



HAL
open science

Production d'hydrolysats de protéines des muscles du pataclet (*Diplodus annularis*) et leur caractérisation physicochimique, fonctionnelle, biologique et peptidomique

Fatma Hamed

► **To cite this version:**

Fatma Hamed. Production d'hydrolysats de protéines des muscles du pataclet (*Diplodus annularis*) et leur caractérisation physicochimique, fonctionnelle, biologique et peptidomique. Génie chimique. Université de Lille; Université de Sfax (Tunisie), 2023. Français. NNT : 2023ULILR075 . tel-04562895

HAL Id: tel-04562895

<https://theses.hal.science/tel-04562895>

Submitted on 29 Apr 2024

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

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

THESE EN CO-TUTELLE

Réalisée à

Faculté des Sciences de SFAX

&

Université de Lille

en vue de l'obtention du

DOCTORAT

Spécialités

Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, physiologie

Présentée par

FATMA HAMED

*« Production d'hydrolysats de protéines des muscles du pataclet
(Diplodus annularis) et leur caractérisation physicochimique,
fonctionnelle, biologique et peptidomique »*

Soutenue publiquement le 15 décembre 2023, devant le jury composé de :

<i>Mme. Mounira Hmani</i>	<i>Professeur, Université de Sfax</i>	<i>Présidente et examinatrice</i>
<i>Mr. Jean-Luc Courthaudon</i>	<i>Professeur, Université d'Angers</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mr. Sami Fattouch</i>	<i>Professeur, Université de Carthage</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mme. Nadia Oulahal</i>	<i>MC-HDR, Université Lyon 1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme. Naima Nedjar</i>	<i>Professeur, U. Lille - ICV</i>	<i>Directrice de thèse</i>
<i>Mr. Ahmed Barkia</i>	<i>MC-HDR, Université de Sfax</i>	<i>Directeur de thèse</i>

Année Universitaire 2022/2023

Dédicace

Je dédie ce travail

*À mes chers parents **Mohamed** et **Hadda** pour leurs amours, sacrifices et encouragements pendant toutes ces années d'études. Puisse le Dieu tout-puissant, les protéger et leur donner santé, bonheur et longue vie ;*

*À mon cher mari **Mahdi** pour son amour et son aide. Que dieu réunisse nos chemins vers un avenir commun radieux et serein ;*

*À mes chers frères **Ajif**, **Hakim** et **Akrem** pour leurs encouragements et leurs affections dans les moments les plus délicats de ma vie. Je vous souhaite plein de joie, de bonheur et de succès ;*

Merci à mes beaux-parents, mes beaux-frères et ma belle-sœur. Je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur ;

Merci à vous tous !



Remerciements

Cette thèse est le fruit d'une collaboration Franco-Tunisienne. À l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail de doctorat sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

*Avant tout, je remercie **Dieu** le tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce travail.*

*Mes premiers remerciements vont pour la Professeure **Naïma Nedjar**, Directrice de thèse côté Français, qui a su m'accorder une confiance sans faille et m'encadrer avec optimisme et enthousiasme. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour son encadrement scientifique et humain, et la construction d'une ambiance de travail sereine et dynamique. J'espère pouvoir un jour imiter sa rigueur et sa passion pour ce métier.*

*Je tiens à remercier mon directeur de thèse côté Tunisien, Pr. **Ahmed Barkja** qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Merci monsieur, pour votre disponibilité et pour votre soutien. Je vous suis profondément reconnaissante pour votre encadrement à la fois scientifique et humain et pour le dynamisme et l'ambiance de travail sereine que tu as créé dans l'équipe.*

*Je tiens particulièrement à exprimer fortement ma gratitude et mes sincères respects à Monsieur **Mohamed Chamkha**, qui a eu la bienveillance de m'accueillir au sein de son laboratoire. Je vous exprime ici toute ma gratitude et ma reconnaissance envers tout ce que vous avez fait pour finaliser ce travail.*

*J'adresse tous mes remerciements à Pr. **Mounira Hmani**, présidente du jury, qui a su guider les discussions générées avec expertise et enthousiasme. Je remercie vivement Pr. **Jean luc Courthaudon** et Pr. **Sami Fattouch**, qui ont jugé ce travail en tant que rapporteurs, avec précision, spontanéité et bonne humeur. De même, je suis particulièrement reconnaissante à*

Pr. Nadia Oulahal de l'intérêt qu'elle a manifesté à l'égard de cette recherche en s'engageant à être examinatrice.

Je remercie aussi Dr. Barbara Deracinois et Pr. Christophe Flahaut pour leur collaboration dans une partie de ce projet.

*Mes sincères remerciements s'adressent, bien sûr, à tous ceux que j'ai côtoyés durant les années passées au sein du LGEM et au sein du PROBIOGEM, pour la bonne ambiance de travail qu'ils ont créé, pour les agréables moments et discussions que l'on a pu avoir ensemble, pour leur soutien et pour l'aide mutuelle que l'on a pu apporter. Que, **Souad, Marwa, Imen, Youssra, Intidhar, Wafa, Jihene, Ahlam** et tous ceux qui se reconnaîtront, trouvent ici l'expression de ma grande reconnaissance et mon éternelle amitié.*

*Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à **Nouha**, technicienne à l'LGEM, pour sa disponibilité et son aide précieuse.*

Il m'est enfin agréable de remercier mes ami(e)s et tous ceux qui m'ont apporté leurs soutiens amicaux et moraux durant l'élaboration de ce travail.



Liste des abréviations

AA	Acide aminé
AAA	Acides aminé aromatique
AAE	Acide aminé essentiel
AAH	Acide aminé hydrophobe
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
CI₅₀	Concentration inhibitrice de 50 % d'activité
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRH	Capacité de rétention d'huile
CRE	Capacité de rétention d'eau
Da	Dalton
D.annularis	<i>Diplodus annularis</i>
DGPA	Direction générale de la pêche et de l'aquaculture
DH	Degré d'hydrolyse
DHA	Acide docosahexaénoïque
DO	Densité optique
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
Fmoc	9-fluorenylméthyl chloroformate
Gpx	Glutathion peroxydase
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HP	Hydrolysats peptidiques
HPP-AL	Hydrolysats peptidiques de pataclet obtenus moyennant la protéase alcalase
HPP-S	Hydrolysats peptidiques de pataclet obtenus moyennant la protéase savinase

LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
IAE	Indice de l'activité émulsifiante
ISE	Indice de la stabilité émulsifiante
MDA	Malondialdéhyde
MetMb	Méthyoglobine
MPNH	Muscle de pataclet non hydrolysé
MM	Masse moléculaire
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide
OPA	Ortho-phthalaldehyde
PAM	Peptide antimicrobien
RP-HPLC	Reversed phase HPLC
SAB	Sérum Albumine Bovine
TAC	Capacité antioxydante totale
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TFA	Acide trifluoroacétique
TIC	Courant ionique total
UFC	Unité formant colonies

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
REVUE DE LITTERATURE	4
I. Production de la pêche et de l'aquaculture dans le monde et en Tunisie.....	4
I.1. Production mondiale.....	4
I.2. Production tunisienne	5
II. Description et répartition géographique de l'espèce étudiée : <i>Diplodus annularis</i>	6
II.1. Position systématique.....	6
II.2. Principaux caractères morphologiques et alimentation.....	7
II.3. Répartition géographique	7
III. Valorisation des produits et des coproduits marins	8
III.1. Les sous-produits d'origine marine	8
III.2. Différentes voies de valorisation des sous-produits marins : les produits dérivés	9
IV. Les protéines de poisson	12
V. Hydrolysats de protéines de poisson.....	13
V.1. Production	13
V.2. Hydrolyse chimique	14
V.3. Hydrolyse enzymatique	14
V.4. Paramètres d'hydrolyse enzymatique.....	16
V.5. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats peptidiques	17
V.5.1. Solubilité	17
V.5.2. Les propriétés émulsifiantes.....	18
V.5.3. Les propriétés moussantes.....	19
V.5.4. La capacité de rétention d'eau.....	19
V.5.5. La capacité de rétention d'huile	20
VI. Domaines d'application des hydrolysats peptidiques	20
VI.1. Nutrition animale	21
VI.2. Nutrition humaine.....	21
VI.3. Milieu de culture bactérienne	21
VI.4. Bioactivité.....	22
VII. Activités biologiques des hydrolysats protéiques	23
VII.1. Activité antioxydante	23
VII.1.1. Stress oxydant.....	23

VII.1.2. Phénomènes d'oxydation dans les aliments	24
VII.1.3. Les systèmes antioxydants	26
<i>VII.1.3.1. Antioxydants enzymatiques</i>	26
<i>VII.1.3.2. Les antioxydants non enzymatiques</i>	28
VII.2. Activité antibactérienne.....	32
VII.2.1. Structure des enveloppes bactériennes	32
VII.2.2. Intoxication alimentaire et importance des molécules antimicrobiennes	33
VII.2.3. Les peptides antimicrobiens (PAMs)	34
<i>VII.2.3.1. Caractéristiques des peptides antimicrobiens</i>	35
<i>VII.2.3.2. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens</i>	38
VIII. Techniques d'analyse et de séparation des peptides.....	41
VIII.1. Fractionnement d'hydrolysats par extraction par solvant.....	41
VIII.2. Chromatographie gel filtration.....	42
VIII.3. Ultrafiltration	42
VIII.4. Chromatographie échangeuse d'ions	43
VIII.5. Chromatographie liquide à haute pression à phase reverse (RP-HPLC)	43
VIII.6. Analyse par spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS).....	44
MATERIELS & METHODES	45
I. Elaboration des hydrolysats protéiques du muscle de pataclet	45
I.1. Matériels biologiques : Pataclet (<i>Diplodus annularis</i>).....	45
I.2. Matériels enzymatiques	45
I.3. Dosage de l'activité protéolytique.....	46
I.4. Procédés de production d'hydrolysats.....	46
II. Analyse physico-chimique.....	48
II.1. Détermination de la matière sèche	48
II.2. Détermination des cendres	48
II.3. Détermination de la composition en acides aminés	48
II.4. Détermination de la teneur en protéines.....	49
II.4.1. Méthode de Lowry	49
II.4.2. Méthode de Kjeldahl	50
II.5. Détermination de la matière grasse	50
III. Techniques chromatographiques appliquées aux échantillons des hydrolysats peptidiques.....	50
III.1. Analyse par Chromatographie liquide à haute-performance (HPLC)	50

III.2. Fractionnement de l'hydrolysat peptidique par HPLC préparative	51
III.3. Analyse des peptides par couplage UPLC-MS/MS	51
IV. Etude des propriétés fonctionnelles des hydrolysats peptidiques	52
IV.1. Solubilité.....	52
IV.2. Capacité émulsifiante et stabilité de l'émulsion	53
IV.3. Capacité moussante (CM) et stabilité de la mousse (SM).....	53
IV.4. Capacité de rétention de l'eau et de l'huile	53
V. Evaluation des activités biologiques.....	54
V.1. Evaluation des activités antioxydantes	54
V.1.1. Activité anti-radicalaire : test au DPPH	54
V.1.2. Test du pouvoir réducteur	54
V.1.3. Pouvoir chélateur des métaux	55
V.1.4. Inhibition du blanchiment du β -carotène	56
V.1.5. Activité antioxydante totale (TAC).....	56
V.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	57
V.2.1. Les souches bactériennes	57
V.2.2. Préparation des pré-cultures	57
V.2.3. Réalisation du test antibactérien sur boîte de Pétri	58
V.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration minimale bactéricide (CMB).....	59
V.2.5. Détermination de pourcentage d'inhibition des bactéries par les fractions	59
VI. Application des hydrolysats comme conservateurs alimentaires	60
VI.1. Préparation des échantillons et suivi de l'expérience	60
VI.2. Évaluation de l'oxydation des lipides.....	61
VI.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	61
VI.2.2. Teneur en diènes conjugués	62
VI.2.3. Détermination de la teneur en metmyoglobine.....	62
VI.2.4. Détermination de la teneur en fer héminique.....	62
VI.3. Analyse de la couleur	63
VI.4. Analyses microbiologiques.....	63
VII. Analyses Statistiques	64

RESULTATS & DISCUSSION	65
CHAPITRE 1 : Elaboration d’hydrolysats de protéines de muscle de pataclet et leur caractérisation physicochimique, fonctionnelle et peptidomique	65
Introduction	65
I. Elaboration des hydrolysats peptidiques du muscle de pataclet	66
II. Caractérisation des hydrolysats peptidiques du muscle du pataclet	67
II.1. Caractérisation physico-chimique	67
II.2. Détermination de la composition en acides aminés des HPPs	68
II.3. Analyse par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	70
III. Identification et caractérisation de la population peptidique	71
IV. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats peptidiques de pataclet	72
IV.1. La solubilité	73
IV.2. Les propriétés émulsifiantes	74
IV.3. Propriétés moussantes des hydrolysats	75
IV.4. La capacité de rétention d’eau et d’huile	76
CHAPITRE 2 : Activité antioxydante et antibactérienne des hydrolysats de protéines du muscle de pataclet (HPPs) : mise en évidence et application dans la conservation de la viande hachée	77
Introduction	77
I. Mise en évidence de l’activité antioxydante	77
I.1. Activité antiradicalaire : Test au DPPH	77
I.2. Test du pouvoir réducteur du fer	79
I.3. Méthode de l’inhibition du blanchiment du β -carotène	80
I.4. Pouvoir chélateur des ions de fer.....	80
I.5. Evaluation de l’activité antioxydante totale	81
II. Mise en évidence de l’activité antimicrobienne des hydrolysats peptidiques.	82
III. Application des hydrolysats peptidiques dans la préservation de viande hachée de bœuf.	85
III.1. Évolution de l’oxydation des lipides durant le stockage	85
III.1.1. Détermination des substances réactives à l’acide thiobarturique (TBARS)	85
III.1.2. Evaluation des teneurs en diènes conjugués	87
III.1.3. Evaluation du taux de la metmyoglobine (MetMb)	87
III.1.4. Détermination de la teneur en Fer héminique	88
III.2. Croissances des microorganismes au sein de la viande durant le stockage.....	89
III.3. Evaluation de la couleur	91

CHAPITRE 3 : Préparation de fractions de l'hydrolysate protéique produit par la savinase, investigation de leurs activités biologiques (antioxydantes et antibactériennes), et identification de peptides	93
Introduction	93
I. Fractionnement de l'hydrolysate et identification des peptides.....	93
II. Activité antioxydante des fractions.....	95
III. Activité antibactérienne des fractions.....	97
DISCUSSION GENERALE	99
CONCLUSION & PERSPECTIVES	105
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Liste des Figures

Figure 1: Evolution de la production mondiale de la pêche et de l'aquaculture par année	5
Figure 2: Evolution de la production de la pêche et d'aquaculture en Tunisie.....	5
Figure 3: Répartition de la production par gouvernorat (2019)	6
Figure 4: Répartition géographique du <i>D. annularis</i>	7
Figure 5: Répartition moyenne de la partie comestible et sous-produits de la pêche	8
Figure 6: Voies de valorisation des co-produits	8
Figure 7: Proportions des différentes voies de valorisation des co-produits d'origine marine.	9
Figure 8: Désacétylation de la chitine en chitosane	11
Figure 9: Hydrolyse d'une liaison amide catalysée par une enzyme protéolytique	12
Figure 10: Mécanisme réactionnelle schématique de la coupure d'une liaison peptidique par hydrolyse enzymatique en milieu alcalin	14
Figure 11: Classes de peptides bioactifs.....	22
Figure 12: Mécanismes des lésions biochimiques introduites par le stress oxydant et conséquences cellulaires.....	24
Figure 13: Production et neutralisation des espèces réactives de l'oxygène.....	28
Figure 14: Structure de la paroi des bactéries à Gram-négatif et des bactéries à Gram-positif	33
Figure 15: Structure secondaire d'un peptide antimicrobien en hélice α amphiphile.....	37
Figure 16: Structure secondaire d'un peptide non structuré	38
Figure 17: Représentation du modèle en douves de tonneau	39
Figure 18: Modèle des "pores toroïdaux"	40
Figure 19: Modèle en tapis	40
Figure 20: Principe de l'ultrafiltration	42
Figure 21: Le poisson <i>Diplodus annularis</i> et son muscle	45
Figure 22: Préparation des hydrolysats de protéines à partir de muscle de <i>Diplodus annularis</i>	47
Figure 23: Schéma de la boîte de Pétri utilisée pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	58
Figure 24: Les Formulations de viandes préparées (photo prise au laboratoire)	61
Figure 25: Formation du produit de condensation chromogénique entre MDA et TBA	61
Figure 26: Méthode de dilution en série pour un comptage des bactéries.	64
Figure 27: Evolution de degré d'hydrolyse en fonction de temps de deux protéases utilisées.	66
Figure 28: Profils chromatographiques des HPPs et des protéines intactes à 214 nm, analysés par HPLC par colonne de type C18 (150 × 2.6 mm).....	70

Figure 29: Diagrammes de Venn montrant les différentes populations de peptides au sein des deux hydrolysats ainsi que le nombre de peptides distincts et communs identifiés par RP-HPLC- MS/MS	72
Figure 30: Etude de la solubilité de la matière azotée des protéines non digérées et de leurs hydrolysats dans différents pH allant de 2 à 10.....	73
Figure 31: Activité antiradicalaire des HPPs et MPNH à différentes concentrations.....	78
Figure 32: Pouvoir réducteur des HPPs et MPNH à différentes concentrations.....	79
Figure 33: Le pouvoir inhibiteur du blanchiment du β -carotène des hydrolysats de protéines de pataclet et de MPNH à différentes concentrations.....	80
Figure 34: Effect chélateur des ions de Fer des HPPs et MPNH à différentes concentrations.	81
Figure 35: Activité antioxydante totale des HPPs et MPNH à différentes concentrations	82
Figure 36: Évaluation de l'oxydation des lipides de la viande hachée traitée avec les deux HPPs aux concentrations de 0.5% et 1% et le BHA (0,5%) durant le stockage sous réfrigération (4°C)	86
Figure 37: Evaluation des teneurs en diènes conjugués des différents échantillons au cours du temps de conservation.	87
Figure 38: Evaluation des teneurs en MetMB des différents groupes de la viande au cours du temps de stockage.	88
Figure 39: Evaluation des teneurs en fer héminique des différents groupes de la viande au cours du temps de stockage.	89
Figure 40: Évolution de la croissance microbienne totale au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHA (0,5%) et les HPPs aux concentrations de 0,5 et 1% durant 11 jours de conservation sous réfrigération (4°C).....	90
Figure 41: Évolution de la croissance des moisissures et des levures au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHA (0,5 %) et les HPPs aux concentrations de 0.5 et 1% durant 11 jours de conservation sous réfrigération (4°C).	90
Figure 42: Profil chromatographique de fractionnement de l'hydrolysat HPP-S à 214 nm par RP-HPLC préparative, analysés par colonne de type C18 (250 mm \times 21.2 mm, Uptisphere CS EVOLUTION, Interchim, France).	94
Figure 43: Analyse peptidomique par RP-HPLC-MS/MS de dix fractions (F1 à F10) de HPP-S (hydrolysat généré par la savinase). (A) Chromatogrammes de courant ionique total (TIC), (B) nombre de scans MS, scans MS/MS et peptides uniques identifiés.....	95
Figure 44: Distribution de la masse moléculaire des peptides identifiés	96
Figure 45: Pourcentage d'inhibition de la croissance d'E.coli et M.luteus.....	98

Liste des tableaux

Tableau 1: La pêche et l'aquaculture dans le monde : production (FAO, 2018).....	4
Tableau 2: Bioactivité de peptides isolés à partir des produits de la mer	23
Tableau 3: Peptides antioxydants isolés des hydrolysats de protéines d'origine marine.....	32
Tableau 4: Peptides antibactériens isolés des hydrolysats d'origine animale et végétale.....	35
Tableau 5: Méthodes de fractionnement d'hydrolysat et critères de sélectivité mis à profit ..	41
Tableau 6: Composition physico-chimique des hydrolysats peptidiques de pataclet	68
Tableau 7: Composition en acides aminés du MPNH et des HPPs obtenus moyennant deux activités protéolytiques	69
Tableau 8: Activité émulsifiante et stabilité émulsifiante d'hydrolysats et de MPNH à différentes concentrations.....	74
Tableau 9: Capacité moussante et stabilité moussante des HPPs et de MPNH à différentes concentrations.....	75
Tableau 10: La capacité de rétention d'eau et d'huile des hydrolysats peptidiques HPPs et MPNH.....	76
Tableau 11: Activité antibactérienne des hydrolysats HPP-S et HPP-AL et des protéines non digérées à une concentration de 100 mg/mL par mesure du halo d'inhibition (en mm).....	83
Tableau 12: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) pour les HPPs contre les différentes souches bactériennes.....	84
Tableau 13: Evaluation du couleur des différentes formulations au cours du temps de conservation.....	92
Tableau 14: Distribution de la masse moléculaire des fractions peptidiques et leurs propriétés antioxydantes.....	95

Introduction générale

Le secteur de la pêche et de l'aquaculture représente le secteur qui enregistre la plus forte croissance dans le domaine de la production mondiale de denrées alimentaires, il répond aux besoins nutritionnels d'une population humaine croissante (FAQ, 2018). En effet, la production mondiale de poissons provenant de la pêche et de l'aquaculture a été estimée à 179 millions de tonnes en 2018. Une grande quantité de ce tonnage (environ 88%) fait l'objet d'une transformation pour être ensuite utilisée en alimentation humaine tandis que les 12% restants ont été utilisés à des fins non alimentaires. La Tunisie bénéficie d'un vaste littoral dépassant les 1300 km de long et la pêche et l'aquaculture y sont importantes. Grâce à sa position géographique largement ouverte sur la mer, il a un attachement à la mer pour développer son économie et accroître ses échanges. Le secteur de la pêche et de l'aquaculture joue un rôle important sur les plans aussi bien socio-économique qu'alimentaire et représente 8% de la valeur des produits agricoles et de 13% de la valeur de ses exportations (FAO, 2014).

La transformation de produits de la pêche génère une grande quantité de déchets estimée à 50% du volume total du poisson (Je et al., 2007). Ces déchets sont non seulement faits de têtes, de nageoires, de peaux et de viscères, mais aussi de poissons qui ne sont pas habituellement consommés ou qui sont abîmés lors du transport ou de la conservation.

Alors que les poissons étaient pendant longtemps considérés juste comme sources de nutriments, les découvertes des dernières décennies ont montré qu'ils peuvent être une source de composés grandement recherchés par les industriels et par le personnel de la santé. En conséquence de cette découverte, les déchets de poissons sont de plus en plus sollicités et ont déjà servi pour la production de plusieurs dérivés importants. Un tel usage peut également être envisagé pour le muscle de poisson habituellement consommé, surtout si sa valeur marchande est faible. Cela est le cas du muscle du « pataclet ». Ces produits de la pêche sont maintenant considérés comme des matières premières destinées à la production de nouvelles substances utilisables en nutrition animale, en cosmétique et en santé humaine. Vu l'origine alimentaire de ces composés, on peut raisonnablement supposer que leur emploi est sans risque. Leur richesse en protéines (15-25% des protéines totales du poisson) permet d'envisager des voies de valorisation plus intéressantes.

L'une des alternatives possibles et prometteuses pour mieux valoriser les protéines de muscle de pataclet «*Diplodus annularis*» est de les hydrolyser enzymatiquement afin d'obtenir des peptides bioactifs à haute valeur ajoutée.

En effet, plusieurs auteurs ont montré qu'à l'issue de cette hydrolyse, la fraction soluble obtenue, appelée «Hydrolysate Protéique» présente de nouvelles propriétés fonctionnelles

(solubilité, propriétés foisonnantes, moussantes, émulsifiantes, etc.), nutritionnelles (digestibilité et allergénicité) et biologiques intéressantes pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Kristinsson & Rasco, 2000). De nombreux auteurs se sont intéressés à la recherche de peptides bioactifs au sein d'hydrolysats protéiques de produits et co-produits de la pêche. Parmi les très nombreuses activités biologiques identifiées à ce jour, il convient de citer les suivantes à titre d'exemple: antioxydante (Bkhairia et al., 2016; Bougatef et al., 2020; Lassoued et al., 2016; Noman et al., 2022), antimicrobienne (Jemil et al., 2014; De Quadros et al., 2019), anti-inflammatoire (Ahn et al., 2012; Da Rocha et al., 2018), antihypertensive (Rodrigues et al., 2021) et anticancéreuse (Yaghoubzadeh et al., 2020).

Actuellement, les peptides bioactifs purifiés à partir de sources de poisson ont suscité un intérêt considérable dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. Ces biopeptides possèdent *in vivo* des cibles potentielles d'actions. Ils sont capables d'exercer, entre autres un effet sur le système cardiovasculaire (en tant qu'hypocholestérolémiant, antioxydant, antithrombotique et hypotenseur), sur le système nerveux (en tant qu'anxiolique ou satiétogène), sur le système digestif (en tant que secrétagogue) et sur le système immunitaire (en tant qu'immunomodulant). Ces composés d'origine naturelle suscitent un intérêt croissant chez les consommateurs qui veulent de plus en plus manger sainement, et éviter les produits synthétiques et les additifs chimiques dont les effets à long terme sont parfois peu connus ou controversés (Agyei & Danquah, 2011).

Les activités biologiques étudiées dans le cadre de cette thèse sont : antimicrobienne et antioxydante.

L'oxydation et l'agression microbienne sont deux causes de détérioration des aliments. Les prévenir ou les combattre est donc un objectif commun pour les industriels et pour le personnel de la santé. Bien qu'efficaces, les antioxydants synthétiques ne sont plus acceptés par le grand public. En effet, les agents habituellement utilisés pour leur pouvoir antioxydant comme butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) et le n-propyl gallate ont l'inconvénient de causer des effets indésirables et de produire des effets incertains.

Également, la prise des antibiotiques peut entraîner des effets secondaires, favoriser la sélection de bactéries résistantes, et provoquer des réactions allergiques. Pour faire face à l'inquiétude et la crainte des consommateurs, des antibactériens et des antioxydants de substitutions sont donc intensément recherchés.

Cette quête a permis de proposer les hydrolysats et peptides de protéines alimentaires et notamment celles d'origine marine, comme l'une des sources valables pour de telles activités.

La présente thèse est une contribution dans un axe de recherche d'actualité qui vise la production de composés doués de propriétés fonctionnelles et biologiques utiles aux secteurs de la santé, de l'agroalimentaire ou de la cosmétique. Dans ce domaine, la préférence de l'origine naturelle est au premier plan, et les hydrolysats et peptides dérivés des protéines alimentaires sont particulièrement recherchés. L'objectif de la présente thèse était d'exploiter, dans ce domaine, le muscle du pataclet. Le choix de ce poisson était dicté d'abord, par la grande quantité récoltée en Tunisie, surtout dans la région de Sfax ensuite par son faible prix. Cette étude se divise en trois chapitres distincts :

- ✚ Le premier chapitre consiste à élaborer différents hydrolysats peptidiques en se servant de deux différentes activités enzymatiques, utilisées à leurs conditions optimales respectives et leur caractérisation physicochimique, fonctionnelle (solubilité, capacité moussante, capacité émulsifiante, rétention d'eau et d'huile) et peptidomique.
- ✚ Le deuxième chapitre porte sur l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des hydrolysats peptidiques et l'application potentielle de ces hydrolysats comme conservateurs en utilisant la viande hachée comme modèle.
- ✚ Enfin, le troisième chapitre concerne le fractionnement de l'hydrolysat le plus actif *via* une technologie séparative RP-HPLC pour récupérer à partir de ce hydrolysat, une fraction enrichie en peptides d'intérêt dotés d'activités biologiques (antioxydante et antibactérienne) et l'identification de ces fractions peptidiques responsables de ces activités. Les masses moléculaires ainsi que les séquences des peptides purifiés seront déterminées par spectrométrie de masse (ESI/MS) et par spectrométrie de masse en tandem (ESI/MS/MS).

Revue de littérature

I. Production de la pêche et de l'aquaculture dans le monde et en Tunisie

I.1. Production mondiale

Selon l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production mondiale halieutique a atteint 179 millions de tonnes en 2018 (FAO, 2018). Sur ce total, 156 millions de tonnes ont été utilisées pour la consommation humaine, ce qui équivaut à 20,5 kg par habitant et 20 millions de tonnes de la production (12%) sont réservés à des usages non alimentaires comme la transformation en farine et en huile de poisson, l'élevage et les utilisations pharmaceutiques ou encore l'alimentation directe des poissons d'élevage. La plus grande part destinée à la consommation humaine est commercialisée sous forme de poissons vivants frais (45%), ou réfrigérés (31%) ou des poissons séchés, salés, saumurés, fermentés et fumés (12%) (FAO, 2018). Cependant, une grande partie des quantités récoltées et capturées à l'échelle mondiale est perdue. Depuis les années 90, il y a une stagnation des volumes capturés et ce malgré les avancées techniques et l'allongement des campagnes de pêche. Par contre, l'aquaculture est la principale source de poisson disponible pour la consommation humaine ayant enregistré le développement le plus soutenu (**Tableau 1**, **Figure 1**). Sa part était de 82,1 millions de tonnes en 2018 et devrait augmenter sur le long terme et pour atteindre 109 millions de tonnes en 2030. La production aquacole mondiale d'animaux aquatiques d'élevage a été dominée par l'Asie, qui a elle seule produit actuellement 89% de la production en volume au cours des deux dernières décennies.

Tableau 1: La pêche et l'aquaculture dans le monde : production (FAO, 2018)

	1986-1995	1996-2005	2006-2015	2016	2017	2018
	Moyenne par an					
	(en millions de tonnes, poids vif)					
Production						
Pêche:						
Continentale	6,4	8,3	10,6	11,4	11,9	12,0
Marine	80,5	83,0	79,3	78,3	81,2	84,4
Total – pêche	86,9	91,4	89,8	89,6	93,1	96,4
Aquaculture						
Continentale	8,6	19,8	36,8	48,0	49,6	51,3
Marine	6,3	14,4	22,8	28,5	30,0	30,8
Total – aquaculture	14,9	34,2	59,7	76,5	79,5	82,1
Total – pêche et aquaculture au niveau mondial	101,8	125,6	149,5	166,1	172,7	178,5

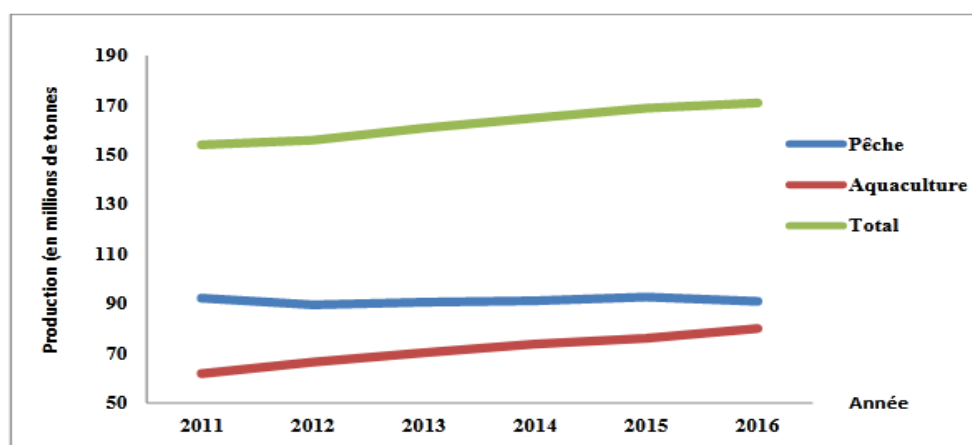
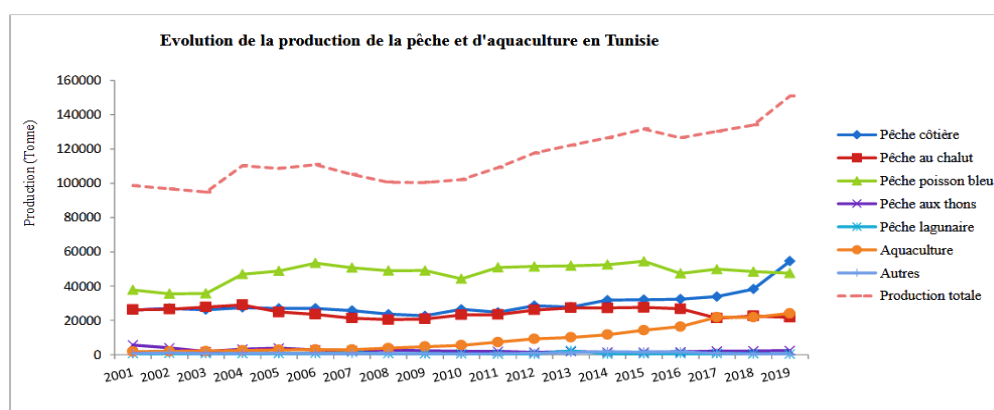


Figure 1: Evolution de la production mondiale de la pêche et de l'aquaculture par année (Source FAO, 2018)

I.2. Production tunisienne

Avec ses deux façades maritimes longeant 1300 km, un domaine maritime national de 80,000 Km² et 105200 hectares de lagunes, la Tunisie a toujours été un pays marin et le secteur de la pêche et l'aquaculture constitue une activité d'une importance certaine sur les plans socio-économiques qu'alimentaires. Ce secteur représente 8% de la valeur de la production agricole et de 13% de la valeur de ses exportations. La production de la pêche, qui n'a cessé de croître pour atteindre 102 mille tonnes en 1988, a connu un fléchissement durant les années 90, puis elle a repris doucement pour atteindre une production de 150 mille tonnes en 2019 (Figure 2).



Source : Direction Générale de la Pêche et de l'Aquaculture (DGPA)

Figure 2: Evolution de la production de la pêche et d'aquaculture en Tunisie

En 2019, la production de la pêche et de l'aquaculture par gouvernorat a été dominée par Monastir et Sfax avec des parts de 21,8% et de 21,4%, respectivement (Figure 3). La consommation par habitant et par an a suivi la même évolution, après 13,5 kg en 1988 elle est descendue à 8,5% en 1990 puis elle est remontée ces dernières années à 11,5 kg.

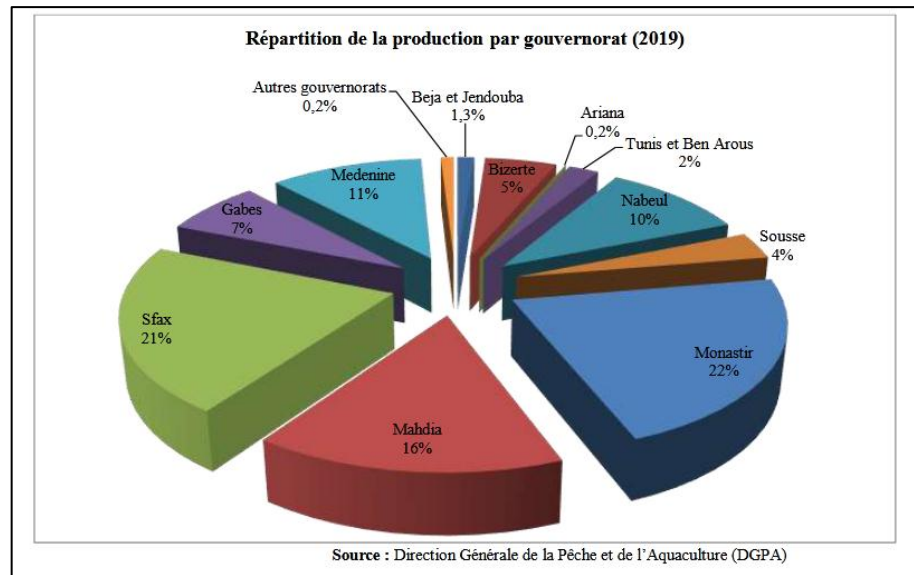


Figure 3: Répartition de la production par gouvernorat (2019)

La Tunisie avec ses eaux tempérées et claires offre des conditions idéales pour l'élevage du poisson et pour le secteur de l'aquaculture en général, devenu un aspect capital de l'économie maritime tunisienne. Selon des données de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'aquaculture en Tunisie évolue avec un taux de croissance annuel de 20% jusqu'à 2014. La production actuelle est d'environ 16200 tonnes (2019). La principale zone de production aquacole marine est située dans les gouvernorats de Sousse, Monastir et Nabeul.

II. Description et répartition géographique de l'espèce étudiée : *Diplodus annularis*

II.1. Position systématique

📌 Systématique :

Embranchement : Chordata

Sous-embranchement :

Vertebrata

Classe : Actinopterygii

Sous-classe : Neopterygii

teleostei

Ordre : Perciformes

Famille : Sparidae

Genre : *Diplodus*

Espèce : *annularis*



Photo 1 : *Diplodus annularis* (*D.annularis*)

Autres noms

communs français :

Sparailon

Noms communs

internationaux:

Raspallón anillado

(Espagnol), *Sparlotto*

(Italien), *Ringelbrasse*

(Allemand)

II.2. Principaux caractères morphologiques et alimentation

D'après (Fischer, 1987), *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758) est un Sparidé au corps ovale, élevé et comprimé latéralement. La coloration générale des adultes est grise argentée, avec des reflets jaunes généralement présents sur le dessus de la tête, l'avant de la nageoire dorsale et de façon plus prononcée, au niveau des nageoires pelviennes et de l'anale. Les caractères distinctifs sont une tache sombre en forme d'anneau presque complet sur le pédoncule caudal, les nageoires pelviennes et le début de la nageoire anale de couleur jaune.

La taille adulte va d'une dizaine de centimètres à une vingtaine de centimètres, exceptionnellement 25 cm. Le corps des juvéniles est de couleur jaune, laquelle tend à disparaître au fur et à mesure de la croissance (de la queue vers la tête). Le sparillon est un carnivore benthique. Il se nourrit de vers, crustacés, mollusques, échinodermes, hydrozoaires. Il peut lui arriver d'ingérer des algues en broutant le substrat à la recherche de ses proies. La puissante dentition de cette espèce lui permet de briser des coquilles et des carapaces.

II.3. Répartition géographique

Le sparillon, *Diplodus annularis*, est présent sur la côte est de l'océan Atlantique, de la Mauritanie à la Bretagne. Il est également présent en mer Noire et très répandu en mer méditerranée. Son abondance varie en fonction des régions et de la pression de la pêche. Facilement observé de la surface, il est un bon indicateur de la qualité des écosystèmes marins côtiers (Gharred et al., 2020). On retrouve le plus souvent le sparillon à une profondeur inférieure à 90 mètres. Il est fréquent à faible profondeur (10-15 mètres). Cette espèce vit à proximité des zones rocheuses et au-dessus des herbiers. On peut aussi observer le sparillon dans les lagunes et les ports.

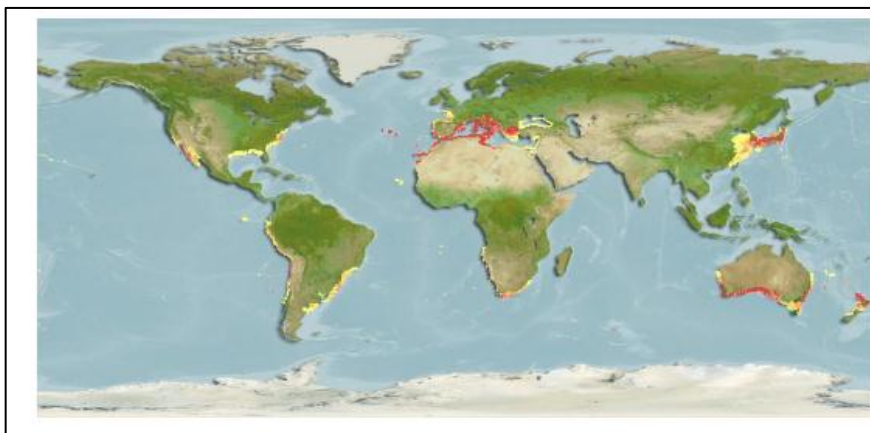


Figure 4: Répartition géographique du *D. annularis* (FROESE and PAULY, 2010)
(couleur rouge : très abondant ; couleur jaune : peu abondant.)

III. Valorisation des produits et des coproduits marins

III.1. Les sous-produits d'origine marine

Les sous-produits sont définis comme les parties rejetées ou non consommables mais récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Les principaux sous-produits générés au cours de transformation de poissons pour la consommation humaine sont les têtes, les viscères, les chutes de filetage, la peau, l'écaille, les arêtes, les queues et les éléments reproducteurs tels que les œufs ou la laitance (**Figure 5**). Les industries de formation des produits génèrent annuellement des déchets solides en quantités importantes présentant plus de 12% de la capture annuelle (FAO, 2018).

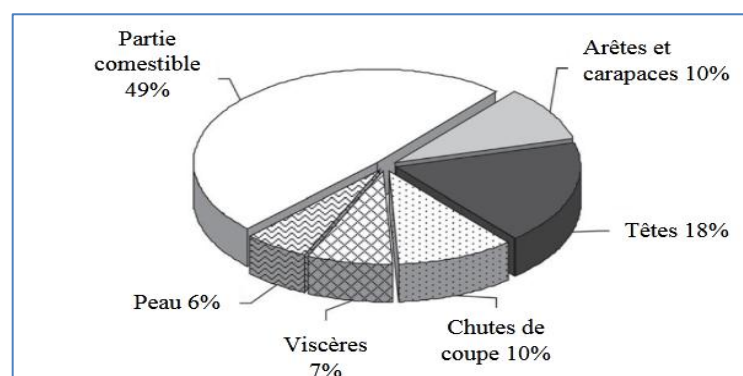


Figure 5: Répartition moyenne de la partie comestible et sous-produits de la pêche (Rustad, 2007)

Ces sous-produits, grâce à l'amélioration des technologies de transformation, peuvent constituer une ressource importante en matière de nutrition puisqu'ils peuvent désormais être recyclés de manière plus efficace. Ces derniers sont généralement transformés en produits de faible valeur tels que des aliments pour les animaux, des farines et des huiles de poisson, des hydrolysats protéiques ou même des isolats et des engrais et les utiliser dans diverses applications : l'alimentation animale ou humaine, la diététique, la nutraceutique, la pharmaceutique, le cosmétique et d'autres applications (Camargo et al., 2021) (**Figure 6**).

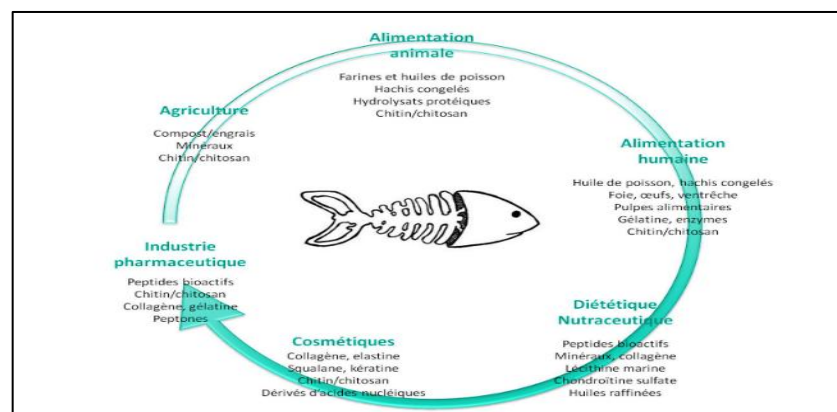


Figure 6: Voies de valorisation des co-produits (Source : IFREMER, 2010)

III.2. Différentes voies de valorisation des sous-produits marins : les produits dérivés

De nos jours, avec le développement du concept de technologies écologiques, les produits et les coproduits marins peuvent offrir de larges possibilités de valorisation dans diverses disciplines industrielles et dans la production de produits commerciaux d'intérêt biotechnologique. Le produit dérivé est le produit commercial obtenu à partir de produits et co-produits marins. De nombreuses études ont dévoilé leurs potentiels multiples d'être convertis en plusieurs molécules bioactives ou groupes de molécules potentiellement valorisables notamment les protéines et les peptides bioactifs (Bougatef et al., 2020a), les enzymes (Balti et al., 2011), le collagène et la gélatine (Taktak et al., 2021), le chitosane et la chitine (Hamdi et al., 2017) qui ont des propriétés bénéfiques pour l'économie, l'environnement et la santé humaine (**Figure 7**).

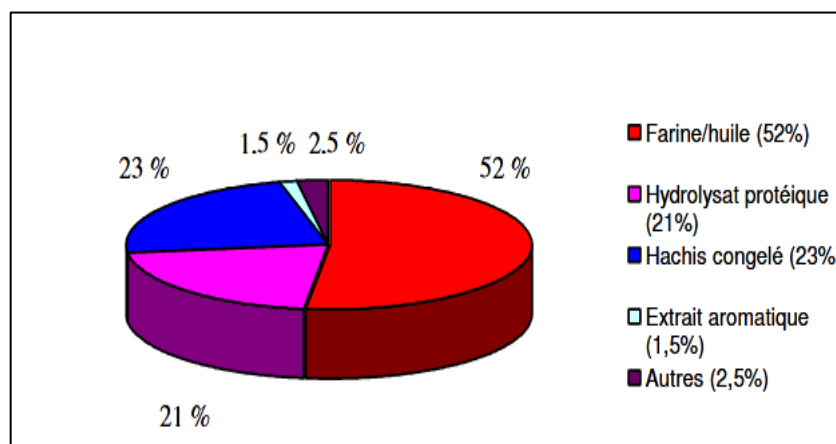


Figure 7: Proportions des différentes voies de valorisation des co-produits d'origine marine (Andrieux, 2004).

✚ Farine et huiles de poissons

Une part croissante de la farine et de l'huile de poisson, comprise entre 25 et 35% provient des industries de transformation des produits de la pêche qui participe de façon directe à l'alimentation des poissons d'élevage ou transformée en engrais (FAO, 2018). La farine de poisson est obtenue par une cuisson de la matière première dans l'eau, un pressage pour extraire l'excès de l'eau et des lipides suivi d'un séchage, par la suite ce produit est séché, broyé et tamisé. La production de la farine de poisson est actuellement la valorisation des co-produits la plus importante, car tous peuvent être utilisés sans distinction et aucun tri n'est nécessaire. En 2008, 2,6 millions de tonnes de farines ont ainsi été commercialisés avec près de 25% des matières premières utilisées qui étaient des coproduits issus de l'industrie de transformation (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, 2018).

La principale valeur nutritionnelle des huiles de poisson réside dans leurs richesses en acides gras polyinsaturés (AGPI, Oméga 3 et Oméga 6).

Les acides gras oméga 3 à longue chaîne et particulièrement en C20 :5 oméga 3 (acide eicosapentaénoïque ou EPA) et C22 :6 oméga 3 (acide docosahexaénoïque ou DHA) ont démontré leur effet préventif sur les maladies cardiovasculaires (Ottaway, 2012), l'abaissement de la tension artérielle et du niveau de cholestérol (Wong et al., 2016) et certains type de cancer (Trombino et al, 2019). Néanmoins, l'apport accru en AGPI conduit à augmenter le risque de la peroxydation ce qui permet la diminution de leurs qualités nutritionnelles et biologiques et par la suite limite leurs utilisations dans la formulation des aliments (Genot & Michalski, 2010). Afin de réduire la dégradation des AGPI, différentes technologies avancées sont orientées vers les huiles encapsulées et commercialisées sous la forme de compléments alimentaires ou incorporés dans des aliments nommés « aliments fonctionnels ». Il s'agit d'exploiter les propriétés filmogènes, absorbantes et émulsifiantes de macromolécules comme matrices à l'état vitreux qui enrobent les lipides tels que l'isolat de protéines (Nasri et al., 2020), le chitosane (Kavousi et al., 2017) et les polysaccharides (González-Vega et al., 2022).

Collagène et gélatine

La gélatine est une classe de biopolymères qui est grandement utilisée dans les industries manufacturières modernes, notamment dans le traitement de produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques, en raison de leurs propriétés fonctionnelles uniques (Lv et al., 2019). Il s'agit d'une substance incolore, solide et insipide issue de l'hydrolyse du collagène (traitement des matières premières avec des acides, des bases ou des enzymes ou bien traitement avec des températures élevées). Le collagène est le composant protéique le plus abondant de tissu conjonctif, des os, des cartilages, des tendons, de la peau et des écailles. C'est un constituant majeur du corps animal. La gélatine peut être classée comme gélatine porcine, gélatine bovine et gélatine de poisson en fonction de sa source. La composition en acides aminés de gélatine et de collagène est un point clé pour leurs utilisations dans différents secteurs industriels, notamment dans les industries alimentaires. La gélatine peut être utilisée comme un agent conservateur sous forme de biofilm et aux actions antibactériennes et antioxydantes, dans la cosmétique elle est utilisée sous forme d'hydrolysats incorporés dans les produits cosmétiques pour améliorer les conditions d'utilisation et dans le domaine pharmaceutique, la gélatine et le collagène ont des propriétés antidiabétiques, anticancérigènes, antioxydantes et antimicrobiennes et aussi peuvent être utilisés dans la cicatrisation.

✚ Chitine et chitosane

La chitine est le deuxième biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. Elle est un constituant majoritaire des carapaces, de crustacés, ainsi que des os de seiches et des plumes de calmars. Elle est aussi présente dans la cuticule des insectes et dans les champignons. Sous la forme désacétylée, la chitine devient chitosane (**Figure 8**). Le chitosane a l'exceptionnelle particularité d'être chargé positivement ce qui lui permet de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement et de les fixer solidement par liaison ionique.

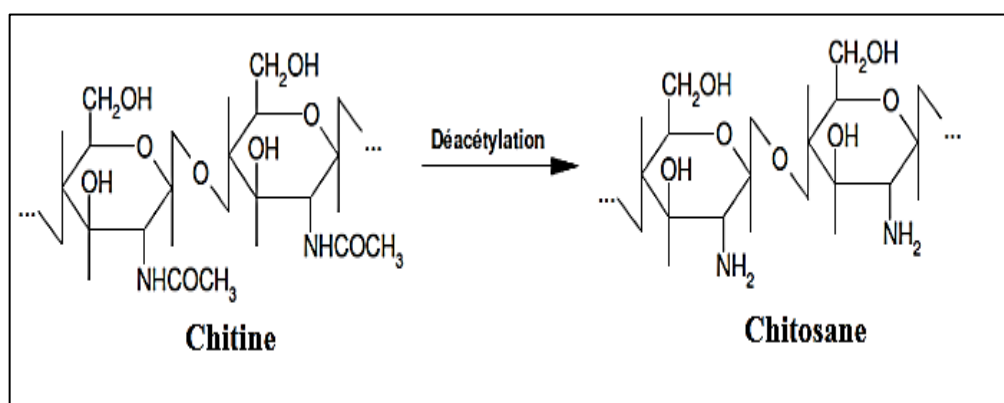


Figure 8: Désacétylation de la chitine en chitosane

Le chitosane présente des nombreuses propriétés bioadhésives et filmogènes. Il présente également des propriétés antioxydantes, fongicides et bactéricides lui permettant des applications en cosmétologie et en alimentation et nutraceutique.

✚ Protéases digestives

Durant ces dernières années, de nombreuses études ont montré l'efficacité d'utilisation de protéases pour des usages biotechnologiques. Les protéases sont des enzymes protéolytiques qui catalysent la dégradation de protéines et de peptides par hydrolyse des liaisons peptidiques (**Figure 9**). Les sous-produits de poisson (surtout les viscères) sont des sources importantes d'enzymes protéolytiques qui représentent aujourd'hui le plus important groupe d'enzymes industrielles utilisées dans le marché (environ 50% du volume total d'enzymes) (Hamdi et al., 2018; Younes et al., 2015). Ces protéases marines ont une variété d'applications dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, de détergence et de tannage, etc. De plus, les protéases marines ont été appliquées dans la déprotéinisation des déchets de crevettes afin de préparer la chitine et comme additifs dans les produits de détergence (Lassoued et al., 2015).

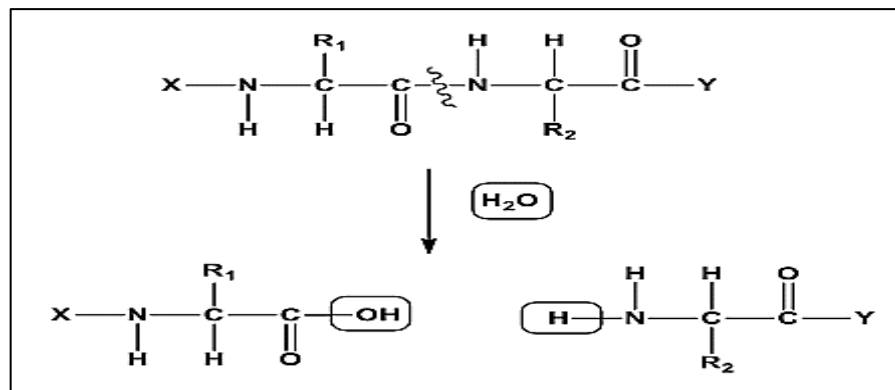


Figure 9: Hydrolyse d'une liaison amide catalysée par une enzyme protéolytique (Stryer, 1995)

Les protéases digestives sont classées en deux grandes catégories : les endopeptidases hydrolysant les liaisons peptidiques spécifiques à l'intérieur des molécules protéiques et les exopeptidases hydrolysant les liaisons peptidiques terminales (extrémité N-terminale ou C-terminale) et libérant les acides aminés. Il existe quatre classes des protéases digestives : les protéases acides et aspartiques, à sérine, à thiol ou protéases à cystéine et les métalloprotéases. Les enzymes protéolytiques les plus étudiées chez les poissons et les invertébrés marins sont les protéases gastriques comme la pepsine et les protéases pancréatiques à sérine comme trypsine et chymotrypsine (Bkhairia et al., 2016).

✚ Hachis congelé

La fabrication des hachis congelés représente la troisième valorisation en masse réalisée en France (33000 tonnes en 2002) (Andrieux, 2004). Ils sont fabriqués à partir de tous les coproduits à l'exception des viscères. La fabrication des hachis congelés est très certainement celle qui nécessite le moins d'opérations de transformation. En effet, les co-produits générés au cours de la transformation sont broyés, filtrés, puis les hachis obtenus sont congelés en blocs. Les hachis congelés sont une bonne source de protéines et ils sont utilisés pour la fabrication d'aliments pour les animaux de compagnie.

IV. Les protéines de poisson

La teneur en protéines du poisson dépend de l'espèce mais elle est généralement supérieure à 20%. Les protéines musculaires, qui représentent 15-25% des protéines totales, sont à 50%-60% myofibrillaires dites de structure (fibres du cytosquelette, myosine, actine, actomyosine (50%-60%)), 30% sarcoplasmiques (myoglobine, albumines, globulines) et 10%-20% stromales (collagène, élastine, kératine, réticuline et connectine). Une telle caractéristique, la faible teneur en protéines globulaires (telle que globuline) des muscles de poisson, leur

donnent une meilleure tendreté et digestibilité que les muscles des animaux terrestres (Tacon & Metian, 2018).

La consommation de protéines de poisson est associée à des bienfaits pour la santé, comme les activités anti-inflammatoires, antioxydantes et inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et antimicrobiennes (Heffernan et al., 2021; Cerrato et al., 2020; Chel-Guerrero et al., 2020). Une grande tendance actuelle consiste à préparer des peptides bioactifs pour les appliquer comme additifs alimentaires et pharmaceutiques (Prameela et al., 2018).

