UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES
Ecole Polytech'Lille
Ecole doctorale 104- Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'environnement
Laboratoire ProBioGEM, UPRES-EA 1026
&
UNIVERSITE DE SFAX
Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax
Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie

THESE DE DOCTORAT

(Co-tutelle)

Présentée par Rafik BALTI

pour l'obtention des grades de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES
&
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE SFAX

Spécialités
Ingénierie des Fonctions Biologiques - Génie biologique

Numéro d'ordre : 40712

Valorisation des produits et co-produits de la seiche commune (*Sepia officinalis*) pour l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et nutraceutique

Soutenu le 21/12/2011, devant le jury composé de :

Mr.	**Ahmed REBAÏ**	Professeur, CBS, Sfax	Président
Mr.	**M^{ed} Néjib MARZOUKI**	Professeur, INSAT, Tunis	Rapporteur
Mr.	**Joseph BOUDRANT**	Professeur, CNRS, Nancy	Rapporteur
Mme.	**Semia ELLOUZ-CHAABOUNI**	Professeur, ENIS, Sfax	Examinateur
Mr.	**Moncef NASRI**	Professeur, ENIS, Sfax	Directeur de thèse
Mme.	**Naima NEDJAR-ARROUME**	Professeur, IUT A, Lille	Directeur de thèse

Dédicaces

A

Mes très chers parents

En témoignage de mon plus grand respect & mon profond amour ;
Je ne vous remercierai jamais assez pour tous vos sacrifices, vos encouragements & votre amour ;

A

*Mes adorables **Chahd** et **Sajid***

A

*Ma chère sœur **Sawssen** et Mon beau-frère **Bahri***

Pour votre compréhension, votre patience et votre soutien continu ;
Merci d'être à mes côtés et de m'insuffler le courage et la force d'aller toujours plus loin ;

A

*Ma très chère femme **Ghada***

Pour tes sacrifices et tes encouragements
Pour ta disponibilité et ta patience
Pour la tendre affection que tu m'as toujours témoignée
Que Dieu te garde toujours près de moi

A

Tous ceux qui me sont chers
J'espère que vous trouvez dans ce modeste travail l'expression de mon profond amour, mon grand respect
et ma sincère gratitude.

Remerciements

C'est avec une grande émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes qui, par leur participation et leurs encouragements, m'ont permise de mener à bien ce travail.

Cette thèse n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mes directeurs de recherche, Mr. ***Moncef NASRI****, Professeur à l'École Nationale d'Ingénieurs de Sfax, et Mme.* ***Naima NEDJAR-ARROUME****, Professeur à l'Institut Universitaire de Technologie A Lille, que je veux vivement remercier. Leurs conseils précieux et encouragements m'ont permis de surmonter toutes les difficultés du parcours. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments sincères.*

Je tiens à présenter ma vive gratitude à Mr. ***Didier GUILLOCHON****, Professeur à l'Université Sciences et Technologies de Lille 1, qui a contribué activement à la réalisation de mes travaux, pour ses conseils efficaces, ses orientations et ses remarques pertinentes.*

Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance au Professeur ***Pascal DHULSTER****, responsable du laboratoire ProBioGEM, d'avoir accepté de m'accueillir dans ce laboratoire. Merci très sincèrement pour cette grande aide scientifique et votre sympathie.*

Mes respectueux remerciements s'adressent à Mr. ***Ali Bougatef****, Maître assistant à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, pour m'avoir fait bénéficier de son expérience et de ses connaissances scientifiques. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et mon immense gratitude.*

Mes plus sincères remerciements vont également aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Mr. ***Ahmed REBAÏ****, Professeur au Centre de Biotechnologie de Sfax, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse. Je remercie vivement Mr.* ***Med Néjib Marzouki*** *et Mr.* ***Joseph BOUDRANT*** *d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail avec intérêt. Merci également à Mr.* ***Semia ELLOUZ-CHAABOUNI*** *pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.*

Un grand remerciement est adressé à tous mes collègues et à tous les membres du Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie (LGEM) pour l'ambiance très favorable qu'ils ont su créer autour de moi. Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM) pour leur sympathie et leur accueil.

Enfin, mes remerciements vont également à tous ceux qui ont participé plus ou moins indirectement au bon déroulement de ma thèse.

“An expert is a person who has made all the mistakes that can be made in a very narrow field”

Niels Bohr (1885-1962)

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications Internationales

Article 1:

Balti R, Barkia A, Bougatef A, Ktari N and Nasri M **(2009)**. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization. *Food Chemistry*, 113, 146-154.

Article 2:

Balti R, Hmidet N, Jellouli K, Nedjar-Arroume N, Guillochon D and Nasri M **(2010)**. Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10623-10630.

Article 3:

Balti R, Bougherra F, Bougatef A, Ben Khaled H, Nedjar-Arroume N, Dhulster P, Guillochon D and Nasri M **(2012)**. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptides substrates: purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 130, 475-484.

Article 4:

Balti R, Nedjar-Arroume N, Yaba Adjé E, Guillochon D and Nasri M **(2010)**. Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3840-3846.

Article 5:

Balti R, Nedjar-Arroume N, Bougatef A, Guillochon D and Nasri M **(2010)**. Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Research International*, 43, 1136-1143.

Article 6:

Balti R, Bougatef A, El-Hadj Ali N, Zekri D, Barkia A and 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, 2006-2014.

Article 7:

Balti R, Bougatef A, El-Hadj Ali N, Ktari N, Jellouli K, Nedjar-Arroume N, Dhulster P and Nasri M **(2011)**. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases. *Journal of Amino Acids*, in press.

Article 8:

Balti R, Jridi M, Sila A, Souissi N, Nedjar-Arroume N, Guillochon D and Nasri M (**2011**). Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. *Food Hydrocolloids*, 25, 943-950.

Article 9:

Bougatef A, **Balti R**, Ben Zaied S, Souissi N and Nasri M **(2008)**. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*). Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry*, 107, 774-784.

Article 10:

Bougatef A, **Balti R**, Nedjar-Arroume N, Ravallec Plé R, Adjé-Yaba E, Souissi N, Lassoued I, Guillochon D and Nasri M **(2010)**. Evaluation of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates generated by gastrointestinal proteases: Identification of the most potent active peptide. *European Food Research and Technology*, 231, 127-135.

Article 11:

Bougatef A, **Balti R**, Rim N, Jellouli K, Souissi N and Nasri M **(2010)**. Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: smooth hound (*Mustelus mustelus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5763-5769.

Article 12:

Yaba Adjé E, **Balti R**, Kouach M, Guillochon D and Nedjar-Arroume N **(2011)**. α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *European Food Research and Technology*, 232, 637-646.

Article 13:

Yaba Adjé E, **Balti R**, Kouach M, Pascal Dhulster, Guillochon D and Nedjar-Arroume N **(2011)**. Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 143-153.

Article 14:

Jellouli K, **Balti R**, Bougatef A, Hmidet N, Barkia A and Nasri M **(2011)**. Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes capriscus*). *LWT- Food Science and Technology*, 44, 1965-1970.

Article 15:

Hmidet N, **Balti R**, Nasri R, Sila A, Bougatef A and Nasri M **(2011)**. Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins

hydrolyzed by *Bacillus mojavensis* A21 proteases. *Food Research International*, 44, 2703-2711.

Article 16:

Ben Khaled H, Bougatef A**, Balti R**, Triki-Ellouz Y, Souissi N and Nasri M **(2008)**. Isolation and characterization of trypsin from sardinelle (*Sardinella aurita*) viscera. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2654-2662.

Article 17:

Bougatef A, Hajji M, **Balti R**, Lassoued I, Yosra Triki-Ellouz and Nasri M **(2009)**. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205.

Article 18:

Zarai Z, Frikha F, **Balti R**, Miled N, Gargouri Y and Majdoub H **(2011)**. Nutrients Composition of the marine snail (*Hexaplex trunculus*) from the Tunisian Mediterranean coasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1265-1270.

Article 19:

Haddar A, Bougatef A, **Balti R**, Souissi N, Koched W and Nasri M **(2011)**. Physicochemical and functional properties of gelatin from tuna (*Thunnus thynnus*) head bones. *Journal of Food and Nutrition Research*, 50, 150-159.

Article 20:

Jellouli K, Bougatef A, Daassi D, **Balti R**, Barkia A and Nasri M **(2009)**. New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. *Food Chemistry*, 116, 644-650.

Article 21:

Hajji M, Jellouli K, Hmidet N, **Balti R**, Salami-Kamoun A and Nasri M **(2010)**. A high thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: Biochemical and molecular characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 805-813.

Article 22:

Barkia A, Bougatef A, Nasri R, Fetoui E, **Balti R** and Nasri M **(2010)**. Trypsin from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterisation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 893-902.

Articles d'ouvrages scientifiques

Article 1:

Bougatef A, **Balti R**, Jellouli K, Ellouz-Triki Y and Nasri M **(2008)**. Trypsin-like protease from the intestine of smooth hound (*Mustelus mustelus*). Purification and characterization Recent Research Developments in Food by-products Technology and Biotechnology, Research signpost. ISBN: 978-81-308-0259-6. pp: 1-19.

Article 2:

Bougatef A, Jellouli K, **Balti R**, Haddar A, Ellouz-Triki Y, Barkia A and Nasri M **(2008)**. Low molecular weight oxidant-stable protease from the intestine of smooth hound (*Mustelus mustelus*). Purification and Characterization. Food Chemistry Research Developments, © 2008 Nova Science Publishers, Inc ISBN: 978-1-60456-303-0. Chapter 7, pp:1-17.

Publications Nationales

Article 1:

Bougatef A, **Balti R**, Ben Khaled H, Triki-Ellouz Y et Nasri M. **(2008)**. Extraction et caractérisation des extraits enzymatiques de l'émissole lisse (*Mustelus mustelus*). Utilisation de l'extrait alcalin dans la mise en évidence d'activités biologiques dans les hydrolysats de co-produits de la sardinelle (*Sardinella aurita*). *Microbiologie et Hygiène Alimentaire*. Vol. 20 N° 57, 1-10.

Article 2:

Ktari N, **Balti R**, Bougatef A, Jridi M et Nasri M **(2011)**. Valorisation combinée des viscères de la seiche commune (*Sepia officinalis*). Extraction de protéases digestives et préparation de farine pour la production de biomasse et de métabolites. *Microbiologie et Hygiène Alimentaire*. Vol. 23 N° 67, 16-22.

Article 3:

Nasri R, Ben Amor I, **Balti R**, Bougatef A, Gargouri J et Nasri M **(2010)**. Caractérisation d'activité antihypertensive et anticoagulante dans les hydrolysats protéiques du muscle de gobie (HPMG) pour la valorisation pharmaceutique et nutraceutique. *Microbiologie et Hygiène Alimentaire*. Vol. 22 N° 65, 8-15.

Brevet

Balti R, Arroume-Nedjar N, Bougatef A, Barkia A, Guillochon D et Nasri M **(2010)**. Procédé de production d'hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (*Sepia officinalis*) enrichis en peptides antihypertensifs. Purification et identification de 14 biopeptides. **N° du Dépôt : TN2010/0245, Date du dépôt : 13 Février 2010.**

Prix de thèse

L'ensemble de mes travaux de thèse a été récompensé par le **prix éco-innovation 2011** délivré par la Cd2e en partenariat avec le pôle de recherche et de l'enseignement (PRES) en France. Notre projet a été évalué selon son caractère innovant et ces impacts enviro-socio-économiques.

Nom : BALTI
Prénom : Rafik
EMail : rafikbalti1981@gmail.com
Organisme : Laboratoire Procédé Biologique et Génie Enzymatique
Polytech'Lille (Université des Sciences et Technologies de Lille 1)

2011 Prix éco-innovation cd2e

« Valorisation des produits et co-produits de la seiche commune (Sepia officinalis) pour l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et nutraceutique ».

Malgré leurs qualités intrinsèques (grande richesse en protéines), les co-produits de la pêche ne font l'objet d'aucun traitement spécifique et sont directement rejetés dans l'environnement, entraînant des problèmes de contamination.

Le sujet de recherche s'inscrit dans le cadre de la valorisation biotechnologique des co-produits de la pêche, et plus particulièrement de la seiche commune, dans l'optique de produire des fonctions et produits de haute valeur ajoutée, destinés à l'alimentation, la nutrition animale et humaine, la cosmétique et la santé Les travaux portent notamment sur les protéases digestives, les peptides antihypertensifs et la gélatine issus des déchets de la seiche commune.

2011 Prix éco-innovation cd2e

INTRODUCTION……..……..……1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Production mondiale des pêches et de l'aquaculture ---------- 4

II. Description de l'espèce étudiée : *Sepia officinalis* ---------- 5

II.1. Généralités ---------- 5

II.1.1. Position systématique, morphologie et alimentation ---------- 5
II.1.2. Distribution géographique et écologie ---------- 5

II.2. Pêche ---------- 6

II.3. Système digestif ---------- 6

III. Co-produits d'origine marine: définition et voies de valorisation ---------- 7

III.1. Définition ---------- 7

III.2. Différentes voies de valorisation des co-produits: produits dérivés ---------- 8

III.2.1. Farine de poissons ---------- 8
III.2.2. Hydrolysats enzymatiques de poissons ---------- 8
III.2.2.1. Autolysats ---------- 8
III.2.2.2. Hétérolysats ---------- 9
III.2.2.2.1. Nutrition animale ---------- 10
III.2.2.2.2. Nutrition humaine ---------- 10
III.2.2.2.3. Nutraceutique et pharmaceutique ---------- 10
III.2.2.2.4. Milieu de culture bactérienne ---------- 11

III.2.3. Gélatine ---------- 11

III.2.3.1. Extraction ---------- 11
III.2.3.1.1. Prétraitement ---------- 12
III.2.3.1.2. Conversion du collagène en gélatine ---------- 12
III.2.3.1.3. Raffinement ---------- 12
III.2.3.2. Rendement d'extraction ---------- 15
III.2.3.3. Propriétés physicochimiques et fonctionnelles de la gélatine marine ---------- 15
III.2.3.3.1. Composition en acides aminés ---------- 15
III.2.3.3.2. Propriétés rhéologiques et texturales ---------- 16
III.2.3.3.3. Capacité émulsifiante et pouvoir moussant ---------- 16
III.2.3.3.4. Formation de film ---------- 17

III.2.4. Autres produits dérivés à haute valeur ajoutée ---------- 17

III.2.4.1. Hachis congelé ---------- 17
III.2.4.2. Arômes ---------- 18
III.2.4.3. Chitine/Chitosane ---------- 18
III.2.4.4. Chondroïtine sulfate ---------- 19
III.2.4.5. Huile riche en acides gras oméga 3 ---------- 19
III.2.4.6. Lécithine ---------- 19
III.2.4.7. Protéases digestives ---------- 20

IV. Les protéases digestives des poissons et des invertébrés marins ---------- 21

IV.1. Protéases acides/aspartiques ---------- 21

IV.1.1. Pepsine ---------- 22
IV.1.2. Cathepsine D ---------- 23
IV.1.3. Chymosine ---------- 24
IV.1.4. Gastricsine ---------- 24

IV.2. Protéases intestinales et hépatopancréatiques ---------- 27

IV.2.1. Trypsine et chymotrypsine ---------- 27
IV.2.2. Collagénase ---------- 34
IV.2.3. Elastase ---------- 34

V. Applications potentielles des protéases digestives d'origine marine ---------- 34

VI. Procédés enzymatiques d'hydrolyse des protéines ---------- 35

VI.1. Principe de l'hydrolyse enzymatique ---------- 35

VI.2. Mécanismes et cinétiques de l'hydrolyse enzymatique ---------- 36

VI.3. Les paramètres de contrôle de l'hydrolyse enzymatique ---------- 37

VI.3.1. Le rapport enzyme/substrat et la concentration du substrat ---------- 37
VI.3.2. Le pH et la température ---------- 38
VI.3.3. Le degré d'hydrolyse (DH) ---------- 39

VI.4. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques ---------- 39

VI.4.1. La solubilité ---------- 39
VI.4.2. La capacité d'hydratation ---------- 41
VI.4.3. La capacité d'absorption d'huile ---------- 42
VI.4.4. Les propriétés émulsifiantes ---------- 42
VI.4.5. Les propriétés moussantes ---------- 44
VI.4.6. La caractérisation des hydrolysats par la taille des peptides ---------- 44

VI.5. Activités biologiques des hydrolysats protéiques ---------- 44

VII. Activité antihypertensive : une voie de valorisation nutraceutique ---------- 46

VII.1. Hypertension : définition et incidence ---------- 46

VII.2. Contrôle physiologique de la pression sanguine ---------- 46

VII.3. Activité antihypertensive par inhibition de l'ECA ---------- 48

VII.4. Activité antihypertensive par fixation sur des récepteurs opioïdes ---------- 48

VII.5. Les peptides antihypertenseurs issus de protéines agroalimentaires ---------- 49

VII.5.1. Peptides issus de produits marins ---------- 50
VII.5.2 Peptides issus des produits laitiers ---------- 55
VII.5.3 Peptides issus des produits végétaux ---------- 60
VII.5.4. Peptides issus d'autres sources naturelles ---------- 63

VII.6. Relations structure-activité des peptides inhibiteurs de l'ECA ---------- 67

VII.6.1. Structure de l'ECA ---------- 67
VII.6.2. Structure des peptides inhibiteurs de l'ECA ---------- 68

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre 1 : Protéases digestives de la seiche commune (*Sepia officinalis*)

Introduction……...70

Résumé 1 : Purification et caractérisation biochimique d'une trypsine thermostable à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*)……..73

Article 1 : A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization……...75

Résumé 2 : Purification et caractérisation biochimique de la cathepsine D à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*)……..84

Article 2 : Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization……...86

Résumé 3 : Purification et caractérisation biochimique d'une chymotrypsine spécifique aux peptides à longue chaîne partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*)……94

Article 3 : Chymotrypsin with high activity in the hydrolysis of long chain peptides substrates from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and biochemical characterization……96

Chapitre 2 : Les peptides antihypertensifs : Purification et identification

Introduction……106

Résumé 4 : Analyse de nouvelles séquences peptidiques inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) à partir d'hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (*Sepia officinalis*) obtenus par traitement avec des protéases microbiennes……...108

Article 4 : Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins……...110

Résumé 5 : Trois nouveaux peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) à partir d'hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (*Sepia officinalis*) obtenus par traitement avec des protéases digestives……...117

Article 5 : Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases……..120

Chapitre 3 : Etude des propriétés fonctionnelles et biologiques des hydrolysats protéiques de la seiche commune

Introduction……128

Résumé 6 : Influence du degré d'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles et l'activité antihypertensive des hydrolysats protéiques préparés à partir des co-produits de la seiche commune (*Sepia officinalis*)……...130

Article 6 : Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products……...134

Résumé 7 : Etude comparative des propriétés biochimiques et des activités antioxydantes des hydrolysats protéiques de la seiche (*Sepia officinalis*) préparés par l'Alcalase et les protéases de *Bacillus licheniformis* NH1……143

Article 7 : Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases……...147

Chapitre 4 : Extraction de la gélatine

Introduction…….....158

Résumé 8 : Extraction par voie enzymatique de la gélatine à partir de la peau de la seiche (*Sepia officinalis*) et étude comparative de ces propriétés fonctionnelles avec celles de la gélatine bovine commerciale……..161

Article 8 : Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process……165

CONCLUSION & PERSPECTIVES……173

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Différentes procédures d'extraction de la gélatine à partir des espèces d'origine marine……...……...…...…..13

Tableau 2 : La force du gel et les températures de gélification et de fusion de certaines gélatines d'origine marine……...….….16

Tableau 3 : Température optimale, pH optimum et masse moléculaire de quelques protéases digestives acides de poissons et d'invertébrés marins……..25

Tableau 4 : Température optimale, pH optimum et masse moléculaire des protéases intestinales et hépatopancréatiques de poissons et d'invertébrés marins…….……30

Tableau 5 : Principales activités biologiques des peptides d'origine marine……..46

Tableau 6 : Hydrolysats issus de produits marins montrant des propriétés antihypertensives……...51

Tableau 7 : Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits marins……52

Tableau 8 : Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits laitiers……59

Tableau 9 : Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits végétaux……62

Tableau 10 : Hydrolysats alimentaires montrant une activité antihypertensive……..65

Tableau 11 : Peptides antihypertenseurs isolés de sources naturelles……66

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution géographique de *S. officinalis*……...6

Figure 2 : Schéma de l'appareil digestif de la seiche commune (*S. officinalis*)……..…..7

Figure 3 : Désacétylation de la chitine en chitosane……..……..18

Figure 4 : Les protéases digestives et les acides aminés impliqués dans la liaison peptidique où s'exerce l'action de l'enzyme…….…….20

Figure 5 : Schéma réactionnel de la libération de protons H^+ lors de l'hydrolyse enzymatique…….…….36

Figure 6 : Représentation schématique du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)…….……47

Figure 7 : Modèle de fixation sur le site actif de l'ECA avec l'inhibiteur captopril (N-[(S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L-Proline)……...……..68

Introduction

La production mondiale de poissons provenant des pêches et de l'aquaculture a été estimée à 145,1 millions de tonnes en 2009 (FAO, 2010). Une grande partie de ce tonnage fait l'objet d'une transformation pour être ensuite utilisée en alimentation humaine. Ces étapes de transformation génèrent une quantité importante de déchets estimée à 50% du volume total (Je *et al*., 2007). Malgré leurs qualités intrinsèques, comme par exemple une grande richesse en protéines, très souvent ces déchets ne font l'objet d'aucun traitement spécifique et sont directement rejetés dans l'environnement, entraînant des problèmes de contaminations. Cependant, si certaines précautions sont prises, ces déchets peuvent devenir des co-produits qui se définissent comme étant les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Les co-produits usuels résultant de la transformation des poissons sont : les têtes, viscères, arêtes, queues, nageoires et peaux.

La valorisation de ces co-produits est une problématique de plus en plus actuelle car elle permet de compenser pour partie la raréfaction de la ressource et limite les frais de retraitement des déchets de plus en plus importants et qui le plus souvent sont à la charge de l'entreprise sous forme de taxe d'enlèvement. Les co-produits doivent donc maintenant être considérés comme d'autres sources de matières premières pour la production de substances destinées à l'alimentation, la nutrition animale et humaine, la cosmétique et la santé (antioxydants, antistress, antihypertensifs, collagènes, pigments...).

En Tunisie, la seiche commune (*Sepia officinalis*) est une des espèces marines les plus importantes économiquement dont sa capture nationale était d'environ 3940 tonnes (DGPA, 2009). Les seiches ne sont jamais transformées à bord des bateaux, ni même congelées, elles sont simplement glacées entières et stockées indépendamment du reste de la pêche, pour éviter les salissures dues à l'encre. Une fois à terre, elles sont achetées par les mareyeurs et les usines de transformation, puis congelées entière en noir (non lavées) et en blocs.

La méthode de transformation de la seiche conduit à l'obtention de plusieurs types de déchets. D'abord la peau et le bec, ensuite l'os de seiche, enfin les viscères et les yeux. La peau et les becs constituent environ 8%, l'os environ 7% et la masse viscérale et les yeux plus de 20% du poids total de l'animal (Richard, 2001). Ces déchets sont une source de contamination environnementale importante obligeant les industriels à traiter leurs déchets avant de les rejeter. La non récupération et la non valorisation de ces déchets engendrent un coût économique (et environnemental) de plus en plus élevé à la charge des industriels.

Cependant, au regard de leur composition, ces déchets s'avèrent relativement riches en protéines, il semble donc intéressant d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines et de voir s'il est possible de les utiliser notamment comme ingrédients dans les produits alimentaires. Les déchets de poissons sont valorisés traditionnellement par transformation en

farine qui représente environ 29 à 30% de la production mondiale de co-produits (Rebeca et *al.*, 1991 ; Valdimarsson et James, 2001). Ces farines sont principalement utilisées comme engrais ou aliments pour bétail (Benjakul et Morrissey, 1997). La faible valeur ajoutée de la farine de poissons a poussé les chercheurs et les transformateurs de produits de la mer à exploiter de nouveaux procédés de transformation afin de valoriser les co-produits issus de poissons.

Un intérêt récent est accordé à l'extraction et la purification des enzymes digestives, essentiellement les protéases qui sont caractérisées par leur action dans une large gamme de pH et de température (Shahidi et Kamil, 2001). Les protéases de poissons et d'invertébrés marins sont classées en deux catégories à savoir les protéases gastriques, intestinales et hépatopancréatiques (Haard, 1994). Les protéases gastriques sont représentées par la pepsine, la chymosine et la gastricsine, alors que celles intestinales et hépatopancréatiques regroupent la trypsine, la chymotrypsine, la collagénase et l'élastase.

Parmi les techniques modernes de valorisation de masse des co-produits, l'emploi d'enzymes exogène, notamment les protéases, connaît un succès considérable. Ce procédé permet une meilleure solubilisation des protéines sous forme d'hydrolysats protéiques. C'est un procédé moins onéreux et relativement facile à maîtriser, aboutissant à l'obtention de produits possédant des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles particulièrement intéressantes pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Liceaga et Li-Chan, 1999 ; Kristinsson et Rasco, 2000a, 2000b ; Liaset *et al*., 2000 ; 2003).

Actuellement, les peptides, par leurs propriétés organoleptiques, fonctionnelles et biologiques sont amenés à jouer un rôle de plus en plus important dans les industries alimentaires, le secteur en forte expansion des aliments santé, ainsi que dans le domaine de la sécurité alimentaire (agents antimicrobiens et surfactifs), de la cosmétique et des biotechnologies en général. On désigne par le terme peptide une molécule comprenant un enchaînement d'acides aminés, ayant une taille comprise entre 3 et 20. Les peptides potentiellement actifs sont appelés biopeptides.

Les biopeptides possèdent *in vivo* des cibles potentilles d'actions. Ils sont capables d'exercer, entre autres un effet sur le système cardiovasculaire (en tant que 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).

A côté des peptides bioactifs, les co-produits de poissons représentent aussi une matrice de choix pour l'extraction de la gélatine (Jellouli *et al*., 2011 ; Haddar *et al*., 2011 ; Balti *et al*., 2011).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre général de la valorisation enzymatique de produits de la pêche. Il a pour principal objectif l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et nutraceutique à partir des produits et co-produits de la seiche commune (*S. officinalis*), connue en Tunisie sous le nom de " Chwabi ". Cette étude se divise en 4 chapitres distincts :

1. Isolement de protéases digestives à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune.
2. Obtention de peptides antihypertensifs à partir du muscle de la seiche commune.
3. Etude des propriétés fonctionnelles et biologiques des hydrolysats protéiques de la seiche commune.
4. Extraction de la gélatine à partir de la peau de la seiche commune.

Le premier chapitre de ce travail s'intéresse à l'extraction, purification et caractérisation biochimiques des protéases digestives d'invertébré marin. Nos travaux ont porté essentiellement sur l'extraction et la purification de la trypsine, la chymotrypsine et la cathepsine D à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*S. officinalis*).

Le deuxième chapitre consiste à élaborer différents hydrolysats protéiques doués d'activité antihypertensive à partir du muscle de la seiche commune moyennant plusieurs enzymes microbiennes, animales et digestives de poissons. Le travail a porté également sur l'isolement et l'identification de quelques peptides responsables de cette activité.

Le troisième chapitre porte sur l'étude de l'influence de degré d'hydrolyse (DH) et le type d'enzyme sur les propriétés fonctionnelles et biologiques des hydrolysats protéiques préparés à partir des co-produits (peau et viscères) et le muscle de la seiche commune (*S. officinalis*).

Enfin, le quatrième chapitre décrit la mise en place d'un procédé enzymatique destiné à l'extraction de la gélatine à partir de la peau de la seiche commune. Pour une éventuelle exploitation de cette biomolécule dans des applications alimentaires, nous avons réalisé une étude comparative de certaines propriétés fonctionnelles et texturales de la gélatine extraite à partir de la peau de la seiche avec celle bovine commerciale.

Etude bibliographique

I. Production mondiale des pêches et de l'aquaculture

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production halieutique mondiale a atteint 145,1 millions de tonnes en 2009 (FAO, 2010). Depuis les années 90, il y a une stagnation des volumes capturés dans les océans (de l'ordre de 90 millions de tonnes par an) et ce malgré le perfectionnement des techniques et l'allongement des campagnes de pêche. Par contre, si les pêches de capture n'évoluent guère depuis 20 ans, les volumes produits par l'aquaculture ne cessent d'augmenter. D'un niveau inférieur à un million de tonnes au début des années 50, la production aquacole mondiale est montée à plus de 55,1 millions de tonnes en 2009. Cette aquaculture mondiale est largement dominée par la région Asie-Pacifique, qui a elle seule produit actuellement 89% de la production en volume. Cette domination est due essentiellement à l'énorme production de la Chine, qui représente 62% du volume (FAO, 2010).

La finalité de ces biomasses marines, quelles soient sauvages ou issues de l'élevage est bien évidemment la nutrition humaine. Ainsi, près 81% de ces biomasses marines sont directement destinés à la consommation, ce qui en 2008 a représenté environ 115 millions de tonnes. Le reste (27 millions de tonnes) étant utilisé à d'autres fins non alimentaire, comme la production de farine ou d'huile de poissons (20,8 millions de tonnes), l'élevage, l'appâtage et les utilisations pharmaceutiques, ou encore l'alimentation directe des poissons d'élevage.

La part de ressources marines (poissons, mollusques, crustacés et algues) consommées par habitant est constante voire en légère hausse depuis plusieurs années et équivalait à 17,2 kg/an en 2009. En 2008, 39,7% de la production mondiale des produits halieutiques (56,5 millions de tonnes) étaient vendus à l'état frais, alors que 41,2% de la production (58,6 millions de tonnes) étaient vendus congelés, fumés ou préparés d'une autre façon en vue de la consommation humaine directe. En ce qui concerne la consommation humaine, la congélation est la première de ces méthodes de transformation (50% des produits de la mer transformés pour la consommation humaine sont congelés), viennent ensuite la mise en conserve et le saurissage (FA0, 2010).

II. Description de l'espèce étudiée : *Sepia officinalis*

II.1. Généralités

II.1.1. Position systématique, morphologie et alimentation

- **Systématique**

Embranchement : mollusques

Classe : céphalopodes

Ordre : coléoidés

Famille : sépiidés

Genre : *Sepia*

Espèce : *officinalis*

Photo 1 :
La seiche commune (*S. officinalis*)

Noms vernaculaires français : casseron, chakod, chibia, margade, seiche, seppia.

- **Principaux caractères morphologiques et alimentation**

La seiche, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758), appartient à l'embranchement des mollusques, classe des céphalopodes. Ces animaux sont caractérisés par le rattachement des pieds à la tête (céphalopodium). De plus, ils possèdent une coquille, soit externe comme chez le nautile soit interne comme chez la seiche, le calmar et le poulpe. Ces animaux sont particulièrement évolués et représentent le sommet de l'évolution chez les mollusques. De cette manière, ils sont dotés d'un système nerveux développé contenu dans un cartilage céphalique et sont capables d'apprentissage (Dickel *et al*., 2001 ; Agin *et al*., 2006). En conséquence, même si les céphalopodes ont gardé des caractéristiques appartenant aux mollusques, certains mécanismes sont comparables à ceux des poissons (Mangold *et al*., 1989 ; Rocha *et al*., 2001). De ce fait, les céphalopodes sont étudiés pour de nombreuses raisons commerciales et scientifiques (Boletsky, 2003).

La seiche est un animal carnivore (Messenger, 1977) et le grand éventail de proies permet de la classer parmi les prédateurs opportunistes. Le régime alimentaire est basé surtout sur les petits crustacés tels que les crevettes (Pinczon du sel et Daguzan, 1992).

II.1.2. Distribution géographique et écologie

La répartition géographique de *Sepia officinalis* est étendue (Figure 1) puisqu'elle occupe l'est de l'Atlantique, la mer de Baltique jusqu'au nord de l'Afrique, ainsi que la Méditerranée et la zone des Açores (Boletsky, 1983 ; Boyle et Boletsky, 1996 ; Guerra, 2006). *Sepia officinalis* est une espèce necto-bentique pouvant vivre jusqu'à des profondeurs avoisinant 200 mètres, avec une plus forte abondance aux alentours de 100 mètres (Guerra, 2006). Espèce migratrice, son cycle de vie s'étale sur un à deux ans (Perez-Losada *et al*.,

2007). Les seiches sont dites semelpares, c'est à dire qu'elles meurent après s'être reproduites. Toutefois, certains individus (souvent mâles) survivent et peuvent participer à une seconde saison de reproduction.

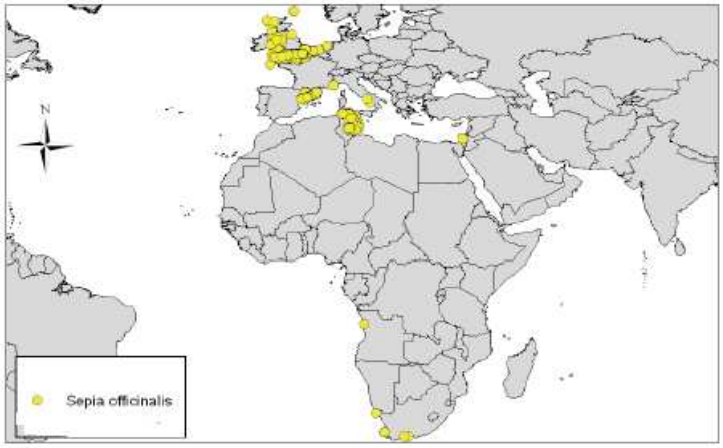


Figure 1 :
Distribution géographique de *S. officinalis*

II.2. Pêche

La production mondiale de seiche commune (*S. officinalis*) fluctue entre 8500 tonnes et 14000 tonnes dans les dernières années, avec des pics à 16000 tonnes et 18000 tonnes. En 2001, les prises totales étaient de 14638 tonnes (0,4% de la production de céphalopodes) dont 6622 tonnes produites par la Tunisie et 3123 tonnes par la Grèce (FAO, 2006). Mais ces chiffres sont assez délicats à interpréter puisque la distinction entre les espèces de seiche et même parfois entre céphalopodes n'est pas toujours faite.

II.3. Système digestif

Les seiches, en milieu naturel, se nourrissent de proies vivantes. Pour les digérer, elles disposent d'un système digestif performant. L'appareil digestif est composé du bulbe buccal, des glandes associées au bulbe buccal, du tube digestif, de la glande digestive et des appendices des canaux digestifs (Figure 2). Chez ces animaux, les organes de digestion sont disposés en U.

La digestion débute au niveau du bulbe buccal qui sert à déchiqueter les proies mécaniquement mais aussi à l'aide d'enzymes sécrétées par les glandes salivaires postérieures (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983 ; Koueta et Boucaud-Camou, 1986). Ensuite, la nourriture transite par l'œsophage vers l'estomac et les débris non digérables sont directement évacués vers l'intestin. L'estomac, très musculeux, broie les aliments qui vont aussi subir l'action des enzymes secrétées par la glande digestive (digestion extracellulaire). Le bol alimentaire passe ensuite directement dans la glande digestive et le caecum où se poursuit la

digestion intracellulaire. L'absorption se déroule dans la glande digestive, les appendices de la glande digestive et le caecum. Pour cela, une partie du liquide nutritif contenu dans le caecum remonte vers les appendices de la glande digestive et vers la glande digestive grâce à un système de sphincters. En effet, l'intestin des invertébrés, contrairement à celui des vertébrés ne possède pas de propriétés d'absorption. Les résidus issus de la digestion intracellulaire forment des corps bruns dans la glande digestive, qui sont évacués par l'intestin.

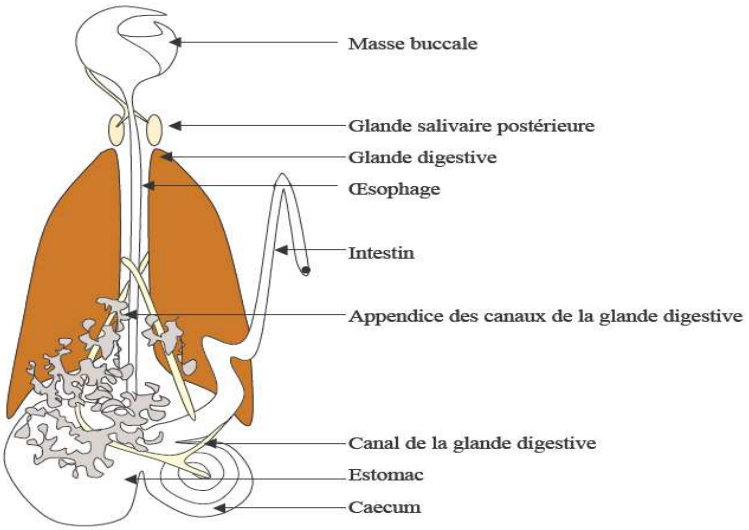


Figure 2 :
Schéma de l'appareil digestif de la seiche commune (*S. officinalis*)

La majeure partie des enzymes digestives est de nature protéolytique (Mangold, 1989): trypsine, chymotrypsine, cathepsines. Des activités non protéolytiques sont également présentes comme celles d'amylases, de lipases, d'estérases et de phosphatases acides et alcalines.

La cellule digestive assurant plusieurs fonctions, son aspect est différent selon le stade de digestion de la seiche. Ainsi, une seule et même cellule, assure les fonctions de synthèse et de sécrétion d'enzyme, ainsi que d'absorption et d'excrétion (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983).

III. Co-produits d'origine marine: définition et voies de valorisation

III.1. Définition

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Il existe trois grands types de producteurs de co-produits: les mareyeurs, les saleurs - saurisseurs et les conserveurs. Pendant la transformation de poissons pour la consommation humaine, des co-produits incluant les têtes, les viscères, la chute de parage (filetage), la peau, l'écaille, les arêtes et les queues sont

générés. Dans un contexte de développement durable mais aussi et surtout dans un souci de rentabilité économique, ces co-produits font depuis plusieurs années l'objet de l'attention des industriels qui aimeraient en tirer bénéfices. L'analyse des compositions proximales de ces matières «secondaires» fait ressortir l'existence de très nombreuses molécules ou groupes de molécules potentiellement valorisables notamment des protéines, des fractions lipidiques, des vitamines, des minéraux mais aussi des composés bioactifs qui ont des propriétés bénéfiques pour la santé humaine et animale (Dumay, 2004 ; Shahidi, 2006).

III.2. Différentes voies de valorisation des co-produits: produits dérivés

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

III.2.1. Farine de poissons

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

III.2.2. Hydrolysats enzymatiques de poissons

Les hydrolysats sont le résultat de la digestion partielle des protéines par hydrolyse protéolytique de poissons entiers ou de co-produits. Les hydrolysats sont des fractions à teneur protéique élevée (73 à 85%) obtenues soit par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) soit par hétérolyse (avec addition d'enzymes exogènes). Une fois séchés, ces hydrolysats ont un aspect identique à celui des farines. Cependant, la proportion en éléments minéraux est assez faible car les arêtes osseuses non hydrolysables ont été retirées. Les hydrolysats ont donc les avantages d'être très digestes et d'avoir une haute qualité nutritive.

III.2.2.1. Autolysats

Les autolysats sont obtenus principalement par l'action des enzymes protéolytiques endogènes du poisson, présentes dans le système digestif (pepsine, trypsine, chymotrypsine) ainsi que dans le tissu musculaire (cathepsines). Les bactéries naturellement présentes dans le

mélange participent également à cette protéolyse. Les autolysats sont généralement liquides, assez visqueux, riches en acides aminés libres et en petits peptides. Ils constituent une nourriture idéale pour l'alimentation animale (Ravallec-Plé, 2000).

Les sauces de poissons sont un exemple d'autolysats issus de la fermentation de poissons fortement salés. Ce sont des produits traditionnels importants de l'alimentation pour certaines populations du sud-est asiatique et portent les dénominations de nuoc-mam (Vietnam), Nam-pla (Thaïlande) ou Shiokara (Japon)…

III.2.2.2. Hétérolysats

Les hétérolysats sont des produits obtenus par l'action d'une enzyme ou d'un mélange d'enzymes additionné au milieu. Ce type d'hydrolyse enzymatique permet d'obtenir des produits protéiques solubles dotés de bonnes propriétés fonctionnelles et susceptibles d'être utilisés en alimentation humaine ou animale. Plusieurs paramètres influencent cette hydrolyse notamment la température, le pH, le ratio enzyme/substrat et le temps d'hydrolyse (Liaset *et al*., 2000).

De très nombreuses enzymes peuvent être utilisées pour ce type d'hydrolyse. Les enzymes d'origine végétale les plus fréquemment employées sont la papaïne et la bromélaïne. Quant aux enzymes d'origine animale (porcine et bovine) les plus fréquentes sont la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine. Les enzymes microbiennes de loin les plus nombreuses dans ce type d'application présentent plusieurs avantages par rapport aux enzymes d'origine animale ou végétale: leurs types d'activité catalytique sont plus variés et leur stabilité face aux variations de température et de pH est meilleure. De ce fait, elles représentent aujourd'hui environ 90% des enzymes produites pour les procédés industriels. De plus en plus, les industriels du secteur, commercialisent leurs enzymes sous forme de complexes enzymatiques comme par exemple Alcalase, Protamex et Flavourzyme commercialisées par la société Novozymes.

Cette hydrolyse accélérée à l'aide d'enzymes exogènes présente par rapport aux autolysats de nombreux avantages tels que le contrôle de l'hydrolyse et des propriétés de l'hydrolysat, et l'utilisation d'une température de catalyse modérée (Diniz et Martin, 1996). Le plus grand intérêt réside cependant dans la possibilité de pouvoir diriger l'hydrolyse vers des peptides particuliers grâce à l'utilisation d'enzymes et de conditions opératoires spécifiques (température, pH, rapport Enzyme/Substrat (E/S), durée de l'hydrolyse...) (Liaset *et al*., 2000).

De tels hétérolysats de poissons trouvent actuellement des applications dans de nombreux domaines tels que: la nutrition animale et humaine, la nutraceutique et la pharmaceutique.

III.2.2.2.1. Nutrition animale

Les hydrolysats protéiques de poissons ont les avantages d'être très digestes et d'avoir une haute qualité nutritive. Ils sont largement utilisés en nutrition animale particulièrement en aquaculture où ils se substituent partiellement à la farine de poissons (Lian *et al.*, 2005 ; Kotzamanis *et al.*, 2007). Ce remplacement des farines par des hydrolysats de poissons augmenterait dans certains cas la croissance des poissons (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2002 ; Refstie *et al.*, 2004 ; Tang *et al.*, 2008). Les procédés d'hydrolyse enzymatique permettent d'obtenir des peptides biologiquement actifs, dotés de propriétés immunostimulantes, stimulant gastrique, anticancéreuses, antihypertensives, antioxydantes... La stimulation gastrique s'avère particulièrement intéressante en aquaculture car elle favorise la digestibilité de l'aliment.

III.2.2.2.2. Nutrition humaine

Depuis une quarantaine d'années, les industriels s'intéressent aux hydrolysats de poissons pour leur intérêt nutritionnel et leur incorporation dans des régimes spécifiques (diététiques) en alimentation humaine. C'est pourquoi les propriétés fonctionnelles telle que la solubilité, la rétention d'eau, la capacité émulsifiante, le pouvoir moussant ont été étudiées afin de déterminer dans quelle mesure ces hydrolysats permettent de modifier les caractéristiques organoleptiques des aliments ou d'augmenter leur durée de stockage (Kristinsson et Rasco, 2000a ; Sathivel *et al.*, 2003 ; Souissi *et al.*, 2007 ; Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008 ; Balti *et al.*, 2010a). D'une manière générale, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont liées aux conditions d'hydrolyse. Ainsi, en contrôlant ces conditions, il est possible d'orienter les propriétés fonctionnelles et donc de diversifier les applications alimentaires.

III.2.2.2.3. Nutraceutique et pharmaceutique

Certains de ces composés bioactifs ont été identifiés comme possédant le potentiel pharmaceutique et nutraceutique qui est avantageux dans l'amélioration de santé humaine (Kim et Mendis, 2006). Des substances bioactives peuvent être issues de l'hydrolyse enzymatique de certains co-produits (viscère, têtes). De très nombreux auteurs se sont intéressés à la recherche de peptides bioactifs au sein d'hydrolysats (Benkajul et Morrissey, 1997 ; Ravallec-Plé *et al.*, 2001). Parmi les très nombreuses activités biologiques identifiées à ce jour, il convient de noter les suivantes à titre d'exemple: antioxydante (Jun *et al.*, 2004 ; Rajapakse *et al.*, 2005b ; Je *et al.*, 2007 ; Klompong *et al.*, 2007; Thiansilakul *et al.*, 2007 ; Šližyte *et al.*, 2009), immunostimulante (Gildberg *et al.*, 1996 ; Tang *et al.*, 2008), antihypertensive (Zhao *et al.*, 2007 ; Bougatef *et al.*, 2008a ; Bougatef *et al.*, 2010a),

antistress, stimulation gastrique, antiproliférатrice (Picot *et al*., 2006), immunomodulatrice (Duarte *et al*., 2006).

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 (dont les co-produits) en vue de produire des peptides bioactifs à forte valeur ajoutée.

III.2.2.2.4. Milieu de culture bactérienne

Dans la culture de microorganismes (bactéries, champignons, levures), c'est le milieu de culture qui représente le plus gros investissement (Martone *et al.*, 2005). L'utilisation d'hydrolysats de poissons comme source de nutriments pour les microorganismes constitue donc une voie intéressante de valorisation. Cette utilisation permet conjointement d'augmenter la valeur des hydrolysats et de réduire le coût de production de la culture cellulaire. Plusieurs travaux ont ainsi mis en évidence une possible substitution des milieux de culture «traditionnels» par des hydrolysats de co-produits de poissons (Guérard *et al*., 2001 ; Aspmo *et al.*, 2005).

III.2.3. Gélatine

La gélatine extraite à partir des sources marine se présente comme une véritable alternative possible à la gélatine bovine (Kim et Mendis, 2006 ; Rustad, 2003 ; Wasswa *et al*., 2007). Une des avantages majeures de la gélatine d'origine marine c'est elle n'est pas associé au risque de la maladie de la vache folle. De plus, la gélatine extraite à partir des produits de la mer est acceptable par l'Islam. En outre, la peau est un déchet généré en grande quantité par les industries de transformation de produits de la mer, qui représente un problème environnementale, pourrait se présenter comme une nouvelle source pou l'extraction de la gélatine (Badii et Howell, 2006).

III.2.3.1. Extraction

La conversion du collagène en gélatine soluble est achevée par un chauffage en milieu acide ou basique (Karim et Bhat, 2009). La solubilisation thermique du collagène est due au clivage de certaines liaisons covalentes inter et intramoléculaire de la protéine. En plus, certaines liaisons amides au niveau de la chaîne élémentaire de la molécule du collagène sont hydrolysées (Bailey et Light, 1989). Le processus d'extraction influe sur la longueur des chaînes polypeptidiques et sur les propriétés fonctionnelles de la gélatine résultante. Cette influence est due aux différents paramètres d'extraction (la température, le temps et le pH), le prétraitement, et la composition et la qualité de la matière première.

Tous les procédés industriels adoptés pour l'extraction des gélatines sont constitués principalement de trois étapes présentées ci-dessous. En outre, la gélatine produite possède une composition variable avec des propriétés spécifiques selon l'application désirée (de Wolf, 2003).

III.2.3.1.1. Prétraitement

Trois procédés différents sont utilisés pour préparer la matière première à l'extraction (préhydrolyse du collagène).

❖ Traitement acide : ce traitement est appliqué pour une matière première peu réticulée comme le collagène de la peau de porc et des poissons. La matière première est traitée en bain acide de courte durée (8 à 24 h). Par la suite, le bain acide est éliminé, la matière neutralisée puis relaver pour ajuster le pH. La gélatine obtenue est appelée gélatine type-A

❖ Traitement alcalin : ce traitement est utilisé pour des collagènes complexes comme ceux du cuir de bovin. Ce processus nécessite normalement plusieurs semaines. La gélatine obtenue est appelée gélatine type-B.

❖ Traitement enzymatique : les propriétés physiques de la gélatine obtenue sont meilleures.

III.2.3.1.2. Conversion du collagène en gélatine

Le collagène partiellement purifié est converti en gélatine par extraction soit avec de l'eau, soit avec des solutions d'acides à des températures adaptées.

III.2.3.1.3. Raffinement

Cette étape permet la filtration, la clarification, la stérilisation, le séchage, le broyage et le tamisage de la gélatine obtenue. Ces opérations dépendent de la concentration et du type de gélatine.

