

## Potentiel des hydrolysats d'un clupéidé esturien, l'*Ethmalose* d'Afrique (*Ethmalosa fimbriata* S) comme source de nutriments pour la fertilisation des plantes cultivées

Andréa Marcelline OBELLA<sup>1,2,3</sup>, Claire DONNAY-MORENO<sup>2</sup>, Sandrine BRUSAC<sup>2</sup>,  
Dieudonné NWAGA<sup>1</sup> et Jean Pascal BERGE<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> University of Yaounde I, Centre of Biotechnology, Laboratory for soil Microbiology,  
BP 842 Yaounde, Cameroon

<sup>2</sup> Institut Français de recherche et exploitation de la Mer (IFREMER), Unité de Biotechnologie et Ressources  
Marines, Laboratoire Science et Technologie de la Biomasse Marine, BP 44311 Nantes, France

<sup>3</sup> Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CENAREST), Institut de Recherches  
Agronomiques et Forestières (I.R.A.F), Laboratoire de Biotechnologie Végétale, BP 2246 Libreville, Gabon

\* Correspondance, courriel : [Jean.Pascal.Berge@ifremer.fr](mailto:Jean.Pascal.Berge@ifremer.fr)

### Résumé

Notre étude porte sur l'apport des hydrolysats enzymatiques de coproduits de poisson (*d'Ethmalosa fimbriata*) ou *Ethmalose* d'Afrique obtenu à base deux enzymes, la Papaine et Protamex® sur les paramètres de croissance des plantes cultivées. Les résultats obtenus montrent que les hydrolysats de poisson sont une importante source de protéines, donc une source d'azote non négligeable utile pour être appliqué aux plantes et utilisés comme engrais. La teneur en azote, phosphore et éléments minéraux est évaluée pour chacune des fractions obtenues. La teneur en composés azotés des coproduits est plus importante pour les fractions hydrolysées avec Protamex® 13.6 % contre 13.3 % avec la Papaine. L'analyse des arêtes de poisson donne une bonne proportion de matière organique à 94 g / kg.

**Mots-clés :** *Ethmalosa fimbriata*, hydrolysats, enzymes, azote organique, protéines.

### Abstract

**Potential of hydrolysates of Estrean clupeid, *Ethmalose* of Africa (*Ethmalosa fimbriata* S) are the source of nutrients for the fertilization of cultivated plants**

Our study focuses on the contribution of enzymatic hydrolysates of fish by-products (from *Ethmalosa fimbriata*) or *Ethmalose* from Africa, based on two enzymes, Papain and Protamex®, on crop growth parameters. The results obtained show that fish hydrolysates are an important source of protein, and therefore a source of non-negligible nitrogen useful for application to plants and used as fertilizers. The content of nitrogen, phosphorus and mineral elements is evaluated for each of the fractions obtained. The content of nitrogen compounds in co-products is higher for hydrolyzed fractions with Protamex® 13.6 % compared with 13.3 % for Papain. Analysis of fish bones yielded a good proportion of organic matter at 94 g / kg.

**Keywords :** *Ethmalosa fimbriata*, hydrolysates, enzymes, organic nitrogen, proteins.

## 1. Introduction

Le secteur de la pêche est aujourd'hui un des secteurs les plus importants de la production alimentaire mondiale. Il produit chaque année des millions de tonnes de poissons (plus de 167,2 millions de tonnes capturées en 2014) dont 43,7 % sont transformées en farine de poisson [1]. Ce secteur produit d'énormes quantités de déchets ou coproduits évaluées à environ 150 000 tonnes par an [2]. Le Gabon est un pays d'Afrique Centrale situé au niveau de l'équateur au bord de l'Océan Atlantique. Sur sa façade maritime, longue de 800 km, la pêche artisanale est fortement développée, la pêche commerciale moderne dans cette zone étant principalement gérée par des sociétés étrangères et exploitée dans d'autres pays. La production estimée, toute pêche confondue, est de 35 000 tonnes par an [3]. Le potentiel halieutique exploitable est estimé à 300.000 tonnes avec 62,3 % constituées de petits pélagiques [4]. La capture des clupéidés dans cette zone est abondante et male, voire non gérée. Pendant les débarquements, l'*Ethmalosa fimbriata* est une espèce qui domine largement les captures avec un fort potentiel de valorisation. Espèce très répandue, abondante dans la pêche artisanale traditionnelle en Afrique en général et au Gabon en particulier, elle fait l'objet d'une pêche intensive et contribue de manière significative à l'autosuffisance alimentaire [5]. La consommation de poissons a augmenté ces dernières années et de la même façon la quantité de déchets générés par leur transformation est en progression constante. Ces déchets sont soit laissés sur place, soit éliminés dans des décharges ou encore rejetés en mer.

Une autre possibilité pour rentabiliser ces rejets serait de se pencher dès aujourd'hui sur le problème de l'utilisation rationnelle de ces rejets par des voies écologiquement acceptables. Les méthodes classiques de valorisation de coproduits de poisson (têtes, viscères, arêtes, peaux et cartilages) sont actuellement en majorité la transformation sous forme de protéines alimentaires à faible valeur ajoutée pour l'alimentation animale [6, 7] et de fertilisants organiques [8]. Le compostage a également été étudié par [9], ainsi que la fermentation pour la production d'aliments pour animaux ayant un taux de digestibilité excellent [10]. La demande croissante des cultures en engrais, l'appauvrissement des sols par l'utilisation d'engrais minéraux [11], l'acidité due à l'érosion et le lessivage obligent à développer d'autres types de produits pour l'enrichissement des terres cultivables. Un intérêt est porté sur l'utilisation de protéines issues de coproduits de poisson, riches en azote et en minéraux, qui pourrait ainsi trouver une voie de valorisation intéressante au niveau commercial. Cette forme d'agriculture que l'on peut qualifier d'écoagriculture ou agriculture biologique permettra également une gestion participative de la pêche et de l'agriculture dans un souci de préservation de l'environnement et de santé publique. [12], ont étudié la fermentation de déchets de poisson pour la fertilisation de transplants en culture hydroponique. L'objectif de cette étude est de caractériser les hydrolysats de coproduits de poisson (*Ethmalosa fimbriata*), d'évaluer le potentiel fertilisant des fractions obtenues afin de favoriser l'apport des hydrolysats de poisson sur quelques spéculations de culture de pouvoir utiliser ces hydrolysats pour la fertilisation des cultures vivrières.

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Matériel

Les coproduits utilisés (têtes, arêtes et viscères) sont récupérés sur le port de pêche d'Oloumi au Gabon. Ils proviennent de la transformation de poissons appartenant à l'espèce *Ethmalosa fimbriata* fortement exploitée dans cette région. Nous avons également travaillé sur des poissons de petite taille, non commercialisable, et destinés habituellement à la production de farine. Les produits sont, à réception, stockés à -18 °C. Avant hydrolyse, des échantillons de 500 g à 1 kg sont prélevés, décongelés une nuit à 4 °C puis broyés à l'aide d'un turmix durant 5 minutes (*Figure 1*).