V. Hydrolysats de protéines de poisson

Les hydrolysats de protéines sont le résultat de la digestion partielle des protéines de poissons entiers ou de co-produits moyennant des protéases et qui peuvent être obtenus soit par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) soit par hétérolyse (avec addition d'enzymes exogènes). Les hydrolysats sont des fractions caractérisées par une teneur protéique élevée (73 à 85%) et ils ont donc les avantages d'être très digestes et d'avoir une haute qualité nutritive. Une fois séchés, ces hydrolysats ont un aspect identique à celui des farines. L'hydrolyse est l'une des techniques les plus efficaces utilisés pour produire des peptides bioactifs qui sont présents à l'état latent dans la séquence des protéines. Ces hydrolysats sont des mélanges complexes riches en peptides et en acides aminés libres, dont la composition varie en fonction de l'origine de la matière première et des paramètres d'hydrolyse appliqués lors de leur fabrication. Leur richesse en acides aminés essentiels (36%-51% du totale de AAs) leur permet de jouer un rôle dans la correction des régimes alimentaires inadéquats et dans le développement de formulations des aliments (Sathivel et al., 2005; Lassoued et al., 2021). Plusieurs études ont montré l'intérêt biologique des peptides bioactifs tel que les activités antioxydantes (Ktari et al., 2020), antibactériennes (Jemil et al., 2014), antihypertensives (Vázquez et al., 2020) et anticoagulantes (Nasri et al., 2012).

V.1. Production

Plusieurs méthodes de production d'hydrolysats à partir de poisson entier ou de parties de poisson, notamment l'hydrolyse chimique (acide et alcaline), l'autolyse, la fermentation bactérienne et l'hydrolyse enzymatique.

V.2. Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique est la plus ancienne méthode qui se produit généralement en milieu fortement acide (HCL ou H₂SO₄) et alcalin (NaOH) dans des hautes températures de l'ordre de 100°C.

La production du chlorure de sodium pendant l'hydrolyse acide, contribue à la conservation du produit. Cependant, en présence des conditions plus drastiques, cette hydrolyse a l'inconvénient de décomposer partiellement certains acides aminés et de détruire complètement le tryptophane. Alors que, l'hydrolyse alcaline provoque la destruction de la sérine, thréonine, et la cystéine qui sont des acides aminés essentiels (Fountoulakis & Lahm, 1998). Les méthodes d'hydrolyse chimique (acide ou alcaline), restent très limitées, malgré leur faible coût, en raison de la réduction des qualités nutritionnelles et fonctionnelles des produits finaux.

V.3. Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique, très populaire, a été appliquée à un très grand nombre de protéines, y compris d'origine maritime. Ce procédé a l'avantage des conditions expérimentales douces qui n'altèrent pas la valeur nutritionnelle des protéines, ainsi que celui d'être contrôlable (Petersen, 1981). Il convertit les protéines en hydrolysats constitué de différents peptides et d'AAs libres. En comparaison aux protéines intactes, les hydrolysats ont généralement une valeur nutritionnelle, une fonctionnalité et une bioactivité améliorées (Gildberg et al., 2002). L'hydrolyse de liaisons peptiques se traduit par l'apparition d'un carboxyle et d'une amine. La dissociation du carboxyle est suivie par la protonation du groupement amine ($R-NH_2 + H^+ \rightarrow R-NH_3^+$). Lorsque la réaction d'hydrolyse est conduite dans un milieu de pH supérieure à 6,5, $R-NH_3^+$ se dissocie libérant un proton H^+ qui acidifie le milieu (**Figure 10**).

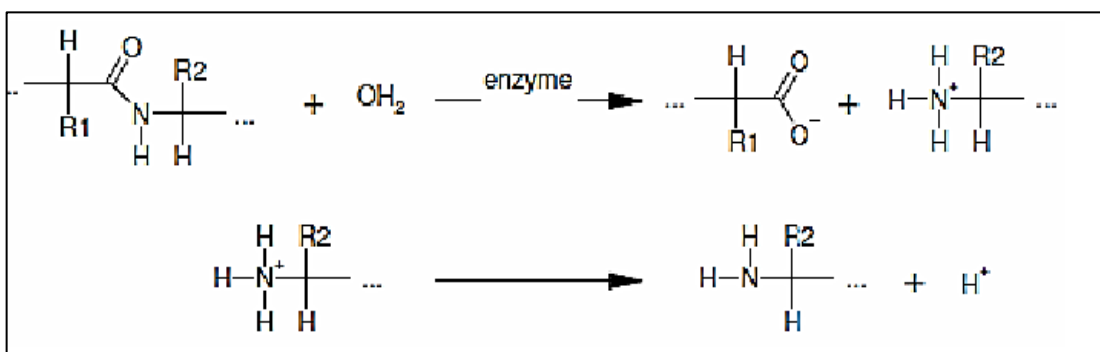


Figure 10: Mécanisme réactionnel schématisé de la coupure d'une liaison peptidique par hydrolyse enzymatique en milieu alcalin

Il est possible de classer les hydrolysats en 2 grandes catégories : l'autolysats et les hétérolysats.

Autolysats

Dans le cas d'autolyse, ce sont les enzymes endogènes du poisson, gastriques, pancréatiques (pepsine, trypsine, chymotrypsine) et lysosomales (cathepsines), qui catalysent l'hydrolyse (Gildberg et al., 1984). Les bactéries naturellement présentes dans le mélange participent également à cette protéolyse. Les autolysats sont élaborés en plusieurs étapes à partir de poissons entiers ou de coproduits. Ils sont généralement liquides, assez visqueux, riches en petits peptides et en acides aminés libres. L'autolyse a l'avantage d'être relativement facile à mettre en œuvre car elle ne nécessite pas l'ajout de protéases. En outre, le processus d'autolyse est difficile à contrôler et donc difficilement reproductible car les concentrations d'enzymes endogènes varient considérablement au sein des espèces et entre elles, tout en étant fortement saisonnières et spécifiques à l'âge ce qui se traduit par des produits finaux présentant des profils moléculaires incohérents et dépendantes d'autres facteurs tels que la température de stockage et fraîcheur de la matière première (Benjakul & Bauer, 2001).

Hétérolysats

Les hétérolysats sont des hydrolysats produits par l'action d'une enzyme ou d'un mélange d'enzymes exogènes ou commerciales additionnées au milieu dans des conditions contrôlées. De nombreuses protéases sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, elles sont d'origine animale (porcine et bovine, les plus fréquents sont trypsine, chymotrypsine et pepsine), végétale (papaïne, bromélaïne) ou microbienne (issues de bactéries ou de levures). Les industriels du secteur commercialisent leurs enzymes sous forme de complexes enzymatiques comme par exemple : Alcalase, Purafect, Protamex, Savinase commercialisées par la société Novozymes. Plusieurs paramètres influencent cette hydrolyse notamment la température, le pH, le rapport enzyme/substrat et à partir d'une même matière première, il est possible de produire plusieurs types d'hydrolysats protéiques, ayant des propriétés structurales, fonctionnelles et biologiques différentes en modulant les conditions d'hydrolyse. Ce type d'hydrolyse moyennant des enzymes exogènes est plus efficace que celui de l'autolyse puisque les différents paramètres de la réaction sont bien contrôlés (Diniz & Martin, 1997). En plus, il est possible de diriger l'hydrolyse vers de peptides particuliers en utilisant des enzymes et de conditions opératoires spécifiques (Liaset et al., 2000).

V.4. Paramètres d'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des protéines dépend de la température, du pH, de la spécificité et de la concentration de l'enzyme, du substrat et de sa concentration, du temps d'hydrolyse, de la vitesse de l'agitation, et de la présence éventuelle d'inhibiteurs comme la graisse dans les sous-produits de poisson. Elle est également influencée par le traitement de la matière première préalable à l'hydrolyse (matière fraîche, matière cuite,...) (Kristinsson & Rasco, 2000). Par ailleurs, la protéolyse est influencée par les facteurs capables d'affecter notamment la conformation de l'enzyme et sa solubilité (Klompong et al., 2007).

L'impact de chaque paramètre sur l'efficacité de l'hydrolyse est évalué en mesurant le degré d'hydrolyse (DH) qui exprime la proportion des liaisons peptidiques rompues et qui est l'un des paramètres déterminants des propriétés fonctionnelles et biologiques du produit final.

- ***Le pH et la température***

Le pH joue un rôle considérable dans le contrôle de l'hydrolyse enzymatique. L'enzyme est très sensible au changement de pH. De manière générale chaque enzyme possède un pH optimum spécifique et une gamme de fonctionnement de pH relativement réduite. La variation du pH du milieu réactionnel peut avoir des conséquences sur l'enzyme en provoquant des modifications de l'état d'ionisation de certains acides aminés situés sur le site actif de l'enzyme pouvant empêcher la formation de complexe enzyme/substrat.

Comme pour le pH, chaque enzyme possède sa propre gamme de température dans laquelle elle est active, cette gamme dépend de plusieurs facteurs : la nature du substrat protéique, le pH et le rapport enzyme/substrat. En effet, il est préférable de travailler dans la plage de températures indiquée par le fournisseur d'enzymes pour optimiser le rendement de la réaction. La température accélère les vitesses des réactions mais au-delà d'une certaine température (qui dépasse 70°C), une modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme se produit provoquant progressivement sa dénaturation et sa désactivation.

- ***Le rapport enzyme/substrat et la concentration du substrat***

Il existe un rapport massique enzyme sur substrat (E/S) optimal, caractéristique de la nature du substrat et de la spécificité de l'enzyme. Cheftel et ses collaborateurs (1971) ont démontré que le degré de solubilisation de la solution liée à l'hydrolyse des protéines de poisson diminuait lorsqu'on augmentait la concentration du substrat pour une concentration fixe de l'enzyme (le pronase). Cela serait dû à une inhibition de l'enzyme par le produit et à un faible transfert du substrat à l'enzyme.

En outre, une augmentation du rapport pronase/substrat protéique favorise la solubilisation des protéines. Nouri et al. (1997) ont observé une augmentation de la vitesse de dégradation de la protéine native de blé proportionnellement à une augmentation de la concentration de l'enzyme (la pepsine).

V.5. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats peptidiques

Les propriétés fonctionnelles des ingrédients alimentaires sont importantes car elles déterminent la qualité et l'utilisation du produit final. Il s'agit de l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques qui peuvent promouvoir les systèmes alimentaires au cours de leur fabrication, leur conservation et leur consommation. Dans le cas des protéines et des hydrolysats, ces caractéristiques comprennent notamment la taille, la séquences en aminoacides, la distribution des charges, le rapport hydrophobie / hydrophilie, la flexibilité et la rigidité des molécules.

V.5.1. Solubilité

La solubilité est déterminante pour la fonctionnalité des protéines et de leurs hydrolysats (Witono et al., 2016). En effet, cette propriété impacte fortement d'autres propriétés fonctionnelles (capacité émulsifiante, capacité moussante...) (Park & Yoon, 2019). Elle est généralement mesurée par l'indice de solubilité de l'azote, défini comme le pourcentage d'azote dans le surnageant par rapport à la quantité d'azote contenu dans la protéine native, après centrifugation de la solution pendant un temps déterminé (Morr et al., 1985).

La solubilité dépend de plusieurs facteurs tels que les interactions hydrophobes peptides-peptides, les interactions ioniques peptides-eau, de la taille des peptides et du pH. L'hydrophobicité et les interactions ioniques sont les deux facteurs majeurs influant la solubilité des protéines. Les liaisons hydrophobes améliorent les interactions protéine-protéine et réduisent par conséquent la solubilité. Cependant, les liaisons ioniques favorisent les interactions protéine-eau, et permettent ainsi l'augmentation de la solubilité. Plusieurs études ont démontré que les protéines de poisson non hydrolysées ont une solubilité réduite dans une large gamme de pH (Dos Santos et al., 2011; Islam et al., 2021; Jemil et al., 2014). Pour remédier à ce problème l'hydrolyse enzymatique s'avère une alternative fortement intéressante pour augmenter la solubilité de ces protéines. Pour les hydrolysats du muscle de sardinelle, Jemil et al. (2014) observent que plus le DH est élevé, plus la solubilité est élevée.

La solubilité des hydrolysats enzymatiques augmente quels que soient les valeurs de pH comparativement aux molécules non hydrolysées. Leni et al. (2020) ont obtenu une augmentation de la solubilité des hydrolysats de protéines des insectes pour des DH élevés. Cette amélioration est attribuée à une production de peptides de petite taille et plus hydrophiles (Mokni Ghribi et al., 2015). Calderòn-Chiu et al. (2021) observent que la solubilité des hydrolysats protéiques de feuilles de jacquier est bonne et varie selon le type d'enzyme. L'hydrolysats obtenu avec pancréatine possède une meilleure solubilité (98%) que celui obtenu avec la pepsine (60%) pour des pH de 4 à 10.

V.5.2. Les propriétés émulsifiantes

Les émulsions sont des systèmes instables faisant intervenir deux liquides non miscibles tels que l'huile et l'eau (l'une des deux phases étant dispersée dans l'autre sous forme de gouttelettes). Lorsque l'eau se trouve dispersée dans l'huile, on parle alors d'une émulsion «eau dans l'huile» ou on peut trouver des émulsions «huile dans l'eau». Le fait dispersé, par l'agitation, une phase sous forme de gouttelettes réduit considérablement la durée de vie du système car la surface disponible entre les gouttes et la phase continue est fortement augmentée induisant alors une augmentation de l'énergie libre.

Pour maintenir cet état de stabilité, l'un des moyens consiste à ajouter des molécules appelées « tensioactifs », dans certains produits dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques, ces molécules sont nommées des émulsifiants. Le rôle de l'émulsifiant est d'abaisser la tension interfaciale en s'adsorbant à l'interface. Un émulsifiant doit avoir dans sa structure une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Cette propriété particulière confère alors aux émulsifiants une capacité à se placer entre l'huile et l'eau (l'interface) et à former un film protecteur qui empêche la coalescence de ces gouttelettes (Demetriades et al., 1997).

Les hydrolysats de protéines sont qualifiés comme d'excellents émulsifiants, car ils permettent de diminuer la tension interfaciale entre les phases aqueuses et lipidiques. La capacité des hydrolysats protéiques à former et à stabiliser des émulsions peut être mesurée par deux propriétés d'émulsification, notamment l'indice d'activité de l'émulsion (IAE) et l'indice de stabilité de l'émulsion (ISE).

En l'absence de protéines douées d'activité émulsifiante, les gouttelettes d'huile vont s'agglomérer et remonter à la surface du produit en lui donnant un aspect indésirable. Mohanty et al. (2021) ont montré que les hydrolysats protéiques sont doués d'une activité de surface et peuvent ainsi promouvoir l'émulsion huile/eau puisqu'ils ont des groupes

hydrophiles et d'autres hydrophobes et sont également hautement solubles dans l'eau. Les propriétés émulsifiantes des hydrolysats peptidiques sont améliorées par un contrôle précis de la réaction d'hydrolyse.

Une hydrolyse poussée se manifeste par une perte de propriétés émulsifiantes (Akbari et al., 2019; Klompong et al., 2007; Mohanty et al., 2021). Malgré la haute stabilité des peptides de petite taille et leur capacité à diffuser rapidement et s'adsorber à l'interface huile/eau, ils ont un effet non significatif sur la réduction de la tension interfaciale puisqu'ils ne peuvent pas se réorienter. Les propriétés émulsifiantes dépendent aussi d'autres facteurs tels que la charge et la masse moléculaire (Gao et al., 2019).

V.5.3. Les propriétés moussantes

Les mousses alimentaires sont des dispersions de bulles de gaz (principalement de l'air) dans une phase continue liquide ou semi-solide qui contient un surfactant capable de diminuer la tension de surface interfaciale de la phase continue. Les hydrolysats de protéines ont été proposés comme des agents tensioactifs capables de favoriser et de stabiliser des mousses grâce à leur structure amphiphile. Elles s'adsorbent à la surface de bulles d'air piégées dans une solution en formant un film protecteur élastique entre les bulles d'air.

Ben khaled et al. (2014) ont montré que les capacités moussantes des hydrolysats sont nettement meilleures que les protéines initiales. Les auteurs expliquent cela par la production des peptides plus amphiphiles et flexibles, ce qui augmenterait leur diffusion aux interfaces, améliorant ainsi les propriétés moussantes. D'autres études ont montré que les peptides de grande taille dans les hydrolysats pourraient former des films flexibles autour des bulles d'air et former une mousse plus stable, tandis que des peptides de petite taille tels qu'obtenus avec un temps d'incubation long affaiblissent la stabilité de la mousse produite (Klompong et al., 2007 ; Chalamaiah et al., 2015 ; Calderón-Chiu et al., 2021 ; González-Serrano et al., 2022).

V.5.4. La capacité de rétention d'eau

La capacité de rétention d'eau est par définition la capacité des protéines à retenir l'eau. Cette propriété fonctionnelle est très importante dans les industries agroalimentaires puisque le fait de retenir l'eau dans une matrice protéique contribue à l'amélioration de la texture finale du produit. Elle dépend essentiellement des interactions protéines-eau. Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la capacité d'hydratation, dont celle de Miller et Groninger (1976) et celle décrite par Huda et al. (2001). L'échantillon est homogénéisé dans de l'eau distillée, puis il est centrifugé. Le surnageant recueilli permet de mesurer la capacité

d'hydratation. Kristinsson & Rasco (2000) ont utilisé une autre technique pour mesurer la capacité d'hydratation d'un hydrolysats de protéines de saumon. Le principe consiste à mesurer la perte d'eau après congélation (48 jours) et décongélation (2 h).

Akbari et al. (2019) expliquent l'augmentation de la capacité d'hydratation des hydrolysats par la présence des groupes riche en phosphate et d'autres groupes polaires, qui pourraient interagir avec les molécules d'eau pour améliorer l'hydratation des protéines. Taktak et al. (2021) ont constaté que les protéines non digérées de l'anguille (*Anguilla anguilla*) ont une meilleure capacité d'hydratation par rapport à leurs hydrolysats. Cela serait probablement dû selon eux, à l'implication des chaînes latérales hydrophiles polaires des protéines natives, plus nombreuses et qui fixent beaucoup plus de molécules d'eau que les hydrolysats protéiques et à leur poids moléculaire plus élevé (>10 Kda). Les protéines et leurs hydrolysats présentant une excellente capacité de rétention d'eau, pourraient donc être utilisés dans les formulations alimentaires.

V.5.5. La capacité de rétention d'huile

Cette propriété met en jeu les interactions hydrophobes entre les molécules de lipides et les protéines. Elle correspond à la quantité d'huile adsorbée par gramme de protéine. Le mécanisme d'absorption est attribué à une réticulation physique de l'huile dans la matrice protéique. La capacité d'absorption d'huile des hydrolysats de protéines de la seiche obtenus par différentes enzymes à des DH variant de 5 à 13,5%, a été étudiée par Balti et al.(2010). Ces hydrolysats possèdent une capacité d'absorption d'huile supérieure aux protéines non digérées. La capacité d'adsorption est meilleure à DH 5% (1.97 mL huile/g de protéines), qu'à DH 10% (1 .87 mL huile/g de protéines) et à DH 13,5 % (1.81 mL huile / g de protéine).

Pour Latorres et al. (2018), l'amélioration de la capacité d'absorption d'huile des hydrolysats protéiques de crevettes pourrait être due à la disponibilité des acides aminés hydrophobes dans les hydrolysats.

VI. Domaines d'application des hydrolysats peptidiques

Les peptides générés lors de l'hydrolyse enzymatique présentent des compositions en acides aminés, des propriétés physico- chimiques, des séquences et des structures particulières qui permettent un éventail très large de fonctionnalités qui vont intéresser divers secteurs d'applications industrielles. La composition en acides aminés et la digestibilité de certains hydrolysats ou de fractions peptidiques vont conférer d'excellentes propriétés nutritionnelles avec des applications dans le secteur de l'alimentation, voire de la santé. Les propriétés

physico-chimiques des peptides dues à la variété de fonctions chimiques des chaînes latérales exposées sont à l'origine des propriétés fonctionnelles de produits agro-alimentaires ou cosmétiques.

Enfin, les activités biologiques portées par de nombreux peptides permettent d'envisager des applications dans le secteur de la santé ou des nutraceutiques. D'une manière générale, il s'agit d'un large spectre des possibilités d'application des peptides provenant de l'hydrolyse enzymatique de protéines. Nous présentons ici les plus prometteuses :

VI.1. Nutrition animale

Les hydrolysats présentent un intérêt particulier dans la nutrition animale à cause de leur haute qualité nutritive et leur digestibilité plus élevée (Heu et al, 2003). De nombreuses études ont été effectuées sur l'efficacité de l'utilisation des hydrolysats de poisson en nutrition animale. En aquaculture, l'utilisation des hydrolysats de poissons a prouvé son efficacité sur la croissance de poissons en substituant partiellement la farine de poissons (Srichanun et al., 2014). L'utilisation d'hydrolysats montre également une amélioration de la maturation du système digestif chez les larves (Zambonino-Infante et al., 1997).

VI.2. Nutrition humaine

Les hydrolysats peptidiques d'origine marine présentent un intérêt particulier en alimentation humaine dû au fait qu'ils présentent des propriétés fonctionnelles tels que la solubilité, la rétention d'eau, la capacité émulsifiante et le pouvoir moussant qui leur permettent de modifier les caractéristiques organoleptiques des aliments ou d'augmenter leur durée de conservation (Vázquez et al., 2020).

Ils sont également utilisés pour leurs propriétés bioactives et rentrent ainsi dans la composition de nombreux produits nutraceutiques visant par exemple à améliorer le transit intestinal (Marchbank et al., 2009), à favoriser la prise de masse musculaire chez les sportifs (Nesse et al., 2014), ou à améliorer la mémoire et les fonctions cognitives (Guerard, 2010).

VI.3. Milieu de culture bactérienne

Les hydrolysats de poisson constituent des ingrédients pour des milieux de culture de qualité et à coût de production réduit destinés à la culture cellulaire microbienne. Plusieurs travaux ont ainsi mis en évidence une possible substitution des milieux de culture «traditionnels» par des hydrolysats de protéines de poissons (Guérard et al., 2001). D'autres

études ont démontré que l'utilisation des peptones obtenues lors de protéolyse de coproduits de crabe et de crevettes comme source d'azote pour la culture d'*E coli* s'avère plus efficace par rapport à une peptone commerciale. Les peptides constituent ainsi une source d'azote efficace à moindre coût pour la culture microbienne (Vieira et al., 2005).

VI.4. Bioactivité

Les secteurs de la nutraceutique et de la pharmacie sont très porteurs et demandeurs de nouveaux produits, c'est pourquoi il existe un certain engouement à l'heure actuelle pour la conduite de protéolyse ménagée de matières premières marines en vue de produire des peptides bioactifs à forte valeur ajoutée. Leur activité couvre un large domaine incluant notamment les effets anti-hypertensif, antithrombotique, immuno-modulateur, antioxydant, antimicrobien, anti-coagulant et antidiabétique. Ainsi, ils peuvent aider à améliorer la conservation des produits et à traiter des pathologies qui constituent un déficit pour la santé publique telles que l'ostéoporose, l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'obésité ou encore le cancer (Gildberg et al., 2002 ; Kim & Mendis, 2006) (**Figure 11**).

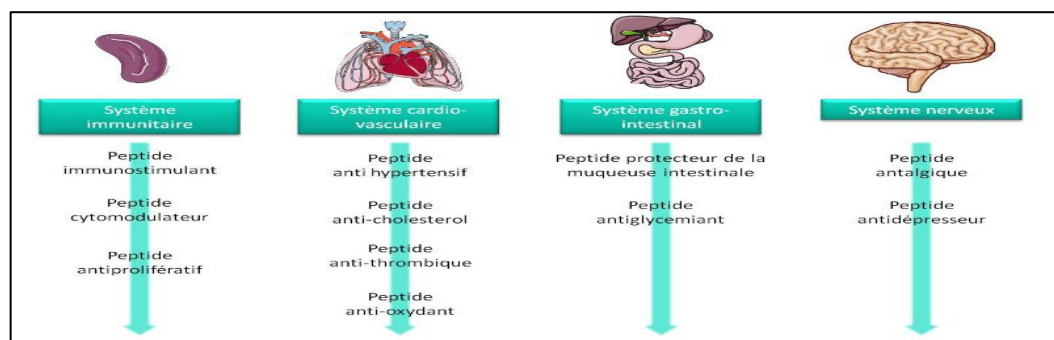


Figure 11: Classes de peptides bioactifs

Le tableau ci-dessous rapporte quelques peptides issus de protéines de produits et coproduits maritimes qui sont doués de bioactivité.

Tableau 2: Bioactivité de peptides isolés à partir des produits de la mer

Origine	Bioactivité	Peptide (s) Actif (s)	Performance	Références
Os de <i>Katsuwonus pelamis</i>	Antioxydante	GAEGFIF GADIVA	CI ₅₀ =(DPPH) 0,30 mg/mL 0,57 mg/mL	(Yang et al 2019)
Coque de sang de <i>Tergillarca granosa</i>	Antioxydante	MDLFTE WPPD	CI ₅₀ = (DPPH) 0,53±0,02 0,36±0,02	(Yang et al., 2019)
Les eaux usées de l'anchois <i>Engraulis japonicus</i>	Antimicrobienne	GLSRLFTALK	Les CMI _s contre <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. Dysenteriae</i> ATCC 51302, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, et <i>S. typhimurium</i> ATCC 50013 sont de l'ordre de 64, 32, 256, 64, et 321 g/mL	(Tang et al., 2015)
Muscle de la raie bouclée	Antihypertensive	FQPSF LKYPI	CI ₅₀ =12.56 CI ₅₀ = 27.07 µM,	(Lassoued et al., 2016)
Cartilage de Raja porosa	Anticancéreuse	FIMGLY	CI ₅₀ =4,81 mg/mL	(Pan et al., 2016)
Gélatine de peau de Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Antidiabétique	IPGDGPPGPPGP, LPGERGRPGAPGP, GPKGDRGLPGPPGRDGM	CI ₅₀ =65,4 µM CI ₅₀ =76,8µM CI ₅₀ =89,6 µM	(Wang et al., 2015)

VII. Activités biologiques des hydrolysats protéiques

VII.1. Activité antioxydante

VII.1.1. Stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme. Ces EOA comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O₂^{•-}) ou le radical hydroxyle (HO[•]) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂) (Garrel et al., 2007). Le stress oxydant résultera d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques.

C'est seulement à ce moment que les EOA vont exercer leur action délétère sur l'organisme. Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques, les carbohydrates (Favier, 2003). Ils peuvent aussi agir sur les macromolécules en provoquant des inactivations enzymatiques, des fragmentations de ces molécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique) et la formation de dimères ou d'agrégats protéiques dans les membranes cytoplasmiques. Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement du

vieillesse ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme, ...).

Différents facteurs peuvent intervenir pour induire ce déséquilibre à savoir certains stimuli pathologiques endogènes (hypertension, diabète...) ou exogènes (polluants environnementaux, tabagisme, alcool, alimentation déséquilibrée) ou suite à une carence en micronutriments antioxydants ou d'anomalies génétiques des enzymes antioxydantes (**Figure 12**).

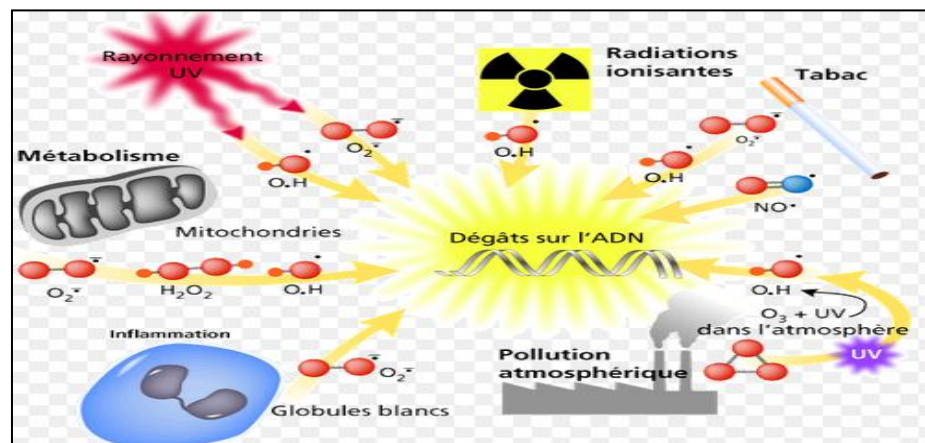


Figure 12: Mécanismes des lésions biochimiques introduites par le stress oxydant et conséquences cellulaires (Favier, 2003)

Les espèces réactives d'oxygène forment une famille de radicaux libres qui sont des espèces chimiques, très instables. Les lipides sont une cible privilégiée des radicaux libres. Ceux-ci provoquent en effet l'oxydation des acides gras poly-insaturés (AGPI) des phospholipides membranaires (principaux constituants des membranes des cellules), mais aussi des organites cellulaires et des noyaux. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Ce phénomène est appelé peroxydation lipidique. De plus, au niveau de l'ADN, les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou un arrêt de la réplication et conduisant à des altérations du message génétique qui sont impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement.

VII.1.2. Phénomènes d'oxydation dans les aliments

Les EROs constituent un facteur principal de l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Les principaux problèmes posés par l'oxydation des lipides résident dans la dégradation des propriétés biochimiques, organoleptiques (formation de composés volatils d'odeur désagréable : rancissement) et nutritionnelles (par interaction des produits d'oxydation avec les acides aminés) de l'aliment. Les facteurs qui influencent, ou qui initient, l'oxydation des lipides sont nombreux.

Il s'agit de facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des lipides (nombre des insaturations), la présence de pro-oxydants (ions métalliques, enzymes, etc.) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc.) et des facteurs externes tels que la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de transformation. En fonction des agents initiateurs, on classe l'oxydation des lipides en 3 types:

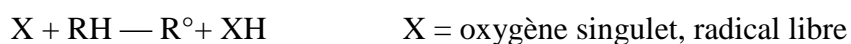
- ✓ L'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres ;
- ✓ La photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs et
- ✓ L'oxydation enzymatique initiée par la présence des enzymes d'oxydation.

✚ *Auto-xydation*

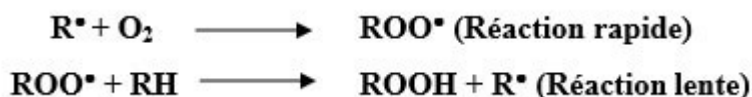
L'auto-oxydation est un terme qui fait référence aux oxydations des substances organiques qui s'effectue en présence d'oxygène atmosphérique à température basse. Il s'agit d'un processus en chaîne de radicaux libres. Il est favorisé en cas de haut degré d'insaturation, d'enrichissement en oxygène et de présence d'un métal catalyseur. Son déroulement se traduit par l'altération de la qualité du produit et, de détérioration cellulaire. Une fois les radicaux libres formés, ils réagissent en chaîne pour convertir le matériau en hydroperoxyde.

La chaîne se termine par des réactions de terminaison dans lesquelles les radicaux libres entrent en collision et combinent leurs électrons impairs pour former une nouvelle liaison (Cuvelier & Maillard, 2012).

Phase d'initiation : En présence d'un initiateur (l'oxygène singulet, le rayonnement, espèces activées de l'oxygène, ou de traces métalliques), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre (R^\bullet) (radical lipoxyle).



Phase de propagation : Le radical lipidique réagit avec l'oxygène en formant un radical peroxyde lipidique instable (ROO^\bullet) qui réagit avec une seconde molécule d'acide gras conduisant d'une part à un hydroperoxyde ($ROOH$) et d'autre part à un second radical libre (Réaction lente). Ce dernier réagit avec une autre molécule d'acide gras (propagation) et l'on aboutit à une suite de réactions radicalaires.



Phase de Terminaison : Cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite '**briseur de chaîne**'.



✚ *Photo-oxydation*

La photo-oxydation implique l'action de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), électrophile, directement sur la double liaison carbone-carbone. Il existe plusieurs sources d'oxygène singulet mais sa présence est souvent initiée dans les aliments par l'effet des UV sur des molécules photosensibles (riboflavine, chlorophylle, erythrosine) (Laguerre et al., 2007). L'oxydation par l'oxygène singulet n'implique pas la formation de radicaux lipidiques. Ainsi, les hydroperoxydes formés peuvent présenter à la fois des doubles liaisons non conjuguées et conjuguées, alors que la formation d'hydroperoxydes non conjugués n'est pas observée lors de l'auto-oxydation (Choe, 2017). Les mécanismes de décomposition des hydroperoxydes formés par photo-oxydation sont les mêmes que ceux rencontrés en auto-oxydation, mais les produits sont obtenus dans des proportions différentes. Néanmoins, dans les produits alimentaires, ce mécanisme semble mineur par rapport à l'auto-oxydation.

✚ *Oxydation enzymatique*

Les mécanismes de l'oxydation enzymatique sont sensiblement les mêmes que ceux rencontrés dans l'auto-oxydation. Ils mettent en jeu un enchaînement de réactions radicalaires, conduisant à la formation d'hydroperoxydes qui se décomposent par la suite. Les hydroperoxydes générés dépendent cependant de l'enzyme présente, dioxygénase à fer non hémique qui incorpore de manière régiospécifique et stéréospécifique le dioxygène sur le système pentadiénique (Min & Ahn, 2005)

VII.1.3. Les systèmes antioxydants

VII.1.3.1. Antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydantes sont préventives parce qu'elles agissent sur les espèces impliquées dans l'initiation de la chaîne de réactions des radicaux libres ; tandis que les molécules antioxydantes, telles que l'ascorbate, le tocophérol, l'ubiquinone, l'urée et le glutathion (GSH), sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire (Buettner & Jurkiewicz, 1993). De façon générale, les actions respectives des diverses enzymes antioxydantes ne sont pas du même ordre d'importance (Harris, 1992).

Le système enzymatique est constitué principalement de trois enzymes. Il s'agit du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

- ***Le superoxyde dismutase***

Comme l'indique son nom, le superoxyde dismutase (SOD), qui existe sous différentes formes, est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Il existe trois types de SOD : SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) (Levine & Kidd, 1996).

- ***La catalase***

Cette enzyme est contenue dans les peroxysomes. Elle existe en forte concentration dans le foie et les globules rouges.

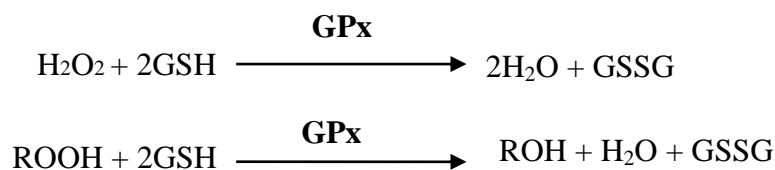
Au niveau sub-cellulaire, la catalase se retrouve dans le cytosol et dans les peroxysomes (Livingstone, 1993). Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :

Catalase

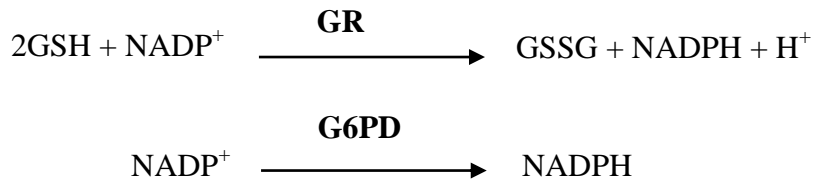


- ***Les glutathion peroxydases et réductases***

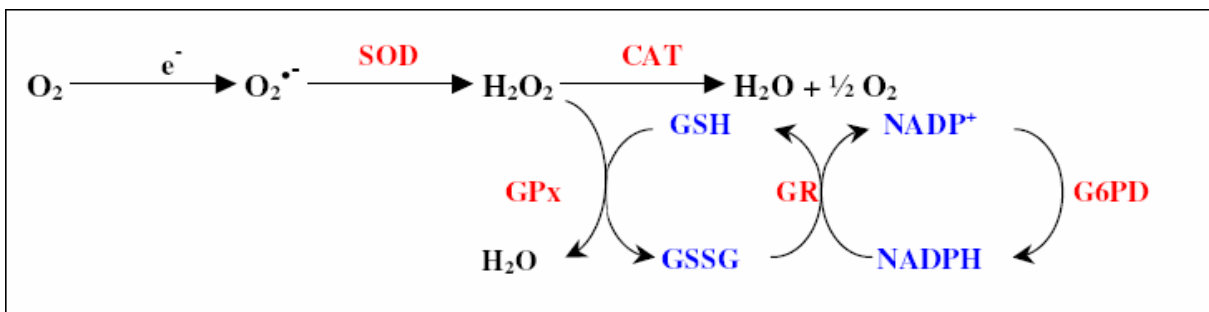
Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) :



La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH. Cette réaction produit du NADP⁺ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déhydrogénase) :



Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant :



Dans les cellules animales, ces trois enzymes (SOD, CAT et GPx) agissent de manière coordonnée, la SOD dismutant l'ion superoxyde pour donner du peroxyde d'hydrogène qui est lui-même détruit par la catalase et la glutathion peroxydase (Figure 13).

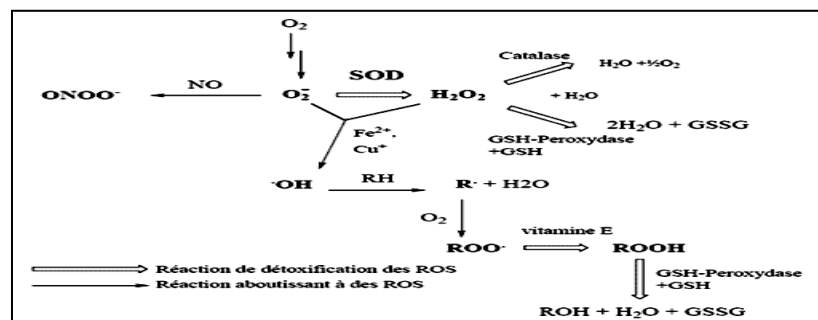


Figure 13: Production et neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

VII.1.3.2. Les antioxydants non enzymatiques

Un antioxydant est une substance ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air. Les molécules antioxydantes sont capables de retarder ou d'inhiber le processus d'oxydation (Halliwell & Gutteridge, 1990). Ce sont des molécules qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004).

Cette définition peut être élargie et le terme « antioxydant » englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des réactions qui engendrent une oxydation excessive (Krinsky, 1992).

Les antioxydants sont donc des molécules qui peuvent prévenir la formation des EOA, ou qui peuvent réagir avec ces derniers pour les neutraliser.

De nombreuses études tant épidémiologiques que cliniques indiquent que des personnes présentant des concentrations sanguines faibles en antioxydants sont plus risqués à développer des maladies cardiovasculaires que des sujets ayant un bilan antioxydant bien équilibré (Gey et al, 1993). L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer la conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une diminution de la valeur nutritionnelle (acides gras essentiels), une détérioration du goût (composés volatils à flaveur caractéristique, rancissement) et même parfois à l'apparition de substances toxiques (Pascal, 1979).

Les antioxydants sont classés dans deux catégories différentes. Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés au laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques. Les antioxydants synthétiques tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT) sont employés comme additifs alimentaires pour préserver la qualité organoleptique des produits alimentaires. Aujourd'hui, ces antioxydants suscitent la méfiance du grand public ce qui rend nécessaire un contrôle rigoureux de leur utilisation. De nouvelles recherches sont donc menées ces dernières années pour découvrir de nouveaux antioxydants d'origine naturelle. Les antioxydants naturels sont principalement des vitamines, des oligoéléments, des polyphénols, parmi lesquels on distingue :

Les vitamines

La vitamine C est hydrosoluble et grandement présente dans les fruits, les légumes et les pommes de terre. Elle contribue à neutraliser les radicaux libres au niveau du plasma sanguin et à l'intérieur des cellules. Elle peut aussi exercer une action pro-oxydante au travers son habilité à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}).

La vitamine E est un antioxydant essentiel qui protège les cellules contre les dégâts associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement. Elle s'incorpore facilement dans les membranes cellulaires et les protège contre la peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux peroxyde, alkyle et alcoxyde ($ROO\bullet$). Elle regroupe les tocophérols et les tocotriénols. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la vitamine E. Elle réagit directement sur les peroxydes ce qui conduit

à son oxydation en radical tocophéryle (Niki et al., 1985). Elle est essentiellement présente dans les huiles végétales, les oléagineuses ou certains fruits comme l'avocat.

Les composés phénoliques

Ce sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et on les trouve majoritairement dans notre alimentation et qui vont agir sur les radicaux libres. Ils constituent une famille de molécules hydrosolubles comme les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ces composés sont de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ce sont également de puissants chélateurs de métaux (Moridani et al., 2003). Le piégeage de radicaux libres se fait soit grâce au transfert d'atome d'hydrogène soit par le mécanisme de transfert d'électron.

Les oligoéléments

Les ions métalliques tels que le fer et le cuivre jouent un rôle très important dans la catalyse de réactions d'autoxydation. En effet, le départ de l'hydrogène lors de l'initiation primaire est facilité par la présence d'ions métalliques (Choe & Min, 2009). De plus, la décomposition des hydroperoxydes peut être catalysée par des métaux comme le fer et le cuivre sous leurs différentes valences (Choe & Min, 2009). Les métaux peuvent également accélérer l'oxydation des lipides en participant à la formation de certaines espèces oxygénées réactives (EOR) telles que l'oxygène singulet, des radicaux hydroxyles, des radicaux anioniques superoxydes, notamment via les réactions d'Haber-Weiss et de Fenton.

Les caroténoïdes

Il se trouve six caroténoïdes qui sont majoritaires : le β -carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptovamine, l' α -carotène, et la zéaxanthine. Le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. C'est un précurseur de la vitamine A, c'est-à-dire qu'il va être transformé en vitamine A par le foie. On le retrouve principalement dans les aliments d'origine végétale mais également les œufs et le beurre. Ils sont de puissants neutralisateurs de dérivés activés de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et les radicaux peroxydes.

Les lécithines

Les lécithines sont des lipides contenant du glycérol et de l'acide phosphorique. Elles sont présentes dans tous les tissus animaux et végétaux (très abondantes dans le cerveau et le jaune d'œuf). Ils agissent comme des antioxydants secondaires chélateurs de métaux, piégeant les métaux pro-oxydants (fer et cuivre). Ces composés sont souvent appelés synergistes et sont employés en combinaison avec les antioxydants primaires pour renforcer l'action de ces derniers.

✚ Peptides antioxydants issus de produits et coproduits marins

Les activités antioxydantes des peptides bioactifs sont principalement dues à la présence d'acides aminés hydrophobes et aromatiques.

Il a été démontré que ces peptides pouvaient agir en tant que piègeurs de radicaux libres, chélateurs de métaux ou bien sur la peroxydation des lipides. Tous les acides aminés peuvent généralement interagir avec les radicaux libres, et les plus efficaces sont ceux contenant des chaînes latérales nucléophiles soufrés (Cys et Met) ou des chaînes latérales aromatiques (Trp, Tyr et Phe), qui peuvent facilement donner des atomes d'hydrogène. Cependant, les peptides présentent une activité antioxydante supérieure à celle des acides aminés libres, en raison de leur composition chimique unique et leurs propriétés physiques (Elias et al., 2008). Ainsi, les hydrolysats de protéines possédant des propriétés antioxydantes, ont été préparés à partir de nombreuses sources et récemment à partir des produits de la mer (Ben Slama-Ben Salem et al., 2017; Ktari et al., 2017; Chel-Guerrero et al., 2020; Lassoued et al., 2021).

Un des premiers travaux démontrant l'activité antioxydante dans les produits de la mer, traite les hydrolysats des protéines myofibrillaires de la sardine qui a été publié en 1990 (Hatate et al., 1990).

Comme mentionné par Zhang et al. (2021), la nature antioxydante des hydrolysats de protéines de poissons est principalement dépendante de la taille et la composition en acides aminés des peptides, y compris la nature des groupements fonctionnels et l'équilibre hydrophile-hydrophobe. Le tableau 3 montre les activités antioxydantes de peptides isolés à partir de protéines d'origine marine.

Tableau 3: Peptides antioxydants isolés des hydrolysats de protéines d'origine marine

Source	Protéase	Séquence	CI ₅₀	Référence
Le Krill (<i>Euphausia superba</i>)	Pepsine Alcalase Papaine Trypsine Neutrase	Ser-Leu-Pro-Tyr Gln-Tyr-Pro-Pro-Met-Gln-Tyr Glu-Tyr-Glu-Ala	Activité anti-radicalaire de DPPH 1,18 ± 0,036 1,547 ± 0,150, 1,372 ± 0,274 mg/mL,	(Zhang et al., 2021)
Le muscle de la lotte (<i>Lophius litulon</i>)	Trypsine	Glu-Trp-Pro-Ala-Gln Phe-Leu-His-Arg-Pro Leu-Met-Gly-Gln-Trp	Activité du piégeage du radical hydroxyle : 0,269, 0,114, 0,040 mg/mL	(Chi et al, 2014)
Le muscle de maquereau (<i>Scomber japonicus</i>)	Protamex	Ala-Leu-Ser-Thr-Trp-Thr-Leu-Gln-Leu-Gly-Ser-Thr-Ser-Phe-Ala-Ser-Pro-Met, Ile-Ala-Asn-Leu-Ala-Ala-Thr-Asp-Ile-Ile-Phe	Test DPPH 36,34±4,64% 33,67 ± 4,95%	(Bashir et al, 2020)
Le muscle de paloude (<i>Tegillarca granosa</i>)	Neutrase	Trp-Pro-Pro	L'activité du piégeage du radical ABTS: CI ₅₀ = 2,75 mg/mL DPPH: CI ₅₀ = 1,388 mg/mL	(Chi et al, 2015)
Le muscle de l'emisolle (<i>Mustelus griseus</i>)	Papaine	Gly-Ala-Ala Gly-Phe-Val-Gly Gly-Ile-Ile-Ser-His-Arg Glu-Leu-Leu-Ile Lys-Phe-Pro-Glu	La capacité du piégeage du radical hydroxyle CI ₅₀ = 1,6337 mg/mL, 0,8944 mg/mL, 0,0769 mg/mL, 0,1173 mg/mL, 0,1510 mg/mL,	(Wang et al, 2014)
Le muscle de miu croaker (<i>Miichthys miiuy</i>)	Alcalase Trypsine Neutrase Papaine Pepsine	Phe-Trp-Lys-Val-Val Phe-Met-Pro-Leu-His	Activité anti-radicalaire du radical DPPH: CI ₅₀ =0,85 mg/mL, CI ₅₀ =0,48 mg/mL	(He et al, 2019)
Le muscle de scad rond (<i>Decapterus maruadsi</i>)	Alcalase	His-Asp-His-Pro-Val-Cys His-Glu-Lys-Val-Cys	Activité anti-radicalaire (DPPH): CI ₅₀ =0,031 mM CI ₅₀ =0,0677 mM	(Jiang et al, 2014)
Les coproduits de thon rouge (bluefin leatherjacket) : la tête	Papine	Trp-Glu-Gly-Pro-Lys, Gly-Pro-Pro, Gly-Val-Pro-Leu-Thr	Test DPPH CI ₅₀ =4,438 mg/mL CI ₅₀ =1,927 mg/mL CI ₅₀ =4,541 mg/mL	(Chi et al, 2015)

VII.2. Activité antibactérienne

VII.2.1. Structure des enveloppes bactériennes

- **La membrane**

Contrairement aux bactéries à Gram-positif, une membrane phospholipidique externe s'ajoute, en plus de la membrane cytoplasmique, pour les bactéries à Gram-négatif. Les phospholipides membranaires constituent entre 3 et 9 % du poids sec des bactéries à Gram-négatif (Raetz, 1978). Généralement, la phosphatidylethanolamine est le constituant majeur des phospholipides de la membrane extérieure des bactéries à Gram-négatif (exemples : *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, ...). Il constitue jusqu'à 90% de ces phospholipides. Par contre, le phosphatidylglycérol et le diphosphatidylglycérol (ou cardiolipine) se trouvent en quantités importantes dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram-positif.

- **La paroi**

La paroi est une structure rigide et résistante qui entoure la membrane cytoplasmique. Elle protège la bactérie et lui donne sa forme. La structure de la paroi des bactéries à Gram négatif diffère de celle des bactéries à Gram positif (**Figure 14**). Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est plus simple, il n'y a pas de membrane externe. Le peptidoglycane est épais de 10 à 80 nm et représente environ 40 % du poids sec. Il est associé aux acides téichoïques qui atteignent la surface externe et constituent des antigènes importants.

Chez les bactéries à Gram négatif, en plus du peptidoglycane, il existe une couche externe composée de protéines, de lipides et de lipopolysaccharides : c'est la membrane externe, son épaisseur est de l'ordre de 10 nm. Elle est riche en lipides (10 % à 20 %) et ne contient pas d'acides téichoïques. La couche de peptidoglycane est mince de 2 à 6 nm et représente moins de 10% du poids sec. La membrane externe est ancrée au peptidoglycane par l'intermédiaire de lipoprotéines et de la protéine OmpA. Elle est constituée d'une double couche phospholipidique dans laquelle flottent des lipopolysaccharides qui jouent un rôle important dans la pathogénicité des bactéries à Gram négatif et des protéines.

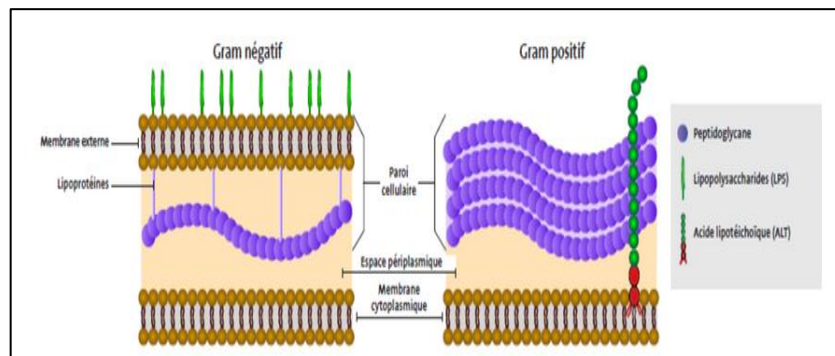


Figure 14: Structure de la paroi des bactéries à Gram-négatif et des bactéries à Gram-positif

VII.2.2. Intoxication alimentaire et importance des molécules antimicrobiennes

Les maladies d'origine alimentaire causées par des microorganismes constituent un dilemme majeur dans le tiers monde et les pays en développement, et même dans les pays développés. La consommation d'aliments contaminés par des microorganismes pathogènes représente un risque grave pour la santé des humains. Une intoxication alimentaire (ou toxoinfection alimentaire) est une infection digestive relativement courante. Elle est due à l'ingestion d'aliments contaminés ou de l'eau contenant des bactéries, de toxines bactériennes, des parasites (surtout dans l'eau, les fruits et les légumes), des virus (présents dans les produits agricoles et marins), des métaux lourds (plomb, cadmium et mercure) ou des produits chimiques. Les aliments qui sont le plus souvent impliqués dans les intoxications alimentaires sont l'eau non traitée, les aliments laissés longtemps sans réfrigération, les œufs, la viande, les

produits laitiers non pasteurisés (la pasteurisation est une technique de conservation), les charcuteries, certains poissons et les crevettes. Ces contaminations microbiologiques représentent des risques majeurs sur le plan sanitaire. Selon l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les maladies d'origine alimentaire bactérienne affectent chaque année 600 millions de personnes dans le monde, entraînant 420000 décès.

Cela a généré une demande croissante des consommateurs pour des aliments sains sans conservateurs chimiques. Les composés antimicrobiens naturels sont largement appliqués comme conservateurs alimentaires permettant d'inhiber la croissance bactérienne et améliorer la sécurité et la qualité microbiologiques et augmenter la durée de conservation des produits alimentaires (Meshginfar et al., 2016). De nombreux composés naturels suscitent un intérêt croissant de la part de chercheurs de l'industrie alimentaire en raison de leur rôle potentiel comme agents antimicrobiens (Maresca et al., 2017). L'utilisation des peptides antimicrobiens est une alternative prometteuse pour assurer la sécurité et la qualité des aliments.

VII.2.3. Les peptides antimicrobiens (PAMs)

Dans les années soixante-dix, des peptides présentant une activité antibactérienne furent découverts chez différents organismes (Csordas & Michl, 1970; Habermann, 1972; Fernandez de Caley et al., 1972). Ces découvertes ont déclenché un intérêt croissant pour isoler et identifier d'autres peptides antibactériens.

A ce jour, 3569 peptides (dont 308 bactériocines, 5 d'archées, 8 de protistes, 25 de champignons, 371 peptides d'origine végétale et 2600 d'origine animale) ont été identifiés et enregistrés dans la base de données des peptides antimicrobiens (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Les peptides antibactériens sont souvent des molécules amphiphiles contenant un nombre important de résidus arginine et/ou lysine dans leur séquence, leur permettant d'acquérir une charge globale positive et donc d'interagir avec les membranes des bactéries. Ils sont généralement constitués par un nombre de résidus d'acides aminés inférieur à 50 dont la majorité est des résidus hydrophobes. Ils sont caractérisés par leur capacité à augmenter la perméabilité ionique des membranes cellulaires (Toke, 2005).

Les peptides antibactériens peuvent être classés en deux catégories: ceux issus d'une synthèse non ribosomale, et ceux dit « naturels » obtenus d'une synthèse ribosomale (Hancock et Chapple, 1999). Les peptides antibactériens non ribosomals sont synthétisés au sein des complexes multienzymatiques. Ces systèmes sont présents, généralement, chez les

bactéries et les champignons. Les PAMs ribosomales sont issus de différents organismes (mammifères, plantes, insectes, amphibiens et bactéries).

Chez les organismes multicellulaires, ces peptides assurent la première ligne de défense de l'organisme, contre les agents pathogènes, où ils font partie intégrante du système immunitaire inné.

Certains peptides antibactériens sont issus par l'hydrolyse enzymatique de protéines. Au cours des années 1990, divers peptides à activité antibactérienne ont été mis en évidence dans des hydrolysats protéiques. Tomita et al. (1991), ont été les premiers à démontrer l'effet antimicrobien d'un hydrolysat pepsique de lactoferrine. Malkoski et al. (2001), ont identifié des peptides antibactériens à partir de l'hydrolysat enzymatique de la caséine. Plusieurs peptides antimicrobiens ont été isolés par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine (Froidevaux et al., en 2001 ; Nedjar et al., 2008 ; Yaba Adje et al., 2011 ; Mira et al., 2020).

Quelques exemples de peptides antibactériens connus d'origine animale et végétale sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: Peptides antibactériens isolés des hydrolysats d'origine animale et végétale

Source	Références
Poissons : <i>Barbus callensis</i> <i>Setipinna taty</i> <i>Engraulis japonicus</i> <i>Sardinella aurita</i>	Sila et al., 2014 Song et al., 2012 Tang et al., 2015 Jemil et al., 2017
Hémoglobine bovine	Froidevaux et al., 2001; Nedjar et al., 2008; Adje et al., 2011; Mira et al., 2020
Hémoglobine humaine	Mak et al., 2009; Deng et al., 2009;
Lactosérum	Tomita et al., 2002; Theolier et al., 2013;
Caséine animale	Baranyi et al., 2003; Cheng et al., 2013; Zhang et al., 2023
Caséine du lait maternel	Minervini et al., 2003
Gluten de blé	Gottardi et al., 2014; Sajjad et al., 2023
Sous-produits de crevette	Zhou et al., 2023
Crabe	Jian et al., 2018
Blanc d'oeuf	Carrillo et al., 2018
Plante	Tang et al., 2018

VII.2.3.1. Caractéristiques des peptides antimicrobiens

La classification des peptides antimicrobiens est extrêmement difficile à cause de leur grande diversité. Généralement, un peptide antimicrobien doit posséder plusieurs caractéristiques physico-chimiques pour interagir avec les membranes biologiques. La charge, la conformation, l'hydrophobicité et le caractère amphiphile de la séquence peptidique sont autant d'éléments influençant son action (Yeaman & Yount, 2003).