La gélatine a été extraite à partir de plusieurs espèces de poissons et d'organismes marins par diverses procédures qui sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Différentes procédures d'extraction de la gélatine à partir des espèces d'origine marine

Espèce	Prétraitement	Procédure d'extraction	Références
Perche du Nile (*Lates niloticus*)	La peau est prétraitée avec une solution de H_2SO_4 (0,01 M) Les os sont déminéralisés par une solution de HCl (3%)	L'extraction de la gélatine est effectuée dans l'eau distillée à 60 °C	Muyonga *et al*. (2004)
Carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella)*	La peau est traitée avec une solution de HCl (0,1-3,0%) à 7 °C.	L'extraction est réalisée dans l'eau à différentes températures allant de 40-80 °C sous une agitation de 180 rpm	Kasankala *et al*. (2007)
Albacore (*Thunnus albacares*)	La peau est immergée dans une solution 0,5 M NaCl (5 min, 5 °C), suivie d'un lavage à l'eau et un traitement avec 0,1 N NaOH (40 min, 20 °C).	L'extraction est réalisée dans une solution 0,1 N acide acétique (1:5 w/v) à 50 °C pendant 18 h	Rahman *et al*. (2008)
Morue (*Gadus morhua*) Saumon (*Salmo salar*)	Traitement de la peau découpée par une solution de NaCl 0,45 M (1:6 w/v) pendant 3 min à 4 °C.	L'extraction est réalisée dans l'eau distillée (1:6 w/v) à différentes températures (45, 70 et 100 °C) et à différents temps (15-120 min).	Ko1odziejska *et al*. (2008)
Beauclaire (*Priacanthus tayenus*)	La peau est traitée par une solution de NaOH 2,5 mM (1:10 w/v) pendant 2 h à 25-28 °C puis lavée avec l'eau distillée jusqu'à neutralité.	La peau est incubée dans une solution d'acide acétique 0,2 M avec un ratio (1:10 w/v) en présence de la pepsine pendant 24 h à 4 °C. Finalement, le mélange sera neutralisé jusqu'à pH 7,5 puis incubé à 45 °C pendant 12 h.	Nalinanon *et al*. (2008)
Barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*)	La peau est immergée dans une solution d'acide acétique 50 mM (1:8 w/v) à 15 °C pendant 18 h. ensuite lavée plusieurs fois avec de l'eau jusqu'à atteindre un pH 3,5-4,0.	L'extraction de la gélatine est effectuée dans l'eau distillée à 45 °C pendant 7 h.	Liu *et al.* (2008)

Espèce	Prétraitement	Procédure d'extraction	Références
Requin-chabot bambou (*Chiloscyllium punctatum*) Requin bordé (*Carcharhinus limbatus*)	La peau est traitée par une solution de NaOH 0,1 M (1:10 w/v) pendant 2 h à 15-20 °C. Ensuite, la peau est déminéralisée par une solution de HCl 1 M (1:10 w/v) à 15-20 °C pendant 1 h. Enfin, la peau est immergée dans une solution d'acide acétique 0,2 M (1:10 w/v) à température ambiante pendant 15 min.	L'extraction est réalisée dans l'eau distillée (1:2 w/v) à différentes températures (45, 60 et 75 °C) pendant 2 h.	Kittiphattanabawon *et al*. (2011)
Bourse licorne (*Alutherus monoceros*)	La peau est traitée par une solution de NaOH 0,1 M (1:20 w/v) pendant 6 h à 4 °C. Ensuite, la peau est immergée dans une solution d'acide phosphorique 0,2 M (1:10 w/v) à 4 °C pendant 24 h.	L'extraction de la gélatine est effectuée dans l'eau distillée à 50 °C pendant 18 h en présence de 0,04 mM SBTI (inhibiteur de protéases à sérine).	Ahmed *et al*. (2011)
Empreur (*Lethrinus microdon*)	La peau est immergée dans une solution 0,5 M NaCl (5 min, 5 °C), suivie d'un lavage à l'eau et un traitement avec 0,1 N NaOH (40 min, 20 °C).	L'extraction est réalisée dans l'acide acétique (0,01 ; 0,1 et 1 N) à différentes températures (20, 60 et 80 °C) pendant 18 h.	Al-Saidi *et al*. (2011)
Baliste (*Balistes capriscus*)	La peau est traitée par une solution de NaOH 0,2 M (1:10 w/v) pendant 1,5 h à 4 °C puis lavée avec l'eau distillée jusqu'à neutralité. Puis la peau est immergée dans une solution d'acide acétique 0,05 M (1:10 w/v) à 4 °C pendant 6 h.	L'extraction de la gélatine est effectuée dans l'eau distillée à 50 °C pendant 18 h.	Jellouli *et al*. (2011)

III.2.3.2. Rendement d'extraction

En moyenne, le rendement d'extraction de la gélatine à partir des espèces marines est plus faible que celui obtenu avec la gélatine des mammifères. Il est compris entre 6% et 19%. Ce faible rendement d'extraction pourrait être dû essentiellement à la perte de collagène par lessivage au cours des étapes de lavage ou à l'hydrolyse incomplète du collagène (Jamilah et Harvinder 2002). Nalinanon et *al*. (2008) ont montré que l'utilisation de la pepsine permet d'obtenir un rendement plus élevé avec une hydrolyse négligeable de la gélatine obtenue. En effet, ils ont montré que le rendement d'extraction de la gélatine à partir de la peau du beauclaire (*Priacanthus tayenus*) augmente d'une manière significative de 22,2% à 40,3% (le rendement est calculé sur la base de la teneur en hydroxyproline), en utilisant la pepsine combinée avec SBTI (inhibiteur de protéase à sérine).

III.2.3.3. Propriétés physicochimiques et fonctionnelles de la gélatine marine

Pour des applications alimentaires, les propriétés les plus importantes caractérisant la gélatine sont la force de gel, la viscosité, la température de gélification et la température de fusion. Ces propriétés sont affectées par de nombreux facteurs, tels que la masse moléculaire moyenne, la distribution de la masse moléculaire, la concentration de la solution de gélatine, la durée et la température de maturation du gel, le pH et la teneur en sel.

Les principales propriétés de la gélatine sont : gélifiante, épaississante, foisonnante, émulsifiante, filmogène, floculant, stabilisante, liante, etc.

III.2.3.3.1. Composition en acides aminés

Généralement, la gélatine de poissons possède des concentrations plus faibles en imino acides (proline et hydroxyproline) comparée à la gélatine des mammifères (Eastoe et Leach, 1977). Cette teneur est de l'ordre de 30% pour la gélatine de mammifères, 22-25% pour la gélatine de poissons d'eau chaude (le tilapia et la perche du Nile) et 17% pour la gélatine de poissons d'eau froide (la morue) (Muyonga *et al*., 2004).

Avena-Bustillos *et al*. (2006) ont montré que la gélatine extraite à partir des poissons d'eau froide contient de faibles teneurs en hydroxyproline, proline, valine et leucine en comparaison à la gélatine des mammifères. Toutefois, des teneurs beaucoup plus élevés en glycine, sérine, thréonine, acides aspartique, méthionine et histidine ont été enregistrées. Les teneurs en alanine, acide glutamique, cystéine, isoleucine, tyrosine, phénylalanine, homocystéine, hydroxylysine, lysine et arginine sont presque comparables.

III.2.3.3.2. Propriétés rhéologiques et texturales

La force et le point de fusion du gel représentent les principales propriétés physiques de la gélatine. Ces propriétés dépendent de la masse moléculaire, ainsi que par la composition en acides aminés et le rapport des chaînes α/β présentes dans la gélatine (Cho *et al*., 2004). La force du gel de la gélatine commerciale varie de 100 à 300 g, mais une gélatine ayant une valeur de l'ordre de 250-260 g est plus souhaitable (Holzer, 1996). La gélatine de poissons possède généralement une force de gel assez faible allant de zéro à 270 g, comparativement aux valeurs élevées de la gélatine bovine ou porcine, qui sont de l'ordre de 200-240 g. Toutefois, une force de gel assez élevée de l'ordre 426 g a été enregistrée avec la gélatine extraite à partir de la peau du thon albacores (Cho *et al*., 2005).

La gélatine possède des qualités particulières recherchées par l'industrie pour donner des textures spécifiques. Elle fait partie de la famille des hydrocolloïdes dont les fonctions principales sont d'épaissir, de gélifier et de stabiliser. Grâce à son fort pouvoir gonflant, plongée dans l'eau froide, elle gonfle en absorbant 5 à 10 fois son volume d'eau. Ces propriétés fonctionnelles d'épaississement ou de gélification des systèmes aqueux sont à la base de son utilisation dans les applications alimentaires.

Le tableau 2 montre certaines valeurs de force du gel et de température de gélification et de fusion des gélatines d'origine marine.

Tableau 2 : La force du gel et les températures de gélification et de fusion de certaines gélatines d'origine marine

Espèce	Force du gel (g)	Température de gélification (°C)	Température de fusion (°C)	Références
Morue	~90	11-12	13,8	Gomez-Guillen *et al*. (2002)
Merlu	~110	11-12	14	
Sole	350	18-19	19,4	
Cardine	240	18-19	18,8	
Courbine barbiche	124,9	7,1	18,5	Cheow *et al*. (2007)
Carangue	176,9	9,9	24,5	
Perche du Nile	222	13,8	21,4	Muyonga *et al*. (2004)
	229	19,5	26,3	
Carpe herbivore	267	19,5	26,8	Kasankala *et al*. (2007)
Albacore	426	18,7	24,3	Cho *et al*. (2005)
Merlu	150	11	12-13	Arnesen et Gildberg (2002)
Barbue de rivière	243-256	15-18	23-27	Liu *et al*. (2008)

III.2.3.3.3. Capacité émulsifiante et pouvoir moussant

La gélatine et le collagène, sont utilisés comme agent moussant et émulsifiant, dans plusieurs produits alimentaires, pharmaceutiques et médicaux, en raison de leurs propriétés

tensioactives. Des études antérieures ont montré que la gélatine est capable d'agir comme un émulsifiant dans des mélanges huile/eau (Lobo, 2002). Les résidus hydrophobes des chaînes peptidiques de la gélatine sont responsables de ces propriétés émulsifiantes et moussantes (Cole, 2000 ; Galazka *et al*., 1999). Jusqu'à présent, peu de travaux ont été menés sur la capacité émulsifiante et moussante des gélatines marines. En général, les émulsions produites par la gélatine de poissons sont moyennement stables.

III.2.3.3.4. Formation de film

L'étude de la capacité filmogène de la gélatine marine et la caractérisation des films obtenus sont largement décrites dans la littérature. Les gélatines de poissons se caractérisent par une excellente capacité de formation de film (Avena-Bustillos *et al*., 2006 ; Jongjareonrak *et al*., 2006 a,b ; Gomez-Guillen *et al*., 2007). En général, le film de gélatine extraite à partir de la peau des espèces de poissons d'eau chaude, telle que la perche du Nile, possède des propriétés mécaniques semblables à celles de la gélatine bovine (Muyonga *et al*., 2004). Le film de gélatine marine, par contre, présente une perméabilité à la vapeur d'eau inférieure à celles des gélatines bovine et porcine (Gomez-Guillen *et al*., 2007). Ces faibles valeurs de perméabilité des films de gélatine marine comparées à celles bovine ou porcine peuvent être expliquées par la différence au niveau de la composition en acides aminés (Avena-Bustillos *et al*., 2006).

III.2.4. Autres produits dérivés à haute valeur ajoutée

La marge bénéficiaire qu'engendre la production de farine et d'huile de poissons est minime et la viabilité des industries n'est assurée que par les très gros volumes qu'elles traitent. Depuis une cinquantaine d'années, les travaux des équipes de recherche laissent entrevoir d'autres possibilités de valorisation de ces co-produits avec, bien souvent, une plus forte valeur ajoutée: hachis congelé, arômes, chondroïtine sulfate, huiles riches en acides gras oméga 3, lécithines.

III.2.4.1. Hachis congelé

L'utilisation des co-produits sous forme de hachis congelés est très certainement celle qui nécessite le moins d'opérations de transformation. En effet, après un tri spécifique (les viscères et la peau sont éliminés tout comme les poissons cartilagineux), les co-produits sélectionnés sont broyés et filtrés, puis le hachis obtenu est congelé en blocs. Les hachis congelés sont une bonne source de protéines et ils sont utilisés par l'industrie du petfood (animaux de compagnie) et représentent en tonnage la 3ème voie de valorisation des co-produits marins en France avec environ 30000 tonnes par an (Andrieux, 2004).

III.2.4.2. Arômes

Les extraits et les arômes marins sont de plus en plus demandés dans le monde notamment en Asie (Johnson, 2002). Deux principes de fabrication cohabitent : le premier qui vise à sécher la matière par cuisson puis à broyer le produit conduit à l'obtention d'une poudre aromatique peu soluble ; le deuxième au contraire consiste à mettre en contact la matière première et l'eau puis à récupérer cette eau et à concentrer puis sécher les matières organiques dissoutes afin d'obtenir un extrait soluble. De très nombreux produits d'origine marine sont ainsi produits à partir de saumon, de morue, des anchois, du thon, des crevettes, du homard, du crabe, du calmar, des pétoncles, des huîtres… Les co-produits peuvent ainsi être valorisés à la condition impérative qu'ils soient de qualité et propre à la consommation humaine.

III.2.4.3. Chitine/Chitosane

La chitine est un biopolymère insoluble composé de séquences linéaires d'acétylglucosamine. La chitine est extraite de carapaces de crustacés, d'os de seiche ou de plumes de calmars. Chez la crevette, la chitine représente environ 1/3 de la carapace. La chitine représente le deuxième polymère naturel en abondance sur la terre après la cellulose. Sous forme déacétylée, la chitine devient chitosane (Figure 3). Le chitosane est un produit biologique possédant une charge électrique positive due à un doublet d'électrons libres sur l'atome d'azote du groupement –NH2.

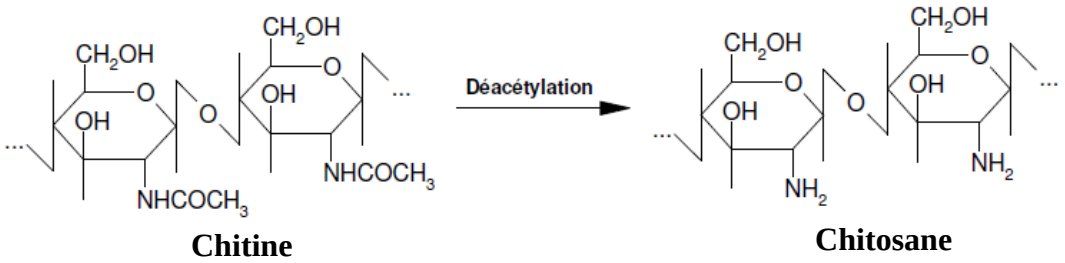


Figure 3 :
Désacétylation de la chitine en chitosane

Cette propriété, exceptionnelle dans le milieu biologique permet au chitosane de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement et de les fixer solidement par liaison ionique. Le chitosane présente également des propriétés filmogènes et bioadhésives lui permettant des applications en cosmétologie et en médecine. Il présente également des propriétés fongicides et bactéricides. Ces propriétés variées ont permis de recenser, en 2000, plus d'une centaine d'applications du chitosane (Marinard Biotech, 2003). Les différentes applications du chitosane sont essentiellement fonction du degré de pureté du composé.

III.2.4.4. Chondroïtine sulfate

La chondroïtine sulfate est une glycoprotéine constitutive des cartilages impliquée dans la tonicité des tissus de soutien. Les sources marines sont principalement les cartilages de raies et requin. Actuellement, cette chondroïtine est utilisée en tant qu'aliment fonctionnel pour réduire les douleurs articulaires, améliorer la fonction articulaire et assurer une protection structurelle de l'articulation chez les patients atteint d'arthrose.

III.2.4.5. Huile riche en acides gras oméga 3

Le principal intérêt nutritionnel des huiles de poissons réside dans la présence d'acides gras insaturés (type ω3 ou ω6). De plus, outre les qualités initialement présentes dans les huiles de poissons, il est désormais possible d'enrichir ces huiles en ω3 (Shahidi et Wanasundara, 1998 ; Gunstone, 1999 ; Xu *et al*., 2000 ; Xu, 2000 ; Linder *et al*., 2001 ; Camacho PaezPáez *et al*., 2002 ; Rao *et al*., 2002 ; Linder *et al*., 2002) en utilisant notamment des enzymes spécifiques (lipases, ligases) permettant de greffer des acides gras sur la partie glycérol des lipides.

L'intérêt nutritionnel des acides gras de la famille des omégas 3 n'est plus à démontrer notamment pour leur effet préventif sur les maladies cardiovasculaires et pour leur contribution au développement cérébral chez l'enfant. Parmi les différentes sources disponibles, les huiles de poissons sont privilégiées car elles sont riches en acides gras oméga 3 à longue chaine et particulièrement en C20:5 ω3 (acide eicosapentaénoique ou EPA) et C22:6 ω3 (acide docosahexaénoique ou DHA). A l'aide d'étapes de filtration et de concentration, les acides gras de cette famille sont peu à peu concentrés. Ces concentrés sont encapsulés et commercialisés sous la forme de compléments alimentaires ou formulés dans des aliments dénommés « aliments fonctionnels » tels des boissons, des soupes, des céréales (Johnson, 2002).

III.2.4.6. Lécithine

Les phospholipides, trivialement appelés lécithines, sont un des constituants majeurs des membranes cellulaires. Ils possèdent de très nombreuses fonctionnalités qui leur confèrent un intérêt pour des applications dans les domaines de la nutraceutique, le médical, la cosmétique et l'agro-alimentaire. Dans la majeure partie des applications, ils sont principalement utilisés pour leurs propriétés émulsifiantes indépendantes de leur greffage en acides gras. Cependant, les lécithines marines présentent en plus la particularité d'être riches en acides gras oméga 3 et notamment en acides gras à longue chaîne de haut intérêt nutritionnel. C'est pourquoi depuis quelques années, il y a un regain d'intérêt pour ce type de produits issus du milieu marin et notamment de co-produits afin de réduire les coûts et d'assurer une disponibilité. Les

œufs et la laitance de poissons sont des matrices de choix tout comme certaines têtes de poissons (thon, saumon...).

III.2.4.7. Protéases digestives

La récupération d'enzymes à partir de poissons et d'invertébrés marins et leur caractérisation s'est accrue durant ces dernières années et a donné naissance à de nouveaux usages biotechnologiques de ces enzymes surtout dans le domaine de la technologie alimentaire (Castillo-Yañez *et al.*, 2004). L'intérêt porté aux animaux aquatiques est dû principalement à la concentration enzymatique dans leurs tissus et à la qualité de ces protéines et leur validité commerciale (Han, 1993). D'autre part, l'extraction des enzymes à partir des sous-produits de la mer et leur utilisation en industrie alimentaire peut contribuer significativement à la réduction du degré de pollution de l'environnement.

Les protéases digestives peuvent être classées selon la spécificité de substrat (Figure 4) ; les endopeptidases hydrolysant les liaisons peptidiques spécifiques à l'intérieur des molécules protéiques. Elles coupent les chaînes protéiques en molécules plus petites, les peptides (Neuberger et BrocMehurst, 1987). Les exopeptidases hydrolysant les liaisons peptidiques terminales (extrémité N-terminale ou C-terminale) et libérant les acides aminés (Polgar, 1989). La sécrétion et l'activation des protéases pancréatiques digestives chez les poissons suivent le même chemin que chez les autres vertébrés.

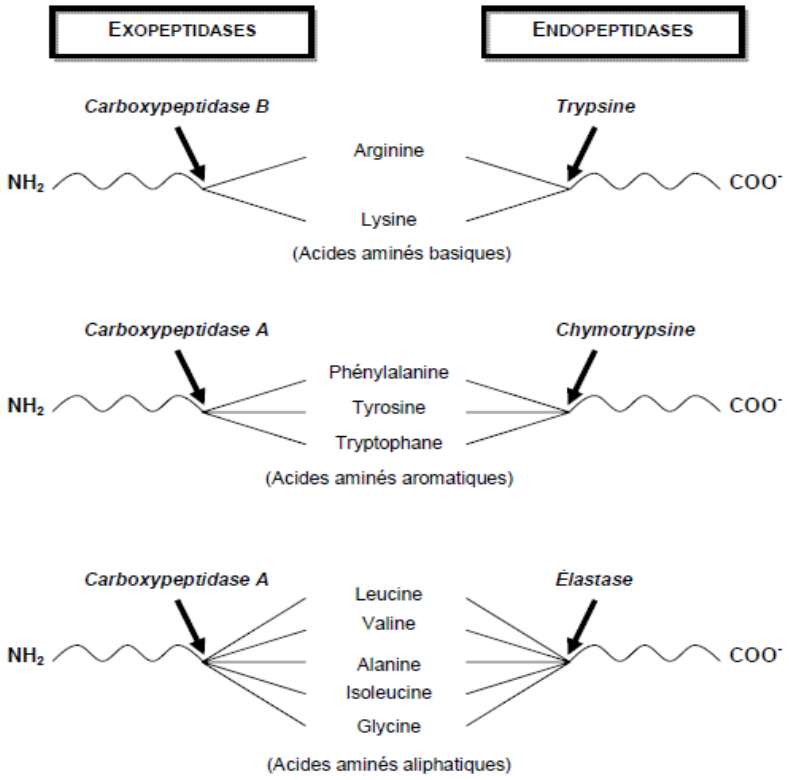


Figure 4 :
Les protéases digestives et les acides aminés impliqués dans la liaison peptidique où s'exerce l'action de l'enzyme (Van Dyke, 1989).

IV. Les protéases digestives des poissons et des invertébrés marins

La plupart des enzymes de poissons et d'invertébrés marins sont également présentes chez les organismes terrestres (Haard, 1998). Cependant, plusieurs différences au niveau de la masse moléculaire, la composition en acides aminés, le pH optimum, la température optimale, la stabilité, les caractéristiques d'inhibition et les propriétés catalytiques ont été observées entre les deux groupes (De-Vecchi et Coppes, 1996).

Parmi les enzymes naturellement disponibles chez les poissons et les invertébrés aquatiques, les protéases constituent le groupe majeur : elles sont connues sous le nom de protéinases (endo) et de peptidases (exo). Ces termes font référence à toutes les enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques des polypeptides et des protéines (Winstanely, 1979 ; Lehninger *et al*., 1993). Suivant leurs propriétés *in vitro*, les protéases ont été classées selon, le pH, la nature du site actif, leur capacité à hydrolyser des protéines spécifiques et selon leur mécanisme d'action (Han, 1993). D'après la classification « International Union of Applied Biochemists » les protéases d'origine marine sont classées en quatre groupes majeurs à savoir les protéases acides et aspartiques, à sérine, à thiol ou protéases à cystéine et les métalloprotéase (Haard et Simpson, 1994).

Les études sur les enzymes protéolytiques présentes au niveau du tractus digestif des espèces marines sa date depuis le 19ième siècle et la mise en évidence de cette activité a été décrite pou la première fois par Stirling en 1884 (Gildberg, 1988). En outre, l'effet des protéases digestives dans les changements post-mortem des poissons au cours de stockage a été décrit par Almy en 1926 (Haard, 1994). Les enzymes protéolytiques les plus étudiées chez les poissons et les invertébrés marins sont les protéinases gastriques, intestinales et hépatopancréatiques (Haard, 1994).

IV.1. Protéases acides/aspartiques

Les protéases acides ou aspartiques forment un groupe des endoprotéases caractérisées par une forte activité et une haute stabilité à des pH acides. C'est la base de l'appellation de ce groupe « protéases acides ». Le pH optimum acide est du à la présence de deux résidus catalytiques aspartyls qui sont essentiels pour l'activité, Asp_{32} et Asp_{215} (séquence dans la pepsine porcine) (Sepulveda *et al*., 1975). L'un d'eux est protoné et l'autre est ionisé (Andreeva et Rumsh, 2001 ; Erskine *et al*., 2003). Les études par cristallographie des rayons X montrent que ces enzymes ont une structure composée de deux lobes séparés par une fente profonde, chaque lobe apporte l'un des résidus aspartiques essentiels. Les deux lobes montrent une grande homologie au niveau de la structure tridimensionnelle qui est préservée dans la plupart des protéases aspartiques, bien qu'ils présentent une séquence en acides

aminés différentes (Rao *et al*., 1998 ; Erskine *et al*., 2003). Cette structure complexe assure l'approche étroite des deux résidus aspartyls, qui dans l'ordre de peptide sont séparés par environ 183 résidus (Rao *et al*., 1998 ; Erskine *et al*., 2003). Les deux résidus aspartyls catalytiques sont contenus dans une séquence composée de Asp-Thr-Gly-Xaa liée aux parties N-terminal et C-terminal des deux lobes de la protéase, ou X-aa peut être une sérine ou une thréonine (Rao *et al*., 1998 ; Andreeva et Rumsh, 2001).

Depuis que la pepsine de saumon a été cristallisée pour la première fois en 1923 (Norris et Elam, 1940), les protéases acides de plusieurs espèces de poissons et d'invertébrés marins ont été purifiées et étudiées par plusieurs groupes de chercheurs. La plupart des recherches effectuées sur les protéases gastriques sont focalisées sur la pepsine. Peu de travaux décrivent la purification de la chymosine et de la gastricsine. Ces enzymes sont des endopeptidases agissant en milieu acide (Gildberg, 1988) et sont appelées aussi des « aspartyl protéases » (Fruton, 1987 ; Han, 1993). On distingue aussi la rénine qui est une aspartyl protéase, son pH optimum est de 6,0-8,0 (Fruton, 1987).

Les protéases purifiées à partir de différentes sources possèdent des propriétés catalytiques et biochimiques très variables (Han et Shahidi, 1995). Généralement, les protéases digestives de poissons ont une activité optimale à une température beaucoup plus élevée que celle de l'habitat de poisson (Koury *et al*., 1971). Ce ci peut être expliqué du faite que les températures internes du tractus digestif des poissons sont toujours plus élevées que la température ambiante de la mer (Gildberg, 1988). Bien qu'il n'y ait pas de grandes différences apparentes entre eux, les protéases digestives d'origine marine se distinguent par leur instabilité thermique, une haute activité spécifique à basse température et leur capacité d'hydrolyse des protéines natives (Simpson et Haard, 1987a,b). À titre d'exemple, la pepsine de la morue polaire (*Boreogadus saida*) a montrée une faible énergie d'activation et une basse température optimale comparé a ces homologues isolées à partir d'autres espèces de poissons à sang froid (Arunchalam et Haard, 1985 ; Gildberg, 1988 ; Martinez et Olsen, 1989 ; Simpson et Haard, 1984). Ainsi, les enzymes protéolytiques digestives des poïkilothermes sont secrétées pour permettre à ces organismes d'utiliser efficacement leur alimentation dans les conditions d'habitat respectif (Simpson *et al*., 1989).

IV.1.1. Pepsine

Les pepsines de poissons appartiennent à la famille des endopeptidases aspartiques présentes dans le suc gastrique des vertébrés (Fruton, 1987). Elles se présentent comme les protéases gastriques majoritaires (Klomklao *et al*., 2007a). La pepsine (EC 3.4.23.1) possède une spécificité préférentielle aux acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane). Les pepsines de poissons sont isolées à partir de la muqueuse gastrique et elles

ont une faible activité sur les peptides à courte chaîne. Cependant, comme toutes les autres protéases aspartiques, elles sont caractérisées par une activité considérable sur l'hémoglobine (Sanchez-Chiang *et al*., 1987). Les pepsines et les pepsines-like ont été purifiées et caractérisées à partir de différentes espèces de poissons à savoir la morue Atlantique (Gilberg *et al*., 1990), la sardine du Pacifique (Castillo-Yanez *et al*., 2004) et le grenadier (Klomklao *et al*., 2007a). Des études ont montré que les pepsines de poissons sont secrétées sous formes d'isoenzymes. La plupart des espèces de poissons possèdent deux ou trois formes de pepsines majoritaires (Gilberg et Raa, 1983). Les pepsines de poissons purifiées ont une activité maximale dans une zone de pH de 2,0 à 4,0 (Simpson, 2000) et qu'elles sont plus spécifiques que les pepsines de mammifères (Gildberg et Raa, 1983). Gildberg, (1988) a mis en évidence la sécrétion d'au moins deux types de pepsines (nommées pepsine I et pepsine II) par plusieurs espèces de poissons. Les pepsines I et II ont des activités maximales, sur hémoglobine, aux pH 3,0-4,0 et 2,0-3,0, respectivement, avec une température optimale comprise entre 37 et 55 °C. Elles sont moins stables que les pepsines de mammifères (Castillo-Yanez *et al*., 2004). Egalement, deux pepsines (A et B) ont été purifiées à partir de l'estomac de grenadier (*Coryphaenoids pectoralis*) présentent une activité maximale à pH 3,0 et 3,5, respectivement, et elles ont la même température optimale de 45°C sur hémoglobine, utilisée comme substrat (Klomklao *et al*., 2007a).

Les pepsines sont inhibées par la pepstatine A et ont une masse moléculaire qui varie entre 30 et 35 kDa (Simpson, 2000).

IV.1.2. Cathepsine D

Contrairement aux trypsines et trypsines-like, les protéases gastriques n'ont pas été détectées chez les poissons qui ne possèdent pas d'estomac et chez les invertébrés marins. Ces espèces possèdent des enzymes homologues comme la cathepsine D (Gildberg, 1988). La pepsine et la cathepsine D ont des propriétés moléculaires très similaires. D'où l'hypothèse proposée selon laquelle la cathepsine D est l'enzyme ancestral des protéases aspartiques présentes chez les vertébrés. En effet, la pepsine n'a jamais été détectée chez les invertébrés. Par contre la cathepsine D, aussi bien que les autres cathepsines, agit à la fois en tant qu'enzyme digestive et lysosomale chez beaucoup de ces animaux. Généralement, les propriétés biochimiques de la cathepsine D d'invertébrés correspondent à celles des poissons et des mammifères (Gildberg, 1988).

La cathepsine D (EC 3.4.4.23) est une endopeptidase aspartique qui possède une activité pepsine-like mais elle diffère des pepsines par sa haute activité sur les peptides à longue chaîne (Haard, 1994). La cathepsine D possède un poids moléculaire de 40 kDa et son pH optimal est de l'ordre 3.5. Sa température optimale est de 40 °C mais elle perd généralement

85% de son activité initiale à 50 °C (Makinodan *et al*., 1991). Les inhibiteurs comme la leupeptine et l'EDTA présentent un effet minime sur l'activité de la cathepsine D alors que la pepstatine A l'inhibe d'une manière irréversible (Konagaya, 1985). Cette protéase hydrolyse les protéines comme l'hémoglobine et les protéines sarcoplasmiques mais elle a très peu d'effet sur le collagène (Okitani *et al*., 1981). A des pH acides (pH < 6), la cathepsine D est capable de dégrader l'actine et la chaîne lourde de la myosine (Okiani *et al*., 1981). Chez les invertébrés, cette enzyme est secrétée par l'hépatopancréas et semble être un élément essentiel de la digestion intracellulaire des protéines. Récemment, Komai *et al*. (2004) et Balti *et al*. (2010b) ont décrit la purification de la cathepsine D à partir de cet organe de l'encornet (*Todarodes pacificus*) et de la seiche commune (*S. officinalis*). Les cathepsines D isolées possèdent des masses moléculaires de l'ordre de 36,5 kDa et 37,5 kDa, estimées par SDS-PAGE, respectivement. Les protéases purifiées possèdent une activité maximale à pH 3.0 sur l'hémoglobine, utilisée comme substrat.

IV.1.3. Chymosine

La chymosine (EC 3.4.23.4), connue sous le nom de rénine, est une protéase acide (Wong, 1995) ayant quelques caractéristiques spécifiques telles qu'une stabilité à pH 7,0 et une activité sur une gamme restreinte de substrats protéiques, ce qui la distingue des autres protéases acides (Haard et Simpson, 1994 ; Shamsuzzaman et Haard, 1984). Certaines études ont mis en évidence des activités enzymatiques de la chymosine et la chymosine-like chez la carpe (*Cyprinus carpio*) (Cohen et Gertler, 1981) et chez le phoque (*P. groenlandica*) (Han et Shahidi, 1995). La chymosine présente des caractéristiques qui la différencient de la pepsine parmi lesquelles un pouvoir élevé de coagulation du lait, un pH optimal entre 2,2-3,5 sur l'hémoglobine comme substrat, une faible activité sur le *N*-acétyl-l-phénylalanyl-3,5-diiodo-1-tyrosine et la forme zymogène possède une masse moléculaire de l'ordre de 33,8 kDa (Haard et Simpson, 1994).

IV.1.4. Gastricsine

La gastricsine (EC 3.4.23.3) est une protéase aspartique ayant des propriétés enzymatiques et biochimiques semblables à celles de la pepsine (De-Vecchi et Coppes, 1996). Sanchez-Chiang et Ponce (1981) ont mis en évidence la présence de deux zymogènes de gastricsine dans l'estomac de merlan (*Merluccius gayi*). Ces derniers restent actifs jusqu'à pH 10,0 avec une activité optimale à pH 3,0. La température optimale, le pH optimum et la masse moléculaire des protéases acides de certaines espèces de poissons et d'invertébrés marins sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 :

Température optimale, pH optimum et masse moléculaire de quelques protéases digestives acides de poissons et d'invertébrés marins

Enzyme	Espèces	Masse moléculaire (kDa)	Température (°C)	pH	Références
Pepsine	Anguille d'Asie (*Monopterus albus*)	32 32 31	40 40 35	3,5 3,0 3,0	Weng *et al*. (2011)
	Bar du Japon (*Lateolabrax japonicus*)	30 31 30	35 30 30	3,0 2,5 3,0	Cao *et al*. (2011)
	Thon (*Thunnus alalunga*)	32,7	50	2,0	Nalinanon *et al*. (2010a)
	Bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*)	33,9 33,7	50 50	1,0 2,5	Nalinanon *et al*. (2010b)
	Anguille d'Europe (*Anguilla anguilla*)	30 30 30	40 40 35	3,5 2,5 2,5	Wu *et al*. (2009)
	Poisson tête de serpent (*Channa argus*)	32 33 31	45 40 40	3,0 3,5 3,0	Chen *et al*. (2009)
	Poisson Mandarin (*Siniperca chuatsi*)	31 30 32 30	40 45 40 45	3,5 3,5 3,5 3,5	Zhou *et al*. (2008)
	Emissole lisse (*Mustelus mustelus*)	35	40	2,0	Bougatef *et al*. (2008b)
	Dorade (*Sparus latus* Houttuyn)	30 29 30 30	45 50 50 50	3,5 3,0 3,5 3,5	Zhou *et al*. (2007)
	Grenadier (*Coryphaenoides pectoralis*)	35 31	45 45	3,0 3,5	Klomklao *et al*. (2007a)
	Coelacanthe Africain (*Latimeria chalumnea*)	31,1 31,1	- -	2,0-2,1 2,3	Tanji *et al*. (2007)

Enzyme	Espèces	Masse moléculaire (kDa)	Température (°C)	pH	Références
Pepsine	Bocasson émeraude (*Trematomus bernacchii*)	34,25 34,25	50 37	2,5 2,0	Brier *et al*. (2007)
	Parone (*Parona signata*)	-	37	3,5	Pavlisko *et al*. (1997a)
	Hoplostète (*Hoplostethus Atlanticus*)	33,5 34,5	37 37	2,5 3,5	Xu *et al*. (1996)
	Morue atlantique (*Gadus morhua*)	-	40	3,0	Martinez et Olsen (1989)
	Morue polaire (*Boreogadus saida*)	-	37 37	2,0 2,0	Arunchalam et Haard (1985)
	Saumon (*Oncorhynchus keta*)	32 27	-	3,0 3,0	Sanchez-Chiang *et al*. (1987)
	Capelan (*Mallotus villosus*)	25 25	38 43	3,7 2,5	Gildberg et Raa (1983)
	Truite (*Salmo gaidneri*)	-	37	3,0	Twining et al. (1983)
	Sardine (*Sardinops melanostica*)	- -	55 40	4,0 2,0	Noda et Murakami (1981)
Cathepsine D	Seiche commune (*Sepia officinalis*)	37,5	50	3,0	Balti *et al*. (2010b)
	Homard américain (*Homarus americanus*)	50	-	-	Rojo *et al*. (2010)
	Encornet (*Todarodes pacificus*)	36,5	-	3,5	Komai *et al*. (2004)
	Calmar (*Todarodes sagittatus*)	38	-	3,7	Gildberg (1987)
Chymosine	Phoque (*Pagophilus groenlandicus*)	-	-	2,2-3,5	Shamsuzzaman et Haard (1984)
Gastricsine	Morue atlantique (*Gadus morhua*)	34	-	-	Amiza et Owusu (2002)

IV.2. Protéases intestinales et hépatopancréatiques

Ces protéases sont sécrétées par le caecum pylorique ou par le pancréas (Haard, 1994; Walsh et Wilcox, 1970). Elles sont principalement représentées par les deux types de protéases à sérine : la trypsine et la chymotrypsine (Han, 1993). Toutefois, d'autres enzymes telles que les collagénases, les élastases et les carboxypeptidases ont été découvertes dans les viscères de poissons (Shahidi et Kamil, 2001). La majorité des enzymes protéolytiques intestinales de poissons sont des protéases à sérine qui possèdent des activités nettement supérieures à des pH alcalins (Walsh et Wilcox, 1970). De plus, plusieurs études ont montré que les protéases à sérine de poissons sont généralement similaires à celles des vertébrés de point de vue masse moléculaire, composition en acides aminés et la sensibilité vis-à-vis des inhibiteurs (Haard, 1994).

IV.2.1. Trypsine et chymotrypsine

La trypsine et la chymotrypsine appartiennent à la famille des protéases pancréatiques à sérine. Cette dernière est caractérisée par sa triade catalytique (histidine, acide aspartique et sérine) hautement conservée chez tous les organismes vivants (Stryer, 1988). La trypsine (EC 3.4.21.4) possède une spécificité très étroite sur les liaisons peptidiques dans lesquelles la fonction carboxyle est fournie par la lysine ou l'arginine (Simpson, 2000) et elle joue un rôle très important dans le processus de la digestion et dans l'activation des zymogènes (Cao *et al*., 2000). La chymotrypsine (EC 3.4.21.1) possède une spécificité plus large en comparaison à celle de la trypsine. Elle catalyse la coupure du côté C-terminal des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine).

Les trypsines et les chymotrypsines sont actives en milieu alcalin. Chez les vertébrés supérieurs, ces enzymes sont secrétées par le pancréas sous forme de zymogènes inactifs. Le trypsinogène est activé en trypsine par autocatalyse ou par une protéase produite par la muqueuse intestinale, l'entérokinase. La trypsine active le chymotrypsinogène en le transformant en chymotrypsine (Weil., 1979). Au cours de ces dernières années, plusieurs trypsines et trypsines-like ont été extraites, purifiées et caractérisées à partir des viscères de plusieurs espèces de poissons et d'invertébrés marins : le pancréas de la carpe (*Cyprinus carpio*) (Cohen et Gertler, 1981), la glande digestive (hépatopancreas) de la crevette blanche du Pacifique (*Penaeus setiferus*) (Gates et Travis, 1969), l'écrevisse (*Astacus fluviatilis*) (Titani *et al*., 1983) et la seiche commune (*S. officinalis*) (Balti *et al*., 2009), la rate de la bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*) (Klomklao *et al*., 2007b) et le thon albacore (*Thunnus albacores*) (Klomklao *et al*., 2006a) le caecum pylorique du saumon royal (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Kurtovic *et al*., 2006), la sardine du Pacifique (Castillo-Yañez

et al., 2005), le sébaste (*Sebastes schlegelii*) et le chaboisseau (*Alcichthys alcicornis*) (Kishimura *et al*., 2007), le barbarin rouge (*Pseudupeneus maculates*) (Souza *et al*., 2007), le goberge d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) (Kishimura *et al*., 2008) et le poisson mandarin (*Siniperca chuatsi*) (Lu *et al*., 2008), les intestins de baliste (*Balistes capriscus*) (Jellouli *et al*., 2009) et l'émissole lisse (*Mustelus mustelus*) (Bougatef *et al*., 2010b) et les viscères entières de l'anchois Japonais (*Engraulis japonica*) (Kishimura *et al*., 2005), sardine (*Sardina pilchardus*) (Bougatef *et al*., 2007), sardinelle (*Sardina aurita*) (Ben khaled *et al*., 2008) et le bogue (*Boops boops*) (Barkia *et al*., 2010). Les caractéristiques biochimiques des trypsines d'invertébrés marin sont similaires à celles des trypsines de poissons et des mammifères de point de vue masse moléculaire, spécificité, stabilité pH et la sensibilité vis-à-vis des inhibiteurs (Balti *et al*., 2009). Par contre, elles sont instables à pH acide et elles ne sont pas activées ou stabilisées par les ions calcium, contrairement aux trypsines pancréatiques des mammifères (Kishimura et Hayashi, 2002).

Généralement, les trypsines et les chymotrypsines-like possèdent une masse moléculaire de l'ordre 25 kDa (Cohen et Gertler, 1981). Castillo-Yañez *et al*. (2005) ont reporté que la trypsine purifiée à partir de caecum pylorique de la sardine du Pacifique possède une masse moléculaire de 25 kDa. Les masses moléculaires des trypsines de bonite à ventre rayé (*K. pelamis*), goberge d'Alaska (*T. chalcogramma*) et la morue atlantique (*G. morhua*) sont de l'ordre de 24 kDa (Klomklao *et al*., 2007b ; Kishimura *et al*., 2008 ; Simpson *et al*., 1989). Les pH optimum des trypsines d'origine marine varient entre 8,0-11,0, alors que leurs températures optimales sont comprises entre 35 et 70 ºC (Tableau 4). Les trypsines d'origine marine sont stables à pH alcalin ce qui les différencie de celles des mammifères qui sont plus stables dans des conditions acides (De-Vecchi et Coppes, 1996). Par contre, Simpson et Haard (1985) ont rapporté que la trypsine-like du limbert (*Tautogolabrus adspersus*) est plus stable entre pH 2,0-4,0, que les trypsines purifiées des mammifères. La stabilité thermique des trypsines marines varie selon l'espèce et les conditions opératoires (De-Vecchi et Coppes, 1996).

En comparaison avec les trypsines, peu de travaux ont été effectués sur les chymotrypsines de poissons (Haard, 1994). La purification et la caractérisation des chymotrypsines d'origine marine telles que celles du capelan (*Mallotus villosus L.*), du hareng (*Clupea harengus L.*) (Kalac, 1978), du requin épineux (*Squalus acanthias*) (Ramakrishan *et al*., 1987) et de la morue atlantique (*G. morhua*) (Asgeirsson et Bjarnason, 1991) ont été décrites dans la littérature. Dans le même contexte, Fong *et al*., (1998) ont purifiés deux chymotrypsines (I et II) à partir de l'hépatopancréas de la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idellus*) qui présentent une susceptibilité d'inhibition similaire par le SBTI et le PMSF. Ce

résultat est en accord avec celui décrit par Kristjansson et Nielson (1992) qui ont isolés deux chymotrypsines à partir de caecum pylorique de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Récemment, El Hadj Ali *et al*. (2010) ont purifiée une chymotrypsine hautement alcaline à partir des viscères de marbré qui possède un pH optimum de l'ordre de 11,0 et qui est extrêmement stable dans une gamme de pH allant de 6,0 à 12,0.

Chez les crustacés, l'hépatopancréas est un organe qui combine les fonctions du foie et du pancréas et secrète des protéases digestives (Tsai *et al*., 1991). Des protéases à sérine, telle que la trypsine, ont été étudiées chez plusieurs espèces de crustacés et de mollusques (Garcia-Carreno et Haard, 1993). Les chymotrypsines ont été également étudiées chez le pétoncle (*Pecten maximus*) (Le-chevalier *et al*., 1995), l'ormeau (*Haliotis kamtschatkana*) (Groppe et Morse, 1993) et la crevette blanche (*Penaeus vannamei*) (Hernandez-Cortes *et al*., 1997). Les protéases digestives des crustacés sont principalement responsables de l'autolyse rapide des protéines du muscle de ces organismes après la mort (Kawamura *et al*., 1984). Elles sont aussi, indirectement, responsables du phénomène de pigmentation mélanique des crevettes et du homard (Gopakumara, 1990 ; Wang *et al*., 1992 ; Zotos et Taylor, 1996). En outre, Tsai *et al*., (1986) ont rapporté que les chymotrypsines des crustacés ont des propriétés catalytiques uniques concernant l'hydrolyse de plusieurs substrats synthétiques. Cependant, la présence d'activité chymotrypsine au niveau des glandes digestives des décapodes est encore un problème à résoudre puisque certains chercheurs ont rapporté l'absence de la chymotrypsine chez les décapodes. Par contre, d'autres ont identifié une activité chymotrypsine au niveau de leurs systèmes digestifs (Garcia-Carreno *et al*., 1994). La température optimale, le pH optimum et les propriétés cinétiques des protéases intestinales de poissons et des invertébrés marins sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 :

Température optimale, pH optimum et masse moléculaire des protéases intestinales et hépatopancréatiques de poissons et d'invertébrés marins

Enzyme	Espèce	Masse moléculaire (kDa)	Température (°C)	pH	Substrat	Références
Trypsine	Sardinelle (*Sardinella aurita*)	28,8 28,8 28,8	55 50 55	9,0 9,0 9,0	BAPNA[a]	Ben khaled *et al*. (2011)
	Balaou (*Cololabis saira*)	24,0	60	8,5	TAME[b]	Klomklao *et al*. (2010)
	Bogue (*Boops boops*)	23,0	55	9,0	BAPNA	Barkia *et al*. (2010)
	Tilapia hybride (*O. niloticus* × *O.aureus*)	22,0	60	9,0	Caséine	Wang *et al*. (2010)
	Vivaneau (*Lutjanus synagris*)	28,4	45	9,0	BAPNA	Espósito *et al*. (2010)
	Saumon masou (*Oncorhynchus masou*)	24,0	60	8,5	TAME	Kanno *et al*. (2010)
	Empereur rouge (*Lutjanus vitta*)	23,0	60	8,5	BAPNA	Khantaphant et Benjakul (2010)
	Emissole lisse (*Mustelus mustelus*)	24,0	50	8,5	TAME	Bougatef *et al*. (2010b)
	Threadfin hakeling (*Laemonema longipes*)	24,0	50	8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2010)
	Pacu Noir (*Colossoma macropomum*)	23,9	50	9,0	z-FR-MCA[c]	Marcuschi *et al*. (2010)
	Seiche commune (*S. officinalis*)	24,0	70	8,0	BAPNA	Balti *et al*. (2009)
	Baliste (*Balistes capriscus*)	23,2	40	10,5	BAPNA	Jellouli *et al*. (2009)
	Grenadier (*Coryphaenoides pectoralis*)	24	45	8,5	TAME	Klomklao *et al*. (2009a)

Enzyme	Espèce	Masse moléculaire (kDa)	Température (°C)	pH	Substrat	Références
Trypsine	Bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*)	24,0 24,0	55 60	9,0 9,0	TAME	Klomklao *et al*. (2009b)
	Marbré (*Lithognathus mormyrus*)	27,5	50	10,0	BAPNA	El Hadj Ali *et al*. (2009)
	Morue du Pacifique (*Gadus macrocephalus*)	24,0	50	8,0	TAME	Fuchise *et al*. (2009)
	Morne boréale (*Eleginus gracilis*)	24,0	50	8,0	TAME	Fuchise *et al*. (2009)
	Poisson mandarin (*Siniperca chuatsi*)	21,0 21,5	35 40	8,5 8,5	Boc-Phe-Ser-Arg-MCA[d]	Lu *et al*. (2008)
	Goberge d'Alaska (*Theragra chalcogramma*)	24,0	50	8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2008)
	Mysis (*Neomysis japonica*)	32,6 32,6	45 45	8,5 8,5	BAPNA	Wu et Jiang (2008)
	Krill Pacifique (*Euphausia pacifica*)	33,0 33,0 33,2	40-50 40-50 40-50	9,0 9,0 9,0	BAPNA	Wu *et al*. (2008a,b)
	Sardinelle (*Sardinella aurita*)	24,0	55	8,0	BAEE[e]	Ben khaled *et al*. (2008)
	Bonite Atlantique (*Sarda sarda*)	29,0	65	9,0	BAPNA	Klomklao *et al*. (2007a)
	Carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idellus*)	30,7 26,4	38,5 40	8,0 8,5	BAEE	Liu *et al*. (2007)
	Sardine (*Sardina pilchardus*)	25,0	60	8,0	Caséine	Bougatef *et al*. (2007)
	Barbarin rouge (*Pseudupeneus maculatus*)	24,5	55	9,0	Azocaséine	Souza *et al*. (2007)
	Bonite à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*)	24,0 24,0 24,0	60 60 60	8,5 8,5 8,5	TAME	Klomklao *et al*. (2007b)

Enzyme	Espèce	Masse moléculaire (kDa)	Température (°C)	pH	Substrat	Références
Trypsine	Tassergal (*Pomatomus saltatrix*)	28,0	55	9,5	BAPNA	Klomklao *et al*. (2007c)
	Sébaste (*Sebastes schlegelii*)	24,0	60	8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2007)
	Chaboisseau (*Alcichthys alcicornis*)	24,0	50	8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2007)
	Thon albacore (*Thunnus albacores*)	24,0 24,0	55 65	8,5 8,5	TAME	Klomklao *et al*. (2006a)
	Thon mignon (*Thunnus tonggol*)	24,0	65	8,5	TAME	Klomklao *et al*. (2006b)
	Maquereau tacheté (*Scomber australasicus*)	24,0	60	8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2006)
	Beauclaire (*Priacanthus macracanthus*)	23,8	55	8,0-11,0	BAPNA	Hu et Benjakul (2006)
	Saumon royal (*Oncorhynchus tshawytscha*)	28,0	60	8,0	BAPNA	Kurtovic *et al*. (2006)
	Sériole du Japon (*Seriola quinqueradiata*)	24,0	60	8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2006b)
	Moride (*Physiculus japonicus*)	24,0	50	8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2006b)
	Anchois Japonais (*Engraulis japonica*)	24,0 24,0	60 60	8,0 8,0	TAME	Kishimura *et al*. (2005)
	Sardine du Pacifique (*Sardinops sagax caerulea*)	25,0	50	8,0	BAPNA	Castillo-Yanez *et al*. (2005)
	Etoile de mer (*Asterina Pectinifera*)	28,0	55	8,0	TAME	Kishimura et Hayashi (2002)
	Parone (*Parona signata*)	24,0	65	8,5	BAPNA	Pavlisko *et al*. (1997a)

Enzyme	Espèce	Masse moléculaire (kDa)	Température (°C)	pH	Substrat	Références
Chymotrypsine	Seiche commune (*Sepia officinalis*)	28,0	55	8,5	SAAPFpNA	Balti *et al*. (2011)
	Marbré (*Lithognathus mormyrus*)	27,0	55	11,0	SAAPFpNA	El Hadj-Ali *et al*. (2010)
	Bar Japonais (*Lateolabrax japonicus*)	27,0 27,5	45 45	8,0 8,0	Suc-(Leu)$_2$-Val-Tyr-MCA[f]	Jiang *et al*. (2010)
	Sardine du Pacifique (*Sardinops sagax caerulea*)	25,5 25,5	45 55	8,0 8,0	SAAPFpNA	Castillo-Yañez *et al*. (2009)
	Carassin (*Carassius auratus*)	28,0 27,0	40 50	7,5 8,0	Suc-(Leu)$_2$-Val-Tyr-MCA	Yang *et al*. (2009)
	Sardine du Pacifique (*Sardinops sagax caerulea*)	26,0	50	8,0	SAAPFpNA	Castillo-Yañez *et al*. (2006)
	Carpe chinoise (*Ctenopharyngodon idellus*)	28,0 27,0	- -	7,5 8,0	BTEE[g]	Fong *et al*. (1998)
	Crevette blanche (*Penaeus vannamei*)	33,2	-	8,0	SAAPFpNA	Hernandez-Cortes *et al*. (1997)
	Anchois (*Engraulis japonica*)	25,6 26,1	45 45	9,0 8,0	SAAPFpNA	Heu *et al*. (1995)
	Pétoncle (*Pecten maximus*)	32,0 32,0 32,0	50 55 55	8,5 8,5 8,0	SAAPFpNA	Le-chevalier *et al*. (1995)

[a] *N*-*α*-benzoyl-$_{DL}$-arginine-*p*-nitroanilide
[b] *N*-*α*-tosyl-$_{L}$-arginine methyl ester
[c] carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin
[d] t-Butyloxy-carbonyl-Phe-Ser-Arg-4-methyl-coumaryl-7-amide
[e] *N*-*α*-benzoyl-$_{L}$-arginine ethyl ester
[f] Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-4-methyl-coumaryl-7-amide
[g] *N*-*α* -benzoyl-tyrosine ethyl ester

IV.2.2. Collagénase

La collagénase (EC 3.4.24.7) est une protéase à sérine qui hydrolyse les molécules de topocollagène I, II et III (Zefirova *et al*., 1996). Elle a été isolée et caractérisée à partir de l'appareil digestif de plusieurs espèces de poissons et des invertébrés aquatiques tels que le crabe des neiges (Souchet et Laplante, 2011), le crabe violoniste (Eisen *et al*., 1973 ; Grant *et al*., 1981 ; Tsu *et al*., 1997), le crabe royal (Sakharov *et al*., 1993, 1994 ; Gerasimova et Kupina, 1996 ; Semenova *et al*., 2008), le crabe vert (Roy *et al*., 1996), la crevette d'eau douce (Baranowski *et al*., 1984 ; Aoki *et al*., 2003), l'écrevisse (Garcia-Carreno *et al*., 1994) et la morue atlantique (Kristjansson *et al*., 1995). Au contraire des collagénases microbiennes, qui sont des métalloprotéases, celles d'origine marine ne nécessitent pas de cofacteur métallique pour leur activité. Les collagénases d'origine marine possèdent des masses moléculaires comprises entre 24 et 36 kDa (Eisen *et al*., 1973 ; Roy *et al*., 1996). Elles sont actives dans une gamme de pH de 6,5 à 8,0 et inactives à des pH inférieurs à 6,0 (Haard et Simpson, 1994). Zefirova *et al*., (1996) ont rapporté que l'application de cette protéase est limitée vu sa thermosensibilité. En effet, il a été décrit que la collagénase perd son activité à une température de 40 °C (Shahidi et Kamil, 2001).