**Figure 1** : Poisson entier (a), têtes, arêtes, queues (b) et (c) viscères

### 2-1-1. Enzymes

Les enzymes utilisées pour l'hydrolyse sont Protamex® et la Papaine. a) Protamex® est une endopeptidase industrielle obtenue à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis* (EC.3.4.21.62). Elle est utilisée sous forme d'une poudre de micro granules. Protamex® présente une activité maximale lors des réactions à des pH compris entre 5.5 et 7.5, et aux températures comprises entre 35 et 60 °C. b) La Papaine (EC 34.22.2) est une protéase à cystéine présente dans le latex de la papaye (*Carica papaya*) ainsi que dans l'ananas. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique, avec trois ponts disulfure et un groupe sulfhydrile nécessaire à l'activité de l'enzyme. Elle possède un poids moléculaire de 23 406 Daltons. Et présente une activité maximale lors des réactions à des pH compris entre 6.0 et 7.0 et une température de 65 °C.

### 2-1-2. Hydrolyse

Après décongélation, les coproduits sont homogénéisés avec de l'eau (ratio 1 / 1, w / v). L'hydrolyse enzymatique est réalisée dans un bioréacteur Distek évolution 6000 (Photo) de volume de 1000 mL à une température de 50 °C, à pH constant (6,5) durant 5 heures sous agitation contrôlée (250 rpm). L'enzyme est inactivée par augmentation de la température du mélange à 85 °C durant 10 minutes. Durant l'hydrolyse, 50 mL d'échantillons sont prélevés aux temps suivants (0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 et 300 min). Après inactivation à 85 °C 10 min et refroidissement rapide, ils sont centrifugés à 9000 g, à 4 °C pendant 20 min. Les culots et surnageant sont récupérés, lyophilisés et stockés à -20 °C jusqu'à analyse.



**Photo** : Bioréacteur DISTEK EVOLUTION 6100

## **2-2. Méthodes d'analyse**

Toutes les analyses sont effectuées en triplicat.

### **2-2-1. Matière sèche**

Avant lyophilisation, la teneur en matière sèche de l'échantillon est déterminée par différence de masse après évaporation de l'eau et des matières volatiles dans une étuve à 105 °C durant 6 heures minimum.

### **2-2-2. Teneur en minéraux**

La teneur en minéraux des échantillons est déterminée par différence de masse après incinération de l'échantillon à 600 °C durant 4 heures minimum.

### **2-2-3. Teneur en azote total (méthode de Kjeldhal)**

L'azote total est dosé par minéralisation de l'échantillon à l'aide d'un excès d'acide sulfurique concentré et chaud, l'ammoniac obtenu est déplacé par une solution concentrée d'hydroxyde de sodium, recueillie dans une solution d'acide borique et titrée à l'acide chlorhydrique.

### **2-2-4. Teneur en lipides totaux**

La teneur en lipides est déterminée par extraction, par un mélange de solvants [13]. Cette technique repose sur le principe d'extraction à froid des lipides par un mélange de solvants méthanol/chloroforme (ratio 1 / 2, v/v). L'addition d'une solution aqueuse de Na Cl à 0,9 % (p / v) favorise l'obtention d'un système diphasique. La phase supérieure constituée de méthanol et d'eau contient les composés hydrophiles (glucides et protéines) tandis que les lipides sont dissous dans la phase organique inférieure. La phase organique inférieure est récupérée dans un ballon taré puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Ce ballon, contenant l'extrait lipidique, est ensuite placé sous azote pour éliminer toute trace de solvant puis pesé pour déterminer les quantités de lipides contenus dans les hydrolysats de poisson.

### **2-2-5. Détermination de la composition en acides aminés**

La composition en acides aminés des hydrolysats lyophilisés a été déterminée après hydrolyse dans HCl 6M à 118 °C pendant 18 h. Les échantillons sont ensuite séchés sous azote et dissous dans 2,5 mL d'eau. L'analyse des acides aminés est effectuée conformément à la procédure EZ faast™ (Phenomenex ®) constituée d'une étape d'extraction en phase solide, suivie d'une dérivation et d'une extraction liquide / liquide. L'analyse est réalisée en GC-MS. Le spectromètre de masse est un Agilent 5973 (Agilent, CA, USA) équipée d'une colonne ZB-AAA Zebron (température maxi. 320 / 340 °C). La norvaline, à une concentration de 200 mmol / L, est utilisée comme étalon interne.

### **2-2-6. Détermination du degré d'hydrolyse**

Le degré d'hydrolyse (DH) est déterminé en mesurant la libération des groupes aminés libres selon la méthode de Sanger (1945). Les groupements libres réagissent avec le dinitrofluorobenzène pour former un complexe de dinitrophényl jaune. Après centrifugation, l'hydrolysats est dilué au 200<sup>ème</sup>. A un millilitre de solution diluée est ajouté 1mL de tétraborate de sodium (2 %). Après mélange, 0,25mL de solution de 2.4-dinitrofluorobenzène (DNFB/éthanol:0,013/1, v/v) est additionné. Les échantillons sont chauffés 10 minutes à

60 °C. Après refroidissement, la réaction est stoppée par addition de 2 mL d'acide chlorhydrique. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec la glycine (SIGMA, France) par lecture de l'absorbance à 410 nm. Les résultats sont exprimés en équivalent glycine.

### 2-3. Analyse statistique

Les données sont analysées par la méthode de Kruskal Wallis et l'analyse de la variance (ANOVA) à l'aide du logiciel statistique XLSTAT 2010<sup>®</sup>. Les différences significatives ont été déterminées à 5 %.

## 3. Résultats

### 3-1. Analyse chimique des coproduits et de la matière première

La composition chimique de la matière première présentée dans le **Tableau 1**. L'hydrolyse enzymatique a été effectuée sur des échantillons d'essai de 10 kg de matière première préparés à partir des différentes parties (poisson entier, têtes, arêtes et viscères) des poissons *Ethmalosa fimbriata*. Les paramètres étudiés étaient le temps d'hydrolyse (0,15, 45, 60, 90, 120, 180, 240 et 320 mn), la concentration en protéine des deux enzymes Protamex et Papaïne et les éléments minéraux et organiques. Après hydrolyse les fractions d'hydrolysats 50 mL ont été extraites pour effectuer les différentes analyses. Les **Tableaux (1a et 1b)** montrent les concentrations des différentes valeurs évaluées avant et après hydrolyse dans les différentes parties du poisson *Ethmalosa fimbriata*. En effet, la teneur en azote est de 3 % chez le poisson contre 2,5 % dans les coproduits. Les teneurs en Ca et Mg sont, significativement plus élevées dans les coproduits que dans les poissons entiers. Aucune différence significative n'a été observée pour les teneurs en P, K, Na et cendres entre le poisson et les coproduits. Une formule d'engrais comporte trois chiffres en indiquant le pourcentage en azote (N), en phosphore (P) et en potassium (K). Nous obtenons donc un 3N-1P-0,25K pour les analyses sur le poisson entier et 2,5N-1,18P-0,24K pour les têtes arêtes et viscères, ces données nous renseignent sur la capacité de fertilisation des hydrolysats et permettent de déterminer la quantité des éléments minéraux. Les éléments minéraux apportent à la plante la valeur fertilisante des engrais, point de départ d'une valorisation efficace des coproduits de poisson. Par ailleurs, le dosage séparé d'autres éléments tels que le calcium (Ca), le magnésium (Mg) et le sodium (Na) peut être utile, afin de compenser les carences en fertilisant dans le cas où il n'y en aurait pas en quantité suffisante dans le sol.