- ***Charge du peptide***

La charge du peptide antimicrobien est un élément essentiel de son activité. La majorité est cationique et présente une charge positive globale qui favorise des interactions électrostatiques entre les chaînes hydrophiles des peptides et les têtes polaires des phospholipides anioniques de la membrane bactérienne.

Selon le type de bactérie cible, cette fixation se fait grâce aux lipopolysaccharides (ou LPS) des bactéries à Gram-négatif par le biais de ses groupements phosphate ou par le peptidoglycane des bactéries à Gram-positif, par le biais d'acides lipoteichoïques présents à la surface.

L'augmentation de la charge pouvait améliorer l'activité antimicrobienne d'un peptide contre des pathogènes Gram positif ou Gram négatif, mais, au-delà d'une charge de +5, l'activité antimicrobienne diminue (Dathe et al., 2001). Pour des charges positives élevées, l'interaction du peptide avec les têtes polaires des membranes bactériennes devient trop importante, empêchant la translocation de la séquence à l'intérieur de la membrane (Akkam, 2016).

- ***Hydrophobicité***

L'hydrophobicité d'un peptide est définie comme le pourcentage de résidus hydrophobes dans sa séquence d'acides aminés. C'est une exigence essentielle à l'interaction avec les membranes peptidiques et à la perméabilisation membranaire. La plupart des peptides antimicrobiens contiennent entre 40 et 60% de résidus hydrophobes, alternés avec des domaines cationiques. La partie hydrophobe permet d'insérer le peptide au sein de la membrane, la déstabilisant et induisant la lyse de l'agent microbien par entrée d'eau, alors que la partie cationique permet de fixer le peptide aux têtes polaires des phospholipides des membranes (Hancock & Scott, 2000).

- ***Caractère amphiphile***

Tous les peptides antimicrobiens ont des groupements hydrophiles et hydrophobes, formant ainsi une structure amphiphile. La majorité des peptides antimicrobiens forment des structures amphipathiques à l'interaction avec les membranes cibles. L'augmentation du nombre d'hélices α peut engendrer une augmentation dans le caractère amphiphile, permettant l'augmentation de l'activité antimicrobienne (Yeaman & Yount, 2003).

- **Conformation du peptide**

L'organisation des peptides en structures secondaires, a une grande importance lors de l'interaction de la séquence peptidique avec la membrane microbienne. Les peptides antibactériens cationiques peuvent être classés en quatre grandes familles : les peptides en hélice α amphiphile, les peptides linéaires riches en acides aminés particuliers, les peptides antibactériens cycliques riches en ponts disulfures et, enfin, les petits peptides à structure dite «random coil».

- ✚ **Peptides antibactériens en hélice α**

Les peptides en hélice α sont présents chez de nombreux organismes comme l'homme, les insectes ou même les champignons (Powers & Yount, 2003). Ces peptides sont les plus étudiés en raison de leur structure et mode d'action relativement simples.

Ils sont généralement cationiques possédant 50% à 60% de résidus hydrophobes, leur taille est inférieure à 40 acides aminés et ne possèdent pas de résidu cystéine (Zasloff, 2002). Ces peptides linéaires adoptent une structure secondaire caractérisée par la présence d'une ou plusieurs hélices α amphiphiles, lors du contact avec la membrane des bactéries (Brogden, 2005) (**Figure 15**).



Figure 15: Structure secondaire d'un peptide antimicrobien en hélice α amphiphile (Powers & Hancock, 2003).

- ✚ **Peptides antibactériens linéaires non structurés riches en certains acides aminés**

Les peptides antimicrobiens riches en acides aminés particuliers comme l'histidine, la proline, l'arginine, la phénylalanine et le tryptophane (Powers & Hancock, 2003) n'adoptent pas de structure secondaire organisée en hélice α ou en feuillet β (**Figure 16**). Ces peptides possèdent un mécanisme d'action différent, ils agissent au niveau intracellulaire par l'inhibition de la synthèse des protéines chez les bactéries contrairement aux peptides organisés en hélice α qui induisent une perméabilisation de la membrane bactérienne (Andreu & Rivas, 1998).



Figure 16: Structure secondaire d'un peptide non structuré (Power & Hancock, 2003).

✚ Peptides antibactériens cycliques riches en ponts disulfures

Cette famille regroupe les peptides antibactériens qui contiennent des ponts disulfures intramoléculaires formés grâce à la présence de résidus cystéine ce qui entraîne la cyclisation partielle ou totale de la molécule (Andres and Dimarcq, 2007). Les défensines sont les plus représentatives de cette catégorie (Brogden, 2005). Les peptides antibactériens riches en cystéines sont classés en fonction du nombre de ponts disulfure, de leur forme et de leur origine (Dimarcq et al., 1998).

✚ Peptides antibactériens à structure «Random coil»

Les peptides à structure « random coil » sont des petits peptides (3 à 9 acides aminés), ils sont caractérisés par une charge globale positive et présentant peu de résidus hydrophobes, voire même aucun (Catiau et al., 2011; Nedjar-Arroume et al., 2008). Ces peptides antibactériens se structurent au contact de la membrane bactérienne (Powers & Hancock, 2003).

La néokyotorphine qui représente les cinq derniers acides aminés en C-terminal de la chaîne α de l'hémoglobine, est le peptide le plus représentatif de cette famille (Lopes et al., 2005).

VII.2.3.2. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens

Les caractéristiques des peptides antimicrobiens déterminant leur action sont la conformation, la charge et l'amphiphilie. Leur mécanisme d'action diffère selon le type de la cible microbienne (Gram positif ou Gram négatif). La plupart des peptides antimicrobiens agissent directement au niveau de la membrane bactérienne, provoquant sa déstabilisation puis la mort de la cellule par des phénomènes osmotiques. Certains, cependant, agissent par inhibition de mécanismes intra-cytoplasmiques comme l'inhibition de différentes voies de synthèses de protéines, de l'ADN et de l'ARN (Jenssen et al., 2006).

- **Mécanisme d'action des peptides déstabilisant la membrane cytoplasmique**

- ✚ **Le modèle en douve de tonneau (barrel-stave model)**

C'est le mode d'action des peptides antibactériens amphipathiques organisés en hélices α (Figure 17).

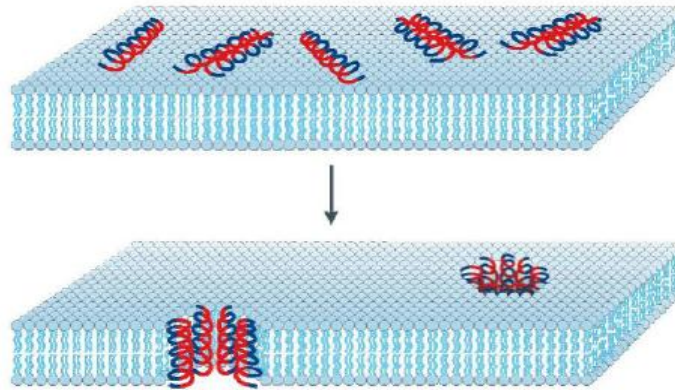


Figure 17: Représentation du modèle en douves de tonneau (Brogden, 2005)

Pour ce modèle, les résidus hydrophobes des peptides antibactériens interagissent avec les lipides de la membrane cellulaire alors que les régions peptidiques hydrophiles se tournent et pénètrent vers l'intérieur pour former un pore aqueux (Matsuzaki, 1998). L'introduction progressive de peptides au niveau de la membrane augmente la taille des pores. A travers ces canaux transmembranaires, une fuite du contenu cytoplasmique s'effectue induisant un déséquilibre osmotique ainsi que la mort de la bactérie.

- ✚ **Le modèle des pores toroïdaux (toroid pore model / Wormhole model)**

Pour ce modèle (Figure 18), les peptides antimicrobiens forment des structures amphiphiles au contact de la membrane, puis y enfouissent leur partie hydrophobe.

L'exposition de ces régions provoque un déplacement des têtes polaires des phospholipides, induisant une courbure de la membrane (Hirsh et al., 1996). Les peptides s'orientent ensuite de manière perpendiculaire à la membrane jusqu'à former un pore dont les parois sont constituées par les domaines hydrophiles des peptides et les phospholipides. Ceci contraste avec le modèle en douves de tonneau où l'intérieur du pore n'était formé que de la partie hydrophile des peptides antimicrobiens.

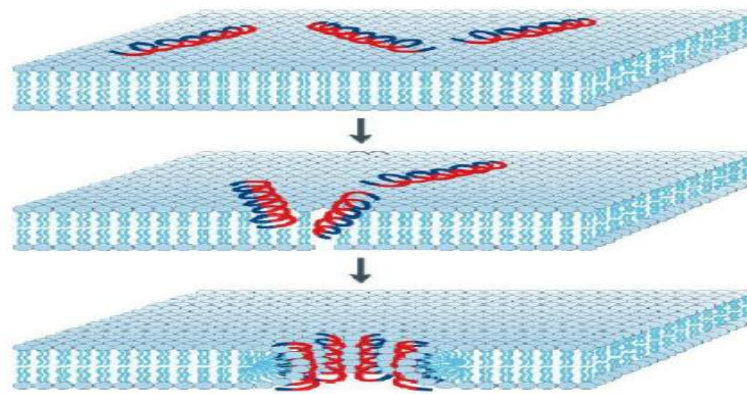


Figure 18: Modèle des "pores toroïdaux" (Brodgen, 2005)

✚ Le modèle en tapis (carpet mechanism)

Contrairement aux deux modèles précédents, les peptides antibactériens s'organisent parallèlement à la surface membranaire (Pouny et al., 1992). Cela se traduit par le fait que les peptides restent en contact avec les têtes polaires des lipides durant l'ensemble du processus de perméabilisation de la membrane (**Figure 19**).

L'accumulation des peptides à la surface de la membrane forment ainsi un tapis aboutissant à la perturbation de la fluidité membranaire et à sa rupture (Shai et al., 2002). Contrairement aux modèles en douves de tonneau et pores toroïdaux, les peptides ne s'insèrent pas dans la membrane et il n'est pas nécessaire que les peptides adoptent une structure en hélice α dans ce mode d'action.

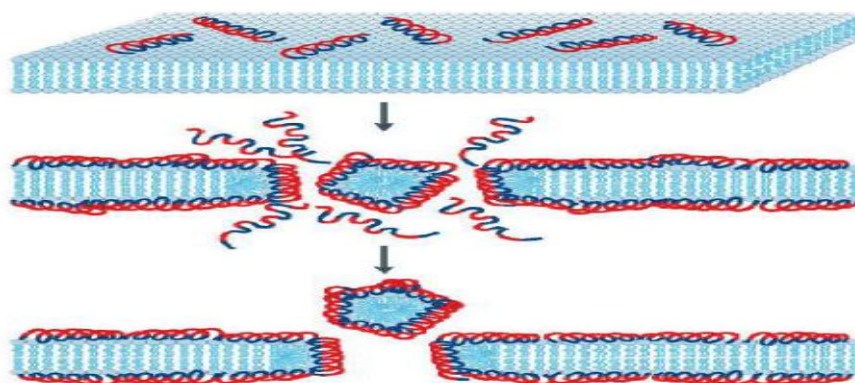


Figure 19: Modèle en tapis (Brodgen, 2005)

- **Mécanismes sans interaction avec la membrane cytoplasmique**

Les peptides antibactériens dépassent la membrane plasmique et inhibent différentes voies de synthèses au niveau intracytoplasmique menant à la mort cellulaire (Powers & Hancock, 2003 ; Jenssen et al., 2006).

Une fois à l'intérieur ces peptides peuvent agir sur des cibles intracellulaires spécifiques tels que la synthèse d'ADN, la synthèse de protéines, des activités enzymatiques, ou encore par des perturbations dans la formation des composants de la paroi (Cudi & Otvos, 2002).

VIII. Techniques d'analyse et de séparation des peptides

Les hydrolysats ont la particularité de présenter une richesse et une diversité de peptides aux paramètres physico-chimiques variés. Cependant, le nombre de peptides générés lors de la protéolyse engendre le fait qu'un ensemble de peptides puisse posséder des caractéristiques proches, rendant ainsi complexe l'extraction sélective et spécifique d'un seul d'entre eux. Souvent, l'enrichissement d'une fraction en un peptide particulier est privilégié à son isolement (Agyei & Danquah, 2011).

En outre, l'extraction et/ou la concentration en peptides d'intérêt est généralement nécessaire pour obtenir une bioactivité intéressante en vue d'une éventuelle valorisation applicative (Udenigwe & Aluko, 2012).

En se basant sur leur masse moléculaire, charge, solubilité et polarité, les peptides peuvent être séparés et purifiés. Les caractéristiques des peptides cibles aident à sélectionner l'une des méthodes communes de fractionnement et de purification de peptides et qui sont illustrées sur le tableau 5.

Tableau 5: Méthodes de fractionnement d'hydrolysats et critères de sélectivité mis à profit

Procédé	Critère sélectif	Masse moléculaire	Encombrement stérique	Charge	Hydrophobie
Chromatographie stérique	d'exclusion	+	+	-	-
Chromatographie d'échange d'ions		-	-	+	-
Extraction par solvant		-	-	-	+
Ultrafiltration		+	+	-	-
Electrodialyse		+	+	+	-
Chromatographie haute Performance (phase inverse)		+	-	-	+
Gel filtration		+	+	-	-

VIII.1. Fractionnement d'hydrolysats par extraction par solvant

Les procédés d'extraction liquide/liquide impliquent des systèmes basés sur l'affinité du soluté cible pour la phase réceptrice. Généralement, cette dernière est constituée d'un solvant

organique. L'utilisation de solvant en usage alimentaire est fortement découragée et pose aujourd'hui de véritables problèmes économiques.

VIII.2. Chromatographie gel filtration

La Chromatographie par filtration sur gel sépare les protéines, les peptides et les oligonucléotides en fonction de leur taille. En effet, les molécules se déplacent à travers un lit de billes poreuses, en diffusant à des degrés plus ou moins importants.

Les petites molécules diffusent plus loin dans les pores des billes, et par conséquent, se déplacent à travers le lit plus lentement, alors que les molécules trop grosses entrent moins ou pas du tout et se déplacent à travers le lit ainsi plus rapidement. Cette technique est employée pour analyser la distribution moléculaire.

Différentes natures de gels de filtration sont utilisées selon les applications souhaitées, à savoir les billes de sephadex (réticulation de dextrane), sephacryl, superdex (réticulation de dextrane et d'agarose), Sepharose (forte réticulation d'agarose), superose (réticulation d'agarose), ect. Dans cette approche, les hydrolysats protéiques sont divisés en différentes fractions en fonction de leur masse moléculaire et forme. La limitation qui existe dans cette méthode est l'incapacité de séparer les peptides de taille et de forme similaires.

VIII.3. Ultrafiltration

L'ultrafiltration (UF) est une technique baromembranaire basée sur la séparation des molécules selon leur taille et leur forme à travers une membrane sous une pression exercée par l'azote liquide. Les particules de haut poids moléculaires sont retenues tandis que les molécules de faible poids moléculaire passent à travers la membrane, comme illustré par la figure 20.

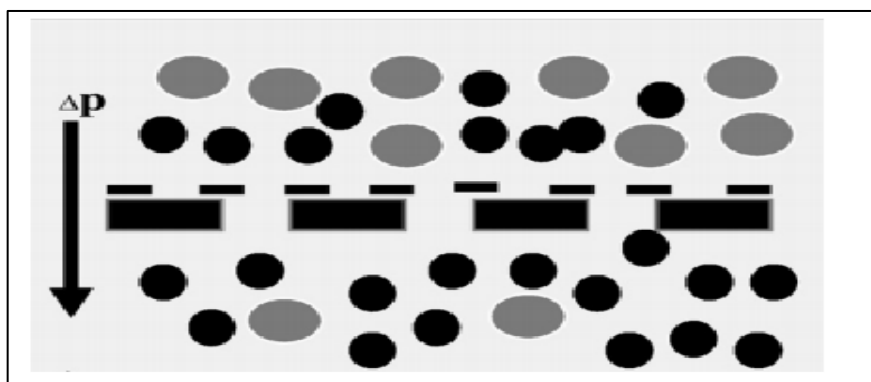


Figure 20: Principe de l'ultrafiltration (Saxena et al., 2009)

Contrairement à d'autres méthodes de fractionnement qui sont seulement efficaces à l'échelle du laboratoire, l'UF a été trouvée la plus adaptée pour la purification ou la

concentration de molécules à l'échelle industrielle, c'est principalement pour son faible coût d'utilisation et sa facilité de montée en échelle permettant ainsi la production commerciale d'un produit (Agyei et al., 2011). Les chercheurs ont également étudié la combinaison d'ultrafiltration avec d'autres technologies pour étendre son application. De nombreuses études qui visent l'obtention de fractions actives à partir d'hydrolysats et l'identification des peptides bioactifs font recours à la technique de l'ultrafiltration comme première étape de purification (Mirzapour-Kouhdasht et al., 2021; Nongonierma et al., 2013; Pezeshk et al., 2019).

Toutefois, la tendance au colmatage due au gradient de pression appliqué et à l'adsorption de protéines ou de peptides lors de l'opération de filtration est un inconvénient évident dans son application industrielle (Bazinet & Firdaous, 2013). De plus, son manque de sélectivité limite son application en interférant une ou plusieurs étapes de séparation supplémentaires pour obtenir des produits bioactifs directement exploitables (Agyei & Danquah, 2011).

Néanmoins, l'ultrafiltration reste bien considérée comme une méthode simple de concentration des protéines (Saxena et al., 2009).

VIII.4. Chromatographie échangeuse d'ions

Cette technique permet de séparer les peptides qui ont une masse moléculaire similaire mais avec des charges différentes. Elle dépend de la liaison compétitive réversible qui existe entre les peptides et le support de la colonne (Sivasankar, 2005). Le principe de cette méthode est basé sur le pH et la force ioniques du tampon d'élution. La chromatographie échangeuse d'ions trouve de nombreuses applications dans la séparation et la purification des fractions peptidiques. L'inconvénient de cette technique est la contamination des fractions de peptides avec le sel utilisé pour l'élution, en particulier pour les peptides (< 1kDa) dont la taille est proche du sel

VIII.5. Chromatographie liquide à haute pression à phase reverse (RP-HPLC)

La HPLC est une méthode analytique qui sépare les molécules en fonction de l'hydrophobicité et préparatrice des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Il existe deux types de colonnes qui peuvent être employés dans cette technique chromatographique. Comme son nom l'indique, la phase mobile est liquide et non gazeuse comme dans le type de chromatographie qui vient d'être décrit.

Cela dit, le principe de la séparation reste le même, à savoir le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases stationnaires et mobiles. Il existe deux possibilités : soit la phase stationnaire est polaire (on parle de HPLC en phase normale) soit elle est apolaire (on parle de HPLC en phase inverse ou RP-HPLC pour Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography).

La RP-HPLC est l'une des méthodes indispensables pour la purification des peptides. Elle est caractérisée par une haute résolution et permet la récupération des peptides avec des structures différentes ou qui sont étroitement apparentés (Aguilar, 2004).

Le principe de la RP-HPLC est basée sur la séparation des différents composés dans une colonne remplie de silice greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18) élués par un gradient de phase liquide (solvant). L'élution de l'échantillon se fait sous pression croissante afin de diminuer le temps nécessaire pour la séparation. Plusieurs travaux ont recours à cette technique pour la séparation des peptides des hydrolysats de la raie bouclée (Lassoued et al., 2015), des hydrolysats protéiques de l'hémoglobine bovine (Mira et al., 2020) et de l'hydrolysat protéique de riz (Chen et al., 2023).

La RP-HPLC est couramment utilisée comme dernière étape de purification avant l'identification de peptides. Elle permet ainsi d'évaluer le degré de pureté des fractions récupérées. Elle est également utilisée en tandem avec la spectrométrie de masse pour identifier la séquence des peptides bioactifs.

VIII.6. Analyse par spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS)

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique (De Graeve et al., 1986). Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) électriquement. La spectrométrie de masse comporte une source d'ionisation va permettre d'ioniser les molécules contenues au sein de l'échantillon à analyser, suivie d'un analyseur de type triple quadripôle, donnant la dénomination de « spectromètre de masse en tandem, qui permet, par le biais de deux des quadripôles, de déterminer les différents m/z présents dans l'échantillon et, par le biais d'un troisième, de déterminer la composition du peptide analysé en le fragmentant. En effet, un peptide donné aura un m/z précis dans le premier quadripôle, déterminant de l'ion parent. Dans le second, ou « cellule de collision », l'ion parent sera fragmenté en des ions de plus petites tailles.

Ces ions fragments seront alors analysés dans le troisième quadripôle et leurs différents m/z seront déterminés.

Matériels & Méthodes

I. Elaboration des hydrolysats protéiques du muscle de pataclet

I.1. Matériels biologiques : Pataclet (*Diplodus annularis*)

Le pataclet est obtenu dans des conditions fraîches du marché de poisson de Sfax. Suite à l'étape de collecte, on sépare le muscle des coproduits (viscères, carapace, tête), par la suite il est lavé à l'eau de robinet et puis conservé à -20 °C. Les matières actives extraites du muscle de pataclet sont les hydrolysats protéiques.

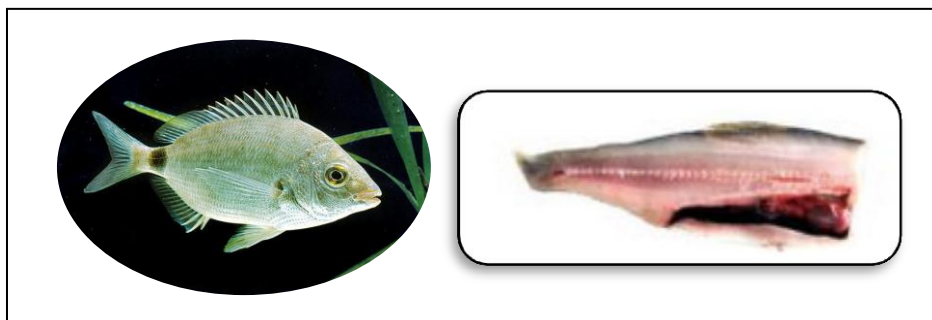


Figure 21: Le poisson *Diplodus annularis* et son muscle

I.2. Matériels enzymatiques

✚ Alcalase

L'Alcalase 2.4.L (EC 3.4.21.62) fournie par Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) est produite par fermentation à partir d'une souche sélectionnée de la bactérie *Bacillus licheniformis*. La fermentation est orientée pour produire essentiellement une protéase alcaline de type sérine dont le principal constituant enzymatique est la Subtilisine A. Cette sérine endoprotéase hydrolyse les liaisons peptidiques internes. En plus de son activité endopeptidasique, elle permet également l'hydrolyse des aminoesters.

Les conditions optimales préconisées par le fournisseur pour l'utilisation de l'Alcalase 2.4.L sont : une température comprise entre 50 et 60°C et un pH compris entre 7 et 10.

✚ Savinase

Savinase est une endoprotéase de type sérine de la famille des subtilisines de *Bacillus lentus*. Elle possède une très large spécificité de substrat. Elle peut hydrolyser la plupart des liaisons peptidiques au sein d'une molécule de protéine. Les conditions optimales pour l'utilisation de Savinase sont : une température comprise entre 30 et 70°C et un pH compris entre 8 et 10.

I.3. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est mesurée en se basant sur la méthode décrite par Kembhavi et al. (1993) en utilisant la caséine comme substrat. Une aliquote de l'extrait enzymatique (0,5 mL), convenablement diluée, est mélangée avec 0,5 mL de 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) contenant 1% (w/v) de caséine. Après incubation pendant 15 min à 50 °C, la réaction est arrêtée par addition de 0,5 ml d'acide trichloracétique TCA 20% (w/v). Le mélange est laissé au repos à température ambiante pendant 15 min et ensuite centrifugé à 8000 ×g pendant 15 min pour éliminer le précipité. La matière soluble dans l'acide est estimée par spectrophotométrie à 280 nm. Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/min dans les conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (0-100 µg/mL) de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions. 1 µg/mL de tyrosine correspond à une DO 280 nm de 0,0055.

$$\text{Activité (U/mL)} = \frac{\text{DO } 280 \text{ nm} \times F \times 3}{0,0055 \times T}$$

Avec, F : facteur de dilution
T : temps de la réaction min

I.4. Procédés de production d'hydrolysats

Les hydrolysats ont été préparés moyennant deux activités protéolytiques de deux endoprotéases à sérine différentes (Savinase et Alcalase). En effet, l'hydrolyse est réalisée dans un réacteur agité de 300 ml, dont le principe est basé sur le maintien d'un pH constant par l'ajout d'une solution de soude afin de neutraliser les ions de H⁺ ou OH⁻ libérés lors de la coupure des liaisons peptidiques au cours de l'hydrolyse. Le pH et la température sont ajustés suivant les conditions optimales d'action des enzymes utilisées : Savinase® (9.0, 50 °C) et Alcalase® (8.0, 50°C). Pour préparer les hydrolysats protéiques du muscle de pataclet, 500 g de muscle de pataclet haché à l'aide d'un broyeur sont homogénéisés avec 1000 mL d'eau distillée. Le mélange est ensuite chauffé à 90 °C pendant 20 minutes, afin d'inactiver les enzymes endogènes, puis homogénéisé pendant 2 minutes avec un homogénéiseur (KEENWOOD). L'homogénat du muscle est maintenu sous agitation dans un réacteur thermostaté jusqu'à stabilisation du pH désiré par l'ajout d'une solution de NaOH 4 N. Pour initier les réactions d'hydrolyse, les protéases sont ajoutées au mélange avec un rapport enzyme/substrat de 3 U/mg de protéine tout en maintenant l'homogénat au pH désiré. La quantité de base consommée permet de calculer le degré d'hydrolyse. Après le temps de l'hydrolyse requis, la réaction enzymatique est arrêtée par inactivation thermique à 80 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, le surnageant, contenant les hydrolysats solubles,

est récupéré suite à une centrifugation pendant 20 min à 8000 rpm et séché par lyophilisation à une température de -46 °C (**Figure 22**).

Le muscle de pataclet non hydrolysé est préparé suivant les mêmes étapes que l'hydrolysate protéique mais sans ajout d'enzyme. Afin de suivre l'évolution des réactions d'hydrolyse, le degré d'hydrolyse (DH) de chaque réaction est déterminé. Le DH est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées sur le nombre de liaisons peptidiques totales. Cette méthode permet d'estimer le DH en se basant sur la consommation de base afin de maintenir le pH constant à la valeur désirée. La valeur du DH peut être déterminée selon l'équation suivante décrite par Adler-Nissen (1986) :

$$DH = (B \times NB) / (MP \times \alpha \times h_{tot}) \times 100$$

Avec B : volume de NaOH ajouté (mL).

NB : normalité de la soude (M).

α : degré moyen de dissociation des groupes alpha aminés

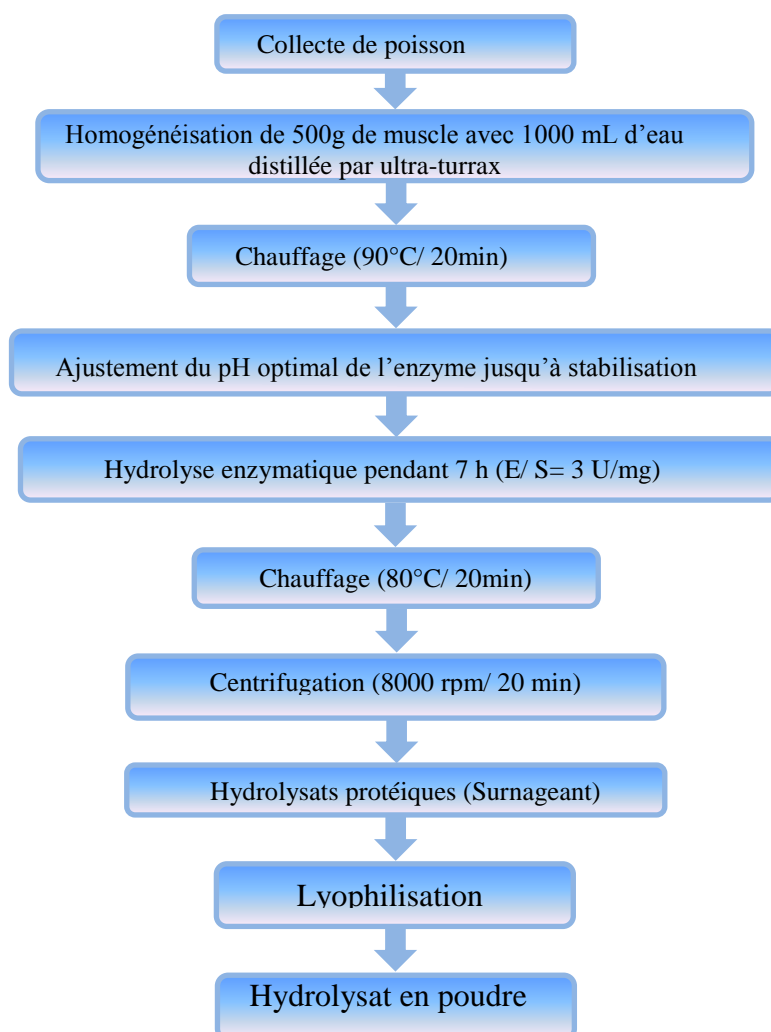


Figure 22: Préparation des hydrolysats de protéines à partir de muscle de *Diplodus annularis*

Les rendements massiques des hydrolysats générés sont calculés par rapport à la matière première de départ :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de la poudre lyophilisée (g)}}{\text{Masse de la première fraîche (g)}} \times 100$$

II. Analyse physico-chimique

II.1. Détermination de la matière sèche

La teneur en matière sèche du MPNH (muscle frais) et des deux hydrolysats peptidiques (HPPs) est déterminée selon la méthode décrite par AOAC (2000). Un gramme de chaque échantillon est séché en duplicata dans un creuset en porcelaine, préalablement lavé, séché et taré, à 105 °C jusqu'à une masse constante. Après refroidissement de l'échantillon dans le dessiccateur, le creuset est de nouveau pesé. La différence de masse entre le creuset contenant la matière sèche et le creuset vide constitue le poids sec.

II.2. Détermination des cendres

La teneur en cendres est déterminée en calcinant en duplicata un gramme du MPNH ou des HPPs pendant 4 h à 500 °C jusqu'à obtenir un poids constant (AOAC, 2000).

Après refroidissement de l'échantillon (MPNH, HPP-S et HPP-AL) calciné dans le dessiccateur, le creuset est de nouveau pesé avec la balance de précision. La différence de poids entre le creuset contenant la matière sèche et le creuset vide constitue le poids sec.

II.3. Détermination de la composition en acides aminés

La composition en acides aminés dans le MPNH ainsi que les HPPs est déterminée par une chromatographie phase liquide à haute performance (RP-HPLC), équipée d'un détecteur à fluorescence. Les deux hydrolysats et le muscle non hydrolysé de pataclet subissent, en premier lieu, une hydrolyse acide totale par une solution de HCl 6 M à 110°C pendant 24h. Après refroidissement, les différentes solutions sont neutralisées par un même volume de NaOH 6 M. Les acides aminés libérés sont filtrés à l'aide d'un filtre à seringue (diamètre de pores 0,2 µm). Concernant l'extraction de tryptophane, à 0,2 mg de chaque échantillon (MPNH, HPP-S, HPP-AL), on ajoute 3 mL d'acide ascorbique 95 mM dans de l'hydroxyde de lithium 4 M fraîchement préparé. Le mélange est ensuite incubé pendant 16h à 110°C. Après refroidissement, on ajoute 2 mL d'acide chlorhydrique 6 M. Le volume obtenu est homogénéisé et filtré.

Par la suite, un volume de 500 μL de chaque solution (la solution d'extraction des acides aminés totaux et la solution de l'extraction de tryptophane) est mélangé avec 500 μL du tampon borate puis additionné par 100 μL ortho-phthalaldehyde (OPA) et 100 μL de 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc) dans un tube eppendorf. Le mélange est homogénéisé, puis filtré à l'aide d'un filtre à seringue de 0,2 μm . A ce stade, les échantillons sont prêts à l'analyse par RP-HPLC.

Le produit obtenu est ensuite analysé par RP-HPLC sur une colonne Zorbax Eclipse Plus C18. L'élution se fait par un mélange de deux solvants : solvant A (solution sodium phosphate monobasic NaH_2PO_4 (40 mM) avec une solution NaOH) et solvant B (mélange acétonitrile/méthanol/eau). Les spectres d'élutions obtenus sont analysés par le logiciel Millennium. Les acides aminés sont repérés par leur temps de rétention, grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec des AA standards. L'intégration des aires mesurées pour chaque acide aminé est réalisée afin de déterminer les teneurs en acides aminés qui sont exprimés en pourcentage.

II.4. Détermination de la teneur en protéines

II.4.1. Méthode de Lowry

La détermination du taux des protéines solubles des hydrolysats et de muscle non hydrolysé est déterminée suivant la méthode développée par Lowry et al. (1951). Cette technique est basée, en premier lieu, sur un prétraitement des solutions protéiques diluées par une solution de Lowry « cupro-alkaline ». Le complexe formé entre le cuivre Cu^{2+} et le groupe aminé des liaisons peptidiques est de couleur bleu-violette. Ensuite, les acides aminés aromatiques des protéines prétraitées réduisent le phosphomolybdate-acide phosphotungstique du réactif de Folin, donnant une coloration bleu foncée. Ainsi, la quantité de protéines totales est estimée par la mesure de la densité optique à 750 nm. A 100 μL d'échantillon, on ajoute 1 ml de la solution de Lowry (Na_2CO_3 2% dissoute dans du NaOH 1 N ; CuSO_4 1% ; tartrate double de Na et K 2%, avec un ratio volumique (50:1:1)) et 100 μL de réactif de Folin dilué 2 fois (conservé à 4 °C à l'obscurité). Après agitation au vortex et incubation à l'obscurité pendant 30 min, on mesure la densité optique à 750 nm. Une courbe d'étalonnage est dressée par des concentrations croissantes de sérum d'albumine bovine (SAB).

II.4.2. Méthode de Kjeldahl

La teneur en azote total (NT) et en azote non protéique (NPN) (précipitation au TCA à 12% de solution finale) a été obtenue par la méthode de kjeldahl. C'est une méthode de référence pour la détermination des teneurs en protéines dans les produits alimentaires. Dans un premier temps, il faut procéder par une minéralisation de l'azote organique en présence d'un catalyseur (CuSO₄ et K₂SO₄ (w/w) (1:10)) par l'acide sulfurique concentré à chaud. Le produit de la minéralisation (ammonium) est par la suite distillé par la soude (10 M) pour le transformer en hydroxyde d'ammoniac. Ce dernier est condensé et recueillie dans une solution d'acide borique concentrée, du rouge de méthyle et du bleu de bromothymol. La titration du NH₃ est effectuée, ultérieurement, par une solution d'acide sulfurique (0,05 M) (AOAC, 2000). La quantité d'azote est calculée par la formule suivante :

$$\text{Quantité d'azote} = N \times V \times 14/p$$

Avec : V = Volume de l'acide sulfurique 0,05 M (mL) ; M= Titre de la solution de l'acide sulfurique 0,05 M ; V= Poids (ou volume) de l'échantillon analysé en mg (ou en mL). La teneur en protéines est donnée par la formule suivante:

$$(NT-NPN) \times 6,25$$

II.5. Détermination de la matière grasse

L'extraction de la matière grasse contenue dans les hydrolysats peptidiques et le muscle non hydrolysé a été réalisée par la méthode de Soxhlet décrite par AOAC (2000), en utilisant l'hexane comme solvant organique. Le principe de cette méthode consiste à extraire la matière grasse jusqu'à épuisement avec du solvant organique qui entraîne les lipides. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation et ne reste qu'un résidu qui représente les lipides. La teneur en matière grasse est déterminée par différence de poids entre le ballon contenant les lipides et le ballon vide.

III. Techniques chromatographiques appliquées aux échantillons des hydrolysats peptidiques

III.1. Analyse par Chromatographie liquide à haute-performance (HPLC)

Le système de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) se compose d'une pompe binaire (G7120A), d'un échantillonneur multiple (G7167B),

d'un dégazeur en ligne et d'un détecteur à longueur d'onde variable (VWDG7114B) réglé sur 214 nm.

Tous les processus chromatographiques ont été réalisés avec une colonne C18 (150×2,6 mm). Chaque hydrolysats (10 mg/mL) est filtré à travers des filtres en difluorure de polyvinylidène de 0,22 µm afin d'éliminer toute particule éventuelle, puis injecté. Le volume d'injection est de 10 µL et le débit de 0,3 mL/min. La colonne est équilibrée avec le solvant A (eau ultrapure + 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA)) et les peptides ont été élués avec un solvant B (Acétonitrile + 0,1% d'acide trifluoroacétique) de 5% en 5 min, à 60% en 40 min et à 95% en 47 min, puis revenant aux conditions initiales.

III.2. Fractionnement de l'hydrolysats peptidique par HPLC préparative

Dans la mesure où notre étude est basée sur l'évaluation de l'activité des hydrolysats peptidiques, c'est donc l'hydrolysats généré avec l'enzyme savinase présentant la meilleure activité qui nous a intéressé. 25 mg de l'hydrolysats lyophilisé ont été mis en suspension dans 1 mL d'eau ultrapure puis filtrés par des filtres en difluorure de polyvinylidène (PVDF) de 0,22 µm. Le fractionnement des extraits peptidiques obtenus à partir des hydrolysats est réalisé sur une colonne semi-préparative C18 (250 mm x 21,2 mm). Les peptides ont été élués avec l'éluant A (eau ultra pure + 0,1% TFA) et l'éluant B (acétonitrile + 0,1% TFA) avec l'éluant B passant de 5% en 5 min à 60% en 40 min et à 95% en 47 min, puis revenant aux conditions initiales. La séparation a été effectuée à 23°C avec un débit de 15 mL/min. La détection des peptides a été suivie à 214 nm. Plusieurs fractions peptidiques (dix fractions) ont été collectées manuellement à 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 et 50 min, respectivement. Après 10 injections, les fractions ont été rassemblées puis évaporées au speed vac et stockées à -20°C.

III.3. Analyse des peptides par couplage UPLC-MS/MS

Les hydrolysats et les fractions collectées après séparation par RP-HPLC de l'hydrolysats HPP-S ont été analysés par spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF) après séparation par HPLC. Les fractions collectées de l'hydrolysats HPP-S, à une concentration de 10 mg/mL, ont été centrifugées pendant 10 min à 8 000 g et le volume d'injection est de 10 µL. La séparation chromatographique des peptides a été réalisée en utilisant le système ACQUITY UPLC (Waters Corporation, France) à l'aide d'une colonne C18 AQ (150 × 3,0 mm, 2,6 µm, Uptisphere CS EVOLUTION, Interchim, France) maintenue à une température

de 30°C. Les phases mobiles sont constituées du solvant A (TFA à 0,1% (v/v)/eau à 99,9% (v/v)) et du solvant B (TFA à 0,1% (v/v)/acétonitrile à 99,9% (v/v)).

Le gradient d'ACN (débit 0,5 mL/min) est le suivant : 1 % de solvant B pendant 3 min, de 1% à 30% de solvant B en 42 min suivi de procédures de lavage et d'équilibrage avec 95% et 1% de solvant B pendant 5 min chacun, respectivement.

L'éluat a été dirigé dans la source d'ionisation par électrospray du q TOF Synapt G2-Si™ (Waters Corporation, Manchester, UK) préalablement calibré à l'aide d'une solution de formiate de sodium. La température de la source a été fixée à 150°C et la tension du capillaire et du cône a été fixée à 3 000 et 60 V. Les données MS ont été recueillies pour des valeurs m/z comprises entre 50 et 2 000 Da avec un temps de balayage de 0,2 s. Un maximum de 10 ions précurseurs ont été choisis pour l'analyse MS/MS avec un seuil d'intensité de 10 000. Les données MS/MS ont été collectées avec un mode de fragmentation CID et un temps de balayage de 0,1 s avec des tensions spécifiques allant de 8 à 9 V et de 40 à 90 V pour les ions de masse moléculaire inférieure et supérieure, respectivement. La leucine + enképhaline ([M + H]⁺ de 556,632) a été injectée dans le système toutes les 2 min pour suivre et corriger l'erreur de mesure pendant tout le temps de l'analyse. Le traitement des données a été réalisé en utilisant le logiciel MassLynx (Waters).

Des recherches dans les bases de données ont été effectuées dans les bases de données UniProt restreintes aux Sparidae via PEAKS® Studio 10.6 XPro (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada). Une tolérance de masse de 35 ppm et une tolérance MS/MS de 0,2 Da étaient autorisées. La pertinence des identités protéiques et peptidiques a été jugée selon leur score dans le logiciel de recherche (p-value de 0,05 (p<0,05) et un taux de fausse découverte < 1%).

IV. Etude des propriétés fonctionnelles des hydrolysats peptidiques

IV.1. Solubilité

La solubilité des HPPs et de MPNH est déterminée selon le protocole décrit par Tsumura et al. (2005). Une quantité de 1 g de chaque échantillon est mise en suspension dans 100 mL de H₂O, puis homogénéisé pendant 10 min. Le pH est ajusté de 2,0 à 12,0 avec des solutions de HCl (2 mM) ou NaOH (2 mM). Le mélange est ensuite centrifugé à 8000 rpm pendant 10 min (centrifugeuse MPW-350 R). Après préparation des dilutions appropriées, la teneur en protéines dans le surnageant est mesurée par la méthode de Lowry. (1951). La

solubilité est exprimée en gramme de protéines solubles par 100 grammes de protéines dans l'échantillon.

IV.2. Capacité émulsifiante et stabilité de l'émulsion

La capacité émulsifiante du HPPs et du MPNH est déterminée selon la méthode décrite par Pearce & Kinsella (1978) avec quelques modifications. Dix millilitres d'huile de maïs sont mélangés avec 30 ml de la solution protéique à différentes concentrations puis homogénéisés avec un à l'aide d'un vortex mixeur pendant 3 min à température ambiante. On prélève ensuite 50 μ L de l'émulsion du fond du tube à l'instant $t = 0$ min et après 10 min d'homogénéisation, on ajoute 5 ml de SDS 0,1% et enfin on mesure l'absorbance à 500 nm. A_0 et A_{10} sont les DOs à $t = 0$ min et $t=10$ min. Les indices d'activités émulsifiantes (IAE) et l'indice de stabilité de l'émulsion (ISE) sont calculés selon les formules suivantes :

$$EAI (m^2/g) = [2 \times 2,303 \times A_{500}] / [0,25 \times \text{poids de protéine en g}]$$

$$ESI (\text{min}) = A_0 \times [\Delta_T / \Delta_A], \text{ avec } \Delta_A = A_0 - A_{10} \text{ et } \Delta_T = 10 \text{ min.}$$

IV.3. Capacité moussante (CM) et stabilité de la mousse (SM)

Le pouvoir moussant et la stabilité de la mousse du MPNH et du HPPs sont calculés et testés selon la méthode rapportée par Shahidi et al. (1995), avec quelques modifications. Une quantité de 3 g d'échantillon est solubilisée dans 100 mL d'eau distillée puis homogénéisée avec Ultraturrax (IKA T18 basic, Wilmington, USA) pendant 3 min. Le volume obtenu est immédiatement mis dans un cylindre de 250 mL. Le volume est mesuré à $t= 0$ s. Le pouvoir moussant est exprimé comme étant le pourcentage de l'augmentation du volume. La stabilité de la mousse est déterminée après 30 min d'homogénéisation en mesurant le volume de la mousse.

$$CM \% = \frac{V_1 - V_0}{V_0} * 100$$

$$SM (\%) = \frac{V_2 - V_0}{V_0} * 100$$

Avec V_0 : volume initial de l'échantillon ; V_1 : volume de l'échantillon après homogénéisation ; V_2 : volume de l'échantillon après 30 min.

IV.4. Capacité de rétention de l'eau et de l'huile

La capacité de rétention d'eau (CRE) et d'huile (CRH) du HPPs et du MPNH est déterminée selon la méthode décrite par Lin et al. (1974). En effet, 100 mg d'échantillon est

solubilisé dans 10 mL d'eau distillée ou d'huile, homogénéisés puis centrifugés à 2500×g pendant 30 min.

Le surnageant (l'huile ou l'eau) est décanté et le volume absorbé est déterminé. La capacité de rétention d'eau et d'huile est exprimée en millilitres d'eau ou d'huile absorbés par 1 gramme d'échantillon.

$$\text{CRE ou CRH} = (\text{volume d'eau ou d'huile absorbé/masse de l'échantillon (g)}) \times 100$$

V. Evaluation des activités biologiques

V.1. Evaluation des activités antioxydantes

V.1.1. Activité anti-radicalaire : test au DPPH

Le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) a été réalisé selon la méthode reportée par Bersuder et al. (1998). Ce test a pour but d'évaluer la capacité de MPNH et des HPPs à céder un atome d'hydrogène afin de stabiliser le DPPH, qui est un radical libre stable possédant une coloration violette foncée qui devient jaune pâle après réduction. Dans des tubes à essai, 500 µL de chaque échantillon à différentes concentrations (1 à 5 mg/mL) sont mélangés avec 500 µL d'éthanol (99,5%) et 125 µL d'éthanol (99,5%) contenant 0,02% (DPPH). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 60 min à température ambiante puis l'absorbance est lue à 517 nm. Le BHA est utilisé comme témoin positif. Le calcul de l'activité antiradicalaire est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition du DPPH (\%)} = (C + B - E)/C \times 100$$

Avec,

C : l'absorbance du contrôle, 500 µL solvant d'extraction + 375 µL éthanol + 125 µL DPPH.

B : l'absorbance du blanc, 500 µL échantillon + 500 µL éthanol.

E : l'absorbance de l'échantillon, 500 µL échantillon + 375 µL éthanol + 125 µL DPPH.

La valeur CI_{50} a été déterminée pour chaque échantillon. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la neutralisation de 50% des radicaux DPPH.

V.1.2. Test du pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur est également étudié. Dans ce test, les échantillons réduisent les ions ferricyanures de potassium $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ en ferrocyanures de potassium $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ qui vont réagir par la suite avec les ions Fe^{3+} pour donner le bleu de Prusse qui est le

ferrocyanure ferrique. L'intensité du complexe bleu augmente avec le pouvoir des hydrolysats peptidiques à céder un électron ou un hydrogène.

L'habilité des hydrolysats peptidiques HPPs, du MPNH et du BHA à réduire les ions Fe^{3+} est examinée par la méthode décrite par Yildirim et al, (2001). Cette technique permet de suivre la capacité d'une molécule antioxydante à réduire le fer ferrique du $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}).

Dans un tube sec, 1 mL de chaque échantillon ou du BHA à des concentrations variables de (de 1 à 5 mg/mL) est mélangé avec 1,25 mL de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 g/L). Le mélange est par la suite incubé pendant 30 min à 50 °C. Après refroidissement du mélange à température ambiante, un volume de 1,25 ml d'acide trichloro-acétique (TCA) (100 g/L) est additionné pour arrêter la réaction. Les tubes sont centrifugés à 8500 rpm pendant 10 min. Après centrifugation, 1,25 ml du surnageant est mélangé avec 1,25 mL d'eau distillée et 0,25 ml d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) (0,1%). Après une incubation de 10 min, l'absorbance est lue à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le BHA est utilisé comme témoin positif. Une meilleure absorbance indique une meilleure réduction du fer.

V.1.3. Pouvoir chélateur des métaux

Le pouvoir chélateur de l'ion Fe^{2+} des hydrolysats et du muscle non hydrolysé est mesuré selon la méthode de Decker & Welch (1990) qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe (II)-Ferrosine après l'ajout des échantillons aux ions Fe^{2+} . L'EDTA est utilisé comme standard dans les mêmes conditions. Un volume de 100 μL de chaque échantillon à différentes concentrations est additionné à 50 μL de FeCl_2 (2 mM) et 450 μL d'eau distillée. Après 3 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, 200 μL de ferrosine (5 mM) est ajouté et le mélange est agité et incubé de nouveau pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel.

L'absorbance du complexe Fe^{2+} -ferrosine est mesurée à 562 nm. L'effet chélateur de l'échantillon est calculé selon la formule ci-dessous :

$$\text{Effet chélateur (\%)} = [(\text{DO}_{\text{Contrôle}} + \text{DO}_{\text{Blanc}}) - \text{DO}_{\text{Echantillon}} / \text{DO}_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

DO **Contrôle**: Tube contrôle contient tous les réactifs sauf l'échantillon est remplacé par l'eau distillée.

DO **blanc** : Tube blanc, le ferrozine est remplacé par l'eau distillée.

V.1.4. Inhibition du blanchiment du β -carotène

La capacité des différents hydrolysats, du MPNH et du BHA à inhiber le blanchiment du β -carotène a été déterminée selon la méthode rapportée par Koleva et al. (2002). En effet, une solution mère d'acide linoléique et du β -carotène est préparée comme suit : 0,5 mg de β -carotène, dissout dans 1 mL de chloroforme sont mélangés avec 25 μ L d'acide linoléique et 200 μ L de Tween 80. L'élimination du chloroforme est réalisée par évaporation à 40°C. Le résidu d'acide linoléique et du β -carotène est solubilisé dans 100 mL d'eau bidistillée. L'émulsion obtenue est fraîchement préparée avant chaque test. 500 μ L des différents échantillons des hydrolysats protéiques et du BHA ont été introduits dans des tubes où on ajoute 2,5 mL de la solution mère préparée à partir du résidu du β -carotène et de l'acide linoléique. Les mélanges sont incubés pendant 2 heures à 50°C. La densité optique est déterminée à une longueur d'onde de 470 nm avant et après incubation. Des contrôles et des blancs sont préparés pour chaque extrait suivant les mêmes étapes. Le tube contrôle contient tous les réactifs sauf l'échantillon et le blanc contient tout à l'exception du β -carotène. L'activité antioxydante est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_0 \text{ échantillon} - A_{120} \text{ échantillon}) / (A_0 \text{ contrôle} - A_{120} \text{ contrôle})] \times 100$$

Avec : A_0 : absorbance à $t = 0$ min, A_{120} : absorbance à $t = 120$ min.

V.1.5. Activité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) des hydrolysats, du MPNH et du BHA est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto et al. (1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) en Mo (V) par l'échantillon et la formation d'un complexe vert de phosphate/ Mo (V) à pH acide. Pour cela, une aliquote de 100 μ L de la solution de chaque échantillon, à différentes concentrations, est homogénéisé avec 1 mL de la solution réactionnelle (0,6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium) dans un tube Eppendorf. Après incubation à 95°C pendant 1h 30 min, chaque échantillon est laissé refroidir à température ambiante. Par la suite, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre une solution contrôle qui contient 1 mL de la solution du réactif et 0,1 mL d'eau distillée et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. Le BHA est utilisé comme témoin positif. L'activité antioxydante totale est évaluée en équivalent α -tocophérol par le biais de la courbe d'étalonnage de l'équation linéaire ci-dessous :

$$A = 0,011 C + 0,0049 ; R^2 = 0,987$$

Avec A : absorbance à 695 nm et C : concentration en α -tocophérol équivalent ($\mu\text{mole/mL}$).

V.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne s'est effectuée par des tests sur boîtes de Pétri gélosées, permettant de mesurer de manière qualitative le pouvoir antimicrobien de l'échantillon testé. La détection de l'activité antibactérienne sur un milieu gélosé est basée sur la diffusion de l'agent antimicrobien contenu dans l'échantillon testé au sein d'un milieuensemencé par une souche bactérienne donnée. Ainsi, le pouvoir antimicrobien peut donc être déterminé contre la souche testée.

V.2.1. Les souches bactériennes

Les activités antibactériennes des hydrolysats sont testées contre trois bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) et *Enterococcus faecalis* et quatre bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Salmonella enterica* (ATCC 43972).

V.2.2. Préparation des pré-cultures

L'activité antibactérienne est ici évaluée selon la méthode de Parish et al. (2001). Dans un premier temps, les pré-cultures sont réalisées à partir des souches de référence des bactéries testées qui sont conservées à -80°C dans du glycérol 15%. Pour cela, 20 μL de souches conservées sont ajoutés à 5 mL de milieu LB (Luria-Bertani: peptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7.5), puis inoculés à 37°C sous agitation pendant 18-24 h. L'inoculum était, si besoin, ajusté à 10^6 UFC/mL pour la suite des tests. Après une bonne homogénéisation, la turbidité de ces cultures est mesurée par lecture spectrophotométrique à 600 nm. Des dilutions nécessaires afin d'obtenir des cultures en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}=0,25$ à 600 nm) sont ensuite effectuées dans le tryptone Sel (TS).

$$\text{Facteur de dilution} = \text{DO}_{\text{corrigé}} / \text{DO}_{\text{lue}} = 0,25 / \text{DO}_{\text{lue}}$$

Lorsque la DO lue est inférieure à 0,25, on augmente le temps d'incubation de la culture concernée.

V.2.3. Réalisation du test antibactérien sur boîte de Pétri

De manière parallèle, des boîtes de Pétri ont été préparées contenant 15 mL de milieu LB gélosé. Après refroidissement, leur ensemencement est effectué par une méthode d'inondation constituant à ajouter 1 mL de suspension bactérienne en surface de la gélose. Après repos de 15 min afin de laisser la pré-culture diffuser, l'excédent est retiré. La boîte est mise à sécher 15 min sous la hotte à flux laminaire. Ensuite, des puits (6 mm de diamètre) ont été creusés en utilisant une pipette pasteur stérile pour y accueillir les échantillons. Les hydrolysats et le muscle non hydrolysé sont solubilisés dans l'eau bidistillée autoclavée. Un volume de 60 μ L de l'échantillon à une concentration de 10 mg/mL sera injecté. Pour chacune des boîtes est utilisé un témoin positif, inhibant la croissance bactérienne telle que l'ampicilline et un témoin négatif correspondant au solvant (de l'eau ultrapure) est également déposé. Le tout est disposé de manière semblable à ce qui est montré dans la figure suivante :

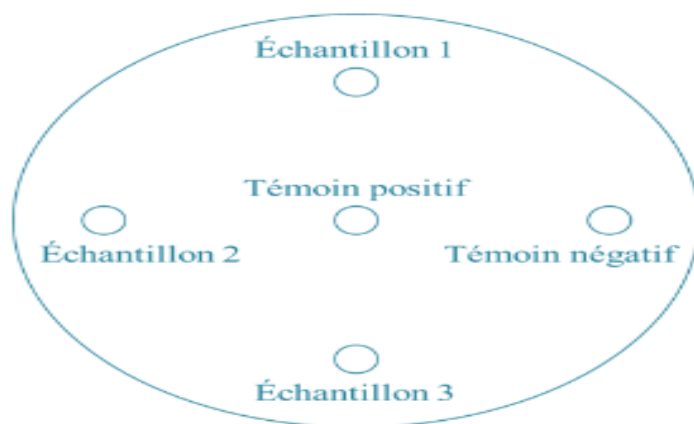


Figure 23: Schéma de la boîte de Pétri utilisée pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les boîtes sont incubées à 4°C pendant 2h à 4°C pour assurer la diffusion de l'échantillon dans la gélose. Finalement les boites sont incubées durant 24h à 37°C. L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure du diamètre de l'halo d'inhibition en millimètre (mm) autour du puits dans lequel a été déposé l'extrait tout en tenant compte du diamètre du puits qui est de 6 mm. Plus le halo d'inhibition possède un diamètre élevé, plus le pouvoir antibactérien de l'agent déposé à une concentration donnée est important. Néanmoins, il est à préciser que cette technique a été utilisée de manière informative et non quantitative de l'activité. Principalement, elle a servi à vérifier la présence ou non de l'activité antibactérienne au sein des hydrolysats et non pas à quantifier le pouvoir antibactérien de ces échantillons testés.

