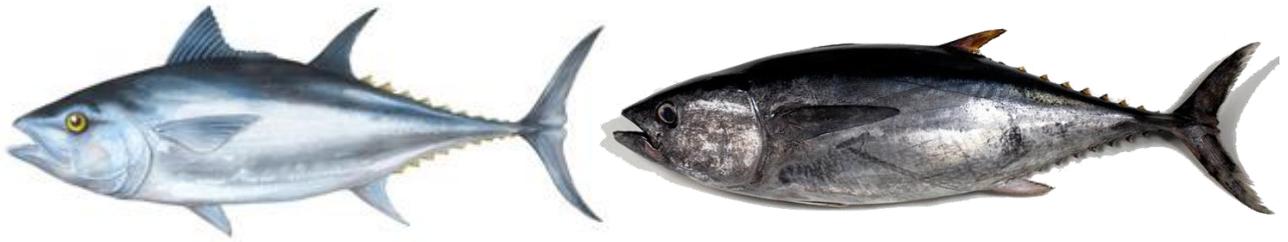


Figure 02 : Thon rouge de l'Atlantique

-Description :

Les thons, par leur grande taille, leur hydrodynamisme et leur bonne vision, sont des nageurs très rapides. Bien qu'ils soient poïkilothermes, ce sont les seuls poissons, avec certains grands requins, qui possèdent un système d'échangeurs de chaleur leur permettant de conserver au chaud leurs muscles et leurs viscères. Ce système, que l'on nomme rete mirabile, ou réseau admirable, est basé sur le contact entre des capillaires veineux, dont le sang est réchauffé par l'activité musculaire, et des capillaires artériels, dont le sang froid provenant des branchies se réchauffe au contact des capillaires veineux. Toutefois ce système n'est pas aussi élaboré chez toutes les espèces de thons et n'est pas aussi développé chez les jeunes que chez les adultes. Ce sont les grands thons rouges (pouvant dépasser 4 mètres et atteindre 700 kg) qui sont capables de fréquenter les eaux les plus froides, ils sont d'ailleurs pêchés jusqu'en Islande. À l'inverse de la plupart des espèces de poisson qui ont la chair blanche, celle des thons est souvent rose, du fait de leur importante vascularisation.

Le thon est un infatigable migrateur, ce qui permet de le repérer lors des campagnes de pêche. Les bancs ou mattes rassemblent plusieurs milliers d'individus poursuivant des bancs de sardines, d'anchois, de sprats, de maquereaux, et méduses dont ils se nourrissent.

I.1.3 Mode de vie :

Comme tous les thons, le thon rouge est un grand migrateur. Les juvéniles se déplacent en bancs tandis que les adultes se concentrent pour la reproduction. Le thon rouge se déplace des régions froides où il se nourrit aux régions chaudes où il se reproduit. C'est d'ailleurs à ce moment qu'il s'approche le plus de nos côtes : en automne, il n'est pas rare de voir de très gros spécimens venir tout près du bord et notamment la nuit. Son activité de chasse est aisément repérable soit par le bouillonnement de la surface de l'eau, soit par le lissage de celle-ci quand

le banc de thons resserrés s'oppose au clapot de la mer. Contrairement à de nombreux scombridés et thonidés, le thon rouge a des périodes d'activité diurnes et nocturnes. Bien qu'on le repère essentiellement en surface, il évolue à diverses profondeurs et descend fréquemment à des profondeurs allant de 500 à 1000 mètres.

Sa vitesse de nage peut atteindre les 80 Km/h et ses capacités d'accélération sont stupéfiantes, comparables à celles de nos meilleures voitures de sport...

I.1.4 Répartition géographique :

Le Thon rouge est essentiellement en Atlantique Nord et en Méditerranée ; on le retrouve depuis l'équateur au Sud, jusqu'à la Norvège au Nord, et du golfe du Mexique à l'Ouest jusqu'à la mer noire à l'Est. Il existe deux stocks bien distincts de thons rouges qui se différencient par leur maturité sexuelle propre et par leur zone de reproduction :

- le stock Est, à maturité précoce, se reproduit en Méditerranée orientale,
- le stock Ouest, à maturité plus tardive, se reproduit dans le golfe du Mexique.

Malgré une vraisemblable fidélité à leur zone de ponte, les migrations des thons rouges se font sur l'ensemble de la Méditerranée et de l'Océan Atlantique, c'est pourquoi des individus appartenant à un stock différent peuvent se trouver réunis, notamment en hiver pendant la période d'engraissement. D'ailleurs on estime que chaque année 1 à 8% des thons rouges traversent de l'Atlantique Est à l'Atlantique Ouest ou inversement. Cependant malgré de nombreuses études (utilisation de marques électroniques), l'incertitude demeure, et certaines voies de migration des thons rouges restent méconnues. On peut penser que le comportement opportuniste de l'espèce sans cesse à la recherche de nourriture, l'instinct de reproduction ainsi que les variations climatiques peuvent amener certains individus à choisir une nouvelle zone de ponte ponctuellement favorable pour retourner plus tard dans les zones de reproduction habituelle garantissant des conditions optimales chaque année.



Figure 03 : Zone d'habitat et de reproduction du thon rouge dans le monde et en méditerranée (Source : CICTA)

I.1.5 Valeur nutritive

Le thon est une source de protéines et contient peu de cholestérol. Le thon regorge d'éléments nutritifs, dont le phosphore, le sélénium, les vitamines A et D, ainsi que celles du groupe B. Le thon rouge se démarque du thon blanc par sa teneur élevée en acides gras oméga-3 dont l'acide eïcosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexanoïque (DHA). Des études montrent que la consommation de thon a des effets favorables sur la santé cardiovasculaire et réduirait la mortalité par maladie cardiovasculaire.

Pour des raisons de conservation, le thon est souvent commercialisé en conserve. Au Japon, le thon est consommé cru sous forme de sushi ou de sashimi, des formes de préparation qui tendent à se populariser en Occident ; la partie ventrale, ou thon gras, étant la plus appréciée. De nombreux pays du Pacifique, des côtes africaines et de la Méditerranée pouvant le consommer frais, de nombreuses recettes existent, y compris crue ou en marinade de citron (voir notamment poisson cru à la tahitienne).

Du fait de sa position de prédateur, et parce qu'il contient beaucoup de lipides, le thon rouge a tendance à accumuler des polluants tels que les organochlorés ou dans la chair le mercure, métal très toxique, notamment sous forme de méthylmercure. Des analyses faites au début des

années 1970 sur des spécimens anciens de thons (et d'espadons) échantillonnés dans les musées laissent penser que ce phénomène n'est pas uniquement dû aux pollutions récentes

I.1.6 Composition biochimique du thon

En tant que poisson gras, le thon représente une source privilégiée d'acides gras insaturés oméga 3, dont les effets protecteurs sur la santé ont largement été démontrés. Comme tous les poissons, il est riche en protéines de qualité, mais apporte aussi d'importantes quantités de vitamine B12, vitamine D, vitamine A et provitamine A et de sélénium.

- **Acides gras oméga-3**

Le thon est une excellente source d'acide eicosapentaénoïque (**AEP**) et d'acide docosahexaénoïque (**ADH**), deux acides gras de la famille des oméga-3. Ces acides gras agissent comme précurseurs de messagers chimiques favorisant un bon fonctionnement des systèmes immunitaire, circulatoire et hormonal. Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont démontré que la consommation d'acides gras oméga-3 (provenant majoritairement de poissons gras) exerçait des effets favorables sur la **santé cardiovasculaire** et réduisait la mortalité par maladie cardiovasculaire¹.

Le thon contient de trois à cinq fois plus d'ADH que d'AEP. L'acide gras ADH contribue principalement au développement et au fonctionnement du cerveau, ainsi qu'à l'intégrité des fonctions cognitives et de la vue. Une portion de 100 g de **thon rouge**, de **thon blanc** en conserve (dans l'eau) et de **thon pâle** en conserve (dans l'eau) fournissent respectivement 1,5 g, 0,9 g et 0,3 g d'AEP et d'ADH. Le thon rouge est donc l'un des six poissons les plus riches en ces deux acides gras, avec la truite, le maquereau, la sardine, le hareng et le saumon.

- **Protéines.**

De façon générale, le poisson est une excellente source de **protéines complètes** puisqu'il renferme les neuf acides aminés essentiels (ceux qui ne sont pas produits par notre organisme et qui doivent provenir de notre alimentation). Les protéines servent à la formation des enzymes digestives et des hormones de même qu'à former, réparer et maintenir les tissus, comme la peau, les muscles et les os. Par ailleurs, plusieurs études chez l'animal ont révélé que la consommation de protéines de poisson, en l'occurrence la protéine de morue,

améliorerait la sensibilité à l'insuline et augmenterait l'absorption du glucose par l'organisme¹⁴⁻¹⁶. Notons que des études chez l'humain sont en cours de réalisation et viendront confirmer ou infirmer ces résultats.

- **Phosphore.**

Le thon rouge et le thon blanc en conserve sont d'**excellentes sources** de phosphore (voir notre fiche Palmarès des nutriments Phosphore). Le thon pâle en conserve est, quant à lui, une **bonne source**. Le phosphore constitue le deuxième minéral le plus abondant de l'organisme après le calcium. Il joue un rôle essentiel dans la formation et le maintien de la santé des os et des dents. De plus, il participe entre autres à la croissance et à la régénérescence des tissus et aide à maintenir à la normale le pH du sang. Il est l'un des constituants des membranes cellulaires.

- **Sélénium.**

Le thon est une **excellente source** de sélénium. Ce minéral travaille avec l'une des principales enzymes antioxydants, prévenant ainsi la formation de radicaux libres dans l'organisme. Il contribue aussi à convertir les hormones thyroïdiennes en leur forme active.

- **Acide pantothénique.**

Le thon rouge est une **excellente source** d'acide pantothénique. Aussi appelée vitamine B5, l'acide pantothénique fait partie d'un coenzyme clé nous permettant d'utiliser de façon adéquate l'énergie présente dans les aliments que nous consommons. Il participe aussi à plusieurs étapes de la synthèse des hormones stéroïdiennes, des neurotransmetteurs (messagers dans l'influx nerveux) et de l'hémoglobine.

- **Vitamine A.**

Le thon rouge est une **excellente source** de vitamine A. Le rétinol est une des formes actives de la vitamine A dans l'organisme. Celle-ci est une des vitamines les plus polyvalentes, jouant un rôle dans plusieurs fonctions de l'organisme. Entre autres, elle favorise la croissance des os et des dents, maintient la peau en santé et protège contre les infections. De plus, elle joue un rôle antioxydant et favorise une bonne vision, particulièrement dans l'obscurité.

- **Vitamine B1.**

Le thon rouge est une **bonne source** de vitamine B1. Appelée aussi thiamine, la vitamine B1 fait partie d'une coenzyme nécessaire à la production d'énergie, principalement à partir des glucides que nous ingérons. Elle participe aussi à la transmission de l'influx nerveux et favorise une croissance normale.

- **Vitamine B2.**

Le thon rouge est une **excellente source** de vitamine B2 pour la **femme** et une **source** pour l'**homme**, étant donné leurs besoins différents. Le thon en conserve est quant à lui une **source**. La vitamine B2 est aussi connue sous le nom de riboflavine. Tout comme la vitamine B1, elle joue un rôle dans le métabolisme de l'énergie de toutes les cellules. De plus, elle contribue à la croissance et à la réparation des tissus, à la production d'hormones et à la formation des globules rouges.

- **Vitamine B3.**

Le thon est une **excellente source** de vitamine B3. Appelée aussi niacine, la vitamine B3 participe à de nombreuses réactions métaboliques et contribue particulièrement à la production d'énergie à partir des glucides, des lipides, des protéines et de l'alcool que nous ingérons. Elle participe aussi au processus de formation de l'ADN, permettant une croissance et un développement normaux.

- **Vitamine B5 :**

la vitamine B5 qui appelé aussi acide pantothénique, fait partie d'un coenzyme clé nous permettant d'utiliser de façon adéquate l'énergie présente dans les aliments que nous consommon. Il participe aussi aux plusieurs étapes de la synthèse des hormones stéroïdiennes, des neurotransmetteurs (messagers dans l'influx nerveux) et de l'hémoglobine.

- **Vitamine B6.**

Les thons rouge et pâle en conserve sont d'**excellentes sources** de vitamine B6. Le thon blanc en conserve en est, quant à lui, une **bonne source**. La vitamine B6, aussi appelée pyridoxine, fait partie de coenzymes qui participent au métabolisme des protéines et des acides gras ainsi

qu'à la synthèse (fabrication) des neurotransmetteurs (messagers dans l'influx nerveux). Elle contribue également à la fabrication des globules rouges et leur permet de transporter davantage d'oxygène. La pyridoxine est aussi nécessaire à la transformation du glycogène en glucose et elle contribue au bon fonctionnement du système immunitaire. Cette vitamine joue enfin un rôle dans la formation de certaines composantes des cellules nerveuses et dans la modulation de récepteurs hormonaux.

- **Vitamine B12.**

Le thon est une **excellente source** de vitamine B12. Cette vitamine travaille de concert avec l'acide folique (vitamine B9) pour la fabrication des globules rouges dans le sang. Elle veille aussi à l'entretien des cellules nerveuses et des cellules fabriquant le tissu osseux.