### 3-2. Protéines solubles, azote et lipides totaux

L'analyse des produits bruts de coproduits faite au laboratoire montre un taux d'azote organique de 3,26 % pour le poisson entier et 2,87 % contenu sur les têtes arêtes et viscères (**Tableau 1a**). La comparaison entre les résultats, montre que la matière fraîche est composée de 3 % d'azote total par la méthode de Kjeldahl quand on utilise le poisson en entier et 2,5 d'azote total pour arêtes têtes et viscères (**Tableau 1**). On retrouve 20,39 % de protéines pour le poisson entier et 18,38 % de protéines pour les têtes, arêtes et viscères, par rapport à la matière sèche, 24,27 % pour le poisson entier et 23,62 % pour les têtes arêtes et viscères. La détermination des cendres ou matières minérales a été effectuée par incinération des échantillons à 600 °C.

**Tableau 1 :** Composition chimique des poissons entiers, coproduits et hydrolysats d'*Ethmalosa fimbriata*. (FHP) (Matières brutes et surnageant)

Matières brutes (avant hydrolyse)		
Composition (%)	Poisson entier (PE)	Tête, arête, viscère (TVA)
Azote	3,6 ± 0,17	2,87 ± 0,09
Protéines	20,39 ± 1,09	18,38 ± 0,55
Lipides	1,90 ± 0,20	2,78 ± 0,15
Matières sèches	24,27 ± 0,59	23,62 ± 0,69
Cendres	5,47 ± 0,42	6,11 ± 0,45

a) Moyenne des différentes valeurs évaluées avant hydrolyse, chaque données est significativement différente ( $P < 0,05$ ).

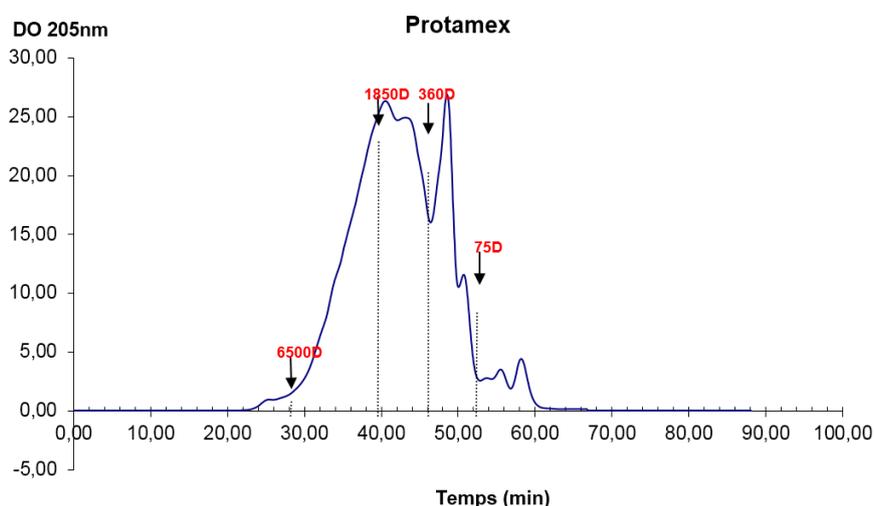
Surnageant (après hydrolyse)		
Composition (%)	Protamex®	Papaïne
Azote	13,60 ± 0,35	13,30 ± 0,29
Protéines	82,30 ± 2,45	81,14 ± 0,81
Lipides	1,70 ± 0,10	2 ± 0,10
Matières sèches	9,27 ± 0,59	8,71 ± 1,54
Cendres	3,98 ± 2,99	2,19 ± 1,64
Degré d'hydrolyse	33,36 ± 3,56	29,76 ± 5,05

b) Moyenne des différentes valeurs évaluées après hydrolyse, chaque donnée est significativement différente ( $P < 0,05$ ).

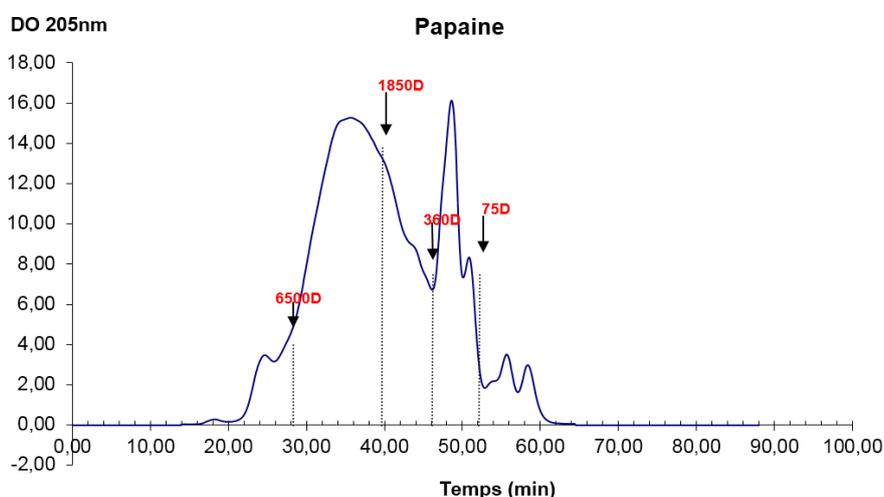
Les résultats des hydrolyses de Protamex et Papaïne montrent les différentes répartitions du degré d'hydrolyse (DH) obtenu dans nos conditions expérimentales après 5 heures de réaction pour le poisson (*Ethmalosa fimbriata*) atteint 29,8 % avec la Papaïne et 33,4 % avec Protamex. Ces résultats sont équivalents à ceux obtenus par [14] sur *Pseudosciaena Polyactis* avec ces mêmes enzymes à pH 7,0. Les teneurs en azote sont respectivement de 13,30 % pour la Papaïne et 13,60 % pour Protamex®. L'azote est l'élément important pour la fertilisation des plantes. L'azote obtenu est l'azote total (méthode Kjeldhal) qui représente toutes les formes d'azote minéral et organique présentes dans l'hydrolysate, excepté les formes oxydées. Sa valeur fertilisante dépend de sa richesse initiale en azote ammoniacal sous forme de l'ion ammonium  $NH_4^+$ , mais aussi de son aptitude à être facilement minéralisé dans le sol. La teneur en protéines brutes peut être utilisée comme indicateur de la pureté de l'hydrolysate des protéines. Les résultats expérimentaux répétés trois fois dans des conditions d'hydrolyse optimales ont donné en protéines brutes 81,14 % ± 0,81 pour la Papaïne et 82,30 % ± 2,45 pour Protamex. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur *Clupea harengus* par [15] allant de 84,44 % à 87 % et à ceux de [16], qui ont rapporté des teneurs en protéines brutes de hareng 77 % et 87,9 %. La protéase commerciale a été celle qui a procuré une hydrolyse de protéines beaucoup plus fluide. La teneur en cendres de l'hydrolysate de protéines est élevée, elle est de 6,1 %. Les cendres peuvent partiellement être constituées de phosphate de sodium utilisé lors de l'hydrolyse et en même temps être une source de phosphore. Le phosphore mis à la disposition de la plante sera directement utilisable car étant présent sous forme minérale et organique. En outre les teneurs en matière grasse de coproduits avant hydrolyse n'étaient pas significativement plus élevées après hydrolyse, par contre nous avons constaté qu'il n'y a pas de grandes quantités de lipides ceci serait dû à la taille des poissons utilisés (**Figure 1**). Les mêmes