V.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration minimale bactéricide (CMB)

Le principe général de cette méthode est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des hydrolysats vis à vis d'une souche cible en milieu liquide.

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est la plus petite concentration en agent antibactérien permettant d'inhiber la croissance d'une souche bactérienne après d'un temps d'incubation de 24 h. Ce test est réalisé sur une microplaque stérile (avec couvercle). Le milieu de culture choisi pour le test est le LB, il servira également pour la préparation des échantillons à tester et des bactéries. L'inoculum a été ajusté à 10^5 UFC/mL. Tous les puits contiennent 100 μ L de l'inoculum et pour chaque extrait à tester on met 100 μ L dans les premiers puits seulement et on fait une dilution $\frac{1}{2}$ dans les deuxièmes puits et ainsi de suite. Un puit contenant le témoin positif : le milieu LB et la bactérie a été utilisé comme contrôle de croissance, un témoin négatif a été inoculé par le milieu de culture uniquement pour contrôler sa stérilité et un autre pour contrôler la stérilité de l'échantillon. La microplaque est incubée à 37°C pendant 24h.

La croissance bactérienne est révélée par ajout de 20 μ l de [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide] (MTT) à 0,02% et incubation pendant 30 min à 37°C. Le MTT est un tétrazole jaune qui se transforme en violet en présence des cellules vivantes (Mosmann, 1983). Les puits où le milieu reste clair témoignent de l'absence de croissance cellulaire. La plus faible concentration en extrait provoquant l'absence de croissance cellulaire correspond à la CMI. Afin de déterminer la CMB, 100 μ L de chaque puits ne présentant pas une variation de couleur après incubation avec MTT, sont étalés à la surface d'un milieu LB solide. La plus petite concentration en échantillon dont la boîte correspondante ne contient aucune colonie après incubation 24h à 37°C, correspond à la CMB.

V.2.5. Détermination de pourcentage d'inhibition des bactéries par les fractions

Le principe de cette méthode est de mettre en évidence l'activité antibactérienne d'une fraction vis-à-vis d'une souche cible en milieu liquide. La croissance ou non de la culture bactérienne en présence d'une fraction est alors comparé à une culture témoin sans fraction peptidique. Ainsi, l'absence de croissance bactérienne après une durée d'incubation (18-24h) reflète l'activité antimicrobienne de cette fraction. La concentration en fraction peptidique de départ est fixée à 100 μ g/mL dans du milieu TS (stérilisation par filtration sur des membranes de pore de 0,2 μ m) ensuite une série de dilutions au demi sont préparées.

Dans chaque puits contenant 50 µL du milieu de culture sont ajoutés, 50 µL de la fraction à tester et 50 µL de la suspension bactérienne préalablement diluée dans du milieu (TS) pour avoir une charge bactérienne finale de 10⁵ UFC/mL. Deux puits serviront de témoin l'un négatif contenant 50 µL de la culture bactérienne et 50 µL de milieu de culture et l'autre, témoin positif correspondant à 2400 UI/mL de nisine pour les bactéries à Gram positif ou 2000 UI/mL de streptomycine pour les bactéries à Gram négatif, ces concentrations sont suffisantes pour induire 100 % d'inhibition de croissance. L'absence de la croissance bactérienne est révélée par mesure de l'absorbance à 600 nm par un lecteur à microplaque après 24h d'incubation à 37°C. L'absorbance des puits correspondant à des concentrations décroissantes du fraction est comparée à celle des puits d'un témoin négatif et d'un témoin positif. Le pourcentage de réduction a été déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ reduction} = \frac{DO_{600} \text{ Témoin positif} - DO_{600} \text{ Echantillon}}{DO_{600} \text{ Témoin positif}} \times 100$$

VI. Application des hydrolysats comme conservateurs alimentaires

VI.1. Préparation des échantillons et suivi de l'expérience

La viande de bœuf était fraîchement achetée sur le marché local de la ville de Sfax. Les steaks de bœuf ont été broyés après élimination des graisses en excès et de toutes autres impuretés. Les différentes formulations ont été préparées dans les plus strictes conditions d'asepsie afin d'éviter au maximum des contaminations extérieures. Quatre conditions de stockage ont été testées :

- 1) Le contrôle, c'est-à-dire la viande sans additif,
- 2) La viande avec un conservateur synthétique connu, BHA: 0,5% comme référence,
- 3) La viande à différentes concentrations de HPP-S: 0.5 et 1%,
- 4) La viande à différentes concentrations de HPP-AL: 0.5 et 1%,

Les échantillons, sous forme de poudre, ont été ajoutés à la viande après pesée. L'ensemble a été homogénéisé. Ensuite, des morceaux de viande 25 g sont confectionnés et conservés à 4°C pour une durée maximale de 11 jours (**Figure 24**). Des prélèvements sont réalisés chaque trois jours. L'évaluation des produits de l'oxydation et le suivi de croissance microbienne des différentes préparations sont investiguées.



Figure 24: Les Formulations de viandes préparées (photo prise au laboratoire)

VI.2. Évaluation de l'oxydation des lipides

VI.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

L'oxydation des lipides a été quantifiée *via* la technique rapportée par Buege & Aust, (1972) mesurant les substances réagissant avec l'acide 2-thiobarbiturique d'où la désignation (Thiobarbituric Acid Reactive Substances : TBARS).

Le MDA est l'un des principaux produits de l'oxydation du radical diène des acides gras polyinsaturés sous forme d'un aldéhyde. Le principe de cette technique colorimétrique repose sur la dérivation du MDA, libéré au cours de l'oxydation des acides gras insaturés dans le broyat de l'échantillon et l'acide thiobarbiturique (TBA). Le produit formé entre les 2 molécules de TBA et la molécule de MDA génère un produit fluorimétrique détectable à 530 nm (Figure 25).

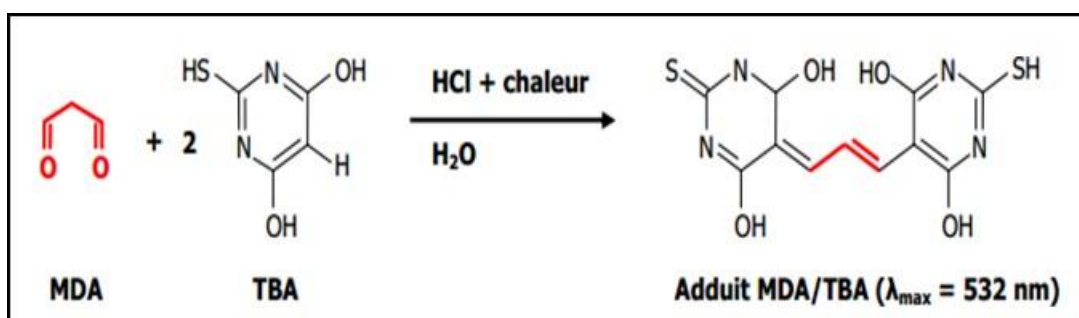


Figure 25: Formation du produit de condensation chromogénique entre MDA et TBA (Buege et Aust, 1972).

Dans un tube vide, une quantité de 0,5 g de chaque formulation est mélangée avec 625 μL TBS (50 mM Tris contenant 150 mM NaCl, pH 7,4) et 375 μL TCA 20%, afin de précipiter les protéines.

Après centrifugation (8000 \times g, 10 min, 4°C), 400 μL du surnageant sont mélangés avec 80 μL HCl 0,6 M et 320 μL Tris-TBA (Tris 26 mM ; TBA 120 mM) et le mélange est incubé

pendant 10 min à 90°C. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 530 nm. La concentration du complexe (TBA-MDA) formé, est proportionnelle à la teneur de MDA et donc aux acides gras peroxydés et exprimée en mg MDA/Kg échantillon. Le calcul des TBARS se fait selon la réaction suivante :

$$\text{MDA} \left(\frac{\text{nmoles MDA}}{\text{mg protéines}} \right) = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\text{E} \times \text{L} \times \text{X} \times \text{Fd}}$$

DO: densité optique lue à 530 nm; E: coefficient d'extinction molaire du MDA ($E = 1,56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); L: longueur du trajet optique ($L = 1 \text{ cm}$); X: concentration de l'échantillon (mg/mL); F_d: facteur de dilution, $F_d = (V_{S1} \times V_S) / (V_f \times V_F)$ avec: V_{S1}: volume de prise de l'échantillon (125 µL); V_S: volume prélevé du surnageant (200 µL); V_f: volume final à l'incubation à 80°C (400 µL); V_F: volume final intermédiaire à la centrifugation (300 µL) ; ici F_d: 0,2083.

VI.2.2. Teneur en diènes conjugués

L'oxydation des lipides est, également, évaluée par la teneur en diènes conjugués, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 233 nm (Esterbauer et al, 1982). Ainsi, un volume de 0,5 mL de chaque échantillon est mélangé avec 5 ml hexane/isopropanol (3/2 ; v/v) pendant 1 min. Après centrifugation pendant 5 min à 3000×g, la différence de l'absorbance à 233 nm est estimée contre un blanc (eau distillée) traité de la même manière.

VI.2.3. Détermination de la teneur en metmyoglobine

L'analyse de la teneur en metmyoglobine (MetMb) est déterminée en se basant sur la méthode décrite par Krzywicki, (1982). Un échantillon (5 g) de viande est placé dans un tube à centrifuger en polypropylène de 50 mL contenant 25 mL de tampon phosphate (TP) glacé (40 mM, pH 6,8). Le mélange dans le tube est homogénéisé pendant 10 s et maintenu à 4°C pendant 1 h, puis centrifugé à 5000×g à 4 °C. Par la suite, Le surnageant est filtré avec du papier filtre Whatman et l'absorbance est observée à 572, 565, 545 et 525 nm. Le pourcentage de MetMb est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{MetMb (\%)} = [-2,51 \times (A_{572}/A_{525}) + 0,777 \times (A_{565}/A_{525}) + 1,098] \times 100$$

VI.2.4. Détermination de la teneur en fer héminique

L'évaluation de la teneur en fer héminique dans les différents échantillons est effectuée selon la méthode de Clark et al. (1997). Des échantillons de viande (10g) sont pesés dans des tubes à centrifuger de 50 mL et mélangés avec la moitié d'une solution d'acétone acidifiée

(40 mL d'acétone, 9 mL d'eau et 1 mL HCl). Après homogénéisation pendant 15, les échantillons sont mélangés et incubés à l'obscurité pendant au moins 1 h à 25°C. Par la suite, les échantillons sont centrifugés à 3000×g pendant 10 min puis le surnageant est filtré et l'absorbance est lue à 640 nm. L'absorbance est multipliée par le facteur 680 puis divisée par la masse de l'échantillon pour donner la concentration de pigments totaux dans la viande exprimée en µg d'hématine/g de viande. Les teneurs en fer héminique sont calculées par l'équation ci-dessous :

$$\text{Fer héminique } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ viande}) = A_{640} \times 680 \times 0,0882$$

VI.3. Analyse de la couleur

Un autre paramètre primordial dans la caractérisation des biomatériaux est la mesure de la couleur. Ce paramètre est déterminé en utilisant un colorimètre portatif (Minolta Chroma Mètre CR-300, CIE, 1976) et la couleur est enregistrée en utilisant les paramètres de couleur CIE $L^*a^*b^*$. L^* indique la transparence et sa valeur varie de 0 (noir) à 100 (blanc), a^* est une mesure de vert ($-a^*$) /rougeur ($+ a^*$) et b^* est la mesure de bleu ($-b^*$) /jaune ($+ b^*$). Pour les paramètres de couleur dérivés, la différence de couleur totale (ΔE), Chroma ou la valeur de saturation de couleur (C), l'angle de teinte (h°) et la transparence (W pour « wightness ») sont calculés en se basant sur l'équation suivante :

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

Avec L_0^* , a_0^* , b_0^* sont les paramètres colorimétriques du standard ($L_0^* = 97,25$; a_0^*

= -0,2 et $b_0^* = 2,25$). L^* , a^* , b^* sont les valeurs pour les échantillons à tester.

VI.4. Analyses microbiologiques

Différents comptages microbiologiques ont été effectués les jours 1, 3, 6, 8, 9 et 11 de stockage à 4°C. 1 g de viande pour chacune des conditions testées ont été ajoutés à 9 mL d'eau peptonée stérile à 0.1% (m/v) et homogénéisés pendant 2 min.

Des aliquotes ont ensuite été réalisées pour des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-5} . 0,1 mL de celles-ci ont été prélevées et étalées sur boîtes de pétri avec des milieux sélectifs (20 mL) (**Figure 26**). Lors de dénombrement, on prend en considération les boîtes de 30 à 300 colonies.

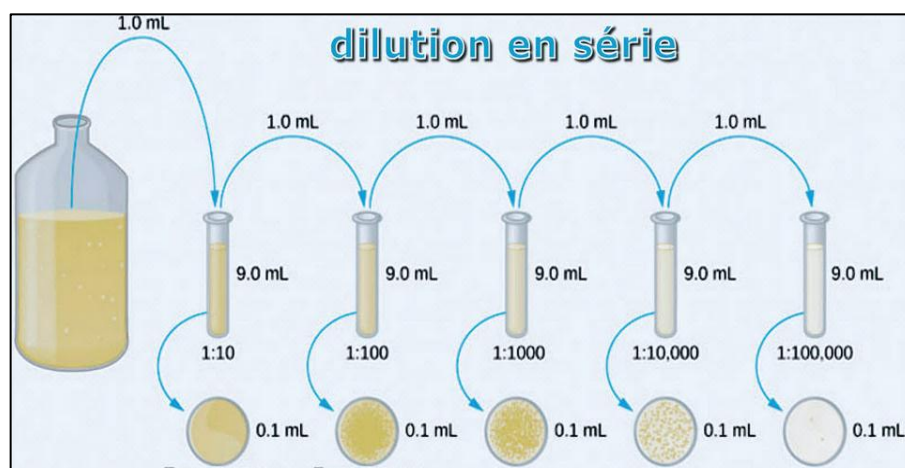


Figure 26: Méthode de dilution en série pour un comptage des bactéries.

Le Plate Count Agar (PCA) pour les colonies totales et le Potato Dextrose Agar (PDA) pour les levures et les moisissures. L'ensemble des étalements a été incubé à 37°C pour une durée de 24 h. Les résultats sont exprimés en log₁₀ d'unités formatrices de colonies (UFC) par gramme de viande (log₁₀ UFC/g).

VII. Analyses Statistiques

Les analyses statistiques sont présentées sous forme de moyenne ± l'écartype (Standard déviation (SD)). Tous les résultats sont traités statistiquement par le programme informatique SPSS (version 17.0) par l'analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicata.

Résultats & Discussion

Chapitre 1 :

*Elaboration d'hydrolysats de protéines de muscle
de pataclet et leur caractérisation
physicochimique, fonctionnelle et peptidomique*

Introduction

De nombreux secteurs utilisent depuis longtemps des substances bioactives qui sont habituellement des produits de synthèse. Seulement, l'intérêt de ces substances est aujourd'hui contesté en raison des effets secondaires indésirables qu'elles peuvent avoir, et donc du risque sanitaire qu'elles représentent. Pour les substituer, des substances d'origine naturelle sont vivement recherchées. Plusieurs substances de cette origine sont proposées, mais les hydrolysats et peptides dérivés des protéines alimentaires sont dans ce domaine l'objet d'un intérêt particulier, notamment dans le secteur de l'agroalimentaire. En effet, l'intérêt de ces dérivés de protéines est non seulement dû à leur bioactivité mais aussi à leur fonctionnalité (texturante, gélifiante, émulsifiante...) et leur valeur nutritionnelle (Villamil et al, 2017).

L'hydrolyse des protéines peut être soit chimique (acide ou basique), soit enzymatique (autolyse ou hétérolyse). Cette dernière est la plus populaire en raison des conditions douces utilisées, la non destruction d'acides aminés et son contrôle possible. L'hydrolyse enzymatique des protéines consiste à couper des liaisons peptidiques entre les acides aminés produisant ainsi un mélange de peptides et d'acides aminés libres. Les caractéristiques enzymatiques propres à l'enzyme utilisée et les conditions de la réaction d'hydrolyse (spécificité, température optimale, pH optimal, temps de réaction, rapport [enzyme]/[substrat]...) influencent fortement la composition en peptides de l'hydrolysats généré, ce qui, à son tour, détermine ses propriétés fonctionnelles, biologiques et nutritionnelles. Ainsi, le choix adéquat de la nature de la protéine substrat, de la spécificité de l'enzyme et des conditions de l'hydrolyse, serait susceptible de permettre l'obtention de l'hydrolysats avec des propriétés plus désirables (He et al., 2013).

De toutes les protéines alimentaires, celles d'origine maritime sont particulièrement prisées pour produire des hydrolysats et des peptides. En effet, elles proviennent d'une grande variété d'organismes (grande variété génétique) qui vivent dans des environnements différents et elles sont disponibles en grande quantité, et souvent à bon marché.

De nombreuses études ont révélé que les hydrolysats de cette origine présentent des propriétés biologiques différentes. On y compte par exemple les activités anticoagulantes (Rajapakse et al., 2005), antiprolifératives de lignées cellulaires cancéreuses (Chukiatsiri et al., 2020), antibactériennes (Tang et al., 2015; Sila et al., 2014; Kim et al., 2017), antioxydantes (Lassoued et al., 2021; Ktari et al., 2020; Latorres et al., 2018; Wang et al., 2021; Tan et al., 2018), et immunomodulatrices (Chalamaiah et al., 2015; Li et al., 2019).

Le présent travail porte sur la production, la purification et l'identification de peptides antioxydants et antibactériens à partir des protéines de muscle du pataclet (*Diplodus annularis*) soumises à l'action de la **Savinase® 16 L** ou de l'**Alcalase® 2.4 L**, puis à effectuer la caractérisation physicochimique et fonctionnelle des hydrolysats, et à déterminer leur composition en peptides.

I. Elaboration des hydrolysats peptidiques du muscle de pataclet

L'hydrolyse est réalisée dans les conditions optimales de chaque préparation enzymatique avec un ratio enzyme/substrat de l'ordre de 3 U d'enzymes pour 1 mg de protéines. Le rendement de production de HPP-S est de l'ordre de 34% et 30% pour HPP-AL. L'évolution du degré d'hydrolyse (DH) des protéines de pataclet en fonction du temps est illustrée sur la figure (27).

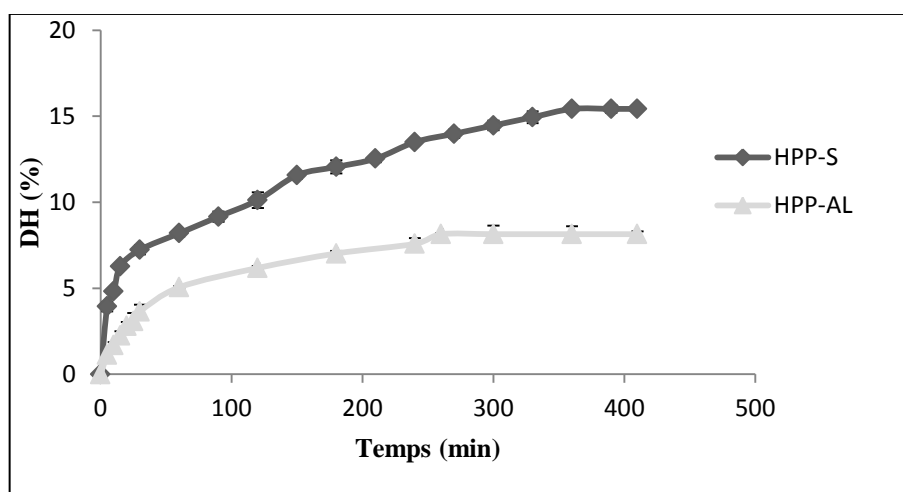


Figure 27: Evolution de degré d'hydrolyse en fonction de temps de deux protéases utilisées.

Le suivi de l'hydrolyse des protéines du muscle, *via* le calcul du DH, a donné deux profils différents selon l'enzyme utilisée. Le DH permet d'évaluer de façon globale l'action des enzymes sur le substrat et l'efficacité du procédé d'hydrolyse. Il influence également la taille moléculaire et la composition des acides aminés présents dans les hydrolysats, ce qui influe sur leurs propriétés fonctionnelles et biologiques (Jamdar et al., 2010).

La cinétique d'hydrolyse est caractérisée par une phase initiale rapide, durant laquelle un grand nombre de liaisons peptidiques est hydrolysé, suivie par un ralentissement, puis par une stabilisation.

Des résultats similaires ont été observés dans la majorité des travaux portant sur des études cinétiques de protéolyse enzymatique de muscle de salomon (Darewicz et al., 2014); de la tête et viscères de l'anguille (Bougatef et al., 2020); de la peau de Colin d'Alaska (Guo et al., 2013); de la chair de la zebra blennie (Ktari et al., 2020) et de muscle de crevette (Latorres et al., 2018).

Le ralentissement et la stabilisation de l'hydrolyse enzymatique avec l'allongement du temps de la réaction seraient dus soit à la diminution des liaisons peptidiques disponibles, soit à l'inactivation des enzymes au cours de la réaction de protéolyse par le substrat ou par les produits secondaires générés (Moreno & Cuadrado, 1993). Les DH finaux obtenus par l'enzyme savinase et alcalase sont de l'ordre de 15,42% et 8,14%, respectivement. Ces résultats attestent que la protéase savinase a montré une plus forte efficacité protéolytique en comparaison avec celle de l'alcalase pouvant se justifier par une large spécificité. En accord avec notre observation, plusieurs études ont effectivement rapporté la forte efficacité hydrolytique de la savinase vis à vis diverses protéines (Garcia-Mora et al., 2014; Bougatef et al., 2020; Egerton et al., 2018; Karoud et al., 2019). De son côté, l'alcalase possède une très forte spécificité dans le clivage des peptides, en particulier pour les acides aminés hydrophobes et aromatiques tels que Tyr, Trp, Phe, et Leu et elle a été utilisée pour l'élaboration de plusieurs hydrolysats (Vàzquez et al., 2020; Yathisha et al., 2022; Finkler et al., 2022; Amiza et al., 2012).

II. Caractérisation des hydrolysats peptidiques du muscle du pataclet

II.1. Caractérisation physico-chimique

La composition physico-chimique des protéines de muscle du pataclet (MPNH) et de leurs hydrolysats (HPPs) a été déterminée (**Tableau 6**). Les HPPs présentent une teneur élevée en protéines qui dépasse 70%, ce qui est également observé dans de nombreux hydrolysats de protéines de poisson (Abraham, 2017; Ben Khaled et al., 2014; Ben Slama-Ben Salem et al., 2017; Henriques et al., 2021; Seniman et al., 2014; Taheri et al., 2013). Les teneurs en protéines de ces hydrolysats varient avec le type de traitement enzymatique effectué. Elles sont de l'ordre de $79,79 \pm 0,74\%$ et $72,68 \pm 1,14\%$ dans les hydrolysats préparés à l'aide de la savinase et de l'alcalase, respectivement et elles sont supérieures à celui du MPNH ($18,97 \pm 0,73\%$).

La différence entre leur DH respectif peut justifier la différence de leur taux de protéines. En effet, un DH plus fort permet une meilleure solubilisation des protéines. Par

ailleurs, des faibles teneurs en lipides ($0,89\pm 0,1\%$; $1,22\pm 0,17\%$) dans la composition des deux hydrolysats ont été observées.

L'hydrolyse du muscle de pataclet a permis une réduction du pourcentage de la matière grasse en comparaison avec la teneur en lipides dans les protéines non digérées (MPNH) qui est de l'ordre de $2,57\pm 0,04\%$, ce qui est dû à l'élimination d'une partie de lipides lors de la séparation par centrifugation. Le plus faible taux de lipides dans HPP-S indique qu'une hydrolyse plus étendue permet une meilleure délipidation. Par conséquent, les faibles teneurs en lipides observées dans les hydrolysats peuvent améliorer la stabilité de produit fini en empêchant son oxydation lipidique. Outre, les teneurs en cendres des hydrolysats peptidiques sont supérieures à celle du MPNH. Ces teneurs élevées sont probablement le résultat de la formation des sels par ajout de la base NaOH lors de la réaction de protéolyse, pour maintenir stable le pH (Kristinsson & Rasco, 2000).

Tableau 6: Composition physico-chimique des hydrolysats peptidiques de pataclet

Paramètres	Teneur en protéines (%)	Taux de lipides (%)	Humidité (%)	Cendres (%)
MPNH	18,97±0,73	2,57±0,04	78,26±0,91	5,62±0,40
HPP-S	79,79±0,74	0,89±0,10	13,28±1,50	12,70±0,25
HPP-AL	72,68±1,14	1,22±0,17	9,58±0,60	10,67±0,20

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3)

II.2. Détermination de la composition en acides aminés des HPPs

Les protéines alimentaires sont reconnues depuis longtemps par leurs propriétés nutritionnelles et fonctionnelles. Les propriétés nutritionnelles des protéines sont associées à leur teneur en acides aminés et à leur biodisponibilité. La littérature rapporte la composition en AAs de nombreux hydrolysats. En général, elle est avantageuse par le contenu en AAEs, avec cependant une variation du profil d'AAs. En particulier, ce profil a été rapporté dominé par Glu dans des hydrolysats de protéines de crevettes, par Gly, Ala et Lys dans des hydrolysats des protéines du muscle de sardinelle (Jemil et al., 2017), par Gly, Arg, Thr dans les hydrolysats de seiche, baliste, émissole lisse (Lassoued et al., 2021) et par Leu, Lys, Gly, Arg, et Thr dans l'hydrolysat des protéines de la bogue *Boops boops* (Lassoued et al., 2021). La différence dans la nature de la matière première, de la spécificité de l'activité enzymatique utilisée et les conditions de l'hydrolyse pourrait justifier la dissemblance des profils d'AAs des différents hydrolysats (Chalamaiah et al., 2012).

La composition totale en acides aminés des HPPs et des protéines non digérées est rapportée dans le tableau 7. L'acide glutamique et la lysine prédominent dans les trois échantillons avec une teneur entre 12,67%-14,81% et 12,47%-12,97%, respectivement.

La richesse de HPP-S et HPP-AL en Glu rend envisageable leur utilisation comme exhausteurs de goût des produits alimentaires (Witono et al., 2016).

Le contenu d'un composé en AAEs est un critère de qualité nutritionnelle. Dans les protéines intactes de pataclet, le pourcentage des AAEs représente 42,32%, alors qu'il est de l'ordre de 39,19% et 39,55%, dans HPP-S et HPP-AL, respectivement. Ce taux concorde avec ceux rapportés dans les hydrolysats de muscle de sardinelle et des coproduits de turbot (Jemil et al., 2017; Vázquez et al., 2020) et il est supérieur à celui dans les hydrolysats de *Raja clavata* (31,9 à 34,1%) (Lassoued et al., 2015). Par contre, il est inférieur que celui rapporté dans les hydrolysats de muscle de la seiche, de la baliste, de l'émissole lisse et de la bogue *Boops boops* (bogue) (42,41%-51,09%) (Lassoued et al., 2021).

L'hydrophobie est un critère qui impacte de manière significative la bioactivité et la fonctionnalité des peptides (Junianto et al., 2020). Les AAs hydrophobes constituaient 37,86% des AAs des protéines intactes du pataclet contre 39,18% et 39,72% des AA de HPP-AL et HPP-S, respectivement. Le taux augmenté de ces AAs dans les hydrolysats peut résulter de leur extirpation du cœur de la protéine.

Tableau 7: Composition en acides aminés du MPNH et des HPPs obtenus moyennant deux activités protéolytiques

	MPNH	HPP-S	HPP-AL
Asp	10,01	9,93	8,63
Glu	12,67	13,31	14,81
Ser	4,96	5,02	4,78
His	2,72	2,21	2,95
Gly	4,93	5,7	5,87
Thr	3,61	3,9	3,88
Arg	7,65	7,22	6,85
Ala	6,23	7,49	7,62
Tyr	2,64	1,91	1,65
Val	5,46	4,02	3,87
Met	1,78	2,2	2,4
Trp	1,06	0,65	0,75
Phe	4,13	3,68	3,33
Ile	3,94	3,4	3,14
Leu	7,71	7,31	7,21
Lys	12,97	12,47	12,77
Hyp	4,83	4,28	4,45
Pro	2,62	5,27	4,99
AAE	42,32	39,19	39,55
AAH	37,86	39,72	39,18
AAA	7,83	6,24	5,73

Acides Aminés Essentiels (AAE), Acides Aminés Hydrophobes (AAH), Acides Aminés Aromatiques (AAA)

II.3. Analyse par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et en particulier la RP-HPLC (HPLC en phase inverse) est une méthode de choix pour la séparation analytique des peptides à partir des hydrolysats de protéines. Elle donne des renseignements sur l'hydrophobie et l'hydrophilie de leurs composants. Cette méthode est souvent utilisée pour analyser et séparer les peptides des hydrolysats (Taktak et al, 2021 ; Alu'datt et al., 2021; Kim et al., 2018).

L'application de RP-HPLC aux deux hydrolysats des protéines du pataclet a montré la présence de nombreux pics prouvant ainsi leur hétérogénéité (**Figure 28**). Cette hétérogénéité se traduit par des temps de rétention différents qui sont en fonction de la composition en acides aminés hydrophobes des peptides.

Les profils HPLC de HPP-S et HPP-AL peuvent être subdivisés en trois catégories d'hydrophobicité des peptides élués : faible, moyenne et élevée. L'hydrolysate protéique (HPP-S) à DH 15,42% a présenté une concentration élevée en peptides hydrophiles et une concentration élevée en peptides très hydrophobes comparé à HPP-AL (DH=8,14%).

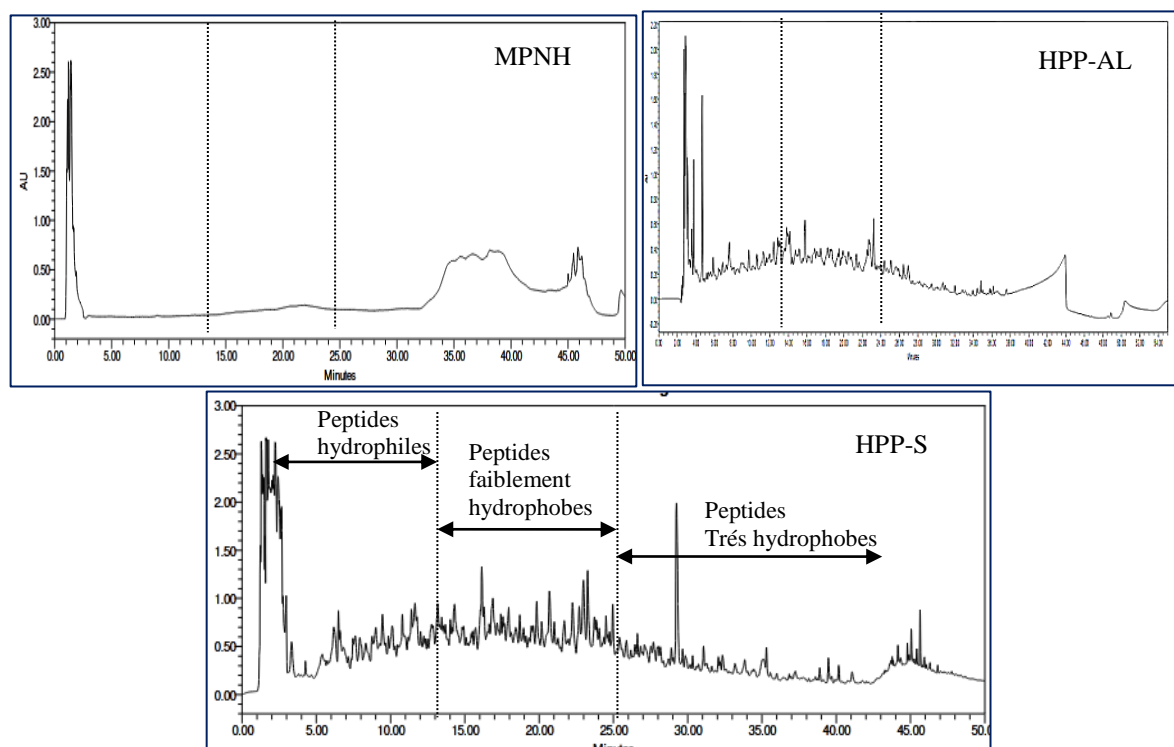


Figure 28: Profils chromatographiques des HPPs et des protéines intactes à 214 nm, analysés par HPLC par colonne de type C18 (150 × 2.6 mm).

III. Identification et caractérisation de la population peptidique

Les deux hydrolysats ont été soumis à une analyse par UPLC-MS/MS et au traitement bioinformatique des données avec le logiciel peaks studio en utilisant la base de données de protéines Swiss-Prot/TrEMBL restreinte aux sparidés (accès en janvier 2022). Le nombre total de peptides identifiés était de l'ordre de 906 dans HPP-S et 536 dans HPP-AL.

Les peptides communs aux HPP-S et HPP-AL et ceux propres l'un ou à l'autre des hydrolysats ont été identifiés et présentés sous forme de diagramme de Venn dans la figure (29.A). Cette analyse a révélé la présence de 258 peptides communs aux deux hydrolysats, avec en plus 648 et 278 autres peptides présents uniquement dans HPP-S et HPP-AL, respectivement. Le plus grand nombre de peptides observés dans HPP-S est en accord avec son plus grand DH.

Ainsi, les hydrolysats de pataclet se composent majoritairement de peptides issus des protéines de muscle squelettique (l'actine A du muscle squelettique alpha et la chaîne lourde de myosine du muscle squelettique). Comme le montre le diagramme de Venn ci-dessous (Figure 29.B), 34 peptides de l'actine A sont communs entre les hydrolysats générés par l'action de savinase et de l'alcalase, tandis que 72 et 29 peptides uniques dans HPP-S et HPP-AL, respectivement. De même, 51 peptides de la chaîne lourde de myosine sont communs entre les deux hydrolysats (Figure 29.C), tandis que 192 et 57 peptides sont spécifiquement générés par savinase et l'alcalase, respectivement. En outre, la divergence entre les différents peptides identifiés dans HPP-S et HPP-AL a ensuite été présentée sous la forme d'une carte thermique (Figure 29. B, C). Pour chaque acide aminé de la séquence protéique, un score a été calculé en fonction de son occurrence dans chaque séquence peptidique identifiée. Plus l'occurrence est élevée, plus la zone peptidique tend vers le rouge. Pour les deux hydrolysats, des similitudes de couleur ont été observées dans certaines parties de la carte, ainsi que des différences entre les deux conditions (flèches bleues dans la figure 29 B, C).

Ces cartes thermiques soulignent la grande abondance des peptides détectés dans les régions protéiques colorées en rouge, où la protéolyse est limitée et la faible abondance des peptides détectés dans les régions protéiques non colorées, où la protéolyse est importante. Le nombre de peptides identifiés originaire de l'actine du muscle squelettique alpha A est de l'ordre de 106 et 63 pour HPP-S et HPP-AL, respectivement. Pour sa part, la chaîne lourde de myosine pour l'hydrolysat était à l'origine, de 243 peptides dans HPP-S et de 108 peptides dans HPP-AL.

Kleekayai et al. (2020) ont rapporté que cette différence peut être expliquée par la spécificité enzymatique et l'effet des conditions d'hydrolyse sur les profils des peptides.

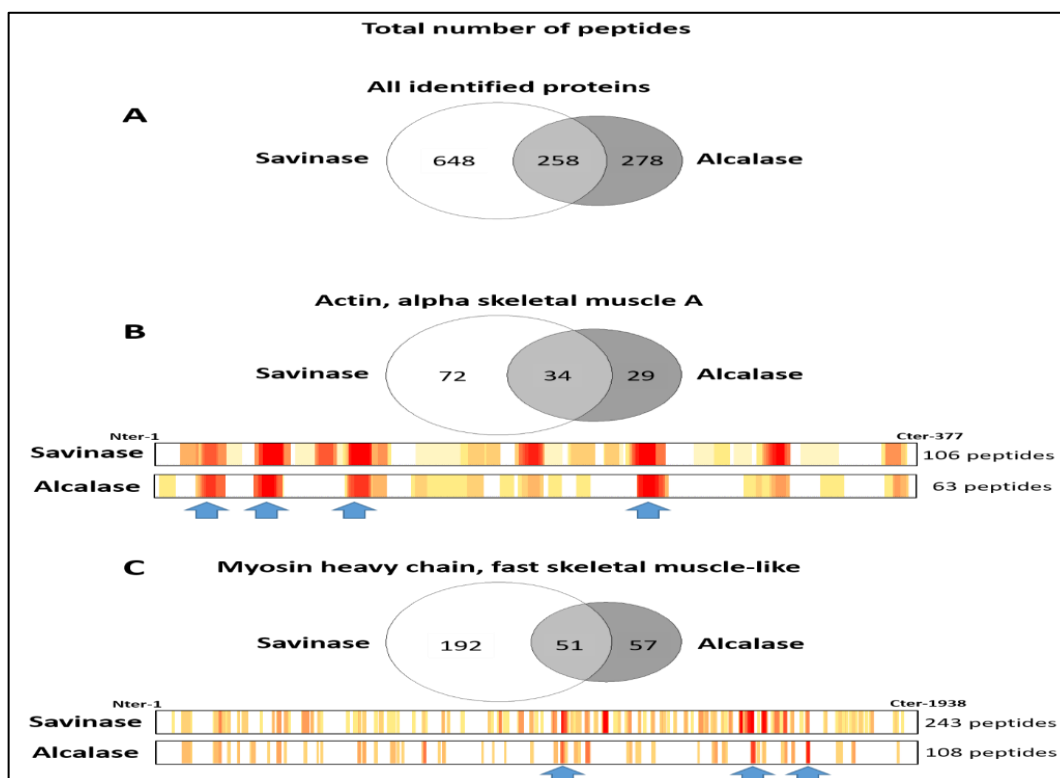


Figure 29: Diagrammes de Venn montrant les différentes populations de peptides au sein des deux hydrolysats ainsi que le nombre de peptides distincts et communs identifiés par RP-HPLC-MS/MS pour : A) Tous les peptides identifiés dans les hydrolysats ; B) L'actine du muscle squelettique alpha ; C) La chaîne lourde de myosine. Des cartes thermiques des deux hydrolysats (panneaux B et C) : mettent en évidence la présence de peptides détectés le long de la séquence de protéine de l'actine du muscle squelettique et de la chaîne lourde de la myosine : la couleur rouge représente un nombre élevé d'identifications, le jaune représente un faible nombre d'identifications et le blanc représente des acides aminés non identifiés

IV. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats peptidiques de pataclet

L'hydrolyse enzymatique des protéines modifie ses propriétés fonctionnelles de façon importante. Les changements observés peuvent être bénéfiques ou non et dépendent de plusieurs facteurs, tels que le DH des protéines, la nature de la protéine et de l'enzyme utilisée. Dans ce cadre, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats ont été étudiées, à savoir la solubilité, les propriétés émulsifiantes, moussantes, le pouvoir de rétention d'eau et d'huile. Ces propriétés revêtent une grande importance dans la formulation des aliments (He et al., 2013).

IV.1. La solubilité

Parmi toutes les propriétés fonctionnelles, la solubilité est l'une des plus importantes (Witono et al., 2016), en raison de l'influence qu'elle exerce sur d'autres propriétés fonctionnelles telles que l'émulsification, la formation de mousse et la gélification (Park & Yoon, 2019). La solubilité des protéines de muscle de pataclet et de leurs deux hydrolysats a été déterminée dans une gamme de pH allant de 2 à 10 (**Figure 30**).

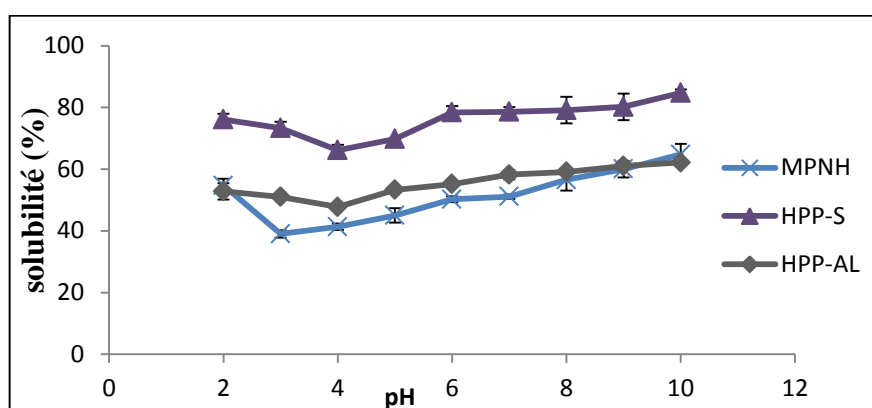


Figure 30: Etude de la solubilité de la matière azotée des protéines non digérées et de leurs hydrolysats dans différents pH allant de 2 à 10

L'analyse des résultats de la figure 29 permet de noter que les protéines intactes ont une solubilité moins importante que celle des hydrolysats HPP-S et HPP-AL ce qui est conforme aux observations antérieures de plusieurs auteurs (dos Santos et al., 2011; Islam et al., 2021; Jemil et al., 2014). L'hydrolyse enzymatique améliore la solubilité des protéines, probablement dû à la diminution du poids moléculaire et l'apparition de petits peptides hydrophiles chargés résultant de l'augmentation des groupes amines et carboxyliques libres (Gbogouri et al., 2004). En effet, l'étude de la solubilité des HPPs a montré que l'augmentation de la solubilité est proportionnelle à l'augmentation du DH. Elle augmente également avec le pH pour atteindre une valeur maximale de l'ordre de 85% pour HPP-S et 62 % pour HPP-AL à pH 10. Dans la gamme du pH utilisée, la solubilité était minimale à pH 4 pour les hydrolysats et à pH 3 pour les protéines intactes, ce qui signifie des pHi respectifs de valeur proche. La faible valeur du pHi (environ pH 3) des protéines intactes limite leur utilisation dans les aliments et les boissons acides. Les résultats de la solubilité des hydrolysats de muscle de pataclet sont semblables à ceux obtenus avec les hydrolysats des coproduits de salamon (Gbogouri et al., 2004), du muscle de selar (*Selaroides leptolepis*) (Klompong et al., 2007), de ver de farine (Leni et al., 2020) et du muscle de la perche (*Nemipterus japonicas*) (Naqash & Nazeer, 2013).

La bonne solubilité des hydrolysats peut affecter positivement d'autres propriétés comme les propriétés moussantes et émulsifiantes (Meenmanee et al., 2022).

IV.2. Les propriétés émulsifiantes

L'étude de propriétés émulsifiantes des différents hydrolysats de protéines du muscle de pataclet (HPPs) en comparaison avec le muscle de pataclet non hydrolysé (MPNH) a été réalisée (**Tableau 8**). HPP-AL affiche l'indice d'activité émulsifiante la plus élevée (169.61 m²/g) suivie par HPP-S (116.67 m²/g) et MPNH (52.82 m²/g). Cet indice d'activité diminue avec l'augmentation de la concentration. Les interactions protéine-protéine à l'interface de gouttelettes d'huile pourraient s'expliquer par l'agrégation ou la précipitation des protéines à haute concentration (Jemil et al., 2014). Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'Egerton et al. (2018) qui ont dévoilé qu'il y a une relation inverse entre l'indice d'activité émulsifiante et la concentration des hydrolysats de protéines de merlan bleu (*Micromesistius poutassou*) générés par différentes protéases (savinase, alcalase, protamex et flavourzyme). HPP-AL qui présente les propriétés émulsifiantes les plus élevées est également le plus efficace en termes de stabilité émulsifiante. Une hydrolyse plus poussée (DH de 15,42%) conduit à une perte de ces propriétés émulsifiantes. Ceci peut être lié à la présence de grandes quantités de petits peptides qui sont moins efficaces dans la réduction de la tension interfaciale. Les résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui montre que l'évolution de la capacité émulsifiante est inversement proportionnelle à l'augmentation du degré d'hydrolyse (Akbari et al., 2020; Mohanty et al, 2021; Hamed et al., 2022).

Tableau 8: *Activité émulsifiante et stabilité émulsifiante d'hydrolysats et de MPNH à différentes concentrations*

Concentration (%)	Indice d'activité de l'émulsion (IAE) (m ² /g)			Indice de stabilité de l'émulsion (min)		
	MPNH	HPP-AL	HPP-S	MPNH	HPP-AL	HPP-S
0,1	52,82±0,18 ^{Ac}	169,61±0,17 ^{Cc}	116,67±0,53 ^{Bc}	32,63±0,62 ^{Ab}	84,30±1,80 ^{bC}	76,18±0,89 ^{Bc}
0,5	28,2±1,03 ^{Ab}	66,71±2,73 ^{Cb}	45,96±0,51 ^{Bb}	19,75±1,08 ^{Aa}	26,12±1,05 ^{Ba}	38,16±0,16 ^{Cb}
1	23,12±1,20 ^{Aa}	36,60±1,03 ^{Ca}	33,26±0,28 ^{Ba}	19,11±0,10 ^{Aa}	25,7±0,33 ^{Ba}	26,78±0,40 ^{Ca}

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3)

a, b, c : différentes lettres minuscules dans les mêmes colonnes indiquent des différences significatives à différentes concentrations (p < 0,05). **A, B, C** : différentes lettres majuscules dans la même ligne signifient des différences significatives entre les hydrolysats (p < 0,05).

IV.3. Propriétés moussantes des hydrolysats

Les propriétés moussantes sont des propriétés de surface d'une grande signification dans l'agroalimentaire. Une mousse est une dispersion homogène de bulles de gaz dans une phase continue aqueuse.

Cette structure est recherchée dans de nombreux secteurs, notamment agroalimentaire et cosmétique. La stabilité d'une mousse constitue un critère important de sa qualité. Mais, la mousse est un système thermodynamiquement instable (surtout si elle possède une très grande surface interfaciale). Pour améliorer sa stabilité, des additifs tensioactifs sont utilisés. Il peut notamment s'agir des protéines intactes ou de leurs hydrolysats.

La capacité moussante et la stabilité moussante des HPPs et des protéines non digérées ont été déterminées à différentes concentrations (**Tableau 9**). Le tableau 9 montre que les hydrolysats préparés manifestent un pouvoir moussant, qui est bien évidemment, dose-dépendant. A toutes les concentrations utilisées, HPP-S avait le meilleur pouvoir moussant et le meilleur pouvoir stabilisant, suivi de HPP-AL puis des protéines intactes. Cette observation est en accord avec celle faite par certains auteurs (Ben Khaled et al., 2014). Le DH plus important est associé à une taille plus petite des peptides qui sont de meilleure solubilité et migrent plus rapidement vers la surface. Notre observation apparaît, cependant, en désaccord avec d'autres auteurs selon eux, les peptides de plus grande taille sont plus flexibles que ceux de petite taille et peuvent donc former un film de surface plus stable (Calderon-Chiu et al., 2021; González-Serrano et al., 2022; Mohanty et al., 2021; Wani et al., 2015).

Tableau 9: Capacité moussante et stabilité moussante des HPPs et de MPNH à différentes concentrations

Concentration (%)	Capacité moussante (%)			Stabilité moussante (%)		
	MPNH	HPPAL	HPP-S	MPNH	HPP-AL	HPP-S
0,1	18,75±1,25 ^{Aa}	20,66±0,94 ^{Aa}	32,81±2,20 ^{Ba}	12,37±0,17 ^{Aa}	12,66±0,94 ^{Aa}	20,31±2,20 ^{Ba}
1	24,37±0,44 ^{Ab}	29,99±2,90 ^{Bb}	55,93±0,49 ^{Cb}	20,16±0,23 ^{Ab}	23,88±2,54 ^{Bb}	34,37±1,50 ^{Cb}
2	36,87±0,88 ^{Ac}	63,99±2,54 ^{Bc}	87,31±0,62 ^{Cc}	25,82±1,17 ^{Ac}	43,33±2,70 ^{Bc}	56,25±0,54 ^{Cc}

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3)

a, b, c : différentes lettres minuscules dans les mêmes colonnes indiquent des différences significatives à différentes concentrations ($p < 0,05$). **A, B, C** : différentes lettres majuscules dans la même ligne signifient des différences significatives entre les hydrolysats ($p < 0,05$).

IV.4. La capacité de rétention d'eau et d'huile

La capacité de rétention d'huile (CRH) et la capacité de rétention d'eau (CRE) sont des propriétés recherchées par différents secteurs y compris l'industrie de confiseries et de pâtisseries. Un ingrédient à forte capacité de rétention d'eau et d'huile peut être utilisé pour améliorer la texture d'un produit et améliorer la jutosité des produits carnés.

La capacité de rétention d'huile et la capacité de rétention d'eau des HPPs et des protéines non digérées ont été déterminées (**Tableau 10**). Les résultats obtenus ont montré que les deux HPPs possèdent d'excellentes capacités d'absorption d'huile. Il a été prouvé qu'il y a une corrélation entre l'absorption d'huile et le DH. En effet, l'absorption d'huile par HPP-S (1,92 mL/g) est plus importante que celle de HPP-AL (1,8 mL d'huile/g) et MPNH (1,3 mL/g). Cependant, cette capacité est semblable à celle des hydrolysats des coproduits de la seiche (*Sepia officinalis*) (1,97 mL/g) (Balti et al, 2010) et des hydrolysats peptidiques de bonylip barb (1,94 mL/g) (Junianto et al., 2020). Latorres et al. (2018) ont émis l'hypothèse qu'une meilleure rétention de l'huile des hydrolysats proviendrait de l'exposition de groupes hydrophobes initialement enfouis à l'intérieur des protéines.

L'effet sur la rétention d'eau peut, quant à lui, être attribué au plus grand nombre de groupements carboxyles et amines résultant du clivage d'un plus grand nombre de liaisons peptidiques (Du et al., 2018).

Tableau 10: La capacité de rétention d'eau et d'huile des hydrolysats peptidiques HPPs et MPNH

Paramètres	HPP-S	HPP-AL	MPNH
Capacité de rétention d'eau (mL d'eau/g)	5,35±0,63 ^c	4,25±0,35 ^b	2,5±0,38 ^a
Capacité de rétention d'huile (mL d'huile/g)	1,92±0,24 ^b	1,8±0,28 ^b	1,3±0,14 ^a

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3)

a, b, c : différentes lettres minuscules dans les mêmes colonnes indiquent des différences significatives à différentes concentrations ($p < 0,05$). **A, B, C** : différentes lettres majuscules dans la même ligne signifient des différences significatives entre les hydrolysats ($p < 0,05$).

Chapitre 2 :

*Activité antioxydante et antibactérienne des
hydrolysats de protéines du muscle de pataclet
(HPPs) : mise en évidence et application dans la
conservation de la viande hachée*

Introduction

La contamination bactérienne et la modification oxydative sont deux causes majeures de l'altération et la perte d'une grande quantité de produits. L'inhibition ou le retardement de ces facteurs peut donc être d'un grand intérêt. Traditionnellement, on utilise dans ce but des substances synthétiques. Cependant, l'utilisation de ces additifs traditionnels a suscité des inquiétudes chez les consommateurs, puisqu'ils s'avèrent être toxiques après une longue utilisation vu leur effet cumulatif (Centenaro et al., 2011). De plus, l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes vis-à-vis des antibiotiques conventionnels est un problème qui ne cesse de croître. Il s'est alors avéré essentiel de développer des substances alternatives, avec une préférence pour l'origine naturelle. Parmi les différents composés candidats de cette origine, les dérivés des protéines paraissent être particulièrement prometteurs. En effet de nombreux peptides antioxydants et/ou antibactériens ont pu être préparés à partir de différentes protéines de diverses origines (Varona et al., 2023; Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Dans ce contexte, une étude a été menée sur l'étude des activités biologiques des hydrolysats de protéines extraites à partir de muscle de pataclet « *Diplodus annularis* ». Nous avons testé leur pouvoir antioxydant et antimicrobien suite à leur incorporation dans la viande hachée du bœuf.

I. Mise en évidence de l'activité antioxydante

Plusieurs tests ont été mis au point pour déterminer l'activité antioxydante d'une substance ou d'un échantillon. Il n'existe pas de tests *in vitro* de référence (ou universel) sachant que l'échantillon peut présenter divers mécanismes d'action. Pour cela, il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester.

Les capacités antioxydantes des HPPs ont été effectuées *in vitro* au moyen de nombreux tests (le test de piégeage du radical libre DPPH, le test de réduction des ions Fe^{3+} , le test du pouvoir chélateur de fer, le test de l'inhibition du blanchiment du β -carotène et l'activité antioxydante totale).

I.1. Activité antiradicalaire : Test au DPPH

La capacité du MPNH, des HPPs et du BHA (antioxydant synthétique utilisé comme contrôle positif) à céder un atome d'hydrogène aux radicaux libres est déterminée selon la méthode de décoloration du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) (**Figure 31**).

Ce radical libre est caractérisé par une coloration violette ayant une absorbance maximale à 517 nm. En présence d'antioxydant, le DPPH change de couleur en virant au jaune pâle, ce qui entraîne une diminution de son absorbance (Laskar et al., 2010).

Comme indiqué dans la figure 31, les protéines intactes et leurs deux hydrolysats étaient capables de céder des protons. Cette capacité était dose dépendante, et plus forte pour les hydrolysats que pour les protéines intactes ce qui est en plein accord avec la littérature (Nasri et al., 2014; Lassoued et al., 2015; Lassoued et al., 2022). En effet, HPP-S (DH= 15,42%) manifeste le meilleur pouvoir de neutralisation du DPPH avec une CI_{50} (la concentration en hydrolysats qui inhibe 50% de l'oxydation) de 3,76 mg/mL, alors que le pouvoir antiradicalaire de HPP-AL (DH= 8,14%) présente une CI_{50} de l'ordre de 4,48 mg/mL. Ces valeurs sont plus faibles que celles rapportées pour l'hydrolysats de muscle de la raie bouclée *Raja clavata* ($CI_{50} \geq 5$ mg/mL) (Lassoued et al., 2015) et de l'hydrolysats de muscle de mulet d'or (CI_{50} de l'ordre de 5,31 mg/mL) (Bkhairia et al., 2016). Cependant, elles sont plus grandes que celles rapportées par Noman et al. (2022) et Lassoued et al. (2022) pour l'hydrolysats de l'esturgeon hybride (*Huso dauricus*×*Acipenser schrenckii*) ($CI_{50}=2,10$ mg/mL) et l'hydrolysats de gélatine de raie bouclée (CI_{50} de 1-1,36 mg/mL).

En accord avec le plus fort pouvoir de HPP-S, des études précédentes ont montré que l'activité antioxydante augmente avec l'augmentation de DH et par conséquent la libération de peptides de petites tailles (De Quadros et al., 2019; Jemil et al., 2014; Noman et al., 2022; Taktak et al., 2021). La plus forte activité de HPP-S que HPP-AL peut être aussi attribuée à sa richesse en AA hydrophobes et en AA aromatiques (**Tableau 7**).