- **Vitamine D.**

Le thon rouge et le thon blanc en conserve sont d'**excellentes sources** de vitamine D, tandis que le thon pâle en conserve en est une bonne source. La vitamine D est étroitement impliquée dans la santé des os et des dents, en rendant disponible le calcium et le phosphore dans le sang, entre autres pour la croissance de la structure osseuse. La vitamine D joue aussi un rôle dans la maturation des cellules, dont celles du système immunitaire.

- **Magnésium.**

Le thon rouge est une **bonne source** de magnésium, tandis que le thon en conserve en est une **source**. Le magnésium participe au développement osseux, à la construction des protéines, aux actions enzymatiques, à la contraction musculaire, à la santé dentaire et au fonctionnement du système immunitaire. Il joue aussi un rôle dans le métabolisme de l'énergie et dans la transmission de l'influx nerveux.

- **Fer.**

Le thon est une **bonne source** de fer pour l'**homme** et une **source** pour la **femme**, car leurs besoins respectifs en ce minéral sont différents. Chaque cellule du corps contient du fer. Ce minéral est essentiel au transport de l'oxygène et à la formation des globules rouges dans le sang. Il joue aussi un rôle dans la fabrication de nouvelles cellules, d'hormones et de neurotransmetteurs (messagers dans l'influx nerveux). Il est à noter que le fer contenu dans

les aliments d'origine animale (dont les poissons) est très bien absorbé par l'organisme, comparativement au fer provenant des végétaux.

Tableau 01 : Le thon est aussi une source indispensable de **protéines**

Valeur nutritionnelles pour 100g	
Protéine	23,4g
Glucides	0g
Lipides	6,2g

I.1.7 Reproduction en captivité :

La reproduction du thon rouge en captivité a été observée, cependant il n'a pas été possible de contrôler le phénomène. En effet, les thons sont capturés jeunes et sont maintenus en captivité pendant plusieurs années dans des grandes cages à l'abri de tout stress et sans aucune manipulation. Lors de la saison de reproduction, les pontes spontanées sont détectées par des guetteurs éloignés observant à la jumelle les perturbations de la surface de l'eau liées au comportement de copulation des géniteurs. Les œufs sont collectés manuellement à l'aide de filets écumant la surface de l'eau. Les productions peuvent atteindre plusieurs centaines de millions d'œufs par an mais les résultats acquis depuis 20 ans montrent que la production d'œufs est très irrégulière et ne peut en aucun cas être programmée (**Kumai 1998**).

Cependant, le déterminisme de la ponte est bien caractérisé : l'émission des gamètes n'intervient qu'au début de l'été (juin-juillet) au début de la nuit et uniquement dans des eaux dont la température est supérieure à 24°C. Malgré ces difficultés, le cycle biologique du thon rouge a été bouclé au Japon en 2003 par l'obtention de juvéniles à partir d'un lot de géniteurs nés en captivité (Kinki University in Fish Farming International). En Europe, dans le cadre du programme ReproDott, nous avons observé post mortem l'occurrence de femelles vitellogénétiques dans les cages d'élevage après un an de captivité,

-Taille, poids maximum (publiés) :

Maximum : longueur à la fourche plus de 3m

Poids maximum : 800 kg (record actuel à la canne : 679 kg à Terre Neuve)

-Les origines du thon

Les thons se déplacent confortablement entre les eaux froides et les eaux les plus chaudes en maintenant leur température corporelle au-dessus de la température de l'eau, principalement grâce à une activité constante. Cependant, certains types de thons, y compris l'albacore, préfèrent les eaux de surface plus chaudes quand ils sont jeunes (moins de 5 ans) et des eaux plus froides et plus profondes quand ils sont plus âgés.

Les eaux plus profondes modifient leurs régimes, ce qui explique pourquoi l'albacore plus âgé pêché dans des eaux froides et profondes a une viande plus maigre et plus blanche comparé au jeune albacore plus grassouillet pêché plus près de la surface. Avant que vous ne commenciez à vous faire du souci pour savoir comment éviter le jeune albacore plus gras, sachez que ces graisses de poisson sont bonnes pour la santé. Le jeune thon albacore et le thon rouge, en particulier, sont de bonnes sources en acides gras essentiels oméga 3, bénéfiques pour la santé.



PARTIE II :
VALORISATION DES
COPRODUIT DE
POISSON

II. Valorisation des coproduit de poissons :

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Il existe trois grands types de producteurs de co-produits: Les mareyeurs, les saleurs - saurisseurs et les conserveurs (**Dumay, 2004, Shahidi, 2006**).

Compte tenu de l'importance des co-produits, de nombreux efforts ont été réalisés pour les utiliser dans diverses applications: l'alimentation animale ou humaine, la diététique, la nutraceutique, la pharmaceutique, le cosmétique et d'autres applications. A partir d'un même type de co-produit (tête, viscères, arêtes, peau) il est possible d'obtenir différents produits dérivés.

II.1. les co-produits de poisson ?

Pendant la transformation de poisson pour la consommation humaine, des co-produits incluant les têtes, les viscères, la chute de parage (filetage), la peau, l'écaille, les arêtes et les queues sont générés. Dans un contexte de développement durable mais aussi et surtout dans un souci de rentabilité économique, ces co-produits font depuis plusieurs années l'objet de l'attention des industriels qui aimeraient en tirer bénéfices. (**Dumay, 2004, Shahidi, 2006**).

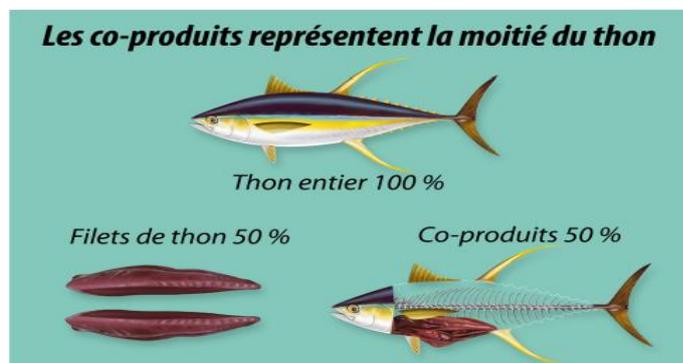


Figure 04: Produits principaux et co-produits provenant de la filière de transformation du thon

L'industrie de transformation de poisson génère une quantité importante de co-produits. La partie consommée du poisson représente à peine 40 à 60 % du produit entier (figure), le reste étant éliminé ou sous-utilisé. La figure schématise la composition des co-produits générés par les sociétés de transformation du thon, exprimée en pourcentage du poids total du poisson. La mise en conserve et la découpe de longes du thon (filetage) génèrent dans le

Pacifique environ 120 000 tonnes de co-produits par an, parmi lesquelles une partie est éliminée et l'autre est transformée en produit en vrac à faible valeur marchande, telle que la farine de poisson. Les sociétés de mareyage, y compris les revendeurs, génèrent une quantité indéterminée de co-produits. Or, ces produits pourraient être centralisés en vue de leur utilisation. Les ménages océaniques consomment environ 80 % du poisson entier (en poids). Les 20 % de co-produits restants sont en général donnés aux animaux domestiques ou sont enterrés pour l'amendement du sol des jardins. Par conséquent, le volume de co-produits éliminés par les ménages est faible.



Figure 05: Schéma illustrant la composition des co-produits de thon, exprimée en pourcentage du poids

II.2 Utilisation des coproduits de poisson

Les sociétés qui génèrent de grandes quantités de co-produits ont généralement recours à l'un des procédés de traitement suivants : la vente sur les marchés locaux de ces co-produits qui constituent une source de protéines à bas coût, la transformation en produits à faible valeur marchande telle que la farine de poisson, ou la simple élimination du produit. La mise en place de technologies simples et à petite échelle permettrait de transformer les faibles quantités de co-produits générés par la pêche artisanale et les ménages, notamment en engrais. Le tableau 01 présente certains des marchés de valorisation possibles,

Tableau 02 : Utilisation potentielle des co-produits

Marchés de Valorisation	Produits dérivés	Utilisation
Agriculture	Engrais (ensilage), compost, pesticide	– Enrichissement des sols – Lutte contre les ravageurs
Énergie	Biocarburant, comburant	– Production d'énergie
Alimentation Animale	Farines, huiles, dérivés protéinés, ensilage, minéraux	– Alimentation – Compléments alimentaires
Nutrition (compléments alimentaires)	Huiles, dérivés protéinés, minéraux, acides aminés	– Compléments alimentaires – Nutrition sportive
Alimentation Humaine	Utilisation entière ou partielle du poisson, hachis, pulpe alimentaire, gélatine, bouillon et sauce à base de poisson, huile de foie	– Produits non transformés – Produits transformés
Industrie pharmaceutique	Oméga 3, calcium, sulfate de chondroïtine, collagène, peptides bioactifs	– Nutraceutique – Cosmétique – Biotechnologie

II.3 Importance et valorisation des coproduits

La production annuelle de coproduits représente environ 50% des capture. Les coproduit contiennent des protéines à haut valeur nutritive, des acides gras insaturés (oméga3). Des vitamines, des antioxydants des minéraux, ainsi que des acides aminés essentiels et des peptides bénéfiques pour l'organisme. Il est intéressant d'accroître la valeur ajoutée des coproduit, pour assures une pêche durable et améliorer la rentabilité des activités de la filière par une meilleure valorisation des captures. **Les coproduits peuvent êtres utilisés sous différentes formes : farine et huile de poisson, hydrolysats protéiques ou même isolats protéiquesetc.**

II.3.1 Farine et huile de poisson

En général, la production de farine et d'huile de poisson pour la nutrition animale est actuellement la valorisation de masse des co-produits la plus importante car tous peuvent être utilisés sans distinction. Ainsi, en 2006, environ 20,2 millions de tonnes de poisson et de co-produits ont été transformés en farines (FAO, 2008). En 2008, 2,6 millions de tonnes de farine ont ainsi été commercialisés avec près de 25% des matières utilisées qui étaient des coproduits issus de l'industrie de transformation du poisson (FAO Globefish, 2009). Les principaux pays producteurs de farine et d'huile de poisson sont le Pérou, le Chili, le Danemark et la Norvège (FAO Globefish, 2009).

II.3.1.1. La farine de poisson

La farine de poisson est la première source de protéines utilisée pour l'alimentation des animaux d'élevage en raison de ses hautes qualités nutritives. Une partie importante de ces farines est utilisée pour faire des aliments pour l'aquaculture de poissons et de crevettes. L'autre partie est utilisée pour l'alimentation des poulets et des porcs. Les farines contiennent en général de 65 à 67% de protéines et un maximum de 12% de lipides. Elles possèdent de bonnes valeurs nutritives et une grande teneur en acides aminés essentiels mais sont peu solubles, possèdent peu de propriétés fonctionnelles et peuvent causer des inconvénients liés à leur forte teneur en sels minéraux (Denes, 2006). L'utilisation mondiale de farine de poisson en 2002 est détaillée sur la Figure 2 (Schippe, 2008).



Figure 06 : Farine de poisson

La quantité de protéines dépend des parties de poissons utilisées dans sa fabrication – entre 58 et 70 % selon les types de farine: type 62 (58 à 63 %) ; 65 (63 à 68 %) ; 70 (68 à 70 %).

La qualité tient compte aussi de la digestibilité de l'azote (dN 88 à 90 %) et du phosphore (dP 38 à 51 %) (Sauvant et al, 2004).

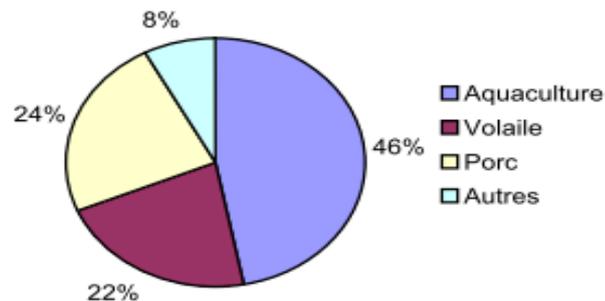


Figure 07 : L'utilisation mondiale de farine (Schippe, 2008)

II.3.1.2 L'huile de poisson :

L'huile de poisson connue pour sa richesse en oméga 3 est en général obtenue à partir des tissus biologiques de poissons gras. Parmi les poissons choisis, on trouve des poissons sauvages ou d'élevage. On trouve dans les poissons sauvages une huile d'excellente qualité. Parmi ces poissons, on trouve le plus souvent le hareng, la sardine, le maquereau, la daurade, l'espadon, etc. Parmi les poissons d'élevage, en général le saumon ou la morue, l'huile est souvent de moindre qualité et peut contenir des métaux lourds. Toutes les huiles obtenus par ces poissons ne se valent pas et leurs teneurs en oméga 3 non plus.

Les principaux usages de l'huile de poisson sont les suivants :

- Alimentation humaine
- Industrie pharmaceutique
- Alimentation des animaux d'élevage
- Alimentation des animaux de compagnie
- Aquaculture

L'huile de poisson sous forme liquide est parfois offerte à meilleur prix que les gélules. Lorsqu'on prend de grandes quantités d'huile de poisson, cette présentation peut être plus commode que d'avaler de nombreuses capsules. Comme l'huile de poisson a un goût prononcé, la plupart des fabricants offrent des produits liquides à saveur de citron ou d'orange.