Plusieurs études ont montré que les collagénases sont responsables de l'autolyse de tissus du muscle des crustacés durant la période du stockage (Kawamura *et al*., 1984).

IV.2.3. Elastase

L'élastase (EC 3.4.21.11) est une protéase à sérine qui hydrolyse l'élastine, protéine fibrillaire du tissu conjonctif (Asgeirsson et Bjarnason, 1993). L'élastase est également capable d'hydrolyser plusieurs substrats protéiques autres que l'élastine native (Shotton, 1970). Elle a été isolée à partir de plusieurs espèces de poissons telles que la carpe (Cohen et Gertler, 1981), le poisson chat (Clark *et al*., 1985) et la morue atlantique (Gildberg et Overbo, 1990 ; Asgeirsson *et al*., 1998).

Asgeirsson et Bjarnason (1993) ont décrit le faible caractère hydrophobe des acides aminés de l'élastase de la morue comparée à l'élastase du porc et ont conclu la présence de faibles interactions au niveau du cœur hydrophobe de la protéine, qui contribue à sa meilleure adaptation à des basses températures.

V. Applications potentielles des protéases digestives d'origine marine

Les protéases constituent une classe importante d'enzymes à large potentiel d'applications industrielles. Le choix de la protéase est basé notamment sur le coût, la spécificité vis-à-vis du substrat, les optima de pH et de température et la sensibilité aux

inhibiteurs et aux activateurs (Simpson et Haard, 1984). Cependant, l'utilisation des sous-produits de la mer comme source potentielle d'enzymes industrielles est associée à quelques limitations à savoir la disponibilité saisonnière, la variation de l'activité enzymatique selon la nature de l'alimentation de poissons et l'état de fraîcheur de la matière première (Simpson *et al*., 1991). L'isolement et la purification d'enzymes telles que la désoxyribonucléase, la lipase, les carboxypeptidases A et B, la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase de la morue atlantique et leurs applications industrielles potentielles ont été décrites (Dixon, 1990).

L'utilisation des enzymes protéolytiques digestives fait partie de nombreux procédés traditionnels de traitement des produits de la mer qu'il s'agisse de poissons fermentés (Gildberg, 1993 ; Nielsen et Borresen, 1997), sauces de poissons (Gilberg *et al*., 1984 ; Chaveesuk *et al.*, 1993) et ensilages de poissons (Arason *et al*., 1990 ; Sikorski *et al*., 1995). Tous ces procédés dépendent à des degrés divers de l'activité d'enzymes protéolytiques associées soit aux viscères eux-mêmes (enzymes digestives) soit aux autres tissus (cathepsines).

Une propriété intéressante des enzymes d'origine marine est leur aptitude à travailler à basse température contrairement à la majorité des autres enzymes d'origine animale. Cette caractéristique présente de nombreux avantages tels qu'une demande réduite en énergie pour le traitement, une limitation des réactions secondaires comme en particulier le développement de l'amertume dans les extraits protéolysés.

Les enzymes digestives des organismes marins sont encore actuellement employées pour la fabrication d'autolysats ou d'arômes à destination de l'alimentation humaine (Shahidi et Kamil, 2001), comme agents de pelage et d'écaillage (Buga *et al*., 1993 ; Gildberg, 1994), dans la préparation des œufs de poissons (caviar) (Raa, 1990 ; Strom et Raa, 1991), pour la préparation de succédanés de présure (Han, 1993 ; Tavares *et al*., 1997) et pour la formulation de lessives aux enzymes lavant "sans bouillir" (El Hadj Ali *et al*., 2011). Ces procédés sont souvent en concurrence avec la biosynthèse bactérienne souvent plus économique.

VI. Procédés enzymatiques d'hydrolyse des protéines

Compte tenu de leur facilité de mise en œuvre, les procédés enzymatiques offrent des applications plus importantes que l'hydrolyse chimique (Petersen, 1981). L'utilisation des enzymes résulte d'un savoir empirique existant depuis l'antiquité (fermentation du vin et de la bière, lait, pain, papier).

VI.1. Principe de l'hydrolyse enzymatique

Une enzyme est une protéine catalysant une réaction biochimique. Comme tout catalyseur, elle est retrouvée intacte à la fin de la réaction. Une enzyme est spécifique d'une

réaction, c'est-à dire qu'elle catalyse toujours la même transformation sur les mêmes corps chimiques. Lors d'une hydrolyse enzymatique, les protéases vont briser les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi au moins deux peptides. L'hydrolyse des liaisons peptidiques va donc générer la libération des protons H^+ (Figure 5). Cette libération de protons H^+ va induire une acidification du milieu. Ce principe est valable pour les hydrolyses se déroulant à pH supérieur à 6,5, pour que le degré de dissociation des ions $R\text{-}N^+H_3$ soit suffisant (Ravallec-Plé, 2000). Lorsque le pH est inférieur, la réaction s'inverse et ce seront des ions HO^- qui seront libérés.

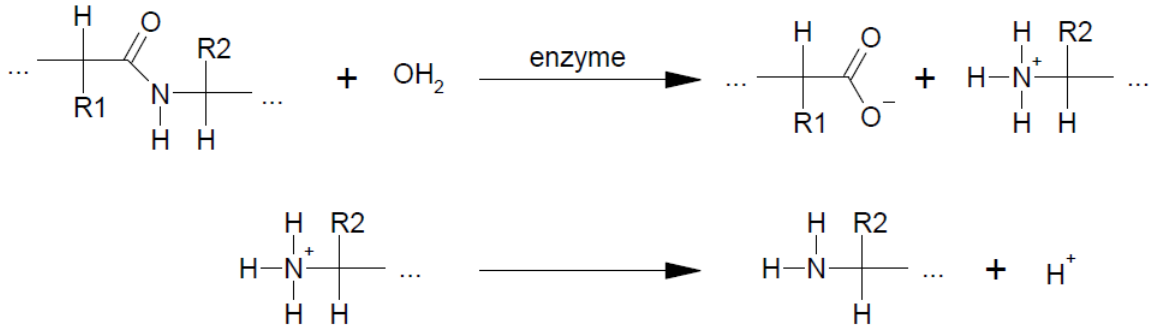
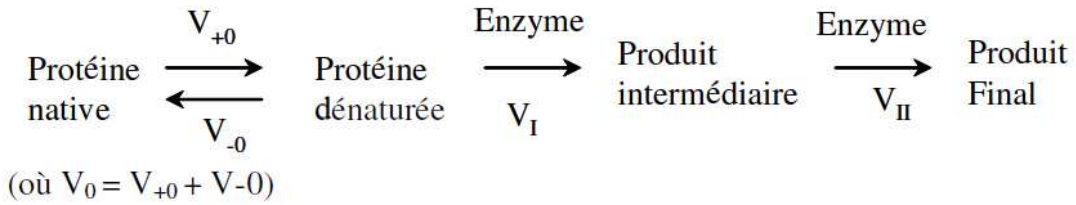


Figure 5 :
Schéma réactionnel de la libération de protons H^+ lors de l'hydrolyse enzymatique.

VI.2. Mécanismes et cinétiques de l'hydrolyse enzymatique

La connaissance et la maîtrise des mécanismes enzymatiques sont devenues indispensables parmi les techniques modernes employées en industrie pour la production d'aliments divers destinés à la consommation humaine. La dégradation enzymatique des protéines aboutit à la production d'hydrolysats protéiques valorisables dans de nombreux domaines tels que la pharmacie, l'alimentation humaine et la cosmétique.

Les mécanismes impliquent souvent une réaction catalytique de type interaction enzyme-substrat se résumant au modèle de Linderström-Lang repris par Adler-Nissen (1976, 1986) dans lequel l'hydrolyse initiale de substrat peut conduire à deux types de réactions en fonction de la vitesse de dénaturation des protéines :



L'étape de dénaturation initiale est déterminante dans la réaction d'hydrolyse.

- ✓ Si $V_0 << V_I$, la première réaction est limitante et l'hydrolyse aura lieu selon la cinétique imposée par V_0. Le mélange réactionnel sera composé de protéines natives et de produits terminaux. Cette réaction est du type « one by one » selon la terminologie de Linderström- Lang.
- ✓ Si $V_0 >> V_I$, la protéine native est rapidement convertie en produits intermédiaires, eux-mêmes dégradés en produits terminaux. Cette réaction est dite « zipper ».

Le mécanisme des réactions enzymatiques a intéressé de nombreux auteurs sur divers substrats, notamment les protéines végétales (Adler-Nissen *et al.*, 1982 ; Moreno et Cuadrado, 1993 ; Nouri *et al.*, 1997), les protéines de poisson et animales (Langmyhr, 1981; Vieira *et al.*, 1995 ; Guérard *et al.*, 2001) et la caséine (Krause et Seiler, 1992). Mohr (1980) a émis l'hypothèse que dans le cas d'une hydrolyse d'un substrat insoluble, les réactions se déroulent en deux étapes : l'enzyme s'associe à la liaison peptidique du substrat préalablement à la réaction d'hydrolyse qui libère un mélange de peptides solubles et d'acides aminés.

La cinétique généralement constatée est une hydrolyse rapide après ajout de l'enzyme, la vitesse de la réaction diminue après avoir atteint une vitesse maximale. Ainsi Moreno et Cuadrado (1993), étudiant l'hydrolyse des protéines de pois, ont suggéré que l'allure de la courbe d'hydrolyse peut être attribuée aux phénomènes suivants :

- ✓ décroissance de la concentration en liaisons peptidiques disponibles due à une vitesse initiale de dégradation élevée
- ✓ décroissance de l'activité de l'enzyme due à la température
- ✓ inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction.

VI.3. Les paramètres de contrôle de l'hydrolyse enzymatique

La réaction enzymatique est influencée par des paramètres qui permettent de contrôler la vitesse et le degré d'hydrolyse (DH) : la concentration du substrat, le rapport enzyme/substrat (E/S), le pH et la température. Le contrôle du degré d'hydrolyse peut être obtenu en imposant judicieusement ces paramètres ainsi que la durée de la réaction.

VI.3.1. 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 al*. (1971) ont montré que le degré de solubilisation du concentrat lié à l'hydrolyse des protéines de poisson diminuait lorsqu'on augmentait la concentration du concentrat pour une concentration fixe de l'enzyme (la pronase). Cela serait dû à une inhibition de l'enzyme par le produit et à un faible transfert

du substrat à l'enzyme. En revanche une augmentation du rapport pronase/concentrat de protéine de poisson 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 la pepsine.

Des études menées par Quaglia et Orban (1987a) portant sur la valorisation des protéines de sardine par hydrolyse enzymatique montrent que le rapport enzyme/substrat influence le degré d'hydrolyse en fonction de l'enzyme (l'Alcalase 0,6 L, la Neutrase 0,5 L et la Papaïne 60 unités/mg) ainsi que la taille des peptides. Avec des rapports enzyme/substrat (E/S) variant entre 0,1% et 4% (g/100 g), ils obtiennent pour l'Alcalase 0,6 L des DH croissant entre 5% et 30% ; avec la Neutrase 0,5 L, des DH entre 4% et 20% et avec la Papaïne des DH entre 7% et 24%. Guérard *et al*. (2001) ont montré que le DH augmente avec la concentration de l'enzyme, et qu'une hydrolyse prolongée au-delà de 5,5 h n'a plus d'effet significatif sur le DH. Une augmentation notable du DH est observée à des concentrations d'enzymes comprises entre 0 et 28,3 unités Anson/kg. Au-delà de cette concentration, une faible augmentation du DH est observée.

VI.3.2. Le pH et la température

Le pH est un facteur très important qui doit être maîtrisé, car l'activité enzymatique est entièrement liée à la nature des groupements présents au niveau du site actif de l'enzyme, à leur état d'ionisation ainsi qu'à celui du substrat. Marquez et Fernandez (1998) ont montré que le pH joue un rôle considérable dans le contrôle d'un procédé l'hydrolyse des protéines végétales. De manière générale, chaque enzyme possède un pH optimal autorisant un domaine de variation très restreint, de l'ordre de 0,5 à 1 unité de pH.

Comme pour le pH, chaque enzyme possède une température optimale de fonctionnement qui dépend de plusieurs facteurs : la nature du substrat protéique, le pH et le rapport enzyme/substrat. Karamac *et al*. (2002) ont montré une influence de la température sur le degré d'hydrolyse obtenu lors de l'hydrolyse d'isolats de protéines de pois par la trypsine. Adler-Nissen (1982) a montré que le pH et la température ont une influence sur le degré d'hydrolyse. En effet, la variation de pH provoque un changement de la distribution des charges et de la conformation aussi bien au niveau du substrat que de l'enzyme. Quant à la température, il est connu que l'évolution des réactions chimiques suit la loi d'Arrhenius.

Dans des expériences d'hydrolyse du squelette central du saumon par la Protamex, Liaset *et al*. (2003) ont observé une dépendance mutuelle de ces facteurs. Pour Langmyhr (1981), les molécules d'enzymes se fixent sur les liaisons peptidiques selon un processus rapide dans les conditions optimales de température et de pH.

VI.3.3. Le degré d'hydrolyse (DH)

Le DH pour une protéine donnée est le principal facteur qui influe sur les caractéristiques finales d'un hydrolysat protéique. En effet, les produits finaux d'une réaction d'hydrolyse sont responsables de la composition physico-chimique et des propriétés fonctionnelles de l'hydrolysat (Kristinsson et Rasco, 2000a,b ; Jamdar *et al.*, 2010).

Le degré d'hydrolyse des liaisons peptidiques peut être mesuré par différentes techniques basées sur trois principes différents : le dosage de la quantité d'azote soluble libéré au cours de la protéolyse, la mesure de la libération des groupements α-aminés par dosage spectrophotométrique et le titrage des protons libérés (technique du pH-stat).

L'avancement de l'hydrolyse est généralement caractérisé par la mesure du nombre d'équivalents de liaisons peptidiques coupées par kg de protéines : h (Adler-Nissen, 1986). Le degré d'hydrolyse est ensuite défini comme étant le rapport du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre de liaisons peptidiques initialement présentes dans la protéine.

VI.4. Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques

La fonctionnalité des hydrolysats est la raison de leur succès comme ingrédients dans les aliments. L'utilisation des enzymes pour la production d'hydrolysats permet l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéolysats qui peuvent être définies comme l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques que peuvent promouvoir les systèmes alimentaires au cours de leur fabrication, leur conservation et leur consommation.

Les propriétés fonctionnelles des protéines et des hydrolysats protéiques dépendent de nombreuses caractéristiques physico-chimiques (taille et structure des protéines et peptides, composition en acides aminés, distribution des charges, ratio hydrophobie/hydrophilie, flexibilité et rigidité des molécules…).

VI.4.1. La solubilité

La solubilité est considérée comme l'une des plus importantes propriétés fonctionnelles des protéines et de leurs hydrolysats. D'autres propriétés fonctionnelles comme l'aptitude à l'émulsification et les propriétés moussantes sont affectées par la solubilité, car ces propriétés dépendront de la capacité de ces hydrolysats à se solubiliser (Voutsinas *et al.*, 1983).

L'hydrophobicité et les interactions ioniques sont les facteurs majeurs de la solubilité des protéines. Les liaisons hydrophobes améliorent les interactions protéine-protéine et réduisent par conséquent la solubilité. Par contre, les liaisons ioniques favorisent les interactions protéine-eau, et permettent ainsi l'augmentation de la solubilité. Pour le cas des protéines et des hydrolysats protéiques de poissons, la solubilité 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).

Certaines protéines et spécialement celles de poissons intactes (non hydrolysées) ont une solubilité réduite dans une large gamme de pH. Ainsi, pour remédier à ce problème l'hydrolyse enzymatique s'avère une alternative forte intéressante pour augmenter la solubilité de ces protéines (Quaglia et Orban, 1987a).

Pour les hydrolysats de lactosérum et de caséine, Chobert *et al*. (1988) 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 (Spinelli et Dassou, 1982 ; Venugopal et Shahidi, 1994). Linder *et al*. (1996) ont obtenu une amélioration de la solubilité des hydrolysats de protéines de muscle de veau en relation avec le DH. Un DH élevé permet une bonne solubilité entre pH 7,0 et 9,0. Drago et Gonzalez (2001) ont observé une augmentation de la solubilité du gluten du blé pour des DH élevés. Cette amélioration est attribuée à une production de peptides de petite taille et plus hydrophiles. Le même phénomène est observé par Hoyle et Merritt (1994), lesquels ont montré que la solubilité des hydrolysats de hareng est globalement améliorée. Ils l'attribuent à la formation de petits peptides plus hydrophiles et de polypeptides plus solvatés. Ils constatent aussi que les échantillons prétraités à l'éthanol présentent un indice de solubilité plus élevé (97 à 99%), qui serait dû à l'élimination des lipides des hydrolysats.

Achouri *et al*. (1998) ont observé que la solubilité des hydrolysats de protéines de soja à tous les pH (1,0 à 12,0) est bien meilleure que celle d'un isolat. La solubilité de l'hydrolysat est supérieure à 60% au pH_i, alors que celle de l'isolat n'est que de 5% à ce même pH_i. L'hydrolyse des protéines de muscles du saumon par différentes protéases alcalines a été réalisée par Kristinsson et Rasco (2000b). Ils ont constaté une solubilité supérieure à 90% aux différents degrés d'hydrolyse (5, 10 et 15%). La valeur maximale a été obtenue avec l'Alcalase à un DH de 5% et à pH 7,0. Quaglia et Orban (1987a) ont étudié la solubilité des hydrolysats de protéines de sardine obtenus avec l'Alcalase : quelle que soit le DH (5 à 20%), la solubilité est supérieure à 90% pour des pH de 5,0 à 9,0. La solubilité des hydrolysats dépend de la nature de l'enzyme et de sa spécificité vis à vis des liaisons peptidiques. Shahidi *et al*. (1995) observent que la solubilité des hydrolysats de capelan est bonne et varie selon le type d'enzyme. L'hydrolysat obtenu avec l'Alcalase possède une meilleure solubilité que celui obtenu avec la Neutrase, quel que soit le pH.

VI.4.2. La capacité d'hydratation

La capacité de rétention d'eau est par définition la capacité de piéger les molécules d'eau dans un réseau protéique et de les retenir même sous une force gravitationnelle importante. 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. Cependant, il est difficile d'avoir un ingrédient ou un additif qui contribue à l'amélioration d'une seule propriété fonctionnelle. Egalement, si un élément possède une bonne capacité de rétention d'eau dans un système, cette capacité peut s'accentuer ou bien diminuer suivant les composantes qui l'entourent (Buinov *et al.*, 1977). Cette propriété dépend essentiellement des interactions protéines-eau.

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la capacité d'hydratation, dont celle de Miller et Groninger (1976) 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 et Rasco (2000b) ont utilisé une autre technique pour mesurer la capacité d'hydratation d'un hydrolysat de protéines de saumon. Le principe consiste à mesurer la perte d'eau après congélation (48 jours) et décongélation (2 h). Dans cette étude, ils ont observé qu'il n'y pas de corrélation entre le DH et la perte d'eau. En revanche, l'hydrolysat obtenu avec l'Alcalase® possède une meilleure capacité d'hydratation que ceux issus de l'utilisation de la Corolase 7089, de la Corolase PN-L et de la Flavourzyme, alors que ces enzymes produisent beaucoup plus de petits peptides que l'Alcalase®. Kristinsson et Rasco (2000b) expliquent cela par la différence de spécificité des enzymes et la nature des peptides obtenus.

Diniz et Martin (1997) ont observé une diminution de la capacité d'hydratation des hydrolysats de protéines de requin obtenu avec l'Alcalase® par rapport aux protéines natives. Cela serait probablement dû selon eux à l'implication des chaînes latérales hydrophiles polaires des protéines natives du requin, plus nombreuses et qui fixent beaucoup plus de molécules d'eau que les hydrolysats protéiques.

De plus, les hydrolysats protéiques de poissons possèdent une excellente capacité de rétention d'eau, et pourraient donc être utilisés dans des formulations alimentaires. Onodenalore et Shahidi (1995) ont montré que l'ajout d'hydrolysats protéiques de requin à des concentrations de 0,5 et 3% permet d'augmenter le rendement en cuisson de la viande de porc de 2,4 à 9,3%.

VI.4.3. La capacité d'absorption d'huile

Cette propriété met en jeu les interactions hydrophobes entre les molécules de lipides et les protéines. Elle exprime 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.

Pour les hydrolysats protéiques de poissons, Haque (1993) a montré une relation entre l'enzyme utilisée lors de la réaction d'hydrolyse et la capacité de rétention d'huile. Ce résultat a été confirmé par la suite par Kristinsson (1998) qui a montré que la capacité de rétention d'huile de plusieurs hydrolysats de muscle de saumon change avec l'enzyme utilisée. La capacité de rétention d'huile a une influence non seulement sur le goût du produit fini mais encore sur ses propriétés physico-chimiques. Ces caractéristiques sont requises essentiellement au niveau des industries de charcuterie.

La capacité d'absorption d'huile des hydrolysats de protéines de saumon obtenus par différentes enzymes à des DH variant de 5 à 15%, a été étudiée par Kristinsson et Rasco (2000b). Ces hydrolysats possèdent une capacité d'absorption d'huile supérieure à celle obtenue avec l'albumine d'œuf et des concentrats de soja, quel que soit le DH. La capacité d'adsorption est meilleure à DH 5% (5,98 à 7,07 ml huile/g de protéine) qu'à DH 10% (3,22 à 5,12 ml huile/g de protéines) et à DH 15% (2,86 à 3,86 ml huile/g de protéine). Pour Periago *et al*. (1998), l'amélioration de la capacité d'absorption d'huile des protéines de farine de pois traitées par des enzymes pourrait être due à une disponibilité des acides aminés hydrophobes dans les protéolysats.

VI.4.4. Les propriétés émulsifiantes

Une émulsion est une dispersion d'une phase liquide sous forme de gouttelettes (0,1 à 1 µm) dans une autre phase liquide non miscible dite dispersante. Si l'on considère un mélange huile/eau, on désigne une émulsion « huile dans eau » ou une émulsion « eau dans huile » en fonction de la nature de la phase dispersée. La formation d'une émulsion entraîne un accroissement de l'aire interfaçiale et s'accompagne d'une augmentation de l'énergie libre. Le rôle de l'émulsifiant est d'abaisser la tension interfaçiale en s'adsorbant à l'interface.

Les hydrolysats protéiques sont ainsi d'excellents tensio-actifs, car ils permettent de diminuer la tension interfaçiale entre les phases aqueuse et lipidique. La caractérisation des propriétés émulsifiantes peut se faire par la mesure de l'activité émulsifiante, la capacité émulsifiante et la stabilité émulsifiante.

Les propriétés émulsifiantes des hydrolysats protéiques de poissons sont directement liées à leurs propriétés de surface. En effet, les protéines des peptones de poissons peuvent

réduire les tensions interfaçiales entre les groupements hydrophiles et hydrophobes des différents composés d'un aliment.

Les protéines adsorbent à leur surface les gouttelettes d'huile nouvellement formées au cours de l'homogénéisation et forment un film protecteur qui empêche la coalescence de ces gouttelettes (Demetriades *et al*., 1997). 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. Wilding *et al.* (1984) ont montré que les hydrolysats protéiques de poissons 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 différences essentielles qui se trouvent au niveau des hydrolysats protéiques de poissons et qui les distinguent des autres protéines sont :

- Leur habilité de regagner rapidement une interface ;
- Leur habilité à se réorienter rapidement en cas de changement de forces hydrophobes pour regagner une autre interface ;
- Leur habilité, une fois à l'interface, d'interagir avec les molécules proches et de former un film cohésif et viscoélastique qui peut supporter des traitements mécaniques et/ou thermiques.

Les propriétés émulsifiantes des hydrolysats protéiques sont améliorées par un contrôle précis de la réaction d'hydrolyse. Une hydrolyse poussée se manifeste par une perte de propriétés émulsifiantes (Mahmoud, 1994). 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 interfaçiale puisqu'ils ne peuvent pas se réorienter. La même observation chez les protéines de haute masse moléculaire (Miller et Groninger, 1976) a été constatée. La solubilité semble jouer un rôle important dans l'émulsification puisqu'une migration rapide et une adsorption à la surface sont nécessaires pour avoir une bonne émulsion (Chobert *et al*., 1988). Un hydrolysat de caséine avec la pancréatine montre une croissance linéaire de son pouvoir émulsifiant avec l'augmentation du pourcentage du degré d'hydrolyse. Cependant, à un DH très élevé (67%), une chute drastique de cette propriété a été observée (Mahmoud *et al.*, 1992).

Les enzymes protéolytiques utilisées lors de l'hydrolyse ont également un rôle important sur les propriétés émulsifiantes. En 1974, Kuehler et Stine ont pu constater que les protéines de petit lait hydrolysées avec la Prolase libèrent des peptides de haute masse moléculaire ayant un pouvoir émulsifiant important. Par contre, une hydrolyse effectuée avec la Pronase qui est moins spécifique que la Prolase, produit des peptides de petite taille et donne des

hydrolysats ayant des propriétés émulsifiants médiocres.

VI.4.5. 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 et interfaçiale de la phase continue. Les protéines sont 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.

Selon Fidantsi et Doxastakis (2001), l'adsorption rapide des protéines à la surface air-eau lors du moussage et le rapide réarrangement à l'interface sont les critères essentiels pour l'obtention de bonnes propriétés moussantes. Ces dernières années, quelques travaux ont été réalisés sur les protéines de poissons. Liceaga et Li-chan (1999) ont montré que les hydrolysats de protéines de hareng ont des propriétés moussantes supérieures à celles des protéines natives. Shahidi *et al.* (1995), Onodenalore et Shahidi (1995) ont respectivement étudié les hydrolysats de protéines de capelan et de requin. 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.

VI.4.6. La caractérisation des hydrolysats par la taille des peptides

Avec l'avènement des techniques d'hydrolyse, la chromatographie liquide d'exclusion de taille et l'électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), sont souvent utilisées pour caractériser la taille des peptides résultants. En effet, la plupart des propriétés fonctionnelles sont liées aux caractéristiques physicochimiques et à la taille des peptides (Mohr, 1980).

Avec ces techniques Chobert *et al.* (1988) ont établi un lien entre la taille des peptides d'hydrolysats du lait et des caséines et les propriétés fonctionnelles comme la solubilité et les propriétés émulsifiantes. Plus les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique sont de petite taille, plus ils sont solubles. Les techniques chromatographiques et membranaires peuvent être des méthodes adéquates pour isoler les peptides amers (Lee et Warthesen, 1996 ; Maehashi *et al.*, 1999).

VI.5. Activités biologiques des hydrolysats protéiques

Lorsqu'elles subissent une hydrolyse enzymatique avec des protéases, les protéines sont alors clivées en peptides. L'action des enzymes sur la formation des peptides est

prépondérante puisqu'elle va jouer sur la taille et la fonction des peptides générés lors de l'hydrolyse. En effet, les modifications apportées sont souvent requises pour la production de composés possédant des propriétés plus désirables qui pourraient par exemple entrer dans la formulation de produits alimentaires (Quaglia et Orban, 1987b).

D'une manière générale, les peptides biologiquement actifs (ou peptides fonctionnels ou bioactifs) sont de petite taille, ils comportent entre 3 et 10 résidus acides aminés dans leur structure (Tomé, 1998). Ces petits peptides sont aussi appelés oligopeptides (González de Llano *et al.*, 1996). Cependant, il existe des exceptions concernant la taille des peptides bioactifs, par exemple :

- ✓ le caséinomacropeptide (un peptide issu de la κ-caséine induisant la production de cholécystokinine, hormone liée à l'état de satiété) est composé de 64 acides aminés (Tomé, 1998),
- ✓ les peptides cationiques antibactériens qui ont une taille variant entre 11 et 50 résidus acides aminés (Powers et Hancock, 2003).
- ✓ certaines hormones peptidiques telles que l'insuline (51 acides aminés) et l'hormone adrénocorticotrope (39 acides aminés).

Ces études ont montré que les peptides bioactifs étaient partiellement résistants à l'hydrolyse et capables d'exercer un effet soit localement dans le tube digestif, soit à distance dans l'organisme, après diffusion dans l'organisme *via* la circulation sanguine (Tomé, 1998). Une attention toute particulière a été portée sur les di- et tripeptides car, du fait de leur petite taille, ils seraient plus facilement résorbés au niveau du tube digestif (Dziuba *et al.*, 1999).

De nombreuses voies de valorisation des peptides issus des hydrolyses de co-produits marins sont citées dans la littérature. De nombreux articles portent sur les activités biologiques des peptides issus d'hydrolyses protéolytiques. Les peptides marins ne font pas exception. Une revue récente sur les composés marins bioactifs liste les différentes activités des peptides. Ainsi, ces derniers peuvent avoir des effets antihypertenseurs, anti-thrombotiques, immunomodulateurs, antioxydants, anticoagulants…(Kim et Mendis, 2006). Les peptides marins interviennent dans le traitement de l'ostéoporose, de l'arthrite, des maladies cardiovasculaires, du diabète, de l'obésité ou encore du cancer (Gildberg *et al.*, 2002 ; Kim et Mendis, 2006). Le tableau 5 précise quelques exemples de ces activités.

Tableau 5 :
Principales activités biologiques des peptides d'origine marine

Espèce	Activité	Références
merlu	réparation du tissu épithélial	Fitzgerald *et al.* (2005)
sole	anticoagulante	Rajapakse *et al.* (2005a)
sole	antioxydante	Jun *et al.* (2004)
sardine	hypotensive	Bordenave *et al.* (2002) Kajimoto *et al.* (2005)
sardine	comportement hormonal	Ravallec-Plé *et al.* (2001) Rousseau *et al.* (2001)
morue	immunomodulatrice antiproliférative	Gildberg *et al.* (1996) Picot *et al.* (2006)
maquereau	oxydante	Wu *et al.* (2003)
lieu	oxydante	Je *et al.* (2005)
merlu	immunomodulatrice	Duarte *et al.* (2006)
carrelet merlan saumon	antiproliférative antiproliférative antiproliférative	Picot *et al.* (2006) Picot *et al.* (2006) Picot *et al.* (2006)

VII. Activité antihypertensive : une voie de valorisation nutraceutique

VII.1. Hypertension : définition et incidence

L'hypertension se défini comme une pression diastolique égale ou supérieure à 90 mmHg et/ou, par une élévation de la pression systolique au-delà de 140 mmHg. Dans le monde, cette maladie affecte environ un quart de la population adulte, soit plus de 50 millions d'individus (Miller *et al*., 2000). L'hypertension est plus fréquente chez les hommes et les femmes d'âge moyen, et la race noire serait quatre fois plus affectée par cette maladie que la race blanche.

L'hypertension est une maladie silencieuse dont les symptômes sont souvent inexistants. Toutefois, ses conséquences sont majeures puisqu'elle peut entraîner des défaillances cardiaques, des infarctus du myocarde, des dommages rénaux et des accidents cérébraux vasculaires. La cause exacte de l'hypertension est encore inconnue, mais il semble que les facteurs génétiques soient fortement impliqués, de même que d'autres facteurs comme le stress, une alimentation riche en sodium, l'obésité et le tabagisme (Mycek *et al*., 1992).

VII.2. Contrôle physiologique de la pression sanguine

Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) est probablement le système endocrine le plus important dans le contrôle de la pression sanguine (Beevers *et al.*, 2001). Il est considéré comme un important régulateur hormonal de l'homéostasie cardiovasculaire. Le SRAA n'est pas seulement un système endocrine, il est aussi présent dans tous les tissus

périphériques, le cœur et les poumons inclus (Dostal *et al*., 1994). Les enzymes clés du SRAA sont la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (Figure 6).

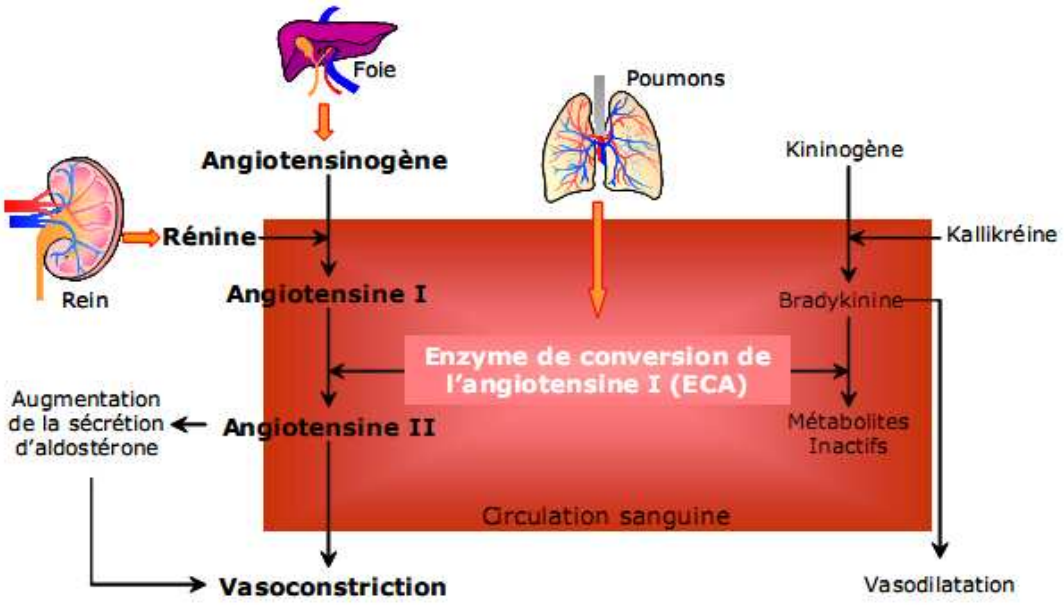


Figure 6 :
Représentation schématique du Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)

La rénine permet la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I, qui sera ensuite clivée par l'ECA en angiotensine II, un octapeptide fortement vasoconstricteur. L'angiotensine II stimule aussi la libération d'aldostérone et favorise la rétention sodée. Le rôle principal du SRAA semble être la régulation à long terme de la pression artérielle par modification des résistances périphériques et/ou de la balance sel/eau (Shapiro, 1987). Les effets de son activation peuvent être locaux ou systémiques, ce qui suggère que la pression sanguine peut être régulée localement (Beevers *et al*., 2001).

Ce rôle clé de l'ECA dans le SRAA combiné au fait qu'elle soit ubiquitaire, justifie qu'elle ait été choisie comme cible privilégiée des agents thérapeutiques à même d'intervenir contre l'hypertension (Maubois *et al*., 1991). En effet, le captopril, premier inhibiteur synthétique de l'ECA commercialisé, réduit la tension artérielle par diminution des résistances vasculaires systémiques sans affecter le rythme cardiaque. De plus, les inhibiteurs de l'ECA empêchent l'inactivation de la bradykinine (peptide vasodilatateur), contribuant ainsi à augmenter l'effet antihypertenseur. Cependant, l'accumulation de bradykinine au niveau des poumons présente des effets secondaires comme une toux sèche (Sesoko et Kaneko, 1985). De manière générale, les inhibiteurs de l'ECA sont responsables de nombreux effets secondaires tels que la perte de goût, des éruptions cutanées, ou encore l'apparition d'œdèmes angioneurotiques (Antonios et MacGregor 1995). A l'heure actuelle, les nouveaux médicaments de synthèse (e.g. losartan) ciblent et bloquent les récepteurs AT1 de

l'angiotensine II et n'ont donc pas d'effet sur le métabolisme de la bradykinine et n'apportent pas les désagréments liés à l'absorption des inhibiteurs de l'ECA (Jackson et Garrison 1996).

VII.3. Activité antihypertensive par inhibition de l'ECA

Les premiers inhibiteurs de l'ECA découverts sont des peptides naturels issus du venin de *Bothrops jararaca* isolés par Ferreira *et al*. en 1970 puis par Ondetti *et al*. en 1971. Leur séquençage a permis d'identifier une proline en position C-terminale. La modification de la L-proline par chimie combinatoire a rendu possible le développement d'inhibiteurs chimiques compétitifs très puissants. Un nombre important d'inhibiteurs de l'ECA issus de l'industrie pharmaceutique sont aujourd'hui utilisés comme médicament antihypertenseur : captopril (lopril®, le premier mis sur le marché, CI_{50} (concentration de produit capable d'inhiber une enzyme à 50%) = 0,022 µM), enalapril (Renitec®), périndopril (Coversyl®), quinapril (Acuitel®), lisinopril (Zestril®) etc… Ces produits permettent un traitement efficace de l'hypertension artérielle. Cependant, comme tout médicament, ces molécules provoquent des effets indésirables.

Des peptides inhibiteurs de l'ECA extraits d'hydrolysats de protéines animales et végétales font actuellement l'objet d'une étude dans le cadre d'une utilisation nutraceutique au sein de fraction ou de l'hydrolysat total. Ces peptides composés de 2 à 13 acides aminés possèdent une CI_{50} comprise entre 0,27 µM à 213 µM et ne présentent aucune structure commune. Leur mode d'action permet de les classer en trois groupes :

- Les **inhibiteurs vrais** qui inhibent l'ECA en bloquant son site actif. La valeur de la CI_{50} n'est pas affectée par la pré-incubation des peptides avec l'enzyme.
- Les **peptides substrats** qui sont dégradés par l'ECA en peptides inactifs. Leur pré-incubation avec l'ECA est associée à une élévation de la CI_{50}.
- Les **inhibiteurs de type pro-drogue**. En présence de l'ECA, ces peptides, substrats de l'enzyme, sont hydrolysés en peptides inhibiteurs vrais. Leur pré-incubation avec l'enzyme est alors associée à une diminution de la CI_{50}.

L'effet antihypertensif de certains peptides purifiés ou en mélange, caractérisé *in vivo* par une diminution de la pression artérielle systolique, a été démontré sur des rats spontanément hypertendus (SHR).

VII.4. Activité antihypertensive par fixation sur des récepteurs opioïdes

L'α-lactorphine, tétrapeptide issu de l'hydrolyse de l'α-lactalbumine, a tout d'abord été caractérisé comme peptide opioïde. En effet, ce peptide se lie à des récepteurs opioïdes et inhibe *in vitro* les contractions de l'iléon de cochon d'inde. Nurminen *et al*. (2000) ont récemment démontré que l'α-lactorphine, administrée de façon sous-cutanée (0,01-1 mg/kg)

diminue la pression artérielle des SHR mais également des rats Wistar-Kyoto normalement tendus (WKY). Les acides aminés Tyrosine, Glycine, Leucine et Phénylalanine, constituant de l'α-lactorphine, administrés seuls n'exercent aucun effet antihypertensif. L'activité de ce peptide n'est donc pas due à son hydrolyse. D'autre part, l'effet antihypertensif de l'α-lactorphine est observé jusqu'à inhibition du récepteur par un antagoniste : la naloxone. A l'inverse, la stimulation des récepteurs opioïdes périphériques vasculaires par un agoniste tel que la morphine ou par des peptides opioïdes endogènes provoque la libération de monoxyde d'azote (NO) et, de ce fait, cause la vasodilatation (Ijäs *et al*., 2004). L'activité antihypertensive est donc engendrée par fixation de l'α-lactorphine sur les récepteurs opioïdes. Cette activité vasodilatatrice a également été constatée avec la β-lactorphine, tétrapeptide opioïde issu de la β-lactoglobuline (Sipola *et al*., 2002).

VII.5. Les peptides antihypertenseurs issus de protéines agroalimentaires

Les peptides peuvent être présents naturellement dans les aliments, produits au cours du processus d'élaboration ou formés *in vivo* par hydrolyse enzymatique *via* les enzymes digestives retrouvées dans le tractus gastro-intestinal. Leur principale fonction *in vivo* est l'apport de l'azote et des acides aminés essentiels à la synthèse des protéines retrouvées dans les tissus et les organes. Depuis la découverte des peptides endogènes ayant des propriétés antimicrobienne, immunomodulante, antithrombotique, antihypertensive et/ou analgésique, les études n'ont cessé d'évaluer les propriétés biologiques potentielles des peptides issus des aliments. La plupart des composés biologiquement actifs identifiés jusqu'à maintenant, sont des petits peptides (ou oligopeptides). Leur résorption au niveau de l'appareil digestif est dépendante de leur taille ainsi que de leurs propriétés hydrophiles/hydrophobes. Leur effet peut être local ou systémique, impliquant dans ce dernier cas leur résorption au niveau gastro-intestinal et leur distribution vers un organe ou tissu *via* la circulation sanguine.

En 1979, Oshima *et al.* étaient les premiers à décrire le potentiel thérapeutique que pouvait présenter la gélatine (aliment disposant d'une faible valeur nutritionnelle) dans le traitement de l'hypertension une fois que celle-ci a reçu un traitement approprié. Ces premiers résultats ont ouvert la voie à d'autres recherches en science des aliments. Certains programmes scientifiques, dont le but était de produire des peptides pharmacologiquement actifs, ont ainsi vu le jour. Ces projets se sont concrétisés par la synthèse d'analogues de peptides endogènes et/ou le retraitement des sous-produits obtenus au cours du processus d'élaboration d'aliments. En plus de l'effet bénéfique que pouvait offrir cette approche, elle permettait aussi de recycler certains déchets alimentaires en limitant la

pollution/contamination par rejet et en les convertissant en suppléments diététiques (Fujii *et al*., 1993 ; Matsumura *et al*., 1993a,b ; Hyun et Shin, 2000 ; Hernandez-Ledesma *et al*., 2002).

Depuis ces 20 dernières années, de nombreux peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, présentant des propriétés antihypertensives *in vivo*, ont été identifiés dans de nombreux aliments.

VII.5.1. Peptides issus de produits marins

Des peptides inhibiteurs de l'ECA ont été produits *via* différentes digestions enzymatiques de protéines issues des muscles de thon (Kohama *et al*., 1991), de sardine (Suetsuna et Osajima 1989), de la bonite séchée (Yokoyama *et al*., 1992), de thon séché/salé (Astawan *et al*., 1995), de saumon (Okamoto *et al*., 1995a), d'algues (Suetsuna 1998a) ou encore de protéines hydrophiles de poissons (Wako *et al*., 1999).

Certains hydrolysats protéiques ont montré des effets *in vitro* (par inhibition de l'ECA) et *in vivo* (effets antihypertenseurs) (Tableau 6). L'hydrolyse par la pepsine de thon indonésien séché/salé (Astawan *et al*., 1995) ainsi que l'hydrolyse par la thermolysine de muscles de bonite (Yokoyama *et al*., 1992) ont donné des produits possédant une activité inhibitrice de l'ECA (CI_{50} = 0,63 mg protéine/ml et 29 µg d'extrait sec/ml, respectivement). L'hydrolysat pepsique a permis de diminuer la pression sanguine de rats spontanément hypertendus (rats SHR) lorsqu'il était administré de façon chronique par voie orale.

Un autolysat de muscles de bonite partiellement purifié a montré une activité antihypertensive dose-dépendante (pour des doses allant de 1 à 3 g/kg) lorsqu'il était administré par voie orale à des rats SHR (Fujii *et al*., 1993). L'administration chronique d'un hydrolysat (par la thermolysine) de muscles de bonite à des rats SHR a permis de supprimer le développement de l'hypertension après une à cinq semaines de traitement suivant une dose utilisée de 15 à 60 mg/kg (Fujita *et al*., 1995). Une simple administration par voie orale (250 mg/kg) de cet échantillon à des rats SHR a significativement baissé leur pression systolique après 4 heures (Fujita *et al*., 2001). Le fractionnement de cet hydrolysat par ultrafiltration sur membrane de porosité 3 kDa a permis d'obtenir un extrait plus inhibiteur de l'ECA que l'hydrolysat de départ ayant une CI_{50} plus faible, 31,5 µg/ml au lieu de 58,3 µg/ml (Fujita *et al*., 2001). Cet extrait a montré un effet antihypertenseur dose-dépendant chez le rat SHR pour des doses allant de 125 à 500 mg/kg. De plus, l'administration chronique (1500 mg/jour) de cet extrait à des patients atteints d'hypertension a montré un effet antihypertenseur (Fujita *et al*., 2001).

Tableau 6 : Hydrolysats issus de produits marins montrant des propriétés antihypertensives.

Source	Fraction	CI_{50}[a]	Dose[b]	Δ PS (mm Hg)[c]	Références
Algues	Hydrolysat pepsique	1,52 mg/ml	200 mg/kg p.o.	-53 après 1 h	Suetsuna (1998a)
Bonite	Hydrolyse par la thermolysine	29 µg/ml	15 mg/kg/jour p.o.	-23 après 7 sem.	Fujita *et al*. (1995)
Bonite	Hydrolyse par la thermolysine	58,3 µg/ml	250 mg/kg p.o.	-5 après 4 h	Fujita *et al*. (2001)
Bonite	Hydrolysat d'intestin	75 µg/ml	1000 mg/kg p.o.	-19 après 3 h	Fujii *et al*. (1993)
Bonite	S-type KO	31,5 µg/ml	125 mg/kg p.o.	-7 après 4 h	Fujita *et al*. (2001)
Bonite	S-type KO*	31,5 µg/ml	1500 mg/jour p.o.	-11,7 après 5 sem.	Fujita *et al*. (2001)
Sardine	Hydrolysat pepsique	27,1 mg/g	117 mg/kg i.v.	-33,7 après 1 h	Suetsuna (1989)
Sardine	Hydrolysat pepsique	27,1 mg/g	500 mg/kg p.o.	-10,6 après 3 h	Suetsuna (1989)
Thon	hydrolysat pepsique	0,63 mg/ml	5000 mg/kg/jour p.o.	-65 après 16 jours	Astawan *et al*. (1995)
Wakame	Hydrolysat par la protéase S	86 µg/ml	10 mg/kg p.o.	-19,3 après 3 h	Sato *et al*. (2002b)
Wakame	Hydrolysat par la protéase S	86 µg/ml	0,1%/jour p.o.	-17,1 après 10 sem.	Sato *et al*. (2002b)
Thon	Hydrolysat par l'orientase	8,85 mg/ml	1 g/kg p.o.	-30 après 2 h	Hsu *et al*. (2007)
Maquereau	Autolysat	40 µg/ml	10 mg/kg p.o.	-27 après 4 h	Itou *et al*. (2007)
Saumon	Hydrolysat par la papaïne	79 µg/ml	30 mg/kg i.v	-30 après 0,5 h	Enari *et al*. (2008)

[a]CI_{50} ; concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique.
[b]Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o.: Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).
[c]Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (sem. : semaine).
S-type KO: Fraction < 3 kDa de bonite hydrolysée par la thermolysine.
*Etude réalisée chez des patients atteints d'hypertension moyenne.

Tableau 7 : Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits marins.