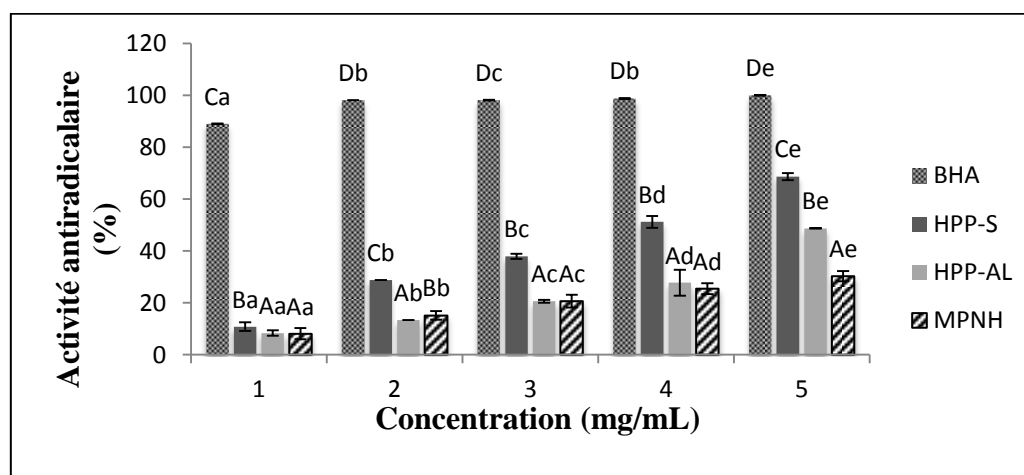


Figure 31: Activité antiradicalaire des HPPs et MPNH à différentes concentrations

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3)

a, e : différentes lettres minuscules indiquent des différences significatives à différentes concentrations dans les mêmes hydrolysats ($p < 0,05$). **A, D** : différentes lettres majuscules signifient des différences significatives entre les hydrolysats ($p < 0,05$)

I.2. Test du pouvoir réducteur du fer

Ce test est souvent utilisé pour évaluer la capacité d'une molécule antioxydante à réduire un oxydant en lui cédant un électron (Yildirim et al., 2001). Dans ce test, les hydrolysats protéiques réduisent les ions ferricyanures de potassium $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ en ferrocyanures de potassium $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ qui vont réagir par la suite avec les ions Fe^{3+} pour donner le bleu de Prusse qui est le ferrocyanure ferrique. L'intensité du complexe bleu augmente avec le pouvoir des hydrolysats à céder un électron ou un hydrogène.

L'activité antioxydante des HPPs préparés moyennant deux activités protéolytiques (savinase et alcalase) et du MPNH en fonction de leurs concentrations (1-5 mg/mL) a été également étudiée *via* le test du pouvoir réducteur (A 700 nm), en comparaison avec celle du BHA. Les résultats de la figure 32 montrent que le pouvoir réducteur des HPPs et du MPNH est dose dépendant. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Ben Slama-Ben Salem et al. (2017) et Chalamaiah et al. (2015) qui ont mis en exergue une corrélation entre le pouvoir réducteur des HPPs et de leurs concentrations. A 5 mg/mL, HPP-S présente le pouvoir réducteur le plus puissant ($\text{DO}_{700} = 1,929$) suivi par HPP-AL (DO_{700} est égale à 0,919) puis par MPNH (DO_{700} est égale à 0,786). Néanmoins, les valeurs de DO_{700} obtenues sont inférieures à celle du BHA qui est de l'ordre de 2,6. D'autre part, les pouvoirs réducteurs des HPPs sont supérieurs à ceux des hydrolysats protéiques de barbeau, dont la DO_{700} est de l'ordre de 1,83 (Sila et al., 2013), $\text{DO}_{700\text{nm}}=1,58$ pour l'hydrolysat de l'anguille (Bougatef et al., 2020), ainsi que ceux des hydrolysats protéiques de l'émissole lisse, baliste et de la seiche (DO_{700} varie entre 0,4 et 1,1) à une concentration égale à 5 mg/mL (Lassoued et al., 2021).

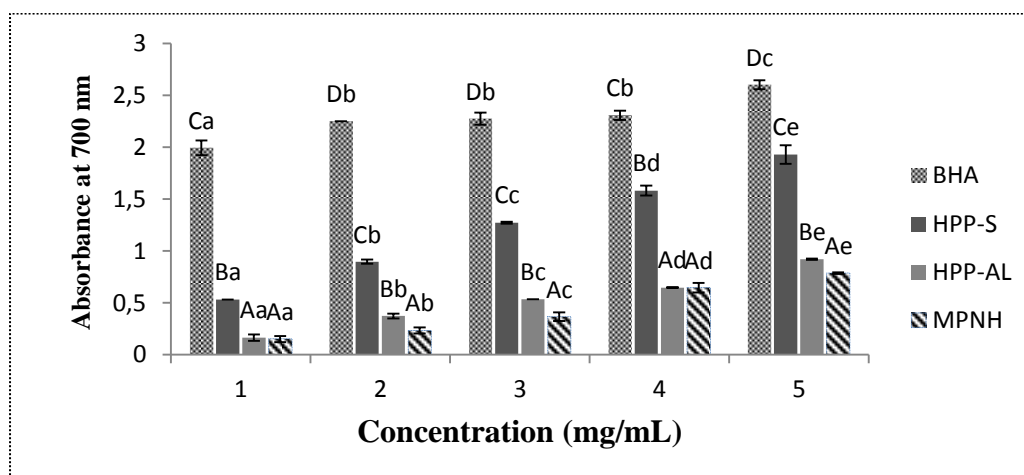


Figure 32: Pouvoir réducteur des HPPs et MPNH à différentes concentrations

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3)

I.3. Méthode de l'inhibition du blanchiment du β -carotène

Dans le même contexte, l'activité antioxydante des HPPs a aussi été évaluée par le test de blanchiment de β -carotène. Les résultats de ce test ont montré que l'addition des différents HPPs au mélange acide linoléique- β -carotène empêche le blanchiment de ce dernier avec des activités variables selon le DH et l'enzyme utilisée dans la préparation des hydrolysats protéiques. Les résultats ont montré également que ces hydrolysats protéiques présentent une capacité à inhiber la décoloration de β -carotène de façon dose-dépendante. HPP-AL ayant le DH le plus faible présente la meilleure activité antioxydante (56,11% à 5mg/mL), mais qui reste inférieure à celle du BHA (100%). Ce test montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le DH et l'activité antioxydante. Donc, on peut conclure que le pouvoir de piégeage des radicaux libres en milieu émulsionné des hydrolysats est dépendant de la séquence peptidique et la composition en acides aminés de la protéine ou des peptides présents (Qian et al., 2008).

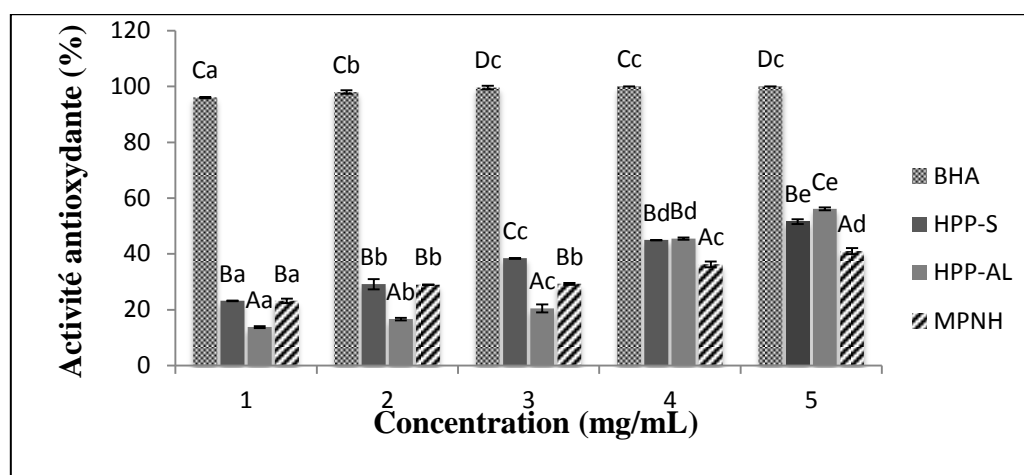


Figure 33: Le pouvoir inhibiteur du blanchiment du β -carotène des hydrolysats de protéines de pataclet et de MPNH à différentes concentrations (Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3))

I.4. Pouvoir chélateur des ions de fer

La recherche de nouvelles substances chélatrices des métaux de transition revêt un grand intérêt puisque ces dernières sont connues comme des catalyseurs puissants, induisant le procédé de peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation lipidique par la réaction de Fenton, en formant les premiers radicaux libres qui déclenchent les réactions oxydatives en chaîne. Cette oxydation provoque la décomposition des hydroperoxydes en radicaux peroxy et alcoxy qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne (Elmastaş et al., 2006).

Dans ce contexte, la capacité des HPPs ainsi que du MPNH, en comparaison avec l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA utilisé en tant que contrôle positif), à chélater les ions de fer a été étudiée. Les résultats illustrés sur la figure 34 indiquent clairement que le pouvoir chélateur des ions de fer est dose dépendant et que tous les échantillons dévoilent une activité antioxydante. Tout de même, le pouvoir chélateur des HPPs est largement supérieur à celui de la protéine non hydrolysée (22,33%, à 5 mg/mL). HPP-S (DH = 15,42%) montre la plus grande activité de chélation des ions Fe^{2+} à une concentration de 5 mg/mL, qui est de l'ordre de 85,1%, suivi par HPP-AL (62%). Les valeurs des CI_{50} relatives à l'effet chélateur des HPP-S (DH = 15,42 %) et HPP-AL (DH = 8,14%) sont de l'ordre de 2,19 mg/mL et 4,34 mg/mL, respectivement. Néanmoins, le pouvoir chélateur des deux hydrolysats protéiques demeure inférieur à celui de l'EDTA, pour toutes les concentrations testées. Chunkao et al. (2020) et Fan et al. (2023) ont révélé que cette capacité peut être attribuée à la forte hydrophobicité et à la forte abondance des acides aminés Asp, Glu et Pro dans les peptides présents.

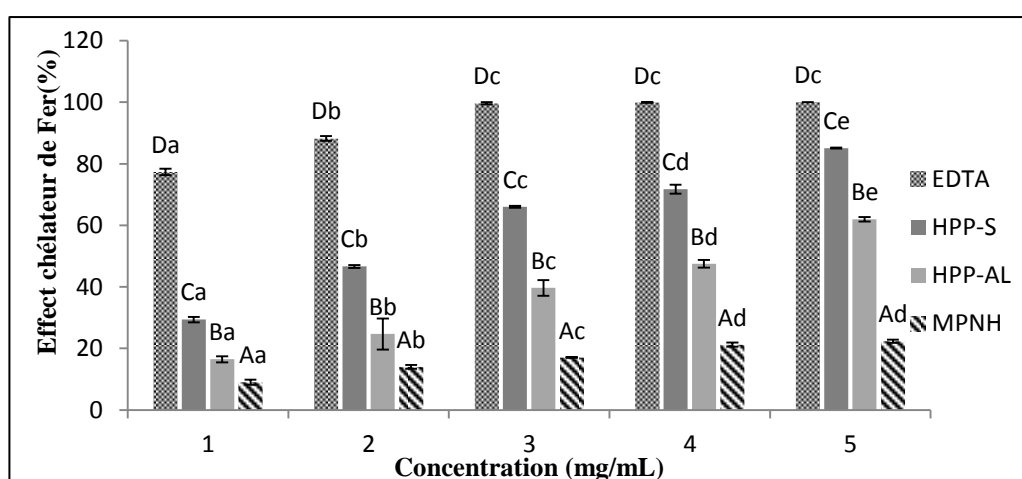


Figure 34: *Effet chélateur des ions de Fer des HPPs et MPNH à différentes concentrations.*

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3)

I.5. Evaluation de l'activité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale est basée sur la réduction du Mo (VI) en Mo (V) et la formation du complexe molybdophosphate qui présente une coloration verte ayant un maximum d'absorbance à 695 nm. Les résultats illustrés sur la figure 35 montrent que les HPPs présentent une activité antioxydante considérable en dose dépendante, mais elle reste inférieure à l'activité du BHA. Les activités antioxydantes totales de HPP-S, HPP-AL et MPNH sont de l'ordre de 163,64 μ mol/mL α -tocophérol équivalents, 100,46 μ mol/mL α -tocophérol et 60,37 μ mol/mL α -tocophérol, respectivement.

Ces résultats sont supérieures que ceux des hydrolysats de gélatine de la raie bouclée *raja clavata* et les hydrolysats de muscle de l'émissole lisse qui ont montré une efficacité antioxydante de l'ordre de 162 $\mu\text{mol/mL}$ et 102,64 $\mu\text{mol/mL}$ α -tocophérol équivalents, respectivement (Bougatet et al., 2009; Lassoued et al., 2022).

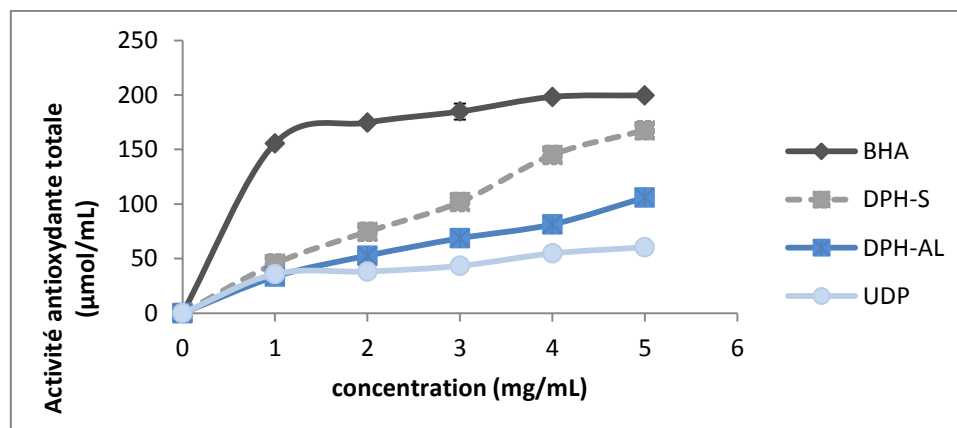


Figure 35: Activité antioxydante totale des HPPs et MPNH à différentes concentrations

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3)

II. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des hydrolysats peptidiques.

Dans cette étude, l'activité antibactérienne des hydrolysats a été évaluée, par la méthode de diffusion, contre sept souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) et *Enterococcus faecalis* pour les Gram-positifs et *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) et *Salmonella enterica* (ATCC 43972) pour les Gram-négatifs. Il est important de préciser que ces souches sont couramment impliquées dans l'altération biologique des denrées alimentaires, tant dans le secteur de la production que de la distribution (Borch et al., 2002). L'analyse de l'activité antibactérienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose et en se basant sur la mesure du diamètre (en mm) de la zone d'inhibition de la croissance de la souche indicatrice qui entoure le disque sur lequel l'échantillon a été déposé. Les résultats des activités antibactériennes exprimées en diamètre des zones d'inhibition (mm) sont récapitulés dans le tableau 11.

Tableau 11: Activité antibactérienne des hydrolysats HPP-S et HPP-AL et des protéines non digérées à une concentration de 10 mg/mL par mesure du halo d'inhibition (en mm)

Les bactéries testées	Diamètre d'inhibition (mm)			
	MPNH	HPP-AL	HPP-S	Ampicilline
Gram +				
<i>S. aureus</i>	7±0 ^b	10±1 ^b	19,5±0,50 ^d	29,33±0.76 ^c
<i>M. luteus</i>	6±1 ^{ab}	11,5±0.5 ^c	16,16±0,28 ^c	20±2 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	24±1 ^b
Gram -				
<i>E. coli</i>	6±1 ^{ab}	14,25±0,433 ^d	15,5±0,7 ^{bc}	25±1 ^b
<i>P. aeruginosa</i>	5±1 ^a	8±1 ^a	15±0 ^b	28±1.8 ^c
<i>K. pneumoniae</i>	5±0,5 ^a	8±1 ^a	8±1 ^a	23,5±1,32 ^b
<i>S. enterica</i>	10,5±0,5 ^c	12,16±0,76 ^c	24±0,5 ^e	29±1 ^c

(a-d) : Des lettres différentes dans la même colonne signifient des différences significatives entre l'activité antibactérienne de chaque échantillon contre les différentes bactéries ($p < 0,05$).

Selon les résultats obtenus, toutes les bactéries testées, à l'exception d'*Enterococcus faecalis* étaient sensibles aux échantillons. Il est possible que les hydrolysats ne contiennent pas de séquences peptidiques avec effet inhibiteur vis-à-vis de cette bactérie ou que la concentration des hydrolysats était trop faible pour montrer un effet. L'effet de l'hydrolyse sur les autres souches était dépendant de l'enzyme utilisée et de la souche bactérienne ciblée. La même capacité a été observée avec les hydrolysats d'autres protéines (Jemil et al., 2014; Wald et al., 2016; Atef et al., 2021; Lassoued et al., 2022). D'une manière générale, HPP-S était plus efficace que HPP-AL sauf vis-à-vis de la souche *K. pneumoniae* qui était pareillement inhibée par les deux hydrolysats. Cela est en accord avec Lassoued et al. (2022) et Wald et al. (2016) qui ont rapporté un effet favorisant de l'augmentation du DH sur l'activité antibactérienne. Notre observation paraît, au contraire, en désaccord avec, d'une part, Atef et al. (2021) qui n'ont pas observé d'effet du DH sur l'activité antibactérienne de l'hydrolysat de collagène de peau de poisson d'esturgeon (*Huso huso*), et d'autre part, Thamamsena and Liu. (2020) qui ont rapporté une corrélation négative entre l'activité antibactérienne et le DH.

Les différences dans l'activité antibactérienne des différents hydrolysats sont principalement liées à la composition du peptide, à la charge, à la structure secondaire, au caractère hydrophile/hydrophobe et à la solubilité dans l'eau (Cheng et al., 2013; Ghanbari et al., 2012). Selon Wang et al. (2018), la présence des peptides riches en résidus chargés positivement est importante pour tuer les bactéries à Gram-négatif et la présence d'une hydrophobicité élevée est pour tuer les bactéries à Gram-positif.

Les résultats présentés montrent une activité significative ($p \leq 0,05$) des hydrolysats du pataclet contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Cependant, de nombreuses études antérieures (Atef et al., 2021; Da Rocha et al., 2018; Jemil et al., 2014; Lassoued et al., 2022; Pezeshk et al., 2019) ont rapporté que les hydrolysats de protéines de poissons (*Sardinella aurita*, *Salaria basilisca*, *Zosterisesessor ophiocephalus*, *Dasyatis pastinaca* et *Umbrina canosai*) ont un effet antibactérien plus efficace contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Cela a été justifié, notamment, par la structure plus complexe de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif (Lauth et al., 2002). Dans l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que : *S. enterica* et *E. coli* étaient les microorganismes les plus sensibles vis à vis les deux hydrolysats (activité antibactérienne forte). Une activité de 24 mm était observée pour HPP-S contre *S. enterica*, et une activité de 15,5 mm contre l'*E.coli*. Cette observation est intéressante à souligner compte tenu de l'importance qu'elle pourrait avoir au niveau de l'application des hydrolysats.

Le Tableau ci-dessous reprend l'ensemble des concentrations minimales inhibitrices ou (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) pour les hydrolysats. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'inhiber la croissance de la souche bactérienne testée, après un temps d'incubation de 24 heures à 37 °C. La détermination de la CMI à partir d'un composé antibactérien est très importante. En effet, elle permet d'éviter l'utilisation du produit antibactérien en une quantité plus grande que celle nécessaire. Ainsi, elle permet d'éviter l'utilisation excessive de l'antibactérien et de prévenir l'apparition de problèmes de résistance bactérienne.

Tableau 12: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) pour les HPPs contre les différentes souches bactériennes.

Souches bactériennes	CMI(mg/mL)			CMB (mg/mL)		
	HPP-S	HPP-AL	Ampicilline	HPP-S	HPP-AL	Ampicilline
Gram -						
<i>E.coli</i>	1,56	3,12	0,39	1,56	6,25	1,56
<i>K.pnemonia</i>	100	100	1,56	> 100	> 100	3,12
<i>P.aeruginosa</i>	3,12	100	0,78	6,25	>100	0,78
<i>S.enterica</i>	0,78	25	0,39	0,78	100	0,39
Gram +						
<i>S.aureus</i>	0,78	25	0,78	0,78	50	0,78
<i>M.luteus</i>	1,56	6,25	0,78	6,25	25	0,78

Comparé au HPP-AL, HPP-S a montré des valeurs de CMI plus faibles sur les différentes souches testées, sauf pour *K. pneumonia* où les CMI sont égales. Toutefois, cet hydrolysate a montré une activité similaire à celle de l'ampicilline contre *S.aureus* (CMI=0,78 mg/mL) ce qui confirme l'efficacité de ces hydrolysats qui peuvent substituer les antibiotiques classiques causant de plus en plus des problèmes de résistance bactérienne aux antibiotiques. L'activité différente des deux hydrolysats peut être attribuée à leur composition différente en peptides. Ils pourraient, notamment, contenir des taux différents en peptides actifs et/ou peptides antagonistes à l'activité. Vis-à-vis certaines souches (*S.aureus* et *S.enterica*), la CMI de HPP-S était comparable ou proche de celle de l'ampicilline. On peut donc le classer comme agent antimicrobien à forte activité contre ces souches.

La CMB correspond à la concentration minimale de l'échantillon capable de réduire 99,9% de la totalité des bactéries présentes. Cette concentration variait avec l'hydrolysate et avec la souche. Alors qu'avec *K.pneumonia*, les deux hydrolysats avaient la même CMB, avec les autres souches le HPP-S avait une faible CMB. Comme c'était le cas pour la CMI, la CMB de HPP-S contre *S.aureus* et *S.enterica* était comparable ou proche de la CMB de l'ampicilline, ce qui confirme la valeur de cet hydrolysate comme agent antibactérien, spécialement contre ces deux souches.

Cette étude pourrait alors constituer une base pour la mise au point d'une nouvelle génération d'agents antimicrobiens naturels pouvant être utilisés comme conservateurs pour le stockage et la distribution de produits alimentaires.

III. Application des hydrolysats peptidiques dans la préservation de viande hachée de bœuf

La modification oxydative, la contamination microbienne et la couleur déterminent la qualité de la viande et son acceptabilité par le consommateur. L'efficacité des hydrolysats de *Diplodus annularis* dans le contrôle de ces paramètres a été évaluée sur la viande de bœuf hachée qui se caractérise par une sensibilité accrue à l'oxydation et à la pourriture.

III.1. Évolution de l'oxydation des lipides durant le stockage

III.1.1. Détermination des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

L'oxydation des lipides est un facteur important impliqué dans le processus de rancissement de la viande. Pendant le stockage de la viande à 4°C, l'oxydation des lipides a été évaluée par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique ou TBARS.

Les TBARS sont produits durant la seconde phase d'auto-oxydation durant laquelle les peroxydes sont oxydés en aldéhydes et en cétones tels que les malondialdéhydes (MDA). Les résultats sont présentés dans la figure 36. Comme attendu, l'effet a été le plus marquant pour le contrôle (ne possédant aucun additif). Les valeurs de TBARS ont été les plus élevées pour cette condition à la fin du stockage que pour les autres échantillons testés, comportant l'additif ($p \leq 0.05$). Les deux hydrolysats étaient capables de retarder l'oxydation de la viande d'une manière dose dépendante, avec cependant une plus grande efficacité de HPP-S. Au 11^{ème} jour de conservation, le taux de MDA/Kg, était égale à 4,12 mg /Kg dans l'échantillon contrôle négatif, 3,95 mg /Kg en présence de 1% de HPP-AL et 2,87 mg /Kg en présence de 1% de HPP-S. La meilleure efficacité de ce dernier est accord avec leur meilleure activité anti-oxydante in vitro, et leur plus grande richesse en AA hydrophobes. En effet, ces AAs sont capables de capter les radicaux libres par transfert direct d'électrons en améliorant l'interaction des peptides avec les lipides et agir ainsi comme des antioxydants (Daliri et al., 2017).

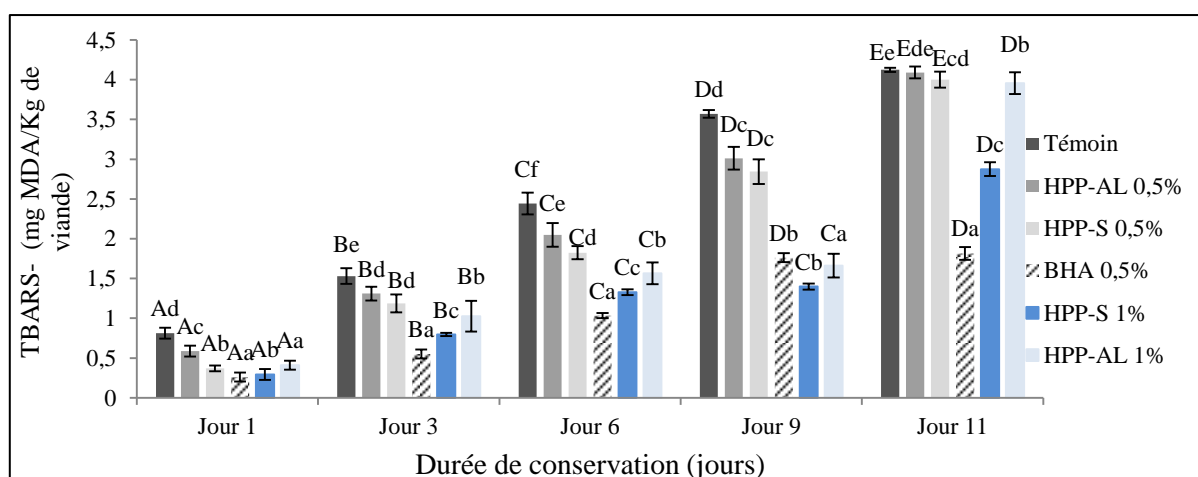


Figure 36: Évaluation de l'oxydation des lipides de la viande hachée traitée avec les deux HPPs aux concentrations de 0,5% et 1% et le BHA (0,5%) durant le stockage sous réfrigération (4°C)

T : Contrôle: viande sans additif; **BHA :** La viande avec un conservateur synthétique connu, BHA: 0,5%; **HPP-S 0,5% et 1% :** Viande hachée formulée en substituant le BHA par 0,5% et 1% de l'hydrolysate généré sous l'action de savinase; **HPP-AL 0,5% et 1% :** Viande hachée formulée en substituant le BHA par 0,5% et 1% de l'hydrolysate généré sous l'action de l'alcalase;

A-C : des lettres différentes indiquent des différences significatives pour la même formulation au cours de différents jours de stockage ($p < 0,05$).

a-e : des lettres différentes désignent des différences entre les formulations d'un même stockage ($p < 0,05$).

III.1.2. Evaluation des teneurs en diènes conjugués

Les diènes conjugués désignés comme produits d'oxydation primaire ont montré une augmentation dans les différents groupes de viandes hachées, suite à la production de substances hydroperoxydes (Hamdi et al., 2018). En effet, l'ajout du HPP-S et HPP-AL a entraîné une diminution de la production des diènes conjugués durant toute la période de stockage, en comparaison aux lots témoins et BHA (**Figure 37**). Cependant, cette réduction ne se manifeste qu'à partir de jour 6, avec une réduction importante pour le groupe à base de HPP-S 1% qui possède une activité équivalente à celle du BHA 0,5% (0,402 contre 0,393). Au jour 11, HPP-S 1% présente une activité contre l'oxydation des lipides de 0,544, non significativement différente de celle du BHA (0,532) et plus faible que le contrôle (1,167). La réduction de la production des diènes conjugués de 50% par rapport au témoin après 11 jours de conservation à 4°C a confirmé la très bonne potentialité de HPP-S pour lutter contre le rancissement de matrice alimentaire de type viande hachée. Ces résultats obtenus sont en accord avec les études rapportées par Bougateg et al. (2020) qui ont montré que l'incorporation des hydrolysats de protéines de sous-produits de l'anguille dans les viandes hachées (stockées à 4 °C pendant 11 jours) améliore la stabilité oxydative.

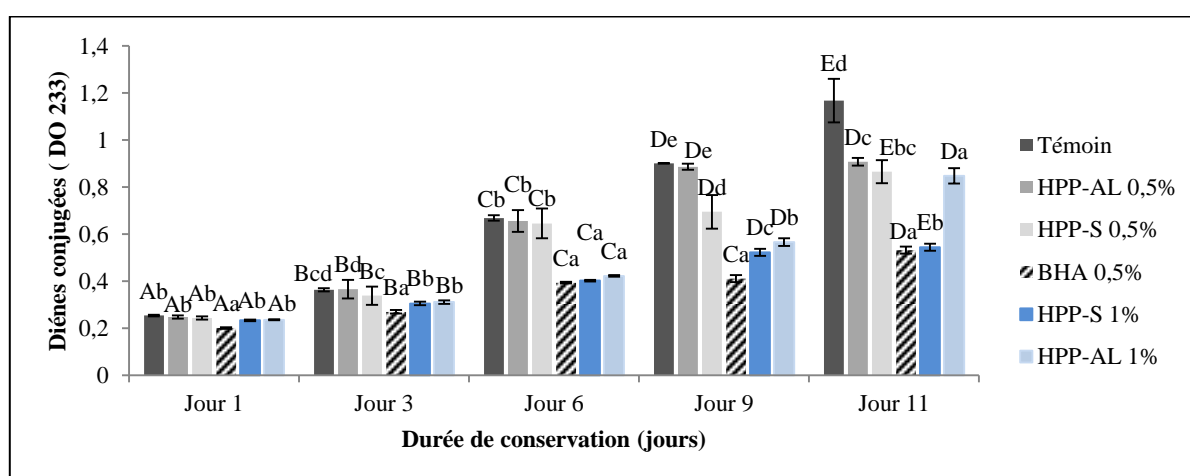


Figure 37: Evaluation des teneurs en diènes conjugués des différents échantillons au cours du temps de conservation.

III.1.3. Evaluation du taux de la metmyoglobine (MetMb)

La couleur rouge de la viande bovine est une caractéristique de la qualité sensorielle majeure qui conditionne la décision d'achat du consommateur (Ramanathan et al., 2020). En effet, la myoglobine est la responsable de cette couleur. Elle se trouve sous la forme de l'oxymyoglobine (OxyMb), de couleur rouge vif.

Cette couleur devient brunâtre lorsqu'elle est oxydée en metmyoglobine (MetMb) (Fadhil et al., 2023). Le pourcentage du MetMb (%) dans les échantillons testés a été suivi durant une période de stockage à 4°C de 11 jours (**Figure 38**).

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative entre les différents échantillons au début de la période de conservation. Les valeurs de MetMb ont été les plus élevées pour le groupe témoin à la fin du stockage que pour les autres, comportant l'additif ($p \leq 0.05$). La présence des hydrolysats a réduit le pourcentage du MetMb d'une manière dépendante de leur concentration. HPP-S avait produit le meilleur effet. A une concentration de 1%, l'hydrolysat avait réduit le MetMb avec la même amplitude que celle du BHA. Ces résultats confirment l'effet des hydrolysats dans la stabilisation et la protection de la myoglobine.

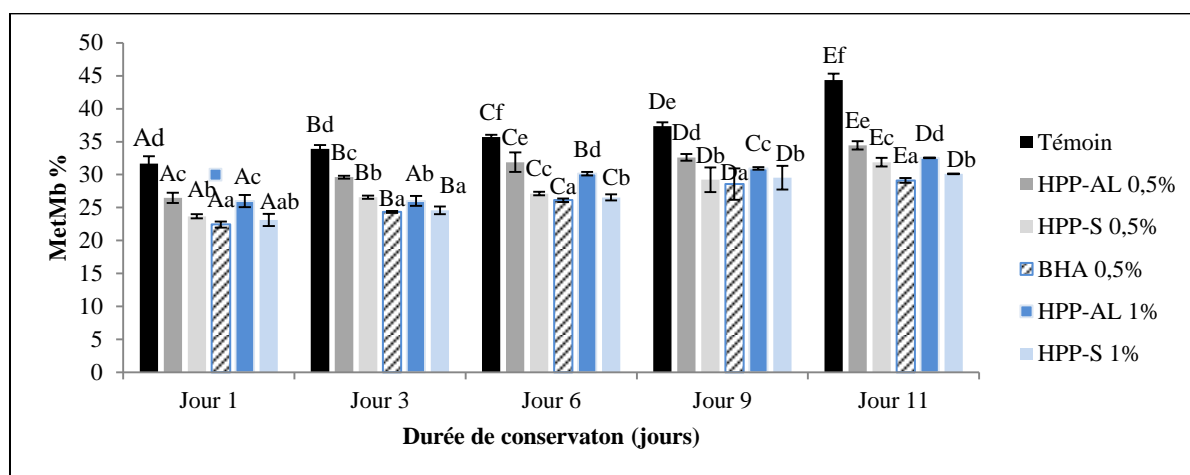


Figure 38: Evaluation des teneurs en MetMb des différents groupes de la viande au cours du temps de stockage.

III.1.4. Détermination de la teneur en Fer héminique

Le fer héminique est la forme de fer la plus assimilable par l'organisme. La viande et les produits à base de viande sont des sources importantes de ce fer. La concentration de cette forme de fer peut être en corrélation avec des indicateurs de qualité de la viande tels que les caractéristiques de couleur et l'oxydation des lipides. Cette concentration était évaluée dans des galettes de viande hachée de bœuf contenant le BHA, l'un des deux hydrolysats, ou sans additif. Comme le montre la figure 39, une diminution de la teneur en fer héminique a été observée tout au long des 11 jours de conservation pour le contrôle (ne possédant aucun additif). Cette diminution résulte de l'oxydation du fer héminique en fer non héminique ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + 1e$).

Au contraire, des échantillons de viande additionnés d'hydrolysats ou du BHA ont montré une augmentation dose-dépendante du niveau de Fe^{2+} au cours de la même période de conservation. L'effet des hydrolysats était plus fort à une concentration de 1% qu'à 0,5%. Aussi, quel que soit la concentration et le temps de stockage, le HPP-S était plus efficace que HPP-AL. A une concentration de 1%, il avait montré le même effet que le BHA.

La réduction de la teneur en fer héminique peut être due à la libération de fer causée par la perturbation de l'hème et l'augmentation des durées de stockage (Benjakul & Bauer, 2001), alors que son augmentation sous l'effet des antioxydants pourrait être due à l'augmentation du niveau de pigments héminiques solubles et à l'augmentation de l'extractibilité de ces pigments (Ozer & Saricoban, 2010).

L'effet des hydrolysats sur le taux de fer héminique coïncide avec leur effet sur l'évaluation du taux du MDA, des diènes conjugués et de la metmyoglobine (MetMb). Effectivement, le MDA et les diènes conjugués sont des produits de processus oxydatifs lesquels sont induits par le fer héminique (Charlotte et al., 2005) et le metmyoglobine résulte de l'oxydation du fer de l'oxymyoglobine.

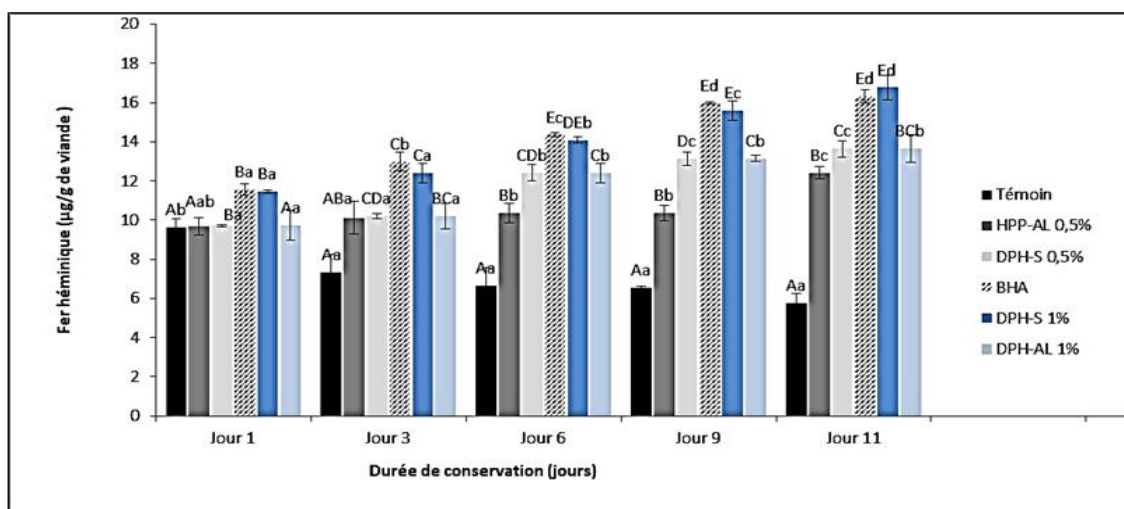


Figure 39: Evaluation des teneurs en fer héminique des différents groupes de la viande au cours du temps de stockage.

III.2. Croissances des microorganismes au sein de la viande durant le stockage

Afin d'apprécier l'effet antimicrobien de l'addition de HPP-S et HPP-AL dans la viande, plusieurs comptages microbiologiques ont été effectués tout au long des 11 jours de stockage à 4°C. La population microbienne totale a diminué de manière significative en présence d'additifs (Figure 40). En effet, le groupe témoin, sans traitement, possède la plus grande valeur de colonies totales en comparaison avec les groupes traités en fin d'expérience

($p \leq 0.05$). L'effet observé des hydrolysats était dose dépendant avec une plus grande efficacité significative de HPP-S par rapport à HPP-AL.

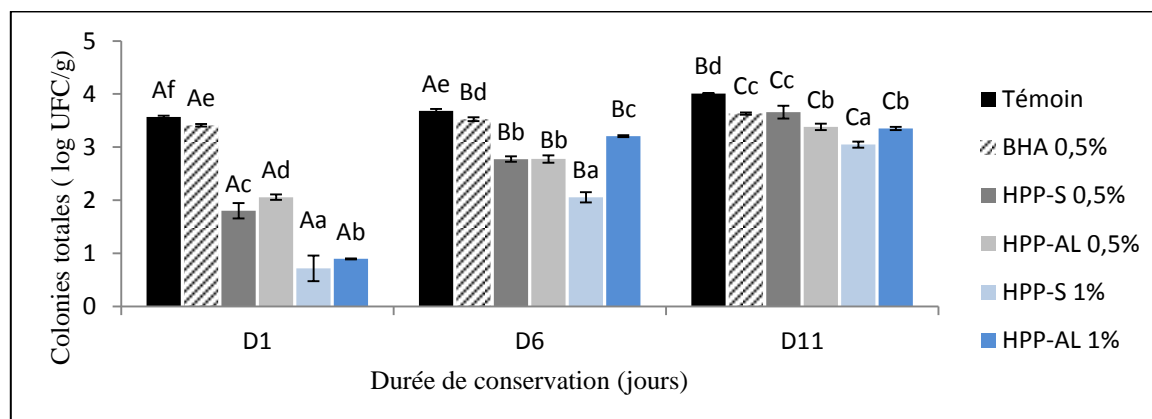


Figure 40: Évolution de la croissance microbienne totale au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHA (0,5%) et les HPPs aux concentrations de 0,5 et 1% durant 11 jours de conservation sous réfrigération (4°C)

A-C : des lettres différentes indiquent des différences significatives pour la même formulation au cours de différents jours de stockage ($p < 0,05$).

a-e : des lettres différentes désignent des différences entre les formulations d'un même stockage ($p < 0,05$).

Concernant les levures et les moisissures (**Figure 41**), les deux hydrolysats ont montré une efficacité d'une part dose-dépendante et d'autre part meilleure pour HPP-S. Au dernier jour de stockage, la différence a été significative entre le témoin et les conditions testées. HPP-S possède une croissance de levures et moisissures estimée à $3,09 \pm 0,01$ log UFC/g, contre $3,21 \pm 0,10$ log UFC/g pour HPP-AL et $2,96 \pm 0,015$ log UFC/g pour le BHA 0,5%. La croissance estimée au sein du témoin est de l'ordre de $4,56 \pm 0,07$ log UFC/g.

Ces résultats prouvent que les hydrolysats de pataclet, surtout le HPP-S, peuvent être proposés comme ingrédients pour retarder la contamination microbienne de la viande et l'amélioration de sa conservation.

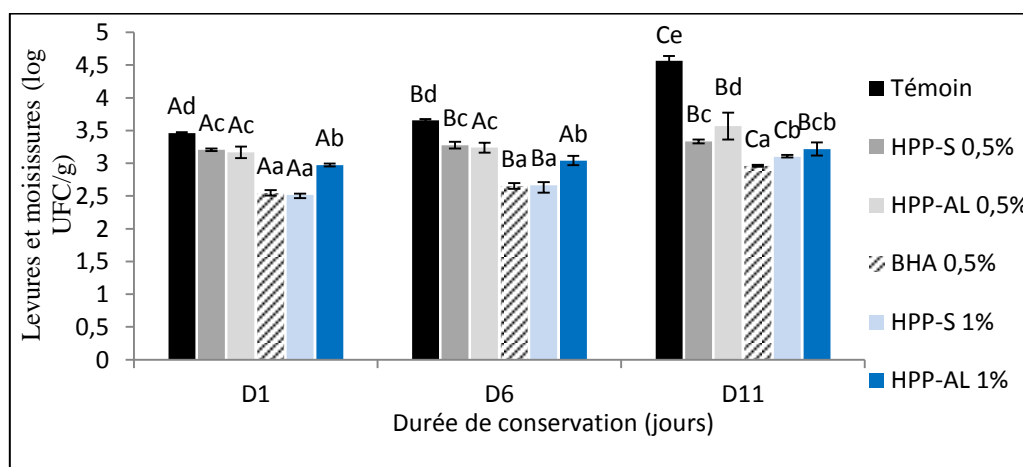


Figure 41: Évolution de la croissance des moisissures et des levures au sein de la viande non-traitée et traitée avec le BHA (0,5 %) et les HPPs aux concentrations de 0.5 et 1% durant 11 jours de conservation sous réfrigération (4°C).

III.3. Evaluation de la couleur

La couleur est un critère de qualité essentiel pour la commercialisation de la viande car elle influence les décisions d'achat et l'attractivité du point de vente pour les consommateurs. En effet, lors de l'achat des produits à la base de viande, le consommateur recherche une couleur rouge vif qu'il associe au degré de fraîcheur du produit. Les résultats obtenus concernant la variation de la couleur entre les groupes traités sont présentés dans le Tableau 13. D'après ces résultats, l'ajout des hydrolysats dans la formulation a entraîné une légère diminution des valeurs de luminosité (L^*), ces données sont en accord avec les résultats enregistrés par El-Saadony et al. (2021) qui montrent une diminution légère des valeurs de luminosité (L^*) suite de l'addition des hydrolysats de l'haricot rouge dans la viande hachée de bœuf pendant les 9 jours de stockage à 4°C. Nous avons marqué une diminution significative de l'indice du rouge (a^*) et du jaune (b^*) par rapport aux groupes contrôle et BHA ($p < 0,05$). Sur la base d'une observation visuelle, les couleurs des échantillons de viande ont été affectées par le temps de stockage, allant du rouge vif (état frais) et du rouge pâle au rouge foncé pendant le stockage réfrigéré. Cependant, la couleur du témoin est passée du rouge vif au brun foncé après 11 jours de stockage. Cette diminution peut s'expliquer par la détérioration des pigments héminiques au cours de stockage (Riel et al., 2017).

Tableau 13: Evaluation du couleur des différentes formulations au cours du temps de conservation.

	Echantillons	Jour 1	Jour 11
L*	T	42,34±0,21 ^{aB}	37,88±0,08 ^{aA}
	BHA	43,17±0,68 ^{aB}	40,24±0,01 ^{aA}
	HPP-S 0,5%	38,98±0,98 ^{aB}	38,22±0,17 ^{aA}
	HPP-S 1%	40,83±0,08 ^{aB}	39,84±0,35 ^{aA}
	HPP-AL 0,5%	38,62±0,20 ^{aB}	37,98±0,67 ^{aA}
	HPP-AL 1%	40,52±0,12 ^{aB}	38,88±0,40 ^{aA}
a*	T	9,03±0,14 ^{aB}	7,28±0,22 ^{aA}
	BHA	8,5±0,28 ^{aA}	10,5±0,34 ^{bB}
	HPP-S 0,5%	8,31±0,16 ^{aA}	7,31±0,11 ^{aB}
	HPP-S 1%	9,09±0,04 ^{aB}	7,36±0,25 ^{aA}
	HPP-AL 0,5%	8±0,18 ^{aB}	7,77±0,24 ^{aA}
	HPP-AL 1%	8,27±0,16 ^{aB}	7,89±0,45 ^{aA}
b*	T	10,58±0,01 ^{aB}	9,45±0,28 ^{aA}
	BHA	14,67±0,55 ^{cB}	12,94±0,72 ^{bA}
	HPP-S0,5%	13,68±0,94 ^{cA}	12,82±0,01 ^{bA}
	HPP-S 1%	14,22±0,18 ^{cA}	13,25±0,43 ^{bA}
	HPP-AL 0,5%	12,35±0,05 ^{bB}	10,64±0,05 ^{aA}
	HPP-AL 1%	12,73±0,31 ^{bA}	12,54±0,10 ^{Ba}

A-C : des lettres différentes indiquent des différences significatives pour la même formulation au cours de différents jours de stockage ($p < 0,05$).

a-e : des lettres différentes désignent des différences entre les formulations d'un même stockage ($p < 0,05$).

Chapitre 3 :

*Préparation de fractions de l'hydrolysate
protéique produit par la savinase,
investigation de leurs activités biologiques
(antioxydantes et antibactériennes), et
identification de peptides*

Introduction

Les peptides purifiés sont recherchés à des fins thérapeutiques et cliniques, ainsi que pour investiguer la relation structure-activité. Le fractionnement des mélanges peptidiques est souvent réalisé par les procédés de filtration membranaire et les procédés chromatographiques (Jang & Lee, 2005). Ces méthodes sont basées sur des phénomènes physicochimiques tels que la solubilité, la taille (chromatographie d'exclusion de taille, ultrafiltration...), la polarité (chromatographie d'adsorption), l'affinité (chromatographie d'affinité), l'hydrophobie de surface (chromatographie en phase inverse), la charge électrique (chromatographie échangeuse d'ions) ou la combinaison de la charge électrique et de la taille (électrophorèse, nanofiltration). Parmi toutes ces techniques, la chromatographie haute performance en phase inverse (RP-HPLC) est l'une des plus répandues. Cette méthode, basée sur la différence d'hydrophobicité de composés en mélange, est très bien adaptée pour le fractionnement des peptides. Grâce à sa haute capacité résolutive, elle est, en effet, couramment utilisée pour purifier les peptides bioactifs. Dans le cadre de notre étude, nous avons appliqué cette technique afin de fractionner l'hydrolysate des protéines du pataclet obtenu moyennant l'enzyme savinase qui avait montré la plus grande activité antioxydante et antibactérienne, à savoir le HHP-S.

I. Fractionnement de l'hydrolysate et identification des peptides

Dans cette étude, l'HPP-S, manifestant les meilleures activités antioxydantes et antibactériennes, a été fractionné par RP-HPLC préparative en utilisant une colonne C18 comme décrit dans le paragraphe IV du chapitre II « Matériels et Méthodes ».

Le profil RP-HPLC de l'HPP-S (Figure 42) révèle la présence de plusieurs pics, ce qui indique l'abondance de peptides dans ce hydrolysate. Ainsi, dix fractions (F1 à F10), correspondant chacune à l'éluat récolté durant 5 minutes, ont été récoltées et lyophilisées, puis leurs activités antioxydantes et antibactériennes ont été évaluées et les séquences peptides correspondant à chaque fraction ont été identifiées par approche peptidomique. Les rendements des fractions F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 sont de l'ordre de $9,3\pm 1,20\%$, $10,66\pm 1,10\%$, $11,54\pm 1,62\%$, $13,67\pm 0,64\%$, $6,33\pm 2,40\%$, $7,82\pm 3,22\%$, $8,28\pm 1,73\%$, $9,41\pm 0,33\%$, $4,6\pm 2,11$ et $1,4\pm 0,82\%$, respectivement.

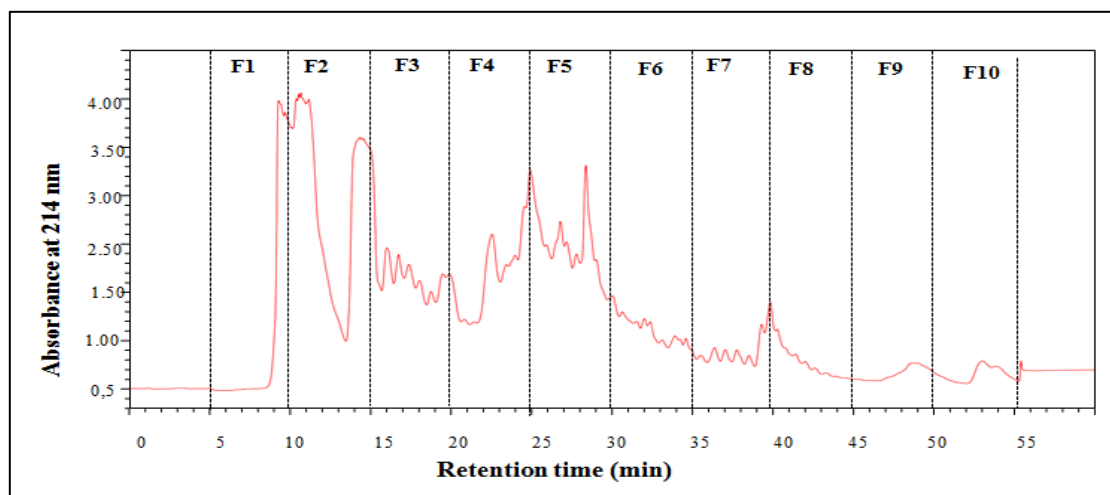


Figure 42: Profil chromatographique de fractionnement de l'hydrolysate HPP-S à 214 nm par RP-HPLC préparative, analysés par colonne de type C18 (250 mm × 21.2 mm, Uptisphere CS EVOLUTION, Interchim, France).

Afin d'identifier les séquences peptidiques, les fractions obtenues ont été soumises à l'analyse par couplage UPLC-MS/MS sur une colonne de silice C 18 en phase inverse. Les chromatogrammes en courant ionique total (TIC) de chaque fraction (F1-F10) sont illustrés dans la figure 43 A (F1 à F10), où plus l'aire sous la courbe TIC est élevée, plus le nombre de peptides est élevé. Par conséquent, le profil TIC de la fraction F4 révèle un très grand nombre d'ions relatifs à l'abondance d'un nombre élevé des peptides générés. Ce résultat est confirmé par le nombre de scans MS, de scans MS/MS et de peptides uniques identifiés (Figure 43 B). En effet, les histogrammes démontrent que le nombre de scans MS est inversement proportionnel à ceux de MS/MS et de peptides uniques identifiés, suggérant que lorsque le nombre d'ions intenses est élevé, le rapport masse sur charge (m/z) des ions sont facilement mesuré en MS (donc le nombre de scans MS est faible) au profit de la fragmentation MS/MS pour optimiser l'identification des peptides. Inversement, lorsque le nombre et l'intensité des ions sont faibles, la mesure MS est prioritaire (donc le nombre de scans MS est élevé) au détriment du nombre de scans MS/MS et de l'identification des peptides.

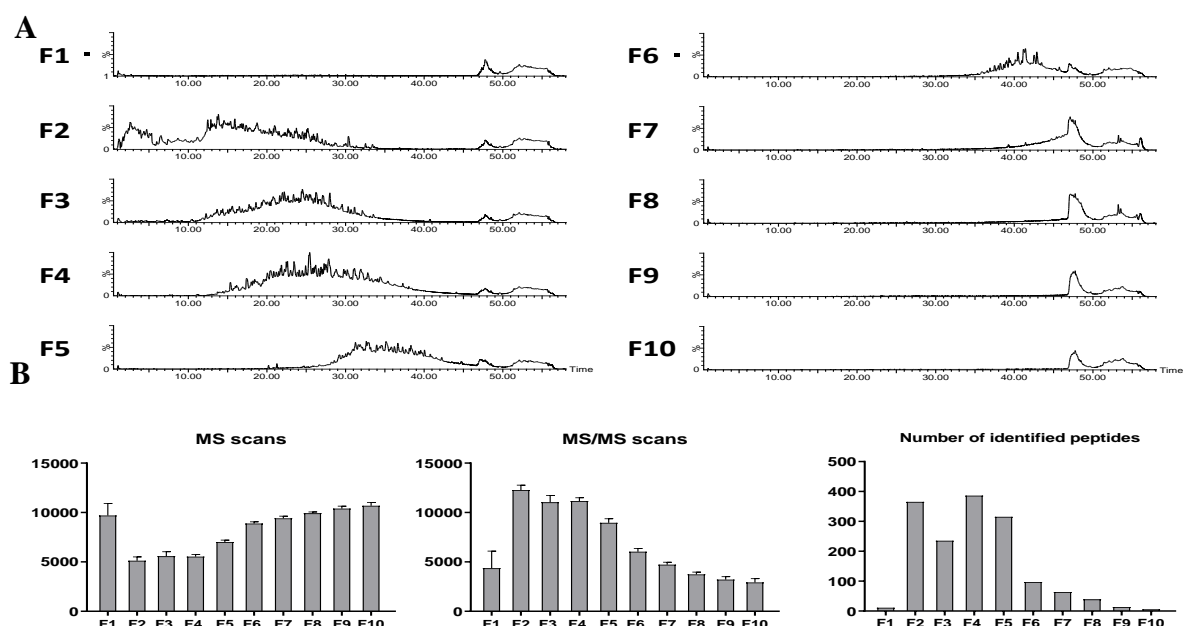


Figure 43: Analyse peptidomique par RP-HPLC-MS/MS de dix fractions (F1 à F10) de HPP-S (hydrolysats générés par la savinase). (A) Chromatogrammes de courant ionique total (TIC), (B) nombre de scans MS, scans MS/MS et peptides uniques identifiés

II. Activité antioxydante des fractions

Les propriétés antioxydantes des différentes fractions ont été déterminées. Comme indiqué dans le tableau 14, les fractions (de F2 à F6) présentent un pouvoir antioxydant significatif. Il est intéressant de noter que la fraction F4 présente le pouvoir antioxydant le plus élevé ($p < 0,05$) que les autres fractions actives. À une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$, elle affiche un taux de piégeage du DPPH de 97,28 %, une activité chélatrice de 80,26%, et une capacité antioxydante totale de 68,72 $\mu\text{mol/mL}$.

Tableau 14: Distribution de la masse moléculaire des fractions peptidiques et leurs propriétés antioxydantes

Fractions	Masse moléculaire (Da)	Activités antioxydantes		
		Activité antiradicalaire (%)	Activité de chélation de Fer (%)	Capacité antioxydante totale ($\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Fraction 1 (11 peptides)	770-2195	18,94 \pm 1,25 ^b	23,73 \pm 0,99 ^c	28,09 \pm 0,12 ⁱ
Fraction 2 (394 peptides)	647-2575	88,84 \pm 0,41 ⁱ	75,70 \pm 0,99 ^g	60,04 \pm 0,57 ⁱ
Fraction 3 (256 peptides)	705-2056	84,0 \pm 0,25 ^h	65,44 \pm 0,99 ^f	41,54 \pm 0,64 ^h
Fraction 4 (408 peptides)	655-2489	97,28 \pm 0,33 ^j	80,26 \pm 1,09 ^h	68,72 \pm 0,89 ^j
Fraction 5 (334 peptides)	697-3035	82,29 \pm 1,66 ^g	65,37 \pm 0,89 ^j	39,63 \pm 0,89 ^g
Fraction 6 (117 peptides)	846-3333	69,06 \pm 0,16 ^f	36,65 \pm 0,79 ^e	18,59 \pm 1,09 ^c
Fraction 7 (63 peptides)	855-4851	66,41 \pm 1,4 ^e	15,16 \pm 0,99 ^b	24,9 \pm 0,38 ^e
Fraction 8 (39 peptides)	855-5185	25,79 \pm 0,54 ^d	23,38 \pm 0,89 ^c	22,31 \pm 0,83 ^d
Fraction 9 (13 peptides)	684-4851	21,13 \pm 0,5 ^c	25,77 \pm 1,09 ^d	13,22 \pm 0,7 ^b
Fraction 10 (5 peptides)	700-3458	16,35 \pm 1,75 ^a	10,04 \pm 0,49 ^a	4,45 \pm 0,8 ^a

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3)

D'après les résultats de RP-HPLC-MS/MS, on observe que tous les peptides identifiés à partir des fractions (F2 à F6), ont des masses moléculaires (MM) relatives variant de 647 à 3333 Da. Au total, 1456 peptides uniques ont été identifiés à partir de dix fractions. Comme le montre la figure 44, les fractions de F2 à F6 contiennent la grande majorité des peptides de MM à 2000 Da. Parmi eux, 408 peptides uniques ont été identifiés dans la fraction 4 et 70% de ces peptides ont une masse moléculaire inférieure à 1250 Da et ils sont entre 7 et 39 acides aminés de longueur. Ainsi, d'après la littérature et les résultats obtenus on peut conclure que les peptides antioxydants sont de petites tailles (Jemil et al., 2017; Li et al., 2017; Wongsrangsap & Chukiatsiri, 2021). Par ailleurs, la présence des AAs hydrophobes dans la séquence des peptides confère à cette dernière un pouvoir antioxydant intéressant.