Figure 08 : Huile poisson sous forme liquide et gélule

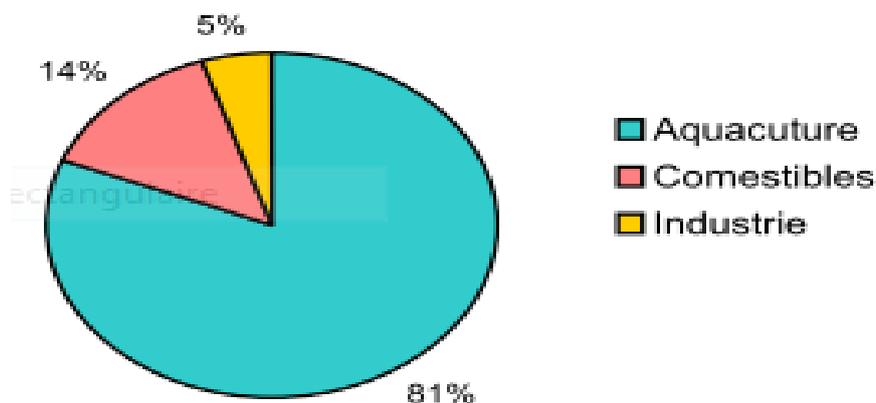


Figure 09 : L'utilisation mondiale de l'huile de poisson (Schippe, 2008)

II.3.1.3. Fabrication de farine et de l'huile de poisson

Dans le traitement de la chair, de l'huile et de la farine de poisson en particulier, les centrifugeuses Flottweg sont utilisées depuis des décennies et dans la plupart des régions du monde pour le traitement des poissons. C'est ainsi que l'entreprise convainc ses clients avec les caractéristiques ci-dessous :

- Efficacité très élevée de la séparation et des performances
- Très haute rentabilité grâce à un fonctionnement automatique en continu
- Fiabilité et disponibilité maximales de machines et de systèmes adaptés de façon précise aux exigences des clients.
- Innovations de Flottweg comme le Simp Drive ou la turbine centrifète réglable

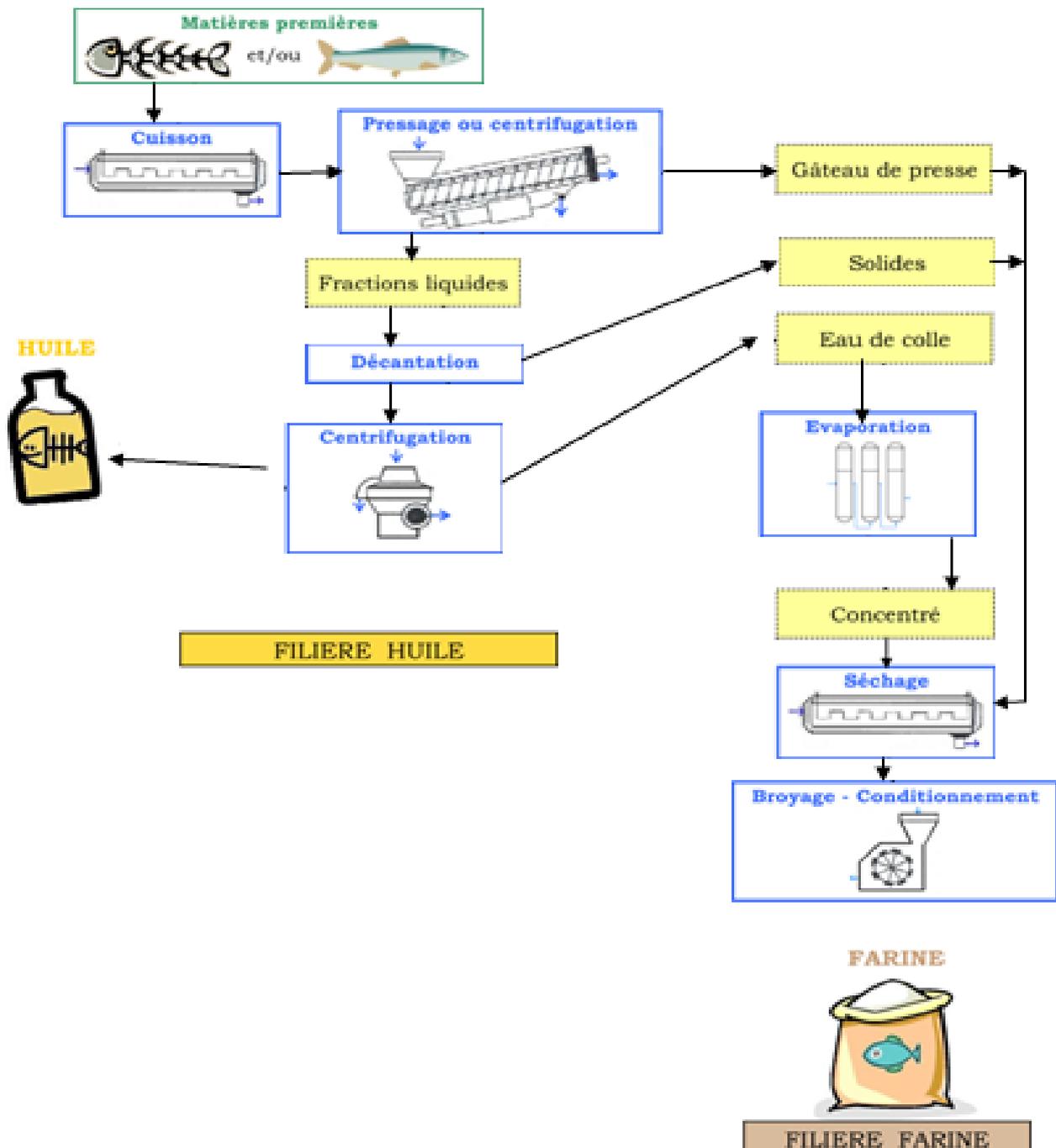


Figure 10 : Schéma de fabrication de la farine et huile de poisson (Ifremer 2009)

La plus grande partie de l'huile et des farines sont produites par la méthode de pressage humide. Les principales étapes de ce processus sont décrites ci-dessous.

- **Cuisson** : des poissons pour coaguler les protéines et ainsi libérer l'eau et l'huile qui leur sont liées,
- **Pressage du coagulat** pour séparer deux phases :
 - une phase **solide** (le « gâteau »), contenant 60 à 80 % de matière sèche (protéines et matière osseuse) ne contenant plus d'huile,
 - une phase **liquide** (la « liqueur »), contenant l'eau et le reste des solides (huile, protéines dissoutes ou en suspension, vitamines, minéraux).
- **Décantation et centrifugation** : de la liqueur, pour en retirer la majeure partie des impuretés et garder l'huile brute qui est stockée dans des fûts.

L'eau contenant les protéines est concentrée dans des évaporateurs multi-effets et le concentré est intimement mélangé avec le gâteau, qui est ensuite déshydraté généralement dans un sécheur à double-étage. Le matériau sec est moulu sous forme de farine, puis stocké dans des sacs ou en vrac.

II.3.2 Les isolats de protéines légèrement modifiées par hydrolyse

Ces isolats sont obtenus en effectuant une hydrolyse modérée des protéines (solubilisation de l'azote inférieure à 10%) avant le traitement d'extraction. La modification des protéines par hydrolyse soulève un certain nombre de problèmes. En premier lieu, il est difficile de fabriquer des produits neutres car diverses molécules produites par hydrolyse présentent elles-mêmes une certaine saveur.

D'autre part, dans le cas d'une hydrolyse enzymatique, on se heurte à la difficulté de contrôler avec précision le degré d'hydrolyse, particulièrement si on diminue la qualité nutritionnelle par destruction de certains acides aminés et racémisation. Dans ce cas il faut également envisager l'élimination du sel produit après neutralisation de l'hydrolysate (Tannenbaum et al, 1970)

II.3.3 Les Hydrolysats

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont perdues par les industries de transformation du poisson qui ne valorisent guère leurs co-produits ou déchets. L'hydrolyse des protéines est donc une des voies privilégiées de la valorisation de ces co-produits mais pour cela il convient d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines présentes afin de pouvoir les utiliser ultérieurement en nutrition humaine ou animale. Cette hydrolyse des protéines, qui peut se faire par voie chimique ou enzymatique, conduit à une grande variété de produits.

II.3.3.1 L'Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique est la plus ancienne et peut être conduite en milieu acide (HCl ou H₂SO₄) ou en milieu alcalin (NaOH) dans des conditions drastiques telles que des températures de l'ordre de 100°C et des fortes concentrations de soude ou d'acide. Dans le cas de l'hydrolyse acide, l'utilisation de l'acide chlorhydrique présente l'avantage, lors de la neutralisation par la soude, de produire du chlorure de sodium qui joue un rôle de conservateur pour le produit. Cependant cette hydrolyse acide a l'inconvénient de décomposer partiellement certains acides aminés et de détruire complètement le tryptophane. Il sera donc nécessaire de supplémenter l'hydrolysate acide par ces acides aminés. L'hydrolyse alcaline par la soude provoque la destruction de la cystéine, la cystine, l'arginine et la méthionine. D'autre part, l'hydrolyse alcaline cause la racémisation des L-acides aminés en D-acides aminés non absorbés par l'homme, ce qui réduit la valeur alimentaire du produit, car seuls les L-acides aminés sont assimilables.

II.3.3.2 L'Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique présente l'avantage d'être plus facilement contrôlable que l'hydrolyse chimique. Elle permet également de préserver la valeur nutritionnelle de la matière première et ne nécessite pas de traitement chimique pour éliminer l'agent hydrolysant, l'enzyme étant simplement inactivée par un échauffement modéré.

II.3.3.3 L'Autolysats

Les autolysats sont obtenus principalement par l'action des enzymes protéolytiques endogènes du poisson, présentes dans le système digestif (pepsine, trypsine, chymotrypsine) ainsi que dans le tissu musculaire (cathepsines). Les bactéries naturellement présentes dans le mélange participent également à cette protéolyse. Les autolysats sont généralement liquides, assez visqueux, riches en acides aminés libres et en petits peptides. Ils constituent une nourriture idéale pour l'alimentation animale (**Ravallec-Plé, 2000**).

L'activité des enzymes endogènes permet la maturation de la matière première et l'obtention du produit final. Dans ces mélanges complexes, la présence d'inhibiteurs naturels diminue l'activité des enzymes endogènes. La vitesse de l'autolyse est alors très lente, la durée des procédés est au minimum de 6 mois (**Roy et Durand, 1997**).



PARTIE III :
LES MILIEUX DE
CULTURE

III. Les milieux de culture du domaine de la microbiologie

L'idée de culture des microorganismes date du XIX^e siècle et à l'époque il n'y avait pas tous les produits et réactifs dont nous disposons à l'heure actuelle. On cultivait sur des milieux naturels (carottes, pommes de terre, viande...). Aujourd'hui, les milieux sont diversifiés et complexifiés (**Branger et al, 2007**).

Les microorganismes ont été divisée en deux grandes catégories sur la base de leurs exigences nutritionnelles : les autotrophes et les hétérotrophes. Les premiers ont les besoins, les plus simples. Ils possèdent un équipement enzymatique extrêmement élaboré et puissant et peuvent synthétiser tous leurs composants à partir de substances élémentaires. Les seconds, au contraire exigent pour leur croissance, les substances qu'ils ne peuvent synthétiser.

III.1. Définition d'un milieu de culture

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre, rapidement, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille. Ainsi, selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables.

Il se compose d'une base (agar-agar, eau, minéraux...) ainsi que d'un indicateur coloré de pH ou de réaction d'oxydo-réduction pour permettre de formuler des hypothèses sur le genre.

Il existe aussi des bouillons de culture qui possèdent la même fonction, mais ces milieux ne contiennent pas d'agar-agar, ils sont donc totalement liquides.

Cet article détaillera les caractéristiques des milieux de culture se rapportant à la microbiologie. (**Washington 1996**)

Principe

Ces milieux permettent l'étude du métabolisme glucidique pour l'identification des différentes espèces de *Bacillus*.

Dans un milieu peptoné, l'acidification produite par l'attaque des glucides est souvent masquée. En effet pour de nombreuses espèces de *Bacillus*, le métabolisme des glucides

se fait par la voie oxydative et donc ce métabolisme produit peu d'acides. Le métabolisme protéique étant très actif, libère de nombreux produits alcalins.

On doit donc utiliser pour étudier le métabolisme glucidique des milieux pauvres en protéines (peptones).

Le milieu semi-synthétique répond à ces conditions d'étude car il ne contient pas de peptone.

La présentation en demi-pente permet une étude différentielle de la voie d'attaque des glucides (Fermentaire ou oxydative).

III.1.1. Milieu de culture minimum

Un milieu minimum ou milieu définit est un milieu comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance bactérienne, sous une forme utilisable par des bactéries n'ayant pas d'exigence particulière.

III.1.2. Milieu de culture empirique

Un milieu de culture dit empirique est un milieu dont on ne connaît pas exactement la composition.

Ainsi, dans le milieu type cœur-cervelle, il y a de l'eau, de l'agar-agar, de l'hydrolysate de cœur et de cervelle sans que l'on en connaisse les aspects qualitatifs et quantitatifs. Il sera donc utilisé uniquement pour la croissance des bactéries. Il n'a pas d'effet sélectif.

III.2 Milieu d'isolement :

Ils peuvent être, suivant les techniques envisagées et les bactéries en cause :

- ✓ des milieux de base
- ✓ des milieux enrichis
- ✓ des milieux sélectifs

III.2.1 Milieux d'identification :

Ils permettent par la mise en évidence des caractères biochimiques des bactéries, de résoudre les problèmes d'identification différentielle qui se posent entre des espèces ou des genres voisins. Ces milieux sont actuellement très nombreux.