résultats ont été observés par [17] sur *Sardinella aurita* ce qui peut assurer la stabilité de l'échantillon. Les hydrolysats de protéines ont de faibles teneurs en matière grasse (Papaine 1,7 % et Protamex® 2 %). Cette faible teneur assure la stabilité du produit au cours du stockage. La présence des lipides en petite ou en grande quantité est importante car ils jouent un rôle protecteur de la couche cellulaire de l'épiderme et de réserves énergétiques chez la plante. Ces résultats sont plus élevés que ceux obtenus par [18] sur *Sardina pilchardus* avec 1,45 %, par [17] sur *Sardinella aurita* et inférieur aux résultats obtenus par [6] avec 3,1 % sur *Sardina pilchardus* avec l'enzyme Protamex. Ces résultats ont été obtenus dans des conditions de température constante. Ces produits sont une importante source de protéines, donc une source d'azote non négligeable et la teneur en eau est faible. La teneur en matières sèches a été mesurée après hydrolyse des fractions par séchage à 105 °C. Le niveau de concentration de la fraction liquide du produit obtenu après hydrolyse donne les teneurs en matière sèche pour les deux enzymes de  $9,27 \pm 0,59$  (traitement au Protamex®) et de  $8,76 \pm 1,54$  (traitement à la Papaine) avec une texture solide visqueuse sur les échantillons traités à la Papaine. Plus la matière sèche est élevée plus elle est riche en éléments fertilisants.

**3-2-1. Évaluation de la quantité des lipides dans les hydrolysats de poisson d'*Ethmalosa fimbriata* après 5 heures d'action**



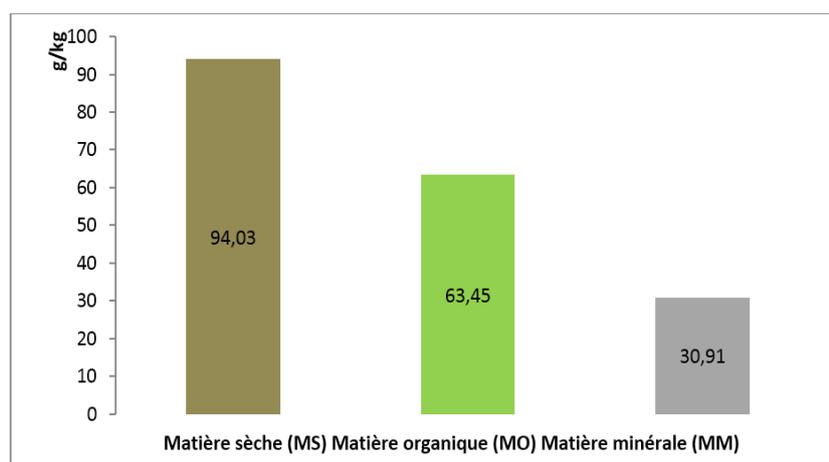
**Figure 2 :** Profils moléculaires (HPLC) des hydrolysats de poisson, après 5 heures d'action de la Protamex à 50 °C



**Figure 3 :** Profils moléculaires (HPLC) des hydrolysats de poisson, après 5 h d'action de la Papaine à 50 °C

La qualité nutritionnelle contenue dans des hydrolysats des poissons a été évalué à partir de la méthode Folch. En effet, les résultats obtenus après extraction des lipides en vu du dosage des acides gras lors de l'évaluation de la quantité de lipide contenu dans les hydrolysats de poisson montrent les réactions chez protamex et Papaïne. Le profil obtenu avec Protamex (*Figure 2*), le pic en début de chromatographie haut est différent de celui de l'enzyme Papaïne (*Figure 3*) il présente deux crochets et le dernier pic est beaucoup plus rapproché du deuxième. Le premier pic est quasiment inexistant avec un poids moléculaire de 6500 kDa. Pour les deux enzymes les pics obtenus étaient au-delà de 75 kDa. Dans l'ensemble, les profils obtenus avec Protamex et Papaïne sont pratiquement identiques avec une forte proportion de matière dans la fraction insoluble.

### 3-2-2. Composition des hydrolysats de poisson (*Ethmalosa fimbriata*)



**Figure 4 :** Composition de la matière sèche (MS), matière organique(MO), matière minérale(MM) des coproduits d'*Ethmalosa fimbriata*