Structure	Origine	CI_{50} (µM)[a]	Dose[b]	Δ PS (mm Hg)[c]	Références
Ala-Ile-Tyr-Lys		213	50 mg/kg p.o.	-40 après 1 h	
Lys-Phe-Tyr-Gly	Wakame	90,5	50 mg/kg p.o.	-40 après 2 h	Suetsuna et Nakano
Tyr-Asn-Lys-Leu		21	50 mg/kg p.o.	-50 après 2 h	(2000)
Tyr-Lys-Tyr-Tyr		64,2	50 mg/kg p.o.	-50 après 2 h	
Gly-Trp	Sauce de poisson	35,0	200 mg/kg p.o.	-29 après 6 h	Okamoto *et al.* (1995a)
Gly-Val-Tyr-Pro-His-Lys (C111)		1,6	100 mg/kg p.o.	-10,3 après 3 h	
Gly-Val-Tyr-Pro-His-Lys (C111)	Intestins de Bonite	1,6	500 mg/kg p.o	Ang I	Karaki *et al.* (1993)
Ile-Arg-Pro-Val-Gln (C112)		1,4	50 mg/kg p.o	-7,0 après 3 h	
Ile-Arg-Pro-Val-Gln (C112)		1,4	500 mg/kg p.o.	Ang I	
Ile-Trp		5,1	60 mg/kg p.o.	-22 après 2 h	
Ile-Trp-His	Bonite	3,5	60 mg/kg p.o.	-30 après 4 h	Fujita *et al.* (2000)
Ile-Tyr		2,1	60 mg/kg p.o	-19 après 2 h	
Leu-Lys-Val-Gly-Gly-Lys-Gln-Tyr	Muscle de sardine	9,2	10 mg/kg i.v.	-15 après 2 h	Suetsuna (1991b)
Leu-Lys-Pro-Asn-Met	Bonite	2,4	8 mg/kg p.o.	-9 après 4 h	Fujita et Yoshikawa
Leu-Lys-Pro		0,32	2,25 mg/kg p.o.	-6 après 2 h	(1999)
Phe-Tyr	Wakame	42,3	10 mg/kg p.o.	-21 après 6 h	Sato *et al.* (2002b)
Val-Tyr		35,2	1 mg/kg p.o.	-21,5 après 9 h	
Val-Trp	Sauce de poisson	2,0	200 mg/kg p.o.	-38 après 3h	Okamoto *et al.* (1995a)

Structure	Origine	CI_{50} (µM)[a]	Dose[b]	Δ PS (mm Hg)[c]	Références
Tyr-His		5,1		-50 après 3 h	
Lys-Tyr	Wakame	7,7	50 mg/kg p.o.	-45 après 6 h	Suetsuna *et al*. (2004)
Phe-Tyr		3,7		-46 après 3 h	
Ile-Tyr		2,7		-33 après 3 h	
Met-Ile-Phe-Pro-Gly-Ala-Gly-Gly-Pro-Glu-Leu	Sole	28,7 µg/ml	10 mg/kg p.o	-22 après 3 h	Jung *et al*. (2006)
Trp-Pro-Glu-Ala-Ala-Glu-Leu-Met-Met-Glu-Val-Asp-Pro	Thon	21,6	10 mg/kg p.o	-18 après 3 h	Qian *et al*. (2007)
Val-Trp-Tyr-His-Thr-Val-Trp	Crevette	28,3	10 mg/kg p.o	-12 après 0,5 h	Nii *et al*. (2008)
Val-Trp		6,6	10 mg/kg p.o	-7 après 0,5 h	
Asp-Leu-Thr-Asp-Tyr	Huître	143 nmol/ml	8 mg/kg p.o	-17 après 6 h	Shiozaki *et al*. (2010)
Gly-Asp-Leu-Gly-Lys-Thr-Thr-Thr-Val-Ser-Asn-Trp-Ser-Pro-Pro-Lys-Try-Lys-Asp-Thr-Pro	Thon	11,28	10 mg/kg p.o	-21 après 6 h	Lee *et al*. (2010)
Tyr-Tyr		680		-8 après 2 h	
Tyr-Tyr-Ala		2800		-12 après 2 h	
Tyr-Tyr-Ala-Pro	Méduse	2330	3 mg/kg p.o	-5 après 6 h	Morinaga *et al*. (2010)
Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe		4350		-9 après 2 h	
Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe-Glu		3770		-12 après 2 h	
Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe-Gln		470		-20 après 6 h	
Leu-His-Pro	Crevette	1,6	6 mg/kg p.o	-36 après 4 h	Cao *et al*. (2010)
Ile-Gln-Pro	Microalgue	5,77	10 mg/kg p.o	-28 après 6 h	Lu *et al*. (2010)

[a]CI_{50} ; concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique.
[b]Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o.: Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).
[c]Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (Ang I: Inhibition de l'effet presseur de l'angiotensine I).

A partir de ces hydrolysats, différents peptides inhibiteurs de l'ECA ont pu être identifiés et ont montré une activité antihypertensive (Tableau 7). Testés sur des rats Sprague-Dawley (rats normotendus), les peptides C111 et C112, isolés par Matsumura *et al.* (1993b), ont montré un effet antagoniste à la réponse de l'angiotensine I 30 minutes après administration orale (500 mg/kg ; Karaki *et al*., 1993). Administrés oralement à des rats SHR, ces peptides ont montré qu'ils pouvaient réduire significativement la pression sanguine à de plus faibles doses (100 et 50 mg/kg pour C111 et C112 respectivement ; Karaki *et al*., 1993).

Un autre peptide inhibiteur de l'ECA a pu être isolé d'un hydrolysat de muscles de bonite par la thermolysine (Leu-Lys-Pro-Asn-Met, CI_{50} = 2,4 µM ; Fujita et Yoshikawa, 1999). Bien que ce pentapeptide ait été démontré comme étant substrat de l'ECA, son hydrolyse a permis d'obtenir un tripeptide huit fois plus inhibiteur (Leu-Lys-Pro, CI_{50} = 0,32 µM). Il est alors possible de considérer Leu-Lys-Pro-Asn-Met comme un pro-médicament de la forme la plus active Leu-Lys-Pro. Administré oralement à des rats SHR (8 mg/kg), ce pro-peptide agit aussi rapidement que le captopril (1,25 mg/kg), soit 4 heures après administration, pour une activité équivalente à 66% de celle du captopril. Le tripeptide a montré un effet maximal sur la pression systolique 2 heures après administration et son efficacité était équivalente à 91% de celle du captopril (Fujita et Yoshikawa, 1999).

D'autres peptides antihypertenseurs ont été identifiés dans des hydrolysats de poissons tels que, Ile-Trp-His, Ile-Trp et Ile-Tyr issus de la bonite (Fujita *et al.*, 2000), Leu-Lys-Val-Gly-Gly-Lys-Gln-Tyr issu des muscles de sardine (Suetsuna, 1991b) et Gly-Trp et Val-Trp issus du saumon (Okamoto *et al*., 1995a). Les fragments peptidiques, Ile-Lys-Pro et Val-Tyr, isolés des muscles de sardine et de bonite ont été synthétisés et testés *in vivo* (Yokoyama *et al*., 1992 ; Matsufuji *et al*., 1994). Administré en i.v., Ile-Lys-Pro (10 mg/kg) a supprimé l'effet hypertenseur de l'angiotensine I (Yokoyama *et al*., 1992) et Val-Tyr (50 mg/kg) a permis de diminuer les pressions systolique et diastolique chez le Rat SHR (Matsufuji *et al.*, 1995). Une autre étude a montré que l'administration orale de Val-Tyr à ces mêmes rats SHR avait baissé significativement la pression artérielle de manière dose-dépendante (doses de 1 à 10 mg/kg). Sur un traitement à long terme, Val-Tyr a démontré sa capacité à produire un effet antihypertenseur puissant et durable chez le Rat SHR (10 mg/kg p.o. pendant 10 jours ; Seki *et al*., 1999).

Des études récentes ont montré que les digestions par la pepsine d'une algue rouge, *Porphyra yezoensis* (Suetsuna, 1998a), d'algues brunes *Hizikia fusiformis* (Suetsuna et Chen, 2001) et *Undaria pinnatifida* (Suetsuna et Nakano, 2000) ainsi que de deux micro-algues *Chlorella vulgaris* et *Spirulina platensis* (Suetsuna et Chen, 2001) pouvaient diminuer la pression sanguine des rats SHR. Les peptides issus de l'hydrolyse pepsique de *Porphyra*

yezoensis (aussi appelés Nori-peptides) ont montré un effet antihypertenseur significatif aussi bien chez des rats SHR que chez des patients atteints d'hypertension. De plus, cette étude a montré que les Nori-peptides ne présentaient pas d'effets délétères hypotenseurs lorsqu'ils étaient administrés à des sujets sains (Saito *et al*., 2002). Une autre étude, utilisant le wakame (*Undaria pinnatifida*), a aussi montré un effet antihypertenseur chez des patients (Hata *et al*., 2001). Un extrait de wakame, obtenu à partir de la digestion enzymatique par la protéase S « Amano » de *Bacillus stearothermophilus*, a permis de diminuer l'hypertension des rats SHR aussi bien après administration orale unique qu'après administration orale répétée (Sato *et al*., 2002a). Ces hydrolysats d'algues sont donc une source importante de peptides biologiquement actifs, dont certains ont été identifiés et ont présenté des activités inhibitrices de l'ECA (Tableau 7). Ces résultats pourraient expliquer, en partie, les effets antihypertenseurs observés chez les rats SHR (Suetsuna 1998a ; Suetsuna et Nakano 2000 ; Sato *et al*., 2002b).

D'autres peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés dans des hydrolysats de produits marins mais très peu ont été évalués *in vivo* (Kohama *et al*., 1988, 1991 ; Yokoyama *et al*., 1992 ; Matsumura *et al*., 1993a,b ; Matsufuji *et al*., 1994, 1995 ; Sheih *et al*., 2009 ; Bougatef *et al*., 2010a ; Gu *et al*., 2011).

VII.5.2. Peptides issus des produits laitiers

De nombreux peptides inhibiteurs de l'ECA ont été isolés à partir des produits laitiers (fromage, lait, lait fermenté…). Plusieurs d'entre eux ont montré des effets antihypertenseurs chez le Rat spontanément hypertendu ainsi que chez des patients atteints d'hypertension.

Maruyama et Suzuki (1982), ont été les premiers à isoler un peptide inhibiteur de l'ECA (appelé CEI 12) à partir d'un hydrolysat trypsique de caséine bovine (un dodecapeptide, CI_{50} = 77 µM). Administré en i.v. à des rats, CEI 12 a permis de prévenir la réponse à l'angiotensine I (Maruyama *et al*., 1987). Par la suite, deux autres peptides inhibiteurs de l'ECA ont pu être isolés de la caséine bovine et, comme CEI12, ont montré une activité de type bradykinine dans la contraction de l'utérus et de l'iléum du rat (Maruyama *et al*., 1985). Depuis ces études, de nombreux peptides antihypertenseurs ont pu être isolés de différents produits laitiers (Tableau 8).

Deux peptides ont été identifiés à partir du lait fermenté, commercialisé au Japon sous le nom de calpis, Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro, dont les CI_{50} sont 9 et 5 µM, respectivement (Nakamura *et al.* 1995a). Administrés oralement à raison de 1 à 5 mg/kg, ces peptides ont montré un effet antihypertenseur chez les rats SHR, et aucun effet chez le Rat normotendu (Nakamura *et al*., 1995b), suggérant que l'activité du calpis est purement antihypertensive et

non hypotensive. Les mesures d'activité de l'ECA dans différents organes, après administration orale du calpis, ont montré des diminutions significatives de l'activité de l'ECA au niveau de l'aorte, du rein et des poumons. Cependant, Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro n'ont été retrouvés qu'au niveau de l'aorte (Masuda *et al*., 1996). Il semblerait que ces tripeptides soient directement résorbés sans être dégradés par les enzymes gastro-intestinales. Leur biodisponibilité est estimée à 4 et 5% pour Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro, respectivement, leur permettant ainsi d'atteindre leur site d'action pour produire leur effet antihypertenseur. Dans une autre étude, le calpis a aussi montré un effet sur la pression sanguine, après administration chronique orale chez le Rat SHR (Nakamura *et al.*, 1996). Un des mécanismes possibles à l'origine de cet effet antihypertenseur a été attribué aux peptides inhibiteurs de l'ECA contenus dans ce lait fermenté, à savoir Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro (Sipola *et al*., 2001). De plus, ces deux peptides ont montré un effet dose-dépendant (Sipola *et al*., 2002).

L'administration orale et chronique, pendant 4 semaines, de 95 ml de calpis à des patients hypertendus a diminué significativement leurs pressions systolique et diastolique (Hata *et al*., 1996). De plus, très récemment, deux études ont montré que la supplémentation diététique avec un lait fermenté par *Lactobacillus helveticus* LBK-16H (souche permettant la production de grandes quantités des peptides Val-Pro-Pro et Ile-Pro-Pro), pouvait potentiellement être utilisée pour le traitement de certaines formes d'hypertension modérée (Seppo *et al*., 2002 ; Seppo *et al.*, 2003). En dépit du faible nombre de sujets (17 et 39 patients atteints d'hypertension), ces premiers résultats sont à prendre en considération et d'autres recherches sont nécessaires pour confirmer ces résultats préliminaires.

L'effet antihypertenseur attribué au lait fermenté par *L. helveticus* et aux hydrolysats de caséines obtenus à partir des protéases de *L. helveticus* est relativement bien documenté dans la littérature. De fait, l'hydrolyse de la caséine par une protéase très active issue de *L. helveticus* CP 790 (connue pour hydrolyser préférentiellement les caséines α_{S1}- et β-) permet la libération d'un grand nombre de peptides inhibiteurs de l'ECA (Yamamoto *et al*., 1994a).

Un heptapeptide (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln), obtenu par hydrolyse de la β-caséine par une protéase extracellulaire issue d'une culture de *L. helveticus* CP 790, a montré un effet antihypertenseur après administration orale (2 mg/kg) chez des rats SHR (Maeno *et al*., 1996). Bien que son activité inhibitrice soit relativement faible (Tableau 8), la diminution de la pression artérielle a été maintenue de 2 à 10 heures après administration orale. Mais il a été observé que ce peptide pouvait être converti *in vivo*, *via* digestion pancréatique, en un hexapeptide d'activité inhibitrice plus forte (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro) possédant une activité antihypertensive aussi importante que celle obtenue avec l'heptapeptide. Le cas de cet

heptapeptide fait qu'il peut être considéré comme une forme pro-peptidique de l'hexapeptide, plus actif, libéré par l'action des enzymes gastro-intestinales.

Plusieurs peptides inhibiteurs de l'ECA ont été obtenus à partir de différents produits laitiers (petit lait, caséine α-lactalbumine et β-lactoglobuline) ayant subi soit des traitements enzymatiques (avec la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine, la pancréatine, l'élastase, carboxypeptidase ou des préparations enzymatiques commerciales), soit des fermentations avec différents micro-organismes (Mullally *et al*., 1997a,b ; Pihlanto-Leppälä *et al*., 1998, 2000 ; Tauzin *et al*., 2002). Dans chaque cas, les auteurs ont montré que l'hydrolyse était nécessaire pour produire des peptides inhibiteurs de l'ECA. Cependant, aucune corrélation n'a été établie entre le temps d'hydrolyse et la production de peptides inhibiteurs (Mullally *et al.* 1997a). La plus forte activité inhibitrice a été obtenue après hydrolyse trypsique du petit lait, avec, dans l'ordre décroissant de d'activité, le petit lait > l'α-lactalbumine > la β-lactoglobuline (Mullally *et al*., 1997a ; Pihlanto-Leppälä *et al*., 2000 ; Pihlanto-Leppälä 2001). Les fractions de faible poids moléculaire (< 1-3 kDa) isolées des hydrolysats de petit lait, α-lactalbumine et β-lactoglobuline se sont montrées les plus riches en peptides présentant des propriétés inhibitrices de l'ECA (Mullally *et al*., 1996, 1997b ; Pihlanto-Leppälä *et al*., 2000). Suite à ces résultats, les auteurs ont préconisé l'enrichissement de certaines préparations laitières en peptides inhibiteurs par ultrafiltration.

Les études sur les fromages ont montré qu'une forte activité inhibitrice de l'ECA était observée après un processus de digestion protéasique (Saito *et al.*, 2000). Il a ainsi été démontré que la protéolyse ayant lieu lors de l'affinage des fromages, permettait d'augmenter le taux d'activité inhibitrice de l'ECA jusqu'à un certain niveau, au-delà duquel cette activité diminue (Smacchi et Gobbetti 2000). Cette constatation indique que des peptides inhibiteurs de l'ECA peuvent être naturellement présents dans le fromage, mais pour cela, la protéolyse doit s'effectuer sur une période limitée avant que ces molécules bioactives ne soient converties en peptides inactifs et acides aminés lors de la maturation (Ryhänen *et al*., 2001). Il a été observé que le temps de maturation optimal pour la production de cette activité était de 13 semaines pour les fromages de type « Festivo » (un fromage allégé) et de 8 mois pour un fromage de type « Manchego » (Ryhänen *et al*., 2001 ; Gómez-Ruiz *et al*., 2002).

La diversité de composition des laits fait que les différents fromages sont une source de peptides antihypertenseurs (Abubakar *et al*., 1996, 1998 ; Saito *et al*., 2000) permettant le développement d'un nouveau genre de produit lacté fermenté aux propriétés antihypertensives (Abubakar *et al*., 1998). Plusieurs peptides inhibiteurs de l'ECA ont été isolés de fromages: 5 oligopeptides issus d'une hydrolyse par la protéinase K, et 2 nonapeptides retrouvés dans le Gouda ont pu être ainsi identifiés (Abubakar *et al*., 1998 ; Saito *et al.*, 2000). Administrés

oralement à des rats SHR, ces peptides se sont montrés antihypertenseurs bien qu'ayant une CI_{50} relativement élevée. Les auteurs en ont déduit que dans le cas des nonapeptides, composés de relativement haut poids moléculaire, ces derniers devaient être métabolisés *via* des peptidases et/ou protéases spécifiques avant de passer la barrière gastro-intestinale et d'exercer leur activité antihypertensive (Saito *et al*., 2000).

Dans le lait, les caséines forment la principale classe de protéines. Elles représentent environ 40% des protéines du lait chez l'homme et 80% chez le ruminant (Kim *et al*., 1999). Parmi cette catégorie de protéines, on retrouve la β-caséine qui est, quantitativement, la plus importante chez l'homme. Dans sa structure primaire sont retrouvés des fragments conservés de proline. La proline est un acide aminé relativement important dans la structure des peptides inhibiteurs de l'ECA, surtout si elle se retrouve en position C-terminale (Cheung *et al.*, 1980). Ainsi, Kohmura *et al.* (1989) ont testé 69 fragments peptidiques issus de β-caséine humaine et identifié 2 peptides fortement inhibiteurs de l'ECA et actifs *in vivo* (Tableau 8).

Récemment, une étude a été menée sur l'α_{S1}-caséine issue de lait humain. Cette sous-unité de l'α-caséine, identifiée en 1994, représente seulement 0,06% des protéines totales du lait humain. Trois peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés dans un hydrolysat trypsique d'α_{S1}-caséine (CI_{50} = 25 à 133 μM). L'étude de leur fragment C-terminal a montré que le tripeptide Leu-Gln-Trp (CI_{50} = 3,8 μM) était résistant à l'hydrolyse par la pepsine et la pancréatine. Dans le cas où ce peptide puisse être produit naturellement, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'il pourrait être résorbé directement dans le tractus gastro-intestinal pour produire un effet physiologique chez l'homme (Kim et Chung, 1999).

Tableau 8 : Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits laitiers

Structure	Origine	CI_{50} (µM)[a]	Dose[b]	Δ PS (mm Hg)[c]	Références
Gly-Lys-Pro	Lactosérum/β_2-m	352	8 mg/kg p.o.	-26 après 6 h	Abubakar *et al*. (1998)
Ile-Pro-Ala	Lactosérum/β-lg	141	8 mg/kg p.o.	-31 après 6 h	Abubakar *et al*. (1998)
Ile-Pro-Pro	Lait/β_2 et κ-cn	5	1 mg/kg p.o.	-15,1 après 6 h	Nakamura *et al*. (1995a,b)
Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro	β-cn	5	1 mg/kg p.o.	-32,2 après 6 h	Maeno *et al*. (1996)
Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln	β-cn	1000	0.5 mg/kg p.o.	-20 après 6 h	Maeno *et al*. (1996)
Phe-Pro	Lactosérum/β-cn	315	8 mg/kg p.o.	-27 après 6 h	Abubakar *et al*. (1998)
Pro-Leu-Ile-Tyr-Pro	Lait/β-cn	4,4	4-8 mg/kg i.v.	Ang I	Kohmura *et al*. (1989)
Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Lait/α_{S1}-cn	16	31,8 mg/kg i.v.	Ang I	Maruyama *et al*. (1987)
Tyr-Gly-Leu-Phe	Lactosérum/α-la	733	0,1 mg/kg s.c.	-23 après 1 h	Nurminen *et al*. (2000)
Tyr-Pro	Lactosérum/α, β-cn	720	0,1 mg/kg p.o.	-10,2 après 6 h	Yamamoto *et al*. (1999)
Val-Pro-Pro	Lait/β-cn	9	0,4 mg/kg p.o.	-11,2 après 6 h	Nakamura *et al*. (1995a,b)
Val-Tyr-Pro	Lactosérum/β-cn	288	8 mg/kg p.o.	-21 après 6 h	Abubakar *et al*. (1998)
Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly	Lactosérum/β-cn	221	8 mg/kg p.o.	-22 après 6 h	Abubakar *et al*. (1998)
Lys-Lys-Tyr-Asn-Val-Pro-Gln-Leu	α_{S1}-cn	77,1	-	-11,5	Miguel *et al*. (2010)
Tyr-Ala-Lys-Pro-Val-Ala	κ-cn	14,3	-	-23,1	Miguel *et al*. (2010)

Note: cn : caséine ;β_2-m : β_2-microglobuline ; β-lg : β-lactoglobuline ; α-la : α-lactalbumine.
[a]CI_{50} ; concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique.
[b]Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o.: Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse ; s.c. : Injection Sous-cutanée).
[c]Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (Ang I: Inhibition de l'effet presseur de l'angiotensine I).

VII.5.3. Peptides issus des produits végétaux

Plusieurs peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés à partir des végétaux comme le soja (Suetsuna, 1991a), le germe de blé (Matsui *et al*., 1999), la dioscorine d'igname de Chine (Hsu *et al*., 2002), la légumine de pois chiche (Yust *et al*., 2003), le gluten (Suh *et al*., 1999) ainsi que dans des hydrolysats d'α- et γ-zéine (Maruyama *et al*., 1989a ; Miyoshi *et al*., 1991a).

Les premières études sur les hydrolysats de γ-zéine ont montré la présence de peptides inhibiteurs de l'ECA (Maruyama *et al*., 1989a). Ces auteurs ont étudié l'activité d'une séquence répétée 6 fois et retrouvée dans la γ-zéine (Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro). L'activité inhibitrice de ce hexapeptide (CI_{50} = 200 µM) était plus faible que celle de deux fragments synthétiques (Val-His-Leu-Pro- Pro, CI_{50} = 18 µM ; Leu-Pro-Pro, CI_{50} = 9,6 µM).

L'hydrolyse de l'α-zéine par différentes enzymes (thermolysine, chymotrypsine, subtilisine, trypsine, papaïne et pepsine) a permis de produire des peptides fortement inhibiteurs de l'ECA (CI_{50} allant de 21 à 230 µg/ml, Tableau 9). La plus forte activité a été obtenue avec la digestion par la thermolysine. Cet hydrolysat a induit un effet antihypertenseur significatif 3 à 6 heures après administration unique par voie intraveineuse (2 g/kg) ou p.o. (5 g/kg) chez le Rat SHR (Miyoshi *et al*., 1991a,b). Plusieurs autres peptides ont été isolés de l'α-zéine mais ils restent encore à être testés *in vivo* (Yano *et al*., 1996). Dans le gluten de blé, un hexapeptide (Pro-Ser-Gly-Gln-Tyr-Tyr) a été isolé suite à l'hydrolyse par la pescalase (protéase à sérine issue de *Bacillus licheniformis*) et a montré un effet antagoniste vis-à-vis de l'angiotensine I *in vivo*. Cependant, par rapport à son CI_{50} (0,1 mM), la dose requise pour observer un effet était élevée (30 mg/kg i.v.). Les auteurs en ont alors déduit que ce peptide devait être rapidement inactivé lors du processus digestif comme c'est souvent le cas avec les grands peptides (Suh *et al*., 1999). Une autre explication peut être aussi une mauvaise résorption du peptide. Récemment, un hydrolysat de gluten a permis de diminuer la pression sanguine des rats SHR 2 heures après administration i.v. (Saiga *et al*., 2002).

L'hydrolyse des protéines de graines de colza par la subtilisine a révélé la présence de peptides inhibiteurs de l'ECA capables de montrer un effet antihypertenseur *in vivo* (Tableau 9). Cet hydrolysat, administré à des rats SHR a permis de diminuer significativement leur pression sanguine 2 heures après administration orale (0,15 g/kg ; Marczak *et al*., 2003).

Le soja est la principale source de protéines d'alimentation humaine. La valeur nutritionnelle du soja étant relativement faible, ce produit est consommé fermenté. Deux études récentes ont montré que des oligopeptides (< 1 kDa) obtenus après digestion alcaline de graines de soja fermentées diminuaient la tension artérielle chez le Rat SHR (Wu et Ding

2001 ; Shin *et al.*, 2001). L'hydrolyse des protéines de soja par l'alcalase a permis de libérer des petits peptides (PM < 954 Da) inhibiteurs de l'ECA (Wu et Ding, 2001). Administré oralement à des rats SHR (aux doses de 100, 500 et 1000 mg/kg/jour pendant 30 jours), l'hydrolysat a permis de diminuer significativement leur pression systolique à partir du 6ème jour de traitement (pour les doses de 500 et 1000 mg/kg) et du 12ème jour (pour la dose de 100 mg/kg). A l'inverse, le même protocole suivi avec des rats normotendus et avec la dose la plus élevée n'a pas permis d'observer d'effet (Wu et Ding, 2001). Les tests sérologiques et histologiques réalisés sur les rats SHR traités (comparés aux rats SHR témoins) ont montré une natrémie réduite, alors que l'activité de l'ECA est restée inchangée dans le sérum, l'aorte et les poumons. Un tripeptide inhibiteur de l'ECA (His-His-Leu) a été isolé d'une pâte de soja coréenne fermentée. Ce peptide a montré un fort pouvoir inhibiteur (CI_{50} = 2,2 µg/ml) ainsi qu'une activité antihypertensive *in vivo* (Shin *et al*., 2001). L'administration unique par voie intraveineuse (5 mg/kg) à des rats SHR a significativement baissé leur pression systolique après 10 minutes. De plus, l'injection répétée (trois fois) de His-His-Leu (5 mg/kg à 20 minutes d'intervalle) a significativement diminué l'activité d'ECA dans l'aorte mais pas dans le sérum (Shin *et al*., 2001).

Un hydrolysat de germe de blé, produit par la protéase alcaline de *Bacillus licheniformis* a montré une activité inhibitrice de l'ECA (CI_{50} = 0,67 mg/ml). Seize oligopeptides, dont l'CI_{50} est < 20 µM, ont pu être isolés. Parmi eux, le tripeptide (Ile-Val-Tyr) a été considéré comme le principal protagoniste de l'activité inhibitrice retrouvée dans l'hydrolysat, en raison notamment de sa prédominance (21,6 mg/100 g) ainsi qu'à son activité inhibitrice (CI_{50} = 0,48 µM ; Matsui *et al.*, 1999). Ce peptide s'est montré résistant à la digestion par les enzymes gastro-intestinales (Matsui *et al.*, 1999). De plus, il dispose dans sa structure de la séquence Val-Tyr (CI_{50} = 5,2 µM) connue pour ses propriétés antihypertensives chez l'homme (Kawasaki *et al.*, 1998, 2000). Après administration i.v., Ile-Val-Tyr a diminué la pression artérielle systolique chez le Rat SHR (Tableau 9). Le suivi métabolique de ce tripeptide et de ses produits de dégradation (Val-Tyr et Tyr) chez le Rat et chez l'homme, a montré une forte accumulation de Val-Tyr au niveau plasmatique. Dans chaque cas, ce tripeptide a été complètement métabolisé en 24 heures par les aminopeptidases plasmatiques et l'effet antihypertenseur observé *in vivo* a été attribué à l'effet combiné de Ile-Val-Tyr et Val-Tyr (Matsui *et al.*, 2000).

Tableau 9 : Peptides antihypertenseurs isolés d'hydrolysats de produits végétaux.

Structure	Origine	CI_{50} (µM)[a]	Dose[b]	Δ PS (mm Hg)[c]	Références
Arg-Ile-Tyr	Graine de colza	28	7,5 mg/kg p.o.	-10,8 après 2 h	Marczak *et al.* (2003)
His-His-Leu	Soja	2,2 µg/ml	5 mg/kg i.v.	-32 après 30 min	Shin *et al.* (2001)
Ile-Tyr	Graine de colza	3,7	7,5 mg/kg p.o.	-9,8 après 2 h	Marczak *et al.* (2003)
Ile-Val-Tyr	Blé	0,48	5 mg/kg i.v.	-19,2 après 8 min	Matsui *et al.* (2000)
Leu-Pro-Pro	Endosperme de maïs	9,6	160 mg/kg i.v.	Ang I	Maruyama *et al.* (1989a)
Pro-Ser-Gly-Gln-Tyr-Tyr	Gluten de blé	100	30 mg/kg i.v.	Ang I	Suh *et al.* (1999)
Val-His-Leu-Pro-Pro	Endosperme de maïs	18	125 mg/kg i.v.	Ang I	Maruyama *et al.* (1989a)
Val-Trp	Graine de colza	1,6	7,5 mg/kg p.o.	-10,8 après 2 h	Marczak *et al.* (2003)
Val-Trp-Ile-Ser	Graine de colza	30	12,5 mg/kg p.o.	-12,5 après 2h	Marczak *et al.* (2003)
Met-Arg-Trp-Arg-Asp		2,1	30 mg/kg p.o	-13.5 après 4 h	
Met-Arg-Trp	Rubisco	0,6	20 mg/kg p.o	-20 après 2 h	Yang *et al*. (2003)
Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly		4,2	100 mg/kg p.o	-15 après 4 h	
Gly-Glu-Pro	Champignon	0,04 mg/ml	1 mg/kg p.	-36 après 2 h	Lee *et al*. (2004)
Thr-Gln-Val-Tyr	Riz	18,2	30 mg/kg p.o	-40 après 6 h	Li *et al.* (2007)
Ala-Tyr	Gluten de maïs	14,2	50 mg/kg p.o	-9,5 après 2 h	Yang *et al.* (2007)

[a]CI_{50} ; concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique.
[b]Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o.: Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).
[c]Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (Ang I: Inhibition de l'effet presseur de l'angiotensine I).

VII.5.4. Peptides issus d'autres sources naturelles

De nombreux autres aliments ont montré qu'ils pouvaient contenir et/ou produire des peptides inhibiteurs de l'ECA. Par exemple, des peptides inhibiteurs ont été identifiés à partir des muscles de poulet (Saiga *et al*., 2006) et de porcs (Escudero *et al*., 2010), les œufs (Miguel et Aleixandre, 2006), l'ail (Suetsuna 1998b), la gélatine (Oshima *et al*., 1979 ; Herregods *et al*., 2011), le latex de figuier (Maruyama *et al*., 1989b), le saké (Saito *et al.* 1994a), le vin (Takayanagi & Yokotsuka 1999), les autolysats bactériens (Furushiro *et al*., 1990), le foie et les muscles de calmar (Wako *et al*., 1996), les champignons (Choi *et al.*, 2001), la gelée royale d'abeille (Matsui *et al*., 2002), les haricots nains ainsi que certains fruits et thés (Chen Zhen *et al*., 2009). Les hydrolysats ainsi que les peptides isolés de ces différentes sources ayant montré des effets antihypertenseurs *in vivo* sont représentés dans les Tableaux 10 et 11 respectivement.

Oshima *et al.* (1979) ont été les premiers à rapporter l'identification de peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines alimentaires. Neufs peptides d'une longueur allant de trois à douze résidus acides aminés ont été isolés à partir d'une digestion de gélatine par une collagénase. Leur pré-incubation avec l'ECA a permis de mettre en évidence que certains de ces peptides étaient des substrats plutôt que des inhibiteurs de l'enzyme.

Les études réalisées sur les hydrolysats de gélatine bovine ont montré que la fraction regroupant les petits peptides (< 1 kDa) était celle qui présentait la plus forte activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les hydrolysats de certains produits laitiers et de plasma (Hyun et Shin, 2000 ; Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000, 2001). Deux tripeptides inhibiteurs de l'ECA ont été récemment identifiés dans un hydrolysat de gélatine bovine (Kim *et al.*, 2001). De même la digestion de gélatine provenant de merlans jaunes d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) par différents traitements protéasiques (alcalase, pronase E et collagénase) a permis d'isoler deux nouveaux tripeptides inhibiteurs de l'ECA (Byun et Kim 2001).

L'hydrolyse d'une protéine d'œuf, l'ovalbumine (par la pepsine), de muscles de poulet et de porcins (par la thermolysine), ou de protéines du jaune d'œuf a permis de mettre en évidence des peptides ayant des propriétés antihypertensives chez le Rat SHR (Fujita *et al.*, 2000 ; Arihara *et al.*, 2001 ; Yoshii *et al*., 2001 ; Nakashima *et al.*, 2002 ; Saiga *et al*., 2003). Par exemple, l'administration chronique (pendant 12 semaines) à des rats SHR d'une fraction oligopeptidique (< 1 kDa) d'un hydrolysat de jaunes d'œufs, a permis de supprimer le développement de l'hypertension pour des doses de 20, 100 et 500 mg/kg administrées quotidiennement par voie orale. La plus forte dose administrée aux animaux a diminué les

pressions systolique, diastolique et moyenne d'environ 10% par rapport à celles des animaux témoins (Yoshii *et al*., 2001). De même, l'administration répétée à long terme (pendant 16 semaines) d'un hydrolysat de poulet a diminué significativement la pression systolique de rats SHR après les six premières semaines de traitement (Chen *et al.*, 2002). Par ailleurs, deux extraits préparés à partir de muscles de poulet ont permis de diminuer la pression artérielle lorsqu'ils étaient administrés oralement à des rats SHR (dose 1,0 g/kg ; Saiga *et al.*, 2003). L'hydrolyse par la thermolysine de protéines solubles et de la myosine de muscles porcins ont permis de révéler une activité antihypertensive après administration orale unique à des rats SHR (aux doses de 210 et 30 mg/kg respectivement). Deux peptides inhibiteurs de l'ECA ont pu être identifiés dans l'hydrolysat de myosine, l'un appelé myopentapeptide A (Met-Asn-Pro-Pro-Lys), l'autre myopentapeptide B (Ile-Thr-Thr-Asn-Pro). L'administration orale de ces peptides à des rats hypertendus a montré un effet antihypertenseur à la dose de 1 mg/kg (Nakashima *et al*., 2002).

Les vertus nutritionnelles et médicinales de l'ail (*Allium sativum*) et des champignons sont reconnues depuis longtemps dans la plupart des cultures. Il est reconnu que la consommation régulière d'ail permet de diminuer les pressions systolique et diastolique chez des patients atteints d'hypertension (Ernst, 1987). Suetsuna (1998b) a isolé, de l'ail, 7 dipeptides inhibiteurs de l'ECA ayant des propriétés antihypertensives *in vivo*. Un extrait de Maitake (*Grifola frondosa*), champignon poussant dans l'hémisphère nord et régulièrement retrouvé au Japon, en Europe et en Amérique du Nord, a montré la plus forte activité inhibitrice vis-à vis de l'ECA par rapport à d'autres extraits de champignons (Choi *et al*., 2001). Les peptides inhibiteurs de l'ECA isolés de cet extrait se sont montrés partiellement résistants à l'hydrolyse enzymatique par la trypsine.

Certaines boissons fermentées, telles le saké (alcool japonais obtenu par fermentation de riz) et le vin rouge contiennent des peptides dont certains ont été identifiés comme inhibiteurs de l'ECA (Saito *et al.*, 1994a ; Takayanagi et Yokotsuka, 1999). Les peptides isolés du saké et de lies de saké ont montré d'une part, une activité *in vitro* par inhibition de l'ECA et, d'autre part, une activité *in vivo* par diminution de la tension artérielle de Rats SHR (Saito *et al.*, 1994a,b). Dans le vin rouge, une activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA a été retrouvée et attribuée aux peptides formés au cours du processus fermentaire. Plusieurs peptides (dont les CI_{50} sont comprises entre 17,5 et 83 µM) ont pu être identifiés, mais leur potentiel antihypertenseur *in vivo* n'a pas été testé (Takayanagi et Yokotsuka, 1999).

Tableau 10 : Hydrolysats alimentaires montrant une activité antihypertensive.

Source	Fraction	CI_{50}[a]	Dose[b]	Δ PS (mm Hg)[c]	Références
Oeufs	Jaunes d'œufs < 1 kDa	1,22 mg/ml	20 mg/kg/jour p.o.	-11,3 après 5 sem.	Yoshii *et al.* (2001)
Porc	Hydrolysat de muscles	n.d.	210 mg/kg p.o.	-15,8 après 6 h	Nakashima *et al.* (2002)
Porc	Hydrolysat de myosine	n.d.	30 mg/kg p.o.	-24,9 après 6 h	Nakashima *et al.* (2002)
Lies de saké	Hydrolyse par la thermoase	n.d.	1000 mg/kg p.o.	-21 après 4 h	Saito *et al.* (1994a)
Saké	Autolysat	n.d.	1000 mg/kg p.o.	-22 après 6 h	Saito *et al.* (1994a)
Porc	Hydrolysat de myofibrilles	3,7 mg/ml	1 g/kg i.v.	-22 après 2 h	Saiga *et al.* (2002)
Blé	Hydrolysat de gluten	3,9 mg/ml	1 g/kg i.v.	-33 après 2 h	Saiga *et al.* (2002)
Colza	Hydrolysat (subtilisine)	0,16 mg/ml	0,15 g/kg	-10 après 2 h	Marczak *et al.* (2003)
Sarrazin	Hydrolysat PCT*	0,14 mg/ml	100 mg/kg p.o.	-27 après 2 h	Li *et al.* (2002)
Poulet	Hydrolysat de muscles	1060 mg/ml	1000 mg/kg p.o.	-45 après 2 h	Saiga *et al.* (2003)
Poulet	Hydrolysat de muscles	1,1 mg/ml	1000 mg/kg p.o.	-50 après 3 h	Saiga *et al.* (2003)
Gelée royale	Hydrolysat PCT*	99 µg/ml	1000 mg/kg p.o.	-22,7 après 2 h	Matsui *et al.* (2002)
Abricot	Hydrolysat d'amande < 1 kDa	0,14 mg/ml	800 mg/kg p.o.	-20,8 après 2 h	Wang *et al.* (2011)
Gélatine	Hydrolysat (thermolysine)	0,8 mg/ml	300 mg/kg p.o.	-17 après 6 h	Herregods *et al.* (2011)
Maïs	Hydrolysat par alcalase < 3 kDa	0,29 mg/ml	100 mg/kg p.o.	26,57 après 1 h	Huang *et al.* (2011)
Champignon	Extrait eau	6 mg/ml	100 mg/kg p.o.	-50 après 1 h	Jang *et al.* (2011)

[a]CI_{50} ; concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique (n.d. : non déterminé). .
[b]Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o.: Administration orale ; i.v. : Injection intraveineuse).
[c]Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base (sem. : semaine).
*Hydrolyse pepsique puis par la chymotrypsine et la trypsine.

Tableau 11 : Peptides antihypertenseurs isolés de sources naturelles.

Structure	Origine	CI_{50} (µM)[a]	Dose[b]	Δ PS (mm Hg)[c]	Références
Arg-Phe		93		-24 après 4 h	
Tyr-Trp	Saké	10,5	100 mg/kg p.o.	-28 après 6 h	Saito *et al.* (1994a)
Val-Trp		1,4		-26 après 4 h	
Val-Tyr		7,1		-31 après 6 h	
Asn-Phe		46,3		-54 après 1 h	
Asn-Tyr		32,6		-33 après 3 h	
Gly-Phe		277,9		-21 après 1 h	
Gly-Tyr	Extrait d'ail	72,1	200 mg/kg p.o.	-54 après 4 h	Suetsuna (1998b)
Phe-Tyr		3,74		-29 après 4 h	
Ser-Phe		130,2		-33 après 1 h	
Ser-Tyr		66,3		-50 après 4 h	
Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly	Rubisco d'épinards	4,2	100 mg/kg p.o.	-9,8 après 4 h	
Met-Arg-Trp		0,6	20 mg/kg p.o.	-20 après 2 h	Yang *et al.* (2003)
Met-Arg-Trp-Arg-Asp		2,1	30 mg/kg p.o.	-10 après 2 h	
Ile-Lys-Trp	Muscles de poulet	0,21	60 mg/kg p.o.	-17 après 4 h	Fujita *et al.* (2000)
Leu-Lys-Pro	Muscles de poulet	0,32	60 mg/kg p.o.	-18 après 4 h	
Ile-Thr-Thr-Asn-Pro	Muscles de porc	549,0	1 mg/kg p.o.	-21 après 6 h	Nakashima *et al.* (2002)
Met-Asn-Pro-Pro-Lys	Muscles de porc	945,5	1 mg/kg p.o	23,4 après 6 h	
Ile-Tyr-Pro-Arg-Tyr	Saké	4,1	100 mg/kg p.o.	-19 après 6 h	Saito *et al.* (1994b)
Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gln	Hémoglobine de porc	1,9	50 mg/kg p.o.	-30 après 3h	Mito *et al.* (1996)
Leu-Thr-Ala		85		-19,6 après 2h	
Leu-Thr-Pro	Plasma de cochon	138	50 mg/kg i.v.	-28,2 après 2h	Suetsuna (1991a)
Ser-Leu-Tyr		45		-29.5 après 2h	
Tyr-Thr-Lys		82		-28,9 après 2h	

[a]CI_{50} ; concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique.
[b]Dose requise à la production d'un effet significatif chez le rat SHR (p.o.: Administration orale; i.v. : Injection intraveineuse).
[c]Diminution de la pression systolique (PS) par rapport à la ligne de base.

La RuBisCo (EC : 4.1.1.39) est une protéine relativement abondante dans les plantes. Sa fonction est de catalyser la fixation photosynthétique du CO_2. L'hydrolyse de la protéine Rubisco (issue d'épinards), par la pepsine et la pancréatine, a permis d'obtenir 4 peptides fortement inhibiteurs de l'ECA. Trois d'entre eux (Met-Arg-Trp, Met-Arg-Trp-Arg-Asp et Ile-Ala-Tyr-Lys-Pro-Ala-Gly) ont montré un effet antihypertenseur après administration orale à des rats SHR (Yang *et al.* 2003).

L'hydrolyse pepsique de gelée royale, suivie d'un traitement par la trypsine et la chymotrypsine a permis de produire des peptides fortement inhibiteurs de l'ECA (CI_{50} < 10 µM). Une administration unique par voie orale de cet hydrolysat (1 g/kg) à des rats SHR a diminué leur pression systolique de manière significative après 2 heures (Matsui *et al.* 2002). Il semblerait donc que ces peptides soient formés *in vivo* au cours du processus de digestion dans le tractus gastro-intestinal.

VII.6. Relations structure-activité des peptides inhibiteurs de l'ECA

Les relations structure-activité des peptides inhibiteurs de l'ECA et des inhibiteurs synthétiques de l'ECA ont été très étudiées depuis 30 ans. Des modèles de sites actifs ont été proposés dans le but de synthétiser l'inhibiteur de l'ECA le plus puissant et le plus sélectif possible.

VII.6.1. Structure de l'ECA

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I est une zinc-métallopeptidase capable de cliver les dipeptides C-terminaux de courtes hormones peptidiques. Elle joue un rôle dans la régulation de la pression sanguine *via* la production de l'angiotensine II. La structure tridimensionnelle de l'ECA, complexée avec le lisinopril (un inhibiteur de l'ECA) a été récemment élucidée par cristallographie aux rayons X (Natesh *et al.*, 2003). Schématiquement, son domaine C-terminal (impliqué dans la régulation de la pression sanguine) inclut un site de fixation du Zn^{++} (motif His-Glu-x-x-His) et des sous-sites (ou poches) appelés S_1, S'_1 et S'_2, impliqués dans les interactions avec les substrats ou inhibiteurs de l'ECA (Figure 7).

Pour les substrats peptidiques, la poche S'_1 semble interagir avec l'acide aminé situé à l'avant-dernière position, et la poche S_1 avec l'acide aminé situé en antépénultième position. La fonction carboxylique de la liaison peptidique située entre l'avant-dernier et l'antépénultième acide aminé, interagit avec le motif fixant le Zn^{++} et forme aussi une liaison hydrogène avec le groupement carboxylique de la chaîne du glutamate en position 384 (Brew, 2003). L'ECA est alors capable de cliver la liaison entre les résidus occupant les poches S_1 et S'_1 du substrat.

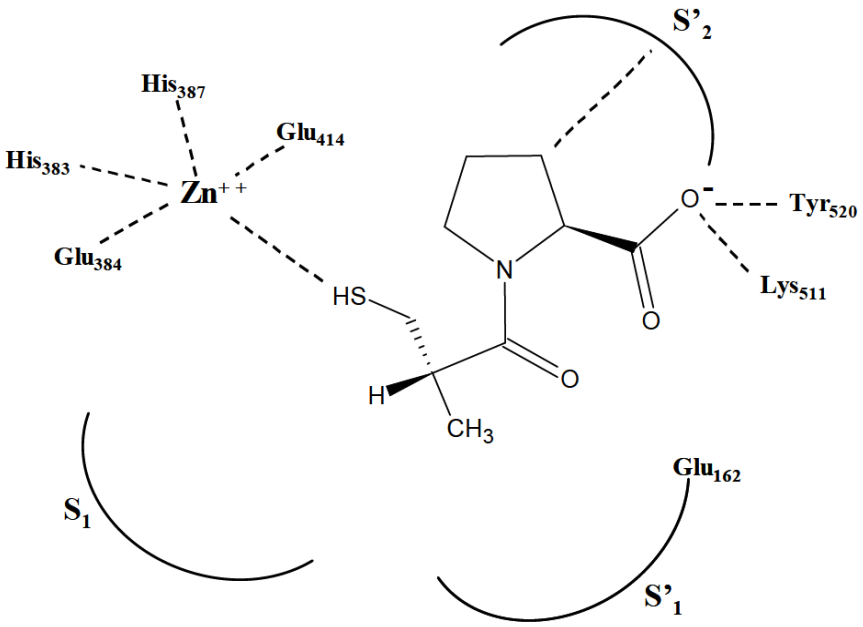


Figure 7 : Modèle de fixation sur le site actif de l'ECA avec l'inhibiteur captopril (N-[(S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L-Proline). Le site catalytique de l'ECA comprend un atome de zinc et son motif de fixation His_{383}-Glu_{384}-x-x-His_{387}. Les interactions non-covalentes entre l'enzyme et le captopril sont représentées en pointillé. Cette représentation schématique a été réalisée selon les modèles proposés par Cushman et Ondetti (1999) et Brew (2003).

VII.6.2. Structure des peptides inhibiteurs de l'ECA

L'étude réalisée par Cheung *et al.* en 1980 a montré que la séquence dipeptidique C-terminale était importante pour la fixation des peptides inhibiteurs à l'ECA. Selon ces auteurs, les acides aminés aromatiques (Trp, Tyr et Phe) et la proline en position C-terminale sont les plus favorables à la fixation. Toujours selon ces mêmes auteurs, les acides aminés à chaîne latérale aliphatique (comme Val et Ile) favorisent la fixation des dipeptides s'ils sont situés en N-terminal du dipeptide. Par contre, une proline en N-terminal ou un acide aminé dicarboxylique en C-terminal diminuent fortement les capacités de fixation des dipeptides à l'ECA (Cushman *et al*., 1973 ; Cheung *et al*., 1980).

En regardant au-delà de la séquence dipeptidique, les résidus situés en amont peuvent aussi jouer un rôle dans la fixation à l'ECA. Ainsi, les acides aminés aromatiques situés en antépénultième position (du côté C-terminal) améliorent la capacité de fixation à l'ECA (Cushman *et al*., 1973 ; Cheung *et al*., 1980). Kawakami *et al*., (1995) ont observé que certains tripeptides de synthèse, différents par leur acide aminé N-terminal, montraient une grande variabilité dans les valeurs des CI_{50}. Les acides aminés aliphatiques (tels que Ala, Val, Leu ou Ile) sont les plus favorables pour montrer une activité inhibitrice (Leu-Lys-Tyr > Met-

Lys- Tyr ; Kawakami *et al*., 1995 ; Suetsuna 1998a). Au regard de la littérature, ces résultats ont été corroborés par ceux de Matsumura *et al.* (1993a) et de Nakamura *et al.* (1995b) qui ont étudié des tripeptides synthétiques. De la même manière, Matsui *et al.* (1999) ont montré que 2 tétrapeptides (Thr-Ala-Pro-Tyr et Thr-Val-Pro-Tyr), différents par leur antépénultième résidu, avaient des valeurs d'CI_{50} distinctes (13,6 et 2,0 µM, respectivement). Pour Miyoshi *et al.* (1991a), une leucine en antépénultième position est plus favorable à la fixation à l'ECA qu'une valine.

Pour les peptides à chaînes longues, il a été démontré que la conformation spatiale du peptide, par exemple sa structure adoptée au niveau du site de fixation de l'ECA, influence considérablement l'inhibition de cette enzyme (Fitzgerald et Meisel, 2000 ; Meisel, 2003). De plus, les petits peptides peuvent exister sous différentes conformations et peuvent adopter des configurations spatiales variables. La configuration des acides aminés est un des facteurs déterminant l'affinité de fixation. Par exemple, le tripeptide L-Val-Ala-Pro dispose d'une CI_{50} de 2 µM, alors que le D-Val-Ala-Pro à une CI_{50} proche de 550 µM (Maruyama *et al*., 1987). De la même manière, L-Phe-Val-Ala-Pro et D-Phe-Val-Ala-Pro ont montré des valeurs de CI_{50} différentes, 10 et 17 µM, respectivement (Maruyama *et al*., 1987).

Toutefois, il est à noter que ces relations structure-activité sont basées sur des expériences *in vitro*. Les études *in vivo* (lorsqu'elles ont été réalisées) ont montré que ces caractéristiques structurales étaient souvent retrouvées pour les peptides ayant une activité antihypertensive. Par exemple, les dipeptides isolés d'hydrolysat d'ail et administrés oralement à des rats SHR (200 mg/kg), ont induit une diminution significative de leur pression systolique (Suetsuna, 1998b). En regardant la structure de ces peptides, chacun d'eux disposait d'un résidu Tyr ou Phe en C-terminal. De plus, ceux disposant du résidu Tyr se sont montrés plus efficaces que ceux disposant du résidu Phe. Matsufuji *et al.* (1995) ont noté que le dipeptide Val-Tyr avait une forte activité inhibitrice vis-à-vis de l'ECA ainsi qu'une activité antihypertensive après injection i.v. à des rats SHR (20 et 50 mg/kg). De même, ce dipeptide a montré une activité antihypertensive chez l'homme après administration chronique orale (6 mg/jour ; Matsui *et al*., 1998). Récemment dans une revue (Fujita *et al.* 2000), la plupart des peptides antihypertenseurs cités, ont montré des caractéristiques structurales similaires à celles mentionnées ci-dessus, à savoir :

- ✓ un résidu hydrophobe et aliphatique en avant-dernière position,
- ✓ et un résidu aromatique ou une proline en position C-terminale.

La plupart des peptides représentés dans les Tableaux 7, 8, 9 et 11 présentent ces caractéristiques structurales, suggérant ainsi que leur effet antihypertenseur semble être lié à l'inhibition de l'ECA.

Résultats & Discussion

Chapitre I :

Protéases digestives de la seiche commune (*Sepia officinalis*)

Article 1:

Balti R, Barkia A, Bougatef A, Ktari N and Nasri M **(2009)**. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization. *Food Chemistry*, 113, 146-154.

Article 2:

Balti R, Hmidet N, Jellouli K, Nedjar-Arroume N, Guillochon D and Nasri M **(2010)**. Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10623-10630.

Article 3:

Balti R, Bougherra F, Bougatef A, Ben Khaled H, Nedjar-Arroume N, Dhulster P, Guillochon D and Nasri M **(2012)**. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptides substrates: purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 130, 475-484.