III.2.2 Milieux de conservation :

Ce sont des milieux pauvres qui maintiennent les bactéries dans un état de vie ralentie.

➤ Milieu de culture sélectif

Les milieux de culture dit sélectifs, permettent uniquement la culture de certains genres de micro-organismes. Pour cela, on ajoute des éléments qui inhibent la croissance des micro-organismes indésirables comme le chlorure de sodium à forte concentration, le thiosulfate de sodium, le cristal violet ou certain antibiotiques etc.

Les éléments ajoutés sont sélectionnés selon les caractéristiques du micro-organisme recherché. Ces milieux sont utilisés pour l'analyse d'un prélèvement polybactérien. Ce milieu permet de sélectionner uniquement en cas de crible positif : Résistance à un antibiotique, la prototrophie etc. (Meyer et al, 2004)

Exemples de milieux sélectifs :

- milieu S-S : il ne permet la croissance que des Salmonelles (Shigella s'y développe moins vite : environ 48 à 72 heures avant d'obtenir une culture exploitable).
- milieu de Sabouraud : il permet la pousse des mycètes.
- gélose Kanamycine - Vancomycine, dite "Kana-Vanco" ou KV : elle empêche la pousse des bactéries à Gram positif (action de la vancomycine) et de la plupart des entérobactéries (action de la Kanamycine). Sur ce milieu, poussent préférentiellement des bactéries anaérobies strictes.

➤ Milieu de culture enrichi

Ils contiennent, outre les composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser. Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites exigeantes. Par exemple : les milieux au sang frais (le sang est riche en nutriments divers): Gélose au sang frais ou cuit. Les milieux avec du sérum, du jaune d'œuf : Gélose Baird Parker ou dite BP.

➤ Milieu synthétique

Ce sont des milieux dont on connaît exactement la composition chimique, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Ils sont utilisés dans la recherche d'une réaction enzymatique précise. Ce sont les milieux les plus couramment utilisés, par exemple : on utilisera le milieu

tryptophane pour révéler la présence de tryptophanase (une enzyme) par la production d'indole. Le tryptophane y est en quantités suffisantes pour permettre un résultat interprétable ; il n'en aurait pas été de même si le milieu n'avait contenu que de l'hydrolysate de viande de bœuf.

➤ **Milieu semi-synthétique :**

On ne connaît leur composition exacte que pour certains composants (d'un point de vue quantitatif, pour les produits ayant un intérêt, comme les facteurs de croissance.)

Les autres composants étant présents de manière empirique.

➤ **Milieu ordinaire**

Ils permettent la culture des bactéries qui n'ont pas d'exigence nutritive particulière, (bactéries non exigeantes). La composition de ces milieux est simple et sans effet de sélection.

Un exemple de milieu ordinaire pourrait être la gélose nutritive.

➤ **Milieu différentiel**

Le milieu de culture dit différentiel ou indicateur' permet de distinguer deux types de microorganismes se développant dans un même milieu. Ce type de milieu utilise certaines caractéristiques biochimiques des microorganismes en présence de certains nutriments ou marqueurs (tel que le rouge neutre, rouge de phénol, l'éosine ou le bleu de méthylène). Ce type de milieu est utilisé pour la détection de microorganismes recombinant dans des lignées bactériennes.



CHAPITRE II :
MATÉRIEL ET
MÉTHODES

II.1 Présentation de l'échantillon

Dans la présente étude, nous avons utilisé comme échantillon les sous-produits du thon rouge. L'espèce *Thunnus thynnus* qui appartient à la famille des Scombridae ; c'est un grand poisson dont la taille maximal est de plus de 3m de longueur et le poids peut atteindre jusqu'à 700 Kg. Le thon rouge est disponible dans les marchés à partir de mois de Mai jusqu'au mois d'Aout (période de pêche). Nous avons dans cette étude utilisée l'analyse des coproduits du thon pêchée dans la cote Ouest d'Algérie.

II.1.1 Collecte des coproduits de thon

Les thons rouges (*Thunnus thynnus*) ont été pêchés dans la cote de Mostaganem et achetés dans le marché de Mostaganem, les coproduits analysés proviennent des marchés. Les thons ont été filetés manuellement et à l'issue de cette étape de transformation, les têtes, arrêtes etc, ont été récupérées et transportées vers le laboratoire.

II.1.2 Préparation des déchets à analysés

Afin d'obtenir une poudre de déchet, on suit les étapes suivantes :

Trier les déchets \Rightarrow cuisant à la vapeur \Rightarrow broyage \Rightarrow matière première



Figure 11 : Le thon rouge et la partie rejetée (les coproduits).

II.1.3 Préparation de l'isolat protéique

L'isolat protéique désigne un produit qui est caractérisé par sa richesse en teneur en protéines avec un faible taux de cendres. La préparation d'un isolat protéique est réalisée par une succession de différentes étapes (Sajot, 1979).

Les étapes sont les suivantes :

1. Préparation de la poudre

-Prendre une quantité de 200g des coproduits (tête et arêtes).

-Broyer les déchets pour faciliter l'hydrolyse.

2. Hydrolyse

-Il s'agit d'une hydrolyse chimique par une solution de NaOH.

-déposer la poudre dans un bécher, Ajouter une solution de NaOH (0,12N) au broyat pour atteindre le pH 12,5 nécessaire pour l'hydrolyse totale de l'échantillon.

-Il faut chauffer le mélange à une température de 70°C pendant 120min pour accélérer l'hydrolyse.

Remarque : on peut faire un tamisage pour éliminer les parties de déchets non dégradées.

3. Blanchiment

-Généralement, il est réalisé par l'eau oxygénée H₂O₂ (pH 3,5- 4,5), pour atteindre un pH de 11,5

-On doit chauffer à une température faible 50°C pendant 30min (car l'eau oxygénée est sensible à la chaleur élevée)

4. Précipitation et centrifugation

-la précipitation est faite par l'ajout d'un acide fort (HCl concentré) afin de stabiliser l'action de l'eau oxygénée et pour précipiter les protéines car le pH du milieu devient autour de 4,5.

-puis, on fait la centrifugation pour séparer le liquide du précipitât.

5. Extraction des graisses

-A partir du précipitât obtenu, on réalise 2 à 3 essais d'extraction de la matière grasse qui reste dans ce précipitât à l'aide d'une solution de l'isopropanol.

- Cette extraction est facilitée par un chauffage à 60°C pendant 15min pour faciliter la dégradation de la matière grasse.
- L'extraction nous donne un mélange d'un produit solide et de l'huile + isopropanol.
- Dons il faut réaliser une autre centrifugation pour extraire seulement le solide

6. Lavage et séchage

Ce produit exempté de matière grasse sera lavé 2 à 3 fois puis sécher dans une étuve de 50°C. A la fin de ces étapes, on a un produit sous forme d'une poudre qu'on peut appeler « isolat protéique » (Fig. 12).

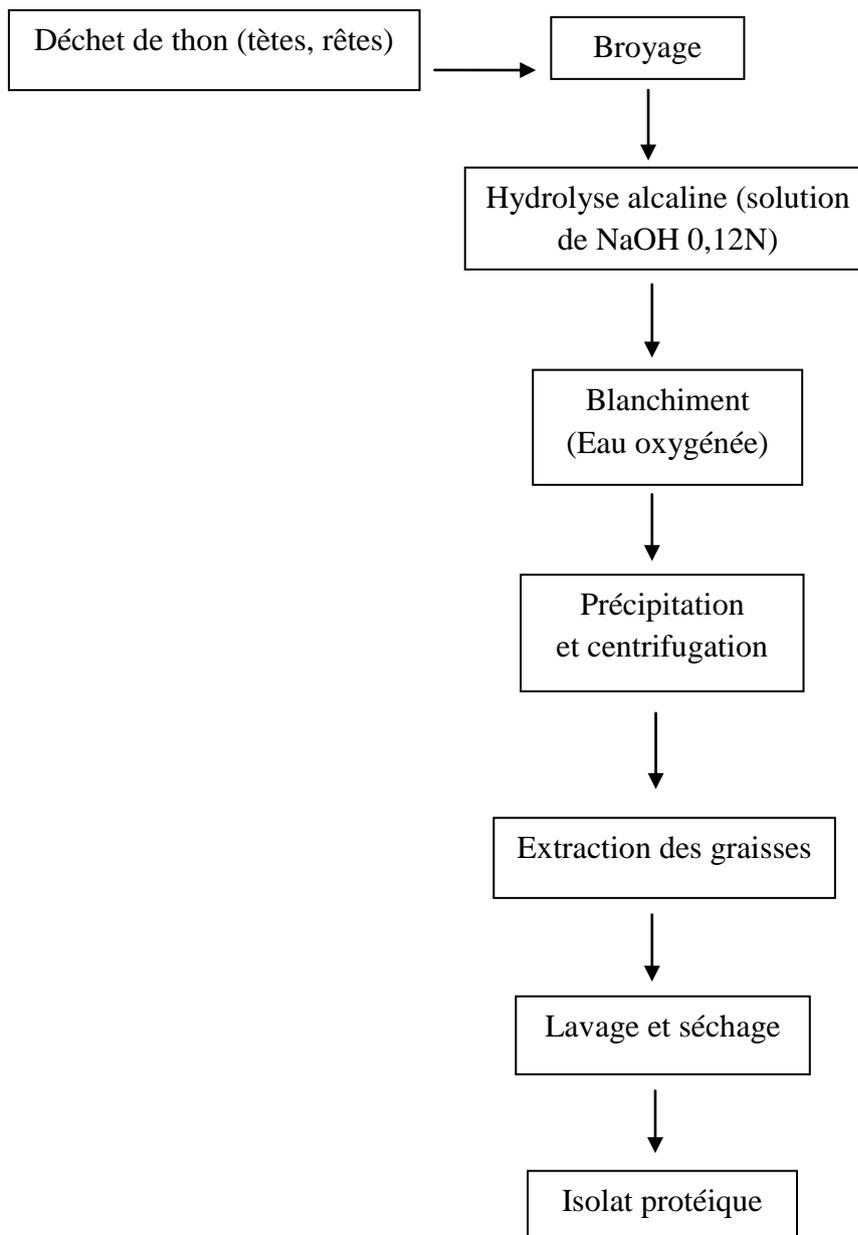


Figure 12: Diagramme de fabrication d'un isolat protéique

II.1.4 Préparation des hydrolysats chimiques :

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont perdues par les industries de transformation du poisson qui ne valorisent guère leurs co-produits ou déchets. L'hydrolyse des protéines est donc une des voies privilégiées de la valorisation de ces co-produits mais pour cela il convient d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines présentes afin de pouvoir les utiliser ultérieurement en nutrition humaine ou animale. Cette hydrolyse des protéines, qui peut se faire par voie chimique ou enzymatique, conduit à une grande variété de produits. C'est pour ça, on va valoriser les protéines présentes dans ces coproduits (têtes, arêtes).

II.1.4.1 L'hydrolyse acide

Il s'agit d'une hydrolyse où on utilise un acide fort comme la solution de l'acide sulfurique ou le HCl. On peut utiliser une solution d'acide faible comme l'acide acétique (Fig. 13).

Mode opératoire

- On prend 20g de notre échantillon (déchet de Thon), déjà préparé et déposé dans un bécher de 250ml.
- Ajouter à cet échantillon un volume de 50ml de solution de HCl concentré.
- Prendre le même échantillon et lui ajouter à 20ml de l'acide acétique juste pour comparer les différents effets des acides.
- Poser le mélange pour l'incuber à 30°C pendant 24 heures.
- Réaliser une centrifugation (4000tours /10min).

II.1.4.2 L'hydrolyse alcaline

Dans ce type d'hydrolyse, on utilise une solution de soude NaOH (5N) (Fig. 13).

Mode opératoire

- Mélanger dans un bécher 100g de déchets du Thon avec 20ml de solution de NaOH (5N).
- Autoclaver à 100°C et sous pression pendant 10min pour éviter tous risques de contamination.
- L'incubation se fait à 30°C pendant 24heures.
- Réaliser une centrifugation (4000tours /10min).