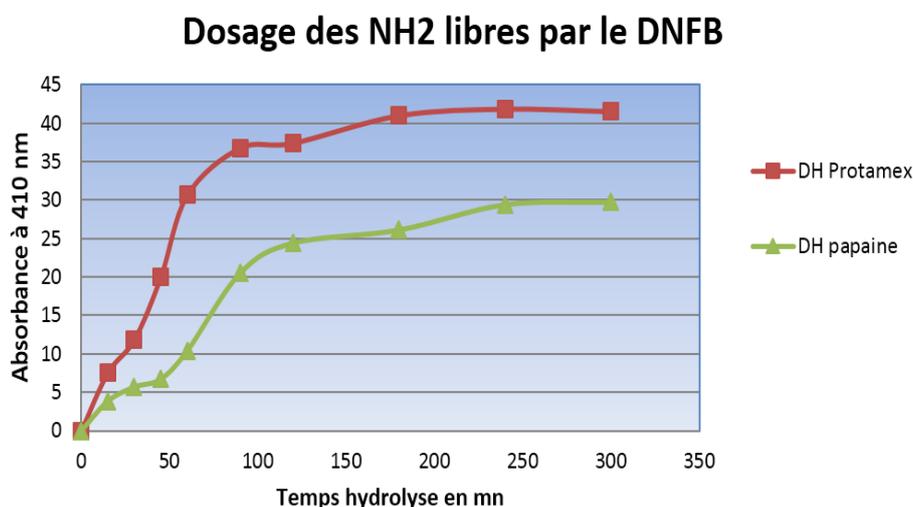
La quantité de fertilisant apporté pour entretenir une plante est primordiale. Les analyses effectuées ont permis d'obtenir des quantités de matières premières importantes retrouvées dans les arêtes de poisson hydrolysées. Les arêtes contiennent une grande quantité de matière sèche 94,03 g/kg, 63,45 g/kg de matière organique et 30,91 g/kg de matière minérale qui va permettre d'améliorer la structure en augmentant son aération et sa résistance à la compaction. Les produits organiques sont intéressants du fait qu'ils sont utilisés comme amendements par l'apport de la matière organique et comme fertilisants par l'apport d'éléments fertilisants minéraux. Ceci est particulièrement utile pour la fertilisation des plants en pépinière (*Figure 4*).

**Tableau 2 :** Composition chimique des coproduits hydrolysés d'*Ethmalosa fimbriata*. (Unités en g / kg des poudres d'arêtes de poisson, excepté le pH)

Éléments	Matière sèche
C	336 ± 0,46
NPK	54,97 ± 0,90
NH4 +	3,93 ± 0,06
C / N	6,1 ± 0,3
NH4 / N	0,07
Ca <sup>2+</sup>	149,6 ± 18,943
K+	4,73±0,12
Mg+	5,13±0,15
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	125,8±3,06
Na+	5,4±0,26
pH	6,3

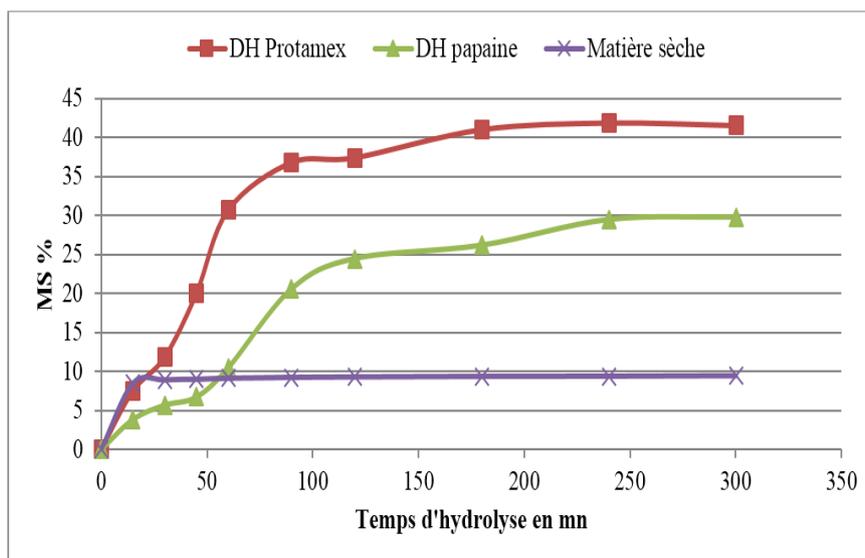
Les résultats obtenus des analyses élémentaires des arêtes de poisson montrent la variabilité de tous les éléments importants à la croissance des plantes (**Tableau 2**). Un traitement enzymatique par Protamex des arêtes de poisson, pendant 360 mn à une température constante de 105°C, permet d'obtenir une fraction hydrolysée que l'on peut diviser en trois parties. La partie solide qui renferme les arêtes de poisson montre que la matière sèche contient des oligoéléments composés de Ca+ ( $149,6 \pm 18,943$ ), Na+ ( $5,4 \pm 0,26$ ), Mg+ ( $5,13 \pm 0,15$ ), P ( $125,8 \pm 3,06$ ) à des quantités plus ou moins intéressantes qui vont contribuer au bon développement des plantes. Le rapport C / N est de  $6,1 \pm 0,3$  avec le C qui est à 336 g / kg. Le pH 6,3 observé est neutre à ce moment l'action du phosphore est bénéfique à la plante, car l'action du pH influence la survie de la plante et le rendement de la plante. D'une manière générale, quand le substrat utilisé à un pH acide, il est nécessaire de vérifier les quantités de calcium et de potassium disponibles. Les études menées par [19] ont révélé l'importance du pH des hydrolysats pour la croissance des plantes et les quantités de fertilisants à apporter et qu'il faut bien doser afin d'éviter qu'il y ait trop de paramètres qui influencent le développement de la plante.

### 3-3. Évolution de l'hydrolyse des coproduits



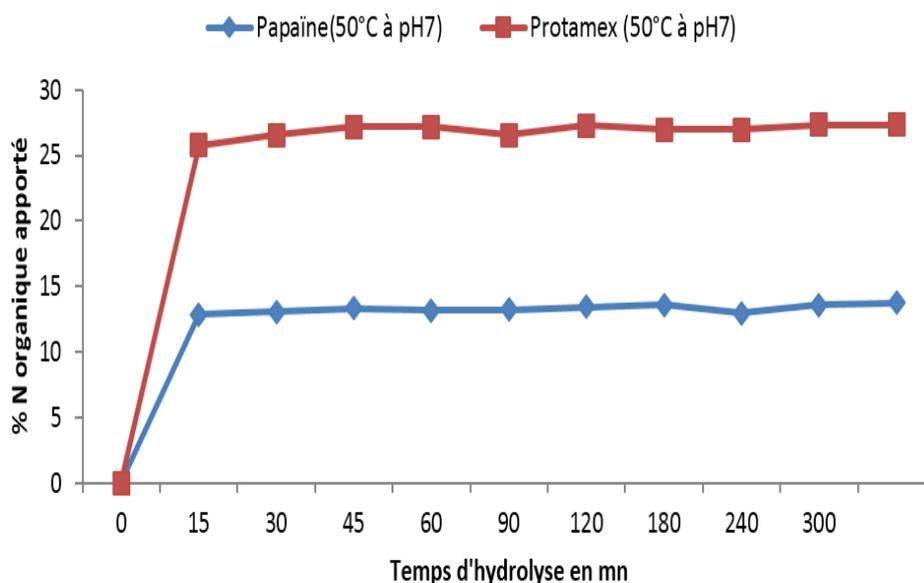
**Figure 5 :** Évolution du degré d'hydrolyse (DH) de différents substrats obtenus d'*Ethmalosa fimbriata* à partir de la production d'azote par deux enzymes (Protamex®, Papaine)

Afin d'avoir une hydrolyse enzymatique avec un bon rendement, les conditions de travail doivent être précises, avec une maîtrise des paramètres pouvant influencer l'hydrolyse. Nous avons utilisé des enzymes de type protéase, produites par génie génétique par la firme Novozyme. Protamex® qui est une endopeptidase et la Papaine qui ont pour effet de scinder progressivement les grosses molécules protidiques en molécules de poids plus faible, et permettent d'obtenir, si leur action est poursuivie, des molécules plus légères, des polypeptides, des dipeptides et en dernier ressort, des acides aminés libres. Le dosage des amines montre (**Figure 5**) que Protamex® est l'enzyme qui donne le plus haut degré d'hydrolyse que ce soit sur le poisson entier ou seulement sur les têtes, arêtes et les viscères. Dans ces hydrolyses nous observons que les enzymes continuent leur activité tout au long de la réaction, le degré d'hydrolyse de l'enzyme Protamex® atteint 30,66 %, dès 60 mn jusqu'à 41,86 % à 240 mn le plus fort pourcentage d'hydrolyse et l'enzyme Papaine présentent un degré d'hydrolyse de 10,43 % puis atteint 29,44 à 204 mn.