Les viscères ou organes internes de poissons représentent relativement une large proportion du poids total de l'animal ; approximativement 5-17 % (Gildberg, 1992 ; Aspmo *et al*., 2005 ; Kurtovic *et al*., 2006). Les viscères, un des plus importantes composantes des déchets halieutiques, sont considérés comme une source potentielle d'enzymes digestives et plus particulièrement de protéases qui possèdent des fortes activités dans une large gamme de pH et de température (Cancre *et al*., 1999 ; Shahidi et Kamil, 2001). Les protéases constituent le groupe le plus important des enzymes industrielles utilisées dans le monde et présentent plusieurs applications notamment en industries alimentaires (Garcia-Carreno *et al.*, 1994).

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent les réactions d'hydrolyse de liaisons peptidiques des protéines et des peptides (Simpson, 2000). Elles peuvent être classées en deux grandes catégories : les protéases extracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides facilement assimilables par les cellules, et les protéases intracellulaires qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires et métaboliques. Les protéases (qui hydrolysent des protéines) et peptidases (qui hydrolysent des peptides) peuvent être classées selon trois critères différents : la nature de leur site catalytique, la spécificité du clivage et leur besoin en ATP (Adénosine Triphosphate). Par ailleurs, les protéases peuvent être subdivisées en six sous groupes selon la nature de leur site catalytique (Rao *et al*., 1998). On distingue les métalloprotéases, les protéases à cystéine, les protéases à sérine, les protéases aspartiques, les protéases glutamiques et les protéases à thréonine (Rawlings *et al*., 2008 ; Ward *et al*., 2009). Certaines protéases ont des sites actifs encore non identifié (Sajid et McKerrow, 2002).

Chez les poissons ou les crustacés ces enzymes sont compartimentées dans les cellules ou stockées sous forme de précurseur lorsque ces organismes sont vivants. Après la mort de ces animaux, la compartimentation n'est plus effective et l'ensemble des enzymes présentes joue un rôle dans la dégradation des protéines constitutives. Les protéases digestives de poissons et des invertébrés aquatiques peuvent être classées en deux classes : les protéases acides et les protéases alcalines (Haard et Simpson, 1994). Les classes d'enzymes protéolytiques largement étudiées chez les organismes marins sont les protéases aspartiques (pepsine) et les protéases à sérine (trypsine, chymotrypsine et élastase) (Shahidi et Kamil, 2001). Les protéases acides de poissons présentent une forte activité entre pH 2,0 et 4,0 alors que les protéases alcalines sont plus actives entre pH 8,0 et 10,0 (Simpson, 2000). Les protéases d'origine marine présentent de nombreux avantages par rapport à celles d'origine bactérienne, végétale ou animale, couramment utilisées dans l'industrie. En effet, les enzymes marines se distinguent par leurs conditions optimales d'activité. Elles sont fonctionnelles dans

des solutions fortement salines, possèdent une forte activité catalytique à basse température. Elles présentent également l'avantage d'être thermosensible (Le Gal et Stenberg, 1998).

Auparavant, l'utilisation industrielle des protéases était limitée à quelques applications telle que la fermentation de poissons qui dépend des enzymes endogènes existantes et celles microbiennes contaminantes et à la préparation d'hydrolysats protéiques de poissons pour l'alimentation animale (Stefansson et Steingrimsdottir, 1990 ; Borresen, 1992 ; Haard, 1992).

Récemment, de nombreuses applications industrielles d'enzymes endogènes de poissons ont été développées dans plusieurs pays tels que le Canada, le Danemark, l'Islande, le Japon, la Corée, la Norvège et l'USA. Dans ces pays, les enzymes endogènes sont utilisées pour la préparation des œufs de poissons pour les caviars (Raa, 1990), pour le pelage des calmars (Buga *et al*., 1993) ou encore l'écaillage des ailerons de requin (Gildberg, 1994). De plus, ces enzymes sont encore utilisées dans l'extraction de pigments et la coagulation de protéines (Kolkovski, 2001 ; Cremades *et al.*, 2003).

Pour extraire les protéases digestives endogènes des organismes aquatiques, les co-produits sont traités selon le même protocole de conservation que les parties destinées à la production alimentaire garantissant ainsi leur non-altération. Les principaux co-produits d'animaux marins riches en protéases sont : les viscères entières pour les espèces de petites tailles comme les sardines, le pancréas, le caecum pylorique ou encore l'hépatopancréas pour les invertébrés comme la seiche. Pour les espèces de taille assez importante, les intestins et l'estomac peuvent être séparés. Les protéases digestives peuvent être purifiées à partir des viscères de différentes espèces marines en se basant sur les différences au niveau des propriétés biochimiques des composants biologiques de l'extrait de départ à savoir la solubilité (précipitation avec les sels et les solvants organiques), la masse moléculaire (dialyse, chromatographie sur gel filtration), la charge (chromatographie échangeuse d'ions, électrophorèse) et l'affinité pour un ligand spécifique (chromatographie d'affinité) (Janson et Rydén, 1998).

Plusieurs travaux ont décrit la purification et la caractérisation des trypsines à partir de plusieurs organismes marins tels que : l'émissole lisse (*M. mustelus*) (Bougatef *et al*., 2010b), la sardinelle (*S. aurita*) (Ben-Khaled *et al*., 2008), la sardine du Pacifique (*S. sagax caerulea*) (Castillo-Yanez *et al*., 2005), l'anchois (*E. japonica*) (Heu *et al*., 1995), le saumon (*O. keta*) (Sekizaki *et al*., 2000), le mullet (*M. cephalus*) (Guizani *et al*., 1991), la morue Atlantique (*Gadus moruha*) (Arnt et Walther, 1989), le crabe (*Callinectes sapidus*) (Dendinger et O'Connor, 1990) et le tambour (*Parona signata*) (Pavlisko *et al*., 1997b). Récemment, la purification des chymotrypsines de poissons a été également décrite à partir de plusieurs

espèces telles que : le marbré (*L. mormyrus*) (El Hadj-Ali *et al*., 2010), le bar d'Asie (*L. japonicus*) (Jiang *et al*., 2010), la sardine du Pacifique (*S. sagax caerulea*) (Castillo-Yañez *et al*., 2009) et le carassin (*C. auratus*) (Yang *et al*., 2009).

La pepsine est la protéase digestive acide d'origine marine la plus étudiée. L'isolement de cette protéase a été largement décrit à partir de plusieurs espèces telles que : la dorade (*S. latus Houttuyn*) (Zhou *et al*., 2007), le coelacanthe (*L. chalumnae*) (Tanji *et al*., 2007), le palometa (*P. signata*) (Pavlisko *et al*., 1997a), le thon (*T. thynuus orientalis*) (Tanji *et al*., 1988) et le capelin (*M. villosus*) (Gildberg et Raa, 1983). Par contre, peu de travaux dans la littérature qui rapportent la purification de la cathepsine D, enzyme homologue de la pepsine, chez les invertébrés aquatiques. Récemment, une nouvelle cathepsine D appelée «Todarepsin» a été purifiée à partir de l'hépatopancréas de l'encornet (*T. pacificus*) (Komai *et al*., 2004).

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à l'extraction, la purification et la caractérisation biochimique de trois protéases endogènes digestives de la seiche commune (*S. officinalis*). Nos travaux ont porté essentiellement sur la trypsine, la chymotrypsine et la cathepsine D.

Purification et caractérisation biochimique d'une trypsine thermostable à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*)

Rafik Balti, Ahmed Barkia, Ali Bougatef, Naourez Ktari, Moncef Nasri

Les trypsines des vertébrés marins, spécialement celles de poissons, ont été largement étudiées. Par contre, peu de travaux notamment qui s'intéressent à la purification et la caractérisation biochimique des trypsines d'invertébrés aquatiques sont décrits dans la littérature. L'objectif de ce travail consiste à extraire, purifier et caractériser la trypsine à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*).

Après la préparation d'une poudre acétonique à partir de cet organe, le protocole expérimental de purification comporte cinq étapes : une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (20-60 %), une filtration sur Sephadex G-100, une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-cellulose, une deuxième filtration sur Sephadex G-75 et une chromatographie échangeuse d'anions sur Mono Q-Sepharose. Le facteur de purification et le rendement final sont de l'ordre de 26,7 et 21,8 %, respectivement.

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes, montre que l'enzyme purifiée présente une seule bande qui correspond à une masse moléculaire de l'ordre de 24 kDa. La pureté de la trypsine a été évaluée par électrophorèse dans les conditions natives associée à un zymogramme. Le résultat obtenu a montré que la trypsine présente une seule bande protéique qui correspond à un seul halo de dégradation de la caséine. Ce résultat prouve d'une part que la trypsine de la seiche commune (*S. officinalis*) a été purifiée à homogénéité, et d'autre part l'absence des isoformes pour cette enzyme.

L'enzyme purifiée présente une activité estérasique sur *N*-α-benzoyl-$_{L}$-arginine éthyl ester (BAEE) et une activité amidasique sur *N*-α-benzoyl-$_{DL}$-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), substrats spécifiques de la trypsine, de l'ordre de 21,2 U/mg et 3,12 U/mg, respectivement. La trypsine de la seiche commune (*S. officinalis*) est 6,8 fois plus active sur un substrat ester que sur un substrat amide. Cette protéase est complètement inhibée par l'SBTI (inhibiteur spécifique de la trypsine) et par les inhibiteurs spécifiques des protéases à serine : le PMSF et le benzamidine. Ces résultats confirment que l'enzyme purifiée est une protéase à serine et particulièrement elle appartient à la famille des trypsines.

L'enzyme purifiée possède des optima de pH et de température de 8,0 et 70 °C, respectivement. Elle est active à des pH allant de 5,0 à 10,0. L'activité relative à pH 9,0 est de l'ordre de 72 %. La trypsine de la seiche commune est très stable à des pH allants de 7,0 à 10,0. En effet, elle retient 100 % de son activité initiale dans cette gamme de pH. A des pH 11,0 et 12,0, la trypsine retient plus que 60 % de son activité initiale. La thermostabilité de la trypsine purifiée a été également examinée. L'étude de la thermostabilité a montré que l'enzyme purifiée est hautement stable à des températures inférieures à 50 °C, cependant elle est totalement inactivée à des températures supérieures ou égales à 70 °C. Les activités résiduelles enregistrées après 60 min de pré-incubation à 50 et 60 °C sont de l'ordre de 90 % et 57 %, respectivement. La trypsine de *S. officinalis* se présente très sensible aux métaux lourd (Cu^{2+} et Zn^{2+}).

La séquence N-terminale de la trypsine est **IVGGKESSPYNQ**. L'alignement de cette séquence avec les séquences publiées a permis de noter une forte identité avec les trypsines des invertébrés marins. Toutefois, la trypsine de *S. officinalis* possède un résidu chargé (Glu) à la position 6 alors que la Thr est la largement décrite à la même position chez les trypsines pancréatiques des mammifères. Contrairement à la trypsine pancréatique bovine qui possède un pont S-S entre la Cys-7 et la Cys-142 et les autres trypsines des vertébrés qui conserve la Cys-7, la trypsine de la seiche commune possède une sérine à la position 7 ce qui prouve l'absence de pont disulfure entre la Cys-7 et la Cys-142 en comparaison aux autres trypsines des mammifères décrites dans la littérature. Ce résultat suggère la présence des différences structurales entre les trypsines des invertébrés et des vertébrés.

Les paramètres cinétiques (K_m et K_{cat}) de la trypsine purifiée, déterminés sur le BAPNA, sont de l'ordre de 0,064 mM et 2,32 s^{-1} respectivement, avec une efficacité catalytique (K_{cat}/K_m) égale à 36,25 $s^{-1}mM^{-1}$.

Article 1:

Heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization.

Balti Rafik, Barkia Ahmed, Bougatef Ali, Ktari Naourez & Nasri Moncef (2009). *Food Chemistry*, 113, 146-154.

Food Chemistry 113 (2009) 146–154

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation

Rafik Balti, Ahmed Barkia, Ali Bougatef, Naourez Ktari, Moncef Nasri *

Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie-Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, B.P. "W" 3038 Sfax, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 May 2008
Received in revised form 14 June 2008
Accepted 21 July 2008

Keywords:
Biochemical characterisation
Purification
Cuttlefish
Sepia officinalis
Trypsin
Hepatopancreas

ABSTRACT

Thermostable trypsin from the hepatopancreas of *Sepia officinalis* was purified by fractionation with ammonium sulphate, Sephadex G-100 gel filtration, DEAE-cellulose an ion-exchange chromatography, Sephadex G-75 gel filtration and Q-Sepharose anion-exchange chromatography, with a 26.7-fold increase in specific activity and 21.8% recovery. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 24,000 Da by SDS-PAGE and size exclusion chromatography. The purified enzyme showed esterase specific activity on *N*α -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) and amidase activity on *N*α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA). The optimum pH and temperature for the enzyme activity were pH 8.0 and 70 °C, respectively, using BAPNA as a substrate. The enzyme was extremely stable in the pH range 6.0–10.0 and highly stable up to 50 °C after 1 h of incubation. The purified enzyme was inhibited by soybean trypsin inhibitor (SBTI) and phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), a serine-protease inhibitor. The N-terminal amino acid sequence of the first 12 amino acids of the purified trypsin was **IVGGKESSPYNQ**. *S. officinalis* trypsin, which showed high homology with trypsins from marine vertebrates and invertebrates, had a charged Lys residue at position 5 and a Ser residue at position 7, where Tyr and Cys are common in all marine vertebrates and mammalian trypsins. Further, the enzyme had an Asn at position 11, not found in any other trypsins.

The trypsin kinetic constants, K_m and k_{cat} for BAPNA, were 0.064 mM and 2.32 s^{-1}, respectively, while the catalytic efficiency k_{cat}/K_m was 36.3 s^{-1} mM^{-1}.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In several of the major fish-producing countries, the by-products of seafood harvesting comprise about 50% of the entire harvest. These materials, which represent an environmental problem to the fishing industry, constitute an important source of proteins and enzymes, especially digestive proteases. Proteases have diverse applications in a wide range of industries, such as the detergent, food, pharmaceutical, leather and silk industries (Gupta, Beg, & Lorenz, 2002).

In recent years, recovery and characterisation of proteolytic enzymes, from the internal organs of fish and aquatic invertebrates, have been reported and this has led to the emergence of some interesting new applications of these enzymes in food processing (Shahidi & Kamil, 2001). The digestive proteases are involved in the hydrolysis of dietary proteins and do not play a role in protein turnover within an organism. The most important digestive enzymes from fish and aquatic invertebrate viscera are the aspartic protease pepsin, and serine proteases, trypsin, chymotrypsin, collagenase and elastase. Acidic proteases from fish stomachs display high activity between pH 2.0 and 4.0, while alkaline digestive proteases, such as trypsin, are most active between pH 8.0 and 10.0. Trypsin (EC 3.4.21.4) is a ubiquitous serine protease in animal digestive glands and is commonly synthesized as a proenzyme by pancreatic acinar cells (Kossiakoff, Chambers, Kay, & Stroud, 1977; Walsh, 1970). Trypsins specifically hydrolyse proteins and peptides at the carboxyl group of arginine and lysine residues and play major roles in biological processes, including digestion and activation of zymogens of chymotrypsin and other enzymes.

Trypsin and trypsin-like proteolytic enzymes have been isolated and characterised from the viscera of some marine invertebrates and a wide range of cold water and warm water fish, including the digestive gland (hepatopancreas) of the white shrimp (*Penaeus setiferus*) (Gates & Travis, 1969) and crayfish (*Astacus fluviatilis*) (Titani et al., 1983), the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) (Klomklao, Benjakul, Visessanguan, Kishimura, & Simpson, 2007a) and yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) (Klomklao et al., 2006), the pyloric caeca of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Kurtovic, Marshall, & Simpson, 2006), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Bezerra et al., 2001) and Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) (Castillo-Yanez, Pacheco-Aguilar,

* Corresponding author. Tel.: +216 74 274088; fax: +216 74 275595.
E-mail addresses: mon_nasri@yahoo.fr, moncef.nasri@enis.rnu.tn (M. Nasri).

0308-8146/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.059

Garcia-Carreno, & Toro, 2005) and the entire viscera of true sardine (*S. melanostictus*) (Kishimura, Hayashi, Miyashita, & Nonami, 2006), japanese anchovy (*Engraulis japonica*) (Kishimura, Hayashi, Miyashita, & Nonami, 2005) and sardine (*Sardina pilchardus*) (Bougatef, Souissi, Fakhfakh, Ellouz-Triki, & Nasri, 2007).

Marine vertebrate trypsins, especially those of fish, have been well characterised. However, few studies have been done on trypsins from marine invertebrates. The characteristics of the enzymes from marine invertebrates resemble those of mammalian and fish trypsins in molecular weight, cleavage specificities, pH stability and reaction with inhibitors.

Cuttlefish (*Sepia officinalis*) is relatively important in the fish-catches in Tunisia, and is utilised for human consumption. During processing, solid wastes are generated. These wastes, which may represent 30% of the raw material, constitute an important source of proteolytic enzymes and proteins. Traditionally, fish processing by-products have been converted to powdered fish flour for animal feed, fertilizer and fish silage (Gildberg & Almas, 1986). However, most of these products have low economic value. Novel processing methods are needed to convert the cuttlefish processing by-products into more profitable and marketable products. One way is to produce powders used as a substrate of fermentation for microbial growth and bioproduct production. In a previous paper, Souissi, Ellouz-Triki, Bougatef, Blibech, and Nasri (2008) showed that protease synthesis is strongly induced when bacterial strains are grown in media containing cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-product powder as a complex carbon source. Balti et al. (2008) showed that selective enzymatic hydrolysis of cuttlefish by-product proteins improved their functional and biological activities.

In the present study, we describe the purification of trypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*S. officinalis*), and provide basic information about its main biochemical and kinetic characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Casein sodium salt from bovine milk, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), *N*α-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE), benzamidine, trichloroacetic acid, glycine, ammonium sulphate, bovine serum albumin and protein markers for molecular weights 14,000–66,000 Da were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Soybean trypsin inhibitor (SBTI) and *N*α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) were obtained from Fluka Biochemica (USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS), acrylamide, ammonium persulphate, N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) and Coomassie Brilliant Blue R-250 were from Bio-Rad Laboratories (Mexico). Sephadex G-100 and G-75, Sepharose mono Q and diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose were from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). PVDF membrane was purchased from Applied Biosystems (Roissy, France). Tris (hydroxymethyl) aminomethane was procured from Panreac Quimica SA (Spain). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Cuttlefish viscera

Cuttlefish (*S. officinalis*) were obtained from the fish market of Sfax City, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1:3 (w/w) and transported to the research laboratory within 30 min. The internal organs were separated and only the hepatopancreas was collected and then stored in sealed plastic bags at −20 °C until used for enzyme extraction.

2.3. Preparation of crude enzyme extract

Hepatopancreas samples from *S. officinalis* were washed with water then with buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 8.0). The cleaned hepatopancreas (64 g) was defatted by homogenisation with cold acetone for 30 s in a tissue homogenizer. The homogenate was filtered. The acetone-insoluble material was washed several times with cold acetone, and then dried at room temperature overnight. The acetone dried powder was homogenised for 2 h with buffer A at 4 °C (ratio of 1:10). The precipitate was removed by centrifugation at 8,500 × *g* for 30 min at 4 °C, and the supernatant obtained was collected and used as the crude protease extract.

2.4. Trypsin purification

2.4.1. Ammonium sulphate precipitation

The crude protease extract was subjected to ammonium sulphate fractionation (0–20%, 20–60% and 60–80%). The precipitates obtained after centrifugation at 13,000 × *g* for 30 min were suspended in buffer A and dialysed for 24 h at 4 °C against repeated changes in the same buffer (after 8 and 16 h).

2.4.2. Sephadex G-100 gel filtration

The dialysed precipitate between 20% and 60% saturation was subjected to gel filtration on a Sephadex G-100 column (2.6 cm × 150 cm) equilibrated with buffer B (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 0.5‰ Triton X-100). Fractions of 5 ml were eluted at a flow rate of 30 ml/h with the same buffer. Protein content (Abs 280 nm) and trypsin activity were determined. Fractions showing protease activities were pooled.

2.4.3. DEAE-cellulose anion-exchange chromatography

The active fractions from the Sephadex G-100 were applied to a DEAE-cellulose column (2 cm × 25 cm) previously equilibrated with buffer C (25 mM Tris-HCl, pH 8.0). After being washed with the same buffer, bound proteins were eluted with a linear gradient of NaCl, in the range 0–0.5 M, in the equilibrating buffer. Fractions of 5 ml were collected at a flow rate of 70 ml/h. The fractions with high trypsin activities were pooled.

2.4.4. Sephadex G-75 gel filtration

The active fractions from DEAE-cellulose were concentrated by ultrafiltration using 10 kDa membrane, then applied to gel filtration on a Sephadex G-75 column (2.5 cm × 90 cm) pre-equilibrated with buffer B and eluted at a flow rate of 30 ml/h with the same buffer. Protein content (Abs 280 nm) and trypsin activity were measured.

2.4.5. Q-Sepharose anion-exchange chromatography

Fractions from the Sephadex G-75 showing protease activities were pooled and applied to a Q-Sepharose column (2 cm × 10 cm) previously equilibrated with buffer C (25 mM Tris-HCl, pH 8.0). Cationic proteins were washed out in the unadsorbed fractions. After being washed with the same buffer, adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of NaCl (0-0.5 M) in the equilibrating buffer. Fractions (5 ml) showing trypsin activities were collected at a flow rate of 60 ml/h. The fractions showing protease activities were pooled and stored at −20 °C for further analyses. All the purification steps were conducted at temperatures not exceeding 4 °C.

2.5. Assay for trypsin activity

2.5.1. Amidase activity

Amidase activity was measured according to the method of Erlanger, Kokowsky, and Cohen (1961), modified by Benjakul, Visessanguan, and Thummaratwasik (2000), using BAPNA as a

substrate. To initiate the reaction, 200 μl of trypsin, with an appropriate dilution, was added to the preincubated reaction mixture containing 1000 μl of 0.5 mM BAPNA in reaction buffer (0.1 M tris-HCl, pH 8.0) and 200 μl of distilled water and mixed thoroughly. The mixture was incubated for 10 min at 25 °C. The enzymatic reaction was terminated by adding 200 μl of 30% (v/v) acetic acid. The reaction mixture was centrifuged at 8000 × *g* for 3 min at room temperature. Trypsin activity was measured by the absorbance at 410 nm due to *p*-nitroaniline released. Trypsin amidase activity was then calculated using the following formula:

$$\text{Activity}(\text{U/ml}) = \frac{(\text{A} - \text{A}_\text{o}) \times \text{Final volume of the mixture}(\text{ml}) \times 1000}{8800 \times \text{Time of the reaction}(\text{min}) \times 0.2(\text{ml})}$$

where 8800 M^{-1} cm^{-1} is the extinction coefficient of *p*-nitroaniline; A and A_0 are A_{410} of the sample and the blank, respectively.

2.5.2. Esterase activity

Esterase activity was evaluated according to Blanco and Guisan (1988), using BAEE as a substrate. Two hundred and fifty microlitres of enzyme solution were added to 2.5 ml of 0.5 mM BAEE in 50 mM phosphate buffer, pH 7.6, and the increase in absorbance at 253 nm was measured every 30 s for 10 min. One enzyme activity unit was calculated as the amount of enzyme that hydrolyses 1 μmol of BAEE in 1 min under the conditions described.

2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis and zymography

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out for the determination of purity and molecular weight of the purified enzyme, as described by Laemmli (1970), using 5% (w/v) stacking and 15% (w/v) separating gels. Samples were prepared by mixing the purified enzyme at 1:5 (v/v) ratio with distilled water containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.5% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue. Samples were heated at 100 °C for 5 min before electrophoresis. After electrophoresis, the gels were stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 45% ethanol, 10% acetic acid and destained with 5% ethanol and 7.5% acetic acid. The molecular weight of the enzyme was estimated using a low molecular weight calibration kit as markers. The molecular mass markers used were: bovine serum albumin (66,000 Da), glyceraldehyde-3-dehydrogenase (36,000 Da), carbonic anhydrase (29,000 Da), bovine trypsinogen (24,000 Da) and bovine α-lactoalbumin (14,200 Da).

Native-PAGE was performed according to the procedure of Laemmli (1970), except that the sample was not heated and SDS and reducing agent were left out.

Zymography was performed on native-PAGE. Briefly, after electrophoresis, the gel was submerged in 1% casein in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and incubated at 37 °C for 90 min. After washing, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250 for zymography analysis. A clear zone on the blue background indicated the presence of proteinase.

2.7. Determination of the N-terminal amino acid sequence of S. officinalis trypsin

The purified enzyme, from Q-Sepharose anion-exchange chromatography, was applied to SDS-PAGE and electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. After brief staining with Coomassie Brilliant Blue R-250, the PVDF band corresponding to the trypsin was excised and the N-terminal amino acid sequence was determined by the Edman degradation method on an ABI Procise 494 protein sequencer (Applied Biosystems).

2.8. Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard and, during the course of enzyme purification, by measuring the absorbance at 280 nm.

2.9. Biochemical properties

2.9.1. Effect of pH on activity and stability of the trypsin

Trypsin activity was assayed over the pH range 4.0 to 12.0 at 25 °C for 10 min, using BAPNA as a substrate. The effect of pH on enzyme stability was evaluated by measuring the residual enzyme activity after incubation at various pHs for 60 min at 25 °C. The following buffer systems were used: 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.0–6.0; 100 mM phosphate buffer, pH 7.0; 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0; 100 mM glycine-NaOH, pH 9.0–12.0.

2.9.2. Effect of temperature on activity and stability of trypsin

Enzyme activity was assayed at different temperatures ranging from 20 to 85 °C, using BAPNA as a substrate. The assay was conducted at pH 8.0 for 10 min. For thermal stability, the enzyme was incubated at different temperatures for 60 min. The residual activity was assayed using BAPNA as a substrate at pH 8.0 and 25 °C for 10 min. The non-heated enzyme was considered as the control (100%).

2.9.3. Effects of enzyme inhibitors

The effects of enzyme inhibitors on trypsin activity were studied using phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), soybean trypsin inhibitor (SBTI), benzamidine, pepstatin A, β-mercaptoethanol and ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA). The purified enzyme was preincubated with inhibitors for 30 min at 25 °C and then the remaining enzyme activity was estimated using BAPNA as a substrate. The activity of the enzyme assayed in the absence of inhibitors was taken as 100%.

2.9.4. Effect of metal ions

The effects of various metal ions (5 mM) on enzyme activity were investigated by adding monovalent (Na^+ and K^+) and divalent metal ions (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}) to the reaction mixture. The activity of the enzyme in the absence of any additives was taken as 100%.

2.9.5. Effect of NaCl concentration

Trypsin activity was assayed in the presence of NaCl at various concentrations (0–30% (w/v)). The relative enzyme activity was determined at 25 °C for 10 min, using BAPNA as a substrate.

2.9.6. Kinetic studies

The activity of the purified enzyme was evaluated at 25 °C with different final concentrations of BAPNA, ranging from 0 to 2000 μM. The final enzyme concentration of the assay was 0.007 mg/ml. The determinations were repeated twice and the respective kinetic parameters, including K_m and V_{max}, were calculated from Lineweaver–Burk plots (Lineweaver & Burk, 1934).

The value of the turnover number (k_{cat}) was calculated from the following equation: $k_{cat} = V_{max}/[E]$, where [E] is the active enzyme concentration and V_{max} is the maximal velocity.

3. Results and discussion

3.1. Trypsin purification

Trypsin from the hepatopancreas of *S. officinalis* was extracted and purified successively by the five-steps procedure described

Table 1
A summary of the purification of trypsin from cuttlefish (*S. officinalis*)

Purification steps	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purity (fold)
Crude extract	140	1193	0.117	100	1
Ammonium sulphate precipitation (20-60%)	106	279	0.379	75.4	3.2
Sephadex G-100	83.3	111	0.747	59.5	6,4
DEAE-cellulose	67.7	57.5	1.177	48.4	10
Sephadex G-75	45.9	21.5	2.13	32.8	18.2
Q-Sepharose	30.5	9.79	3.12	21.8	26.7

All operations were carried out at 4 °C. Only precipitate formed between 20% and 60% saturation with ammonium sulphate was subjected to gel filtration on Sephadex G-100.

in Section 2. In the first step, the crude enzyme extract was fractionated with ammonium sulphate. The fraction F2 (20–60% (w/v) saturation) showed higher specific activity 0.379 U/mg than those of F1 (0–20%; 0.023 U/mg) and F3 (60–80%; 0.056 U/mg). No activity was detected in the final supernatant. The 20–60% ammonium sulphate precipitate, which gave the highest specific activity, was successively subjected to Sephadex G-100 gel filtration, DEAE-cellulose ion-exchange chromatography, Sephadex G-75 gel filtration and finally to Q-Sepharose anion-exchange chromatography (data not shown).

The results of the purification procedure are summarised in Table 1. After the final purification step, the trypsin was purified 26.7-fold, with a recovery of 21.8% and a specific activity of 3.12 and 21.2 U/mg, using BAPNA and BAEE as substrates, respectively.

3.2. Purity and molecular weight

The purified trypsin was homogeneous on SDS-PAGE and its molecular weight was estimated to be 24,000 Da (Fig. 1), corresponding to that determined by gel filtration (data not shown). Fish trypsins have been reported to have molecular masses in the range 23–28 kDa. The molecular weight of *S. officinalis* trypsin was similar to those of other fish species, such as white shrimp (*P. setiferus*) (Gates & Travis, 1969), walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) (Kishimura, Klomklao, Benjakul, & Chun, 2008), true sardine (*S. melanostictus*) and arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*) (Kishimura et al., 2006), jacopever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*) (Kishimura et al., 2007), yellowfin tuna (*T. albacores*) (Klomklao et al., 2006), skipjack tuna (*K. pelamis*) (Klomklao et al., 2007a) and sardine (*S. pilchardus*) (Bougatef et al., 2007).

The purity of the isolated trypsin was also evaluated by using native-PAGE. The trypsin migrated as a single protein band in native-PAGE (Fig. 2), confirming the homogeneity of the enzyme. The proteolytic activity of this protein band was confirmed by zymogram. As shown in Fig. 2, only one clear band of casein hydrolysis was observed, indicating the homogeneity of the trypsin.

3.3. N-terminal amino acid sequence of S. officinalis trypsin

The 12 N-terminal amino acids of the *S. officinalis* trypsin were determined to be **IVGGKESSPYNQ**. The N-terminal amino acid sequence of *S. officinalis* trypsin showed uniformity, indicating that

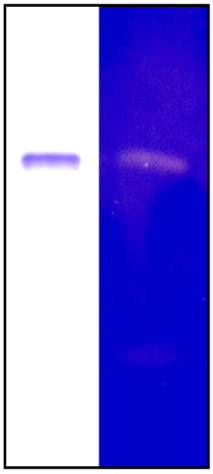


Fig. 2. Native-PAGE (lane 1) and zymogram (lane 2) of the purified trypsin from *S. officinalis* hepatopancreas.

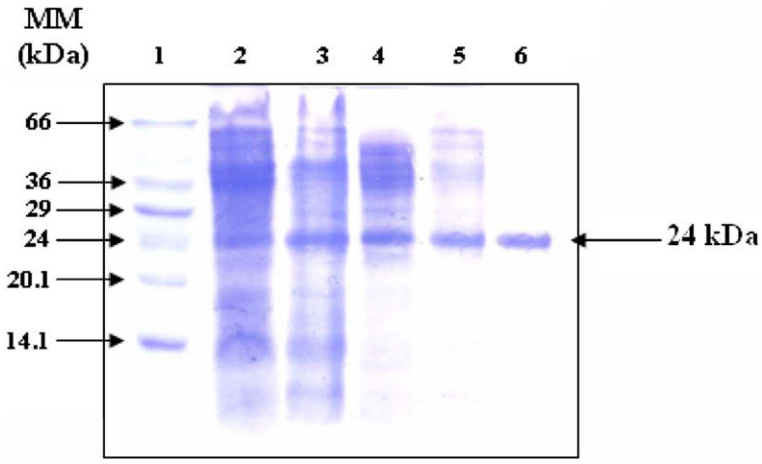


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified trypsin from *S. officinalis* hepatopancreas. Lane 1: standard proteins marker of different molecular weights; lane 2: crude enzyme extract; lane 3: enzyme through Sephadex G-100; lane 4: enzyme through DEAE-cellulose; lane 5: enzyme through Sephadex G-75; lane 6: purified trypsin.

Invertebrate												
Cuttlefish (*S. officinalis*)	I	V	G	G	K	E	S	S	P	Y	N	Q
Starfish (*A. amurensis*)	I	V	G	G	K	E	S	S	P	H	S	R
Starfish (*A. pectinifera*)	I	V	G	G	H	E	F	-	-	-	-	-
Snail (*B. glabrata*)	I	V	G	G	K	E	S	M	P	Y	T	W
Vertebrate												
Antarctic fish (*P. magellanica*)	I	V	G	G	K	E	C	S	P	Y	S	Q
Sardine (*S. pilchardus*)	I	V	G	G	Y	E	C	Q	K	Y	S	Q
Japanese anchovy (*E. japonica*) (TR- II)	I	V	G	G	Y	E	C	Q	P	Y	S	Q
True sardine (TR-S) (*S. melanostictus*)	I	V	G	G	Y	E	C	K	A	Y	S	Q
Arabesque greenling (TR-P) (*P. azonus*)	I	V	G	G	Y	E	C	T	P	H	T	Q
Jacopever (TR-J) (*S. schlegellii*)	I	V	G	G	Y	E	C	K	P	Y	S	Q
Common carp (*C. carpio*) (trypsin A)	I	V	G	G	Y	E	X	E	P	Y	S	T
Common carp (*C. carpio*) (trypsin B)	I	V	G	G	Y	E	X	T	P	H	S	Q
Mandarin fish (*S. chuasti*)	I	V	G	G	Y	E	C	E	A	H	-	-
Walleye pollok (*T. chalcogramma*)	I	V	G	G	Y	E	C	T	K	H	S	Q
Bluefish (*P. saltatrix*)	I	V	G	G	Y	E	C	K	P	K	S	A
Mammal												
Rat	I	V	G	G	Y	T	C	P	E	H	S	V
Dog	I	V	G	G	Y	T	C	S	A	N	S	V
Bovine	I	V	G	G	Y	T	C	G	A	N	T	V
Porcine	I	V	G	G	Y	T	C	A	E	N	S	V
Human	I	V	G	G	Y	N	C	E	E	N	S	V

Fig. 3. Alignment of the N-terminal amino acid sequence of the purified trypsin from cuttlefish (*S. officinalis*) with the sequences of other trypsins. Amino acid residues identical to *S. officinalis* trypsin are shaded. Cuttlefish, *S. officinalis* trypsin (present study); starfish (*Asterias amurensis*) (Kishimura & Hayashi, 2003); starfish (*A. pectinifera*) (Kishimura & Hayashi, 2002); snail (*Biomphalaria glabrata*) (Salter, Lim, Hansell, Hsieh, & McKerrow, 2000); Antarctic fish (*P. magellanica*) (Genicot et al. 1996); sardine (*S. pilchardus*) (Bougatef et al. 2007); japanese anchovy (TR-II) (*E. japonica*) (Kishimura et al., 2005); true sardine (TR-S) (*S. melanostictus*) and arabesque greenling (TR-P) (*P. azonus*) (Kishimura et al., 2006a); jacopever (TR-J) (*Sebastes schlegellii*) (Kishimura et al., 2007); common carp (*Cyprinus carpio*) (Cao et al., 2000); mandarin fish (*Siniperca chuasti*) (Lu et al., 2008); walleye pollok (*T. chalcogramma*) (Kishimura et al., 2008); bluefish (*Pomatomus saltatrix*) (Klomklao, Benjakul, Visessanguan, Kishimura, & Simpson, 2007b); rat (MacDonald et al., 1982); dog (Pinsky, LaForge, & Scheele, 1985); bovine (LeHuerou et al., 1990); porcine (Hermodson, Ericsson, Neurath, & Walsh, 1973); human (Emi et al., 1986).

it was isolated in a pure form and, if other isoforms were present, their amounts must be small.

The N-terminal amino acid sequence of *S. officinalis* trypsin was aligned with the sequences of other animal trypsins (Fig. 3). The N-terminal four amino acid sequence of *S. officinalis* trypsin (**IVGG**) was identical and conserved with all other animal trypsins. The sequence of *S. officinalis* showed high homology with Antarctic fish (*Paranotothenia magellanica*) trypsin (Genicot, Rentier-Delrue, Edwards, VanBeeumen, & Gerday, 1996). There are only 2 amino acid residues in the 12-terminal sequence that differ in the two sequences. The sequence of *S. officinalis* also showed high homology with trypsins from marine invertebrates. Like the marine vertebrates, *S. officinalis* trypsin had a charged Glu residue at position 6, where Thr is most commonly found in mammalian pancreatic trypsins (Emi et al., 1986; MacDonald, Stary, & Swift 1982).

Interestingly, *S. officinalis* trypsin had a charged Lys residue at position 5, where Tyr is common in marine vertebrates and mammalian trypsins, and had an Asn residue at position 11, where Ser or Thr are common in all other trypsins.

Bovine pancreatic trypsin (LeHuerou, Wicker, Guilloteau, Toullec, & Puigserver, 1990) has a disulfide bond between Cys-7 and Cys-142 and the other vertebrate trypsins also possess the Cys-7 (Fig. 3). However, as shown in Fig. 3, the Cys residue was replaced by Ser in cuttlefish trypsin.

3.4. Effect of enzyme inhibitors on trypsin activity

Proteases can be classified by their sensitivity to various inhibitors (North 1982). In order to determine the nature of the purified protease, the effects of different enzyme inhibitors, e.g. a chelating agent and a specific group reagent, on the protease activity were investigated (Table 2).

Trypsin from *S. officinalis* was strongly inhibited by the well-known trypsin inhibitor investigated, namely, SBTI and also by PMSF and benzamidine. On the other hand, pepstatin A and EDTA (that are specific for aspartic acid and metalloproteinase, respectively) were practically without influence on the activity of the enzyme. These results indicate that the *S. officinalis* enzyme is a serine-protease and belongs to the trypsin family.

Table 2
Effect of various enzyme inhibitors on the activity of the purified trypsin from hepatopancreas of cuttlefish (*S. officinalis*)

Inhibitors	Concentration (mM)	Remaining activity (%)
None	-	100
PMSF	1	39
	5	0
EDTA	1	100
	5	100
Benzamidine	1	77.8
	5	45
ß-mercaptoethanol	5	100
SBTI	1 mg/ml	0
Pepstatin A	1	100

Purified enzyme was pre-incubated with various enzyme inhibitors for 30 min at 25 °C and the remaining activity was determined at pH 8.0 and 25 °C.
Enzyme activity measured in the absence of any inhibitor was taken as 100%.

3.5. Specific activity of cuttlefish trypsin

Amidase (BAPNA) and esterase (BAEE) specific activities of the purified trypsin were evaluated. Cuttlefish trypsin showed a specific activity of 21.2 U/mg on the ester substrate, and 3.12 U/mg on the amide substrate, indicating a hydrolysis of BAEE 6.8 times faster than that of BAPNA. These results are in agreement with those of trypsin from Monterey sardine (*S. sagax caerulea*), which showed esterase activity 4.5-times higher than amidase specific activity (Castillo-Yanez et al., 2005).

3.6. Effect of pH on activity and stability of cuttlefish trypsin

The pH activity profile of the purified cuttlefish trypsin is shown in Fig. 4a. The purified enzyme was active between pH 5.0 and 10.0, with an optimum around pH 8.0. The relative activities at pH 7.0, 9.0 and 10.0 were about 60.6%, 72% and 25%, respectively, of that at pH 8.0. However, as shown in Fig. 4a, trypsin activity decreased significantly above pH 9.0 and was only 6% at pH 11.0. The sharp decrease in hydrolysis of BAPNA by purified trypsin at low and high pHs might be attributed to irreversible protein denaturation.

The pH stability showed that the cuttlefish trypsin was highly stable over a broad pH range, maintaining over 100% of its original activity between pH 7.0 and 10.0, and more than 60% of its activity at pH 11.0 and 12.0 (Fig. 4b). The pH stability of cuttlefish trypsin was higher than that of Monterey sardine trypsin, which was stable in the pH range 7.0–8.0 (Castillo-Yanez et al., 2005). However, cuttlefish trypsin was unstable at below pH 6.0. No activity was found after incubation at pH 4.0 for 60 min, suggesting irreversible denaturation of trypsin at acidic pHs.

3.7. Effect of temperature on the activity and stability of cuttlefish trypsin

The effect of temperature on activity was determined by assaying enzyme activity at different temperatures (Fig. 5a). The trypsin from cuttlefish was active at temperatures from 20 to 85 °C, with an optimum around 70 °C. The relative activities at 60, 65 and

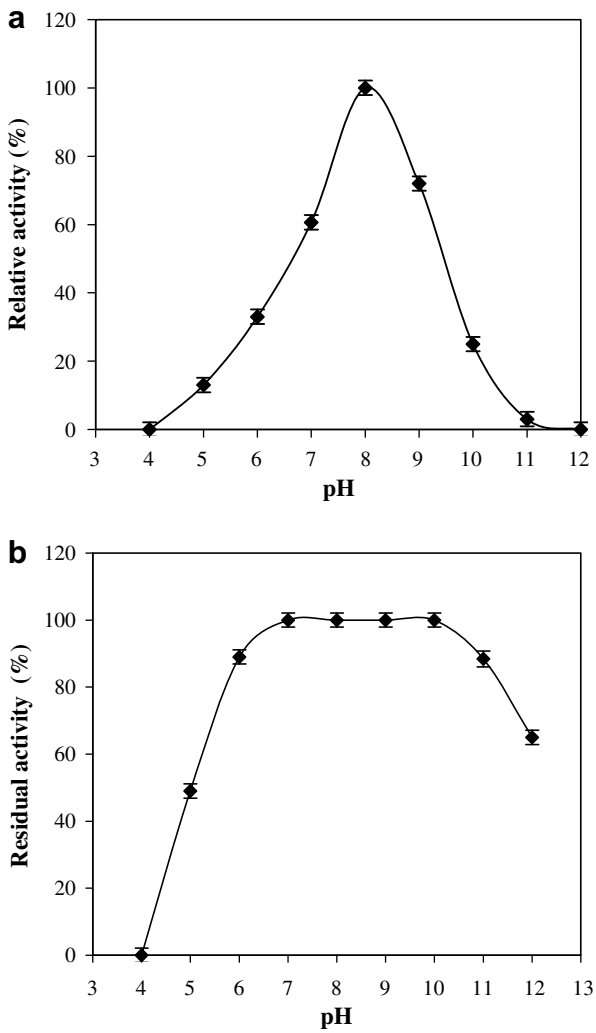


Fig. 4. pH profile (a) and pH stability (b) of the purified trypsin from cuttlefish (*S. officinalis*) hepatopancreas. Trypsin activity was assayed in the pH range from 4.0 to 12.0 at 25 °C. The maximum activity obtained at pH 8.0 was considered as 100% activity. The pH stability of the enzyme was determined by incubating the enzyme in different buffers for 60 min at 25 °C and the residual enzyme activity was determined at pH 8.0 and 25 °C using BAPNA as a substrate. The activity of the enzyme before incubation was taken as 100%. Buffer solutions used for pH activity and stability are presented in Section 2.

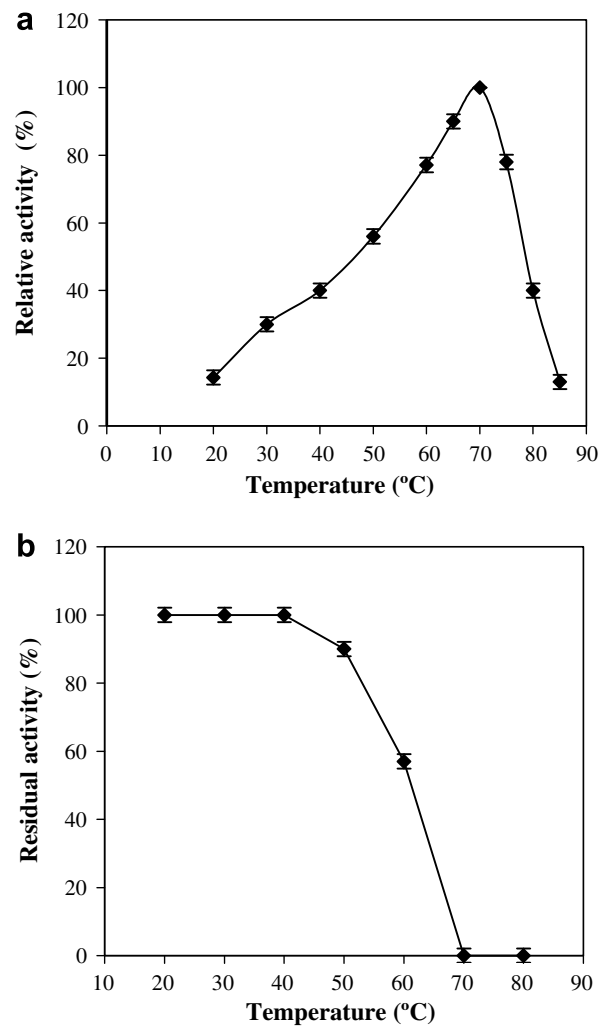


Fig. 5. Temperature profile (a) and thermal stability (b) of the purified trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*S. officinalis*). Enzyme activity was assayed at different temperatures ranging from 20 to 85 °C at pH 8.0, using BAPNA as a substrate. The activity of the enzyme at 70 °C was taken as 100%. For thermal stability, the enzyme was incubated at different temperatures for 60 min. The residual enzyme activity was assayed at pH 8.0 and 25 °C. The non-heated enzyme was considered as control (100%).

Table 3
Effect of various metal ions (5 mM) on trypsin activity

Ions (5 mM)	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Zn^{2+}	Mn^{2+}	Cu^{2+}	Ba^{2+}	Co^{2+}	Na^{+}	K^{+}
Relative activity (%)	100	83.2	29	65.5	32	73	52	100	92

The activity of the trypsin was determined by incubating the enzyme in the presence of various metal ions for 10 min at 25 °C and pH 8.0.

75 °C were about 77.1%, 90% and 78%, respectively, of that at 70 °C. The optimum temperature for *S. officinalis* trypsin was similar to that of the protease from the hepatopancreas of shrimp (*P. orientales*) (Oh, Kim, Kim, & Kim, 2000) and higher than those of trypsins from cold-water fish, which had optimal temperatures in the range 40–45 °C (Simpson, 2000).

The thermal stability profile of the purified trypsin showed that the enzyme was highly stable at temperatures below 50 °C but was inactivated at higher temperatures (Fig. 5b). The enzyme retained more than 90 and 57% of its initial activity after 60 min of incubation at 50 and 60 °C, respectively. The thermal stability of *S. officinalis* trypsin was higher than those of other marine vertebrate and invertebrate trypsins. Tryspin from the pyloric caeca of Chinook salmon (*O. tshawytscha*) (Kurtovic et al., 2006) lost over 90% of its activity after 30 min at 60 °C, and Monterey sardine (*S. sagax caerulea*) trypsin retained less than 5% of its original activity after 15 min of incubation at 50 °C (Castillo-Yanez et al., 2005).

3.8. Effect of metal ions

The effect of some metal ions at a concentration of 5 mM on the activity of *S. officinalis* trypsin was studied at pH 8.0 and 25 °C by adding monovalent ions (Na^{+} and K^{+}) and divalent ions (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}) to the reaction mixture (Table 3). Na^{+} showed no influence on the activity. The trypsin activity was slightly affected by K^{+} and Mg^{2+}. However, the addition of Ba^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} and Cu^{2+} decreased the activity by 27%, 34.5%, 48%, 71% and 68%, respectively. Although it is known that calcium is required for trypsin stability and activity, especially in mammals, the trypsin activity of *S. officinalis* was not affected by Ca^{2+}.

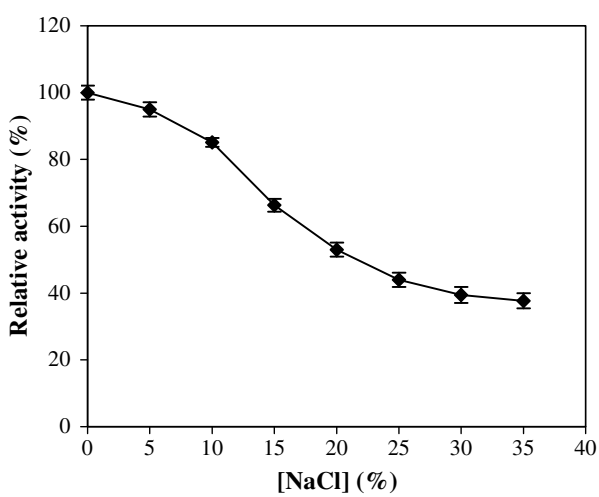


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on the activity of the purified trypsin.

3.9. Effect of NaCl concentration

The effect of NaCl on the activity of *S. officinalis* trypsin was studied at pH 8.0 and 25 °C by addition of NaCl to the reaction mixture (Fig. 6). A continuous decrease in trypsin activity was observed with increasing NaCl concentration. The relative activity of trypsin at 30% NaCl was approximately 39.4%. The trypsin from cuttlefish hepatopancreas may be used to facilitate the hydrolysis of proteins in high salt fermented fish products such as fish sauce.

The decrease in activity might be due to the denaturation of the enzyme caused by the "salting out" effect with increasing NaCl concentration. NaCl, at higher concentration, possibly competed with the enzyme in water binding, resulting in a stronger protein–protein interaction, which was possibly associated with precipitation.

3.10. Kinetic properties

Kinetic constants K_m and k_{cat} of the purified trypsin from hepatopancreas of cuttlefish were determined using Lineweaver-Burk plots (Table 4). The K_m and k_{cat} of the purified enzyme using BAPNA were 0.064 mM and 2.32 s^{-1}, respectively, and were close to those reported for trypsins from carp (*Cyprinus carpio*) (Cohen, Gertler, & Birk, 1981), Monterey sardine (*S. sagax cearula*) (Castillo-Yanez et al., 2005), anchovy (*E. japonica*) (Heu, Kim, & Pyeun, 1995) and salmon (*O. keta*) (Sekizaki, Itoh, Murakami, Toyota, & Tanizawa, 2000). The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of cuttlefish trypsin, 36.3 s^{-1} mM^{-1}, was close to trypsin from anchovy *E. japonica* (31 s^{-1} mM^{-1}) (Heu et al., 1995).