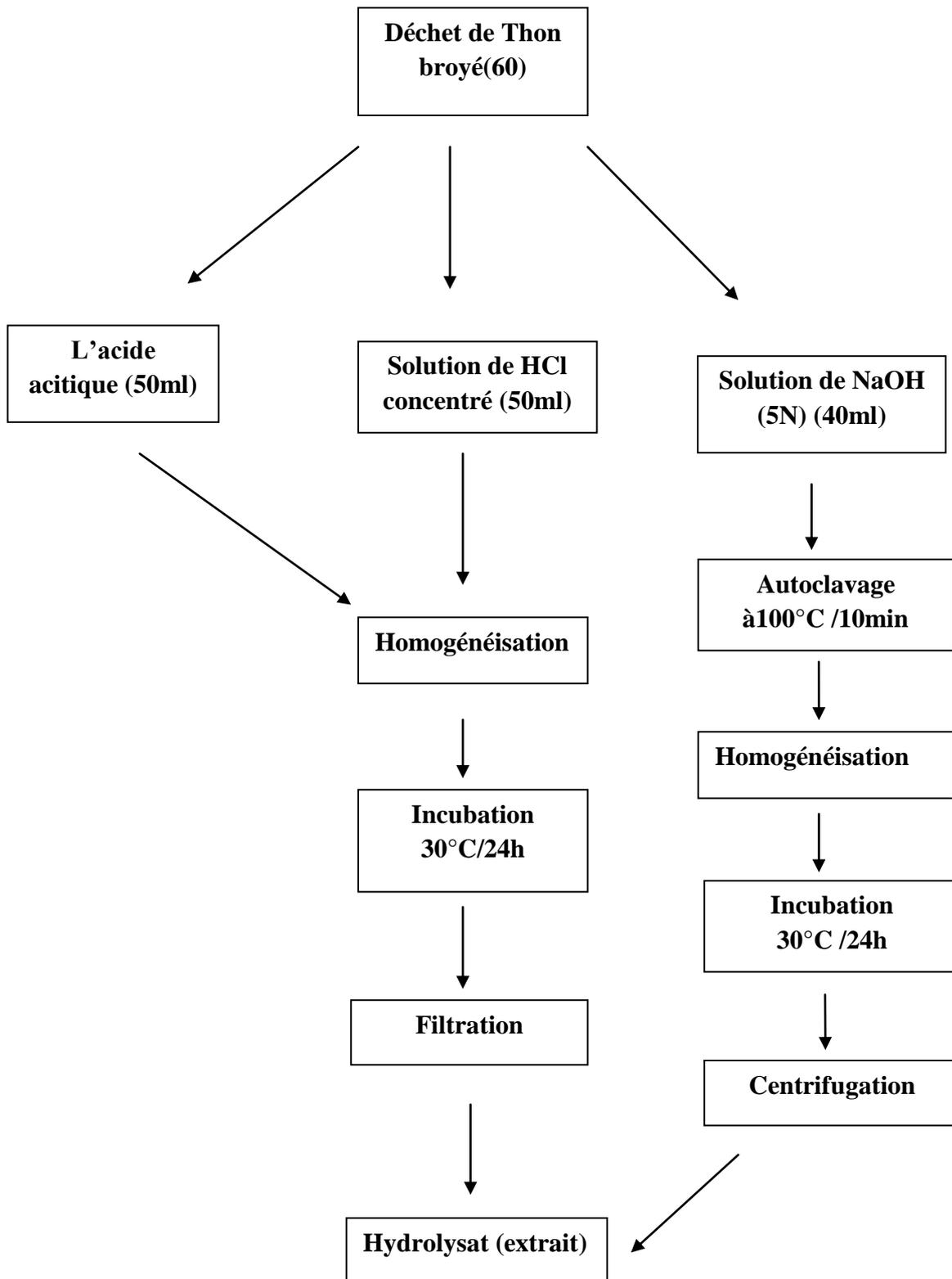


Figure 13 : Diagramme de préparation des hydrolysats chimiques

II.2 Les analyses biochimiques des échantillons

II.2.1 Dosage de la teneur en eau

La teneur en eau, ou l'humidité contenue dans un aliment est la quantité d'eau perdue par la substance lorsqu'on l'amène en équilibre vrai avec une pression de vapeur nulle (humidité relative égale à 0 %). La teneur en eau d'un échantillon d'aliment s'exprime en % de la masse d'eau rapportée, soit à la masse de matière sèche contenue dans l'échantillon, soit à la masse totale de la matière humide d'échantillon (**Fasquel et al ,2000**).

Pour estimer la part d'eau dans un produit 1 à 2 g d'échantillon, sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu. La coupelle est placée 24 h dans une étuve à 105°C, puis pesée après 30 min de refroidissement. L'expérience est réalisée en triplicat (**AOAC, 1980**).

La teneur en eau est déterminée dans la matière première et dans les produits d'extraction chimique et enzymatique. Ses produits sont marqués par une forte hygroscopicité.

✓ Principe

Elle est basé sur le séchage du produit à une température de 105°C pendant 24 heures jusqu'à l'obtention d'un point constant à la pression atmosphérique normale.

✓ Mode opératoire

- On a réglé le thermostat de l'étuve à 105°C
- On a pesé 1g de l'échantillon (creuset de porcelaine pesé avant) dans un creuset à masse marquée (P1) puis on l'introduit dans l'étuve.
- Après 24 heures, on retire le creuset et on la place dans le dessiccateur durant une heure et on fait la pesée (p3)

L'humidité est déterminée par la formule suivante :

$$H\% = ((P2-P3)/ (P2-P1))*100$$

P1 : masse en gramme du creuset vide.

P2 : masse en gramme du creuset +la prise d'essai avant le séchage.

P3 : masse en gramme du creuset + la prise d'essai après le séchage.

II.2.2 Dosage de la teneur en cendres

La teneur en cendres d'une denrée s'obtient par incinération (ou combustion complète) dans un four à 900°C. L'adjonction de réactifs comme le nitrate de lanthane peut faciliter ou accélérer la combustion (cendres moins fusibles).

Toutefois, la teneur en cendres ne correspond pas exactement à la teneur en matières minérales de la denrée (pertes de substances par volatilisation ou augmentation sensible de poids par formation de carbonates ou d'oxydes). Le dosage de la teneur en cendre pour l'isolat protéique nous permet de savoir la pureté de notre échantillon et pour conclure le % des protéines (**Fasquel et al. 2000**).

✓ Principe

L'incinération se fait dans une atmosphère oxydante 900°C jusqu'à la combustion complète. Le % de cendres totales est calculé sur une base humide, mais le plus souvent sur une base sèche pour plus de reproductibilité dans les résultats.

✓ Mode opératoire

- On pèse le creuset vide, puis on met 1g de la prise d'essai.
- On la place dans le four préalablement chauffé à 900°C durant 3heures.
- On retire le creuset du four, puis laisser refroidir dans un dessiccateur, ensuite c'est la pesée du creuset.

$$TC\% = ((P3-P1) / (P2-P1)) * 100$$

TC : taux de cendre

P1 : masse en gramme du creuset vide.

P2 : masse en gramme du creuset + la prise d'essai.

P3 : masse en gramme du creuset après incinération (cendre).

II.2.3 Dosage de la teneur en protéines (méthode de Kjeldahl)

Contrairement aux sucres et aux lipides, les protéines contiennent de l'azote. Cette propriété sera exploitée dans la méthode de détermination de la teneur en protéines dans les aliments. La méthode Kjeldahl est la méthode de référence pour la détermination des protéines dans les aliments (**Cover, 2007**).

✓ Principe

La détermination des protéines par la méthode Kjeldahl se divise en trois étapes :

1. Minéralisation de la matière organique par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur de cuivre pour convertir l'azote total en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2. Libération du NH_3 de l'échantillon minéralisé en ajoutant du NaOH en excès et distillation à vapeur de cet ammoniacque à l'acide borique.
3. Détermination du NH_3 libéré par titrage avec l'hydroxyde de sodium.

✓ Mode opératoire :**1. Minéralisation de la matière organique :**

- Peser 0,25g de l'échantillon et introduire cette prise d'essai dans un tube à minéralisation de Kjeldahl (Fig 14).
- Ajouter 20ml d'acide sulfurique pure et 5g de catalyseur ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4 + \text{se}$)
- Chauffer le tube tout d'abord doucement pour éviter le débordement de la mousse.
- Chauffer avec modération, en agitant de temps en temps en tournant jusqu'à carbonisation de la masse et disparition de la mousse, chauffer ensuite plus fort jusqu'à ébullition régulière du liquide, et arrêter le chauffage quand la couleur verte apparaisse.
- Transvaser le liquide dans une fiole de 100ml et ajuster au trait de jauge.

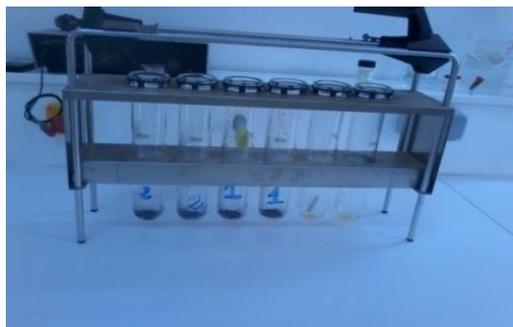


Figure 14 : Appareil de minéralisation

2. Neutralisation :

- Prélever un volume v (20ml) du distillat et transvaser ce liquide dans un ballon à deux col rodés. Y ajouter 40ml de NaOH à 30% et fermer immédiatement.
- A l'autre bout de réfrigérant (Fig 15), on place un bécher qui contient 20ml d'acide borique à 4%

- Lancer le chauffage du ballon pour distiller l'ammoniaque. Ce dernier sera piégé dans l'acide borique qui se colore en bleu (signe de présence d'ammoniaque).



Figure 15 : montage de l'appareil de distillation

3. Titrage : Titrer ce distillat avec de l'acide sulfurique N /20 jusqu'à la couleur de départ (grenade).

Calcul la teneur en azote : La teneur en azote est exprimée en masse du produit :

$$N(\%) = v.7*10.V/v0 *100/p$$

$$P(\%) = 6.25 *N(\%)$$

V : solution d'acide sulfurique pour la détermination.

V0 : volume de prise d'essai.

V : Volume de burette.

p : poids des échantillons



Figure 16 : le titrage

II.2.4 Dosage de la teneur en matière grasse :

La détermination des matières grasses dans le produit a été réalisée par l'extraction à l'oxyde di-éthylique. Cette technique est largement utilisée pour la détermination des matières grasses dans les aliments des animaux (ISO, 1999).

✓ **Principe :**

Il consiste à l'extraction sous reflux d'une prise d'essai avec de l'oxyde di-éthylique. Il y a élimination du solvant par distillation, dessiccation et pesée résidus

✓ **Mode opératoire :**

- Peser 5g de l'échantillon+100ml (chloroforme/ méthanol 2/1)
- Agiter le mélange a l'aide d'un agitateur bandant une nuit
- filtrer le mélange avec papier filtre et laver avec le mélange (chloroforme /méthanol) 15ml
- Ajouter au mélange 22ml Nacl (0,58%) dans une ampoule à décanter (reposé 6h)
- verser la phase inferieur du mélange dans un ballon.
- Placé le ballon sur la rote a vapeur (Fig 17).

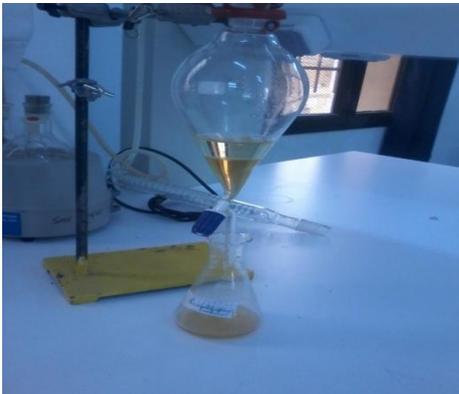


Figure 17 : Ampoule à décanter et Rote à vape

Expression des résultats :

$$\text{MG}\% = 100 (M2 - M1) / \text{prise d'essai}$$

M1 : le poids du ballon vide en gramme avant l'extraction.

M2 : le poids du ballon en gramme après l'extraction.

MG : matière grasse.

II. 3 L'étude microbiologique :

II.3.1 Préparation de la solution mère et les dilutions décimales

Pour préparer la solution mère, on procède comme suit :

- ✚ On introduit dans un flacon 10g d'échantillon (déchet de thon broyé) + 90 ml eau physiologique stérile, et on homogénéise parfaitement. Cette préparation constitue la solution mère.
- ✚ On prépare les dilutions décimales à partir de la solution mère en introduisant 1ml de la solution mère dans le premier flacon 9 ml de l'eau physiologique (Fig 18).
- ✚ On recommence l'opération jusqu'à l'obtention de la dilution souhaitée (jusqu'à la 6eme dilution).

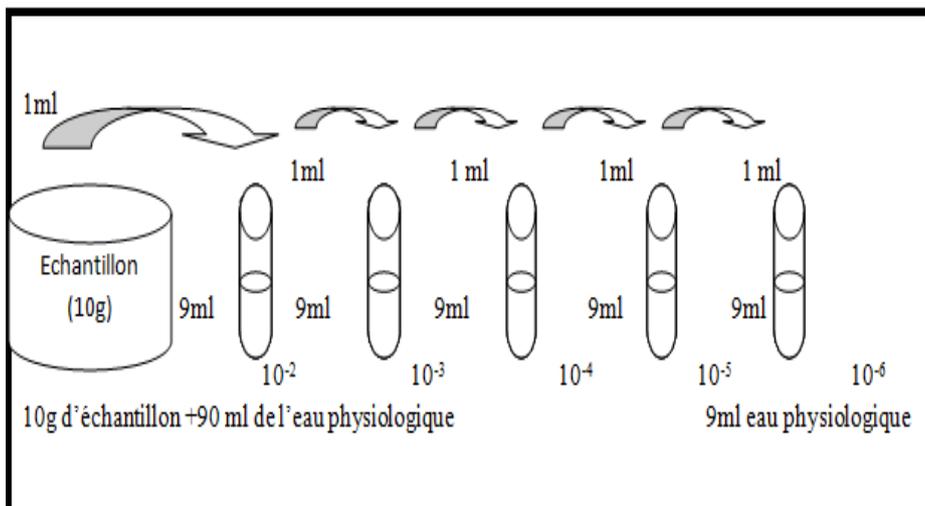


Figure 18 : Méthode de préparation des dilutions décimales

✓ La flore totale

Ce sont des micro-organismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprise entre 20°C et 45°C. Cette microflore peut comprendre des micro-organismes pathogènes pour l'homme et des micro-organismes d'altération variée (Guiraud, 1988).

✓ Les champignons :

Les champignons sont des êtres eucaryotes, hétérotrophes, unicellulaires ou filamenteux, sans organisation tissulaire et qui peuvent se reproduire soit sexuellement soit de façon asexuée (Murray *et al.*, 2008).