Dans la fraction 4, la plupart des peptides avaient un degré d'hydrophobicité (> 50%). Parmi les peptides identifiés dans la F4, MILPVGAA et DIPGPPIGPV sont les plus hydrophobes. Effectivement, Bhandari et al. (2020) ont rapporté que la présence d'acides aminés hydrophobes, tels qu'Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Tyr (Y) et Val (V) est responsable de l'augmentation du potentiel antioxydant, ce qui explique l'activité antioxydante observée au niveau de cette fraction. Des études antérieures ont montré qu'une proportion élevée d'acides aminés hydrophobes a été rapportée dans les peptides à forte activité antioxydante, tels que Phe-Lys-Gly-Pro-Ala-Cys-Ala (MM = 692 Da) de Bombyx du mûrier (Zhang et al., 2021), Gly-Phe-Thr-Gly-Pro-Pro-Gly-Phe-Asn-Gly (MM=950 Da) de cartilage de requin-marteau halicorne (*Sphyrna lewini*) (Li et al., 2017) et Leu-Asn -Lys-Asp-Leu-Met-Arg (MM = 905 Da) de *Samia ricini* pupes (Wongsrangsap & Chukiatsiri, 2021).

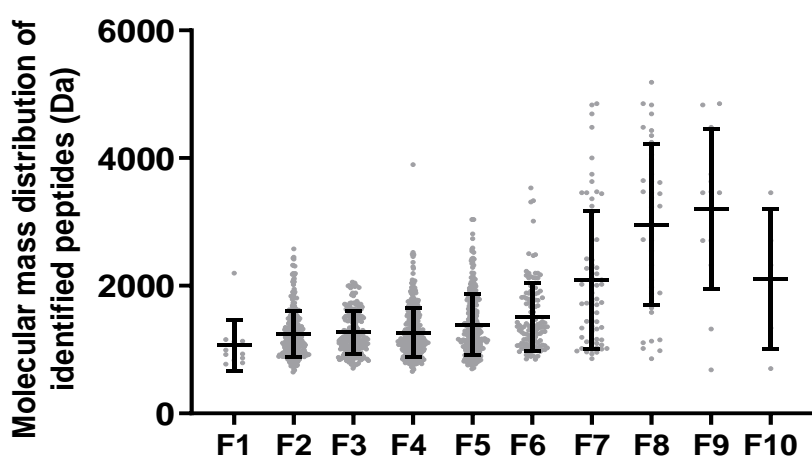


Figure 44: Distribution de la masse moléculaire des peptides identifiés

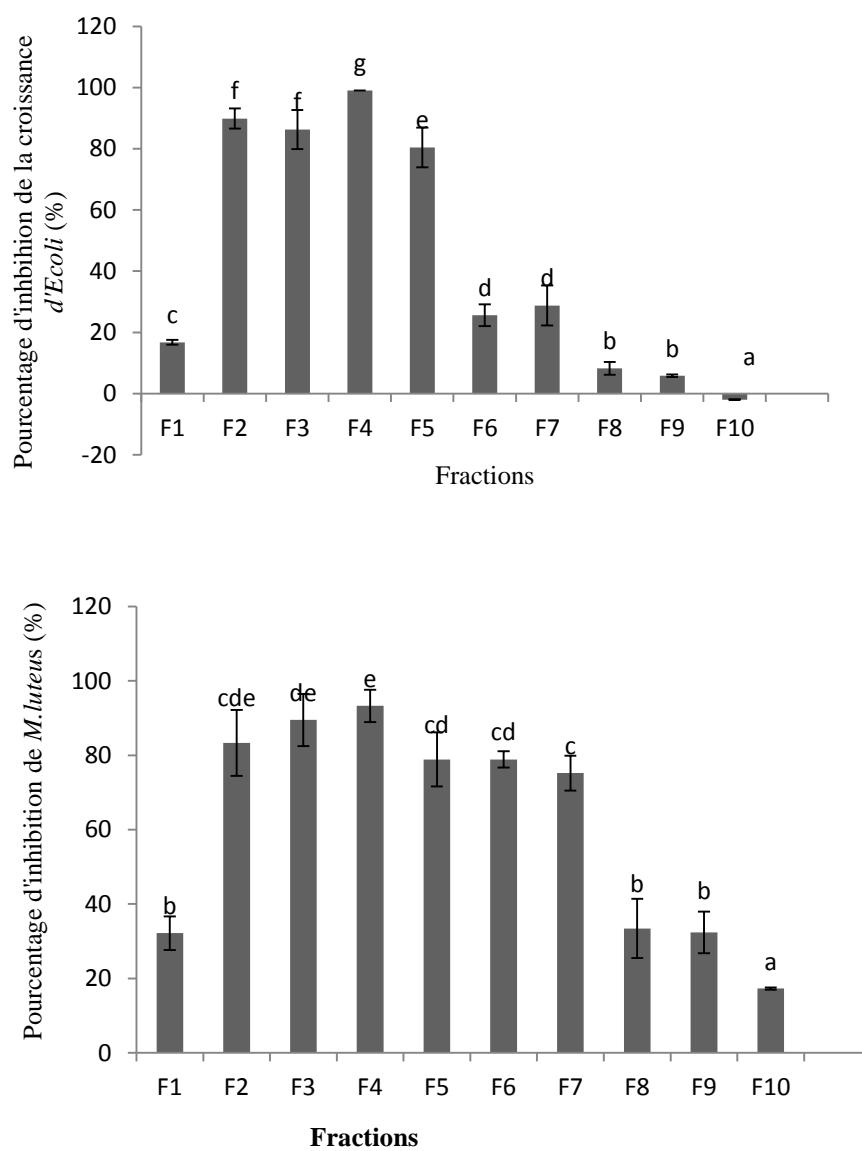


Figure 45: Pourcentage d'inhibition de la croissance d'*E. coli* et *M. luteus*

Discussion Générale

Discussion générale

Les développements récents de la recherche en biotechnologie marine laissent deviner des perspectives prometteuses en matière de valorisation des ressources d'origines marines dans diverses disciplines industrielles et dans la production de substances à haute valeur ajoutée destinées aux marchés de l'alimentation, la nutrition, la cosmétique et la thérapeutique. Au cours des dernières décennies, les substances naturelles et notamment celles d'origine marine ont connu un intérêt croissant dans le développement de nombreux produits de consommation (Gao et al., 2021). Un tel engouement est justifié par plusieurs facteurs dont l'accessibilité, le bas prix, l'échec de certains traitements pharmaceutiques conventionnels et les effets indésirables des substances actives traditionnelles. De plus, la grande hétérogénéité biologique et d'environnement du monde marin rend envisageable l'obtention de composés ayant des propriétés uniques. Parmi les différentes substances maritimes pouvant servir source de fonctionnalité et bioactivité, les protéines sont des plus valables. En effet, la littérature regorge de preuves ne laissant aucun doute sur la bonne qualité de ces protéines et leur détention d'un réel potentiel biologique et fonctionnel. En effet, les nombreuses études réalisées ont prouvé leur composition avantageuse en acides aminés et leur bonne digestibilité ainsi que la production de propriétés bioactives et fonctionnelles multiples suite à leur hydrolyse limitée. Nous savons aujourd'hui que ces propriétés sont attribuables aux peptides générés et que leur nature et leur magnitude reflète les propriétés physicochimiques de ces peptides et leurs concentrations relatives, lesquels dépendent de la nature des protéines initiales, de spécificité de l'enzyme utilisée et des conditions d'hydrolyse. Ainsi, à chaque fois qu'on utilise des protéines et une activité enzymatique particulière, dans des conditions précises d'hydrolyse, on génère un mélange de peptides avec des propriétés physiques données, et donc une fonctionnalité et bioactivité données. En conséquence, la variété des peptides et des propriétés pouvant être obtenue par hydrolyse est très large. De plus, la possibilité de pouvoir produire l'activité désirée en « orientant convenablement l'hydrolyse » peut être raisonnablement envisagée. Une telle possibilité sera appréciable par les chercheurs ainsi que par les industriels (agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique) et le personnel de la santé. En pratique, toute hydrolyse utilisant une « combinaison » singulière des protéines, enzymes et conditions de réaction, enrichie la panoplie d'activités.

Notre travail de thèse est à placer dans ce contexte. Nous avons choisi d'utiliser le produit d'un poisson sans grande valeur marchande ce qui est, en principe, de nature à

permettre l'obtention de produit à prix modéré. Notre travail était construit de différentes parties.

La première partie a débuté par la production de deux hydrolysats au DH final en soumettant les protéines du muscle du pataclet à l'action séparée de l'alcalase et la savinase. Le choix de ces enzymes était basé sur leur grande efficacité hydrolytique montrée sur diverses protéines (Egerton et al., 2018; Bougateg et al., 2020; Vázquez et al., 2020; Yathisha et al., 2022). Les hydrolysats produits étaient ensuite comparés par leurs DH, leur composition chimique, leur profil d'acides aminés, l'hydrophobicité de leurs peptides, composition peptidique (analyse peptidomique) et propriétés fonctionnelles. Le suivi de l'hydrolyse des protéines, *via* le degré d'hydrolyse (DH), a montré que par rapport à l'hydrolysate généré par l'alcalase, l'hydrolysate produit par la savinase avait un plus fort DH (15,42% vs 8,14%) cela montre une plus grande efficacité de la savinase à hydrolyser les protéines du muscle du pataclet. En accord avec notre observation, l'alcalase hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques du côté C-terminal des résidus hydrophobes, alors que la savinase a une spécificité large (Vogelsang-O'Dwyer et al. 2022). Les résultats de plusieurs études ont montré que les caractéristiques propres à l'enzyme utilisée et les conditions de la réaction d'hydrolyse (spécificité, température optimale, pH, temps de réaction, rapport [enzyme]/[substrat]...) influencent fortement la composition en peptides de l'hydrolysate généré, ce qui, à son tour, détermine ses propriétés fonctionnelles, biologiques et nutritionnelles (He et al, 2013).

L'analyse de la composition chimique des hydrolysats peptidiques (HPP) montre des teneurs élevées en protéines avec cependant une plus grande teneur dans l'hydrolysate généré par la savinase. La différence entre les DH peut justifier la différence de leur taux de protéines.

La littérature rapporte qu'une teneur en lipides d'un hydrolysate doit être <5% lui donne une bonne stabilité vis-à-vis des modifications oxydatives. Les hydrolysats que nous avons préparés avaient des teneurs en lipides nettement plus faibles que 5% ce qui est un argument pour leur bonne stabilité. Parmi les deux hydrolysats, celui produit par la savinase avait le taux de lipides le plus faible. Cela est attribuable au plus fort DH qui est susceptible d'extraire plus de lipides.

Dans les deux hydrolysats, le taux des cendres était nettement plus fort que dans les protéines non digérées. L'augmentation de ces éléments qui avait accompagné l'hydrolyse était probablement attribuable à l'ajout de la base NaOH au cours de la réaction d'hydrolyse (Kristinsson et Rasco, 2000).

En accord avec cela, les cendres étaient plus présentes dans l'hydrolysats ayant le DH le plus fort, ce qui veut dire plus de liaisons peptidiques clivés générant plus de H⁺ libéré et, donc, plus de NaOH nécessaire pour maintenir le pH stable.

L'analyse de la composition en AAs montre un taux en AAE plus grand dans les protéines intactes que dans les hydrolysats. Les AA majoritaires dans les deux hydrolysats sont, dans l'ordre décroissant, Glu, Lys et Asp. Leur richesse en AA acides leur donne le potentiel de servir comme exhausteurs de goût des aliments (Witono et al., 2016), alors qu'ils peuvent servir comme complément pour corriger le contenu en Lys de certains régimes comme ceux à base de produits d'origine végétale. Par leur profil d'acides aminés, les hydrolysats donnent satisfaction aux recommandations de la FAO/WHO (EAAs/TAAAs $\geq 0,40$ et AANes/AAEs $\geq 0,60$). Les aminogrammes révèlent aussi la richesse des HPPs en acides aminés hydrophobes (AAH) par rapport au muscle de pataclet non hydrolysé (37,86%). De plus, on remarque que l'hydrolysats généré par la protéase savinase est plus riche en AAH (39,72%) en comparaison avec HPP-AL (39,18%). Par conséquent, cette différence en teneurs en acides aminés hydrophobes peut être concomitante avec la spécificité de coupures des enzymes utilisées. En conséquence, la présence des résidus hydrophobes (Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Tyr (Y), et Val (V)) peuvent conférer aux biopeptides des propriétés antioxydantes intéressantes, vue qu'elle favoriseraient les interactions entre les peptides et les lipides (Bhandari et al., 2020). Cette variation dans la composition en AAs entre les deux différents hydrolysats est due à la variation de la matière première, la spécificité de l'enzyme et les conditions différentes de l'hydrolyse (Chalamaiah et al., 2012).

En accord avec son plus fort DH, l'hydrolysats généré par la savinase a montré par RP-HPLC une plus grande hétérogénéité. Cela est confirmé par RP-HPLC MS/MS qui a révélé la présence de 906 peptides dans HPP-S contre seulement 536 peptides dans HPP-AL, avec 258 peptides communs aux deux hydrolysats. Les protéines mères de l'essentiel de ces peptides étaient l'actine A du muscle squelettique alpha et la chaîne lourde de myosine du muscle squelettique.

Des propriétés fonctionnelles principales étaient étudiées dans les hydrolysats présents. La solubilité était augmentée par l'hydrolyse d'une manière positivement liée au DH. Cette augmentation était justifiable par la diminution de la taille et l'augmentation de nombre de groupement polaires (COOH et NH₂) (Tavano, 2013). Il est reconnu que la solubilité d'un échantillon affecte d'autres propriétés. Effectivement, l'amélioration de la solubilité des protéines du pataclet par hydrolyse était associée à une amélioration de leurs propriétés émulsifiantes et moussantes.

La présence de groupements polaires dans un échantillon lui permet d'interagir et retenir l'eau. Un plus grand nombre de tels groupements permet une plus grande rétention d'eau. Par rapport à l'hydrolysat HPP-AL, HPP-S, qui a un plus grand DH et donc plus de groupements polaires, avait effectivement montré une plus grande capacité de rétention d'eau. Les hydrolysats avaient également affiché une plus grande capacité de rétention d'huile. En effet, des AAs hydrophobes, initialement dans le noyau des protéines, peuvent être dégagés par l'hydrolyse (Latorres et al., 2018) et participer activement dans la rétention d'huile.

L'hydrolyse affecte les propriétés des protéines de différentes manières. En l'occurrence elle diminue la taille, augmente le nombre de groupements polaires et fait naître ou renforce le caractère hydrophobe en laissant s'exprimer des AA hydrophobes qui ne le pouvait pas dans les protéines intactes. Ainsi, elle produit des peptides avec une meilleure solubilité et qui possèdent un caractère amphiphile lui permettant d'occuper l'interface huile-eau groupement polaire du peptide (Gao et al., 2019). Ces différents effets de l'hydrolyse peuvent expliquer l'amélioration des propriétés émulsifiantes et moussantes des hydrolysats des protéines du pataclet suite à leur hydrolyse. Nos observations suggèrent la possibilité pour les hydrolysats préparés de servir comme ingrédients fonctionnels pour les produits alimentaires. Cependant, leur éventuelle utilisation comme émulsifiants devra éviter l'utilisation de fortes concentrations. En effet, un accroissement de la concentration de HHP-S et HPP-AL avait négativement impacté leur pouvoir émulsifiant. Une agrégation ou précipitation peut être observée à des fortes concentrations de protéines (Jemil et al., 2014).

Dans la deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur l'évaluation du potentiel antioxydant et antibactérien de HPP-S et HPP-AL, avec leur application dans la conservation de galettes de viande de bœuf hachée. En effet, les résultats obtenus ont permis de montrer que la capacité antioxydante était dose dépendante, et plus forte pour les hydrolysats que pour les protéines intactes.

Les deux hydrolysats se sont comportés comme antioxydants primaires (antiradicalaires). En effet, les résultats des tests anti DPPH et pouvoir réducteur du fer prouvent leur capacité à donner des protons (piégeur de radicaux) et des électrons (pouvoir réducteur). Ces hydrolysats avaient également les compétences d'antioxydants secondaires (préventifs) comme l'a montré leur efficacité à chélater le métal de transition (Fer) ce qui est de nature à prévenir la génération des radicaux libres. En outre, HPP-S et HPP-AL étaient efficaces, non seulement en milieu aqueux, mais aussi en milieu lipidique comme le prouve leur capacité à atténuer la décoloration de la bêta carotène.

En accord avec la littérature, le HPP-S qui avait le plus grand DH (Wongsrangsap & Chukiatsiri, 2021, Taktak et al., 2021.) et le plus fort contenu en AA hydrophobes et en AA aromatiques (Fan et al., 2023), avait aussi un plus grand potentiel antioxydant que HPP-AL. Dans le test anti-DPPH, son CI_{50} était égale à 3,76 mg/mL contre un $CI_{50}=4,48$ mg/mL pour HPP-AL.

Le potentiel antibactérien de HPP-AL et HPP-S a été examiné vis-à-vis de 7 souches bactériennes responsables d'intoxications alimentaires : 3 Gram positifs et 4 Gram négatifs.

À l'exception d'*Enterococcus faecalis*, toutes les souches étaient sensibles à chacun des hydrolysats, avec cependant une importance de l'effet qui varie avec l'enzyme utilisée et la souche bactérienne. D'une manière générale, HPP-S était plus efficace que HPP-AL sauf vis-à-vis de la souche *K. pneumonia* qui était pareillement inhibée par les deux hydrolysats. En accord avec cette observation, plusieurs auteurs ont rapporté que le DH est positivement lié à l'activité antimicrobienne, d'autres ont au contraire rapporté que cette relation est inexistante ou négative. Les hydrolysats sont généralement considérés plus actifs contre les bactéries Gram positif que contre celles Gram négatif. Il est intéressant de souligner l'activité significative des hydrolysats du pataclet contre les Gram positif et les Gram négatif, et le fait qu'elle était plus forte contre certaines souches Gram négatif que contre d'autres Gram positif.

La détention des hydrolysats d'un potentiel antioxydant avec un autre antibactérien est de nature à leur donner l'efficacité pour améliorer la conservation des aliments. Une possibilité a été évaluée en utilisant la viande hachée comme modèle. L'incorporation de l'un des deux hydrolysats de pataclet avait atténué, de manière dose dépendante, l'altération oxydative et microbienne de la viande durant son stockage à froid. Les niveaux de malondialdéhydes (MDA), de diènes conjugués et de metmyoglobine ainsi que la croissance microbienne étaient significativement réduits dans les échantillons supplémentés par l'un des deux hydrolysats.

De plus, l'analyse microbiologique révèle une diminution de la croissance des bactéries et des levures et moisissures pendant les 11 jours de stockage. La même efficacité a été observée avec d'autres hydrolysats (Przybylski et al., 2016; Verma et al., 2021). Conformément aux tests in vitro de l'activité antioxydante et du test de l'activité antibactérienne sur milieu solide, HHP-S avait protégé plus efficacement la viande. En conclusion, le HPP-S grâce à ses propriétés particulières peut être utilisé comme un additif naturel puissant pour améliorer la stabilité des viandes hachées et de ce fait, il pourrait remplacer le composé antioxydant synthétique dans l'industrie alimentaire.

Afin d'identifier les fractions peptidiques bioactives responsables des activités biologiques (antioxydantes et antimicrobiennes), une étude de séparation et de purification de l'hydrolysate a été réalisée. Dans la mesure où HPP-S s'est révélé être le plus actif, nous avons choisi de l'exploiter pour y rechercher les peptides au sein de l'hydrolysate. Cela pourra aider à préciser la relation entre l'activité et la structure. HPP-S a été fractionné par RP-HPLC préparative en 10 fractions. L'évaluation de l'activité antioxydante dans les différentes fractions nous a permis de mettre en évidence que l'activité antioxydante était corrélée au poids moléculaire des peptides contenus dans l'hydrolysate. L'analyse par HPLC MS/MS nous a permis d'identifier la présence de 1456 peptides à partir de dix fractions. Parmi eux, la fraction 4 enrichie en peptides à faible poids moléculaire ≤ 1250 Da présentait l'activité antioxydante la plus élevée. Des études antérieures ont montré que les peptides de faible poids moléculaire avaient un potentiel antioxydant plus important que ceux de haut poids moléculaire et qu'une proportion élevée d'acides aminés hydrophobes a été rapportée dans les peptides à forte activité antioxydante (Li et al., 2017; Wongsrangsap & Chukiatsiri, 2021; Zhang et al., 2021). F4 avait également montré la plus forte activité antibactérienne. Cela peut être justifié par sa richesse en peptides hydrophobes (la plupart des peptides avaient un degré d'hydrophobicité ($> 50\%$)), sa teneur élevée en peptides cationiques et par la présence d'une teneur élevée en peptides riches en acides aminés particuliers tels que la proline, l'arginine et / ou la glycine.

Conclusion & perspectives

Conclusion et perspectives

Récemment, la possibilité de générer des hydrolysats de protéines contenant des biopeptides par protéolyse contrôlée en réacteur enzymatique a été montrée. Il est ainsi possible d'envisager une production standardisée d'hydrolysats peptidiques actifs.

Ce travail de recherche consiste à mettre au point un procédé enzymatique de production d'hydrolysats peptidiques, à partir du muscle de pataclet enrichis en peptides bioactifs. Nous avons par ailleurs évalué les propriétés physicochimiques, fonctionnelles et biologiques des hydrolysats de protéines de pataclet en vue d'une éventuelle utilisation dans divers domaines, notamment en agroalimentaire. En outre, l'hydrolysats le plus actif a été retenu pour le fractionnement et l'identification des peptides potentiellement actifs.

La première partie de ce travail a porté sur la production de deux hydrolysats du muscle de pataclet moyennant deux activités protéolytiques. Les hydrolysats obtenus ont été caractérisés de point de vue composition en protéines, lipides et cendres. La composition en acides aminés et en peptides des hydrolysats peptidiques a été également déterminée. Puis une étude des propriétés fonctionnelles a été effectuée. Le suivi de la cinétique d'hydrolyse de muscle de *D.annularis* montre que l'action de savinase sur les protéines de muscle conduit un DH de 15,42% alors que l'action de l'alcalase produit un DH de 8,14%. L'analyse de la composition chimique des hydrolysats (HPPs) montre une richesse en protéines et des faibles teneurs en lipides. Il est remarquable que les teneurs en cendres dans les hydrolysats ont été supérieures à celles dans les protéines substrats. De même, la teneur en sels minéraux est proportionnelle au degré d'hydrolyse (DH), de sorte que HPP-S a la plus forte teneur minérale ($12,70 \pm 0,25$). La composition en acides aminés des hydrolysats préparés présente une richesse en acide glutamique (12,67%-14,81%) et lysine (12,47%-12,97%). De plus, HPP-S et HPP-AL ont été caractérisés par des teneurs élevées en acides aminés essentiels de l'ordre de 39,19% et 39,55%, respectivement. Ce résultat prouve que les hydrolysats protéiques de pataclet possèdent une haute valeur nutritionnelle sur la base de sa composition en acides aminés.

L'analyse biochimique par RP-HPLC a montré une grande hétérogénéité en termes de composition peptidique entre les hydrolysats. Le nombre total de peptides identifiés dans les deux échantillons HPP-S et HPP-AL est de l'ordre de 906 et 536, respectivement. Nous avons pu démontrer que les HPPs préparés possèdent des propriétés fonctionnelles intéressantes.

Ces dernières sont très recherchées surtout lorsque ces hydrolysats sont utilisés comme ingrédients incorporés dans les produits alimentaires. Cette étude a montré que la solubilité, la capacité moussante et le pouvoir de rétention d'eau et d'huile augmentent avec le DH par contre, le pouvoir émulsifiant décroît avec le DH.

La deuxième partie de ce travail, a porté sur la mise en évidence des activités antioxydantes et antibactériennes des hydrolysats de protéines de pataclet. L'efficacité de ces hydrolysats a été évaluée sur la viande de bœuf hachée qui se caractérise par une sensibilité accrue à l'oxydation et à la pourriture. L'activité antioxydante a été évaluée moyennant plusieurs tests. Tous les hydrolysats ont montré des activités variables selon le test utilisé. HPP-S (DH= 15,42%) constitue l'hydrolysats le plus efficace de tous les tests sauf celui de l'activité d'inhibition du blanchiment du β -carotène dont HPP-AL est le meilleur. L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant plusieurs souches de référence et a montré que les hydrolysats présentent une activité antibactérienne et que HPP-S est le plus actif particulièrement contre les bactéries Gram-, cependant, un plus grand effet sur *E.coli* et *S.enterica*. En effet, le diamètre sur lequel HPP-S empêche la croissance de *E.coli* et *S.enterica* était respectivement de $15,5\pm 0,7$ et $24\pm 0,5$ mm. HPP-S et HPP-AL ont présenté des valeurs de CMI plus faibles sur les souches à Gram- négatif et les souches à Gram-positif testées. HPP-S, a montré une activité similaire à celle de l'ampicilline contre *S.aureus* (CMI = 0,78 mg/mL). Cela nous incite à envisager l'étude de l'emploi de cet extrait dans le milieu alimentaire. Dans ce cadre, un regard particulier est porté sur l'étude de l'effet de l'addition des hydrolysats au viande hachée de bœuf fraîche et l'étude de leurs impacts sur les caractéristiques de qualité (oxydation des lipides, stabilité microbienne, couleur). En effet, la peroxydation lipidique des aliments carnés est un problème technologique important dans les industries alimentaires. Il limite la durée de conservation des produits et diminue leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques. De ce fait, une étude du degré d'oxydation des lipides contenus dans les échantillons de la viande hachée a été évaluée *via* le dosage des teneurs en TBARS, en diènes conjugués, en MetMb et en fer héminique. Les résultats dévoilent que l'addition du HPP-S et HPP-AL dans la viande hachée de bœuf stockés à 4 °C pendant 11 jours a inhibé les teneurs en TBARS, en diènes conjugués, en MetMb avec amélioration du taux de fer héminique. De plus, l'analyse microbiologique révèle une diminution de la croissance bactérienne et de la croissance des levures et des moisissures pendant les 11 jours de stockage.

En conclusion, le HPP-S grâce à ses propriétés particulières peut être utilisé comme un additif naturel puissant pour améliorer la stabilité des viandes hachées et de ce fait, il pourrait remplacer le composé antioxydant synthétique dans l'industrie alimentaire

Dans la troisième partie de la thèse, l'HPP-S qui exhibe l'activité antioxydante et antibactérienne la plus élevée a été fractionné par HPLC préparative. Les masses moléculaires ainsi que les séquences de peptides dans les fractions ont été déterminées par couplage UPLC-MS/MS et toutes les identifications ont été déposées au consortium proteome exchange *via* Pride. 408 peptides ont été identifiés dans la fraction la plus active (F4) et il s'agit de nouvelles séquences peptidiques dont la majorité ayant une charge positive et une masse moléculaire ≤ 1250 Da.

Dans le cadre de cette thématique les perspectives viseront :

- ✓ L'optimisation des conditions opératoires pour améliorer la bioactivité des hydrolysats générés.
- ✓ Pour évaluer l'éventualité d'utiliser les peptides *in vivo*, nous projetons d'examiner l'activité dans des conditions qui miment le milieu gastro-intestinale (pH, Enzymes digestives...).
- ✓ Une caractérisation plus avancée (critères d'acceptabilités) et la possibilité d'utiliser les hydrolysats en microcapsules pour protéger des substances sensible à l'oxydation (exp: AGPI).
- ✓ L'étude *in vivo* des activités antioxydantes des hydrolysats protéiques de muscle de pataclet ainsi que l'investigation d'autres activités possibles (hypocholestérolémiant, antidiabétique, anticoagulante...).
- ✓ Une purification plus poussée des peptides bioactifs : fractionnement de la fraction la plus active préparée (F4).
- ✓ L'application des hydrolysats et des biopeptides dans le développement de films comestibles.

Références bibliographiques

- Abraham, B. (2017). Production of fish protein hydrolysate from silver catfish (*Arius thalassinus*). *MOJ Food Processing & Technology*, 5(4). <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2017.05.00132>.
- Abou-Diab, M., Thibodeau, J., Deracinois, B., Flahaut, C., Fliss, I., Dhulster, P., & Nedjar, N. (2020). Bovine Hemoglobin Enzymatic Hydrolysis by a New Eco-Efficient Process-Part II: Production of Bioactive Peptides. *Membranes*, 10(10), 268.
- Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(2), 143–153.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier applied science publishers. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19870419770>
- Aguilar, M.-I. (2004). *HPLC of Peptides and Proteins* (Vol. 251). Springer. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1385/1592597424.pdf#page=15>
- Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29(3), 272–277.
- Akbari, N., Mohammadzadeh Milani, J., & Biparva, P. (2019). Functional and conformational properties of proteolytic enzyme-modified potato protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 1320–1327.
- Akkam, Y. (2016). A Review of Antifungal Peptides: Basis to New Era of Antifungal Drugs. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1). <https://platform.almanhal.com/Files/2/92183>
- Alu'datt, M. H., Al-u'datt, D. G. F., Alhamad, M. N., Tranchant, C. C., Rababah, T., Gammoh, S., & Kubow, S. (2021). Characterization and biological properties of peptides isolated from dried fermented cow milk products by RP-HPLC: Amino acid composition, antioxidant, antihypertensive, and antidiabetic properties. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15794>
- Amiza, MA., Kong, YL., Faazaz, AL. (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *Journal of International Food Research*, 19 (1), 199.
- Andreu, D. & Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Peptide Science*, 47(6), 415-433.
- Andres, E., & Dimarcq, J. L. (2004). Cationic anti-microbial peptides: From innate immunity

- study to drug development. *La Revue de Medecine Interne*, 25(9), 629–635.
- Andres, E., & Dimarcq, J. L. (2007). Cationic antimicrobial peptides: From innate immunity study to drug development. Up date. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 37(4), 194–199.
- Andrieux G. (2004). La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture: état des lieux et analyse. *Etudes de l'Ofimer*, pp. 63.
- AOAC, (2000). Official methods of analysis (17th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Atef, M., Chait, Y. A., Ojagh, S. M., Latifi, A. M., Esmaili, M., Hammami, R., & Udenigwe, C. C. (2021). Anti-Salmonella Activity and Peptidomic Profiling of Peptide Fractions Produced from Sturgeon Fish Skin Collagen (*Huso huso*) Using Commercial Enzymes. *Nutrients*, 13(8), 2657. <https://doi.org/10.3390/nu13082657>.

-B-

- Balti, R., Bougatef, A., El-Hadj Ali, N., Zekri, D., Barkia, A., & Nasri, M. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 2006–2014.
- Baranyi, M., Thomas, U., & Pellegrini, A. (2003). Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Journal of Dairy Research*, 70(2), 189–197.
- Bashir, K. M. I., Sohn, J. H., Kim, J.-S., & Choi, J.-S. (2020). Identification and characterization of novel antioxidant peptides from mackerel (*Scomber japonicus*) muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 323, 126809.
- Bazinet, L., & Firdaous, L. (2013). Separation of bioactive peptides by membrane processes: Technologies and devices. *Recent Patents on Biotechnology*, 7(1), 9–27.
- Ben Khaled, H., Ktari, N., Ghorbel-Bellaaj, O., Jridi, M., Lassoued, I., & Nasri, M. (2014). Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. *Journal of Food Science and Technology*, 51(4), 622–633.
- Ben Slama-Ben Salem, R., Bkhairia, I., Abdelhedi, O., & Nasri, M. (2017b). Octopus vulgaris

- protein hydrolysates: Characterization, antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1442–1454. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2567-y>
- Benjakul, S., & Bauer, F. (2001). Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis* Linne) muscle as influenced by different freeze–thaw cycles. *Food Chemistry*, 72(2), 207–217.
- Bersuder, P., Hole, M., & Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 181–187.
- Bhandari, D.; Rafiq, S.; Gat, Y.; Gat, P.; Waghmare, R.; & Kumar, V. (2020). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal. Peptides. Research. Ther*, 26, 139–150
- Bkhairia, I., Ben Slama Ben Salem, R., Nasri, R., Jridi, M., Ghorbel, S., & Nasri, M. (2016). In-vitro antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from golden grey mullet prepared by commercial, microbial and visceral proteases. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 2902–2912.
- Borch, E. & Arinder, P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*, 62, 381-390.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198–1205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075>
- Bougatef, H., Krichen, F., Kobbi, S., Martinez-Alvarez, O., Nedjar, N., Bougatef, A., & Sila, A. (2020). Physicochemical and biological properties of eel by-products protein hydrolysates: Potential application to meat product preservation. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 931–942.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1972). On the solubilization of NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes with crude pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 286(2), 433–436.
- Buettner, G. R., & Jurkiewicz, B. A. (1993). Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: An EPR study. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(1), 49–55.

- Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2021). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus Lam*) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: Physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids*, *112*, 106319.
- Carrillo, W., Lucio, A., Gaibor, J., Morales, D., & Vásquez, G. (2018). Isolation of antibacterial hydrolysates from hen egg white lysozyme and identification of antibacterial peptides. *Journal of Medicinal Food*, *21*(8), 808–818.
- Catiau, L., Traisnel, J., Delval-Dubois, V., Chihib, N.-E., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, *32*(4), 633–638.
- Centenaro, G. S., Centenaro, M. S., & Prentice-Hernández, C. (2011). *Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones*. <http://127.0.0.1:8080/handle/1/1730>
- Cerrato, A., Capriotti, A. L., Capuano, F., Cavaliere, C., Montone, A. M. I., Montone, C. M., Piovesana, S., Zenezini Chiozzi, R., & Laganà, A. (2020). Identification and antimicrobial activity of medium-sized and short peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) simulated gastrointestinal digestion. *Foods*, *9*(9), 1185.
- Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, *135*(4), 3020–3038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., & Dinesh Kumar, B. (2015). Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science and Technology*, *52*, 5817–5825.
- Charlotte, ., Carlsen, Jens K.S., Møller, Leif H., & Skibsted. (2005). Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews*, *249*(3–4), 485-498.
- Cheftel, C., Ahern, M., Wang, D. I. C., & Tannenbaum, S. R. (1971). Enzymic solubilization of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *19*(1), 155–161.
- Chel-Guerrero, L., Cua-Aguayo, D., Betancur-Ancona, D., Chuc-Koyoc, A., Aranda-González, I., & Gallegos-Tintoré, S. (2020). Antioxidant and chelating activities from Lion fish (*Pterois volitans L*) muscle protein hydrolysates produced by in vitro

- digestion using pepsin and pancreatin. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 62–72.
- Chen, H.-J., Dai, F.-J., Chen, C.-Y., Fan, S.-L., Zheng, J.-H., Chau, C.-F., Lin, Y.-S., & Chen, C.-S. (2023). Effects of molecular weight fraction on antioxidation capacity of rice protein hydrolysates. *Scientific Reports*, 13(1), 3464.
- Cheng, X., Tang, X., Wang, Q., & Mao, X. Y. (2013). Antibacterial effect and hydrophobicity of yak κ -casein hydrolysate and its fractions. *International Dairy Journal*, 31(2), 111–116.
- Chi, C.-F., Hu, F.-Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G.-F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, 301–313.
- Chi, C.-F., Wang, B., Deng, Y.-Y., Wang, Y.-M., Deng, S.-G., & Ma, J.-Y. (2014). Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. *Food Research International*, 55, 222–228.
- Choe, E. (2017). Effects and Mechanisms of Minor Compounds in Oil on Lipid Oxidation. In C. C. Akoh (Ed.), *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (pp. 567–590). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group.
- Choe, E., & Min, B. D. (2009). Mechanisms of antioxidant in the oxidation of foods. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 8, 345–358.
- Chukiatsiri, S., Siriwong, S., & Thumanu, K. (2020). Pupae protein extracts exert anticancer effects by down regulating the expression of IL-6, IL-1 β and TNF- α through biomolecular changes in human breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110278.
- Chunkao, S., Youravong, W., Yupanqui, C. T., Alashi, A. M., & Aluko, R. E., 2020. Structure and Function of Mung Bean Protein-Derived Iron-Binding Antioxidant Peptides. *Foods*. 9(10), 1406. <https://doi.org/10.3390/foods9101406>
- Cuvelier, M. E., & Maillard, M. N. (2012). Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 19(2), 125–132
- Clark, E.M., Mahoney, A.W., & Carpenter, C.E. (1997). Heme and total Iron in ready-to-Eat chicken. *J. Agric. Food Chemistry*, 45, 124–126.
- Csordas, A., & Michl, H. (1970). Isolation of na hemolytic polypeptide from the defensive secretion of European Bombina species. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 101(1), 182–189.
- Cudic, M., & Otvos Jr, L. (2002). Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current Drug*

- Daliri, E., Oh, D., & Lee, B. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), 32.
<https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Darewicz, M., Borawska, J., Vegarud, G., Minkiewicz, P., & Iwaniak, A. (2014). Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity and ACE Inhibitory Peptides of Salmon (*Salmo salar*) Protein Hydrolysates Obtained by Human and Porcine Gastrointestinal Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 14077–14101.
- Da Rocha, M., Alemán, A., Baccan, G. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, C., Montero, P., & Prentice, C. (2018). Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects of underutilized fish protein hydrolysate. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(5), 592–608.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001). Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2–3), 146–150.
- De Caleyra, R. F., Gonzalez-Pascual, B., García-Olmedo, F., & Carbonero, P. (1972). Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins In Vitro. *Applied Microbiology*, 23(5), 998–1000. <https://doi.org/10.1128/am.23.5.998-1000.1972>
- De Graeve, J., Berthou, F., Prost, M., & Arpino, P. (1986). Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse: Technologie et applications dans les domaines de l'environnement, la pharmacologie et la biochimie. Masson.
- De Quadros, C. D. C., Lima, K. O., Bueno, C. H. L., Fogaça, F. H. dos S., Da Rocha, M., & Prentice, C. (2019). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysates and peptide fractions derived from *Colossoma macropomum* and their effect on ground beef lipid oxidation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(6), 677–688.
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674–677.
<https://doi.org/10.1021/jf00093a019>
- Demetriades, K., Coupland, J. N. & McClements, D. J. (1997). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *Journal of Food Science*, 62, 342–348.

- Deng, L., Pan, X., Wang, Y., Wang, L., Zhou, X. E., Li, M., Feng, Y., Wu, Q., Wang, B., & Huang, N. (2009). Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina. *Human Reproduction*, *24*(1), 211–218.
- Dimarcq, J., Bulet, P., Hetru, C., & Hoffmann, J. (1998). Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Peptide Science*, *47*(6), 465–477.
- Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1997). Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *LWT-Food Science and Technology*, *30*(3), 266–272.
- Dong, N., Ma, Q., Shan, A., Lv, Y., Hu, W., Gu, Y., & Li, Y. (2012). Strand Length-Dependent Antimicrobial Activity and Membrane-Active Mechanism of Arginine- and Valine-Rich β -Hairpin-Like Antimicrobial Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*(6), 2994–3003. <https://doi.org/10.1128/AAC.06327-11>.
- Dos Santos, S. D., Martins, V. G., Salas-Mellado, M., & Prentice, C. (2009). Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(8), 1399–1406.
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, C., & Xie, M. (2018). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, *76*, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.003>.

-E-

- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and their application in beverage fortification. *Food Chemistry*, *245*, 698–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.107>.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S. & Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*, 430-441.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Işildak, Ö., Küfrevioğlu, Ö. İ., İbaoğlu, K., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, *3*(3), 258–266. <https://doi.org/10.1007/bf03247217>.
- El-Saadony, M. T., Abd El-Hack, M. E., Swelum, A. A., Al-Sultan, S. I., El-Ghareeb, W. R.,

Hussein, E. O. S., & Nader, M. M. (2021). Enhancing quality and safety of raw buffalo meat using the bioactive peptides of pea and red kidney bean under refrigeration conditions. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 762–776. doi:10.1080/1828051x.2021.1926346.

Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G., & Slater, T. F. (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, 208(1), 129–140.

-F-

Fadhil, KA., Suryati, T., & Jayanegara, A. (2023). Comparison Between Natural and Synthetic Antioxidants in Beef Products: A MetaAnalysis. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 1 (1), 19-26

Fan, C., Wang, X., Song, X., Sun, R., Liu, R., Sui, W., Jin, Y., Wu, T., & Zhang, M. (2023). Identification of a Novel Walnut Iron Chelating Peptide with Potential High Antioxidant Activity and Analysis of Its Possible Binding Sites. *Foods*, 12, 226. <https://doi.org/10.3390/foods12010226>

FAO Globefish (2009). Fishmeal market report, May.

FAO (2014). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

FAO (2018). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

FAO (2019). Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité Chimique*, 108(10), 863–832.

Fawzya, Y. N., Nursatya, S. M., Susilowati, R., & Chasanah, E. (2020). Characteristics of Fish Protein Hydrolysate from Yellowstripe Scad (*Selaroides leptolepis*) Produced by a Local Microbial Protease. *E3S Web of Conferences*, 147, 03017. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014703017>.

Fernandez de Caleyra, R., Gonzalez-Pascual, B., Garcia-Olmedo, F., & Carbonero, P. (1972). Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in Vitro. *Applied Microbiology*, 23, 998-1000.

Finkler, J. K., Piana, P. A., Fleck, J. F., Boscolo, W. R., Feiden, A., Signor, A., & Fiorese, M. L. (2022). Production of fish protein hydrolysates from *Oreochromis niloticus* fillet trimmings. *Research, Society and Development*, 11(6), e37311629172–e37311629172. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.29172>.

Fischer, W. (1987). Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la peche:

Méditerranée et Mer Noire (Zone de pêche 37).

- Foh, M. B. K., Amadou, I., Foh, B. M., Kamara, M. T., & Xia, W. (2010). Functionality and Antioxidant Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as Influenced by the Degree of Hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1851–1869. <https://doi.org/10.3390/ijms11041851>
- Fountoulakis, M., & Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, *826*(2), 109–134.
- Froese, R., & Pauly, D. (2010). FishBase. Fisheries Centre, University of British Columbia
- Froidevaux R, Kried F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kodciarz, E., Ruckebush, C., Dhulster, P., & Guillochon, D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine haemoglobin fragment. *FEBS Letters*, *491*, 159-163.

-G-

- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D. J., & Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 687–699. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>.
- Gao, Y., Li, J., Chang, C., Wang, C., Yang, Y., & Su, Y. (2019). Effect of enzymatic hydrolysis on heat stability and emulsifying properties of egg yolk. *Food Hydrocolloids*, *97*, 105224.
- Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G., & Al-Gubory, K. H. (2007). Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂ α -induced luteal cell death in vivo. *Free Radical Research*, *41*(3), 251–259.
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *Journal of Food Science*, *69*(8), C615–C622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x>.
- Genot, C., & Michalski, M.-C. (2010). Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments. *Innovations Agronomiques*, *10*, 43–67.
- Gey, K.F., Stahelin, H.B. & Eichholzer, M. (1993). Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke: Basel prospective study. *Journal of Clinical Investigation*, *71*, 3-6.
- Ghanbari, R., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Ismail, A., & Saari, N. (2012). *Actinopyga*

- Ilecanora* hydrolysates as natural antibacterial agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 7, 13(12), 16796-811. <https://doi.org/10.3390/ijms131216796>.
- Gharred, T., Mannai, R., Belgacem, M., & Jebali, J. (2020). Incidence of morphometry variation, growth alteration, and reproduction performance of the annular sea bream (*Diplodus annularis*) as effective tools to assess marine contamination: How useful is a multi-biotimarkers approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 4075–4088.
- Gildberg, A., Arnesen, J. A., & Carlehög, M. (2002). Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochemistry*, 38(4), 475–480.
- Gildberg, A., Espejo-Hermes, J. & Magno-Orejana, F. (1984). Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing salt content. *Journal Science and Food Agriculture*, 35, 1363-1369.
- González-Serrano, D. J., Hadidi, M., Varcheh, M., Jelyani, A. Z., Moreno, A., & Lorenzo, J. M. (2022). Bioactive Peptide Fractions from Collagen Hydrolysate of Common Carp Fish Byproduct: Antioxidant and Functional Properties. *Antioxidants*, 11(3), 509. <https://doi.org/10.3390/antiox11030509>.
- González-Vega, R. I., Del-Toro-Sánchez, C. L., Moreno-Corral, R. A., López-Elías, J. A., Reyes-Díaz, A., García-Lagunas, N., Carvajal-Millán, E., & Fimbres-Olivarría, D. (2022). Sulfated polysaccharide-rich extract from *Navicula incerta*: Physicochemical characteristics, antioxidant activity, and anti-hemolytic property. *AIMS Bioengineering*, 9(4), Article bioeng-09-04-027.
- Gottardi, D., Hong, P. K., Ndagijimana, M., & Betti, M. (2014). Conjugation of gluten hydrolysates with glucosamine at mild temperatures enhances antioxidant and antimicrobial properties. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 181–187.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the Most Suitable Enzyme for Releasing Peptides from Lentil (*Lens culinaris var. Castellana*) Protein Concentrates with Multifunctional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4166–4174
- Guérard, F., Decourcelle, N., Sabourin, C., Floch-Laizet, C., Le Grel, L., Le Floc'h, P., Gourlay, F., Le Delezir, R., Jaouen, P., & Bourseau, P. (2010). Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications : a review. *Journal des sciences Halieutique et Aquatique*, 2, 21–27.
- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D. & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of

proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1051-1059.

Guo, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Z., Wang, S., & Zhao, X. (2013). Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. *Process Biochemistry*, 48(5–6), 988–993. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.013>.

-H-

Habermann, E. (1972). Bee and wasp venoms. *Science*, 177, 314-322

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(1), 1–8.

Hamdi, M., Hammami, A., Hajji, S., Jridi, M., Nasri, M., & Nasri, R. (2017). Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 455–463.

Hamdi, M., Nasri, R., Dridi, N., Moussa, H., Ashour, L., & Nasri, M. (2018). Improvement of the quality and the shelf life of reduced-nitrites turkey meat sausages incorporated with carotenoproteins from blue crabs shells. *Food Control*, 91, 148–159.

Hamed, F., Elgaoud, I., Deracinois, B., Flahaut, C., Nedjar, N & Barkia, A. (2022). Production of hydrolysates and peptides from a new protein source: *Diplodus annularis*. *Food Bioscience*, 50, 102129. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102129>.

Hancock, R. E., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1317–1323.

Hancock, R. E., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8856–8861.

Harris, E. D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal*, 6(9), 2675–2683. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.9.1612291>

Hatate, H., Numata, Y. & Kochi, M. (1990). Synergistic effect of sardine myofibril protein hydrolysates with antioxidants. *Nippon Suisan Gakk*, 56, 1011.

Heffernan, S., Giblin, L., & O'Brien, N. (2021). Assessment of the biological activity of fish muscle protein hydrolysates using in vitro model systems. *Food Chemistry*, 359, 129852.

Henriques, A., Vázquez, J. A., Valcarcel, J., Mendes, R., Bandarra, N. M., & Pires, C. (2021). Characterization of protein hydrolysates from fish discards and by-products

from the north-west Spain fishing feet as potential sources of bioactive peptides. *Marine Drugs*, 19(6), 338. <https://doi.org/10.3390/md19060338>.

- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), 289–297.
- Heu, M.-S., Kim, J.-S., & Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82(2), 235–242.
- He, Y., Pan, X., Chi, C.-F., Sun, K.-L., & Wang, B. (2019). Ten new pentapeptides from protein hydrolysate of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*) muscle: Preparation, identification, and antioxidant activity evaluation. *LWT*, 105, 1–8.
- Heu, M.-S., Kim, J.-S., & Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82(2), 235–242.
- Hirsh, D. J., Hammer, J., Maloy, W. L., Blazyk, J., & Schaefer, J. (1996). Secondary Structure and Location of a Magainin Analogue in Synthetic Phospholipid Bilayers. *Biochemistry*, 35(39), 12733–12741. <https://doi.org/10.1021/bi961468a>
- Huda, N., Abdullah, A., & Babji, A. S. (2001). Functional properties of surimi powder from three Malaysian marine fish. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(4), 401–406.

-I-

- Ilic, N., Novkovic, M., Guida, F., Xhindoli, D., Benincasa, M., Tossi A., & Juretic, D. (2013). Selective antimicrobial activity and mode of action of adeptantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. *Biochimica Biophysica Acta*, 1828, 1004-1012.
- Islam, Md. S., Hongxin, W., Admassu, H., Noman, A., Ma, C., & An wei, F. (2021). Degree of hydrolysis, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates from Grass Turtle (*Chinemys reevesii*) as influenced by enzymatic hydrolysis conditions. *Food Science & Nutrition*, 9(8), 4031–4047. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1903>.

-J-

- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010).

- Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *121*(1), 178–184.
- Jang, A., & Lee, M. (2005). Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, *69*(4), 653–661.
- Je, J.Y., Qian Z, J., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process biochemistry*, *42*, 840-846.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S.-B., Mehiri, M., Hajji, M., & Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A 26. *Process Biochemistry*, *49*(6), 963–972.
- Jemil, I., Nasri, R., Abdelhedi, O., Aristoy, M.-C., Salem, R. B. S.-B., Kallel, C., Marrekchi, R., Jamoussi, K., ElFeki, A., & Hajji, M. (2017). Beneficial effects of fermented sardinelle protein hydrolysates on hypercaloric diet induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in wistar rats. *Journal of Food Science and Technology*, *54*, 313–325.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(3), 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jiang, H., Tong, T., Sun, J., Xu, Y., Zhao, Z., & Liao, D. (2014). Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *154*, 158–163.
- Jiang, W., Liu, Y., Yang, X., & Hu, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activities of modified crab shell bioactive peptides by Maillard reaction. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 2730–2743.
- Junianto, J., Afrianto, E., & Hasan, Z. (2020). Functional properties and proximate compositions of bony barb protein hydrolysated. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, *24*(6), 331–341. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.112861>

-K-

- Karoud, W., Sila, A., Krichen, F., Martinez-Alvarez, O., & Bougatef, A. (2019). Characterization, Surface Properties and Biological Activities of Protein Hydrolysates Obtained from Hake (*Merluccius merluccius*) Heads. *Waste and Biomass Valorization*, *10*(2), 287–297. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0069-9>.

- Kavousi, H. R., Fathi, M., & Goli, S. A. H. (2017). Stability enhancement of fish oil by its encapsulation using a novel hydrogel of cress seed mucilage/chitosan. *International Journal of Food Properties*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1357042>
- Kim, D., Soundrarajan, N., Lee, J., Cho, H., Choi, M., Cha, S.-Y., & Park, C. (2017). Genomewide Analysis of the Antimicrobial Peptides in *Python bivittatus* and Characterization of Cathelicidins with Potent Antimicrobial Activity and Low Cytotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9).
- Kim, S.-K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts—a review. *Food Research International*, 39(4), 383–393.
- Kim, S. S., Ahn, C.-B., Moon, S. W., & Je, J.-Y. (2018). Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halocynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. *Food Bioscience*. doi:10.1016/j.fbio.2018.08.010
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317–1327.
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, 13(1), 8–17. <https://doi.org/10.1002/pca.611>
- Krinsky, N. I. (1992). Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Experimental Biology and Medicine*, 200(2), 248–254. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43429>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36(1-2), 131–139.
- Krzywicki, K. (1982). The determination of haem pigments in meat. *Meat Science*, 7(1), 29–36.
- Ktari, N., Salem, R. B. S.-B., Bkhairia, I., Slima, S. B., Nasri, R., Salah, R. B., & Nasri, M. (2020). Functional properties and biological activities of peptides from zebra blenny protein hydrolysates fractionated using ultrafiltration. *Food Bioscience*, 34, 100539.
- Ktari, N., Trabelsi, I., Bardaa, S., Triki, M., Bkhairia, I., Ben Slama-Ben Salem, R., Nasri, M.,

& Ben Salah, R. (2017). Antioxidant and hemolytic activities, and effects in rat cutaneous wound healing of a novel polysaccharide from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 625–634. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.091>

-L-

- Laguette, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244–282.
- Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N., & Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233–237.
- Lassoued, I., Elgaoud, I., Hamed, F., & Barkia, A. (2022). Thornback ray gelatin hydrolysate as an alternative preservative: Effect of hydrolysis degree. *Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(2), 9–14.
- Lassoued, I., Elgaoud, I., Hamed, F., Nasri, R., Nasri, M., & Barkia, A. (2021). Evaluation of four fish protein hydrolysates as a source of antioxidants and amino acids. *Current Topics in Peptide & Protein Research*, 22, 131–144
- Lassoued, I., Hajji, S., Mhamdi, S., Jridi, M., Bayouhd, A., Barkia, A., & Nasri, M. (2015). Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): Characteristics and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 668–675.
- Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M., Nasri, M., & Toldrá, F. (2016). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides FQPSF and LKYPI identified in *Bacillus subtilis* A26 hydrolysate of thornback ray muscle. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(7), 1604–1609. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13130>
- Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.-C., Barkia, A., & Nasri, M. (2015). Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 13, 225–238.
- Latorres, J. M., Rios, D. G., Saggiomo, G., Wasielesky, W., & Prentice-Hernandez, C. (2018). Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science and Technology*, 55, 721–729.
- Lauth, X., Shike, H., Burns, J.C., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.C., Van Osit,

- Nizet, V., Tylor, S.W., and Shimizu, C., & Bulet., H. (2002). Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *Journal of Biological chemistry*, 277(7), 5030-5039.
- Lee, J.-C., Kim, H.-R., Kim, J., & Jang, Y.-S. (2002). Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6490–6496. <https://doi.org/10.1021/jf020388c>
- Leni, G., Soetemans, L., Caligiani, A., Sforza, S., & Bastiaens, L. (2020). Degree of Hydrolysis Affects the Techno-Functional Properties of Lesser Mealworm Protein Hydrolysates. *Foods*, 9(4), 381. <https://doi.org/10.3390/foods9040381>
- Levine S.A., & Kidd P.M. (1996). Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. *In: San leandro : Allergy Research Group. Eds A. Biocurrents division. California. pp* 35-42.
- Liaset, B., Lied, E., & Espe, M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 581–589.
- Lin, M. J.-Y., Humbert, E. S., & Sosulski, F. W. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, 39(2), 368–370.
- Li, X.-R., Chi, C.-F., Li, L., & Wang, B. (2017). Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Protein Hydrolysate of Scalloped Hammerhead (*Sphyrna lewini*) Cartilage. *Marine Drugs*, 15(3), 61. <https://doi.org/10.3390/md15030061>
- Li, Z.; Zhao, S.; Xin, X.; Zhang, B.; Thomas, A.; Charles, A.; Lee, K.S.; Jin, B.R.; & Gui, Z. (2019). Purification and characterization of a novel immunomodulatory hexapeptide from alcalase hydrolysate of ultramicro-pretreated silkworm (*Bombyx mori*) pupa protein. *Journal of Asia Pacific Entomology*, 22, 633–637
- Livingstone D.R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Tech Biotechnol*, 57 : 195 - 211.
- Lopes, S. C. D. N., Fedorov, A. & Castanho, M. A. R. B. (2005). Lipidic membranes are potential "catalysts" in the ligand activity of the multifunctional pentapeptide neokytorphin. *Chemical Biology*, 6, 697-702.
- Lowry, Oliver, H., Rosebrough, Nira, J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lv, L.-C., Huang, Q.-Y., Ding, W., Xiao, X.-H., Zhang, H.-Y., & Xiong, L.-X. (2019). Fish gelatin: The novel potential applications. *Journal of Functional Foods*, 63, 103581.