**Figure 6 :** Évolution moyenne de la matière sèche (MS) du coproduit obtenu d'*Ethmalosa fimbriata* en comparé aux enzymes (Protamex®, Papaine) en fonction du temps

A notre connaissance, très peu d'études ont été faites avec les hydrolysats de poisson de façon expérimentale appliquées à l'agriculture. La **Figure 6** montre la moyenne de l'évolution de la matière sèche des coproduits de poisson obtenus après hydrolyses en présence des deux enzymes utilisés. Nous observons que la quantité de matière sèche atteint les 8,45 % dès 15 mn de la réaction et reste constante pendant toute la réaction et quelque soit l'enzyme et la durée de l'hydrolyse soit 9,44 % à 350 mn quand les deux Dh des enzymes (Protamex®, Papaine) étaient à (7,52-3,86) à 15 mn puis atteignent (41,51 - 29,76) à 350 mn. L'utilisation des produits issus des hydrolysats de poisson donne un engrais liquide qui est très souvent utilisé en horticulture dans certains pays développés. Les hydrolysats de poisson sont une source importante d'azote à libération lente tout en respectant les capacités d'absorption de la plante. C'est aussi une source de protéines, d'acides aminés agissant comme des hormones de croissance et d'oligo-éléments.



**Figure 7 :** Évolution de l'azote récupéré de l'hydrolysat obtenu d'*Ethmalosa fimbriata* par deux enzymes (Protamex®, Papaine)

La **Figure 7** montre l'évolution de la quantité d'azote contenu dans les hydrolysats d'*Ethmalosa fimbriata* au cours de la réaction enzymatique. Les deux enzymes utilisées, la Papaine et le Protamex® présentent un plateau systolique pendant toute la réaction avec une teneur en azote d'environ 12,89 % à 15 mn 14 % à 240 mn pour Protamex® et 12,86 % au bout de 15 mn à 12,94 % à 204 mn pour Papaine. Le dosage des protéines donne une analyse de NPK 13,6-114-4,45 avec Protamex ou 13,3-114-4,45 avec Papaine où la teneur élevée en azote permet une bonne croissance végétative de la plante et la teneur en phosphore relativement élevée permet un bon développement des racines. Cette source importante de fertilisant riche en azote permet une bonne croissance des racines de plantes cultivées en milieu contrôlé.

**Tableau 3 :** Concentration en acides aminés (g / 100 g de matière fraîche) de la fraction soluble d'*Ethmalosa fimbriata* hydrolysée par deux enzymes (protamex et papaine) selon Kim et al (2010)

	Acides aminés	<i>Ethmalosa fimbriata</i>		Engrais commerciaux*
		Protamex®	Papaine	
	HIS	1,15	1,48	0,28
	LEU	5,39	5,79	0,42
	LYS	3,29	3,53	1,54
	MET	2,31	2,54	n. d.
	PHE	2,88	2,91	0,22
	SER	0,63	0,42	0,21
	THR	2,04	1,84	0,23
	TYR	1,56	1,48	0,17
	VAL	2,93	2,87	0,39
Acides aminés non essentiels	ALA	5,38	4,84	1,00
	ASP	3,36	4,32	n. d.
	GLU	3,97	7,59	2,96
	GLY	6,23	6,05	0,31
	PRO	3,42	2,60	0,09
	ILE	3,03	2,60	0,28
	C-C	0,48	0,52	n. d.
	Total	48,05	51,01	9,23

L'hydrolysats de protéines d'*Ethmalosa fimbriata* ressemble à la composition du collagène interstitiel qui contient une quinzaine d'acides aminés dont certains essentiels pour les plantes, avec chacun ses spécificités. De nombreuses plantes ont des transporteurs d'azote et d'acides aminés. Ce sont ces acides aminés qui peuvent apporter une importante source vitale pour le métabolisme cellulaire et le développement de la plante. Ils peuvent être absorbés par la nervure des feuilles ou au niveau des racines [12]. C'est pourquoi la composition des engrais organiques présente de grandes quantités d'acides aminés disponibles pour l'absorption des plantes. Le **Tableau 3** montre la concentration des acides aminés contenue dans les hydrolysats de poisson *Ethmalosa fimbriata*. Nous observons donc que l'alanine, la glycine et la leucine présents en grande quantité 5,38 / 100 g, d'échantillons ; 6,23 / 100 g, d'échantillons et 5,39 / 100 g, d'échantillons sur Protamex® et 4,84 / 100 g, d'échantillons; 6,05 / 100 g, d'échantillons ; 5,79 / 100 g, d'échantillons pour les hydrolysats obtenus avec la Papaine sont indispensables pour la synthèse de la

chlorophylle, le développement des bourgeons et l'amélioration de la qualité du fruit. L'acide glutamique et la méthionine (3,97 g ; 2,31 g) pour Protamex® et (7,59 g ; 2,54 g) pour Papaine qui sont des précurseurs, d'autres acides aminés régulent la croissance et l'assimilation azoté. La valine (2,93 g et 2,87 g) respectivement intervient dans les systèmes de résistance de la plante face aux situations défavorables. Ces acides aminés favorisent le développement de la flore bactérienne du sol, qui elle même transforme la matière organique inerte en humus, élément indispensable à une bonne vie des sols puis des plantes. Cependant nous n'observons pas de différence significative entre les différents acides aminés que ce soit avec Protamex® ou avec la Papaine.