✓ Les levures :

Les levures sont des champignons microscopiques, unicellulaires de forme ovoïde ou sphérique. La grande particularité de la levure est qu'il s'agit d'un **organisme vivant** ! des levures sont vivantes et naturelles. Elles ont besoin d'air pour se multiplier, mais l'absence d'air n'est pas non plus sans conséquence sur son développement agroalimentaire, santé, cosmétique, la levure est partout. Zoom sur l'infiniment petit : La levure est entourée d'une paroi cellulaire qui entoure sa membrane plasmique et protège la levure des agressions extérieures. La levure est capable de vivre en présence ou en absence d'oxygène ! Explications. (**Microbiologia, 1999**)

II.3.2 Dénombrement de FTAM, levure et de champignon

Dénombrer la flore totale : c'est tenter de compter tous les micro-organismes présents, afin d'apprécier la pollution microbienne du produit. Ce dénombrement dépend des conditions de température (en général 30°C) le nombre de colonies en tenant compte des remarques suivantes :

- Le nombre de colonies doit être significatif : on considère qu'il faut plus 30 colonies par boîte de pétrie.
- Le nombre de colonies ne doit pas être excessif car, dans ce cas, des colonies peuvent être confondues : on considère qu'il doit y avoir moins de 300 colonies.
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution. (**Christiane et Jean-Noel JOFFIN 1993**)

Mode opératoire

A partir des dilutions de la solution mère préalablement préparée, nous avons inoculé 1ml d'échantillon dans une boîte pétri stérile. Nous complétons ensuite avec une quantité suffisante de la gélose PCA (pour les FTAM) et le la gélose OGA (pour les champignons et levures) fondue et refroidie à 45°C, puis nous agitons par un mouvement circulaire. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 72 heures. On compte les colonies (bactéries, champignons et levures) qui se développent quelques soit la taille et la forme des colonies.

II.3.3 Préparation des milieux de culture :

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié ce qui implique : (Meyer et, 2004)

- couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie ;
- présenter un pH voisin du pH optimal ;
- présenter une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).

Composition des milieux de culture (MRS – TGEA - OGA et PCA)

➤ Préparation des Milieux de culture (MRS)

- peptone10 g
- extrait de viande8 g
- extrait de levure..... 4 g
- Glucose..... 20 g
- Acétate de sodium tri hydraté..... 5 g
- Citrate d'ammonium..... 2 g
- Tween 80..... 1 ml
- hydrogénophosphate de potassium 2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté 0,2
- sulfate de manganèse tétra hydraté 0,05 g
- Agar 10 g
- pH = 6,2

➤ Milieux de culture TGEA

- Tryptone..... 5g
- Extrait de viande..... 3g
- Glucose..... 1g
- Agar..... 15g
- pH07

➤ **Milieu de culture OGA**

- Extrait de levure..... 5g
- Glucose..... 20g
- Agar..... 15g
- PH.....07

➤ **Préparation des milieux de culture PCA**

- Tryptone..... 5g
- Extrait de levure..... 2,5 g
- Glucose..... 1g
- Agar 12g

-La préparation d'un milieu de culture pour des bactéries lactiques : Ont a préparé un milieu universel (MRS) et d'autres milieux de culture MRS modifié (MRSM) dont lequel ont a ajouté soit l'isolat protéique, soit les différentes hydrolysats chimiques, soit la poudre de déchet de thon lui-même.

a) milieu MRSM1 (milieu MRS sans : peptones, extrait de viande, extrait de levure, tout cet ensemble est remplacé par 2,5g d'Isolat protéique) **voir Annexe I**

b) milieu MRSM2 (milieu MRS sans : peptones, extrait de viande, extrait de levure tout cet ensemble est remplacé par 2,5g de déche de Thon) **voir Annexe I**

c) milieu MRSM3 (milieu MRS sans : peptone, extrait de viande, extrait de levure tout cet ensemble est remplacé par 2,5g hydrolysats acide(Hcl)).**voir Annexe I**

d) milieu MRSM4 (milieu MRS sans : peptone, extrait de viande, extrait de levure tout cet ensemble est remplacé par 2,5g hydrolysats acide (Acide acitique)).**voir Annexe II**

e) milieu MRSM5 (milieu MRS sans : peptone, extrait de viande, extrait de levure tout cet ensemble est remplacé par 2,5g hydrolysats alcaline (NaOH)).**voir Annexe II**

-La Préparation d'un milieu de culture pour des bactéries E. coli : Dans ce cas, ont a préparé un milieu universel (TGEA) et d'autres milieux de culture modifié (TGEAM) dont lequel ont a introduit soit la poudre de déchet de thon, soit l'isolat protéique, soit les hydrolysats chimiques.

a) milieu TGEA1 (milieu TGEA sans : Tryptone, extrait de levure tout remplacé 0,9g de déche de Thon) **voir Annexe II**

- b) milieu TGEA2** (TGEA sans Tryptone, sans extrait de levure +0,9g d'Isolat protéique)
voir Annexe II
- c) milieu TGEA3** (TGEA sans Tryptone, sans extrait de levure + 0,9g hydrolysate acide(Hcl)). **Voir Annexe II**
- d) milieu TGEA4** (TGEA sans Tryptone, sans extrait de levure + 0,9g hydrolysate acide (Acide acétique)). **Voir Annexe III**
- e) milieu TGEA5** (TGEA sans Tryptone, sans extrait de levure + 0,9g hydrolysate alcaline (NaOH)).**voir Annexe III**

II.3.4.1 Les souches bactérienne utilisées :

➤ Bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles sont Gram +, généralement immobiles, asporulées et ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al, 1994**). Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, anaérobies partiellement tolérantes à l'oxygène, ne produisant pas en général de spores, se présentant sous formes de coques ou de bâtonnets et capables de fermenter les sucres en acide lactique.

Elles ont été utilisées par l'homme depuis le néolithique pour fabriquer des aliments fermentés. Leur production d'acide lactique permet d'acidifier le substrat et par là d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des modifications organoleptiques. La fermentation améliore la conservation et modifie la saveur des aliments. On trouve des bactéries lactiques dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), les boissons alcooliques fermentées (vin, bière, cidre), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain.

➤ *Escherichia coli* :

La bactérie *Escherichia coli*, également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale (Gram négatif) des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches *d'E. coli* peuvent

être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou une septicémie. (Microbiol., 2004.)

II.3.5 Utilisation de la poudre du thon comme source de bactéries lactiques :

Dans l'ensemble, la majorité des travaux sont portés accent sur l'exploitation des coproduits de la mer comme source de bactéries d'intérêt industriel ou comme source d'enzymes ou de bactéries lactiques. Donc, notre second but de valoriser ces déchets n'est qu'un essai pour confirmer ou infirmer la présence de bactéries lactiques dans la poudre de déchet de thon. Pour cela, nous avons suivi un protocole standard d'isolement et d'identification de ce type de bactéries. Un ensemencement de 0,1ml de la dilution 10^{-4} de notre échantillon sur le milieu MRS a été réalisé après qu'on a laissé à température ambiante jusqu'à l'obtention d'un pH 5,8.

✓ Enrichissement

A partir de notre échantillon (déchet de thon), on a réalisé des dilutions décimales, puis 1ml de la dilution 10^{-5} et 10^{-6} est mis dans un bouillon MRS, incubé à 30°C pendant 24 à 48h. Le résultat positif est indiqué par une turbidité dans le bouillon.

✓ Isolement

0,1 ml de bouillon MRS, présentant un trouble, est étalé par râteau sur gélose MRS en surface. L'incubation se fait en anaérobiose 30°C pendant 24 à 5 jours.

✓ Identification des bactéries lactiques

Des souches bactériennes isolées ont été identifiées par caractérisation physiologique et biochimique selon les critères préconisés par **Larpen –Gourgaud et al. ,(1997) ; Axelsson (2004) ; Hammes et Hertel (2006) ; Teuber et Geis (2006) et Bjorkroth et Holzapfel (2006).**

Cette identification a été faite en deux étapes :

➤ Caractérisation macroscopique

Une observation macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies, obtenues sur milieu gélosé (taille, pigmentation, contour, viscosité...)

➤ Caractérisation microscopique

L'examen microscopique a été effectué, après coloration de Gram sur une culture jeune de 24 heures. Les formes caractéristiques des cellules microbiennes, leur arrangement, la présence ou non de spore et leur coloration de Gram ont été déterminées.



CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET
DISCUSSIONS

III.1 Préparation des hydrolysats et isolat protéique

Les rendements massiques des différents coproduits préparés à partir de déchet de thon sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 03 : Les rendements massiques pour l'isolat protéique et hydrolysats chimiques

	La Prise d'essai de l'échantillon en (g)	Les rendements massiques
Isolat protéique	200 g	48 g soit 24%
Hydrolysats acide(HCl)	20 g	08 g soit 40%
Hydrolysats acide(A.acétique)	20 g	14,50 g soit 72,5%
Hydrolysats alcaline (NaOH)	20 g	13,06 g soit 65,3%

D'après les résultats cités ci-dessus, on remarque que le rendement observé pour A.acétique est plus élevé avec 72,5 % par rapport à celui du HCl et NaOH cette différence est due à l'acidité trop forte de HCl (pure). Cela conditionne la dégradation de la quantité de matière contrairement à A.acétique qui est un acide faible.

Pour l'isolat protéique nous avons obtenu un rendement faible de 24 % seulement, cela est dû à l'extraction de l'isolat protéique en passant par plusieurs étapes de : déminéralisation, déprotéinisation, blanchiment et délipidation.

III.2 L'analyse biochimique

Toutes les valeurs des teneurs en eau, en cendre, en lipide et en protéine pour les quatre échantillons sont indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Résultat des analyse biochimiques (eau, cendre, lipide, protéine) exprimé en (%) des différents échantillons.

		La teneur en eau	La teneur en cendre	La teneur en lipide	La teneur en protéine
Poudre		29,7%	7,14%	22%	49%
Isolat protéique		3,9%	13,66%	8%	55%
L'Hydrolysats Chimique	HCL	75,18%	5,45%	45%	14,87%
	Acide Acitique	90%	12,38%	40%	35%
	NaOH	78%	40%	15%	17,5%

La teneur en eau :

A partir des résultats obtenus, on remarque que la poudre à 29,7 % d'humidité. Contrairement à l'isolat protéique avec seulement 3,9 % d'eau considéré comme un produit sec cette sècheresse est due au séchage sévère de l'isolat (à 90°C pendant 24h). Par contre les hydrolysats chimiques sont sous traitées à état humide, leur valeurs varie entre 75,18 et 90 %.

La teneur en cendre :

On remarque que la poudre de déchet de thon et l'isolat protéique ont respectivement tout les deux les taux les plus élevés en minéraux à 16,90 % et plus de 13,66 % (en matière sèche).

Les acides ont une spécificité de déminéralisation donc l'hydrolysats de l'HCl est pauvre en minéraux suivi par l'acide acétique à un taux de cendre de 12,38 %.

L'hydrolysats chimique de l'NaOH a un taux élevé de cendre par rapport aux hydrolysats acides parce qu'il n'a aucun effet sur les minéraux.

Les protéines

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que les protéines du déchet de thon est élevé à 49 % suivi par l'A.A à 35 % un taux qui reste élevé en protéine. Par contre pour les autres hydrolysats, ils ont un taux faible de protéine avec 17,5 % et 14,87% respectivement.

Concernant l'isolat protéique, le pourcentage de protéine calculé est de 55 %. Il représente une quantité importante selon la composition de l'Isolat.

Et puisque les protéines du poisson renferment tous les acides aminés essentiels, donc, on peut déduire que notre isolat protéique a une haute valeur biologique vu sa richesse en acide aminés essentiels.

Les lipides

Le dosage le plus élevé de la matière grasse et sel des hydrolysats Hcl et A.A avec 45% et 40% cette augmentation est due a la manipulation dans l'étape de filtration (lipide reste dans la paroi de la toile ou papille filtre et donc mélanger avec le culot. Ou lieu de flotter sur le surnagent, la poudre aussi contienne une quantité importante des lipides 22% et sa c'est logique pour un poisson comme le thon.

Pour NaoH le taux de lipide est 15% les considéré comme un taux faible, ca résulte de la centrifugation.

L'Isolat protéique est donc le produit le plus pauvre en lipides est ca est dur a l'étape de dégradation des lipides dans laquelle on rince avec l'isopropanol 2a3 fois

III.3 L'analyses microbiologiques

III.3.1 Evaluation de la charge microbienne de l'échantillon (déchet de thon)

Notre étude de la charge microbienne de l'échantillon (déchet du thon) a pour bute de juger utile d'évaluer la charge microbienne de notre échantillon afin d'estimer le risque que peut encourir chacun de nous lors d'un rejet de déchet tel que les déchets de pêche et par voie de conséquence prospector les différentes voies de valorisation. L'ensemble des résultats obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Nombre de colonies de la flore mésophiles obtenue dans les différentes dilutions du déche de Thon

Germes aérobies mésophiles totaux(les dilutions)	Nombre (germes /ml)
10^{-4}	41.10^4
10^{-5}	27.10^5
10^{-6}	17.10^6

Nous avons remarqué une présence très importante des germes aérobies mésophiles pour les trois dilutions. L'analyse bactériologique de notre échantillon montre une contamination totale avec $6,7.10^6$ de micro-organismes aérobies mésophiles à 30 °C.