4. Conclusion

In the present study, a trypsin from *S. officinalis* was purified and characterised. The purification to homogeneity of the

Table 4
Kinetic constants of *S. officinalis* trypsin and other trypsins

Trypsins	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m (s^{-1} mM^{-1})	References
Cuttlefish (*S. officinalis*)[a]	0.064	2.32	36.25	This study
Anchovy (*E. japonica*)[a]	0.049	1.55	31.0	Heu et al. (1995)
Salmon (*O. keta*)[a]	0.029	2.29	79.0	Sekizaki et al. (2000)
Carp (*C. carpio*)[a]	0.039	3.10	79.5	Cohen et al. (1981)
Bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*)	0.312	1.06	3.4	Hau and Benjakul (2006)
Anchovy (*E. encrasicholus*) A[a]	0.830	1.55	1.86	Martinez, Olsen, and Serra (1988)
Anchovy (*E. encrasicholus*) B[a]	0.660	3.2	4.84	Martinez, Olsen, and Serra (1988)
Montery sardine (*S. sagax cearula.*)[a]	0.051	2.12	41.0	Castillo-Yanez et al. (2005)

[a] Substrate: Nα -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA).

trypsin was achieved by ammonium sulphate precipitation (20–60% saturation), gel filtration through Sephadex G-100 and G-75, anion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and Q-Sepharose columns. After the final purification step, the enzyme was purified 26.7-fold with a specific activity of 3.1 U/mg and 21.8% recovery. The purified trypsin was homogeneous on SDS-PAGE and its molecular weight was estimated to be 24,000 Da. The enzyme showed an optimum temperature at 70 °C and optimum pH of 8.0. The enzyme was stable at a pH range of 6.0–10.0 and had a high thermostability, with 90 and 57% activity retained at 50 and 60 °C, respectively, after 60 min of incubation.

The N-terminal sequence of the trypsin was determined. *S. officinalis* trypsin, which showed high homology with vertebrate and invertebrate trypsins, had Lys and Ser residues at positions 5 and 7, where Tyr and Cys are common in fish trypsins, respectively. Furthermore, a remarkable substitution was also found, *S. officinalis* trypsin had an Asn_{11} not found in any trypsin sequences.

Further research is needed to determine properties of *S. officinalis* trypsin as a possible biotechnological tool in the fish processing and food industries.

Acknowledgement

This work was funded by the « Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie, Tunisia».

References

Balti, R., Bougatef, A., Souissi, N., EL-Hadj Ali, N., Zekri, D., Barkia, A., & Nasri, M. (2008). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. In Moncef Nasri (Ed.), Recent research developments in food by-products technology and biotechnology, ISBN: 978-81-308-0259-6. Research Signopost 37/661(2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India (in press).

Benjakul, S., Visessanguan, W., & Thummaratwasik, P. (2000). Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. *Journal of Food Biochemistry, 24*, 107–127.

Bezerra, R. S., Santos, J. F., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Vieira, V. L. A., et al. (2001). Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry, 25*, 199–210.

Blanco, R. M., & Guisan, J. M. (1988). Protecting effects of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachments: trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system. *Enzyme and Microbial Technology, 10*, 227–232.

Bougatef, A., Souissi, N., Fakhfakh, N., Ellouz-Triki, Y., & Nasri, M. (2007). Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry, 102*, 343–350.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248–254.

Cao, M. J., Osatomi, K., Suzuki, M., Hara, K., Tachibana, K., & Ishihara, T. (2000). Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. *Fisheries Science, 66*, 1172–1179.

Castillo-Yanez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F. L., & Toro, M. A. N. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology, 140B*, 91–98.

Cohen, T., Gertler, A., & Birk, Y. (1981). Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxipeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology, 69B*, 639–646.

Emi, M., Nakamura, Y., Ogawa, M., Yamamoto, T., Nishide, T., Mori, T., & Matsubara, K. (1986). Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens. *Gene, 41*, 305–310.

Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 95*, 271–278.

Gates, B. J., & Travis, J. (1969). Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry, 8*, 4483–4489.

Genicot, S., Rentier-Delrue, F., Edwards, D., VanBeeumen, J., & Gerday, C. (1996). Trypsin and trypsinogen from an antarctic fish: molecular basis of cold adaptation. *Biochimica Biophysica Acta, 1298*, 45–57.

Gildberg, A., & Almas, K. A. (1986). Utilization of fish viscera. In M. L. Maguer & P. Jelen (Eds.), *Food engineering and process applications Vol: 2. unit operations* (pp. 383–393). London, UK: Elsevier.

Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology, 59*, 15–32.

Hau, P. V., & Benjakul, S. (2006). Purification and characterization of Trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Pricanthus macracanthus*). *Journal of Food Biochemistry, 30*, 478–495.

Hermodson, M. A., Ericsson, L. H., Neurath, H., & Walsh, K. A. (1973). Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis. *Biochemistry, 12*, 3146–3153.

Heu, M. S., Kim, H. R., & Pyeun, J. H. (1995). Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, 112B*, 557–567.

Kishimura, H., & Hayashi, K. (2002). Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology, 132B*, 485–490.

Kishimura, H., & Hayashi, K. (2003). N-terminal amino acid sequence of trypsin from the pyloric ceca of the starfish *Asterias amurensis*. *Fisheries science, 69*, 867–869.

Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., & Nonami, Y. (2005). Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *Journal of Food Biochemistry, 29*, 459–469.

Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., & Nonami, Y. (2006). Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chemistry, 97*, 65–70.

Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakul, S., & Chun, B. S. (2008). Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry, 106*, 194–199.

Kishimura, H., Tokuda, Y., Yabe, M., Klomklao, S., Benjakul, S., & Ando, S. (2007). Trypsins from the pyloric ceca of jacopever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. *Food Chemistry, 100*, 1490–1495.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2007a). Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry, 100*, 1580–1589.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2007b). Trypsin from pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comparative Biochemistry and Physiology, 148B*, 382–389.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B. K., & Saeki, H. (2006). Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology, 144B*, 47–56.

Kossiakoff, A. A., Chambers, J. L., Kay, L. M., & Stroud, R. M. (1977). Structure of bovine trypsinogen at 1.9 A resolution. *Biochemistry, 16*, 654–664.

Kurtovic, I., Marshall, S. N., & Simpson, B. K. (2006). Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Biochemistry and Physiology, 143B*, 432–440.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227*, 680–685.

LeHuerou, I., Wicker, C., Guilloteau, P., Toullec, R., & Puigserver, A. (1990). Isolation and nucleotide sequence of cDNA clone for bovine pancreatic anionic trypsinogen: structural identity within the trypsin family. *European Journal of Biochemistry, 193*, 767–773.

Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society, 56*, 665–666.

Lu, B. J., Zhoo, L. G., Cai, Q. F., Hara, K., Maeda, A., Su, W. J., & Cao, M. J. (2008). Purification and characterisation of trypsins from pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuasti*). *Food chemistry, 110*, 352–360.

MacDonald, R. J., Stary, S. J., & Swift, G. H. (1982). Two similar but nonallelic rat pancreatic trypsinogens Nucleotide sequences of the cloned cDNAs. *The Journal of Biological Chemistry, 257*, 9724–9732.

Martinez, A., Olsen, R. L., & Serra, J. L. (1988). Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicholus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, 91B*, 677–684.

North, M. J. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiological review, 46*, 308–340.

Oh, E. S., Kim, D. S., Kim, J. H., & Kim, H. R. (2000). Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of shrimp, *Penaeus orientalis*. *Journal of Food Biochemistry, 24*, 251–264.

Pinsky, S. D., LaForge, K. S., & Scheele, G. (1985). Differential regulation of trypsinogen mRNA translation: full-length mRNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas. *Molecular and Cellular Biology, 5*, 2669–2676.

Salter, J. P., Lim, K. C., Hansell, E., Hsieh, I., & McKerrow, J. H. (2000). Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *The Journal of Biological Chemistry, 275*, 38667–38673.

Sekizaki, H., Itoh, K., Murakami, M., Toyota, E., & Tanizawa, K. (2000). Anionic trypsin from chum salmon: activity with p-aminophenyl ester and comparison with bovine and *Streptomyces griseus* trypsins. *Comparative Biochemistry and Physiology, 127B*, 337–346.

Shahidi, F., & Kamil, J. Y. V. A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology, 12*, 435–464.

Simpson, B. K. (2000). Digestive proteinases from marine animals. In N. F. Haard & B. K. Simpson (Eds.), *Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality* (pp. 531–540). New York: Marcel Dekker.

Souissi, N., Ellouz-Triki, Y., Bougatef, A., Blibech, M., & Nasri, M. (2008). Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories. *Microbiological Research, 163*, 473–480.

Titani, K., Sasagawa, T., Woodburg, R. G., Ericsson, L. H., Dörsam, H., Kraemer, M., Neurath, H., & Zwilling, R. (1983). Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) trypsin If. *Biochemistry, 22*, 1459–1465.

Walsh, K. A. (1970). Trypsinogens and trypsins of various species. In E. Gertrude & P. L. Lorand (Eds.), *Methods in Enzymology* (pp. 41–63). New York: Academic Press.

Purification et caractérisation biochimique de la cathepsine D à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*)

Rafik Balti, Noomen Hmidet, Kemel Jellouli, Naima Nedjar-Arroume, Didier Guillochon, Moncef Nasri

Les invertébrés ne possèdent pas de pepsine. Ils existent des cathepsines qui partagent le même ancêtre commun avec la pepsine. Ces enzymes sont lysosomales, elles sont donc impliquées dans plusieurs voies métaboliques dont le turn-over protéique. Quatre d'entre elles (les cathepsines B, D, H et L) sont considérées comme importantes dans la dégradation des protéines du muscle *post-mortem*. On peut les classer en deux groupes : les protéases à cysteine (B, L, H) et une protéase à acide aspartique, la cathepsine D. Cette dernière était le sujet de ce travail qui s'intéresse à sa purification ainsi que la détermination de ces caractéristiques biochimiques.

La purification de la cathepsine D à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*) a été réalisée selon les étapes suivantes : une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (30-60 %), une filtration sur Sephadex G-100, une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose, une deuxième filtration sur Sephadex G-75 et une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-FPLC. Le rendement final est de 17,22 % et le facteur de purification est de l'ordre de 54,21. La protéase acide purifiée présente une activité spécifique de 359,44 U/mg sur l'hémoglobine, utilisée comme substrat.

La masse moléculaire de la cathepsine D estimée par SDS-PAGE est de l'ordre de 37,5 kDa. Egalement, la pureté de la cathepsine D a été évaluée par électrophorèse dans les conditions natives associée à un zymogramme. Le résultat obtenu a montré que la cathepsine D présente une seule bande protéique qui correspond à un seul halo de dégradation de l'hémoglobine. Ce résultat prouve d'une part que la cathepsine D de la seiche commune (*S. officinalis*) a été purifiée à homogénéité, et d'autre part l'absence des isoformes pour cette enzyme. L'activité de la cathepsine D est totalement inhibée par le pepstatine A, ce qui confirme qu'elle appartient à la famille des protéases aspartiques.

La séquence N-terminale de la cathepsine D est **APTPEPLSNYMDA**. L'alignement de cette séquence avec les séquences publiées d'autres protéases aspartiques a permis de noter une forte identité avec les cathepsines D des invertébrés marins. Toutefois, la cathepsine D de *S. officinalis* possède un résidu Pro à la position 6 et un résidu Ser à la position 8 alors que la

Thr et la Lys sont largement décrits aux mêmes positions chez les cathepsines D des invertébrés marins.

L'enzyme purifiée est active entre pH 1,5 et 5,0, avec un optimum d'activité enregistré au alentour de pH 3,0. Les activités relatives à pH 2,0, 4,0 et 5,0 sont de l'ordre de 57, 65,7 et 23 %, respectivement. Par contre, l'activité de la cathepsine D diminue considérablement au-delà de pH 5,0 et elle est uniquement 2 % à pH 6,0. La cathepsine D de la seiche commune est hautement stable dans une large gamme de pH. En effet, elle retient 100 % de son activité initiale à pH 3,0 et 4,0, après 60 min d'incubation à 25 °C.

L'optimum de la température d'action de la cathepsine D est observé à 50 °C. A 55 °C, l'activité relative est de 81,7 %, et à 60 °C elle est de 55,1 %. La thermostabilité de la cathepsine D a été aussi examinée après pré-incubation de l'enzyme purifiée à différentes températures allant de 5 à 70°C pendant 30 min. Les résultats obtenus ont montré que l'enzyme maintient, 75,2 et 49 % de son activité initiale, respectivement à 50 et 55 °C. Cependant, l'enzyme est complètement inactivée au bout de 30 min d'incubation à 65 °C.

L'activité protéolytique a été testée sur différents substrats protéiques. L'activité sur hémoglobine est utilisée comme contrôle pour l'évaluation des activités relatives sur les autres substrats protéiques. En utilisant la caséine comme substrat, la cathepsine D montre une activité relative de 46,3 %. Comparativement, l'enzyme présente des activités relatives de 21,4 % et 12,9 % en utilisant respectivement, le sérum albumine bovine (BSA) et la gélatine. L'activité relative de la cathepsine D sur γ-globuline est de 2,6 %. Toutefois, l'activité de la cathepsine D est nulle sur l'albumine d'œuf.

La digestion des protéines myofibrillaires du muscle de la seiche commune par la cathepsine D purifiée à 50 °C a été analysée par SDS-PAGE. L'analyse a montré une dégradation de la myosine, la paramyosine et l'actine. Parmi ces protéines, la myosine est la plus susceptible d'être hydrolysée par la cathepsine D de la seiche commune. Une hydrolyse totale de cette protéine est observée au bout de 10 min à 50 °C. Par contre, la paramyosine est hydrolysée complètement par la cathepsine D au bout 20 min d'incubation, alors que l'actine est plus résistance à l'hydrolyse par cette protéase acide.

Article 2:

Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization.

Balti Rafik, Hmidet Noomen, Jellouli Kemel, Nedjar-Arroume Naima, Guillochon Didier & Moncef Nasri (2010). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10623-10630.

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY
ARTICLE

J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 10623–10630 10623
DOI:10.1021/jf102233d

Cathepsin D from the Hepatopancreas of the Cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and Characterization

RAFIK BALTI,[†] NOOMEN HMIDET,[†] KEMEL JELLOULI,[†] NAIMA NEDJAR-ARROUME,[§] DIDIER GUILLOCHON,[§] AND MONCEF NASRI*,[†]

[†]Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Route Soukra Km 3,5 B.P. 1173, 3038 Sfax, Tunisia, and [§]Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, B.P. 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Cathepsin D from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) was purified to homogeneity by precipitation with ammonium sulfate (30−60%, w/v), Sephadex G-100 gel filtration, Mono-S cation-exchange chromatography, Sephadex G-75 gel filtration, and Mono-S FPLC with a 54-fold increase in specific activity and 17% recovery. The molecular weight of the purified cathepsin D was estimated to be 37.5 kDa by sodium dodecyl sulfate−polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). On the basis of the native-PAGE and hemoglobin zymography, the purified protease appeared as a single band. The optimum pH and temperature for the cathepsin D activity were pH 3.0 and 50 °C, respectively, using hemoglobin as a substrate. The purified enzyme was completely inhibited by pepstatin A; however, no inhibition was observed with phenylmethylsulfonyl fluoride and ethylenediaminetetraacetic acid. Moreover, the activity was strongly inhibited by SDS and molybdate and enhanced by ATP. The purified cathepsin D was activated by Mg^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Sr^{2+}, and Co^{2+} ions, whereas it was not affected by Na^{+}, K^{+}, and Ca^{2+} ions. The N-terminal amino acid sequence of the first 13 amino acids of the purified cathepsin D was APTPEPLS-NYMDA. *S. officinalis* cathepsin D, which showed high homology with cathepsin D from marine vertebrates and invertebrates, had a Pro residue at position 6 and a Ser residue at position 8, where Thr and Lys are common in all marine vertebrates cathepsins D. *S. officinalis* cathepsin D showed high efficiency for the hydrolysis of myofibrillar proteins extracted from cuttlefish muscle.

KEYWORDS: Biochemical characterization; purification; cuttlefish; *Sepia officinalis*; cathepsin D; hepatopancreas

INTRODUCTION

Aspartic proteinases constitute a widely distributed protein superfamily, whose members accomplish a variety of functions, including protein degradation at low pH (*1*). They share a high degree of sequence similarity and have a characteristic bilobal tertiary structure (*2*, *3*). Individual members of the superfamily differ in the topography of their active sites and in their cellular localization. These features determine physiological function (*4*, *5*).

On the basis of their different molecular characteristics and tissue/cellular localization, aspartic proteinases have been classified into several subgroups, including the cathepsins (*6*), renins (*7*), pepsins (*8*), and chymosins (*9*). In addition, other types of aspartic proteinases have been isolated from invertebrates (*10*, *11*), plants (*12*, *13*), retroviruses (*14*, *15*), and a number of microbial sources (*16*, *17*).

Among these subgroups, the intracellular aspartic proteinase cathepsin D (EC 3.4.23.5) is present in most cells in many species and is probably one of the major factors contributing to lysosomal digestive activity (*18*, *19*). Cathepsin D activity was found to be particularly elevated in a wide variety of tissues during remodeling or regression, as well as in apoptotic cells (*20*). Although important for the degradation of intracellular proteins, cathepsin D is implicated in the processing of antigens and peptide hormones (*21*, *22*), and the overexpression and secretion of cathepsin D were observed in human breast cancer (*23*). Cathepsin D has been thoroughly investigated in mammals, but a limited number of studies are available on cathepsin D from fish species (*24*−*27*).

In fish, cathepsin D, together with pepsin, has received some attention because of the potential importance of fish physiology in relation to aquaculture (*28*). Indeed, high cathepsin D activity found in fish tissues, especially during spawning, is considered to be the main factor influencing deterioration of fish products (*28*). However, most of these studies have been aimed at the identification of the enzymatic activity present in various fish tissues and rarely at elucidating the biochemical properties of invertebrate cathepsin D. Recently, the catalytic and molecular characterization of a cathepsin D from the hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) has been reported (*29*). Mammalian cathepsin D has been purified and characterized from a variety of sources including human tissues (*30*, *31*),

*Corresponding author (phone 216 74-274-088; fax 216 74-275-595; e-mail mon_nasri@yahoo.fr or moncef.nasri@enis.rnu.tn).

© 2010 American Chemical Society

pig spleen (*32*), bovine milk (*33*), and chicken liver (*34*). The enzyme has also been purified from some fish species such as tilapia muscle (*35*), carp muscle (*24*), Antarctic icefish liver (*27*), and Atlantic cod liver (*26*).

In Tunisia, cuttlefish (*Sepia officinalis*) is relatively important in fish-catches and is utilized for human consumption. During processing, solid wastes are generated. These wastes, which may represent approximately 30% of the raw material, constitute an important source of proteolytic enzyme and proteins. In a previous work, we have purified and characterized trypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*S. officinalis*). The enzyme showed an optimum temperature at 70 °C and an optimum pH of 8.0. In addition, the enzyme was stable at a pH range of 6.0−10.0 and highly thermostable (*36*).

In the present study, we describe the purification of cathepsin D from the hepatopancreas of cuttlefish (*S. officinalis*) and provide basic information about its main biochemical characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Hemoglobin, pepstatin A, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), benzamidine, tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), soybean trypsin inhibitor (SBTI), L-*trans*-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanido)butane (E-64), iodoacetic acid (IAA), trichloroacetic acid, glycine, ammonium sulfate, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide, ammonium persulfate, *N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylethylenediamine (TEMED), and Coomassie Brilliant Blue R-250 were from Bio-Rad Laboratories (Mexico). Sephadex G-100, Sephadex G-75, and Mono-S Sepharose were from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). PVDF membrane was purchased from Applied Biosystems (Roissy, France). Tris(hydroxymethyl)-aminomethane was procured from Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain). All other reagents were of analytical grade.

Cuttlefish Viscera. Cuttlefish (*S. officinalis*), in the size range of 6−8 cuttlefish/kg and dorsal length 20−25 cm, were purchased from the fish market of Sfax City, Tunisia. After capture, the cuttlefish were chilled in ice and off-loaded approximately 10 h thereafter. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1:3 (w/w), and transported to the research laboratory within 30 min. The internal organs were separated, and only the hepatopancreas was collected and then stored in sealed plastic bags at −20 °C until used for enzyme extraction.

Preparation of Crude Enzyme Extract. Defatted powder of the hepatopancreas of cuttlefish was prepared according to the method of Balti et al. (*36*). Protease was extracted from defatted powder by stirring in 10 volumes buffer A (10 mM glycine−HCl, pH 3.0) for 2 h at 4 °C. The homogenate was centrifuged at 8500*g* for 30 min at 4 °C. The pellet was discarded, and the supernatant obtained was collected and used as crude acidic protease extract.

Cathepsin D Purification. *Ammonium Sulfate Precipitation*. The crude acidic protease extract was first subjected to ammonium sulfate fractionation 0−30, 30−60, and 60−80% (w/v). The precipitate obtained in each fraction after centrifugation at 13000*g* for 30 min was suspended in buffer A and dialyzed for 24 h at 4 °C against repeated changes in the same buffer (after 8 and 16 h).

Sephadex G-100 Gel Filtration. The 30−60% (w/v) ammonium sulfate fraction was subjected to gel filtration on a Sephadex G-100 column (2.6 cm × 165 cm) equilibrated with buffer B (25 mM sodium acetate, pH 4.0, containing 0.5‰ Triton X-100). Fractions of 5 mL were eluted at a flow rate of 28 mL/h with the same buffer. Protein content (Abs 280 nm) and proteolytic activity were determined. Fractions showing protease activity were pooled.

Mono-S Cation-Exchange Chromatography. The active fractions from Sephadex G-100 were applied to a Mono-S column (2.6 cm × 20 cm) previously equilibrated with buffer C (25 mM sodium acetate, pH 4.0). After being washed with the same buffer, bound proteins were eluted with a linear gradient of sodium chloride (NaCl) in the range of 0−0.5 M in the equilibrating buffer. Fractions of 5 mL were collected at a flow rate of 60 mL/h and analyzed for protease activity and protein concentration. The fractions with high proteolytic activities were pooled.

Sephadex G-75 Gel Filtration. The active fractions from Mono-S were concentrated by ultrafiltration using a 10 kDa membrane and then applied to gel filtration on a Sephadex G-75 column (2.5 cm × 100 cm) pre-equilibrated with buffer B and eluted at a flow rate of 30 mL/h with the same buffer. Protein content (Abs 280 nm) and proteolytic activity were measured.

Mono-S FPLC Cation Exchange Chromatography. The pooled Sephadex G-75 fractions containing protease activity were concentrated by ultrafiltration using a 10 kDa membrane and further purified by cation-exchange chromatography on a Mono-S FPLC column (2.6 cm × 30 cm) equilibrated with buffer C. Nonadsorbed proteins were washed out with the same buffer containing 100 mM NaCl. The enzyme was eluted with a linear gradient of NaCl (100−250 mM). Fractions (3 mL) showing protease activities were collected at a flow rate of 120 mL/h. The enzyme-containing fractions were pooled, dialyzed, concentrated by lyophilization, and stored at −20 °C for further analyses. All of the purification steps were conducted at temperatures not exceeding 4 °C.

Assay for Protease Activity. Proteolytic activity was assayed according to the method of Anson (*37*) with slight modifications, using hemoglobin as a substrate, as described by Bougatef et al. (*38*). Enzyme (50 μL) was mixed with 100 μL of solution consisting of 2.0% acid-denatured bovine hemoglobin and 350 μL of 100 mM glycine−HCl buffer (pH 3.0). After incubation of the mixture at 37 °C for 30 min, the reaction was immediately stopped by the addition of 500 μL of 8.0% trichloroacetic acid (TCA). The mixture was centrifuged at 10000*g* for 15 min, and the absorbance of the supernatant at 280 nm was measured. One unit of enzymatic activity against hemoglobin was defined as the amount of enzyme that catalyzed an increase of 1.0 in the absorbance at 280 nm per minute under the assay conditions. Values are the means of three independent experiments.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Hemoglobin Zymography. SDS-PAGE was carried out for the control of the purity and determination of molecular weight of the purified enzyme as described by Laemmli (*39*), using 5% (w/v) stacking and 15% (w/v) separating gels. The molecular weight of the enzyme was estimated using a low molecular weight calibration kit as markers (Sigma), consisting of rabbit muscle phosphorylase *b* (97000 Da), bovine serum albumin (66000 Da), egg white ovalbumin (45000 Da), human carbonic anhydrase (31000 Da), soybean trypsin inhibitor (20100 Da), and α-lactalbumin (14200 Da).

Native-PAGE was performed according to the procedure of Laemmli (*39*) except that the sample was not heated and SDS and reducing agent were left out.

Hemoglobin zymography was performed on native-PAGE according to the method of Garcia-Carreno et al. (*40*).

Determination of the N-Terminal Amino Acid Sequence of *S. officinalis* Cathepsin D. The purified enzyme, from Mono-S FPLC, was applied to SDS-PAGE and electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. After brief staining with Coomassie Brilliant Blue R-250, the PVDF band corresponding to the cathepsin D was excised and the N-terminal amino acid sequence was determined by using the Edman degradation method on an Applied Biosystems Protein Sequencer Procise 492 equipped with 140 C HPLC systems (*41*).

Protein Determination. Protein concentration was determined according to the method of Bradford (*42*) using BSA as a standard and during the course of enzyme purification by measuring the absorbance at 280 nm.

Molecular Weight. To determine the molecular mass of the native enzyme, the freeze-dried proteins were resuspended in phosphate buffer, pH 7.0. Two hundred micrograms of the pure enzyme was loaded on a size exclusion HPLC column Protein Bio. Sil SEC. 125 (300 × 7.8 cm) equilibrated in phosphate buffer. Elution was performed with phosphate buffer at 0.5 mL/min.

Biochemical Properties. *Effect of pH on Activity and Stability of Cathepsin D*. The effect of pH was determined with hemoglobin as a substrate. Cathepsin D activity was studied over the pH range of 1.0−7.0 at 37 °C for 30 min. For the measurement of pH stability, the enzyme was incubated at 25 °C for 60 min in different buffers, and then the residual proteolytic activity was determined under standard assay conditions.

The following buffer systems were used: 100 mM glycine−HCl buffer, pH 1.0−3.0; 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.0−6.0; 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0−8.0.

Effect of Temperature on Activity and Stability of Cathepsin D. The effect of temperature on cathepsin D activity was studied from 20 to 70 °C for 30 min at pH 3.0. For thermal stability, cathepsin D isolated from cuttlefish hepatopancreas was pre-incubated in 100 mM glycine−HCl, pH 3.0, at temperatures ranging from 5 to 70 °C for 30 min and immediately cooled on ice. Thereafter, the residual activity was determined at 37 °C for 30 min at pH 3.0.

Effects of Enzyme Inhibitors, SDS, and Some Chemicals. The effects of enzyme inhibitors, SDS, and some chemicals on cathepsin D activity were studied using PMSF, SBTI, benzamidine, pepstatin A, TPCK, E-64, IAA, EDTA, ATP, molybdate, and various concentrations of SDS. The purified enzyme was pre-incubated with each inhibitor or additive for 30 min at 25 °C, and then the remaining enzyme activity was tested using hemoglobin as a substrate. The activity of the enzyme assayed in the absence of any inhibitor or additive was taken as control.

Effect of Metal Ions. The effects of various metal ions (5 mM) on cathepsin D activity were investigated by adding the monovalent (Na^+ or K^+), divalent (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, and Mg^{2+}), or trivalent (Fe^{3+}) metal ions to the reaction mixture. The activity of the enzyme in the absence of any metal ions was taken as control.

Effect of the Cathepsin D on Food Proteins. Proteolytic activity was examined against natural food proteins that are commonly hydrolyzed or used in protease assay. The different substrates used were hemoglobin, casein, ovalbumin, γ-globulin, BSA, and gelatin. Substrate concentration of 2% (w/v) was prepared in glycine−HCl buffer, pH 3.0. The protease activity toward hemoglobin was taken as a control.

Preparation of Myofibrillar Proteins from Cuttlefish Muscle. Myofibrillar proteins were prepared according to the method of Hashimoto et al. (*43*). All steps were performed at 4 °C to minimize proteolysis and protein denaturation. Twenty grams of cuttlefish muscle was homogenized with 10 volumes of phosphate buffer (ionic strength, I = 0.05, pH 7.5) for 1 min using a Wiset Stir HS-100 homogenizer (DAIHAN Scientific, Korea). The homogenate was centrifuged at 5000*g* for 15 min at 4 °C using a Hermele Z36HK refrigerated centrifuge (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). The supernatant was discarded and the procedure repeated three times. The residue from the above was homogenized with 10 volumes of KCl−phosphate buffer (I = 0.5, pH 7.5) in a Waring blender (Moulinex, Paris, France) and centrifuged. The residue was similarly homogenized and centrifuged again. Both supernatants were combined and used as the myofibrillar proteins fraction. Two phosphate buffers were used for extracting myofibrillar proteins: 15.6 mM Na_2HPO_4−3.5 mM KH_2PO_4 (ionic strength, I = 0.05, pH 7.5) and 0.45 M KCl−15.6 mM Na_2HPO_4−3.5 mM KH_2PO_4 (I = 0.5, pH 7.5), respectively. All extracts were supplemented by 0.1 mM PMSF, 10 mM EDTA, and 0.01 (w/v) sodium azide to inhibit endogenous proteases and microbial growth.

Hydrolysis of Myofibrillar Proteins by Purified Cathepsin D. To hydrolyze muscle proteins, purified cathepsin D (1.5 U) was added to 2 mL of reaction mixture, containing 3 mg of protein substrate in 100 mM glycine−HCl buffer, pH 3.0. The hydrolysis was conducted by incubating the reaction mixture at 50 °C for 0, 5, 10, 20, and 30 min. The control was performed by incubating the reaction mixture at 50 °C for 30 min without the addition of cuttlefish cathepsin D. The reaction was terminated by adding 100 μL of 1 N NaOH containing 1% (w/v) SDS. The mixture was further mixed with SDS-PAGE sample buffer and boiled for 1 min. The mixture was centrifuged at 8500 rpm for 10 min at room temperature (Hettich zentrifugen, Berlin, Germany) to remove debris. The protein hydrolysate was analyzed by SDS-PAGE using 12% separating and 5% staking gels.

Statistical Analysis. All experiments were run in triplicate. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and mean comparisons were carried out using Duncan's multiple-range test. The SPSS statistic program (SPSS 10.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL) was used for data analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Cathepsin D Purification. Cathepsin D from the hepatopancreas of *S. officinalis* was purified successively by the five-step procedure described under Materials and Methods. In the first step, the crude enzyme extract was fractionated with ammonium sulfate. Fraction F2 (30−60% w/v saturation) showed higher specific activity (20.33 U/mg of protein) than fraction F1 (0−30%; 0.577 U/mg). No activity was detected in F3 (60−80%) and in the final supernatant. The 30−60% ammonium sulfate precipitate, which gave the highest specific activity, was then successively subjected to Sephadex G-100 gel filtration, Mono-S Sepharose cation-exchange chromatography, Sephadex G-75 gel filtration, and finally Mono-S FPLC (results not shown).

Table 1. Summary of the Purification of Cathepsin D from Cuttlefish (*S. officinalis*)[a]

purification step	total activity (U)	total protein (mg)	specific activity (U/mg)	recovery (%)	purification fold
crude extract	4528	682.15	6.63	100	1
ammonium sulfate precipitation (30−60% w/v)	3758	184.8	20.33	82.99	3.06
Sephadex G-100	2856	57.0	50.10	63.07	7.55
Mono-S Sepharose	2084	12.75	163.45	46.02	24.65
Sephadex G-75	1258	5.13	245.22	27.78	36.98
Mono-S FPLC	780	2.17	359.44	17.22	54.21

[a] All operations were carried out at 4 °C. Only the precipitate formed between 30 and 60% saturation with ammonium sulfate was subjected to gel filtration on Sephadex G-100.

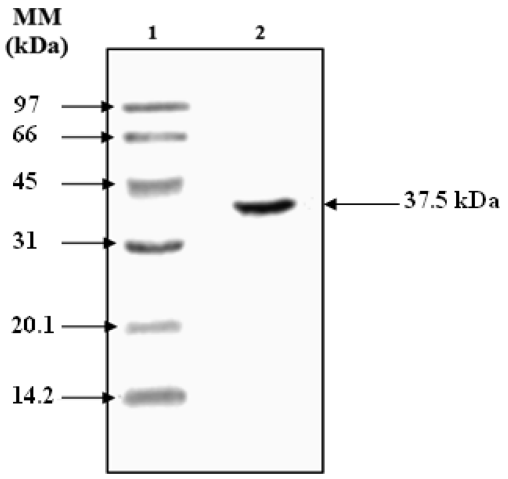


Figure 1. SDS-PAGE of the purified cathepsin D from *S. officinalis* hepatopancreas. Lanes: 1, molecular weight markers; 2, purified cathepsin D from *S. officinalis* hepatopancreas.

After the final purification step, the cathepsin D was purified 54.2-fold with a recovery of 17.2% and a specific activity of 359.4 U/mg of protein, using hemoglobin as a substrate. The results of the purification procedure are summarized in **Table 1**. The obtained total recovery of enzyme activity in the purified fractions (17.22%) is relatively high compared to other published purifications of cathepsin D from other fish species (*24*−*26*, *35*, *44*).

Purity and Molecular Weight. Analysis by SDS-PAGE of the purified enzyme showed a single band of about 37.5 kDa (**Figure 1**) corresponding to that determined by gel filtration (data not shown), indicating that the active enzyme is a single-chain monomer. Cathepsin D of common carp muscle, Atlantic cod, and Japanese common squid hepatopancreas also are single-chain enzymes (*24*, *26*, *29*).

The molecular weight of the *S. officinalis* cathepsin D was close to those from other fish species, such as white Japanese common squid (*T. pacificus*) (36.5 kDa) (*29*), carp (*Cyprinus carpio*) (36 kDa) (*24*), and herring (*Clupea harengus*) (38 kDa) (*25*).

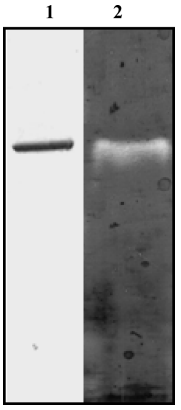


Figure 2. Native-PAGE (lane 1) and zymogram detection of proteolytic activity (lane 2) of the purified cathepsin D from *S. officinalis* hepatopancreas.

It was lower than those of cathepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*) (40 kDa) (*26*), Antarctic icefish (*Chionodraco hamatus*) (40 kDa) (*27*), mackerel (*Scomber australasicus*) (51 kDa), milkfish (*Chanos chanos*) (54 kDa) (*45*), banded shrimp (*Penaeus japonicus*) (61 kDa) and grass shrimp (*Penaeus monodon*) (61 kDa) (*46*).

The purity of the purified cathepsin D was also evaluated by using native-PAGE. As reported in **Figure 2**, *S. officinalis* cathepsin D migrated as a single protein band in the native-PAGE, confirming the homogeneity of the enzyme. The proteolytic activity of this protein band was confirmed by zymogram activity staining. A unique clear band of hemoglobin hydrolysis was observed in the gel, indicating the homogeneity of the purified cathepsin D (**Figure 2**).

N-Terminal Amino Acid Sequence of *S. officinalis* Cathepsin D. The N-terminal amino acid sequence of the purified cathepsin D determined by automated Edman degradation was found to be APTPEPLSNYMDA. The N-terminal amino acid sequence of *S. officinalis* cathepsin D showed uniformity, indicating that it was isolated in a pure form and, if other isoforms were present, their amounts must be small.

The N-terminal amino acid sequence of *S. officinalis* cathepsin D was aligned with the sequences of cathepsin D from other species and other known aspartic proteases (**Figure 3**). The sequence of *S. officinalis* showed high homology with cathepsins D from marine invertebrates. The cathepsin D from *S. officinalis* differs from that of Japanese flying squid (*T. pacificus*) cathepsin D by only one residue in the first 13 amino acids (*29*). The Leu_{11} in Japanese flying squid cathepsin D was replaced by Met_{11} in *S. officinalis* cathepsin D. However, there are two amino acid residues in the 13-terminal sequence that differ from cathepsins D of black tiger shrimp (*P. monodon*) (*47*) and American lobster (*Homarus americanus*) (*48*).

S. officinalis cathepsin D, which showed high homology with cathepsin D from marine vertebrates, had a Pro residue at position 6 and a Ser residue at position 8, whereas Thr and Lys are common in all marine vertebrate cathepsins D (*25*, *49*). Compared with the N-terminal amino acids of herring (*C. harengus*) cathepsin D, cuttlefish cathepsin differed only at residues 6 and 8.

The N-terminal amino acid sequence was also compared with those of other cathepsins and aspartic proteinases. The sequence showed high homology with cathepsin from lizard. Both sequences differed by only two amino acids. Compared with those from chicken and human, there are three and four amino acid residues in the 13-terminal sequence that differed from cuttlefish cathepsin D.

Effects of Enzyme Inhibitors, SDS, and Some Chemicals on Cathepsin D Activity. Proteases can be classified by their sensitivity to various inhibitors (*50*). To determine the nature of the purified protease, the effects of a variety of enzyme inhibitors, such as chelating agent and specific group reagents, on the cathepsin D activity were investigated (**Table 2**).

Purified cathepsin D from *S. officinalis* was strongly inhibited by pepstatin A, which inhibits only aspartyl proteases (*51*), indicating that the enzyme belonged to the aspartic acid proteases. Furthermore, E-64 and iodoacetic acid (IAA), which are

Invertebrate	
Cuttlefish (*S. officinalis*) cat D	A P T P E P L S N Y M D A
Japanese flying squid (*T. pacificus*) cat D	A P T P E P L S N Y L D A
Black tiger shrimp (*P. monodon*) cat D	G P M P E P L S N Y M D A
American lobster (*H. americanus*)	G P M P E P L S N Y M D A
Vertebrate	
Herring (*C. harengus*) cat D	A P T P E T L K N Y M D A
Antarctic icefish (*C. hamatus*) cat D	A P T P E T L K N Y L D A
Pufferfish (*T. rubripes*) cat D	A P T P E T L K N Y L D A
Atlantic salmon (*S. salar*) cat D	G P T P E T L K N F M D A
Rainbow trout (*O. mykiss*) cat D	G P T P E T L K N F M D A
Japanese flounder (*P. olivaceus*) cat D	G P T P E T L K N Y L D A
Zebrafish (*D. rerio*) cat D	D P T P E T L K N Y L D A
Turbot (*S. maximus*) cat D	G P T P E M L K N F L D A
Others animals	
Chicken cat D	E P T P E I L K N Y M D A
Human cat D	G P I P E V L K N Y M D A
Lizard cat D	A P T P E A L K N Y M D A
Pig cat D	G P I P E V L K N Y M D A
Rat cat D	E P V S E L L K N Y L D A
Nematode aspartic protease	G E T D E V L K N Y M D A
Human renin	T T S S V I L T N Y M D T
Sheep renin	R T S P V V L T N Y L D T

Figure 3. Alignment of the N-terminal amino acid sequence of the purified cathepsin D from cuttlefish (*S. officinalis*) with the sequences of other aspartic proteinases. Residues identical with *S. officinalis* cathepsin D are shaded. Cuttlefish, *S. officinalis* cathepsin D (cat D) (this work); Japanese flying squid (*T. pacificus*) cat D (*29*); black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cat D (*47*); American lobster (*Homarus americanus*) cat D (*48*); herring (*Clupea harengus*) cat D (*25*); Antarctic icefish (*Chionodraco hamatus*) cat D (*27*); pufferfish (*Takifugu rubripes*) cat D (*71*); Atlantic salmon (*Salmo salar*) cat D (*49*); rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cat D (*72*); Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) cat D (*73*); zebrafish (*Danio rerio*) cat D (*74*); turbot (*Scophthalmus maximus*) cat D (*75*); chicken cat D (*76*); human cat D (*77*); lizard (*Podarcis siculus*) cat D (*78*); pig cat D (*79*); rat cat D (*80*); nematode aspartic proteinase (*81*); human renin (*82*); sheep renin (*83*).

Table 2. Effects of Various Enzyme Inhibitors, SDS, and Some Chemicals on the Activity of the Purified Cathepsin D from Hepatopancreas of Cuttlefish (*S. officinalis*)[a]

inhibitor	concentration	remaining activity[b] (%)
control		100
pepstatin A	1.5 μM	0*
PMSF	5 mM	100
benzamidine	5 mM	100
SBTI	1 mM	100
TPCK	1 mM	100
E-64	1 mM	83.0 ± 1.1*
iodoacetic acid (IAA)	1 mM	76.0 ± 0.5*
EDTA	5 mM	97.0 ± 1.8
ATP	1 mM	385.5 ± 1.4*
molybdate	1 mM	2.3 ± 0.4*
	0.05 (w/v)	52.9 ± 2.1*
SDS	0.1 (w/v)	43.4 ± 2.5*
	0.2 (w/v)	28.0 ± 0.3*

[a] Purified enzyme was pre-incubated with various enzyme inhibitors or additives for 30 min at 25 °C, and the remaining activity was determined at pH 3.0 and 37 °C, using haemoglobin as a substrate. Enzyme activity measured in the absence of any inhibitor or additive was taken as 100%. [b] Mean ± SD from triplicate determinations. *, Significantly different from control at $p < 0.05$.

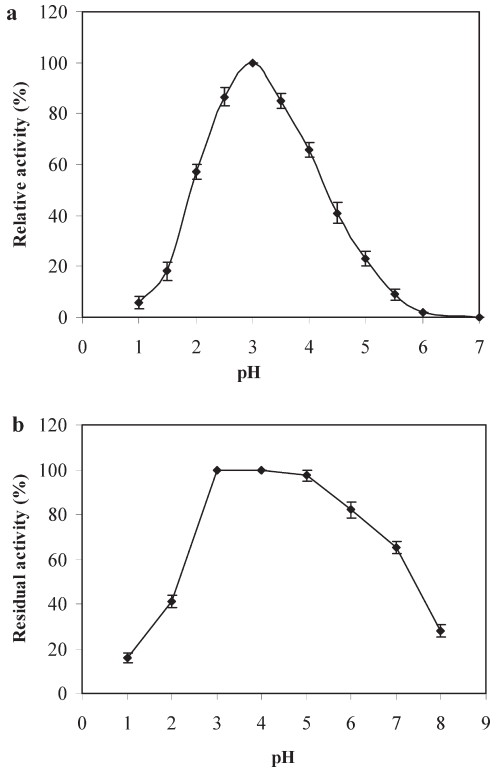


Figure 4. pH profile (**a**) and pH stability (**b**) of the purified cathepsin D from cuttlefish (*S. officinalis*) hepatopancreas. Results are mean ± SD of triplicates.

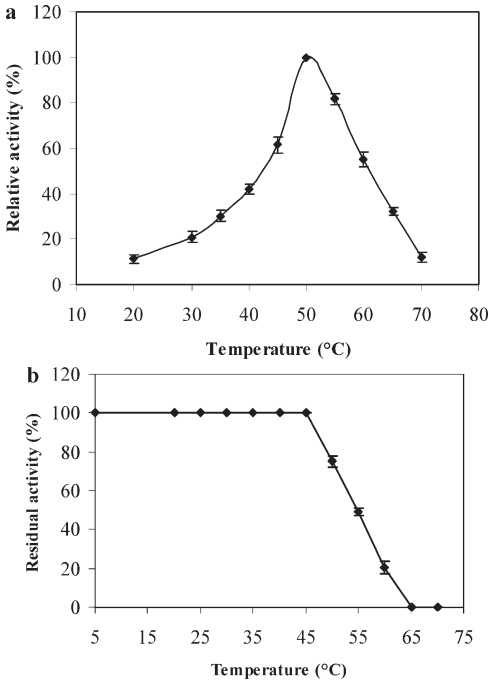


Figure 5. Temperature profile (**a**) and thermal stability (**b**) of the purified cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*S. officinalis*). Results are mean ± SD of triplicates.

specific for cysteine proteases (*52*), partially inhibited the activity of the enzyme. The enzyme retained 83 and 76% of its initial activity, after 30 min of incubation at 25 °C, in the presence of E-64 and iodoacetamide, respectively. However, PMSF, a serine protease inhibitor, SBTI, a trypsin specific inhibitor, and EDTA, a metalloprotease inhibitor, did not affect the enzyme activity.

The hemoglobin activity of the purified cathepsin D was strongly inhibited by the strong anionic surfactant (SDS) (**Table 2**). The enzyme retained 43.2 and 28% of its activity after 30 min of incubation at 25 °C in the presence of 0.1 and 0.2% SDS, respectively. Watabe et al. (*53*) and Jiang et al. (*45*) showed that 0.057 and 0.1% SDS completely inactivated the cathepsin D from porcine adrenal cortex and milkfish (*C. chanos*) muscle, respectively.

Because SDS would bear a net negative charge at pH 3.0, this compound would distort the conformation of cathepsin D and consequently inhibit activity of this proteinase.

Different chemicals were also used to elucidate their impact on the activity of cathepsin D (**Table 2**). ATP, an activator of cathepsin D (*54*), enhances the activity by 385%, whereas molybdate inhibitor of cathepsin D affects considerably the activity of the enzyme. Pillai and Zull (*54*) had also reported that cathepsin D was generally activated by ATP when BSA, hemoglobin, and parathyroid hormone were used as substrates. However, the enzyme was fully inhibited by molybdate, a cathepsin D inhibitor.

Effect of pH on the Activity and Stability of Cuttlefish Cathepsin D. The pH activity profile of the purified cuttlefish cathepsin D is shown in **Figure 4a**. The purified enzyme was active between pH 1.5 and 5.0, with an optimum around pH 3.0. The relative activities at pH 2.0, 4.0, and 5.0 were about 57, 65.7, and 23%, respectively, of that at pH 3.0. However, cathepsin D activity decreased significantly above pH 5.0 and was only 2% at pH 6.0. The optimum pH of *S. officinalis* cathepsin D was similar to those from Japanese flying squid (*T. pacificus*) (*29*), Atlantic cod (*G. morhua* L.) (*26*), and Antarctic icefish (*C. hamatus*) (*27*). However, the pH optimum may vary in the acidic range depending on the protein substrate (*55*, *56*).

It is recognized that most cathepsins D from different sources have an optimum between pH 3.0 and 5.0 (*57*−*60*). However, some cathepsins D had two optimum pH values (*61*−*63*). The pH curves for cathepsin D obtained from different sources were slightly different. This suggested that the pK_a values for the carboxyl groups were slightly different. Accordingly, the catalytic groups in the active site of the corresponding proteinases from different sources might be aspartate residues, but the environment around this residue was not similar.

The pH stability of cuttlefish cathepsin D is shown in **Figure 4b**. Cathepsin D was highly stable in a broad pH range, maintaining 100% of its original activity at pH 3.0 and 4.0 after 60 min of incubation at 25 °C. At pH 2.0 and 5.0, the enzyme retained 41.0 and 97.3% of its initial activity, respectively.

The pH stability results showed that *S. officinalis* cathepsin D has lower pH stability than those from banded shrimp (*P. japonicus*) and grass shrimp (*P. monodon*) cathepsin D, which were stable in the pH ranges of 5.0−7.0 and 4.0−8.0, respectively (*46*).

Effect of Temperature on the Activity and Stability of Cuttlefish Cathepsin D. The cathepsin D from cuttlefish was active at temperatures from 20 to 70 °C with an optimum around 50 °C. At temperatures above the optimum, activity quickly decreases (**Figure 5a**). The relative activities at 55, 60, and 65 °C were about 81.7, 55.1, and 32%, respectively, of that at 50 °C. The optimum temperature for *S. officinalis* cathepsin D was similar to those from porcine spleen (*64*), rat spleen (*65*), carp muscle (*62*), and banded shrimp (*P. japonicus*) muscle (*46*) and higher than those of cathepsins D from grass shrimp (*P. mondon*) and tilapia (*Tilapia nilotica* × *Tilapia aurea*) muscle, which had optimal temperatures at 45 and 37 °C, respectively (*35*, *46*).

The thermal stability profile of the purified cathepsin D showed that the enzyme is highly stable at temperatures below 45 °C but declined rapidly at temperatures exceeding 50 °C (**Figure 5b**).

Table 3. Effects of Metal Ions (5 mM) on Cathepsin D Activity[a]

ion	relative activity[b] (%)
control	100
Na^+	100
K^+	100
Mg^{2+}	137.6 ± 1.2*
Mn^{2+}	32.5 ± 0.4*
Ni^{2+}	176.0 ± 2.5*
Zn^{2+}	123.7 ± 1.2*
Cu^{2+}	157.0 ± 1.1*
Cd^{2+}	191.3 ± 1.4*
Hg^{2+}	26.2 ± 1.2*
Fe^{2+}	68.0 ± 0.3*
Ca^{2+}	103.1 ± 0.1
Sr^{2+}	212.5 ± 1.5*
Ba^{2+}	54.0 ± 1.1*
Co^{2+}	239.4 ± 2.8*
Fe^{3+}	12.4 ± 0.5

[a] The activity of the cathepsin D was determined by incubating the enzyme in the presence of various metal ions for 30 min at 37 °C and pH 3.0. [b] Mean ± SD from triplicate determinations. *, significantly different from control at $p < 0.05$.

The enzyme retained more than 75.2 and 49% of its initial activity after 30 min of incubation at 50 and 55 °C, respectively. Although the optimal temperature for the cathepsin D from cuttlefish was 50 °C, 25% of the activity of this protease was lost after 30 min of incubation at 50 °C (**Figure 5b**). These results indicated that cathepsin D from *S. officinalis* was most likely stabilized against thermal inactivation by its substrate during incubation. The enzyme is labile at relatively high temperatures (>55 °C) and retained only 20.5% after incubation for 30 min at 60 °C, whereas no activity was detected after incubation at 65 °C. Thermostability of the isolated cathepsin D was similar to those from porcine spleen, rat spleen, and bovine spleen, which retained about 60−70% of the hemoglobin hydrolytic activity after incubation for 30 min at 50 °C (*64*−*67*).

Interestingly, the thermal stability of *S. officinalis* cathepsin D was higher than those from other marine vertebrate and invertebrate cathepsins D. Cathepsin D from the liver of Atlantic cod (*G. morhua* L.) (*26*) was completely inactivated after 15 min at 40 °C. Mackerel (*Scomber australasicus*) cathepsin D retained < 50% of its original activity after 20 min of incubation at 50 °C (*45*).