- Mak, P., Wojci, k., Wicherek, L., Suder, P., & Dubin, A. (2009). Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides*, 25, 1839-1847.
- Malkoski, M., Dashper, S. G., O'Brien-Simpson, N. M., Talbo, G. H., Macris, M., Cross, K. J., & Reynolds, E. C. (2001). Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2309–2315. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2309-2315.2001>
- Marchbank, T., Elia, G. & Playford, R. J. (2009). Intestinal protective effect of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Regulatory Peptides*, 155(1–3),105–109.
- Maresca, J. A., Moser, P., & Schumacher, T. (2017). Analysis of bacterial communities in and on concrete. *Materials and Structures*, 50, 1–13.
- Marquez Moreno, M. C., & Fernandez Cuadrado, V. (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, 28(7), 481–490.
- Matsuzaki, K. (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1376(3), 391–400.
- Meenmanee, S., Rattananukrom, A., Thaiphanit, S., & Suppavorasatit, I. (2022). Improvement of solubility, foaming, and emulsification properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein by non-enzymatic deamidation. *LWT*, 153, 112493. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112493>.
- Meshginfar, N., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., & Aalami, M. (2016). Effects of Protein Hydrolysate from Sheep Visceral on Oxidative Stability of Soybean Oil and Chicken Sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), 12875.
- Niki, E., Kawakami, A., Yamamoto, Y., & Kamiya, Y. (1985). Oxidation of Lipids. VIII. Synergistic Inhibition of Oxidation of Phosphatidylcholine Liposome in Aqueous Dispersion by Vitamin E and Vitamin C. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 58(7), 1971–1975. <https://doi.org/10.1246/bcsj.58.1971>
- Miller, R. & Groninger, H. S. (1976). Functional properties of enzyme-modified acylated fish protein derivatives. *Journal of Food Science*, 41, 268-272
- Min, B., & Ahn, D. (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Science and Biotechnology*, 14(1), 152–163.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., & Gobbetti, M. (2003).

Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase-Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5297–5305. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5297-5305.2003>

- Mirzapour-Kouhdasht, A., Moosavi-Nasab, M., Lee, C. W., Yun, H., & Eun, J.-B. (2021). Structure–function engineering of novel fish gelatin-derived multifunctional peptides using high-resolution peptidomics and bioinformatics. *Scientific Reports*, 11(1), 7401.
- Mohanty, U., Majumdar, R. K., Mohanty, B., Mehta, N. K., & Parhi, J. (2021). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 4349–4358.
- Mokni Ghribi, A., Maklouf Gafsi, I., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A., & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, 187, 322–330.
- Moridani, M. Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A., & O'Brien, P. J. (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 243–253. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01241-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01241-8)
- Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E. & Regenstein, J. M. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50, 1715-1718.

-N-

- Naqash, S. Y., & Nazeer, R. A. (2013). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 972–978. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0416-y>
- Nasri, R., Taktak, W., Hamdi, M., Amor, N. B., Kabadou, A., Li, S., & Nasri, M. (2020). Sardinelle protein isolate as a novel material for oil microencapsulation: Novel alternative for fish by-products valorisation. *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111164.
- Nasri, R., Amor, I. B., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., & Nasri, M. (2012). Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133(3), 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.101>
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach,

- M., Briand, G., & Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29(6), 969–977.
- Nesse, K.O., Nagalakshmi, A.P., Marimuthu, P., Singh, M., Bhetariya, P.J., & Ho, M. (2014). Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69, 1-6.
- Niki, E., Kawakami, A., Saito, M., Yamamoto, Y., Tsuchiya, J., & Kamiya, Y. (1985). Effect of phytol side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *Journal of Biological Chemistry*, 260(4), 2191–2196.
- Noman, A., Wang, Y., Zhang, C., & Abed, S. (2022). Antioxidant Activity of Hybrid Sturgeon (*Huso dauricus* × *Acipenser schrenckii*) Protein Hydrolysate Prepared using Bromelain, Its Fractions and Purified Peptides. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 72(1), 79–89. <https://doi.org/10.31883/pjfn/146317>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food–drug interaction. *International Dairy Journal*, 32(1), 33–39.
- Nouri, L., Legrand, P. Y. & Belleville, P. (1997). Enzymatic hydrolysis of wheat proteins. Part I. Enzymatic kinetics and study of limited hydrolysis in a batch stirred reactor. *Chemical Engineering Journal*, 65, 187-194.

-O-

- Ortiz, S. E. M., & Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: Structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, 6(35), 511–518.
- Ottaway, P.B. (2012). The regulation of fish oils and omega-3 fatty acids in the European Union. *Long-Chain Omega-3 Specialty Oils*, 243-261.
- Otvos L. (2002). The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1138-1150.
- Ozer, O., & Saricoban, C. (2010). The effects of butylated hydroxyanisole, ascorbic acid, and α -tocopherol on some quality characteristics of mechanically deboned chicken patty during freeze storage. *Czech Journal Food Sciences*, 28, 150-160.

-P-

- Pan, X., Zhao, Y.-Q., Hu, F.-Y., Chi, C.-F., & Wang, B. (2016). Anticancer activity of a

- hexapeptide from skate (*Raja porosa*) cartilage protein hydrolysate in HeLa cells. *Marine Drugs*, 14(8), 153.
- Parish, C. A., Jiang, H., Tokiwa, Y., Berova, N., Nakanishi, K., McCabe, D., Zuckerman, W., Xia, M. M., & Gabay, J. E. (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9(2), 377–382.
- Park, B. Y., & Yoon, K. Y. (2019). Biological activity of enzymatic hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions from perilla seed meal protein. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(3), 180–185.
- Pascal, G. (1979). Les antioxygènes alimentaires: Aspects technologiques, toxicologiques et nutritionnels [France, CEE]. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 14.
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Petersen, B. R. (1981). The Impact of the Enzymic Hydrolysis Process on Recovery and Use of Proteins. In G. G. Birch, N. Blakebrough, & K. J. Parker (Eds.), *Enzymes and Food Processing*, 149–175. https://doi.org/10.1007/978-94-011-6740-6_9
- Pezeshk, S., Ojagh, S. M., Rezaei, M., & Shabanpour, B. (2019). Fractionation of protein hydrolysates of fish waste using membrane ultrafiltration: Investigation of antibacterial and antioxidant activities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 1015–1022.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., & Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49), 12416–12423. <https://doi.org/10.1021/bi00164a017>
- Powers, J.-P. S., & Hancock, R. E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), 1681–1691.
- Prameela, K., Mohan, C. M., & Ramakrishna, C. (2018). Biopolymers for food design: Consumer-friendly natural ingredients. In *Biopolymers for food design*, 1–32.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341.
- Przybylski, R., Firdaus, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., & Nedjar, N. (2016). Production of

an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry*, 211, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.074>.

-Q-

Qian, Z.-J., Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99(6), 1690–1698. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.005>.

-R-

Raetz, C. R. (1978). Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 42(3), 614–659. <https://doi.org/10.1128/mr.42.3.614-659.1978>

Rajapakse, N., Jung, W.-K., Mendis, E., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76(22), 2607–2619.

Ramanathan, R., Suman, S. P., & Faustman, C. (2020). Biomolecular Interactions in Postmortem Skeletal Muscles Governing Fresh Meat Color: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08098>

Riel, G., Boulaaba, A., Popp, J., & Klein, G. (2017). Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages – Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects. *Meat Science*, 131, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.05.007>

Rodrigues, D. P., Calado, R., Ameixa, O. M., Valcarcel, J., & Vázquez, J. A. (2021). Valorisation of Atlantic codfish (*Gadus morhua*) frames from the cure-salting industry as fish protein hydrolysates with in vitro bioactive properties. *LWT*, 149, 111840.

Rustad, T. (2007). Physical and chemical properties of protein seafood by-products. In Maximising the value of marine by-products (pp. 3–21). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845690137500016>

-S-

Sajjad, A., Zia, M., Xiao, X., Olsson, R. T., Capezza, A. J., & Rasheed, F. (2023). Wheat

- gluten hydrolysates with embedded Ag-nanoparticles; a structure-function assessment for potential applications as wound sorbents with antimicrobial properties. *Polymer Testing*, *118*, 107896.
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., & Bechtel, P. J. (2005). Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Food Science*, *70*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11437.x>
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., & Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, *145*(1–2), 1–22.
- Sayari, N., Sila, A., Haddar, A., Balti, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Bougatef, A. (2015). Valorisation of smooth hound (*Mustelus mustelus*) waste biomass through recovery of functional, antioxidative and antihypertensive bioactive peptides. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(1), 366–376. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5244-6>.
- Seniman, M. S. M., Yusop, S. M., & Babji, A. S. (2014). Production of enzymatic protein hydrolysates from freshwater catfish (*Clarias batrachus*). *AIP Conference Proceedings*, *1614*(1), 323–328. <https://doi.org/10.1063/1.4895216>.
- Shahidi, F., Han, X.-Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, *53*(3), 285–293.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*, *66*(4), 236–248. <https://doi.org/10.1002/bip.10260>
- Sila, A., Haddar, A., Martinez-Alvarez, O., & Bougatef, A. (2013). Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Protein Hydrolysate from Muscle of Barbel (*Barbus callensis*). *Journal of Chemistry*, *2013*, 1–6.
- Sila, A., Hedhili, K., Przybylski, R., Ellouz-Chaabouni, S., Dhulster, P., Bougatef, A., & Nedjar-Arroume, N. (2014). Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Functional Foods*, *11*, 322–329.
- Sivasankar, B. (2005). *Biosperations: Principles and Techniques*.
- Song, R., Wei, R.-B., Luo, H.-Y., & Wang, D.-F. (2012). Isolation and characterization of an antibacterial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). *Molecules*, *17*(3), 2980–2991.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., & Chotikachinda, R. (2014).

Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer Bloch*) larvae. *Aquaculture*, 428, 195–202.

Stryer, L. (1995). Molecular motors. *Biochemistry*, 4th Ed. WH Freeman and Company, New York, 391–404.

-T-

Tacon, A. G., & Metian, M. (2018). Food matters: Fish, income, and food supply—a comparative analysis. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(1), 15–28.

Taheri, A., Anvar, S. a. A., Ahari, H., & Fogliano, V. (2013). Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. [Http://Aquaticcommons.Org/Id/Eprint/22587](http://Aquaticcommons.Org/Id/Eprint/22587).
<https://aquadocs.org/handle/1834/37351>

Taktak, W., Nasri, R., López-Rubio, A., Hamdi, M., Gómez-Mascaraque, L. G., Nasri, M., & Karra-Chaâbouni, M. (2021). Enzymatic production of novel European Eel proteins hydrolysates: Biological activities, techno-functional properties and maltodextrin-hydrolysates efficient electrosprayability. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 1129–1148.

Tang, S.-S., Prodhan, Z. H., Biswas, S. K., Le, C.-F., & Sekaran, S. D. (2018). Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry*, 154, 94–105.

Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168, 115–123.

Tan, X., Qi, L., Fan, F., Guo, Z., Wang, Z., Song, W., & Du, M. (2018). Analysis of volatile compounds and nutritional properties of enzymatic hydrolysate of protein from cod bone. *Food Chemistry*, 264, 350–357.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.

Thamamsena, R., & Liu, DC. (2020). Antioxidant and antimicrobial activities of different enzymatic hydrolysates from desalted duck egg white. *Asian-Australas Journal of Animal Sciences*, 33(9), 1487-1496. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0361>.

Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., & Jean, J. (2013). Isolation and identification

of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706–714.

- Toke, O. (2005). Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 80(6), 717–735.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., & Hayasawa, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 109–112.
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 38(3), 255–261.

-v-

- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food Protein Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*, 77(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>

-v-

- Vansant, G. (2004). Radicaux libres et antioxydants: Principes de base. *Symposium «Antioxydants et Alimentation»*. Institut Danone.
- Varona, E., García-Moreno, P.G., Echers, S.G., Olsen, T.H., Marcatili, P., Guardiola, F., Overgaard, M.T., Hansen, E.B., Jacobsen, C., & Yesiltas, B. (2023). Antioxidant peptides from alternative sources reduce lipid oxidation in 5% fish oil-in-water emulsions (pH 4) and fish oil-enriched mayonnaise. *Food Chemistry*, 426, 136498.
- Vázquez, J. A., Rodríguez-Amado, I., Sotelo, C. G., Sanz, N., Pérez-Martín, R. I., & Valcárcel, J. (2020). Production, Characterization, and Bioactivity of Fish Protein Hydrolysates from Aquaculture Turbot (*Scophthalmus maximus*) Wastes. *Biomolecules*, 10(2), 310. <https://doi.org/10.3390/biom10020310>.
- Verma, Chatli, M. K., Kumar, P., & Mehta, N. (2021). Assessment of quality attributes of porcine blood and liver hydrolysates incorporated pork loaves stored under aerobic and modified atmospheric packaging. *Journal of Food Science and Technology*, 59(3), 1114–1130. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05115-3>
- Vieira, G.H.F., Vieira, R.H.S.F., Macrae, A., & Sousa, O.V. (2005). Peptone preparation from fishing byproducts. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85.
- Villamil, O., Váquiro, H., & Solanilla, J. F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates:

Production, potential applications and functional and bioactive properties.

Food Chemistry, 224, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>.

Vogelsang-O'Dwyer, M.; Sahin, A.W.; Arendt, E.K., & Zannini, E. (2022). Enzymatic Hydrolysis of Pulse Proteins as a Tool to Improve Techno-Functional Properties. *Foods*, 11, 1307. <https://doi.org/10.3390/foods11091307>.

-W-

Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B., & Beermann, C. (2016). *Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. Food Chemistry*, 205, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002>.

Wang, B., Gong, Y.-D., Li, Z.-R., Yu, D., Chi, C.-F., & Ma, J.-Y. (2014). Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 6, 176–185.

Wang, T.-Y., Hsieh, C.-H., Hung, C.-C., Jao, C.-L., Chen, M.-C., & Hsu, K.-C. (2015). Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: A comparison between warm-and cold-water fish. *Journal of Functional Foods*, 19, 330–340.

Wang, X., Mishra, B., Lushnikova, T., Narayana, J.L., & Wang, G. (2018). Amino Acid Composition Determines Peptide Activity Spectrum and Hot-Spot-Based Design of Mercidin. *Advanced Biosystems*, 2(5), 1700259. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700259>

Wang, Z., Liu, X., Xie, H., Liu, Z., Rakariyatham, K., Yu, C., Shahidi, F., & Zhou, D. (2021). Antioxidant activity and functional properties of Alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity in vitro. *Food Chemistry*, 344, 128566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128566>.

Wani, I. A., Sogi, D. S., & Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo L.*) cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2, Part 1), 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.060>.

Witono, Y., Taruna, I., Windrati, W. S., Azkiyah, L., & Sari, T. N. (2016). ‘Wader’ (*Rasbora jacobsoni*) protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 482–492.

- Wong, B. H., Chan, J. P., Cazenave-Gassiot, A., Poh, R. W., Foo, J. C., Galam, D. L., Ghosh, S., Nguyen, L. N., Barathi, V. A., & Yeo, S. W. (2016). Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) in eye and is important for photoreceptor cell development. *Journal of Biological Chemistry*, 291(20), 10501–10514.
- Wongsrangsap, N., & Chukiatsiri, S. (2021). Purification and Identification of Novel Antioxidant Peptides from Enzymatically Hydrolysed *Samia ricini* Pupae. *Molecules*, 26(9), 2588. <https://doi.org/10.3390/molecules26092588>

-γ-

- Yaba Adje, E., Balti, R., Kouach, M., Dhulster, P., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 143-153.
- Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R., & Fattahi, E. (2020). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 625–632.
- Yang, C. L., Cao, X. J., Zhang, Y. C., Liu, S. C., & Ji, H. W. (2019). Comparative composition and nutritional evaluation of different head parts of three tuna species. *Meat Research*, 33(10), 8–14.
- Yang, X.-R., Qiu, Y.-T., Zhao, Y.-Q., Chi, C.-F., & Wang, B. (2019). Purification and Characterization of Antioxidant Peptides Derived from Protein Hydrolysate of the Marine Bivalve Mollusk *Tergillarca granosa*. *Marine Drugs*, 17(5), 251. <https://doi.org/10.3390/md17050251>
- Yang, X.-R., Zhao, Y.-Q., Qiu, Y.-T., Chi, C.-F., & Wang, B. (2019). Preparation and characterization of gelatin and antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) bone stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Marine Drugs*, 17(2), 78.
- Yathisha, U. G., Vaidya, S., & Sheshappa, M. B. (2022). Functional Properties of Protein Hydrolyzate from Ribbon Fish (*Lepturacanthus Savala*) as Prepared by Enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 187–203. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2027964>.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.

- Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4083–4089. <https://doi.org/10.1021/jf0103572>
- Younes, I., Nasri, R., Bkhairia, I., Jellouli, K., & Nasri, M. (2015). New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Food and Bioprocesses Processing*, 94, 453–462.

-Z-

- tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *The Journal of Nutrition*, 127(4), 608–614.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395.
- Zhang, X., Yang, J., Suo, H., Tan, J., Zhang, Y., & Song, J. (2023). Identification and molecular mechanism of action of antibacterial peptides from Flavourzyme-hydrolyzed yak casein against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*, 106(6), 3779–3790.
- Zhang, Y., Wang, J., Zhu, Z., Li, X., Sun, S., Wang, W., & Sadiq, F. A. (2021). Identification and characterization of two novel antioxidant peptides from silkworm pupae protein hydrolysates. *European Food Research and Technology*, 247, 343–352.
- Zhou, J., Han, Q., Koyama, T., & Ishizaki, S. (2023). Preparation, Purification and Characterization of Antibacterial and ACE Inhibitory Peptides from Head Protein Hydrolysate of Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Molecules*, 28(2), 894.

Annexes

Peptides identifiés à partir de F4 par UPLC-MS/MS

Peptide	Mass	Length	ppm	m/z	RT	AScore
TIIPKLPPIEIQPKTQPAPAPAPAPSPAPPKAAPGRGM	3899,1858	39	1,8	780,8458	34,71	
GEPISODEIDELMKDGDKNADGM(+15.99)	2523,0627	23	-3,3	1262,5345	36,23	M23:Oxidation (M):73.54
GIVLDAGDGVTHNVPVYEGYALPH	2492,2336	24	4,6	831,7938	35,52	
GRTTGIVLDAGDGVTHNVPVYEGY	2489,2185	24	-1,8	830,7834	32,34	
TIIDQNRDGIISKDDLRLDVLAS	2456,2871	22	3,9	819,8105	32,93	
TIIDQNRDGIISKDDLRLDVL	2369,2549	21	7,1	790,8017	33,5	
TIIDQNRDGIISKDDLRLDVL	2298,2178	20	5,9	767,1204	33,62	
EQQVDDLEGSLEQEKKIRM	2274,1162	19	3,9	759,0846	29,14	
EQQVDDLEGSLEQEKKLRM	2274,1162	19	3,9	759,0846	29,14	
HGIVPIVEPEILPDGDHDLK	2192,1477	20	7,7	1097,1411	33,3	
Q(-17.03)QEISDLTEQIGETGKSIH	2095,0068	19	-0,8	1048,5099	35,78	Q1:Pyro-glu from Q:1000.00
AENEYIGLPIETGESVKVS	2091,0371	20	13,9	1046,5593	33,91	
STGEPISODEIDELMKDGD	2078,8838	19	11,5	1040,51	36,7	
GIVLDAGDGVTHNVPVYEGY	2074,0007	20	5,2	1038,0607	34,66	
APKIPDGEKVFDDIQ(+.98)KK	2043,0524	18	4,1	682,0596	25,9	Q16:Deamidation (NQ):1000.00
APKIPDGEKVFDDIQKK	2042,0684	18	1,8	1022,0433	25,47	
SEKLLGSIDLHTQYKF	1993,0156	17	-0,4	997,5147	32,21	
ELEMEEDAGLGN(+.98)GGLGRL	1974,884	19	4,4	988,499	35,21	N13:Deamidation (NQ):1000.00
PKIPDGEKVFDDIQKK	1971,0312	17	-0,3	493,765	25,47	
Q(-17.03)EISDLTEQIGETGKSIH	1966,9484	18	9,4	984,537	34,39	Q1:Pyro-glu from Q:1000.00
ANNVLSGGTMYPGIADRM	1966,9241	19	23,9	984,538	33,13	
GQKDSYVGDEAQSQRGIL	1949,9806	18	5,9	976,0492	23,12	
AERIGEDYIRDLDQLQ	1932,9541	16	-8,4	967,4762	34,09	
KLEKTIDLEDELYAQ	1921,952	16	8	962,0361	33,93	
DLDKSPDDPSRHISGE	1913,8755	17	1,6	957,9465	25,51	
STGEPISODEIDELMKD	1906,8353	17	0,2	954,4251	36,61	
GEPISODEIDELMKDGD	1890,804	17	13,1	946,4661	36,5	
VDDLEGSLEQEKKIRM	1888,9564	16	3	630,6902	25,87	
VDDLEGSLEQEKKLRM	1888,9564	16	3	630,6902	25,87	
ALEEAEGTLEHEEAKIL	1880,9366	17	9,9	941,5291	33,44	
KIPDGEKVFDDIQKK	1873,9785	16	3,2	469,525	24,79	
SMFQSQIQEYKEAF	1863,8348	15	6,6	932,9736	33,4	
MFGEKLGADPEDVILS	1847,9338	17	-6,2	924,9684	33,37	
RADLSRELEEISERL	1814,9486	15	3,8	606,0203	30,1	
LEKTIDLEDELYAQ	1793,8571	15	-1	897,9349	35,41	
NVLSGGTMYPGIADRM	1781,844	17	6,5	891,976	33,4	
RNPFVPPGSPQELEIT	1779,9155	16	-1,6	890,9636	34,87	
YNELRVAPEEHPTLL	1779,9155	15	7,1	891,0132	30,18	
AAEDRSKQLEDDLVAL	1771,8951	16	-0,8	886,9541	32,73	
KDSYVGDEAQSQRGIL	1764,9005	16	5,7	589,3378	22,23	
KLTGAVIHHGGMKFKQ	1750,9664	16	2	584,6639	20,75	
WYLDGEELADEGNIK	1750,8049	15	6,3	876,4554	33,91	
GRVGGPAGIVGPPGSSGPA	1742,9062	21	2,6	872,4626	25,94	
GM(+15.99)PGAEGRTGPIGM(+15.99)PGAR	1742,8192	18	0,6	581,9474	23,66	M2:Oxidation (M):1000.00;M14:Oxidation (M):1000.00
DKN(+.98)GDGYIDREEFAI	1741,7794	15	5,9	871,9431	31,33	N3:Deamidation (NQ):1000.00
NRRIQLVEEELDRA	1739,9277	14	5,4	581,0136	26,92	
SEKEDKYEEIEIKVL	1737,8672	14	5,8	869,9868	26,17	
SQKEDKYEEIEIKVL	1736,8832	14	5,9	869,4949	25,75	
DLDKSPDDPSRHIS	1727,8114	15	14,9	576,9801	24,63	
ASGRTTGIVLDAGDGVTH	1725,8645	18	5,2	863,9837	24,21	
NVIGEPIDERGPISTK	1723,9104	16	-5,2	575,6411	25,84	
FGEKLGADPEDVILS	1716,8933	16	-2,9	859,4515	30,68	
DFPEYDGKDRVHDL	1704,7743	14	8,4	853,4016	26,39	
TLDDLQAEEDKVNTL	1702,826	15	0,6	852,4208	31,23	
AEDRSKQLEDDLVAL	1700,858	15	4,1	851,4398	32,57	
TAEREIVRDIKEKL	1698,9628	14	1,6	850,4901	27,28	
EEMRDEKLAELVTM	1692,8063	14	20,6	847,4677	32,28	
RVGGPAGIVGPPGSSGPA	1685,8849	20	0	843,9497	25,94	

EKTIDDELELYAQ(+.98)	1681,757	14	12,1	841,8756	34,79	Q14:Deamidation (NQ):1000.00
EKTIDDELELYAQ	1680,7729	14	8,9	841,4407	33,21	
KN(+.98)SYEEALDHLETM	1679,7349	14	13,6	840,9257	34,41	N2:Deamidation (NQ):1000.00
TGREFDDLPLHEQS	1642,7587	14	4,5	822,428	26	
PSRIYGFDFKQRY	1641,8627	13	4,4	548,323	30,39	
PSRILYGFDFKQRY	1641,8627	13	4,4	548,323	30,39	
EIWEDDVGHEHIA	1639,7366	14	11	1640,839	34,29	
PDGEKVFDDIQKK	1632,7994	14	11,4	545,2926	24,79	
EDRSKQLEDDLVAL	1629,8209	14	9,3	1630,9199	32,47	
NELRVAPEEHPTLL	1616,8522	14	7,5	809,4774	28,4	
SWEKPDHDGGSRIM	1613,7256	14	2,2	807,8718	22,75	
SALEEAEGTLEHEEA	1613,7056	15	4,9	807,864	30,89	
VLDPRGPPPEGPISY	1608,8511	15	12,4	805,4797	32,24	
DTIFQPGPPGNPRVL	1606,8467	15	-0,8	804,4669	32,94	
STLGEKMTEAIDAL	1606,776	15	-0,5	804,3949	34,45	
GTLEEMRDEKLATL	1604,808	14	0,3	803,4115	29,66	
RELEELSERLEEA	1601,7896	13	4,9	801,9428	27,59	
RELEEISERLEEA	1601,7896	13	4,9	801,9428	27,59	
RVLYPNDNFFEGK	1597,7888	13	-1,2	799,9007	29,35	
DLSREIEEISERL	1587,8103	13	6,5	794,955	34,88	
DLSRELEEISERL	1587,8103	13	6,5	794,955	34,88	
GEKLGADPEDVILS	1569,825	15	10,7	1570,9229	26,57	
GRTTGIVLDAGDGVTH	1567,7954	16	5,3	784,9452	24,12	
TGREFDDLPLHEQ	1555,7267	13	5,8	778,9117	26,49	
DAGAGIALNEHFVKL	1553,8202	15	-8	777,9477	33,54	
TWEPLIDGGARIK	1551,8408	14	-0,6	518,2872	31,36	
KTIDDELELYAQ	1551,7303	13	7,4	776,9147	31,81	
DLTEQLGETGKTIH	1540,7733	14	1,1	771,3948	25,83	
DLTEQIGETGKTIH	1540,7733	14	1,1	771,3948	25,83	
PISEDEIDELMKD	1532,6915	13	16	767,4014	35,99	
EREIVRDIKEKL	1526,8779	12	3,4	509,9917	26,56	
HGIVPIVEPEILPD	1526,8344	14	-4,3	764,4211	38,39	
DLTEQIGETGKSIH	1526,7576	14	0,2	764,3862	25,26	
KEDKYEEIEKVL	1521,7926	12	4,4	761,9427	25,58	
TLGEKMTEAIDAL	1519,7439	14	12,5	760,8887	31,41	
EISDLTEQIGETGK	1518,7413	14	5	760,4166	26,75	
GRVGGPGPAGIVGPPGSS	1517,7949	18	5,6	759,9438	24,38	
N(+.98)WDDMEKIWHH	1510,6299	11	6,5	756,3618	32,93	N1:Deamidation (NQ):1000.00
DLAGRDLTDYLMK	1509,7498	13	3,3	504,282	33,13	
NWDDMEKIWHH	1509,6459	11	9,5	1510,7368	31,01	
WISKQYDEAGPS	1508,6783	13	12,6	755,3906	24,06	
ELRVAPEEHPTLL	1502,8092	13	4,1	752,4495	28,25	
NIEDKADRKKMF	1493,766	12	6,2	747,9292	19,28	
VTWYDNEFGYSN	1493,6099	12	3,2	1494,6219	35,36	
NELRVAPEEHPT(-18.01)L	1485,7576	13	6,5	743,925	27,99	T12:Dehydration:1000.00
GEKLGADPEDVIL	1482,793	14	4,9	742,4423	27,66	
TIIDQ(+.98)NRDGIISK	1472,7834	13	1,2	737,4337	23,96	Q5:Deamidation (NQ):14.02
ADSVAEELGEQLDNL	1472,6995	14	9,7	1473,7887	36,93	
ADSVAEELGEQIDNL	1472,6995	14	9,7	1473,7887	36,93	
TIIDQNRDGIISK	1471,7994	13	0,6	736,9074	24,14	
DKKQRNFDKVL	1460,8099	12	5,7	731,45	18,28	
KVEEFPDLSKH	1456,7197	12	4,9	729,4042	23,3	
DLQHRLEAENL	1451,7004	12	6	726,896	27,48	
AERIGEDYIRD	1448,726	12	7,2	725,4095	29,46	
VHDIPGPPTGPIKL	1439,8136	14	-2,7	720,9121	30,54	
SHLGRPDGNFVPE	1423,6843	13	-2,3	712,8478	24,31	
QVEEADDWLRY	1422,6415	11	2,9	712,3301	33,62	
GEKVFDDIQKK	1420,7197	12	-1,2	474,58	25,47	
ENIEEDIKLVGY	1420,7085	12	3,5	711,3967	34,57	
RHLTPGEQIKIQ	1418,7993	12	3,3	710,4419	20,91	
WVNEEDHLRVI	1408,7098	11	15,9	705,3734	27,7	
RYKEDLEWLR	1406,7306	10	4	469,9414	26,44	
Q(-17.03)VEEADDWLRY	1405,615	11	3	1406,6265	40,09	Q1:Pyro-glu from Q:1000.00
SADQIEDFKEAF	1398,6302	12	2,9	700,3245	32,78	

KRKLEGLDLKLAQ	1397,8354	12	1,7	466,9747	18,43	
DLAGRDLDYLM(+15.99)	1397,6497	12	6	699,8692	33,44	M12:Oxidation (M):1000.00
DRPGPPEGPISY	1396,6986	13	0,5	699,3569	31,18	
WDDMEKIWHH	1395,603	10	0,7	698,8093	28,64	
EDKYEEEIKVL	1393,6976	11	6,4	697,8933	28,06	
EMLDTKQPRQF	1391,6868	11	6,4	696,8871	23,28	
LTDRENQSVLIT	1387,7307	12	6	694,9087	24,2	
			-			
LEGTLLKPNMVTA	1385,7588	13	33,8	693,8959	30,35	
GDGYIDREEFAI	1383,6306	12	5,7	692,8583	32,14	
NVLSGGTMYPGIA	1379,6755	14	8,6	1380,7581	33,7	
LRVAPEEHPTLL	1373,7666	12	0,2	687,8907	27,56	
LEKGEAIDSMIPA	1372,6908	13	12,7	1373,78	29,67	
SADIETYLLEKS	1367,682	12	16,5	684,8917	33,78	
LDLDGTENKSKF	1365,6776	12	0,9	683,8467	24,6	
VVLDKPTPPMGPL	1362,7581	13	-5,4	682,3826	31,74	
			-			
TTGIVLDAGDGVTH	1354,6729	14	14,5	678,3657	26,26	
PEILPDGDHDLQ	1347,6306	12	24,4	450,2285	33,76	
EDRSKQLEDDL	1346,6313	11	4,6	674,357	23,12	
TIIDQN(+.98)RDGIIS	1344,6885	12	6,3	673,3874	26,87	N6:Deamidation (NQ):17.01
KTRLEPVMEEL	1343,7119	11	6,4	672,8984	27,42	
DSELPVDEVFGQ	1333,6038	12	5,7	1334,6187	37,7	
DGPPVPKAPGAPM	1329,675	14	3,7	665,8778	26,08	
DEMNLEDSTKF	1327,5602	11	4	1328,5728	29,18	
SFLGDEETVKKA	1322,6718	12	4,6	662,3766	23,07	
AVIDQDKSGFIE	1320,6561	12	5,1	661,3691	26,08	
KNSYEEALDHL	1317,6201	11	3	659,8193	28,51	
IQLVEELDRA	1313,6826	11	-0,3	657,8484	30,57	
TEQLGETGKTIH	1312,6622	12	1,9	657,3397	25,85	
TEQIGETGKTIH	1312,6622	12	1,9	657,3397	25,85	
TTGHKPELIEAL	1307,7085	12	4,5	654,8953	26,87	
RDEKLAELVTM	1303,6805	11	4,9	652,8814	29,07	
YELPDGQVITIG	1303,6659	12	2,3	1304,6761	36,67	
TVGDHVDLDAF	1302,5728	12	4,3	652,2964	31,12	
VEEADDWLRY	1294,5829	10	3,6	648,301	33,33	
SVAELGEQLDNL	1286,6354	12	11,4	1287,7178	34,67	
SVAELGEQIDNL	1286,6354	12	11,4	1287,7178	34,67	
KKLESIDLQVQV	1285,7241	11	2,8	643,8712	23,27	
KDLLDPIISDR	1283,7085	11	4,4	642,8945	29,32	
AGRDLDYLMK	1281,6387	11	-0,9	641,826	34,09	
SELEELKTVT	1276,6398	11	-8,3	639,3519	29,87	
SVADLVESITKN	1274,6718	12	-2,1	638,3418	31,51	
RELEELSRL	1272,6674	10	7,8	1273,7444	25,76	
REIEISERL	1272,6674	10	7,8	1273,7444	25,76	
RELEEISERL	1272,6674	10	7,8	1273,7444	25,76	
VGDEAQSKRGIL	1271,6833	12	5,8	636,8826	20,8	
IVGDDLTVTNP	1270,6769	12	9,6	1271,7561	24,53	
RKLEGLDLKLAQ	1269,7405	11	3,2	424,2749	20,68	
RVAPPEEHPTLL	1260,6826	11	0,9	631,3491	24,64	
MDLERAKRKL	1258,7179	10	5,6	630,3698	20,11	
RVAPPEHPVLL	1258,7034	11	-0,1	630,3885	25,02	
IDQNRDGIISK	1257,6677	11	7,4	629,8754	23,72	
LLGKIEDEQVL	1255,7023	11	3,7	628,8896	29,98	
SFLGDEETVKK	1251,6346	11	5,8	1252,708	22,58	
VIDQDKSGFIE	1249,619	11	0,1	625,8168	25,17	
VAGDEESYEVF	1243,5244	11	12	1244,6051	31,1	
LRVAPEEHPT(-18.01)L	1242,672	11	5,8	622,3761	27,2	T10:Dehydration:1000.00
GFNAEEKLGIY	1239,6135	11	27	1240,7112	28,97	
SIDDVEEFAT	1237,5714	11	3,3	1238,6396	36,14	
SKQLEDDLVAL	1229,6503	11	8,4	1230,7257	31,72	
VN(+.98)EEDHLRVI	1223,6146	10	3,1	612,8446	24,91	N2:Deamidation (NQ):1000.00
VNEEDHLRVI	1222,6306	10	-1,5	612,3217	24,35	
LSAERSYHIF	1221,6141	10	6,3	611,8469	26,48	
KLTGAVIHGGM	1219,6495	12	8,8	610,8655	18,65	
VLDPRGPPVGPL	1215,6975	12	4,3	608,8866	28,83	
GFTGEEKLGIY	1212,6027	11	8,8	1213,6763	29,36	

GRDLTDYLMK	1210,6016	10	4,7	606,3387	33,13	
DDMEKIWHH	1209,5237	9	7,5	605,8021	31,47	
K(+87.07)SADDIKKAF	1208,6764	10	22,2	403,8904	20,89	K1:Hypusine:129.62
KRIEAPPHIF	1206,6873	10	-6,5	604,3747	23,78	
DIPGPPTGPIKL	1203,6863	12	10,4	1204,7627	33,97	
GEFLESEPIIA	1203,6023	11	-1,6	1204,6077	36,97	
AGDDAPRAVFPS	1201,5728	12	10,1	601,828	24,93	
ENIEEDIKLV	1200,6238	10	9,7	1201,6992	32,38	
LQTIINSPNKA	1197,6718	11	-1,9	599,842	24,18	
EQJGETGKSIH	1197,5989	11	5,2	599,838	25,41	
NSYEEALDHL	1189,5251	10	1,3	595,7706	30,96	
LTDRENSIL	1187,6146	10	7,2	1188,6851	23,56	
WN(+.98)DVIAPK	1184,6077	10	0,9	1185,616	30,68	N2:Deamidation (NQ):1000.00
LDFETPTYVT	1184,5601	10	4,4	1185,5725	34,05	
WNDVIAPEIK	1183,6237	10	2	1184,6333	30,26	
GNPWEKARPE	1182,5781	10	5,5	592,3274	21,13	
GVDNPGHPFIM	1182,5492	11	11,5	1183,6257	29,42	
GLDMEELEDM	1180,4628	10	4,5	1181,4753	37,7	
WYDNEFGYS	1179,4509	9	8,6	1180,5238	32,3	
SELEELKTV	1175,5922	10	2	1176,6018	29,22	
LEQEKIRM	1173,6539	9	-2,5	587,8328	18,37	
LEQEKLRM	1173,6539	9	-2,5	587,8328	18,37	
LTDRENSVL	1173,599	10	3,5	1174,6104	24,39	
GDEAQSKRGIL	1172,6149	11	6,3	587,346	23,12	
KDFYEMEPN	1171,4856	9	8,5	1172,5579	25,38	
KIEEIFKKH	1170,676	9	4,9	586,3481	19,55	
SISDN(+.98)GYQFM	1161,4648	10	1,6	1162,474	33,29	N5:Deamidation (NQ):32.69
GEKLGADPED	1157,5564	11	3	579,8138	14,45	
EIVPGDIVEVS	1155,6023	11	7,7	1156,6729	33,44	
GIVLDAGDGVTH	1152,5775	12	4,2	1153,5896	25,99	
DSELPVDEVF	1148,5237	10	3,7	1149,5352	38,39	
PLNDSVVQLY	1146,592	10	1,6	1147,655	34,19	
DQNRDGIISK	1144,5836	10	-2,6	573,2976	24,14	
VIIEGDLERT	1143,6135	10	8,3	1144,6829	25,17	
GN(+.98)SGLTDVIHM	1143,5231	11	12	1144,5979	32,3	N2:Deamidation (NQ):1000.00
GNSGLTDVIHM	1142,5391	11	9,9	1143,6101	30,38	
K(+14.02)DLLDPIISD	1141,623	10	10,5	1142,696	31,02	K1:Methylation(KR):1000.00
ELPDGQVITIG	1140,6027	11	11,3	1141,6765	32,88	
DLAGRDLDY	1137,5302	10	3,6	1138,5415	27,08	
VALDFENEMA	1137,5012	10	14,2	1138,5781	33,93	
SIDVVEFIA	1136,5237	10	2,8	1137,5342	37,46	
SLDDEFPLS	1136,4873	10	11,3	1137,5609	34,39	
KYDKSLPVVS	1134,6284	10	7,5	1135,6963	22	
MLDLGTENK	1134,5227	10	2,7	568,2701	24,76	
GDDAPRAVFPS	1130,5356	11	9,2	1131,6064	24,83	
GTYYDYVEGL	1130,4768	10	3,8	1131,5403	32,69	
VILEGLERS	1129,5979	10	0,1	565,8063	26,03	
KDLLDPIISD	1127,6074	10	5	1128,6721	32,14	
GEQGMVGGPP(+15.99)GLA	1127,5281	12	8,9	1128,5984	26,83	P9:Oxidation or Hydroxylation:30.46
EATLDDIGMY	1126,4852	10	6,7	1127,5518	33,23	
QIEDFKEAF	1125,5342	9	11,6	1126,6074	29,54	
GHSERRHVF	1123,5635	9	4,9	562,8176	13,06	
NEEDHLRVI	1123,5621	9	5,2	562,8177	24,29	
LHLDDAVRGQ	1122,5781	10	8,5	1123,6465	21,61	
KSADDIKKAF	1121,608	10	5,4	1122,6741	19,71	
KERGMVVGIK	1115,6484	10	4	558,86	18,43	
Q(-17.03)HDLFKEIV	1110,5709	9	5,4	1111,6365	34,5	Q1:Pyro-glu from Q:1000.00
SAERSYHIF	1108,5302	9	6,2	555,3019	26,48	
PPLDGGAKIK	1107,6652	11	1	554,8665	31,3	
FRENLGKLM	1106,5906	9	6,8	1107,6562	25,57	
GHKPELIEAL	1105,6132	10	7,6	1106,6808	26,79	
GHKPELLEAL	1105,6132	10	7,6	1106,6808	26,79	
NVPAMYVAIQ	1104,5637	10	3,4	1105,5747	33,24	
NLPADSPEFL	1101,5342	10	4,3	1102,5968	33,18	

AELGEQLDNL	1100,5349	10	5,8	1101,5991	30,09	
AELGEQIDNL	1100,5349	10	5,8	1101,5991	30,09	
RLQDLVDKL	1098,6396	9	11,2	1099,7109	30,98	
GYDLGEVEFA	1098,4869	10	7,6	1099,553	35,33	
VGPIEEVVQK	1096,6128	10	0,9	549,34	24,8	
AISEELDHAL	1096,54	10	8	549,3069	28,17	
GVPSAPGQVIAT	1095,5924	12	6,8	1096,6587	26,52	
WYDN(+.98)EFGY	1093,4028	8	10,8	1094,4734	34,55	N4:Deamidation (NQ):1000.00
KTDLNFENL	1092,5452	9	6,9	1093,6113	29,95	
LGDEETVKKA	1088,5713	10	8	545,3229	23,46	
IIAPPERKY	1085,6233	9	6,3	1086,6873	20,72	
MGPPDPILGVS	1081,5477	11	-1,4	1082,5535	34,74	
NLGTGLRGGVH	1079,5836	11	4	540,8013	20,89	
RIEAPPHIF	1078,5923	9	8,5	1079,6594	26,96	
GWRPGAGYTN	1077,4991	10	9,2	539,7618	23,74	
YGDFKQRY	1075,5087	8	6,4	1076,5723	20,59	
SYEALDHL	1075,4822	9	8,2	1076,5488	29,14	
DDAPRAVFPS	1073,5142	10	12,1	1074,5837	25,07	
ADYETDLTF	1073,4553	9	10	1074,5238	33,58	
GDEESYEVF	1073,4189	9	12,4	1074,49	30,2	
EIVPGDIVEV	1068,5703	10	6,9	1069,634	35,48	
EADDWLRY	1066,4719	8	11,4	1067,5415	31,21	
RVEAPPHIF	1064,5767	9	1,4	533,2963	26,07	
TLDDVIQTGV	1059,5448	10	14,1	530,8115	24,34	
TVDDIIQTGV	1059,5448	10	19,7	1060,5312	24,67	
GDDLTVTNPK	1058,5244	10	8,1	1059,5889	24,2	
AAAEGPMKGIL	1056,5637	11	4,4	1057,5757	28,43	
DDVDPPRIM	1056,491	9	3,3	1057,5017	26,73	
VLKITPTTFS	1055,6227	10	6	1056,6848	23,74	
DLDKSPDD	1050,4506	9	9,1	1051,5168	24,8	
DTVLDMIKD	1048,511	9	15,2	1049,5835	31,18	
MWNEHLGY	1048,4436	8	3,1	1049,4541	28,68	
TIEDQLSEL	1046,5132	9	9,7	1047,5798	34,13	
TLEDQLSEI	1046,5132	9	9,7	1047,5798	34,13	
TLEDQLSEL	1046,5132	9	9,7	1047,5798	34,13	
SWEPPEYM	1037,4164	8	3,2	1038,427	33,57	
NAEEKLGIY	1035,5237	9	8,3	1036,5872	24,96	
TVEDQLSEL	1032,4976	9	1,2	1033,5061	30,96	
AELFDPVIK	1030,5698	9	-1,4	1031,5757	31,7	
SISDN(+.98)GYQF	1030,4243	9	3,2	1031,4349	29,02	N5:Deamidation (NQ):37.54
ELGEQLDNL	1029,4978	9	9,4	1030,562	29,36	
ELGEQIDNL	1029,4978	9	9,4	1030,562	29,36	
AERSYHIF	1021,4981	8	21,8	1022,5757	24,34	
KHKDFFAK	1019,5552	8	4,1	510,787	15,42	
LGDEETVKK	1017,5342	9	4	509,7764	23,15	
LFDKPVSPL	1014,575	9	11,3	1015,6414	29,92	
ELTSPILIK	1012,6168	9	3,4	1013,6276	29,82	
KDLLDPIIS	1012,5804	9	2,7	1013,5905	32,77	
GNSGLTDVIH	1011,4985	10	2,3	506,7577	24,95	
KLPDKVAIQ	1010,6124	9	7,7	1011,6738	21,42	
EEDHLRVI	1009,5192	8	7,2	1010,5338	23,48	
TGEEKLGIY	1008,5128	9	7,3	1009,5737	24,6	
APSADAPMFV	1004,4637	10	9,8	1005,5269	31,57	
DYETDLTF	1002,4182	8	2,2	1003,4277	34,66	
LISMPITPQ	998,5471	9	-2,9	999,5514	32,56	
GGLPDVVTIQ	997,5444	10	0,5	998,5521	32,94	
KNPLLEFH	996,5392	8	0,1	499,2769	26,52	
SADDIKKAF	993,5131	9	3,5	497,7656	20,51	
IDREEFAI	991,4974	8	5,9	992,5562	28,45	
TVDDLPLY	991,4862	9	8,5	992,5485	33,77	
LEGDLKLAQ	985,5444	9	5,4	986,6023	24,12	
AAEGPMKGIL	985,5266	10	9,1	986,5892	27,52	
VLDAGDGVTH	982,4719	10	7,3	492,27	25,58	
GLEESDSVF	981,4291	9	9,7	982,4921	29,54	
VVTPDMGMM	979,4177	9	11,4	980,4812	31,01	
PGPPTGPIKL	975,5753	10	4	488,8193	33,46	

KDDL RDVL	972,524	8	6,4	973,5833	24,93	
YDDYVEGL	972,4076	8	10,8	973,4711	30,73	
SGLTDVIHM	971,4746	9	0,8	972,4827	32,61	
LD FENEMA	967,3957	8	10,4	968,4585	29,87	
RGVY PVLY	965,5334	8	1,2	966,5419	29,77	
DIPGPIGPV	960,528	10	-0,5	961,5348	34,01	
TLDDVIQTG	960,4764	9	6,6	961,5352	26,71	
DAPRAVFPS	958,4872	9	6,9	959,5451	24,4	
SEEMLAEF	954,4004	8	2,2	955,4098	34,66	
GLVPIVEPE	951,5276	9	2,6	952,5374	32,77	
GIVPIVEPE	951,5276	9	2,6	952,5374	32,77	
N(+.98)VPVYEGY	940,4178	8	8,6	941,4774	28,53	N1:Deamidation (NQ):1000.00
NVPVYEGY	939,4338	8	14,9	940,4713	27,52	
GVDNPGHPF	938,4246	9	7,1	939,4386	23,35	
LHLDDAVR	937,4981	8	6	938,511	22,34	
RKEFVKM	936,5215	7	3,7	937,5322	17,41	
EASGPINF	934,4396	9	7,3	935,4966	24,92	
DTVLDMIK	933,4841	8	5,3	934,5403	32,51	
IEGLERT	931,4611	8	2,2	932,4704	25,9	
IDVGEIGPQ	926,4709	9	4	927,4819	27,36	
GIDTENMF	925,3851	8	6,6	926,3986	31,51	
MYPGIADR	921,4378	8	6,5	922,451	23,7	
AKVIN(+.98)DNF	920,4603	8	-1,7	921,4661	24,18	N5:Deamidation (NQ):38.40
AKVINDNF	919,4763	8	4,5	920,531	22,62	
AEGPMKGIL	914,4895	9	9,5	915,5485	27,2	
ADDIKAF	906,481	8	13,8	454,2541	20,27	
GDEETVKK	904,4501	8	4,4	453,2551	22,18	
TLDDVIQT	903,4549	8	2,1	904,5066	25,72	
AINDPFID	903,4338	8	8,8	904,4905	31,57	
FDKPV SPL	901,4908	8	7,8	902,5475	29,91	
ADRKKMF	894,4745	7	5,3	895,4866	15,15	
TGHKPELI	893,4971	8	14,8	447,7624	20,5	
TGHKPELL	893,4971	8	14,8	447,7624	20,5	
PAMYVAIQ	891,4524	8	10,6	892,4502	32,57	
ETKTPGIM(+15.99)	891,4371	8	2,9	892,447	18,43	M8:Oxidation (M):1000.00
ETKTPGLM(+15.99)	891,4371	8	2,9	892,447	18,43	M8:Oxidation (M):1000.00
ANPLLEAY	889,4545	8	1,8	890,4634	30,22	
LLGEVEDL	886,4647	8	16,7	887,4989	31,14	
GLTDVIHM	884,4426	8	9,9	885,5002	31,64	
LDVEIPAK	883,5015	8	6,1	884,5547	25	
LDAGDGVTH	883,4036	9	6,5	884,4166	25,98	
PSRHISGE	881,4355	8	-0,1	441,725	13,37	
AEKGVPLY	875,4752	8	4,9	876,527	23,21	
ETKTPGIM	875,4423	8	9,6	876,4982	21,39	
ETKTPGLM	875,4423	8	9,6	876,4982	21,39	
ENFLVIH	870,46	7	8,8	871,5159	29,34	
GKFIRIH	869,5235	7	2,6	870,533	18,75	
EKSRVTF	865,4658	7	3,8	866,4763	18,59	
ESKTPGLM	861,4266	8	8,3	862,4806	20,82	
TERGYSF	858,3871	7	8	859,4417	22,49	
GTGLRGGVH	852,4566	9	5,4	427,2579	20,15	
ILTERGY	850,4548	7	5,4	851,5067	21,82	
KEIVNML	845,4681	7	0,6	846,4759	27,91	
KASEKLLG	844,5018	8	1,6	845,5104	17,19	
APRAVFPS	843,4603	8	5,2	844,5107	22,43	
EGPMKGIL	843,4524	8	5,3	844,5029	26,12	
SADAPMFV	836,3738	8	19,9	837,4371	31,1	
PDNLHLQ	835,4188	7	-1,3	418,7161	30,02	
EASGPINF	833,3919	8	8,7	834,4457	25,84	
AIKEKIM	831,4888	7	5,5	832,5006	19,75	
ETLWGVQ	831,4127	7	9,2	832,4667	31,06	
HTPVDMM	829,3463	7	2,9	830,356	24,22	
KGVNLPGAA	825,4708	9	5,7	826,4828	22,62	
VPVYEGY	825,3909	7	5,8	826,4418	26,79	

EEALDHL	825,3868	7	2,9	826,3965	29,5
YVAMPGAD	822,3582	8	9,7	823,4121	24,29
FALVHYA	819,4279	7	2,7	820,4374	28,35
NPLLEAY	818,4174	7	8,5	819,4692	30,18
EGDLERT	818,377	7	7,5	819,428	25,2
GEKLGAD	816,4341	8	0,7	817,4419	11,14
SLPGPGPW	809,4072	8	-18	810,3999	32,87
HTGPVW	808,4232	7	4,8	809,4714	27,18
EFDLGTK	808,3967	7	5,9	809,4088	23,71
EKGVPLY	804,4381	7	5,2	805,4866	23,02
PGHPFIM	797,3894	7	2,8	798,3989	27,08
GHKPELI	792,4493	7	6,8	793,462	20,06
GHKPELL	792,4493	7	6,8	793,462	20,06
NQVADIM	789,3691	7	7	790,419	26,13
DNPGHPF	782,3347	7	4,9	783,3458	23,35
TFNVPAM	778,3683	7	21,7	779,3925	30,48
NVPVYEG	776,3704	7	5,3	777,4175	22,6
SLRGIVK	771,4966	7	5,3	386,7754	17,21
KVTGLVVG	771,4854	8	14,2	386,7555	20,56
MILPVGAA	770,436	8	0,9	771,444	32,21
DAGDGVTH	770,3195	8	10,8	771,3705	24,16
DTPIPGY	761,3596	7	10,7	762,4108	26,7
GGSPITGY	750,3548	8	2,7	751,3641	24,77
NLGTGLR	729,4133	7	4,9	730,4242	20,31
SLPVVSN	714,3912	7	-6,3	715,3939	24,14
ALAPSTM	689,3418	7	7,8	690,3861	22,65
AGDGVTH	655,2925	7	10,1	656,3365	24,16



Production of hydrolysates and peptides from a new protein source: *Diplodus annularis*

Fatma Hamed^{a,b}, Imen Elgaoud^a, Barbara Deracinois^b, Christophe Flahaut^b,
Naima Nedjar^{b,*}, Ahmed Barkia^{a,c,**,1}

^a Laboratory of Enzyme Engineering and Microbiology, University of Sfax, National Engineering School of Sfax, B.P. 1173-3038, Sfax, Tunisia

^b UMR Transfrontalière BioEcoAgro N° 1158, Université Lille, INRAE, Université Liège, UPJV, JUNIA, Université Artois, Université littoral côte d'Opale, ICV-Institut Charles Viollette, F-59000, Lille, France

^c Higher School of Health Sciences and Techniques, BP 1009, 3038, Sfax, Tunisia

ARTICLE INFO

Keywords:

Diplodus annularis
Enzymatic hydrolysis
Functional properties
Peptides
Protein hydrolysates

ABSTRACT

In the present study, *Diplodus* proteins were hydrolyzed using one of two proteases alcalase and savinase, then, the hydrolysates were characterized by their chemical composition, functional properties and peptide content. Protein hydrolysates of *Diplodus annularis* with different degrees of hydrolysis (DH of 8.14% and 15.42%) were prepared using the enzymes alcalase® and savinase®. The protein hydrolysates obtained by treatment with savinase® had a higher protein content than that produced with alcalase®. Both hydrolysates showed great heterogeneity in their peptide composition. In comparison with the alcalase generated hydrolysate, savinase hydrolysate is richer in hydrophobic peptides as shown by RP-HPLC results. Also, the RP-HPLC-MS/MS, according to database survey, allowed the identification of 906 peptides in this hydrolysate against only 536 peptides in the alcalase hydrolysate. Regarding the functional properties, the maximum solubility values, the best foaming properties and the greatest oil and water retention capacities were obtained with the hydrolysate produced by savinase action. The emulsifying property and emulsion stability showed higher values for the alcalase generated hydrolysate with a lower degree of hydrolysis. As a consequence of increasing hydrolysate concentrations, the emulsifying activity index decreased. Conversely, the foaming abilities increased as the hydrolysate concentrations increased. The results of the present study suggest that alcalase and savinase can be used for the conversion of *Diplodus annularis* proteins into numerous peptides with promising functional properties.

1. Introduction

The last decades have witnessed a real boom in the production of food protein hydrolysates by the action of enzymes. Among the different food proteins, proteins of marine origin are the most common in this field. Indeed, they have the advantage of being inexpensive and available in large quantities (Gao et al., 2021; Idowu et al., 2021). Thus, proteins of this origin offer potential for the preparation of value-added products at low cost and in sufficient quantity to be exploitable in industry.