Cette flore peut être considérée comme une flore d'altération, car la présence d'une flore mésophile aérobie, revivifiable, abondante indique un processus de dégradation en cours (GUIRAUD, 1998).

III.3.2 Evaluation de la contamination par les champignons et levures de l'échantillon (déchet de thon) :

Cette partie de l'étude reflète l'état actuel des connaissances sur la contamination fongique de notre poudre de déchet de thon. La détermination des champignons implique en premier lieu une reconnaissance des caractères apparents, dits macroscopiques. Les moisissures sont des contaminants fréquents de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Leur présence peut altérer le produit.



Figure 19 : image macroscopique de levure

Sur un milieu OGA, l'observation visuelle des boîtes après incubation nous a révélé qu'il y avait une croissance modérée des espèces de levure, et aucun développement des champignons n'a été remarqué sur les boîtes. La croissance de levure sur les boîtes nécessite une étude prolongée pour l'identification de ces levures par isolement de plusieurs dilutions.

III.3.2.1 Isolement de la souche de levure retrouvée

L'isolement des levures à partir des déluion (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) sur le milieu OGA nous a permis de distinguer la présence d'une seule souche de levure, selon les critères des aspects macroscopique suivants :

- ✓ La forme des colonies: isolées, enchainement, en amas, gonflé et aplaté.
- ✓ La couleur de colonies est crémeuse, grise et blanche.
- ✓ L'odeur est ressentie dans quelques colonies.

L'aspect macroscopique de la colonie isolée : elle est de couleur blanche, une forme isolées et gonflée (fig.20).



Figure 20: Aspect macroscopique de la souche de levure isolée.

III.3.4 l'étude microbiologique sur les milieux de culture modifiés

III.3.4.1 les milieux de culture pour une bactérie non exigeante (gélose TGEA)

- Pour le milieu TGEA témoin :



Figure 21 : Aspecte macroscopique de la souche *E. Coli* sur la gélose TGEA témoin

La croissance de la souche de référence *E coli* sur ce milieu donne des colonies blanches (à crème) avec des bords réguliers.

- Pour les milieux TGEA modifiés :

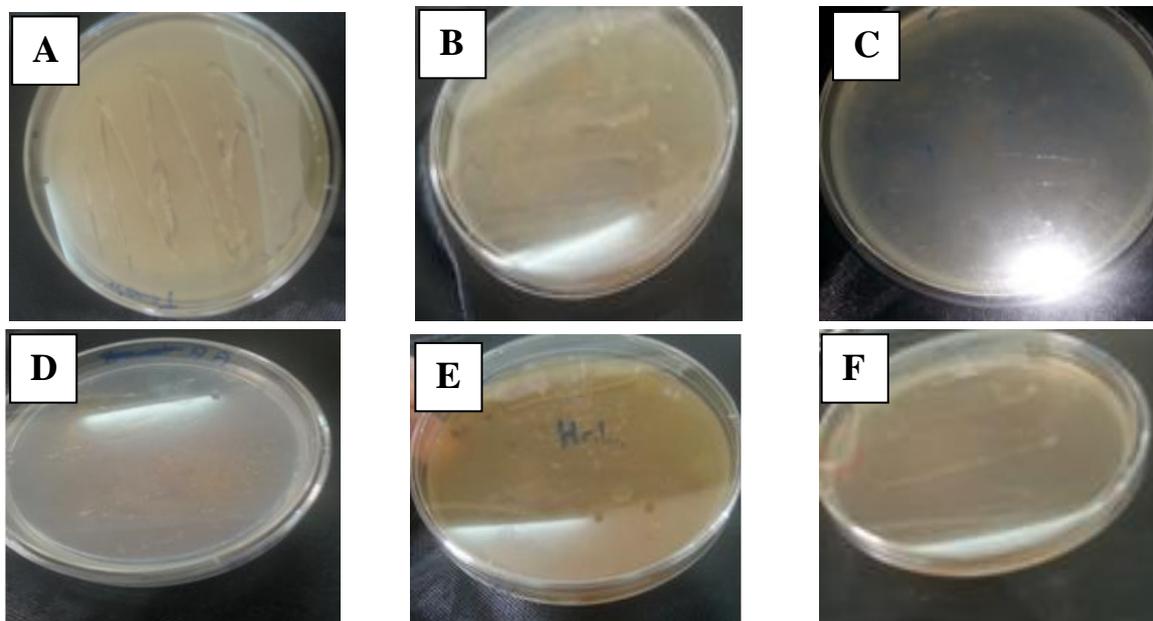


Figure 22 : résultats d'ensemencement des bactéries lactiques (A) sur la gélose TGEA témoin, (B) la gélose TGEAM (la poudre) et (C) la gélose TGEAM (Isolat protéique), (D) la gélose TGEAM (A. Acétique), (E) la gélose TGEAM (NaOH) et (F) la gélose TGEAM (HCl) après l'incubation.

La comparaison entre les résultats de ces trois milieux TGEA indique que la croissance de la bactérie *E.Coli* est similaire dans les deux milieux modifiés (TGEAM de la poudre et TGEAM de l'isolat), avec une différence de temps au niveau du développement bactérien et cela par rapport à notre témoin.

Pour les trois hydrolysats, la croissance bactérienne prend plus de 5 jours pour donner un signe d'apparition modeste de la bactérie.

III.3.4.2 les milieux de culture pour une bactérie lactique (gélose MRS)

- Pour la gélose MRS témoin :



Figure 23: Aspect de la souche sur la gélose MRS témoin

Les colonies issues de l'ensemencement de notre souche lactique sur le milieu MRS témoin, sont de couleur blanchâtre, convexes, lisses, à bord régulier et de petites taille d'un diamètre d'environ 2mm. Ces colonies ont poussé après 2 jours d'incubation. La souche lactique s'est facilement développée avec un temps d'incubation réduit. Il s'agit d'un milieu qui comporte tous les éléments essentiels à la croissance optimale de ce type de bactéries.

- Pour le milieu MRSM1

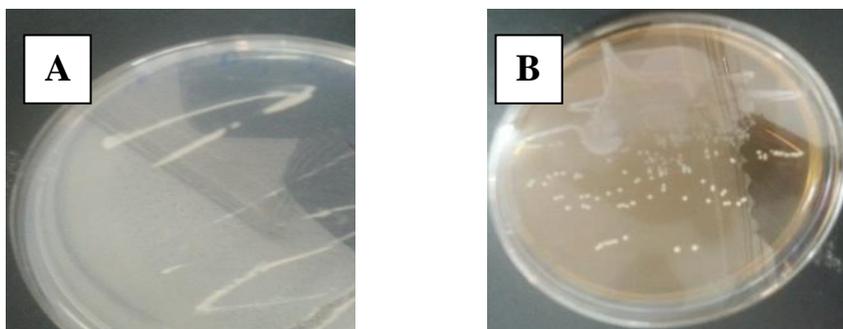


Figure 24 : résultats d'ensemencement des bactéries lactiques (A) sur la gélose MRSM1, (B) la gélose MRS témoin après l'incubation.

Pour cette gélose (MRSM1) préparée avec l'isolat protéique, elle est caractérisée par une couleur transparente de structure homogène, ce qui indique la bonne solubilité de notre isolat protéique dans le milieu. L'apparition des colonies sur cette gélose avait besoin d'une durée d'incubation de 4 jours et même le nombre des colonies est beaucoup plus réduit par rapport à la gélose témoin. Ce qui signifie que les bactéries lactiques ont besoin de plus de temps pour s'adapter avec le nouveau milieu.

- **Pour le milieu MRSM2**

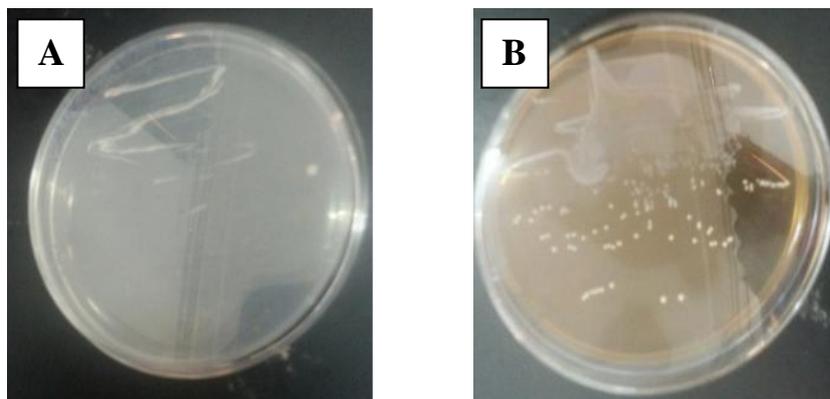


Figure 25 : Aspect des colonies (A) sur la gélose de MRSM2 de l'isolat protéique, (B) sur la gélose MRS témoin

Pour la gélose MRS2 : préparée par le déchet de Thon, cette gélose possède le même aspect que le milieu MRSM1 (de l'isolat protéique) mais l'apparition des colonies exige une incubation plus rapide que celui du milieu de culture MRS1, en demandant seulement 3 jour d'incubation, une période qui est nécessaire pour favoriser à la bactérie lactique de se développer normalement en dégradant les composants essentiels présents dans la poudre tel que les protéines.

- **Pour les milieux de culture modifiés MRSM3, MRSM4 et MRSM5 :**

Se sont des milieux de culture préparés par les hydrolysats chimiques : A. acétique, NaOH et HCl. D'après les résultats obtenus, on a observé que la croissance de la bactérie lactique sur ces trois milieux est moins développée par rapport aux milieux composés par la poudre, l'isolat protéique et le témoin (fig.26). Cette différence est liée au nombre des colonies développées ainsi que la durée de l'apparition bactérienne.

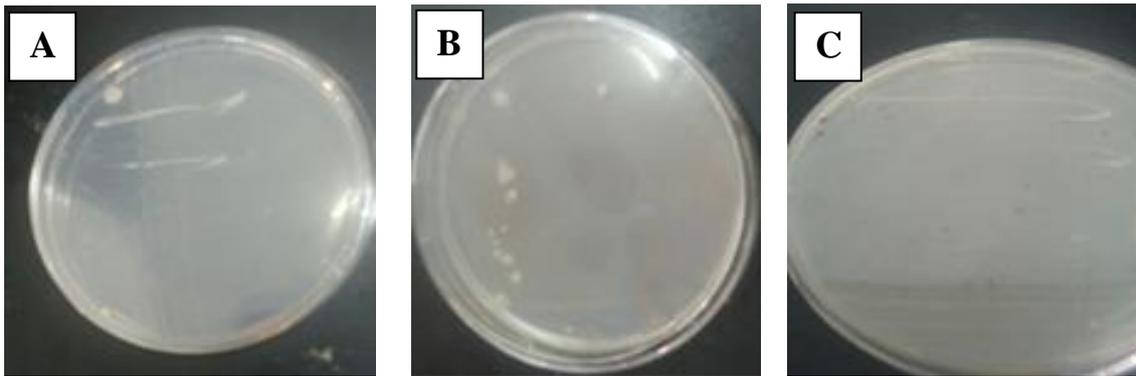


Figure 26 : La croissance de la bactérie lactique sur les milieux modifiés par les hydrolysats protéiques obtenus par la méthode chimique : (A) MRSM3, (B) MRSM4 et MRSM5

III.3.5 Déchet de poisson comme source de bactéries lactiques

L'incubation à 30°C pendant 24 à 48h de deux milieux MRS bouillon avec des dilutions 10^{-5} et 10^{-6} (contenant la poudre de déchet de thon), nous avons obtenus des résultats positifs indiqués par une turbidité dans le bouillon (fig.27). Cela nous a poussés à réaliser d'autres analyses approfondis : Isolement sur MRS gélosé et coloration de Gram.



Figure 27 : résultat positif de la présence des bactéries lactiques sur MRS bouillon.

L'ensemencement sur le milieu MRS acidifié a donné lieu, après incubation de 24 à 48h, à des colonies caractéristiques de bactéries lactiques. Danc notre poudre de déchet de thon est source de bactérie lactique, mais seulement d'une seule bactérie identifiée selon l'observation microscopique qui donne à une bactérie à Gram positif et d'une forme de bâtonnets (bacilles) (fig.28.B)

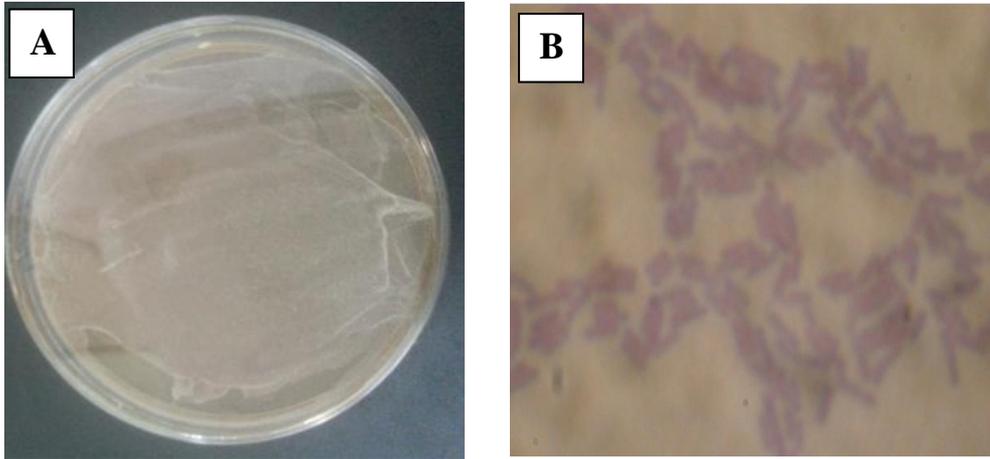


Figure 28 : (A) Aspet de la bactérie lactique en milieu MRS, (B) resultat de coloration de grame de la bacterie.