Effects of Metal Ions. The effects of some metal ions, at a concentration of 5 mM on the activity of *S. officinalis* cathepsin D were studied at pH 3.0 and 37 °C (**Table 3**) by the addition of metal ions to the reaction mixture. The hemoglobin hydrolytic activity of the purified cathepsin D was activated by Mg^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Sr^{2+}, and Co^{2+} ions, whereas it was not affected by Na^+, K^+, and Ca^{2+} ions. However, the addition of Ba^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, and Fe^{3+} decreased the activity by 46, 67.5, 73.8, and 87.6%, respectively. Cathepsins D from tilapia muscle, rat spleen, and human erythrocyte membrane acid proteinase (EMAP) were also inhibited by Hg^{2+} and Fe^{3+} (*35*, *65*, *68*). Hg^{2+} has been reported to bind to SH groups of the target enzyme and subsequently inhibit the enzymatic activity (*69*). Inhibition of cuttlefish cathepsin D by IAA and Hg^{2+} suggests that the active site of these proteases might also contain cysteine.

Effect of Cathepsin D on Food Proteins. To study the possible food applications of the cathepsin D of *S. officinalis*, the activity of the protease using different protein substrates was studied. Among all proteins, hemoglobin was the most susceptible to hydrolysis, followed by casein, BSA, and then gelatin (**Table 4**), whereas ovalbumin and γ-globulin were resistant to hydrolysis by cathepsin D.

Table 4. Hydrolysis of Food Protein Substrates by Purified Cathepsins D

substrate	relative activity[a] (%)
hemoglobin	100
casein	46.3 ± 1.15*
BSA	21.4 ± 2.83*
ovalbumin	0[a]
gelatin	12.9 ± 1.66*
γ-globulin	2.6 ± 0.04*

[a] Mean ± SD from triplicate determinations. *, significantly different from hemoglobin at $p < 0.05$.

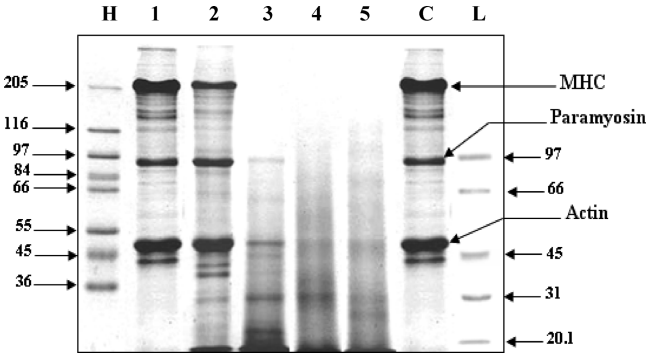


Figure 6. Hydrolysis of myofibrillar protein by purified cathepsin D from the hepatopancreas of cuttlefish at 50 °C. Lanes 1, 2, 3, 4, and 5 were 0, 5, 10, 20, and 30 min, respectively. H, high molecular weight standard; L, low molecular weight standard; C, control (incubated without enzyme addition for 30 min at 50 °C); MHC, myosin heavy chain.

Hydrolysis of Myofibrillar Proteins from Cuttlefish Muscle by the Purified Cathepsin D from Hepatopancreas of Cuttlefish. The myofibrillar proteins fraction, extracted from cuttlefish muscle, contained three major protein bands, corresponding to myosin heavy chain (MHC), actin, and paramyosin (**Figure 6**). The molecular mass of paramyosin from different species ranges from 95 to 125 kDa (*70*).

The digestion of myofibrillar protein from cuttlefish muscle by the purified cathepsin D at 50 °C was investigated by SDS-PAGE. **Figure 6** shows the degradation of the MHC, paramyosin, and actin. Among all proteins, MHC was the most susceptible to hydrolysis, followed by paramyosin. MHC was degraded rapidly within 5 min by the purified cathepsin D (**Figure 6**). Total disappearance of MHC was observed after 10 min of incubation at 50 °C. For actin and paramyosin, the degradation increased during the incubation time. However, the degradation rate was lower than that of MHC. On the other hand, paramyosin was completely hydrolyzed by cathepsin D after 20 min of incubation, whereas actin was more resistant to hydrolysis by cathepsin D. Actin was retained to some extent after 30 min of incubation at 50 °C. From the result, cathepsin D from cuttlefish hepatopancreas hydrolyzed myofibrillar proteins effectively, particularly MHC, which is the dominant protein in fish muscle. Therefore, cathepsin D can be used for further application, especially for the production of protein hydrolysates.

Conclusion. In the present study, a new cathepsin D from *S. officinalis* was purified and characterized. The purified cathepsin D was homogeneous on SDS-PAGE, and its molecular mass was estimated to be 37.5 kDa. The enzyme showed an optimum temperature at 50 °C and an optimum pH of 3.0. The N-terminal sequence of cathepsin D showed high homology with vertebrate and invertebrate cathepsins D.

Further work is needed to isolate and sequence analyze the cDNA encoding cuttlefish cathepsin D and to determine the

properties of this protease as a possible biotechnological tool in the fish-processing and food industries.

LITERATURE CITED

(1) Davies, D. R. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1990**, *19*, 189−215.
(2) Foltmann, B. Gastric proteinases: structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays Biochem.* **1981**, *17*, 52−84.
(3) Cooper, J. B.; Khan, G.; Taylor, G.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L. X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 199−222.
(4) Takeda-Ezaki, M.; Yamamoto, K. Isolation and biochemical characterization of procathepsin E from human erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *304*, 352−358.
(5) Sato, K.; Nagai, Y.; Suzuki, M. Purification and characterization of an acid proteinase from *Dirofilaria immitis* worms. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1995**, *362*, 299−304.
(6) Tang, J.; Wang, R. N. S. Evolution in the structure and function of aspartic protease. *J. Cell Biochem.* **1987**, *33*, 53−63.
(7) Inagami, T.; Murakami, K.; Misono, K.; Workman, R. J.; Cohen, S.; Suketa, Y. Renin and precursor: purification, characterization, and studies on active site. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *95*, 225−247.
(8) Roberts, N. B.; Taylor, W. H. The preparation and purification of individual human pepsins by using diethylaminoethyl-cellulose. *Biochem. J.* **1987**, *169*, 607−615.
(9) Foltman, B.; Andersen, B. The primary structure of prochymosin (prorennin) EC 3.4.4.3. Some tryptic fragments of a maleylated preparation. *FEBS Lett.* **1971**, *17*, 87−89.
(10) Kay, J.; Tyas, L.; Humphreys, M. J.; Hill, J.; Dunn, B. M.; Berry, C. Aspartic proteinases from parasites. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *389*, 247−250.
(11) Francis, S. E.; Sullivan, D. J., Jr.; Goldberg, D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 97−123.
(12) Guruprasad, K.; Tormakangas, K.; Kervinen, J.; Blundell, T. L. Comparative modelling of barley-grain aspartic proteinase: a structural rationale for observed hydrolytic specificity. *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 131−136.
(13) Brodelius, P. E.; Cordeiro, M. C.; Pais, M. S. Aspartic proteinases (cyprosins) from *Cynara cardunculus* spp. *flavescens* cv. Cardoon; purification, characterisation, and tissue-specific expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1995**, *362*, 255−266.
(14) Phylip, L. H.; Mills, J. S.; Parten, B. F.; Dunn, B. M.; Kay, J. Intrinsic activity of precursor forms of HIV-1 proteinase. *FEBS Lett.* **1992**, *314*, 449−454.
(15) von der Helm, K. Retroviral proteases: structure, function and inhibition from a non-anticipated viral enzyme to the target of a most promising HIV therapy. *Biol. Chem.* **1996**, *377*, 765−774.
(16) Toogood, H. S.; Prescott, M.; Daniel, R. M. A pepstatin-insensitive aspartic proteinase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Biochem. J.* **1995**, *307*, 783−789.
(17) Hill, J.; Phylip, L. H. Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 357−360.
(18) Metcalf, P.; Fusek, M. Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *EMOB J.* **1993**, *12*, 1293−1302.
(19) Tsuji, H.; Akasaki, K. Identification and characterization of lysosomal enzymes involved in the proteolysis of phenobarbital-inducible cytochrome P450. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 568−571.
(20) Yang, X.; Schnellmann, R. G. Proteinases in renal cell death. *J. Toxicol. Environ. Health* **1996**, *48*, 319−332.
(21) Diment, S.; Martin, K. J.; Stahl, P. D. Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13403−13406.
(22) van Noort, J. M.; van der Drift, A. C. The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14159−14164.
(23) Garcia, M.; Platet, N.; Liaudet, E.; Laurent, V.; Derocq, D.; Brouillet, J. P.; Rochefort, H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* **1996**, *14*, 642−650.
(24) Goldman-Levkovitz, S.; Rimon, A.; Rimon, S. Purification properties and specificity of cathepsin D from *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *112*, 147−151.
(25) Nielsen, L. B.; Nielsen, H. H. Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **2001**, *128*, 351−363.
(26) Wang, P. A.; Stenvik, J.; Larsen, R.; Mæhre, H.; Olsen, R. L. Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) liver. Isolation and comparative studies. *Comp. Biochem. Physiol.* **2007**, *147*, 504−511.
(27) Capasso, C.; Lees, W. E.; Capasso, A.; Scudiero, R.; Carginale, V.; Kille, P.; Kay, J.; Parisi, E. Cathepsin D from the liver of the antarctic icefish *Chionodraco hamatus* exhibits unusual activity and stability at high temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1431*, 64−73.
(28) Gildberg, A. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **1988**, *91*, 425−435.
(29) Komai, T.; Kawabata, C.; Amano, M.; Lee, B. R.; Ichishima, E. Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid. *Comp. Biochem. Physiol.* **2004**, *82*, 373−382.
(30) Wright, L. M.; Levy, E. S.; Patel, N. P.; Alhadeff, J. A. Purification and characterization of cathepsin D from normal human breast tissue. *J. Protein Chem.* **1997**, *16*, 171−181.
(31) Wittlin, S.; Rösel, J.; Stover, D. R. One-step purification of cathepsin D by affinity chromatography using immobilized propeptide sequences. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *252*, 530−536.
(32) Huang, J. S.; Huang, S. S.; Tang, J. Cathepsin D isozymes from porcine spleens. Large scale purification and polypeptide chain arrangements. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 11405−11417.
(33) Larsen, L. B.; Benfeldt, C.; Rasmussen, L. K.; Petersen, T. E. Bovine milk procathepsin D and cathepsin D: coagulation and milk protein degradation. *J. Dairy Res.* **1996**, *63*, 119−130.
(34) Barrett, A. J. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem. J.* **1970**, *117*, 601−607.
(35) Jiang, S. T.; Wang, Y. T.; Chen, C. S. Purification and characterization of a proteinase identified as cathepsin D from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* × *Tilapia aurea*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1597−1601.
(36) Balti, R.; Barkia, A.; Bougatef, A.; Ktari, N.; Nasri, M. Heat-stable trypsin from cuttlefish (*Sepia officinalis*) hepatopancreas: purification and characterization. *Food Chem.* **2009**, *113*, 146−154.
(37) Anson, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and the cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol* **1938**, *22*, 79−89.
(38) Bougatef, A.; Balti, R.; Ben Zaied, S.; Souissi, N.; Nasri, M. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chem.* **2008**, *107*, 774−784.
(39) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680−685.
(40) Garcia-Carreno, F. L.; Dimes, L. E.; Haard, N. F. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 65−69.
(41) Hewick, R. M.; Hunkapiller, M. W.; Hood, L. E.; Dreyer, W. J. A gas−liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7990−7997.
(42) Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248−254.
(43) Hashimoto, K.; Watabe, S.; Kono, M.; Kazuki, S. Musle protein composition of sardine and mackerel. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1979**, *45*, 1435−1441.
(44) Gildberg, A. Purification and characterization of cathepsin D from the digestive gland of the pelagic squid *Todarodes sagittatus*. *J. Sci. Food Agric.* **1987**, *39*, 85−94.
(45) Jiang, S. T.; Heir, Y. H.; Lee, J. J.; Wang, J. H. Comparaison of the cathepsin D from mackerel (*Scomber australasicus*) and milkfish (*Chanos chanos*). *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *57*, 571−577.
(46) Jiang, S. T.; Nei, F. P.; Chen, H. C.; Wang, J. H. Comparative Study on the Cathepsin D from banded shrimp (*Penaeus japonicus*) and

grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 961−966.
(47) Tassanakajon, A.; Wongpanya, R. Cathepsin D of *Penaeus monodon*. Accession no. ABQ10738, GenBank database, 2007.
(48) Rojo, L.; Muhlia-Almazan, A.; Saborowski, R.; Garcia-Carreno, F. L. Aspartic cathepsin D endopeptidase contributes to extracellular digestion in clawed lobsters *Homarus americanus* and *Homarus gammarus*. *Mar. Biotechnol.* **2010**, in press.
(49) Andreassen, R.; Lunner, S.; Hoyheim, B. Characterization of full-length sequenced cDNA inserts (FLIcs) from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* **2009**, *10*, 502.
(50) North, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiol Rev.* **1982**, *46*, 308−340.
(51) Yoshida, H.; Okamoto, K.; Iwamoto, T.; Sakai, E.; Kanaoka, K.; Hu, J.-P.; Shibata, M.; Hotokezaka, H.; Nishishita, K.; Mizuno, A.; Kato, Y. Pepstatin A, an aspartic proteinase inhibitor, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. *J. Biochem.* **2006**, *139*, 583−590.
(52) Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. L-*trans*-Epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189−198.
(53) Watabe, S.; Taguchi, S.; Ikeda, T.; Takada, M.; Yogo, N. Characterization of cathepsin D in porcine adrenocortical lysosomes. *J. Biochem.* **1982**, *92*, 45−55.
(54) Pillai, S.; Zull, J. E. Effects of ATP, vanadate, and molybdate on cathepsin D-catalyzed proteolysis. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 8384−8389.
(55) Doke, S. N.; Ninjoor, V.; Nadkarni, G. B. Characterization of cathepsin D from the skeletal muscle of fresh water fish, *Tilapia mossambica*. *Agric. Biol. Chem. Tokyo* **1980**, *44*, 1521−1528.
(56) Stoknes, I.; Rustad, T. Purification and characterization of a multicatalytic proteinase from Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *111*, 587−596.
(57) Asghar, A.; Henrickson, R. L. Postmortem stimulation of carcasses: effects on biochemistry, biophysics, microbiology and qualityof meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1982**, *18*, 51−58.
(58) Asghar, A.; Bhatti, A. R. Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses. *Adv. Food Res.* **1987**, *31*, 343−451.
(59) Bond, J. S.; Butler, P. E. Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 333−364.
(60) Zeece, M. G.; Katoh, K. Cathepsin D and its effects on myofibrillar proteins: a review. *J. Food Biochem.* **1989**, *13*, 157−178.
(61) Iodice, A. A.; Leong, V.; Weinstock, L. M. Separation of cathepsin A and D of skeletal muscle. *Arch. Biochim. Biophys.* **1966**, *117*, 477−486.
(62) Makinodan, Y.; Kyaw, N. N.; Ikeda, S. Intracellular distribution of carp muscle cathepsin D and electron micrograph of muscle lysosomal fraction. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1982**, *48*, 1501−1509.
(63) Takeda, M.; Ueno, E.; Kato, Y.; Yamamoto, K. Isolation and catalytic and immunochemical properties of cathepsin D-like acid proteinase from rat erythrocytes. *J. Biochem.* **1986**, *100*, 1269−1277.
(64) Cunningham, M.; Tang, J. Purification and properties of cathepsin D from porcine spleen. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 4528−4536.
(65) Yamamoto, K.; Katsuda, N.; Himeno, M.; Kato, K. Cathepsin D of rat spleen, affinity purification and properties of two types of cathepsin D. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 459−467.
(66) Turk, V.; Kregar, I.; Gubensek, F.; Lapanje, S.; Urh, I.; Kovacic, M. Studies on bovine spleen cathepsin D. *Acta. Biol. Med. Ger.* **1977**, *36*, 1531−1535.
(67) Draper, A. M.; Zeece, M. G. Thermal stability of cathepsin D. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 1651−1652.
(68) Yamamoto, K.; Takeda, M.; Yamamoto, H.; Tatsumi, M.; Kato, Y. Human erythrocyte membrane acid proteinase (EMAP): sidedness and relation to cathepsin D. *J. Biochem.* **1985**, *97*, 821−830.
(69) Klee, C. B. Interaction of calmodulin with Ca^{2+} and target proteins. In *Molecular Aspects of Cellular Regulations, Vol. 5, Calmodulin*; Cohen, P., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1988; Chapter 3, pp 35−56.
(70) Sikorski, Z. E. The myofibrillar proteins in seafoods. In *Seafood Proteins*; Sikorski, Z. E., Pan, B. S., Shahidi, F., Eds.; Chapman and Hall: New York, 1994; pp 40−57.
(71) Kurokawa, T.; Uji, S.; Suzuki, T. Identification of pepsinogen gene in the genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol.* **2005**, *140*, 133−140.
(72) Brooks, S.; Tyler, C. R.; Carnevali, O.; Coward, K.; Sumpter, J. P. Molecular characterization of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gene* **1997**, *201*, 45−54.
(73) Park, E. M.; Kim, Y. O.; Nam, B. H.; Kong, H. J.; Kim, W. J.; Lee, S. J.; Kim, K. K. Cloning and expression analysis of cathepsin D in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2009**, *73*, 1856−1859.
(74) Riggio, M.; Scudiero, R.; Filosa, S.; Parisi, E. Sex- and tissue-specific expression of aspartic proteinases in *Danio rerio* (zebrafish). *Gene* **2000**, *260*, 67−75.
(75) Jia, A.; Zhang, X. H. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cathepsin D gene from turbot *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2009**, *26*, 606−613.
(76) Retzek, H.; Steyrer, E.; Sanders, E. J.; Nimpf, J.; Schneider, W. J. Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. *DNA Cell Biol.* **1992**, *11*, 661−672.
(77) Faust, P. L.; Kornfeld, S.; Chirgwin, J. M. Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 4910−4914.
(78) De Stasio, R.; Borrelli, L.; Kille, P.; Parisi, E.; Filosa, S. Isolation, characterization and molecular cloning of cathepsin D from lizard ovary: changes in enzyme activity and mRNA expression throughout ovarian cycle. *Mol. Reprod. Dev.* **1999**, *52*, 126−134.
(79) Shewale, J. G.; Tang, J. Amino acid sequence of porcine spleen cathepsin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3703−3707.
(80) Birch, N. P.; Loh, Y. P. Cloning, sequence and expression of rat cathepsin D. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6445−6446.
(81) Jolodar, A.; Miller, D. J. Preliminary characterization of an *Onchocerca volvulus* aspartic protease. *Int. J. Parasitol.* **1997**, *27*, 1087−1090.
(82) Imai, T.; Miyazaki, H.; Hirose, S.; Hori, H.; Hayashi, T.; Kageyama, R.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S.; Murakami, K. Cloning and sequence analysis of cDNA for human rennin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, *80*, 7405−7409.
(83) Aldred, G. P.; Fu, P.; Crawford, R. J.; Fernley, R. T. The sequence and tissue expression of ovine renin. *J. Mol. Endocrinol.* **1992**, *8*, 3−11.

Received for review February 26, 2010. Revised manuscript received August 27, 2010. Accepted August 30, 2010. This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia.

Purification et caractérisation biochimique d'une chymotrypsine spécifique aux peptides à longue chaîne partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*)

Rafik Balti, Fateh Bougherra, Ali Bougatef, Hayet Ben Khaled, Naima Nedjar-Arroume, Pascal Dhulster, Didier Guillochon, Moncef Nasri

Les chymotrypsines représentent le deuxième groupe le plus important des protéases digestives à sérine. Jusqu'à présent, peu de travaux de recherche concernant l'étude biochimique de ces protéases chez les invertébrés marins ont été menés. Le présent travail s'intéresse à l'extraction, la purification et la caractérisation biochimique de la chymotrypsine à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*Sepia officinalis*). Le protocole de purification adopté comporte cinq étapes : une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-Sepharose, ultrafiltration (10 kDa), une filtration sur Sephadex G-200, une chromatographie hydrophobe sur Phenyl-Sepharose. Le facteur de purification et le rendement final sont de l'ordre de 120 et 23 %, respectivement.

L'analyse par électrophorèse sur SDS-PAGE, montre que l'enzyme purifiée présente une seule bande qui correspond à une masse moléculaire de l'ordre de 28 kDa. La pureté de la chymotrypsine a été évaluée par Native-PAGE associée à un zymogramme. Le résultat obtenu a montré que la chymotrypsine présente une seule bande protéique qui correspond à un seul halo de dégradation de la caséine. Ce résultat prouve d'une part que la chymotrypsine de la seiche commune (*S. officinalis*) a été purifiée à homogénéité, et d'autre part l'absence des isoformes pour cette enzyme.

L'enzyme purifiée présente une activité spécifique sur succinyl-$_L$-ala-ala-pro-$_L$-phenylalanine-*p*-nitroanilide (SAAPFpNA), substrat spécifique de la chymotrypsine, de l'ordre de 68,52 U/mg. Cette protéase est complètement inhibée par le chymostatine (inhibiteur spécifique de la chymotrypsine) et par les inhibiteurs spécifiques des protéases à serine : le PMSF et le DFP (Diisopropylfluorophosphate). Ces résultats confirment que l'enzyme purifiée est une protéase à serine et particulièrement elle appartient à la famille des chymotrypsines.

L'enzyme purifiée possède des optima de pH et de température de 8,5 et 55 °C, respectivement. Elle est active à des pH allant de 5,0 à 11,0. Les activités relatives à pH 7,5,

8,0 et 9,0 sont de l'ordre de 82 %, 90,1 % et 87 %, respectivement. La chymotrypsine de la seiche commune est très stable dans une large gamme de pH. En effet, elle retient plus de 92 % de son activité initiale entre pH 7,5 et 9,5. A des pH 10,0 et 11,0, la chymotrypsine retient plus que 85 % de son activité initiale. L'étude de la thermostabilité a montré que l'enzyme purifiée est hautement stable à des températures inférieures à 50 °C, cependant elle est totalement inactivée à 70 °C. Les activités résiduelles enregistrées après 60 min de pré-incubation à 50 et 60 °C sont de l'ordre de 75 et 31 %, respectivement.

La séquence N-terminale de la chymotrypsine est **IVGGQEATIGEYPWQAALQV**. L'alignement de cette séquence avec les séquences des chymotrypsines publiées a permis de noter une forte identité avec les chymotrypsines des invertébrés marins. Toutefois, la chymotrypsine de *S. officinalis* possède respectivement les résidus Gly, Tyr et Ala aux positions 3, 12 et 17 alors que Asn_3, Trp_{12} and Ser_{17} sont largement décrites chez les chymotrypsines des vertébrés marins.

L'étude de la spécificité de coupure de la protéase purifiée à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune a été réalisée en utilisant plusieurs peptides chromogènes synthétiques. Les résultats ont montré que cette protéase hydrolyse préférentiellement du côté C-terminale des résidus Phe et Leu, similaire aux chymotrypsine-like protéases. De plus, cette enzyme hydrolyse efficacement les peptides synthétiques formés de 4 acides aminés avec Phe et Leu en position P_1. Les activités spécifiques déterminées sur SAAPFpNA et SAAPLpNA sont de l'ordre de 68,52 U/mg et 15,34 U/mg, respectivement. Par contre, la chymotrypsine de *S. officinalis* possède une très faible activité spécifique de l'ordre de 1,42 U/mg, sur ZAALpNA, utilisé comme substrat. Cette étude suggère que la chymotrypsine purifiée hydrolyse uniquement les peptides à longue chaîne (3 ou 4 acides aminées) en présence de Phe ou Leu en position P_1, alors qu'elle est inactive sur les peptides contenant un seul acide aminé, contrairement aux chymotrypsines des mammifères.

Les paramètres cinétiques (K_m et K_{cat}) de la chymotrypsine purifiée, déterminés sur SAAPFpNA, sont de l'ordre de 21,9 µM et 17,9 s^{-1}, respectivement. Alors que ceux déterminés sur SAAPLpNA sont de l'ordre de 53,7 µM et 3,6 s^{-1}, respectivement. Les efficacités catalytiques (K_{cat}/K_m) sont de 0,817 s^{-1} μM^{-1} et 0,067 s^{-1} μM^{-1}, déterminées sur SAAPFpNA et SAAPLpNA, respectivement.

Article 3:

Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptides substrates: Purification and biochemical characterization.

Balti Rafik, Bougherra Fateh, Bougatef Ali, Ben Khaled Hayet, Nedjar-Arroume Naima, Dhulster Pascal, Guillochon Didier & Nasri Moncef (2012). *Food Chemistry*, 130, 475-484.

Food Chemistry 130 (2012) 475–484

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterisation

Rafik Balti [a], Fateh Bougherra [b], Ali Bougatef [a], Ben Khaled Hayet [a], Naima Nedjar-Arroume [c], Pascal Dhulster [c], Didier Guillochon [c], Moncef Nasri [a,*]

[a] *Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Université de Sfax, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP "1173", 3038 Sfax, Tunisia*
[b] *Laboratoire de Bio-ressources Naturelles, Université Hassiba Benbouali de Chlef, BP 151, Hay Salem 02000, Chlef, Algeria*
[c] *Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 March 2011
Received in revised form 27 June 2011
Accepted 7 July 2011
Available online 22 July 2011

Keywords:
Chymotrypsin
Cuttlefish
Sepia officinalis
Hepatopancreas
Purification
Biochemical characterisation
N-terminal amino acid sequence

ABSTRACT

Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) was purified to homogeneity, with a 120-fold increase in specific activity and 23% recovery. The molecular weight of the purified chymotrypsin was estimated to be 28 kDa by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for the chymotrypsin activity were pH 8.5 and 55 °C, respectively, using succinyl-L-ala-ala-pro-L-phenylalanine-*p*-nitroanilide (SAAPFpNA) as a substrate. The enzyme was extremely stable in the pH range of 7.0–10.0 and highly stable up to 50 °C after 1 h incubation. This proteinase was strongly inhibited by chymostatin, soybean trypsin inhibitor, diisopropylfluorophosphate and phenylmethylsulfonyl fluoride, but was not inhibited by tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, *N*-carbobenzoxy-phenylalanine chloromethyl ketone or N_{α}-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone. The enzyme hydrolysed long chymotrypsin peptide substrates SAAPFpNA, SAAPLpNA and ZAALpNA and did not hydrolyse short chymotrypsin substrates. Kinetic parameters of the enzymatic reaction demonstrated that the best substrate was SAAPFpNA, with k_{cat} 18 s^{-1} and K_m 22 μM. However, the enzyme had a lower K_m for SAAPLpNA, 54 μM.

The N-terminal amino acid sequence of the first 20 amino acids of the purified chymotrypsin was **IVGGQEATIGEYPWQAALQV**.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, recovery and characterisation of proteolytic enzymes, from the internal organs of fish and aquatic invertebrates, have been reported and this has led to the emergence of some interesting new applications of these enzymes in food processing (Shahidi & Kamil, 2001). The most important digestive enzymes from fish and aquatic invertebrate viscera are the aspartic protease pepsin, and serine proteases, trypsin, chymotrypsin, collagenase and elastase.

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) is a serine protease that has been extensively studied both structurally and functionally (Blow, 1971; Hess, 1971). It is synthesised in the form of an inactive precursor, chymotrypsinogen, in the pancreatic tissue as a single polypeptide chain and is converted to the active enzyme by tryptic cleavage. Chymotrypsin, a member of the large family of serine proteinases, specifically cleaves peptide bonds on the carboxyl side of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan residues and plays an important role in protein digestion. Chymotrypsins are widely distributed among living species. Until recently, most studies on chymotrypsin have been restricted to mammalian species, particularly on the bovine enzyme. In the last two decades, a lot of studies have been performed in an attempt to understand aspects of evolution of chymotrypsin from the submammalian species.

Chymotrypsins have been isolated and characterised from the viscera of some marine invertebrates and several fish species, including the digestive gland (hepatopancreas) of the white shrimp (*Penaeus vannamei*) (Hernandez-Cortes, Whitaker, & Garcia-Carreno, 1997), scallop (*Pecten maximus*) (Le Chevalier, Sellos, & Van Wormhoudt, 1995), grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Fong, Chan, & Lau, 1998) and crucian carp (*Carassius auratus*) (Yang et al., 2009), the pancreas of common carp (*Cyprinus carpio*) (Cohen, Gertler, & Birk, 1981a), the pyloric caeca of cod (*Gadus morhua* L.) (Raae & Walther, 1989) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Kristjansson & Nielsen, 1992), the entire viscera of anchovy (*Engraulis japonica*) (Heu, Kim, & Pyeun, 1995), striped seabream

* Corresponding author. Tel.: +216 74 274 088; fax: +216 74 275 595.
E-mail addresses: mon_nasri@yahoo.fr, moncef.nasri@enis.rnu.tn (M. Nasri).

0308-8146/$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.019

(*Lithognathus mormyrus*) (El Hadj Ali, Hmidet, Zouar-Fakhfakh, Ben Khaled, & Nasri, 2010) and Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) (Castillo-Yañez, Pacheco-Aguilar, García-Carreño, Navarrete-Del Toro, & Félix-López, 2006).

Marine vertebrate chymotrypsins, especially those of fish, have been well characterised. These studies revealed that fish chymotrypsins have similar molecular weight to bovine and porcine chymotrypsins. However, some important differences have been detected in fish chymotrypsin, including higher catalytic activity, lower thermostability, and differences in polypeptide amino acid composition (Racicot & Hultin, 1987; Ramakrishna, Hultin, & Racicot, 1987). For example, the cod chymotrypsins have a higher proportion of charged residues but fewer polar H-bond forming residues than their mammalian counterparts (Guðmunsdóttir, Óskarsson, Eakin, Craik, & Bjarnason, 1994; Leth-Larsen, Ásgeirsson, Thórólfsson, Nørregaard-Madsen, & Hojrup, 1996). The more flexible tertiary structure results in a higher catalytic efficiency of the fish enzyme (Asgeirsson & Bjarnason, 1991; Kanno et al., 2011). The higher catalytic ability of the enzyme represents an evolutionary adaptation of enzyme to the low temperature environment of the fish, so as to maintain full physiological activities in their cold habitat (Kishimura, Klomklao, Benjakul, & Chun, 2008).

However, few studies have been done on chymotrypsins from marine invertebrates. The presence of chymotrypsin activity in the digestive gland of decapods is still a matter of controversy, as several authors have reported its absence. However, some researchers have identified chymotrypsin activity in the digestive system of decapods (Garcia-Carreno, Hernandez-Cortes, & Haard, 1994).

In Tunisia, cuttlefish (*Sepia officinalis*) is relatively important in fish-catches and is utilised for human consumption. During processing, solid wastes are generated. These wastes, which may represent approximately 30% of the raw material, constitute an important source of proteolytic enzymes and proteins. In a previous work, we have purified and characterised trypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*S. officinalis*). The enzyme showed an optimum temperature at 70 °C and an optimum pH of 8.0. In addition, the enzyme was stable over a pH range of 6.0–10.0 and highly thermostable (Balti, Barkia, Bougatef, Ktari, & Nasri, 2009).

In the present study, we describe for the first time the purification of a chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish, and provide basic information about its main biochemical and kinetic characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Chemicals

DEAE-Sepharose, Sephadex G-200 and Phenyl-Sepharose were purchased from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). *N*-Succinyl-$(Ala)_2$-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (SAAPFpNA) and *N*-succinyl-$(Ala)_2$-Pro-Leu-*p*-nitroanilide (SAAPLpNA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and other substrates used for characterisation of enzyme substrate specificity: *N*-CBZ-$(Ala)_2$-Leu-*p*-nitroanilide (ZAALpNA), *N*-succinyl-$(Gly)_3$-*p*-nitroanilide (SGGGpNA), *N*-succinyl-$(Ala)_2$-Val-*p*-nitroanilide (SAAVpNA), *N*-succinyl-$(Ala)_3$-*p*-nitroanilide (SAAApNA), *N*-benzoyl-L-tyrosine-*p*-nitroanilide (B-Tyr-pNA), *N*-succinyl-phenylalanine-*p*-nitroanilide (S-Phe-pNA) and *N*-acetyl-L-leucine-*p*-nitroanilide (Ac-Leu-pNA) were purchased from Bachem Feinchemikalien AG (Bubendorf, Switzerland). Casein sodium salt from bovine milk, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline, *N*-*p*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) and *N*-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), benzamidine, glycine, ammonium sulphate, and bovine serum albumin were purchased from Sigma Chemical Co. Soybean trypsin inhibitor (SBTI) and *N*-α-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BApNA) were obtained from Fluka Biochemica (Buchs, Switzerland). Sodium dodecyl sulphate (SDS), acrylamide, ammonium persulfate, *N,N,N′,N′*-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) and Coomassie Brilliant Blue R-250 were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). All other reagents were of analytical grade.

2.1.2. Cuttlefish viscera

Cuttlefish (*S. officinalis*) were obtained from the fish market of Sfax City, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1:3 (w/w) and transported to the research laboratory within 30 min. The internal organs were separated and only the hepatopancreas was collected and then used immediately for the extraction of digestive enzymes.

2.2. Extraction of cuttlefish digestive glands

Cuttlefish digestive glands (63 g) were rinsed with cold distilled water, and homogenised for 3 min with 252 mL extraction buffer (10 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), 5 mM $CaCl_2$, 20 mM NaCl) at 4 °C. The homogenate was centrifuged at 10,000*g* for 30 min at 4 °C, and the supernatant obtained was collected and lyophilised.

2.3. Chymotrypsin activity assay

Routinely, amidase activity of the isolated chymotrypsin was evaluated according to Tsai, Chuano, and Chuang (1986), using SAAPFpNA as a substrate with slight modifications. The reaction mixture contained 10 μL of enzyme solution suitably diluted and 990 μL of 0.1 mM SAAPFpNA in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5), 10 mM $CaCl_2$ buffer. The assays were carried out for 10 min at 25 °C. Chymotrypsin activity was measured by the absorbance at 410 nm due to *p*-nitroaniline released. SAAPFpNA hydrolysis units (*U*) were calculated with the following equation:

$$U = [A_{(410)}/\text{min} \times 1000 \times 1]/8800,$$

where 8800 = *p*-nitroaniline molar extinction coefficient in $M^{-1}\ cm^{-1}$, 1000 is the factor to convert M to μmoles in 1 mL which is the volume of the reaction mixture (Erlanger, Kokowski, & Cohen, 1961). All assays were done in triplicate.

2.4. Chymotrypsin purification

All the purification steps were conducted at temperatures not exceeding 4 °C. Lyophilised powder (1.83 g) of cuttlefish digestive gland was dissolved in 5-fold of buffer **A** (25 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), 5 mM $CaCl_2$) and dialysed against the same buffer extensively. The dialysate was applied to a DEAE-Sepharose column (2.5 cm × 20 cm), which had been previously equilibrated with the buffer **A** until no protein was detected in the eluate. The bonding proteins were eluted with a linear gradient of NaCl in the range 0–0.5 M in the equilibrating buffer. Fractions of 5 mL were collected at a flow rate of 1 mL/min. All of the fractions were assayed for protein content and chymotrypsin activity, using SAAPFpNA as a substrate.

Fractions from DEAE-Sepharose hydrolysing SAAPFpNA were concentrated by ultrafiltration using a membrane of YM-10 (Millipore, Billerica MA), then applied to a Sephadex G-200 column (1.2 cm × 120 cm) pre-equilibrated with buffer **B** (25 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), NaCl 0.5 M). Fractions of 5 mL each were collected with the same buffer at a flow rate of 0.5 mL/min and

analysed for protein content and chymotrypsin activity, using SAAPFpNA, as a substrate.

Active fractions from Sephadex G-200 were pooled, added to 1.0 M $(NH_4)_2SO_4$ and subsequently applied to a Phenyl-Sepharose column (1.5 cm × 9 cm) equilibrated with buffer **C** (25 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), 1.0 M $(NH_4)_2SO_4$). The column was washed with the same buffer followed by a linear gradient of 1.0 to 0 M $(NH_4)_2SO_4$ in 25 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) in a total volume of 90 mL. Finally, the column was eluted with a linear gradient of ethylene glycol from 0% to 50% (v/v) in 25 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) in a total volume of 90 mL. Active fractions were pooled for further study.

2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis and casein zymography

SDS–PAGE was carried out for determination of purity and molecular weight of the purified enzyme, as described by Laemmli (1970), using a 5% (w/v) stacking and 15% (w/v) separating gels. Samples were prepared by mixing the purified enzyme at 1:5 (v/v) ratio with the SDS–PAGE sample buffer (10 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0), 2.5% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue). Samples were heated at 100 °C for 5 min before loading onto the gel. After electrophoresis, the gel was stained with 0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 45% ethanol:10% acetic acid and destained with 5% ethanol and 7.5% acetic acid. The molecular weight of the enzyme was estimated using molecular weight standards (low-range standards, Bio-Rad). The molecular mass markers used were phosphorylase B (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), egg white ovalbumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (31.0 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.3 kDa).

Native PAGE was performed according to the procedure of Laemmli (1970), except that the sample was not heated and SDS and reducing agent were left out.

Zymography is a sensitive and rapid assay method for analysing protease activity. Casein zymography was performed on native PAGE. Briefly, after electrophoresis, the gel was submerged in 1% casein in 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5), and incubated at 37 °C for 90 min. After washing, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 for zymography analysis. A clear zone on the blue background indicated the presence of proteinase.

2.6. N-terminal amino acid sequence analysis

The purified enzyme was subjected to SDS–PAGE and electrophoretically transferred to an Immobilon™ polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore) using a Bio-Rad Mini Trans-Blot cell. N-terminal sequencing was carried out on the PVDF-blotted protein at the Platform in Proteomics (University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France) using an ABI Procise System Model 492 automated protein sequencer (Applied Biosystems).

2.7. Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard and, during the course of enzyme purification, by measuring the absorbance at 280 nm.

2.8. Biochemical properties

2.8.1. pH and temperature profiles

Chymotrypsin activity was determined over the pH range of 4.0–11.0 at 25 °C for 10 min, using 0.1 mM SAAPFpNA as a substrate. The following buffer systems were used: 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.0–6.5), 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM Tris–HCl buffer (pH 7.5–8.5), and 100 mM glycine–NaOH buffer (pH 9.0–11.0). For the temperature profile study, the enzyme activity was assayed at various temperatures ranging from 10 to 70 °C for 10 min at pH 8.5.

2.8.2. pH and thermal stability

The effect of pH on chymotrypsin stability was evaluated by measuring the residual enzymatic activity for 10 min at 25 °C after incubation at various pH values (pH 2.0–11.0) for 60 min at room temperature (20 ± 1 °C). To investigate thermal stability, the purified chymotrypsin in 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5) was incubated at different temperatures from 10 to 70 °C for 60 min and immediately cooled in ice water. Thereafter, the residual activity was determined at pH 8.5 and 25 °C for 10 min. The non-heated enzyme was considered as the control (100%).

2.8.3. Effect of proteinase inhibitors and metal ions

The effects of different enzyme inhibitors on chymotrypsin activity were studied using chymostatin, PMSF, SBTI, DFP, TLCK, TPCK, ZPCK, benzamidine, 1,10-phenanthroline, EDTA, pepstatin, leupeptin, amastatin, bestatin, elastatinal, *N*-ethylmaleimide, *p*-hydroxymercuribenzoate and E-64. The purified enzyme was preincubated with inhibitors at different final concentrations in 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5) for 30 min at 25 °C, and the remaining activity was measured using SAAPFpNA as a substrate. The activity of the enzyme assayed in the absence of inhibitors was taken as control.

The effects of various metal ions (5 mM) on chymotrypsin activity were investigated, using SAAPFpNA as a substrate, by adding monovalent (Na^+ or K^+) or divalent (Ca^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ba^{2+} and Mg^{2+}) metal ions to the reaction mixture. The activity of the enzyme in the absence of metal ions was taken as the control.

2.8.4. Substrate specificities

To investigate the substrate specificities of purified chymotrypsin, enzyme assays were performed in 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5) as described above using various synthetic substrates: SAAPLpNA, ZAALpNA, SGGGpNA, SAAVpNA, SAAApNA, B-Tyr-pNA, S-Phe-pNA and Ac-Leu-pNA.

Activities toward BTEE (Hummel, 1959), ATEE (Schwert & Takenaka, 1955), BAEE (Blanco & Guisan, 1988) and BApNA (Erlanger et al., 1961) were also evaluated.

2.8.5. Kinetic studies

The kinetic parameters for enzymatic hydrolyses of SAAPFpNA and SAAPLpNA were determined with the purified chymotrypsin in 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.5) at 25 °C. Enzyme activities were measured using different final concentrations of substrates ranging from 0.005 to 1.0 mM. The final enzyme concentration of the assay was 2 μg/mL. The respective kinetic parameters for each substrate, including the apparent Michaelis–Menten constant (K_m) and the maximum velocity (V_{max}), were calculated from Lineweaver–Burk plots (Lineweaver & Burk, 1934).

The value of the turnover number (k_{cat}) was calculated from the following equation:

$$K_{cat} = V_{max}/[E],$$

where $[E]$ is the enzyme molar concentration, which was estimated, using its molecular weight as determined by SDS–PAGE (Copeland, 2000). All of the kinetic values were obtained from three independent determinations.

3. Results and discussion

3.1. Purification of S. officinalis chymotrypsin

Chymotrypsin from the hepatopancreas of *S. officinalis* was extracted and purified successively by the four-step procedure described in Section 2. Sample was first applied to an ion-exchange column (DEAE-Sepharose). The chymotrypsin fractions, eluted at 0.22 M NaCl, were pooled, and then applied to a stirred ultrafiltration cell using 10-kDa cut-off membrane. The concentrated enzyme was subjected to chromatography on a Sephadex G-200 column (data not shown). After gel filtration, the active chymotrypsin fractions were submitted to Phenyl-Sepharose for further purification.

As shown in Fig. 1, chymotrypsin activity was eluted from the Phenyl-Sepharose column when the gradient reached a concentration of 32% ethylene glycol, indicating the higher binding capacity of the purified proteinase. Such strong binding to Phenyl-Sepharose was also reported in chymotrypsins from shrimp (*P. vannamei*) (Hernandez-Cortes et al., 1997), rainbow trout (*O. mykiss*) (Kristjansson & Nielsen, 1992), crucian carp (*C. auratus*) (Yang et al., 2009) and Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) (Jiang et al., 2010).

The results of the purification procedure are summarised in Table 1. After the final purification step, cuttlefish chymotrypsin was purified 120-fold, with a recovery of 23% and with a specific activity of 69 U/mg protein, using SAAPFpNA as a substrate.

3.2. Purity and molecular weight

The purified chymotrypsin was analysed by SDS–PAGE under reducing conditions. As shown in Fig. 2a, the purified enzyme gave a single band, and its molecular weight was estimated to be 28.0 kDa. The molecular weight of the purified *S. officinalis* chymotrypsin was similar to those of mammalian chymotrypsins (22–30 kDa) and was closer to those from other fish and aquatic invertebrates species, such as shrimp (25.0 kDa) (Van Wormhoudt, Chevalier, & Sellos, 1992), cod (27.0 kDa) (Raae & Walther, 1989), grass carp (28.0 and 27.0 kDa) (Fong et al., 1998), crucian carp (28.0 and 27.0 kDa) (Yang et al., 2009), Atlantic cod (26.0 kDa) (Asgeirsson & Bjarnason, 1991), rainbow trout (28.2 and 28.8 kDa) (Kristjansson & Nielsen, 1992), anchovy (26.1 kDa) (Heu, Kim, & Pyeun, 1995), Monterey sardine (25.5 kDa) (Castillo-Yañez,

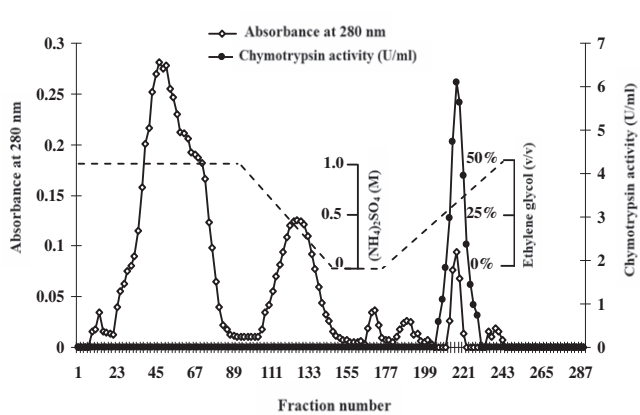


Fig. 1. Elution profile of *S. officinalis* chymotrypsin from a Phenyl-Sepharose column. Active fractions from the Sephadex G-200 gel filtration were collected and then applied to a phenyl-Sepharose column (1.5 cm × 9 cm), equilibrated with buffer C. The enzyme was eluted with a linear gradient of ethylene glycol (0–50%) in 25 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0). Fractions of 1.5 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min.

Table 1
A summary of the purification of chymotrypsin from cuttlefish (*S. officinalis*) hepatopancreas.

Purification steps	Total activity (*U*)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purity (fold)
Crude extract	414	727	0.57	100	1
DEAE-Sepharose	267	53	5	64	8.8
Ultrafiltration	220	34	6.5	53	11
Sephadex G-200	159	6.7	24	38	42
Phenyl-Sepharose	97	1.4	69	23	120

All operations were carried out at 4 °C.

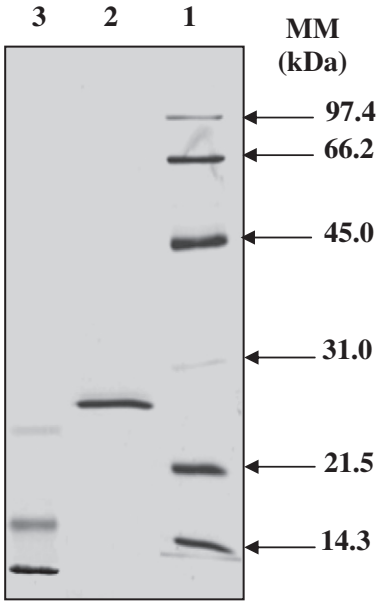


Fig. 2a. SDS–PAGE analysis. Lane 1: standard proteins marker of different molecular weights; lane 2: purified cuttlefish chymotrypsin; lane 3: bovine chymotrypsin.

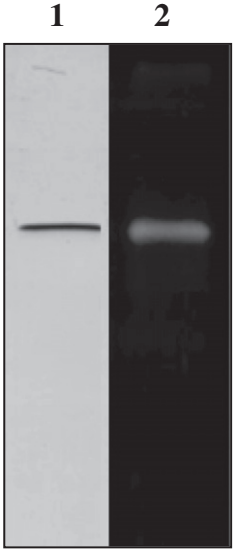


Fig. 2b. Native PAGE (lane 1) and zymogram (lane 2) of the purified chymotrypsin from *S. officinalis* hepatopancreas.

Pacheco-Aguilar, Lugo-Sanchez, García-Sanchez, & Quintero-Reyes, 2009), striped seabream (27.0 kDa) (El Hadj Ali et al., 2010) and Japanese sea bass (27.0 and 27.5 kDa) (Jiang et al., 2010).

The detection of a single band even in the presence of β-mercaptoethanol resembled other fish chymotrypsins, but differed from the bovine enzyme which splits into three polypeptide chains under reducing conditions (Blow, 1971). Direct amino acid sequence analyses of native cod chymotrypsins indicate the presence of two polypeptide chains (Leth-Larsen et al., 1996; Raae, Flengsrud, & Sletten, 1995). However, the A chain (13 residues long) is short and is probably lost on SDS–PAGE, leaving the longer B chain (230 residues) as the only polypeptide chain detected (Asgeirsson & Bjarnason, 1991; Raae & Walther, 1989). Similarly, the A chain of bovine chymotrypsin also escaped detection on SDS–PAGE analysis (Fig. 2a, lane 3). Therefore, the activated fish chymotrypsins, unlike their mammalian counterparts, remain in either the π or δ form and do not convert into the α form.

The purity of the isolated chymotrypsin was also evaluated by using native gel electrophoresis. *S. officinalis* chymotrypsin migrated as a single protein band in the native PAGE, confirming the homogeneity of the enzyme (Fig. 2b). The proteolytic activity of this protein band was confirmed by zymogram activity staining. As shown in Fig. 3, only one clear band of casein hydrolysis was observed in the gel, indicating the homogeneity of the purified chymotrypsin.

The obtained result showed that there is one dominant isoform of chymotrypsin in the hepatopancreas of *S. officinalis*. Our present results are similar to some other previous studies on chymotrypsins from aquatic invertebrate species, such as white shrimp (Hernandez-Cortes et al., 1997) and abalone (Groppe & Morse, 1993). On the other hand, marine vertebrate chymotrypsins usually have different isoforms. Recently, Jiang et al. (2010) reported the presence of two isoforms of chymotrypsins in the hepatopancreas of Japanese sea bass. However, only one dominant isoform of chymotrypsin was purified from the viscera of striped seabream (El Hadj Ali et al., 2010).

3.3. N-terminal amino acid sequence of S. officinalis chymotrypsin

In order to further characterise the *S. officinalis* chymotrypsin, we investigate its N-terminal amino acid sequence. The N-terminal 20 amino acids of the *S. officinalis* chymotrypsin were found to be **IVGGQEATIGEYPWQAALQV**. The N-terminal amino acid sequence of *S. officinalis* chymotrypsin showed uniformity, indicating that it was isolated in a pure form.

In this study, no evidence of a chymotrypsinogen was found. Chymotrypsin was found in its active form when activity was tested in hepatopancreas extract, suggesting that rapid activation of zymogens was performed during dissection and extraction. This result is different from chymotrypsins from grass carp, which were activated by trypsin (Fong et al., 1998).

The amino acid terminal sequence of *S. officinalis* chymotrypsin was aligned with the sequences of other vertebrate and invertebrate chymotrypsins (Fig. 3). As shown in Fig. 3, $Ileu_1$, Val_2, Gly_4, Ala_7, Pro_{13}, Gln_{15} and Leu_{18} are common to all presented chymotrypsins. The sequence of *S. officinalis* showed high similarity with chymotrypsins from marine invertebrates. The chymotrypsin from *S. officinalis* differs from that of abalone (*Halotis rufescens*) by only seven residues in the first 20 amino acids (Groppe & Morse, 1993). The Ser_5, Asn_6, Ala_8, Ala_9, Phe_{12}, Gly_{16} and Ser_{17} in abalone chymotrypsin were replaced by Gln_5, Glu_6, Thr_8, Ile_9, Tyr_{12}, Ala_{16} and Ala_{17} in *S. officinalis* chymotrypsin. However, there are eight amino acid residues in the 20-terminal sequence that differ from chymotrypsins of white shrimp (*P. vannamei*) (Sellos & Van Wormhoudt, 1992) and kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) (Danwattananusorn, Kondo, Aoki, & Hirono, 2009).