The production of capture fisheries and aquaculture is very

important. In the year 2018, it amounted to 179 million tones (FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture, 2020). According to Kristinsson and Rasco (2000), about 50% of the aquatic production ends up as by-products (skin, head, viscera, trimmings, liver, frames, bones, etc.). The proteins of these co-products, but also of muscles of species that are underutilized or with low price, constitute an opportunity for obtaining value-added compounds. Therefore, these proteins have a particularly high economic potential. Different products and by-products of many marine organisms are used for the preparation of protein hydrolysates. They include muscles of Sardinella (Jemil et al., 2017), Silver Catfish (*Arius thalassinus*) (Abraham, 2017), Yellowstripe

* Corresponding author.

** Corresponding author. Laboratory of Enzyme Engineering and Microbiology, University of Sfax, National Engineering School of Sfax, B.P. 1173-3038, Sfax, Tunisia.

E-mail addresses: naima.nedjar@univ-lille.fr (N. Nedjar), ahmedbarkia_lgem@yahoo.fr (A. Barkia).

¹ contributed equally in this article.

Scad (*Selaroides leptolepis*) (Fawzya et al., 2020), Triggerfish, *Boops boops*, *Cuttlefish*, *Smooth hound* (Lassoued et al., 2021) and by-products of Aquaculture Turbot (*Scophthalmus maximus*) [heads, (trimmings + frames), viscera] (Vázquez et al., 2020), viscera Ribbon Fish (*Lepturacanthus Savala*) (Yathisha et al., 2022), Australian Rock Lobster Shells (*Jasus edwardsii*) (Nguyen et al., 2016) and Red salmon heads (Sathivel et al., 2005). Obtained hydrolysates may have several properties that give them an interest in various applications. For example, their high protein content (60%–85% of dry weight) (Abraham, 2017; Ben Slama-Ben Salem et al., 2017; Lassoued et al., 2021) and their richness in essential amino acids (36%–51% of total AAs) (Ben Slama-Ben Salem et al., 2017; Kakko et al., 2022; Lassoued et al., 2021; Sathivel et al., 2005) propose them for a role in the correction of inadequate diets and in the development of specific alimentary formulations.

Limited hydrolysis converts proteins into a mixture of different size peptides and free amino acids, and can therefore affect their properties. In particular, it can affect functional properties which, in turn, influence an ingredient's usefulness in food and cosmetics, and govern the physical behavior during preparation, processing and storage (Damodaran et al., 2007).

An improvement of different functional properties was observed in hydrolysates of various proteins such as those of Ribbon Fish (*Lepturacanthus Savala*) viscera (solubility and oil retention capacity) (Yathisha et al., 2022), octopus (solubility and emulsifying and foaming properties) (Ben Slama-Ben Salem et al., 2017) of sardine heads and viscera (solubility, foaming capacity and Fat binding capacity) (Souissi et al., 2007). Nevertheless, the real impact of the hydrolysis depends on various factors such as the DH and the enzyme specificity. Indeed, Souissi et al. (2007) reported that moderate hydrolysis (DH = 6.62%) with alcalase of Sardinella head and viscera proteins improves the emulsifying capacity; but this property is reduced in the event of a more extensive hydrolysis (DH = 9.31% and 10.16%). Similarly, Sathivel et al. (2005) reported that an increase in the hydrolysis time of the proteins of heads and viscera of sockeye salmon is associated to the reduction of emulsion stability and fat adsorption.

The production of protein hydrolysates could be a valid approach to add value to low cost fish such as *Diplodus annularis*. This sparidae is a flat, oval fish that lives in the coastal waters of a wide geographical area including the Atlantic coast from Mauritania to Brittany, the Black Sea and the Mediterranean. The proteins of this sparidae have never been used for the preparation of hydrolysate and, therefore, their function and bioactive potential are still unknown. The aims of the present work were to enzymatically obtain *Diplodus* protein hydrolysates using the alcalase and savinase enzymes, to characterize their chemical composition, hydrophobicity profile, peptide content and functional properties.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pataclet (*Diplodus annularis*) was freshly purchased from the fish market of Sfax city, Tunisia. Muscle was separated, rinsed with cold distilled water, and then stored in sealed plastic bags at -20°C until used.

Chemicals and solvent reagents of analytical grade were obtained from different commercial sources. Commercial proteases, alcalase 2.4 L and savinase, were kindly supplied by novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Trifluoroacetic acid (TFA), mass spectrometry (MS)-grade water and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2. Production of *diplodus* protein hydrolysates (DPHs)

D. annularis muscle (500 g), in 1000 mL distilled water was first minced, using a grinder (Moulinex Charlotte HV3, France) and then

cooked at 90°C for 20 min to inactivate endogenous enzymes. The cooked muscle sample was subsequently homogenized in a Moulinex® blender for about 2 min. The samples were adjusted to optimal pH and temperature for each enzyme preparation: Savinase® (3 U/mg; pH 9; 50°C) and Alcalase® (3 U/mg; pH 8, 50°C). The protein solution was allowed to equilibrate for 30 min before hydrolysis was initiated. Control experiments were also performed without enzyme addition.

Enzymes were added to the reaction to give an enzyme: substrate (E/S) ratio of 3 U/mg (unit of enzyme: weight of protein). Enzymes were used at the same activity levels to compare hydrolytic efficiencies. During the reaction, the pH of the mixture was maintained constant by continuous addition of 4 N NaOH solution. After the required digestion time, the reaction was stopped by heating the solution for 20 min at 80°C to inactivate enzymes. *Diplodus* muscle protein hydrolysates were then centrifuged at 5000 g for 20 min to separate insoluble and soluble fractions. Finally, the soluble fractions were freeze-dried using a freeze-dryer and stored at -20°C for further use.

2.3. Determination of the degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH), defined as the percent of the number of peptide bonds cleaved (h) to the total number of peptide bonds in the protein substrate (htot), was calculated from the amount of base (NaOH) added to keep the pH constant during the hydrolysis (Adler-Nissen, 1986) as given below.

$$DH(\%) = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{htot} \times 100$$

where B is the amount of NaOH consumed (mL) to keep the pH constant during the reaction. Nb is the normality of the base, MP is the mass (g) of protein ($N \times 6.25$), and α is the average degree of dissociation of the α -NH₂ groups released during hydrolysis expressed as:

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

where pH and pk are the values at which the proteolysis was conducted. The total number of peptide bonds (htot) in a fish protein hydrolysate was assumed to be 8.6 meq/g (Adler-Nissen, 1986).

2.4. Chemical analysis

The moisture and ash content were determined according to the (AOAC 2000) standard methods 930.15 and 942.05, respectively total nitrogen content of DPHs and UDP was determined using the Kjeldahl method according to the AOAC method number 984.13. Crude protein was estimated by multiplying total nitrogen content by the factor of 6.25. Lipids were determined gravimetrically after Soxhlet extraction of dried samples with hexane for 2 h.

2.5. Peptide identification

Reversed phase ultra-performance liquid chromatography (RP-UPLC) system consisted of binary pump (G7120A), a multisampler (G7167B), an inline degasser and a variable wavelength detector (VWDG7114B) adjusted to 214 nm. All the chromatographic processes were performed with a C18 column (150 × 2.6 mm). Samples were filtered through 0.22 μm polyvinylidene difluoride (PVDF) filters and then injected. The injection volume was 10 μL and the flow rate was 0.3 mL/min. A gradient was applied for the mixture of solvent A (ultrapure water + 0.1% formic acid) and eluent B (acetonitrile + 0.1% formic acid) with eluent B increasing from 5% 5 min, to 60% in 40 min and to 95% in 47 min, then back to initial conditions.

Savinase and alcalase-based hydrolysates, at a concentration of 10 mg mL⁻¹, were centrifuged for 10 min at 8000 × g and 10 μL of supernatants were analyzed in triplicate by RP-HPLC-MS/MS as described

below. Peptides were chromatographically separated at 30 °C on an ACQUITY UPLC system (Waters Corporation, France) using a C18AQ column (150 × 3.0 mm, 2.6 μm, Uptisphere CS EVOLUTION, Interchim, France). The mobile phases consisted of solvent A (0.1% (v/v) formic acid/99.9% (v/v) water) and solvent B (0.1% (v/v) formic acid/99.9% (v/v) acetonitrile (ACN)). The ACN gradient (flow rate 0.5 mL min⁻¹) was as follows: 1% solvent B during 3 min, from 1% to 30% solvent B over 42 min followed by washing and equilibrating procedures with respectively 95% and 1% solvent B for 5 min each. The eluate was directed into the electrospray ionization source of the qTOF Synapt G2-Si™ (Waters Corporation, Manchester, UK) previously calibrated using a sodium formate solution. MS analysis was performed in sensitivity, positive ion and data dependent analysis (DDA) modes using the proprietary MassLynx software (Waters). The source temperature was set at 150 °C and the capillary and cone voltages were set to 3000 and 60 V. MS data were collected for m/z values in the range of 50 and 2000 Da with a scan time of 0.2 s. A maximum of 10 precursor ions were chosen for MS/MS analysis with an intensity threshold of 10 000. MS/MS data were collected with a CID fragmentation mode and a scan time of 0.1 s with specified voltages ranging from 8 to 9 V and from 40 to 90 V for the lower and higher molecular mass ions, respectively. The leucin + enkephalin ([M + H]⁺ of 556.632) was injected in the system every 2 min for 0.5 s to follow and to correct the measure error during all the time of analysis.

Database searches were performed in the UniProt databases restricted to *Sparidae* via PEAKS® Studio 10.6 XPro (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada). A mass tolerance of 35 ppm and an MS/MS tolerance of 0.2 Da were allowed. The data searches were performed without notifying the choice of enzyme. The relevance of protein and peptide identities was judged according to their score in the research software (p-value of 0.05 (p < 0.05) and a false discovery rate <1%).

The number of unique and common peptides identified between the two hydrolysates were presented in Venn diagram using R software. In order to envision peptide identifications, the data were exported from PEAKS® Studio to a home-built Microsoft Excel heat map to determine the amino acid occurrences in the two major proteins according to Savinase- or alcalase-based hydrolysates.

2.6. Determination of functional properties

2.6.1. Solubility

Solubility of DPHs was carried out over a wide range of pH values from pH 2.0 to pH 10.0 as described by Tsumura et al. (2005). The percentage of soluble proteins was calculated at each pH value. Solubility analysis was carried out in triplicate.

$$\text{Nitrogen solubility (\%)} = \frac{\text{Nitrogen content in the supernatant}}{\text{Total nitrogen content in the sample}} \times 100$$

2.6.2. Emulsifying properties

The emulsifying activity index (EAI) and the emulsion stability index (ESI) of the hydrolysates were determined according to the method of Pearce and Kinsella (1978) using the following equation:

$$\text{EAI} \left(\frac{\text{m}^2/\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0}{0.25 \times \text{protein weight (g)}}$$

$$\text{ESI (min)} = \frac{A_0}{\Delta A} \times t$$

where ΔA is (A0-A10) and t = 10 min. All determinations are means of three measurements.

2.6.3. Foaming properties

Foam expansion (FE) and foam stability (FS) of DPHs were determined according to the method of Shahidi et al. (1995).

2.6.4. Water and oil holding capacity

Water Imbibing Capacity (WIC) and Oil Imbibing Capacity (OIC) were measured according to Lin et al. (1974). A mass of 100 mg of Hydrolysates was separately added to 10 mL of corn oil and 10 mL of distilled water to evaluate OIC and WIC, respectively. The mixtures were stirred and the tubes were then centrifuged at 2500×g for 30 min. The free oil and water were decanted and the absorbed oil volume was determined.

3.6.5. Statistical analysis

Analysis was performed using SPSS software (Version 24.0, SPSS, Chicago, IL). DATA were subjected to analysis of variance (ANOVA) and mean comparisons were carried out by Duncan's multiple range test (p < 0.05). All tests were carried out in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of *Diplodus annularis* protein hydrolysates (DPHs)

Alongside the nature of the raw material and the conditions of hydrolysis, the specificity of enzyme used has a great effect on the yield and properties of the final product. In the present work, two protein hydrolysates were prepared from *D. annularis* using two different serine endoproteases (savinase and alcalase).

To determine the time required to obtain the final degree of hydrolysis (DH), hydrolysis kinetics was carried out. Fig. 1 reports the evolution of DH as a function of reaction time. Unsurprisingly, the DH was found to rapidly increase during the first hour of the reaction, then it gradually declined until it vanished at the stationary phase during which the DH remained constant. An inhibition by inhibitor derivatives and/or substrate diminution may result in a gradual decrease in rate until reaction rate disappears. The results showed that the degree of hydrolysis of the savinase generated hydrolysate (DPH-S) was the highest, with the DH value at 15.42%, whereas it was 8.14% for the alcalase generated hydrolysate (DPH-AL) under the optimal enzymatic hydrolysis conditions after 6 h, indicating that savinase enzyme cleaved more peptide bonds than alcalase.

Savinase has been used to produce hydrolysates from various proteins of two origins: lentil (Garcia-Mora et al., 2014) and blue whiting (*Micromesistius poutassou*) (Egerton et al., 2018). In fact, this enzyme was previously used, at an E/S ratio equal to that of the present study, to hydrolyze shake head proteins (Karoud et al., 2019) and head and viscera of Eel (Bougatef et al., 2020). In these two studies, obtained DH was clearly lower than that obtained in the present study.

Alcalase has been used for the preparation of hydrolysates from many marine proteins such as salmon head (Gbogouri et al., 2004), turbot (*Scophthalmus maximus*) (Vázquez et al., 2020), rainbow trout or ribbonfish (*Lepturacanthus savala*) (viscera) (Yathisha et al., 2022), dogfish (*squalus acanthis*) shark (muscle) (Diniz & Martin, 1997), catfish (*Clarias batrachus*) (muscle) (Seniman et al., 2014), Oreochromis niloticus (fillet) (Finkler et al., 2022), common carp (*Cyprinus carpio*) roe (Chalamaiah et al., 2015), catfish (*Nemapteryx caelata*) (roe) (Binsi et al., 2016), Common Carp Roe (Ghelichi et al., 2018), blue whiting (*Micromesistius poutassou*) (Egerton et al., 2018), Cobia (*Rachycentron canadum* (frame) (Amiza et al., 2012) and Nile perch, Grass carp and Nile tilapia (skin) (Wasswa et al., 2007). In general, it showed an excellent hydrolytic efficiency. In the present study, this efficiency is modest as shown by the relatively low value of DH.

3.2. Physico-chemical composition

The results of proximal composition analysis of undigested *Diplodus* proteins (UDP) and its hydrolysates are given in Table 1. All samples showed high protein content. Corresponding values for hydrolysates prepared using savinase and alcalase were 79.79%, and 72.68%, respectively. These values are within the range of values found in other

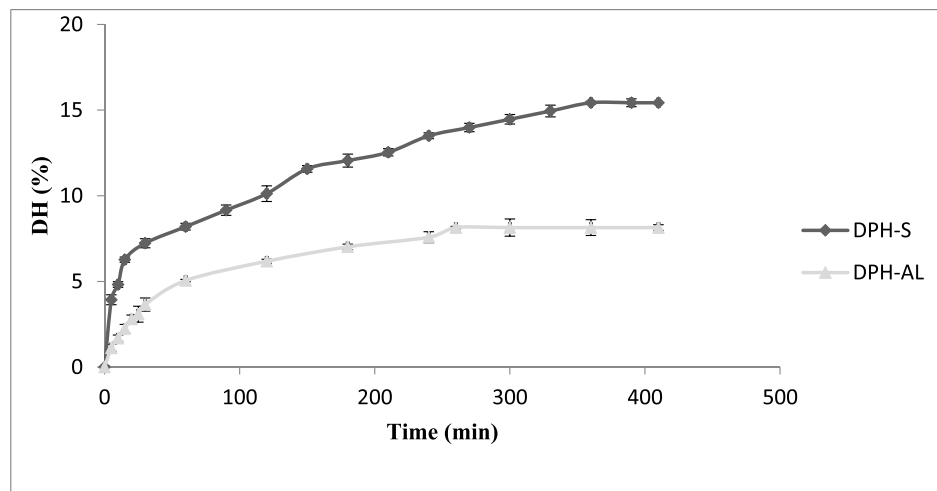


Fig. 1. Hydrolysis curves of *Diplodus* muscle proteins treated with two enzymes. DPH-S: Savinase generated *Diplodus* protein hydrolysate; DPH-AL: Alcalase generated *Diplodus* protein hydrolysate.

Table 1

Physico-chemical composition of UDP and DPHs.

	Protein content (%)	Lipids levels (%)	Moisture (%)	Ash (%)
UDP	18.97 ± 0.73	2.57 ± 0.04	78.26 ± 0.91	5.62 ± 0.4
DPH-S	79.79 ± 0.74	0.89 ± 0.1	13.28 ± 1.5	12.70 ± 0.25
DPH-AL	72.68 ± 1.14	1.22 ± 0.17	9.58 ± 0.6	10.67 ± 0.2

fish protein hydrolysates (Abraham, 2017; Ben Khaled et al., 2014; Ben Slama-Ben Salem., 2017; Henriques et al., 2021; Seniman et al., 2014; Taheri et al., 2013). Compared to DPH-AL, DPH-S contained higher protein content. This may be a consequence of its greater DH which allows better solubilization of proteins.

DPHs exhibited low lipid content. As illustrated in Table 1, higher DH is associated to a better delipidation. The lipid level of the DPH-S (0.9%) was significantly lower than that of DPH-AL (1.22%). Similar lipid levels were reported in the protein hydrolysate from *Octopus vulgaris* (Ben Slama-Ben Salem., 2017) and *Mung bean* (*Vigna radiate*) (Xie., 2019). However, high lipid contents were reported in cuttlefish (Balti et al., 2010) and Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) leaf (Calderón-Chiu et al., 2021) protein hydrolysates. The decreasing lipid content in the protein hydrolysates can be justified by the low amount of lipid in the initial raw material and centrifugation step that removes the lipids. According to Kristinsson and Rasco (2000), the low level of lipid residues in the protein hydrolysates are requested in order to increase its stability towards lipid oxidation during storage.

The ash contents were 10.67%, 12.7% and 5.62% in DPH-AL and DPH-S and undigested proteins, respectively. These results were higher than that of protein hydrolysate prepared from *Mung bean* (*Vigna radiate*) proteins (Xie et al., 2019) which was (6.62% ± 2.89%) and similar to those found in protein hydrolysates prepared from cuttlefish (*Sepia officinalis*) (Ktari et al., 2013). The addition of NaOH for pH adjustment during hydrolysis may account for the higher ash content in hydrolysates, compared to intact proteins (Nasri et al., 2014). Thus, the greater ash content of DPH-S, compared to DPH-AL, appears as a consequence of its greater DH, which means the appearance of a greater number of acid equivalents and, consequently, the consumption of more NaOH.

3.3. Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

RP-HPLC has become an important method to separate and purify peptides (Girgih et al., 2013). Depending on their hydrophobicity, the peptides interact more or less strongly with the stationary phase and, therefore, they are eluted more or less rapidly by the polar mobile phase. Thus, the elution order of peptides depends on their hydrophobic/hydrophilic character. However, large peptides elution also depends on size, probably, because they generally have a more hydrophobic character than small peptides. The total ion currents (TICs) of RP-HPLC elution profiles of DPH-S (A) and DPH-AL (B) are shown in Fig. 2. Both chromatograms show very intense and similar global TIC profiles illustrating the heterogeneous composition of *Diplodus* protein hydrolysates after proteolysis. However, as highlighted by the dotted line, the TIC profile of DPH-S is more intense than those of DPH-AL, suggesting a greater number of ions and therefore peptides in DPH-S rather than in DPH-AL. Nevertheless, several differences are observed between the two chromatograms, especially at the end (between 30 and 45 min) of the elution gradient where the most hydrophobic peptides are eluted.

3.4. Peptide identification by peptidomics approach (RP-HPLC-MS/MS + bioinformatics)

Both hydrolysates were subjected to triplicate RP-HPLC-MS/MS analysis, and the bioinformatics retreatment of data with Peaks® Studio software using the Swiss-Prot/TrEMBL protein database restricted to Sparidae (access on January 2022). Peaks® Studio software identified 258 common peptides to both hydrolysates and 648 and 278 distinct peptides for the hydrolysates generated by savinase and alcalase, respectively (Fig. 3A). The 906 peptides identified from alcalase- and savinase-based hydrolysates correspond to 45 and 46 distinct polypeptides, respectively (Supplemental Tables 1 and 2). As expected, the most largely identified proteins were the alpha skeletal muscle A actin and the fast skeletal muscle-like myosin heavy chain. As illustrated with the Venn diagrams, 34 peptides (Fig. 3B) of the alpha actin were common between savinase- and alcalase-based hydrolysates while 72 and 29 peptides were specifically generated by savinase and alcalase, respectively. In the same way, 51 peptides (Fig. 3C) of the fast skeletal muscle-like myosin heavy chain were common between savinase- and alcalase-based hydrolysates, while 192 and 57 peptides were specifically generated by savinase and alcalase, respectively.

The peptide abundance of a given protein of each hydrolysate were

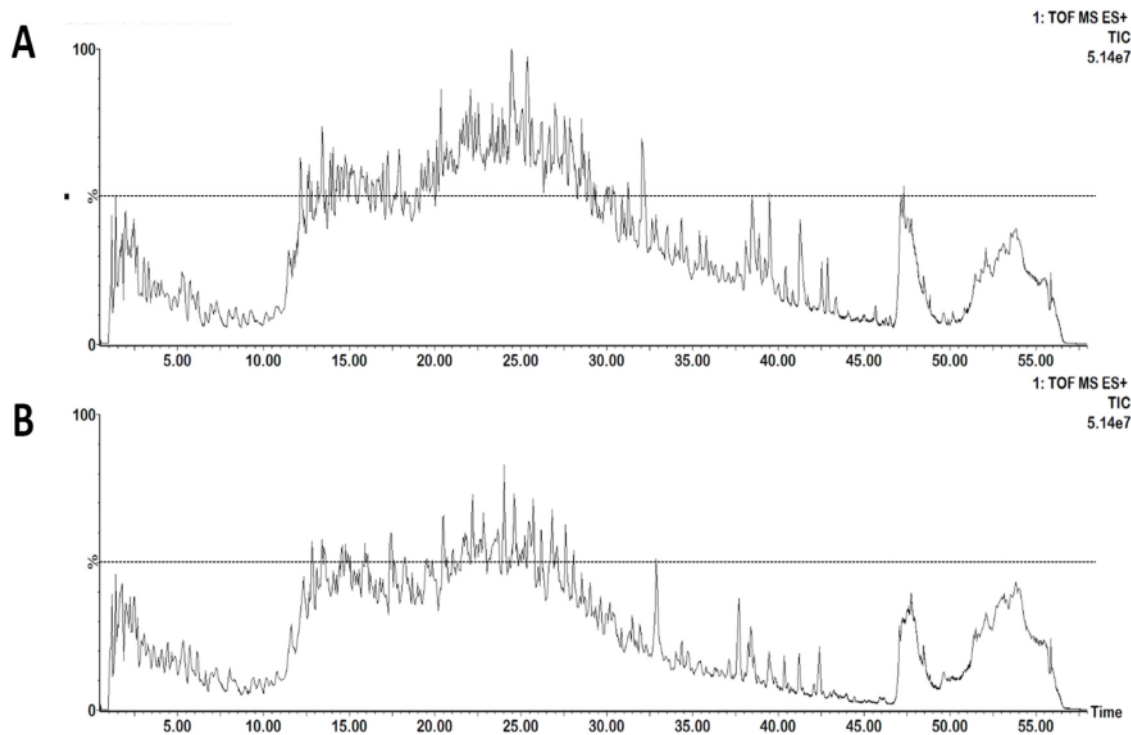


Fig. 2. Total ion current (TIC) chromatograms obtained by RP-HPLC-MS analysis of DPH-AL (the alcalase-generated hydrolysate) (A) and DPH-S (the savinase generated hydrolysate) (B).

assessed using a home-built Microsoft Excel heat map giving the amino acid occurrences in the proteins (from the N-terminal amino acid (left) to the C-terminal amino acid (right)). For each amino acid of the protein sequence, a score was calculated according to its occurrence in each peptide sequence identified. The higher the occurrence, the more the peptide zone tends towards red. Therefore, these heat maps underline the high abundance of detected peptides in the red-colored protein regions, where the proteolysis is limited, and the low abundance of detected peptides in the non-colored protein regions, where the proteolysis is important.

Finally, whatever the peptidase, 4 protein regions (blue arrows) of the alpha-A actin (fig. 3.B) are weakly cleaved whereas the alcalase hydrolyses it more drastically. This leads to the identification of a lesser number of peptides (63 versus 106 peptides for alcalase and savinase, respectively) since the identification of peptides with a size lower than 5 amino acids is challenging by the peptidomics approach. In the same way, heat maps evidenced that the proteolysis of myosin heavy chain (Fig; 3.C) is more drastically cleaved by alcalase than savinase. The red-colored regions, where high abundance of peptides was identified, are not legion as well.

3.5. Functional properties

Because they affect the palatability and sensory quality of foods, functional properties (solubility, foaming ability, emulsifying capacity, and oil and water retention capacity) are of great importance in food formulation (He et al., 2013).

3.5.1. Solubility

Solubility is one of the most important functional properties (Witono et al., 2016), because the optimum functionality of proteins depends on their ability to go into the solution. It influences other functional properties such as emulsification, foaming, and gelation (Park & Yoon, 2019).

Fig. 4 shows the solubility of hydrolyzed *Diplodus* proteins and intact

proteins from pH 2 to 10. UDP was less soluble than the hydrolysates. Similar results were reported by several authors (dos Santos et al., 2011; Islam et al., 2021; Jemil et al., 2014). Enzymatic hydrolysis considerably improved the solubility of *Diplodus* proteins at all pH values tested and DPHs solubility increased with increasing DH. In fact, the hydrolysate obtained by treatment with savinase which showed the highest DH (15.42%) had excellent solubility than that catalyzed with alcalase. The increased solubility of the resulting hydrolysates is from ionizable amino and carboxyl groups of the amino acids that were exposed during the hydrolysis of the protein (Gbogouri et al., 2004).

The minimum solubility of present samples was observed at pH 4, which indicates that their *pI* is equal or close to pH4. Such *pI* limits the use in highly acidic foods and beverages. Similar solubility patterns have been reported for protein hydrolysates from *Tenebrio molitor* (Bußler et al., 2016), salmon by-products (Gbogouri et al., 2004), yellow-striped trevally muscle (*Selaroides leptolepis*) (Klompong et al., 2007), lesser mealworm (Leni et al., 2020) and rosy perch muscle (*Nemipterus japonicus*) (Naqash & Nazeer, 2013). However, the *pI* of marine proteins and their hydrolysates is most often found between pH 5 and pH 5.5. This is the case of protein hydrolysates from *Locusta migratoria* (Purschke et al., 2018), salmon by-products (Gbogouri et al., 2004) and rosy perch muscle (*Nemipterus japonicus*) (Naqash & Nazeer, 2013). On the other hand, some hydrolysates displayed a lower *pI* than that of the present hydrolysates. This is the case of perilla seed meal protein hydrolysates prepared by Kim and Yoon (2020) which showed *pI* equal to pH 3.

Thus limited enzymatic hydrolysis could be used as an effective alternative to improve the solubility of fish proteins. The improved solubility of hydrolysates can allow them good foaming and emulsifying properties (Meenmanee et al., 2022) and it indicates their potential applications in various food industries.

3.5.2. Emulsifying properties

The emulsifying activity was used to reflect the capacity of the protein hydrolysates to be adsorbed at the oil water interface

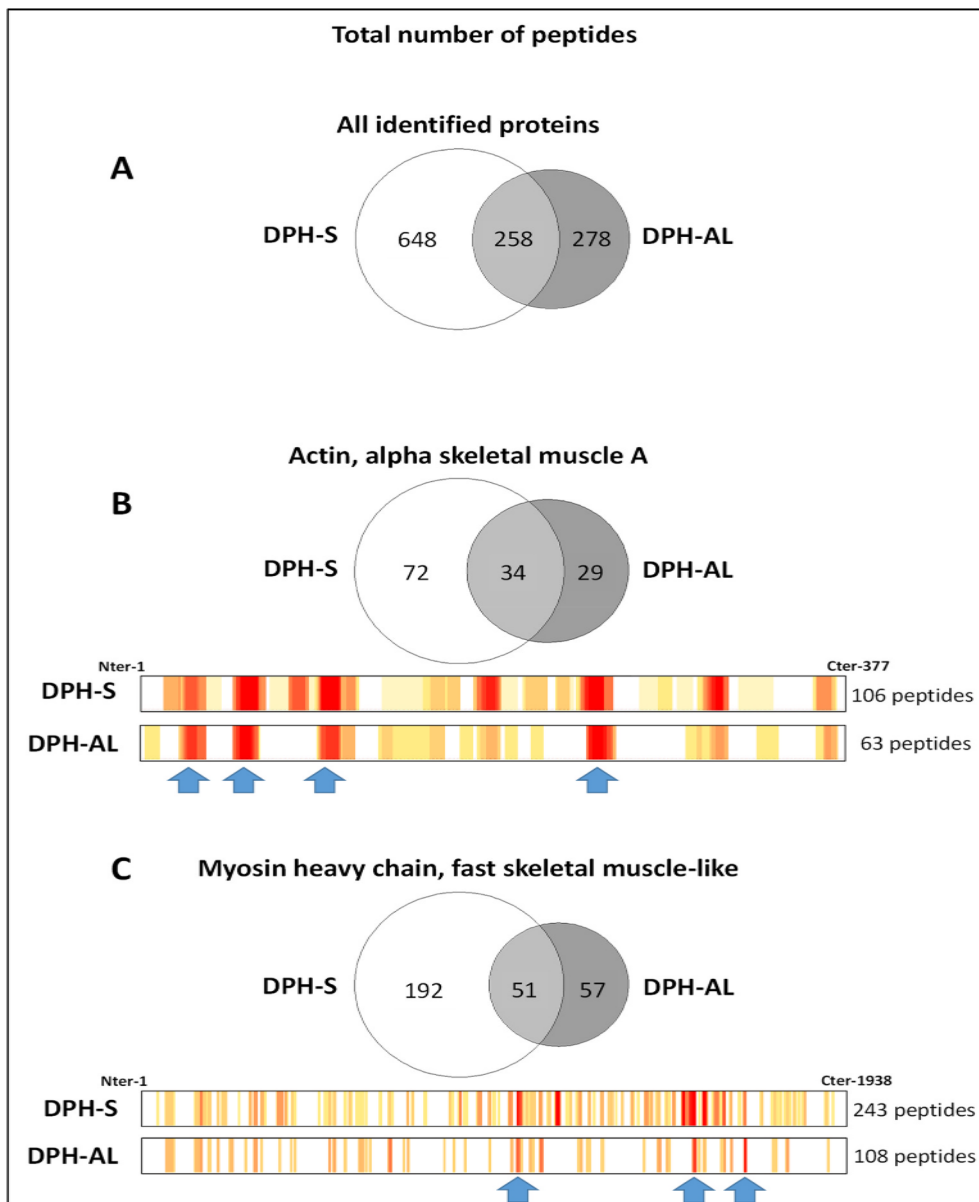


Fig. 3. Venn diagrams and heat maps illustrating the number of distinct and common peptides identified by RP-HPLC-MS/MS analysis for A) all proteins identified from the peptides of hydrolysates, B) for alpha skeletal muscle A actin and C) for the fast skeletal muscle-like myosin heavy chain. Heat maps (panels B and C) highlight the occurrence of detected peptides along the amino acid sequence for alpha skeletal muscle A actin and fast skeletal muscle-like myosin heavy chain. More red color, more frequently detected peptides on the backbone.
 DPH-S: Savinase-generated *Diplodus* protein hydrolysate; DPH-AL: Alcalase-generated *Diplodus* protein hydrolysate. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

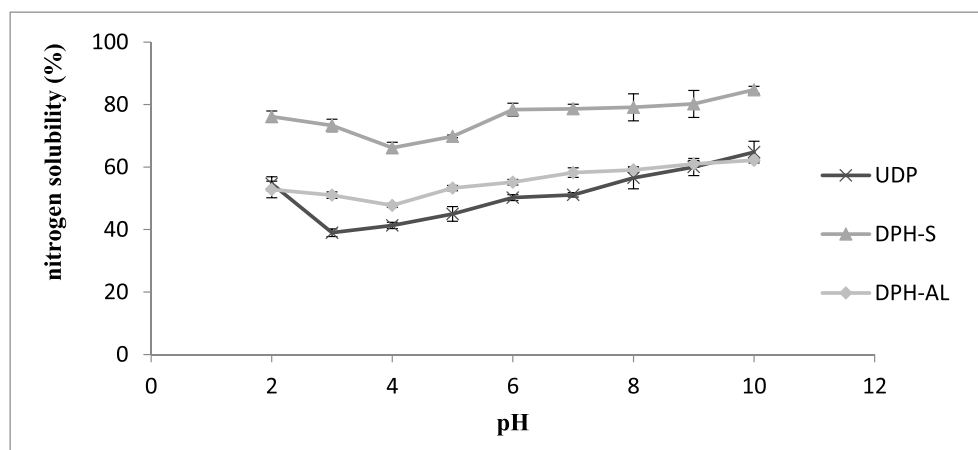


Fig. 4. Solubility profiles of UDP (Undigested *Diplodus* proteins) and DPHs (*Diplodus* protein hydrolysates) in different pH.

(Pacheco-Aguilar et al., 2008). EAI (defined as the ability of the material to form emulsion) and ESI (defined as the ability to maintain the formed emulsion) of UDP and DPHs at different concentrations (0.1%, 0.5% and 1%) are shown in Table 2.

EAI and ESI of all samples decreased with increasing concentration. A maximum EAI and ESI values were observed at a concentration of 0.1%. Similarly, Egerton et al. (2018) observed an inverse relationship between emulsifying activity index and the concentration of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) generated by different enzymes (savinase, alcalase, protamex, lavourzyme). According to Lawal (2004), low concentration of proteins allows the diffusion and adsorption of proteins at the oil-water interface, which promotes the production of protein-protein interaction and, therefore, the formation of a thinner film stabilizing oil droplets whereas high protein concentration promotes several phenomena, such as aggregation, precipitation and viscosity, that limit protein-protein interactions.

The EAI values of the alcalase and savinase hydrolysates were 169.61 ± 0.17 and $116.67 \pm 0.53 \text{ m}^2/\text{g}$, respectively. The EAI values of both hydrolysates were significantly stronger than that of UDP ($52.82 \pm 0.18 \text{ m}^2/\text{g}$). DPH-AL that exhibits the highest emulsifying properties is also the most efficient in terms of emulsifying stability. It has been reported that hydrolysates having a limited degree of hydrolysis, have good emulsifying activity and stability peptides (Akbari et al., 2020; Klompong et al., 2007; Mohanty et al., 2021; Mokni Ghribi et al., 2015).

The emulsifying properties of protein hydrolysates were generally dependent on the surface charge, hydrophobicity, and molecular weight (Gao et al., 2019). The high surface hydrophobicity and large peptide particle size contributed to improving and stabilizing the emulsifying properties of protein hydrolysates, but the small size peptides and amino acids often reduced the emulsifying properties (Avramenko et al., 2013). The decrease in the emulsifying properties of DPHs could be attributed to the increased formation of small, hydrophilic peptides, which decreased their ability to interact with the oil-water interface.

3.5.3. Foaming properties

Foaming power measures the ability of protein solution to form and stabilize a foam.

Table 3 shows the foam capacity (FC %) and foam stability (FS %) of *Diplodus* proteins and its hydrolysates. The foam capacity of hydrolysate samples was better than UDP and DPH-S (at concentration of 2%) indicated the highest foam capacity. At 2% protein concentration, FC and FS increased by 87.31% and 56.25%, respectively, with DPH-S and 63.99% and 43.33% with DPH-AL. As DH increased, DPHs displayed a higher foaming capacity and foam stability. These results can be linked with previous reports that revealed that enzymatic hydrolysis improved

Table 2
Emulsifying properties of UDP and DPHs at different concentrations.

Hydrolysate concentration (%)	Emulsifying activity index (m^2/g)			Emulsion stability index (min)		
	UDP	DPH-AL	DPH-S	UDP	DPH-AL	DPH-S
0.1	52.82 \pm 0.18 ^{Ac}	169.61 \pm 0.17 ^{Cc}	116.67 \pm 0.53 ^{Bc}	32.63 \pm 0.62 ^{Ab}	84.30 \pm 1.8 ^{Bc}	76.18 \pm 0.89 ^{Bc}
0.5	28.2 \pm 1.03 ^{Ab}	66.71 \pm 2.73 ^{Cb}	45.96 \pm 0.51 ^{Bb}	19.75 \pm 1.08 ^{Aa}	26.12 \pm 1.05 ^{Ba}	38.16 \pm 0.16 ^{Cb}
1	23.12 \pm 1.2 ^{Aa}	36.60 \pm 1.03 ^{Ca}	33.26 \pm 0.28 ^{Ba}	19.11 \pm 0.10 ^{Aa}	25.7 \pm 0.33 ^{Ba}	26.78 \pm 0.4 ^{Ca}

a,b,c: Different small letters in the same columns indicate significant differences at different concentration ($p < 0.05$). A,B,C: Different large letters in the same row mean significant differences between hydrolysates ($p < 0.05$). DPH-S, *Diplodus* hydrolysate by savinase; DPH-AL, Alcalase hydrolysate; UDP, Undigested *Diplodus* proteins.

Table 3
The foaming properties of UDP and DPHs.

Hydrolysate concentration (%)	Foaming capacity (%)			Foaming stability (%)		
	UDP	DPH-AL	DPH-S	UDP	DPH-AL	DPH-S
0.1	18.75 \pm 1.25 ^{Aa}	20.66 \pm 0.94 ^{Aa}	32.81 \pm 2.20 ^{Ba}	12.37 \pm 0.17 ^{Aa}	12.66 \pm 0.94 ^{Aa}	20.31 \pm 2.2 ^{Ba}
1	24.37 \pm 0.44 ^{Ab}	29.99 \pm 2.9 ^{Bb}	55.93 \pm 0.49 ^{Cb}	20.16 \pm 0.23 ^{Ab}	23.88 \pm 2.54 ^{Bb}	34.37 \pm 1.5 ^{Cb}
2	36.87 \pm 0.88 ^{Ac}	63.99 \pm 2.54 ^{Bc}	87.31 \pm 0.62 ^{Cc}	25.82 \pm 1.17 ^{Ac}	43.33 \pm 2.7 ^{Bc}	56.25 \pm 0.54 ^{Cc}

a,b,c: Different small letters in the same columns indicate significant differences at different concentration ($p < 0.05$). A,B,C: Different large letters in the same row mean significant differences between hydrolysates ($p < 0.05$). DPH-S, *Diplodus* hydrolysate by savinase; DPH-AL, Alcalase hydrolysate; UDP, Undigested *Diplodus* proteins.

Table 4
Water binding capacity and oil binding capacity of UDP and DPHs at a concentration of 0.1%.

Parameter	DPH-S	DPH-AL	UDP
Water-binding capacity (mLwater/g)	5.35 ± 0.63^c	4.25 ± 0.35^b	2.5 ± 0.38^a
Oil binding capacity (mL oil/g)	1.92 ± 0.24^b	1.8 ± 0.28^b	1.3 ± 0.14^a

Values are given as mean \pm SD from triplicate determinations. Different letters in the same row mean significant differences between hydrolysates ($p < 0.05$). DPH-S, Savinase generated hydrolysate; DPH-AL, Alcalase hydrolysate; UDP, Undigested *Diplodus* proteins.

foam capacity (Ben Khaled et al., 2014; Ortiz & Wagner, 2002). In contrast, this observation seems to disagree with other authors who explained that larger peptides in the hydrolysates could form flexible films around the air bubbles and form a more stable foam (Calderón-Chiu et al., 2021; González-Serrano et al., 2022; Mohanty et al., 2021; Wani et al., 2015) (see Table 3).

3.5.4. Water and oil holding capacity

The water and oil absorption capacity of protein hydrolysates are shown in Table 4. The water holding capacity (WHC) of the hydrolysates prepared using alcalase and savinase were 4.25 ± 0.35 and $5.35 \pm 0.63 \text{ mL/g}$, respectively. These results were higher than the WHC reported for rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera protein hydrolysate (5.1 mL/g) (Sathivel et al., 2005), the hydrolysate of bonylip barb protein (3.1 mL/g) (Taheri et al., 2013), bonylip barb protein (3.1 mL/g) (Junianto et al., 2020) and Nile tilapia (2.1 mL/g) (Foh et al., 2011).

The observed increase in WHC with increasing DH (and solubility) could be due to the amino acid composition, protein conformation and the ratio of surface polarity to hydrophobicity (Du et al., 2018). The WHC of savinase-treated hydrolysates was significantly higher than that of DPH-AL, which might be due to the interaction of a higher number of phosphate groups and other polar groups resulting from the cleavage of peptide bonds with water molecules, which resulted in enhanced hydration of proteins (Du et al., 2018).

The highest oil holding capacity (OHC) was observed in the hydrolysate prepared by savinase ($1.92 \pm 0.24 \text{ mL/g}$) while the lowest OHC was determined for the control sample (1.3 ± 0.14). These results were higher than the OHC reported for bonylip barb protein hydrolysates (Junianto et al., 2020) and similar to those found in the protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products (Balti et al., 2010). This raise could be explained by the exposure of a highest number of hydrophobic amino acids (Latorres et al., 2018).

The results showed that DPHs exhibited greater fat absorption and could be useful in the meat and confectionary industries.

4. Conclusion

This study investigates the use of *Diplodus annularis* proteins for the production of hydrolysates by treatment with savinase and alcalase. These two commercial enzymes are suitable in the production of hydrolysates from these sparidae proteins. However, savinase showed a higher hydrolytic ability as evidenced by its larger DH and more heterogeneous peptide composition. Two hydrolysates have an advantageous proximal composition in terms of their protein and lipid content. Despite some differences, they have also interesting functional properties, which can offer them as an ingredient for products development. Peptides are responsible for the functional and biological properties of both hydrolysates. Meanwhile, it was found that some of the peptides present in DPH-S and in DPH-AL are the same while others are specific to each one. Thus, they may have common applications and specific ones, based on the available peptides. Future studies of biological properties and hydrolysates fractionation may provide information that can inform us about the fields of application of each hydrolyzate and the relation structure peptide-functional and biological properties.

Authors statement

I, Ahmed Barkia certify that all the signatories of this article “Production of hydrolysates and peptides from a new protein source: *Diplodus annularis*” have really made a significant contribution. Their respective contribution can be summarized as follows:

- Ahmed Barkia conceived of the presented idea and he provided, with Naima Nadjar, the supervision of the doctoral student Fatma Hamed. Also, He contributed in writing the article.
- Fatma Hamed was in charge of most of the practical part of the study, and contributed to the writing of the article.
- Imen elgaoud participated in the collection of the sample and the production of the hydrolysates, and she provided critical comments
- Naima Nadjar helped shape the research, analysis and manuscript
- Barbara Deracinois, Christophe Flahaut supervised the RP-HPLC and RP-HPLC MS/MS, and helped interpret the results and identify the peptides

Ahmed Barkia.

Declaration of competing interest

All cited authors certify that they have sufficiently participated in the work to assume public responsibility for the content. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102129>.

References

- Abraham, B. (2017). Production of fish protein hydrolysate from silver catfish (*Arius thalassinus*). *MOJ Food Processing & Technology*, 5(4). <https://doi.org/10.15406/mojft.2017.05.00132>
- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19870419770>.
- Akbari, N., Mohammadzadeh Milani, J., & Biparva, P. (2020). Functional and conformational properties of proteolytic enzyme-modified potato protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 1320–1327. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10148>
- Amiza, M. A., Kong, Y. L., & Faazaz, A. L. (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *International Food Research*, 19(1), 199–206.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis*. Washington DC, USA: Association official Analytical Chemists.
- Avramenko, N. A., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2013). The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. *Food Research International*, 51(1), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.020>
- Balti, R., Bougateg, A., El-Hadj Ali, N., Zekri, D., Barkia, A., & Nasri, M. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 2006–2014. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4045>
- Ben Khaled, H., Ktari, N., Ghorbel-Bellaaj, O., Jridi, M., Lassoued, I., & Nasri, M. (2014). Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. *Journal of Food Science & Technology*, 51(4), 622–633. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0544-4>
- Ben Slama-Ben Salem, R., Bkhairia, I., Abdelhedhi, O., & Nasri, M. (2017). Octopus vulgaris protein hydrolysates: Characterization, antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1442–1454. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2567-y>
- Binsi, P. K., Viji, P., Panda, S. K., Mathew, S., Zynudheen, A. A., & Ravishankar, C. N. (2016). Characterisation of hydrolysates prepared from engraved catfish (*Nemapteryx caelata*) roe by serial hydrolysis. *Journal of Food Science & Technology*, 53(1), 158–170. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1998-6>
- Bougateg, H., Krichen, F., Kobbi, S., Martinez-Alvarez, O., Nedjar, N., Bougateg, A., & Sila, A. (2020). Physicochemical and biological properties of Eel by-products protein hydrolysates: Potential application to meat product preservation. *Waste and Biomass Valorization*, 11(3), 931–942. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0424-5>
- Bußler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. M., & Schlüter, O. K. (2016). Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon*, 2(12), Article e00218. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00218>
- Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2021). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: Physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids*, 112, Article 106319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106319>
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., & Dinesh Kumar, B. (2015). Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science & Technology*, 52(9), 5817–5825. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1714-6>
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2007). *Fennema's food chemistry*. CRC Press.
- Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1997). Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *LWT - Food Science and Technology*, 30(3), 266–272. <https://doi.org/10.1006/food.1996.0184>
- Du, M., Xie, J., Gong, B., Xu, X., Tang, W., Li, X., Li, C., & Xie, M. (2018). Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*, 76, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.003>
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). Characterization of protein hydrolysates from blue whiting (*Micromesistius poussou*) and their application in beverage fortification. *Food Chemistry*, 245, 698–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.107>
- Fawzya, Y. N., Nursatya, S. M., Susilowati, R., & Chasanah, E. (2020). Characteristics of fish protein hydrolysate from Yellowstripe Scad (*Selaroides leptolepis*) produced by a local microbial protease. *E3S Web of Conferences*, 147, Article 03017. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014703017>
- Finkler, J. K., Piana, P. A., Fleck, J. F., Boscolo, W. R., Feiden, A., Signor, A., & Fiorese, M. L. (2022). Production of fish protein hydrolysates from Oreochromis niloticus fillet trimmings. *Research, Society and Development*, 11(6). <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.29172>. e37311629172–e37311629172.
- Foh, M. B. K., Kamara, M. T., Amadou, I., Foh, B. M., & WenShui, X. (2011). Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *International Journal of Biological Chemistry*, 5(1), 21–36.
- Gao, Y., Li, J., Chang, C., Wang, C., Yang, Y., & Su, Y. (2019). Effect of enzymatic hydrolysis on heat stability and emulsifying properties of egg yolk. *Food Hydrocolloids*, 97, Article 105224. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105224>
- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D. J., & Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 687–699. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>
- García-Mora, P., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2014). Savinase, the most suitable enzyme for releasing peptides from lentil (*lens culinaris* var. Castellana) protein concentrates with multifunctional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4166–4174. <https://doi.org/10.1021/jf500849u>
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of*

- Food Science*, 69(8), C615–C622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x>
- Ghelihi, S., Shabanpour, B., & Pourashouri, P. (2018). Properties of fish sausages containing common carp (*Cyprinus carpio*) roe oil and defatted roe protein hydrolysate during refrigerated storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(2), 185–199. <https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1420119>
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2013). Reverse-phase HPLC separation of hemp seed (*cannabis sativa* L.) protein hydrolysate produced peptide fractions with enhanced antioxidant capacity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(1), 39–46. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0340-6>
- González-Serrano, D. J., Hadidi, M., Varcheh, M., Jelyani, A. Z., Moreno, A., & Lorenzo, J. M. (2022). Bioactive peptide fractions from collagen hydrolysate of common carp fish byproduct: Antioxidant and functional properties. *Antioxidants*, 11(3), 509. <https://doi.org/10.3390/antiox11030509>
- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>
- Henriques, A., Vázquez, J. A., Valcarcel, J., Mendes, R., Bandarra, N. M., & Pires, C. (2021). Characterization of protein hydrolysates from fish discards and by-products from the north-west Spain fishing fleet as potential sources of bioactive peptides. *Marine Drugs*, 19(6), 338. <https://doi.org/10.3390/md19060338>
- Idowu, A. T., Igiehon, O. O., Idowu, S., Olatunde, O. O., & Benjakul, S. (2021). Bioactivity potentials and general applications of fish protein hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10071-1>
- Islam, M. S., Hongxin, W., Admassu, H., Noman, A., Ma, C., & An wei, F. (2021). Degree of hydrolysis, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates from Grass Turtle (*Chinemys reevesii*) as influenced by enzymatic hydrolysis conditions. *Food Sciences and Nutrition*, 9(8), 4031–4047. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1903>
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Ben Slama-Ben Salem, R., Mehiri, M., Hajji, M., & Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49(6), 963–972. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004>
- Jemil, I., Nasri, R., Abdelhedi, O., Aristoy, M.-C., Salem, R. B. S.-B., Kallel, C., Marrekchi, R., Jamoussi, K., Elfeki, A., Hajji, M., Toldrá, F., & Nasri, M. (2017). Beneficial effects of fermented sardine protein hydrolysates on hypercaloric diet induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in wistar rats. *Journal of Food Science & Technology*, 54(2), 313–325. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2464-9>
- Junianto, J., Afrianto, E., & Hasan, Z. (2020). Functional properties and proximate compositions of bony barb protein hydrolysate. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(6), 331–341. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.112861>
- Kakko, T., Damerou, A., Nisov, A., Pугanen, A., Tuomasjukka, S., Honkapää, K., Tarvainen, M., & Yang, B. (2022). Quality of protein isolates and hydrolysates from Baltic herring (*Clupea harengus membras*) and roach (*Rutilus rutilus*) produced by pH-shift processes and enzymatic hydrolysis. *Foods*, 11(2), 230. <https://doi.org/10.3390/foods11020230>
- Karoud, W., Sila, A., Krichen, F., Martínez-Alvarez, O., & Bougatef, A. (2019). Characterization, surface properties and biological activities of protein hydrolysates obtained from hake (*Merluccius merluccius*) heads. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 287–297. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0069-9>
- Kim, J. M., & Yoon, K. Y. (2020). Functional properties and biological activities of perilla seed meal protein hydrolysates obtained by using different proteolytic enzymes. *Food Science and Biotechnology*, 29(11), 1553–1562. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00810-x>
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
- Kristinsson, H. G., & Raso, B. A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 657–666. <https://doi.org/10.1021/jf990447v>
- Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M., & Bougatef, A. (2013). Effect of degree of hydrolysis and protease type on the antioxidant activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*sepia officinalis*) by-products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(5), 436–448. <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.658961>
- Lassoued, I., Elgaoud, I., Hamed, F., Nasri, N., Nasri, M., & Barkia, A. (2021). Evaluation of four fish protein hydrolysates as a source of antioxidants and amino acids. *Current Topics in Peptide & Protein Research*, 22, 131–144.
- Latorres, J. M., Rios, D. G., Saggiomo, G., Wasielesky, W., & Prentice-Hernandez, C. (2018). Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 721–729. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2983-z>
- Lawal, O. S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) protein isolate: Effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86(3), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.036>
- Leni, G., Soetemans, L., Caligiani, A., Sforza, S., & Bastiaens, L. (2020). Degree of hydrolysis affects the techno-functional properties of lesser mealworm protein hydrolysates. *Foods*, 9(4), 381. <https://doi.org/10.3390/foods9040381>
- Lin, M. J. Y., Humbert, E. S., & Sosulski, F. W. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, 39(2), 368–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x>
- Meenmanee, S., Rattananukrom, A., Thaiphanit, S., & Suppavorasatit, I. (2022). Improvement of solubility, foaming, and emulsification properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein by non-enzymatic deamidation. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 153, Article 112493. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112493>
- Mohanty, U., Majumdar, R. K., Mohanty, B., Mehta, N. K., & Parhi, J. (2021). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. *Journal of Food Science & Technology*, 58(11), 4349–4358. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04915-3>
- Mokni Ghribi, A., Maklouf Gafsi, I., Sila, A., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A., & Besbes, S. (2015). Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. *Food Chemistry*, 187, 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.109>
- Naqash, S. Y., & Nazeer, R. A. (2013). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science & Technology*, 50(5), 972–978. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0416-y>
- Nasri, R., Jridi, M., Lassoued, I., Jemil, I., Ben Slama-Ben Salem, R., Nasri, M., & Karra-Chaabouni, M. (2014). The influence of the extent of enzymatic hydrolysis on antioxidant properties and ACE-inhibitory activities of protein hydrolysates from goby (*zosterisessor ophiocephalus*) muscle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(5), 1121–1134. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0905-3>
- Nguyen, T. T., Zhang, W., Barber, A. R., Su, P., & He, S. (2016). Microwave-intensified enzymatic deproteinization of Australian Rock lobster Shells (*jasus edwardsii*) for the efficient recovery of protein hydrolysate as food functional nutrients. *Food and Bioprocess Technology*, 9(4), 628–636. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1657-y>
- Ortiz, S. E. M., & Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: Structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, 6(35), 511–518.
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M. A., & Ramírez-Suárez, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109(4), 782–789. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.047>
- Park, B. Y., & Yoon, K. Y. (2019). Biological activity of enzymatic hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions from perilla seed meal protein. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(No. 3), 180–185. <https://doi.org/10.17221/145/2018-CJFS>
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Purschke, B., Meinschmidt, P., Horn, C., Rieder, O., & Jäger, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 244(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3017-9>
- dos Santos, S. D., Martins, V. G., Salas-Mellado, M., & Prentice, C. (2011). Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1399–1406. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0301-0>
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., & Bechtel, P. J. (2005). Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70(6), c401–c406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11437.x>
- Seniman, M. S. M., Yusop, S. M., & Babji, A. S. (2014). Production of enzymatic protein hydrolysates from freshwater catfish (*Clarias batrachus*). *AIP Conference Proceedings*, 1614(1), 323–328. <https://doi.org/10.1063/1.4895216>
- Shahidi, F., Han, X.-Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53(3), 285–293. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)93934-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)93934-J)
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of *Sardinella (Sardinella aurita)* by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 187–194.
- Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., & Fogliano, V. (2013). Comparison of the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. <https://aquadocs.org/handle/1834/37351>. <http://Aquat.commons.Org/1d/Eprint/22587>
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kumiyama, W., & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 38(3), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.06.007>
- Vázquez, J. A., Rodríguez-Amado, I., Sotelo, C. G., Sanz, N., Pérez-Martín, R. I., & Valcarcel, J. (2020). Production, characterization, and bioactivity of fish protein hydrolysates from aquaculture turbot (*Scophthalmus maximus*) wastes. *Biomolecules*, 10(2), 310. <https://doi.org/10.3390/biom10020310>
- Wani, I. A., Sogi, D. S., & Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.060>. Part 1.
- Wasswa, J., Tang, J., Gu, X., & Yuan, X. (2007). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 104(4), 1698–1704. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.044>

- Witono, Y., Taruna, I., Windrati, W. S., Azkiyah, L., & Sari, T. N. (2016). 'Wader' (Rasbora jacobsoni) protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.167>
- Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T., & Lin, L. (2019). Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*). *Food Chemistry*, 270, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.103>
- Yathisha, U. G., Vaidya, S., & Sheshappa, M. B. (2022). Functional properties of protein hydrolyzate from Ribbon fish (*lepturacanthus savala*) as prepared by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 187–203. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2027964>