CONCLUSION

Conclusion

Avec l'extension de la consommation du thon rouge à l'ensemble du monde entier, la demande de thon rouge a littéralement explosé au cours des trente dernières années. Une meilleure gestion des déchets du thon au cours du filetage, permettrait une diminution de leur impacte sur l'environnement.

Tout le long de notre travail, nous avons essayé d'une part, de valoriser les coproduits de thon rouge (*Thunnus thynnus*) afin de les utiliser en préparant des milieux de culture pour des germes précis et d'autre part, voir si ces coproduits peuvent être une source des bactéries à intérêts industriels.

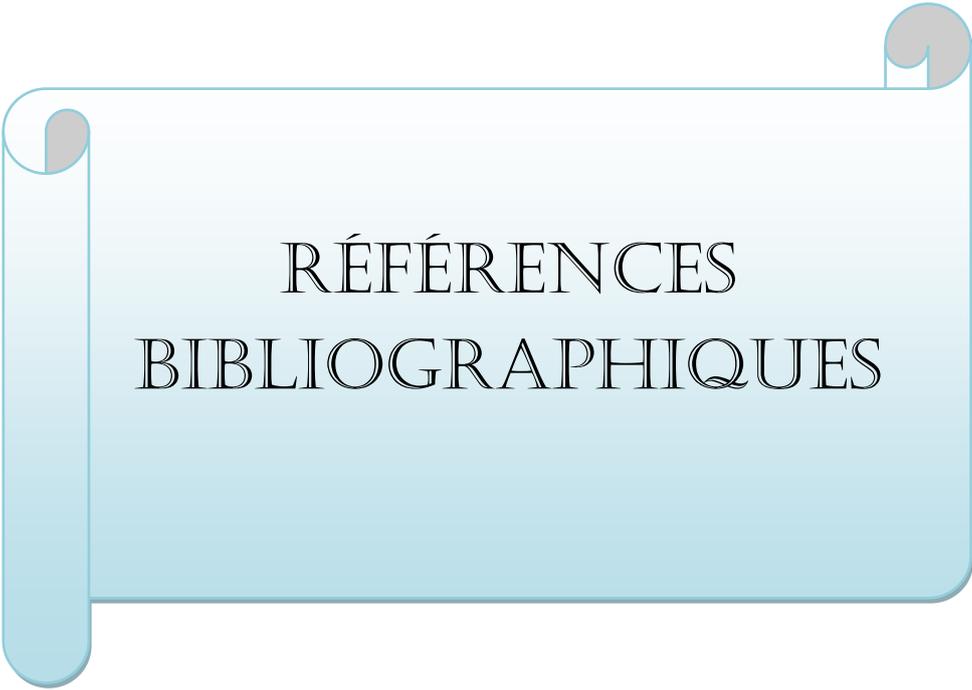
Ces deux principaux objectifs poursuivis dans ce travail ont été atteints : Le premier objectif était de mettre au point une expérience d'utiliser les coproduits de thon et de ces dérivés (hydrolysats protéiques extraites par des méthodes chimiques plus au moins douces) comme source essentielle destinée en microbiologie, afin de préparer des milieux de cultures modifiés dont les souches bactériennes s'adaptent dans la majorité des milieux préparés, ceci a été exprimé par une croissance abondante (ou modérée) sur les boîtes.

D'après les résultats obtenus à travers les analyses biochimiques de nos substrats (isolat protéique et hydrolysats chimiques) extraites à partir des coproduits, on a trouvé que ces derniers sont riches en protéines. Ce qui donne une valeur biologique élevée à notre échantillon. Ces résultats ont été confirmés par le développement bactérien en présence de ces éléments.

Le deuxième objectif de ce travail, a été aussi atteint avec succès, et on a conclu que la poudre de notre échantillon qui est le déchet de thon (tête et arrêtes.....) est une source de bactérie lactique bacille à gram+.

L'ensemble de ces résultats, montre l'intérêt biologique de ces coproduits (et leur dérivés) par leur valeur ajoutée.

Pour cela, parmi les perspectives que nous préconisons c'est de réaliser en parallèle de l'extraction, de caractériser et d'exploiter les propriétés biochimiques des hydrolysats protéiques des coproduits du thon rouge par voie enzymatique autre que la méthode chimique développée dans ce travail.



RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Retirances bibliographique

C

Cover., 2007. Etude des propriétés fonctionnelles et organoleptiques de la protéine animale., Ed : Doc &pdf.

Christiane et Jean- Noël JOFFIN., 1993. professeurs physiologie , biologie et Microbiologie au lycée Paul-Eluard de saint-Denis (93)

D

Denes A., 2006. Etude comparée de l'effet de deux protéases sur la production d'hydrolysats dotés d'activités antioxydante et antiradicalaire. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. 45pp.

Dellaglio et al., 1994. Bifidobacterium longum ATCC 15707 cell production during free- and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium (Denes, 2006) in fishmeal. Fr détails sur le site Passeport Santé [archive].

Dumay J., 2006. Extraction de lipides en voie aqueuse par bioreacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: Application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). Thèse de doctorat de l'Université de Nantes. 305 pp

F

Fasquel M., Dumon J-P., Fasquel A-M., 2000. Activité technologique en biochimie –tome 1 méthode d'analyse, 2^{ème} Ed sceren, PP : 15-16-103-105.

FAO., 2008. FAO Globe fish, 2009

FAO., 2008. Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO - Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture Rome, 2008, 92 pp.

FAO Globefish., 2009 . Fishmeal market report - May 2009.

FAO Globefish., 2009 . Fish oil market report - January 2009.

François SARANO., 2009. : *Le peuple d'océans*, éditeur Seuil jeunesse, 2009

G

Guérard F., Batista I., Pires C., Thorkelson G., et Gal Y., 2004. Report On sources and selection criteria for raw material. Rapport établi pour le programme SEAFOOD plus, 57pp

GUIRAUD J.P; 1988. analyse microbiologiques dans les industrie agro-alimentaires. Analyse du poisson et produits de la mer .PARIS edition de l'usine nouvelle, P149-150-250.

Retirances bibliographique

G. E. Miller, P. M. Grant, R. Kishore, F. J. Steinkruger, F. S. Rowland et V. P. March
1972. Guinn, *Mercury Concentrations in Museum Specimens of Tuna and Swordfish* ;
Science 10 March 1972: Vol. 175 no. 4026 p. 1121-1122 DOI:
10.1126/science.175.4026.1121

I

Ifremer.,2008. La farine de poisson et autres produits d'origine aquaculture du site Web
aquaculture. 8p

Ifremer., 2008. La farine de poisson et autres produits d'origine aquaculture du site Web
aquaculture. 8p

ISO.1999. aliment des animaux determinant de la teneur en matière grasse. ISO n °6496-1999.

K

Kumai H., 1998. Studies on bluefin tuna artificial hatching, rearing and reproduction.

Nippon Suisan Gakkaishi, 64, 601-605.

M

Meyer. A, Deiana. J , Bernard. A. , 2004. Cours de microbiologie general : avec problems et
exercices corrigés.

Microbiol., 2004. James B. Kaper, James P. Nataro et Harry L. T. Mobley, « Pathogenic
Escherichia coli », Nat. Rev., vol. 2, pp. 123 à 140.

Murray et al., 2008. Memoire Online - Evaluation de l'activité antidermatophytique des
extraits au méthanol et fractions d'*acalyphamanniana* (euphorbiacées) et *tristemma hirtum*
(mélastomatacées) - Rosine Clémentence Momo Dongmo.html

Microbiologia., 1999. Giselle A.M. Soares ET Hélia H. Sato, « Killer toxin of
Saccharomyces cerevisiae Y500-4L active against Fleischmann and Itaiquara commercial
brands of yeast » p. 253–257

P

Paquette P., 1999. La situation du marché du thon. *Ofimer*, 12: 6-9.

Q

Quéro J.C., Vayne J.J., 1997. Les poissons de mer des pêches françaises. Editions
Delachaux et Niestlé,Lausanne, 304 p.

S

Retirances bibliographique

Schipp G., 2008. Is the use of fishmeal and fish oil in aquaculture diets sustainable? Department of Primary Industry - Fisheries and Mines. Northern Territory Government. Technote 124, 15p.

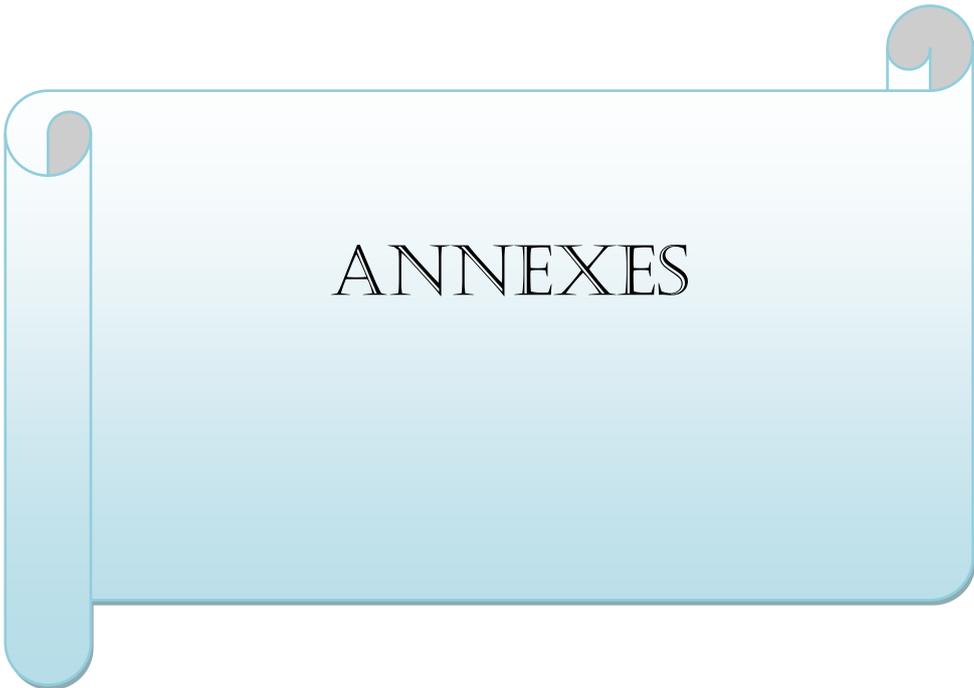
W

Washington JA.,1996. *Baron's Medical Microbiology (Baron S et al., eds.)*, Galveston, Univ of Texas Medical Branch, , 4^e éd., relié, « Principles of Diagnosis

La liste de site internet

https://www.notre-planete.info/actualites/actu_3124_thon_rouge_surpeche.php

www.bastia-offshore-fishing.com/Pages/thonrouge.aspx



ANNEXES

Annexe I

Les milieux de culture modifiés utilisés.

Milieux de culture MRSM1

- Isolat protéique 2,5g
- Glucose 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté 5 g
- Citrate d'ammonium 0,2 g
- Tween 80 0,1 ml
- hydrogénophosphate de potassium 0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté 0,005 g
- Agar 1,5 g
- pH = 6,8

Milieux de culture MRSM2

- déchet du thon 2,5g
- Glucose 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté 5 g
- Citrate d'ammonium 0,2 g
- Tween 80 0,1 ml
- hydrogénophosphate de potassium 0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté 0,005 g
- Agar 1,5 g
- pH = 6,8

Milieux de culture MRSM3

- hydrolysate Acide (HCl) 2,5g
- Glucose 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté 5 g
- Citrate d'ammonium 0,2 g
- Tween 80 0,1 ml
- hydrogénophosphate de potassium 0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté 0,005 g
- Agar 1,5 g
- pH = 6,8

Annexe II

Milieux de culture MRSM4

- hydrolysate Acide (Acide Acétique) 2,5g
- Glucose 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté 5 g
- Citrate d'ammonium 0,2 g
- Tween 80 0,1 ml
- hydrogénophosphate de potassium 0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté 0,005 g
- Agar 1,5 g
- pH = 6,8

Milieux de culture MRSM5

- hydrolysate alcaline (NaOH) 2,5g
- Glucose 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté 5 g
- Citrate d'ammonium 0,2 g
- Tween 80 0,1 ml
- hydrogénophosphate de potassium 0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté 0,005 g
- Agar 1,5 g
- pH = 6,8

Milieu de culture TGEA1

- déchet du thon 0,9g
- Glucose 1g
- Agar 15g
- pH = 7

Milieu de culture TGEA2

- Isolat protéique 0,9g
- Glucose 1g
- Agar 15g
- pH = 7

Annexe III

Milieu de culture TGEA3

- hydrolysate Acide (HCl) 0,9g
- Glucose 1g
- Agar 15g
- pH = 7

Milieu de culture TGEA4

- hydrolysate Acide (Acide acétique) 0,9g
- Glucose 1g
- Agar 15g
- pH = 7

Milieu de culture TGEA5

- hydrolysate alcaline (NaOH) 0,9g
- Glucose 1g
- Agar 15g
- pH = 7

Milieu de culture OGA

- Extrait de levure 5g
- Glucose 20g
- Agar 15g
- PH= 7

Milieu de culture PCA

- Tryptone 5g
- Extrait de levure 2,5 g
- Glucose 1g
- Agar 12g
- pH = 7