## 4. Discussion

### 4-1. Évaluation de l'analyse chimique des hydrolysats de poisson (*d'Ethmalosa fimbriata*)

Les hydrolysats de poisson contenant (29,9 et 33 % du degré d'hydrolyse) ont été fabriqués à partir de mélanges des restes de coproduits d'*Ethmalosa fimbriata* broyés traités avec deux enzymes Papaine et Protamex chauffés dans un bioréacteur. Les conditions de réaction ont été contrôlées à pH 6,5, 50 °C pendant 5 heures. Les protéases ont été inactivées par la chaleur, la matière insoluble et non hydrolysée a été centrifugée et les fractions protéiques solubles ont été récupérées et lyophilisées. Les spécificités du substrat pour les protéases étaient clairement différentes. La teneur en protéines pour les hydrolysats variait de 20 à 84 %, selon le temps de prélèvement du produit et la teneur en lipides était très faible. La récupération de l'azote variait de 12,9 à 13,5 %. [12] ont montré que la fermentation des déchets de poisson pour la fertilisation de transplants en culture hyponique donnait des résultats remarquables et ont rapporté que la conversion potentielle des déchets de poisson comme engrais végétaux à l'aide de bactéries protéolytiques pouvait aboutir à des résultats remarquables. Par conséquent les déchets de poisson transformé ont le potentiel pour être utilisés comme engrais liquide, bien que le niveau bas NPK soit un sujet de préoccupation. Les résultats obtenus sur les hydrolysats de poisson sont similaires à ceux obtenus par [12, 20] ont étudié le processus d'utiliser les déchets de poisson comme engrais liquide dans un réacteur à ruban de 5 L et la biodégradation a été effectuée par inoculation des déchets de poissons autoclavés avec des microorganismes mixtes pendant 96 h.

Les résultats ont montré que, la culture des déchets de poisson broyés et après hydrolyse enzymatique possédaient une capacité fertilisante aux engrais commerciaux dans la culture en serre et en champs et que la biodégradation des déchets de poisson se fait directement par les plantes. L'azote est le premier élément nutritif des plantes qui souvent, quand il n'est pas en quantité suffisante, est le plus limitant de la production efficace des cultures. L'apport inadéquat d'azote, à de faible dose, entraîne fréquemment des plantes ayant une croissance lente, des niveaux de protéines faibles, un mauvais rendement et des produits de mauvaise qualité. Les plantes à stress azoté ont souvent une plus grande susceptibilité à la maladie par rapport aux plantes ayant reçu un apport normal de produits azotés. Cependant, l'azote excessif peut nuire à la croissance et à la qualité des cultures, et en plus provoquer des impacts environnementaux indésirables. Les hydrolysats de poisson permettent un apport continu de l'azote pendant la croissance et le développement de la plante. Ces résultats corroborent ceux obtenus par [21] qui ont mené des recherches sur la gestion des éléments nutritifs végétaux. Ces résultats ne traitent pas de tous les aspects importants liés à la gestion de l'azote, mais couvrent les principales sources d'azote pour la production de cultures biologiques et leur comportement dans le sol.

#### 4-2. Apport des protéines de coproduits de poisson

Les hydrolysats de coproduits de poisson apportent une plus value intéressante par rapport à l'apport des protéines disponibles dans les tissus cellulaires. Ces résultats corroborent les résultats obtenus par [22]. Les enzymes utilisées produisent des hydrolysats riches en azote organique et en protéines. L'hydrolyse enzymatique des coproduits de poisson donne des fractions solubles et insolubles. Les fractions insolubles sont broyées et mélangées dans la fraction soluble et l'ensemble sera utilisé directement en application sur les plantes. L'hydrolysate d'*Ethmalosa fimbriata* contient jusqu'à 80 à 85 % de protéines présentes principalement sous forme soluble, Ces protéines proviennent des arêtes et de la chair de poisson broyées au mixeur et sont une bonne source d'azote disponible pour la nutrition des cultures, après décomposition par les microorganismes du sol. Cet azote se dissout relativement rapidement par minéralisation entraînant des conditions favorables à la croissance des plantes. Les quantités et la qualité d'azote organique obtenues présentent des caractéristiques uniques qui nécessitent une gestion spéciale permettant de tirer le meilleur parti pour la santé des plantes et la production, tout en minimisant les pertes environnementales indésirables et l'impact sur la santé humaine. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par [9] qui démontrent que l'utilisation des déchets de poisson dans le compostage est une solution viable et respectueuse de l'environnement. Pour évaluer la quantité d'azote dans le mélange enzymatique durant la réaction d'hydrolyse pendant la minéralisation, la concentration d'azote a été mesurée à partir de la concentration en protéines en fonction du temps. La **Figure 7** indique la libération d'azote pendant toute l'hydrolyse. Le surnageant a été analysé pour les teneurs en protéines et a permis de déterminer les quantités approximatives d'azote au cours de la réaction. Nous pouvons observer qu'après 45 minutes d'hydrolyse, l'azote a déjà atteint son maximum de 13,26 % pour la papaine et 13,60 % pour Protamex® et cette teneur restera constante quelque soit la durée de l'hydrolyse à la température de 50 °C.

#### 4-3. Intérêt des acides aminés

Des recherches récentes ont démontré que les acides aminés peuvent être une source importante de nutriments pour les plantes [23]. Leur présence dans la fertilisation organique évite que l'on soit amené à utiliser des produits chimiques compensatoires aux végétaux. Pour cela, la gestion biologique des plantes s'appuie sur les intrants comme les engrais organiques, ce qui entraîne un apport d'un grand nombre d'acides aminés disponibles qui seront absorbés par les plantes, car en cas d'absence la plante risque d'utiliser ses propres protéines. Les acides aminés sont donc une partie essentielle de la fraction active de la matière organique dans l'engrais. La croissance des plantes dépend de l'équilibre approprié de ces acides aminés et de leur composition. Ainsi, il y a des éléments comme la méthionine qui est un élément nutritionnel et qui est le précurseur de plusieurs métabolites qui régulent la croissance des plantes [24]. Dans les conditions optimales de culture, la teneur élevée en acides aminés issus des hydrolysats de coproduits de poissons est importante, les acides aminés influencent directement ou indirectement sur activités physiologiques et biologique de la plante. La quantité totale d'acides aminés dans les coproduits de poisson est comparable à celle d'un engrais chimique. [25] suggère que le substrat idéal organique doit fournir la plupart des éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes et limiter le recours aux fertilisants solubles. En plus les engrais de poisson ne brûlent pas les plantes, ils ont un taux de libération lente ce qui évite des apports répétés et ne sont pas facilement lessivés du sol, ils restent plutôt dans des microorganismes utilisés comme nourriture par la plante.

## 5. Conclusion

Au terme de cette étude, nous avons relevé un certains les caractéristiques des hydrolysats d'*Ethmalosa fimbriata* riche en protéines et en azote. Bien que l'agriculture biologique s'est établie comme étant d'importance économique, il ya un manque important de recherche scientifique sur l'utilisation des déchets de poisson comme bio fertilisants pour soutenir ce segment de la production agricole. Les informations actuelles disponibles pour les hydrolysats de poisson sont limitées et basée sur l'utilisation des émulsions à base de poisson à qui l'on a extrait les lipides. Bien que le concentré de protéines soluble de poisson obtenu par broyage, hydrolyse enzymatique de poisson frais (poissons entiers, arêtes et viscères) soit connue par son utilisation dans l'alimentation des poissons d'élevage. Les coproduits de poisson *Ethmalosa fimbriata* qui représentent un potentiel protéique important après transformation par hydrolyse enzymatique renferment non pas de protéines au sens propre, mais des peptides et des acides aminés qui ne perturbent pas les différents paramètres de croissance de la plante. Compte tenu de la composition en azote organique, les hydrolysats de coproduits de poisson ont une importance agro économique et environnementale. Les degrés d'hydrolyse de la Protamex® et de la papaïne sont élevés de l'ordre de 33,36 % et 29,76 %. De tels DH entraînent l'apparition d'acides aminés libres et de tri et dipeptides qui sont responsables du goût amer et des mauvaises odeurs sans altérer leurs effets sur la croissance de la plante, l'alimentation et l'impacte sur l'environnement. Les hydrolysats issus de l'*Ethmalosa fimbriata* sont riches en protéine et constituent une importante source de protéines et d'azote organique, ils peuvent être utilisés comme source d'azote non négligeable et sont un engrais organique favorisant l'amélioration de la structure du sol, la vie microbienne et une meilleure santé de la plante. Les coproduits de poisson peuvent apporter à l'Agriculture une nouvelle source de fertilisants.

## Références

- [1] - FAO, La Situation Mondiale des Pêches et l'Aquaculture. Rome, Italie, (2016)
- [2] - J. DUMAY, A. LHERIAU, G. BARNATHAN, P. JAOUEN, J. P. BERGÉ, What could be the benefit of using enzymes for extracting lipids from fatty fish by-products? 35th West European Fish Technologists Association meeting. Antwerp, Belgium, (2005)
- [3] - FAO/COPACE, Rapport de l'Atelier FAO/COPACE sur les mesures du ressort de l'Etat du port pour lutter contre la pêche illicite, non déclarée et non règlementée pour la sous région de l'Afrique de l'Ouest. Accra. Ghana. 9-12 juin 2009, (2009)
- [4] - ANONYME, Direction Générale des pêches et de l'aquaculture. Gabon, (2011)
- [5] - ANONYME, Revue de l'industrie des pêches et de l'aquaculture dans la zone de la COMHAFAT. Industrie des pêches et de l'aquaculture au Gabon. Rapport N°4, (2013)
- [6] - E. S. KECHAOU, J. DUMAY, C. DONNAY-MORENO, P. JAOUEN, J-P. GOUYGOU, J-P. BERGÉ et R. BEN AMAR, Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases : Effects on lipid distribution and amino acid composition. *J Biosci and Bioeng*, (107), Issue 2, 158-164. Japan, (2009)
- [7] - H. T. M. NGUYEN, K. S. B. SYLLA, Z. RANDRIAMAHATODY, C. DONNAY-MORENO, J. MOREAU, LUYEN THI MY, J-P. BERGÉ, Enzymatic hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. *Food Tech and Biotech*, 49 (2011) 48 - 55
- [8] - M. CHALAMAIAH, KUMAR, B. DINESH, R. HEMALATHA, Fish protein hydrolysates : Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications : *Food Chem*, Vol. 135 Issue : 4 Pages : 3020-3038, (2012)

- [9] - P. H. LIAO, L. JONES, A. K. LAU, S. WALKEMEYE, B. EGAN and N. HOLBEK, Composting of fish wastes in a full-scale in-vessel system. *Biores. Technol.* Vol. 59: Issues 2-3 February-March 163–168, (1997)
- [10] - M. YAMAMOTO, F. SALEH, K. HAYASHI, A fermentation method to dry and convert Shochu distillery by-product to a source of protein and enzymes. *J Poultry Sci.* Japan, 41 (2004) 275 - 280
- [11] - S. FROMARTZ, Organic, Inc. Harcourt, Inc. Orlando, Fla. XII-25, (2006)
- [12] - J. K. KIM, V. T. DAO, I. S. KONG and H. H. LEE, Identification and characterization of microorganisms from earthworm viscera for the conversion of fish wastes into liquid fertilizer. *Biores Tech*, (101) (2010) 5131 - 5136
- [13] - J. FOLCH, Lees M and Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal sources. *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497 - 509
- [14] - YING JI, Z. GUOZENG, XINGTAI LI, BUDIAZA and Z. SUMEI, Enzymatic hydrolysis of protein from small yellow croaker (*pseudosciaena polyactis*) and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of food. Biochem.* 37 (2013) 278 - 285
- [15] - S. SATHIVEL, P. J. BECHTEL, J. BABBIT, S. SMILEY, C. CRAPO, KD REPPOND et W. PRINYAWIWATKUL, Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68 (2003) 2196 - 2200
- [16] - A. M. LICEAGA-GESUALDO, LI-CHAN ECY, Functional properties of fish protein hydrolysisate from herring (*clupea harengus*). *Journal of food science*, 64 (6) (1999) 1000 - 1004
- [17] - S. NABIL, A. BOUGATEF, YOUSRA TRIKI-ELLOUZ and M. NASRI, Biochemical and Functional Properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) By-Product Hydrolysates, *Food Tech. Biotech*, 45 (2) (2007) 187 - 194
- [18] - R. RAVALLEC-PLÉ, C. CHARLOT, C. PIRES, V. BRAGA, I. BATISTA, A. VAN WORMHOUDT, Y. LE GAL, M. FOUCHEREAU-PÉRON, The presence of bioactive peptides inhydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *J.Sci. Food Agric.*, 81 (2001) 1120 - 5
- [19] - C. J. MCGRATH, Evaluation of optimal substrates and fertilizer for organic vegetable transplant production in Alabama. *etd.auburn.edu*, (2008) 116 p.
- [20] - V. T. DAO and J. K. KIM, Scaled-up bioconversion of fish waste to liquid fertilizer using a 5 L ribbon-type reactor. *Journal of Environmental Management*, 92 (10) (2011) 2441 - 6
- [21] - ROBERT MIKKELSEN, Proceedings, 2008 California Alfalfa and Forange Symposium and Western Seed Conference, San Diego, CA 2-4.December, (2008)
- [22] - F. SHAHIDI, XQ HAN et J. SYNOWIECKI, Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem*, 53 (1995) 285 - 93
- [23] - J. R. REEVE, J. L. SMITH, L. C. CARPENTER-BOGGS, J. P. REGANOLD, Soil-based cycling and differential uptake of amino acids by three species of strawberry (*Fragaria spp.*) plants. *Soil Biol. Biochem.*, 40 (2008) 2547 - 2552
- [24] - R. AMIR, Y. HACHAM et G. GALILI, Cystathionine c-synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. *Trends Plant Sci.*, 7 (2002) 153 - 156
- [25] - K. L. NIELSEN et K. THORUP-KRISTENSEN, Growing media for organic tomato plantlet production. *Acta Hort.* 644 (2004) 183 - 187