S. officinalis chymotrypsin, which showed average homology with chymotrypsins from marine vertebrates, had a Gly residue at position three, a Tyr residue at position 12 and Ala residue at position 17, whereas Asn_3, Trp_{12} and Ser_{17} are common in all marine vertebrate chymotrypsins (Jiang et al., 2010; Leth-Larsen et al., 1996).

Invertebrate																				
Cuttlefish (*S. officinalis*)	I	V	G	G	Q	E	A	T	I	G	E	Y	P	W	Q	A	A	L	Q	V
Abalone (*H. rufescens*)	I	V	G	G	S	N	A	A	A	G	E	F	P	W	Q	G	S	L	Q	V
Scallop (*P. maximus*)	-	V	-	G	Q	-	A	G	I	Q	-	Y	P	W	Q	A	A	L	Q	A
White shrimp (*P. vannamei*)	I	V	G	G	V	E	A	T	P	H	S	W	P	H	Q	A	A	L	F	I
Kuruma shrimp (*M. japonicus*)	I	V	G	G	V	E	A	T	P	H	S	W	P	H	Q	A	A	L	F	I
Vertebrate																				
Striped seabream (*L. mormyrus*)	I	V	N	G	E	E	A	V	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atlantic cod (*G. morhua*) A	I	V	N	G	E	E	A	V	P	H	S	W	S	W	Q	V	S	L	Q	D
Atlantic cod (*G. morhua*) B	I	V	N	G	E	E	A	V	P	H	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Japanese sea bass (*L. japonicus*) A	I	V	N	G	E	E	A	V	P	H	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Japanese sea bass (*L. japonicus*) B	I	V	N	G	E	E	A	V	P	H	S	W	P	W	Q	V	S	L	-	-
Japanese flounder (*P. olivaceus*) 1	I	V	N	G	E	T	A	V	S	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Japanese flounder (*P. olivaceus*) 2	I	V	N	G	E	E	A	L	P	H	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Zebrafish (*D. rerio*) B_1	I	V	N	G	E	E	A	V	P	H	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Mozambique tilapia (*O. mossambicus*)	I	V	N	G	E	E	A	V	P	H	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Others animals																				
Chicken	I	V	N	G	E	P	A	V	P	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	Y
Ostrich	I	V	N	G	E	P	A	V	P	G	S	W	P	-	-	-	-	-	-	-
Human B_1	I	V	N	G	E	D	A	V	P	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Human B_2	I	V	N	G	E	D	A	V	P	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Bovine A	I	V	N	G	E	E	A	V	P	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Bovine B	I	V	N	G	E	D	A	V	P	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D
Cow	I	V	N	G	E	E	A	V	P	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	N
Rat	I	V	N	G	E	D	A	I	P	G	S	W	P	W	Q	V	S	L	Q	D

Fig. 3. Alignment of the N-terminal amino acid sequence of the purified chymotrypsin from cuttlefish (*S. officinalis*) with the sequences of other chymotrypsins. Amino acid residues identical to *S. officinalis* chymotrypsin are shaded. Cuttlefish, *S. officinalis* chymotrypsin (present study); abalone (*H. rufescens*) (Groppe & Morse, 1993); scallop (*P. maimus*) (Le Chevalier et al., 1995); white shrimp (*P. vannamei*) (Sellos & Van Wormhoudt, 1992); kuruma shrimp (*M. japonicus*) (Danwattananusorn et al., 2009); striped seabream (*L. mormyrus*) (El Hadj Ali et al., 2010); Atlantic cod (*G. morhua*) (Leth-Larsen et al., 1996); Japanese sea bass (*L. japonicus*) (Jiang et al., 2010; Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Suzuki, Srivastava, & Kurokawa, 2002); zebrafish (*Danio rerio*) (GenBank BC078367); Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Lo & Weng, 2006); chicken (Guyonnet, Tłuścik, Long, Polanowski, & Travis, 1999); ostrich (Smith, Naude, Oelofsen, Lazure, & Patthy, 1992); human (Hou et al., 1993); bovine A (Hartley, 1964) and B (Smillie, Furka, Nagabhushan, Stevenson, & Parkes, 1968); cow (De Haën, Neurath, & Teller, 1975); rat (Bell et al., 1984).

Table 2
Effects of various enzyme inhibitors on the activity of the purified chymotrypsin from hepatopancreas of cuttlefish (*S. officinalis*).[a]

Inhibitors	Concentration (mM)	Target proteases	Remaining activity[b] (%)
Control	–	–	100
EDTA	5	Metallo-proteases	90 ± 2.8*
1,10-phenanthroline	5	Metallo-proteases	93 ± 1.4
SBTI	1.5 μM	Trypsin-like serine proteases	2.1 ± 0.3*
DFP	0.1	Serine proteases	6.3 ± 0.7*
PMSF	0.1	Serine proteases	1.4 ± 0.2*
Benzamidine	10	Serine proteases	88 ± 0.5*
TLCK	0.1	Trypsin-like serine proteases	98 ± 0.5
Leupeptin	0.1	Trypsin-like serine and some cysteine proteases	84 ± 0.1*
Amastatin	0.1	Metallo-aminopeptidases	100
Bestatin	0.1	Metallo-aminopeptidases	100
Pepstatin A	0.1	Some aspartic proteases	99 ± 0.2
Elastatinal	0.1	Elastase-like serine proteases	100
E-64	0.1	Cysteine proteases	99 ± 0.1
N-ethylmaleimide	1	Cysteine proteases	100
p-Hydroxymercuribenzoate	1	Cysteine proteases	100
TPCK	0.01	Chymotrypsin-like serine proteases	98 ± 1.6
ZPCK	0.01	Chymotrypsin-like serine proteases	96 ± 2.1
Chymostatin	0.01	Chymotrypsin-like serine proteases	0*

[a] Purified enzyme was pre-incubated with various enzyme inhibitors for 30 min at 25 °C, and the remaining activity was determined at pH 8.5 and 25 °C, using SAAPFpNA as a substrate. Enzyme activity measured in the absence of any inhibitor was taken as 100%.
[b] Mean ± SD from triplicate determinations.
* Significantly different from control at $p < 0.05$.

3.4. Effect of enzyme inhibitors on chymotrypsin activity

Proteases can be classified by their sensitivity to various inhibitors (North, 1982). The effects of various class-specific protease inhibitors on the purified chymotrypsin were investigated (Table 2). Chymotrypsin from *S. officinalis* was strongly inactivated by PMSF, DFP and SBTI, indicating the involvement of serine in their active site. It was not significantly affected by leupeptin, benzamidine, elastatinal or TLCK, but was strongly inhibited at low concentration by chymostatin, supporting our conclusion that the enzyme is a serine protease and belongs to the chymotrypsin family.

Unlike mammalian and other fish chymotrypsins which are inhibited by chloromethyl ketone derivatives, cuttlefish chymotrypsin was not susceptible to inhibition by TPCK (Castillo-Yañez et al., 2009; Heu et al., 1995; Yang et al., 2009) nor ZPCK. The inhibitors of metallo- (e.g., 1,10-phenanthroline, amastatin, bestatin and phosphoramidon), cysteine (e.g., E-64, *N*-ethylmaleimide and *p*-hydroxymercuribenzoate) and aspartic (e.g., pepstatin A) proteases tested here were ineffective against either enzyme.

The presence or absence of chymotrypsin in decapods has been a subject of debate. The idea that chymotrypsin activity is absent in all decapod digestive gland extracts is now known to be incorrect (Galgani, Benyamin, & Ceccaldi, 1984; Galgani & Nagayama, 1988; Gates & Travis, 1969). Garcia-Carreno et al. (1994) demonstrated chymotrypsin can be detected even in crude extracts from the hepatopancreas of decapod langostilla (*Pleuroncodes planipes*). This is confirmed in this report.

3.5. Substrate profile of S. officinalis chymotrypsin

A series of different *p*-nitroanilide substrates with various P_1 residues was used to test the substrate specificity of cuttlefish (*S. officinalis*) protease. Table 3 summarises the specific activities of trypsin, chymotrypsin and elastase with different substrates associated with *S. officinalis* protease. The cuttlefish protease hydrolysed the synthetic peptides preferentially at the carboxy terminus of Phe or Leu, similar to chymotrypsin-like serine proteases. The enzyme was most active on the two chymotrypsin substrates containing four amino acid residues with Phe and Leu in P_1 position, SAAPFpNA (69 U/mg) and SAAPLpNA (15 U/mg). However, cuttlefish chymotrypsin showed very low specific activity with ZAALpNA (1.4 U/mg). On the other hand, the enzyme was able to cleave trypsin substrates (BApNA and BAEE) and the typical elastase substrates (SAAApNA and SAAVpNA). Other evidence makes clear, nonetheless, that cuttlefish protease is a chymotrypsin and that this preparation does not contain trypsin and elastase activities.

Table 3
Hydrolysis of various chromogenic synthetic peptides by the purified protease from cuttlefish (*S. officinalis*).[a]

Chromogenic substrat	Specific activity (U/mg)[b]
BTEE (benzoyl-L-tyrosine ethyl ester)	0
ATEE (acetyl-L-tyrosine ethyl ester)	0
BAEE (*N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester)	0
BApNA (*N*-benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide)	0
SAAPFpNA (*N*-succinyl-$(Ala)_2$-Pro-Phe-*p*-nitroanilide)	69 ± 1.2
SAAPLpNA (*N*-succinyl-$(Ala)_2$-Pro-Leu-*p*-nitroanilide)	15 ± 0.5
ZAALpNA (*N*-CBZ-$(Ala)_2$-Leu-pNA)	1.4 ± 0.3
SGGGpNA (*N*-succinyl-$(Gly)_3$-*p*-nitroanilide)	0
SAAVpNA (*N*-succinyl-$(Ala)_2$-Val-*p*-nitroanilide)	0
SAAApNA (*N*-succinyl-$(Ala)_3$-*p*-nitroanilide)	0
B-Tyr-pNA (*N*-benzoyl-L-tyrosine-*p*-nitroanilide)	0
S-Phe-pNA (*N*-succinyl-phenylalanine-*p*-nitroanilide)	0
Ac-Leu-pNA (*N*-acetyl-L-leucine-*p*-nitroanilide)	0

[a] The activity of the cuttlefish chymotrypsin was determined at 25 °C and pH 8.5.
[b] Mean ± SD from triplicate determinations.

The data on the substrate specificity indicate that the purified enzyme is a chymotrypsin-like proteinase with an extended binding site. The enzyme hydrolysed only long peptide substrates, containing three or four amino acid residues with Phe or Leu in the P_1 position, but did not hydrolyse *p*-nitroanilide substrates containing one amino acid residue, which are hydrolysed efficiently by mammalian chymotrypsins. Also, our data suggest that an extended peptide chain and secondary binding of the residues at P_2–P_5 are important for efficient catalysis by the *S. officinalis* chymotrypsin.

3.6. Effect of pH on the activity and stability of S. officinalis chymotrypsin

The pH activity profile of *S. officinalis* and bovine chymotrypsins is shown in Fig. 4a. The purified cuttlefish chymotrypsin and

bovine chymotrypsin showed the same behaviour between pH 4.0 and 8.0, and from 8.0 to 11.0. *S. officinalis* chymotrypsin showed more activity than its mammalian counterpart (Fig. 4a). Optimum pH for hydrolysis of SAAPNA by cuttlefish and bovine chymotrypsins was 8.5 and 8.0, respectively. The relative activities of the purified cuttlefish chymotrypsin at pH 7.5, 8.0, and 9.0 were about 82%, 90.1%, and 87%, respectively, of that at pH 8.5. However, chymotrypsin activity decreased significantly above pH 9.0 and was only 22% at pH 11.0. In addition, these enzymes showed low activity at acidic pH (4.0–5.0), considerably activity at pH from 6.0 to 9.0 whilst cuttlefish chymotrypsin showed the highest activity toward the alkaline pH (8.5–10). pH dependence of the two enzymes is expected for serine proteases which share the same hydrolysis mechanism. Apparent pH activity profiles of cuttlefish chymotrypsin were in agreement with chymotrypsins from other marine species such as scallop (8.0–8.5) (Le Chevalier et al., 1995) and abalone (8.0–8.5) (Groppe & Morse, 1993).

The pH stability showed that the cuttlefish chymotrypsin was highly stable over a broad pH range, maintaining more than 92% of its original activity between pH 7.5 and 9.5, and more than 85% of its activity at pH 10.0 and 11.0 (Fig. 4b). The pH stability of cuttlefish chymotrypsin was higher than that of Monterey sardine chymotrypsin, which was stable in the pH range 7.0–8.0 (Castillo-Yañez et al., 2006). However, chymotrypsin was unstable at pH below 5.0, retaining only 20% and 12% activity at pH 3.0 and 2.0, respectively. Bovine chymotrypsin has stability at acidic and alkaline pHs (Fig. 4b).

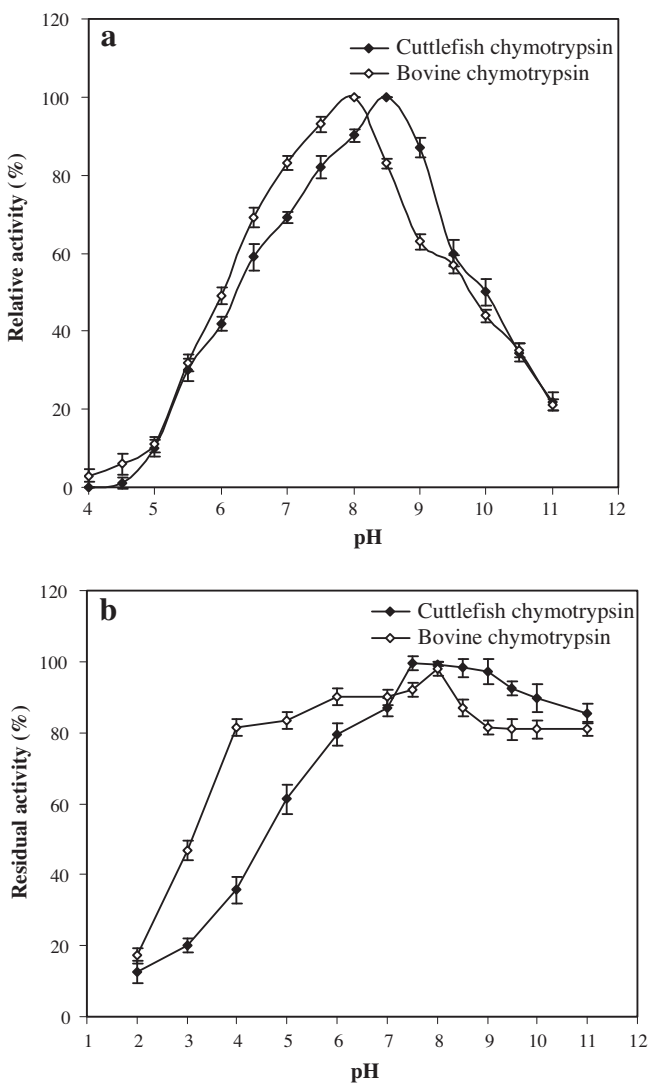


Fig. 4. pH profile (a) and pH stability (b) of cuttlefish (*S. officinalis*) and bovine chymotrypsins. Results are mean ± SD of triplicates.

In general, chymotrypsins from warm-blooded organisms are extremely stable at acidic and alkaline pHs, whilst fish chymotrypsins are stable only to alkaline pH (Simpson, 2000). The effect of pH shows that cuttlefish chymotrypsin was more stable at alkaline than acid conditions. The acid-labile properties and mild activity above room temperature make cuttlefish chymotrypsin a candidate for food technology applications. Protein modification by controlled hydrolysis enhanced the functionality of raw protein (Panyam & Kilara, 1996). Inactivation of enzymes to achieve the desired degree of hydrolysis is done by lowering the pH of the reaction. Further studies in this direction are needed to establish the conditions for protein hydrolysis for possible application of cuttlefish chymotrypsin.

3.7. Effect of temperature on the activity and stability of S. officinalis chymotrypsin

The temperature activity profiles of *S. officinalis* and bovine chymotrypsins are depicted in Fig. 5a. The activity of both enzymes increased with temperature up to an optimum around 55 °C. The relative activities of cuttlefish chymotrypsin at 40, 50 and 60 °C were about 66%, 84.9% and 86.3%, respectively, of that at 55 °C. The optimal temperature of *S. officinalis* chymotrypsin was similar to those from rainbow trout (Kristjansson & Nielsen, 1992) and scallop (chymotrypsin C) (Le Chevalier et al., 1995). It was different from those of chymotrypsins A (40 °C) and B (50 °C) from crucian carp (Yang et al., 2009), chymotrypsins I (50 °C) and II (45 °C) from Monterey sardine (Castillo-Yañez et al., 2009) and chymotrypsins A and B (45 °C) from Japanese sea bass (Jiang et al. (2010).

It is remarkable that cuttlefish chymotrypsin showed higher activity at high temperatures (40–70 °C) which could be in response to the change in the conformation of the enzyme. The differences in enzyme conformation are governed by habitat, environment and genetics (Klomklao, Benjakul, Visesanguan, Kishimura, & Simpson, 2006). A sharp decrease in activity of cuttlefish chymotrypsin at a temperature above 65 °C was most likely due to thermal denaturation.

For thermal stability, residual activity of chymotrypsins was evaluated after heat treatment for 60 min at various temperatures and results are shown in Fig. 5b. The thermal stability profile of the purified cuttlefish chymotrypsin showed that the enzyme was highly stable at temperatures below 50 °C but was inactivated at higher temperatures (Fig. 5b). The enzyme retained more than 75% and 31% of its initial activity at 50 and 60 °C, respectively.

The thermostability of *S. officinalis* chymotrypsin was similar to that from the hepatopancreas of shrimp (*P. vannamei*), which retained more than 80% of its activity after 60 min at 50 °C (Hernandez-Cortes et al., 1997). However, *S. officinalis* chymotrypsin was more thermostable than other fish chymotrypsins. Chymotrypsins A and B from the hepatopancreas of crucian carp (*C. auratus*) (Yang et al., 2009) lost over 80% of their activities after 30 min at 60 °C, and striped seabream (*L. mormyrus*) chymotrypsin retained less than 30% of its original activity after 30 min of incubation at 50 °C (El Hadj Ali et al., 2010).

Generally, the mammal chymotrypsins are more stable to temperature than fish chymotrypsins (Asgeirsson & Bjarnason, 1991; Simon, Lászlo, Kotorman, & Szaláni, 2001). But in this study, we found that marine invertebrate chymotrypsin was significantly more stable than bovine chymotrypsin when temperatures were above 50 °C. Cuttlefish chymotrypsin was completely inactivated at 70 °C whilst bovine chymotrypsin was inactivated at 60 °C. Enzymes are inactivated at high temperature due to the partial

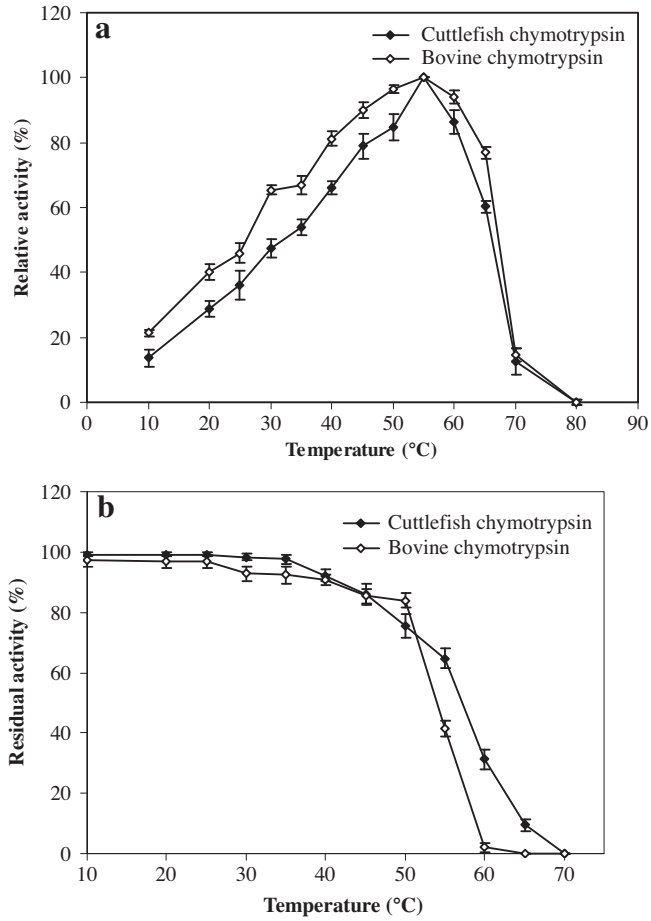


Fig. 5. Temperature profile (a) and thermal stability (b) of cuttlefish (*S. officinalis*) and bovine chymotrypsins. Results are mean ± SD of triplicates.

unfolding of the enzyme molecule. The mechanism for increasing thermal stability of proteins appears to be due to strengthening of hydrophobic interactions and disulphide bonds in the interior of the protein molecule (Kim, Meyers, Pyeun, & Godber, 1994). Numerous disulphide linkages, as well as stronger hydrophobic interactions in the interior of the protein contribute to protein thermal stability. Disulphide bonds may stabilise a folded conformation (Klomklao, Kishimura, Nonami, & Benjakul, 2009). Cuttlefish enzyme was more stable than that from cattle at temperatures above 50 °C, possibly caused by the higher number of maximal intramolecular disulphide bonds in invertebrate cuttlefish chymotrypsin compared with bovine chymotrypsin.

3.8. Effect of metal ions

The effects of some metal ions, at a concentration of 5 mM, on the activity of *S. officinalis* chymotrypsin were studied at pH 8.5 and 25 °C by the addition of metal ions to the reaction mixture (Table 4). As shown in Table 4, Na^+ and K^+ did not affect chymotrypsin activity, whereas Ca^{2+}, Mg^{2+} and Co^{2+} increased the protease activity to 110%, 117% and 121%, respectively. However, the purified enzyme was partially inhibited by Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} and strongly affected by Fe^{2+} and Cu^{2+}, suggesting the adverse effect of heavy metal ions on chymotrypsins.

To date it is not conclusive whether invertebrate proteases depend on a moderate concentration of Ca^{2+} for maximum activity, as observed in mammalian proteases. Chymotrypsin from cuttlefish (*S. officinalis*) is not dependent on Ca^{2+} for activation or stability.

Table 4
Effects of metal ions (5 mM) on bovine and cuttlefish chymotrypsins activities.[a]

Ions	Relative activity[b] (%)	
	Cuttlefish	Bovine
None	100	100
Na^+	100	100
K^+	100	95 ± 1.4*
Mg^{2+}	117 ± 1.4*	108 ± 0.7*
Mn^{2+}	93 ± 0.2*	95 ± 1.8*
Ni^{2+}	73 ± 1.5*	93 ± 0.2*
Zn^{2+}	56 ± 1.7*	34 ± 1.5*
Cu^{2+}	1.4 ± 0.1*	2.1 ± 0.1*
Cd^{2+}	67 ± 2.5*	59 ± 1.1*
Hg^{2+}	12 ± 1.3*	5.8 ± 0.4*
Fe^{2+}	6 ± 0.1*	21 ± 1.5*
Ca^{2+}	110 ± 1.1*	167 ± 1.2*
Ba^{2+}	84 ± 2.6*	98 ± 0.6*
Co^{2+}	121 ± 0.8*	97 ± 2.4*

[a] The activity of the chymotrypsin was determined by incubating the enzyme in the presence of various metal ions for 10 min at 25 °C and pH 8.5.
[b] Mean ± SD from triplicate determinations.
* Significantly different from control at $p < 0.05$.

Table 5
Kinetic parameters of *S. officinalis* chymotrypsin and other chymotrypsins.

Substrates	Chymotrypsins	K_m (μM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m (s^{-1} μM^{-1})	References
SAAPFpNA	Cuttlefish (*S. officinalis*)	22	18	0.82	This work
	Striped seabream (*L. mormyrus*)	30.7	14.35	0.465	El Hadj Ali et al. (2010)
	Monterey sardine (*S. sagax C.*)				
	I	74	18.6	0.251	Castillo-Yañez et al. (2009)
	II	48	4.8	0.100	
	Anchovy (*E. japonica*)	89	14.7	0.165	Heu et al. (1995)
	Rainbow trout (*O. mykiss*)	35	2.2	0.0628	Kristjansson and Nielsen (1992)
	Carp (*C. carpio*)	300	4.4	0.0146	Cohen et al. (1981a, 1981b)
	Atlantic cod (*G. morhua*)				
	1	12	22.7	1.9	Raae et al. (1995)
	2	30.8	25.0	0.8	
	Shrimp (*P. vannamei*)	1600	15.5	0.01	Hernandez-Cortes et al. (1997)
	Bovine	43	45	1.0	DelMar, Largman, Brodrick, and Geokas (1979)
SAAPLpNA	Cuttlefish (*S. officinalis*)	54	3.6	0.07	This work

SAAPFpNA, *N*-succinyl-$(Ala)_2$ProPhe-pNA; SAAPLpNA, *N*-succinyl-$(Ala)_2$ProLeu-pNA.

In fact, the calcium binding motif that is commonly in mammalian pancreatic chymotrypsins does not occur in most of this invertebrate protease. This finding suggests that notable structural differences may exist between vertebrate and invertebrate chymotrypsins. Neurath, Walsh and Winter (1967) pointed out the importance of phylogenetic variations of the enzyme in tracing the process of its evolution.

3.9. Kinetic studies

The kinetic constants K_m and k_{cat} of the purified chymotrypsin from hepatopancreas of cuttlefish were determined using Lineweaver–Burk plots (Table 5). The K_m and k_{cat} of the purified enzyme using SAAPFpNA were 22 μM and 18 s^{-1}, respectively. Furthermore, the K_m and k_{cat} of the purified enzyme using SAAPLpNA were 54 μM and 3.6 s^{-1}, respectively.

The K_m value of *S. officinalis* chymotrypsin was lower than those of chymotrypsins from shrimp (*P. vannamei*) (Hernandez-Cortes et al., 1997), carp (*C. carpio*) (Cohen, Gertler, & Birk, 1981b) and anchovy (*E. japonica*) (Heu et al., 1995). This suggests that it has higher affinity.

The turnover number (k_{cat}) value, determined using SAAPFpNA, was close to that reported for chymotrypsin I from Monterey sardine (Castillo-Yañez et al., 2009). The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of cuttlefish chymotrypsin (0.817 s^{-1} μM^{-1}) was higher than other previously cited fish chymotrypsins (Table 5).

4. Conclusion

In the present study, a new chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*S. officinalis*) was purified and characterised. The purified chymotrypsin was homogeneous on SDS–PAGE, and its molecular mass was estimated to be 28.0 kDa. The enzyme showed an optimum temperature at 55 °C and optimum pH of 8.5. The N-terminal sequence of chymotrypsin showed relatively high homology with vertebrate and invertebrate chymotrypsins.

The results reported above indicate that the enzyme is a chymotrypsin-like serine proteinase with an extended binding site, which does not hydrolyse short chymotrypsin substrates and is not affected by TPCK. This report demonstrates the knowledge about the distribution of chymotrypsin-like proteinases with an extended binding site, presenting the first detailed characteristics of such enzymes among the class of cephalopoda order sepiida.

Further work is needed to isolate and sequence analyse the cDNA encoding cuttlefish chymotrypsin and to determine the properties of this protease as a possible biotechnological tool in the fish-processing and food industries.

Acknowledgement

This work was funded by Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia.

References

Asgeirsson, B., & Bjarnason, J. B. (1991). Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology, 99B*, 327–335.

Balti, R., Barkia, A., Bougatef, A., Ktari, N., & Nasri, M. (2009). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterisation. *Food Chemistry, 113*, 146–154.

Bell, G. I., Quinto, C., Quiroga, M., Valenzuela, P., Craik, C. S., & Rutter, W. J. (1984). Isolation and sequence of a rat chymotrypsin B gene. *Journal of Biological Chemistry, 259*, 14265–14270.

Blanco, R. M., & Guisan, J. M. (1988). Protecting effects of competitive inhibitors during very intense insolubilised enzyme-activated support multipoint attachments: Trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system. *Enzyme and Microbial Technology, 10*, 227–232.

Blow, D. M. (1971). The structure of chymotrypsin. In P. D. Boyer (Ed.). *The enzymes* (Vol. 3, pp. 185–212). New York: Academic Press.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248–254.

Castillo-Yañez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F. L., Navarrete-Del Toro, M. A., & Félix-López, M. (2006). Purification and biochemical characterisation of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Food Chemistry, 99*, 252–259.

Castillo-Yañez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E., García-Sanchez, G., & Quintero-Reyes, I. E. (2009). Biochemical characterisation of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chemistry, 112*, 634–639.

Cohen, T., Gertler, A., & Birk, Y. (1981a). Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*C. carpio*) – I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology, 69B*, 639–646.

Cohen, T., Gertler, A., & Birk, Y. (1981b). Pancreatic proteolytic enzyme from carp (*C. Carpio*) – II. kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. *Comparative Biochemistry and Physiology, 69B*, 647–653.

Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis* (2nd ed.). New York: John Wiley and Sons.

Danwattananusorn, T., Kondo, H., Aoki, T., & Hirono, I. (2009). Molecular cloning, characterisation and expression analysis of a chymotrypsin-like serine protease from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fisheries Science, 75*, 1231–1238.

De Haën, C., Neurath, H., & Teller, D. (1975). The phylogeny of trypsin-related serine proteases and their zymogens. New methods for investigation of distant evolutionary relationships. *Journal of Molecular Biology, 92*, 225–259.

DelMar, E. G., Largman, C., Brodrick, J. W., & Geokas, M. C. (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry, 99*, 316–320.

El Hadj Ali, N., Hmidet, N., Zouar-Fakhfakh, N., Ben Khaled, H., & Nasri, M. (2010). Alkaline chymotrypsin from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: Purification and characterisation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*, 9787–9792.

Erlanger, B. F., Kokowski, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 95*, 271–278.

Fong, W. P., Chan, Y. M., & Lau, K. K. (1998). Isolation of two chymotrypsins from grass carp. *Biochemistry and Molecular Biology International, 45*, 409–418.

Galgani, F., Benyamin, Y., & Ceccaldi, H. (1984). Identification of digestive proteinases of *Peneuus keruthurus* (Forskal); a comparison with *Penaeus japonicus* bate. *Comparative Biochemistry and Physiology, 78B*, 355–361.

Galgani, F., & Nagayama, F. (1988). Digestive proteolysis and digestive proteinases in deep sea crabs *Geryon affinis* and *Chionocetes japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi, 54*, 983–987.

Garcia-Carreno, F. L., Hernandez-Cortes, M. P., & Haard, N. F. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive system of a freshwater and marine decapod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*, 1456–1461.

Gates, B., & Travis, J. (1969). Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry, 8*, 4483–4489.

Groppe, J., & Morse, D. (1993). Molluscan chymotrypsin-like protease; structure, localisation and substrate specificity. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 305*, 159–169.

Guðmunsdóttir, Á., Óskarsson, S., Eakin, A. E., Craik, C. S., & Bjarnason, J. B. (1994). Atlantic cod cDNA encoding a psychrophilic chymotrypsinogen. *Biochimica Biophysica Acta, 1219*, 211–214.

Guyonnet, V., Tłuścik, F., Long, P. L., Polanowski, A., & Travis, J. (1999). Purification and partial characterisation of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin. Chymotrypsin and elastase from the chicken. *Journal of Chromatography A, 852*, 217–225.

Hartley, B. S. (1964). Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen-A. *Nature, 201*, 1284–1287.

Hernandez-Cortes, P., Whitaker, J. R., & Garcia-Carreno, F. L. (1997). Purification and characterisation of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda). *Journal of Food Biochemistry, 21*, 497–514.

Hess, G. P. (1971). Chymotrypsin-chemical properties and catalysis. In P. D. Boyer (Ed.). *The enzymes* (vol. 3, pp. 213–248). New York: Academic Press, Inc..

Heu, M. S., Kim, H. R., & Pyeun, J. H. (1995). Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy (*Engraulis japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology, 112B*, 557–568.

Hou, D. X., Ozawa, K., Tomita, N., Maeda, Y., Hashiguchi, T., Yokoyama, K., et al. (1993). Genomic cloning and partial characterisation of human chymotrypsinogen gene. *The Japanese Journal of Human Genetics, 38*, 371–380.

Hummel, B. C. W. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37*, 1393–1399.

Jiang, Y. K., Sun, L. C., Cai, Q. F., Liu, G. M., Yoshida, A., Osatomi, K., et al. (2010). Biochemical characterisation of chymotrypsins from the hepatopancreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*, 8069–8076.

Kanno, G., Kishimura, H., Ando, S., Nalinanon, S., Klomklao, S., Benjakul, S., et al. (2011). Structural properties of trypsin from cold-adapted fish, arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*). *European Food Research and Technology, 232*, 381–388.

Kim, H. R., Meyers, S. P., Pyeun, J. H., & Godber, J. S. (1994). Enzymatic properties of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkia*. *Comparative Biochemistry and Physiology, 107*, 197–203.

Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakul, S., & Chun, B. S. (2008). Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollok (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry, 106*, 194–199.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2006). Purification and characterisation of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*, 5617–5622.

Klomklao, S., Kishimura, H., Nonami, Y., & Benjakul, S. (2009). Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry, 115*, 155–162.

Kristjansson, M. M., & Nielsen, H. H. (1992). Purification and characterisation of two chymotrypsin-like proteases from the pyloric ceca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, 101B*, 247–253.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, 227*, 680–685.

Le Chevalier, P., Sellos, D., & Van Wormhoudt, A. (1995). Purification and partial characterisation of chymotrypsin-like proteases from the digestive gland of the scallop *Pecten maximus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, 110B*, 777–784.

Leth-Larsen, R., Ásgeirsson, B., Thórólfsson, M., Nørregaard-Madsen, M., & Hojrup, P. (1996). Structure of chymotrypsin variant B from Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Biochimica Biophysica Acta, 1297*, 49–56.

Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society, 56*, 658–666.

Lo, M. J., & Weng, C. F. (2006). Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture, 261*, 1403–1412.

Neurath, H., Walsh, K. A., & Winter, W. P. (1967). Evolution of structure and function of proteases: amino acid sequence of proteolytic enzymes reflect phylogenetic relationships. *Science, 158*, 1638–1644.

North, M. J. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiological Review, 46*, 308–340.

Panyam, D., & Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science and Technology, 7*, 120–125.

Raae, A. J., Flengsrud, R., & Sletten, K. (1995). Chymotrypsin isoenzymes in Atlantic cod; differences in kinetics and substrate specificity. *Comparative Biochemistry and Physiology, 112B*, 393–398.

Raae, A. J., & Walther, B. T. (1989). Purification and characterisation of chymotrypsin, trypsin and elastase like proteinases from cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, 93B*, 317–324.

Racicot, W. F., & Hultin, H. O. A. (1987). Comparison of dogfish and bovine chymotrypsins. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 256*, 131–143.

Ramakrishna, M., Hultin, H. O., & Racicot, W. F. (1987). Some kinetic properties of dogfish chymotrypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology, 87B*, 25–30.

Schwert, G. W., & Takenaka, Y. (1955). A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochimica Biophysica Acta, 16*, 570–575.

Sellos, D., & Van Wormhoudt, A. (1992). Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penueus vunnumei* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Letters, 309*, 219–224.

Shahidi, F., & Kamil, J. Y. V. A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology, 12*, 435–464.

Simon, M. L., Lászlo, K., Kotorman, M., & Szaláni, B. (2001). A comparative of the conformational stabilities of trypsin and α-chymotrypsin. *Acta Biologica Szegediensis, 45*, 43–49.

Simpson, B. K. (2000). Digestive proteases from marine animals. In N. F. Haard & B. K. Simpson (Eds.), *Seafood enzymes* (pp. 191–213). New York: Marcel Dekker.

Smillie, L. B., Furka, A., Nagabhushan, N., Stevenson, K. J., & Parkes, C. O. (1968). Structure of chymotrypsinogen B compared with chymotrypsinogen A and trypsinogen. *Nature, 218*, 343–346.

Smith, N., Naude, R. J., Oelofsen, W., Lazure, C., & Patthy, A. (1992). The isolation and partial characterisation of trypsinogen. Pancreatic secretory trypsin inhibitor and multiple forms of chymotrypsinogen and trypsin from the pancreas of the ostrich (*Struthio camelus*). *International Journal of Biochemistry, 24*, 877–885.

Suzuki, T., Srivastava, A. S., & Kurokawa, T. (2002). CDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, 131B*, 63–70.

Tsai, I. H., Chuano, K. L., & Chuang, J. L. (1986). Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (Shrimps). *Comparative Biochemistry Physiology, 85B*, 235–239.

Van Wormhoudt, A., Chevalier, P., & Sellos, D. (1992). Purification, biochemical characterisation and N-terminal sequence of a serine-protease with chymotryptic and collagenolytic activities of a tropical shrimp, *Penueus vunnumei* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, 103B*, 675–680.

Yang, F., Su, W. J., Lu, B. J., Wu, T., Sun, L. C., Hara, K., et al. (2009). Purification and characterisation of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chemistry, 116*, 860–866.

Chapitre II :

Les peptides antihypertensifs : Purification et identification

Article 4:

Balti R, Nedjar-Arroume N, Yaba Adjé E, Guillochon D and Nasri M **(2010)**. Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3840-3846.

Article 5:

Balti R, Nedjar-Arroume N, Bougatef A, Guillochon D and Nasri M **(2010)**. Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Research International*, 43, 1136-1143.

Les maladies cardiovasculaires présentent la plus grande cause de décès chez l'adulte dans les pays industrialisés (Bonow *et al*., 2002). L'hypertension est un état avec une pression sanguine élevée (> 140 mm Hg pour la pression systolique et > 90 mm Hg pour la pression diastolique selon les limites fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé) et cette affection représente le facteur de risque principal sur le plan cardiovasculaire. Les éléments contribuant majoritairement à l'augmentation de la pression sanguine sont le volume sanguin, le débit cardiaque et les résistances périphériques vasculaires (Page *et al*., 1999).

Dans plus de 90 % des cas adultes de plus de 40 ans, les causes de l'élévation de la pression artérielle ne sont pas connues. On parle alors d'hypertension artérielle essentielle (ou primaire). Plusieurs mécanismes biologiques peuvent contribuer au maintien de la pression sanguine à un niveau physiologique. Il est vraisemblable que certains facteurs soient en relation pour augmenter la pression sanguine chez les patients atteints d'hypertension (Beevers *et al.*, 2001). Parmi ces facteurs de risque, on trouve la consommation en sel, l'obésité, la résistance à l'insuline et les dysfonctionnements du système nerveux sympathique et/ou du système endothélial (Garbers et Dubois 1999 ; Beevers *et al.*, 2001). Le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) est la cible préférentielle des agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de l'hypertension. Ce système est principalement régulé *via* l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECA) (EC: 3.4.15.1). Il s'agit d'une enzyme clé du SRAA. Elle est ubiquitaire et responsable de la production d'un octapeptide fortement vasopresseur (l'angiotensine II) et de l'inactivation d'un peptide vasodilatateur, la bradykinine (Jackson et Garrison, 1996).

Les inhibiteurs spécifiques de l'ECA (captopril, enalapril, etc…) sont considérés comme les principaux agents thérapeutiques pour le traitement de l'hypertension et la prévention des maladies cardiovasculaires. Depuis la découverte de peptides inhibiteurs de l'ECA dans le venin de serpent (Ferreira, 1965 ; Ferreira, *et al*., 1970 ; Kato et Suzuki, 1971), plusieurs analogues structuraux ont été synthétisés et sont devenus les médicaments antihypertenseurs les plus utilisés. En 1979, Oshima *et al*. ont été les premiers à rapporter l'identification de peptides inhibiteurs de l'ECA issus de protéines alimentaires. Depuis cette étude, de nombreuses recherches sur les protéines alimentaires ont montré la présence, dans leur structure, de peptides inhibiteurs de l'ECA capables de montrer un effet antihypertenseur *in vivo*.

Au cours de ces 20 dernières années, de nombreux peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I ont été purifiés et identifiés à partir de protéines alimentaires de sources variées telles que le lait (Pihlanto-Leppälä *et al*., 2010), la gélatine (Zhao *et al*.,

2007), le maïs (Maruyama *et al*., 1989a), le germe de soja (Chen *et al*., 2004) et le germe de blé (Jia *et al*., 2010). Plusieurs autres études récentes ont décrit la présence de ce type de peptides dans les hydrolysats enzymatiques de protéines d'origine marine comme la sardinelle (Bougatef *et al*., 2008a), l'émissole lisse (Bougatef *et al*., 2010a), le concombre de mer (Zhao *et al*., 2009), les huîtres (Wang *et al*., 2008), le tilapia (Raghavan et Kristinsson, 2009) et le thon (Lee *et al*., 2010).

Ces peptides à activité biologique, présents à l'état latent dans la séquence des protéines, peuvent être libérés par hydrolyse au cours du processus physiologique de digestion (Tauzin *et al*., 2002) ou de procédés de fabrication de produits alimentaires tels que l'affinage (Ryhänen *et al*., 2001) et la fermentation (Gobbetti *et al*., 2000). Leur activité biologique peut soit s'exercer le long du tractus gastro-intestinal soit être systémique. Dans le cas d'une action systémique, le peptide doit être suffisamment petit pour franchir l'épithélium intestinal et ainsi atteindre la circulation générale (Meisel, 1997). Récemment, la possibilité de générer des hydrolysats contenant des peptides à activité biologique par protéolyse contrôlée en réacteur enzymatique a été montrée. Il est ainsi devenu possible d'envisager une production standardisée d'hydrolysats actifs dans le cadre d'une utilisation comme ingrédient pour une alimentation fonctionnelle (Byun et Kim, 2001).

Récemment, des études *in vivo* ont montré que des hydrolysats de protéines de graines de colza (Marczak *et al*., 2003) et de bonite (Fujita *et al*., 1995) exercent un effet antihypertenseur puissant sur des rats spontanément hypertendus (RSH). De plus, Seppo *et al*. (2003) ont montré qu'un hydrolysat de protéines de lait réduit la pression artérielle de patients humains hypertendus. L'effet antihypertenseur *in vivo* des peptides est généralement attribué à la présence de peptides inhibiteurs de l'ECA (Fujita *et al*., 1995, Seppo *et al*., 2003).

Au cours de ce chapitre, le muscle de la seiche commune (*S. officinalis*) a été utilisé comme source de protéines pour la préparation d'hydrolysats protéiques douées d'activité antihypertensive, et pour l'isolement et l'identification de peptides responsable de cette activité.

Analyse de nouvelles séquences peptidiques inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) à partir d'hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (*Sepia officinalis*) obtenus par traitement avec des protéases microbiennes

Rafik Balti, Naima Nedjar-Arroume, Estelle Yaba Adjé, Didier Guillochon, Moncef Nasri

Différents types d'enzymes commerciales ont été utilisés avec succès dans la préparation d'hydrolysats de protéines de poissons et à partir d'autres protéines alimentaires. Le choix de l'enzyme est un facteur important, puisque les enzymes présentent des spécificités différentes qui leur permettent de produire des hydrolysats protéiques ayant des compositions peptidiques différentes et par conséquent des propriétés fonctionnelles et biologiques différentes. Dans le cadre de ce travail, différents hydrolysats protéiques enrichis en peptides inhibiteurs de l'ECA ont été élaborés à partir du muscle de la seiche commune moyennant différentes préparations enzymatiques microbiennes à savoir des protéases bactériennes (l'extrait enzymatique de *Bacillus licheniformis* NH1 et l'extrait enzymatique de *Bacillus mojavensis* A21) et fongiques (l'extrait enzymatique d'*Aspergillus clavatus* ES1) et une enzyme commerciale (Alcalase®).

Les courbes d'hydrolyse des protéines de la seiche commune, après 4 heures d'incubation ont montré que le degré d'hydrolyse (DH) augmente en fonction du temps. D'autre part, il en ressort que les cinétiques d'hydrolyse sont caractérisées par une phase initiale rapide durant les 60 premières minutes, durant laquelle un grand nombre de liaisons peptidiques est hydrolysé, après le DH tend à se stabiliser. Les protéases de la souche A21 hydrolysent efficacement les protéines du muscle de la seiche commune, étant donné que l'hydrolysat préparé avec ces protéases présente le DH le plus élevé qui est de l'ordre de 18,7 %. Les DH des hydrolysats protéiques préparés par les préparations enzymatiques des souches NH1, ES1 et celui de l'Alcalase® sont de l'ordre de 15 %, 5 % et 12,5 %, respectivement.

Tous les hydrolysats préparés (à une concentration de 2 mg/ml) exercent une activité anti-ECA. L'hydrolysat obtenu par l'extrait enzymatique de *B. mojavensis* A21 présente la meilleure activité anti-ECA qui est de l'ordre de 70,0 % avec une CI_{50} la plus faible qui est de l'ordre de 1,12 ± 0,07 mg/ml. Les CI_{50} des hydrolysats protéiques préparés par l'Alcalase® et

les extraits enzymatiques de NH1 et ES1 sont de l'ordre de 1,84 ± 0,11 mg/ml, 2,01 ± 0,21 mg/ml et 4,43 ± 0,36 mg/ml, respectivement.

L'étude de la cinétique d'apparition et de disparition de l'activité inhibitrice de l'ECA au cours de la protéolyse enzymatique avec la préparation protéolytique de A21 a été réalisée. Cette étude a permis d'optimiser la protéolyse enzymatique et de déterminer le temps d'hydrolyse nécessaire ou le degré d'hydrolyse adéquat permettant l'obtention d'hydrolysat fortement enrichis en biopeptides. Les résultats de cette étude ont montré que l'activité anti-ECA de l'hydrolysat obtenu par la préparation protéolytique de A21 augmente avec le DH et que le meilleur pouvoir d'inhibition de l'ECA (87,11 % à 2 mg/ml) est obtenu avec un DH de l'ordre de 16 %. Au-delà de ce DH l'activité antihypertensive décroît.

L'hydrolysat protéique (DH = 16 %) obtenu par action avec l'extrait enzymatique de *B. mojavensis* A21 a été fractionné sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25. Huit pics majoritaires (P_1-P_8) ont été collectés et leurs activités anti-ECA ont été déterminées. Toutes les fractions sont capables d'inhiber l'activité de l'ECA. La fraction P_6 présente le pouvoir d'inhibition le plus important (75,44% à 1 mg/ml).

La fraction (P_6) sortie gel filtration, qui présente la meilleure activité inhibitrice de l'ECA, a été retenue en vue d'isoler quelques peptides actifs. Cette fraction est soumise à un nouveau fractionnement selon l'hydrophobicité par HPLC sur une colonne de silice C_{18} en phase inverse. Onze sous-fractions actives exerçant une activité anti-ECA nommées (P_{6-1}-P_{6-11}) ont été retenues pour identification. La sous-fraction P_{6-5} présente la meilleure activité inhibitrice de l'ECA (CI_{50} = 5,5 µg/ml), suivie par les sous-fractions P_{6-2}, P_{6-6} et P_{6-8} avec des CI_{50} de l'ordre de 8 µg/ml, 12,3 µg/ml et 15 µg/ml, respectivement.

Les masses moléculaires ainsi que les séquences des peptides purifiés ont été déterminées par spectrométrie de masse (ESI/MS) et par spectrométrie de masse en tandem (ESI/MS/MS). Onze peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés et il s'agit de nouvelles séquences peptidiques. La détermination de l'activité inhibitrice de l'ECA de ces peptides a montré que les peptides Ala-His-Ser-Tyr, Gly-Asp-Ala-Pro et Ala-Gly-Ser-Pro, sont les plus actifs avec des CI_{50} de l'ordre de 11,6 ; 22,5 et 37,2 µM, respectivement.

Le peptide le plus actif (Ala-His-Ser-Tyr) possède un mécanisme d'inhibition non compétitive et une forte résistance vis-à vis de l'action des protéases gastro-intestinales *in vitro*.

Article 4:

Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins.

Balti Rafik, Nedjar-Arroume Naima, Yaba Adjé Estelle, Guillochon Didier & Nasri Moncef (2010). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3840-3846.

DOI:10.1021/jf904300q

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY
ARTICLE

Analysis of Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Muscle Proteins

Rafik Balti,[†] Naima Nedjar-Arroume,[‡] Estelle Yaba Adjé,[‡] Didier Guillochon,[‡] and Moncef Nasri*,[†]

[†]Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie—Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP "1173" 3038 Sfax, Tunisia, and [‡]Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

The angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of protein hydrolysates prepared from cuttlefish (*Sepia officinalis*) proteins by treatment with various bacterial proteases were investigated. The hydrolysate generated by the crude enzyme from *Bacillus mojavensis* A21 displayed the highest ACE inhibitory activity, and the higher inhibition activity (87.11 ± 0.92% at 2 mg/mL) was obtained with hydrolysis degree of 16%. This hydrolysate was fractionated by size exclusion chromatography on a Sephadex G-25 into eight major fractions (P_1−P_8). Fraction P_6, which exhibited the highest ACE inhibitory activity, was then fractionated by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Eleven ACE inhibitory peptides were isolated, and their molecular masses and amino acids sequences were determined using ESI-MS and ESI-MS/MS, respectively. The structures of the most potent peptides were identified as Ala-His-Ser-Tyr, Gly-Asp-Ala-Pro, Ala-Gly-Ser-Pro and Asp-Phe-Gly. The first peptide displayed the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of 11.6 μM. The results of this study suggest that cuttlefish protein hydrolysates are a good source of ACE inhibitory peptides.

KEYWORDS: ***Sepia officinalis*; muscle protein hydrolysates; ACE inhibitory peptide; purification and identification**

INTRODUCTION

High blood pressure has been considered a risk factor for developing cardiovascular diseases (arteriosclerosis, stroke and myocardial infarction) and end-stage renal disease (*1*). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) plays an important role in the renin−angiotensin system (RAS), which regulates human blood pressure and fluid homeostasis. The main molecule of the RAS, angiotensin II, is produced through an enzymatic cascade consisting of renin, an aspartic protease that first cleaves angiotensinogen to form the decapeptide angiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, 1−10), and ACE, an M2 family metallopeptidase that then further cleaves angiotensin I into the octapeptide angiotensin II (1−8) by removing the C-terminal dipeptide His-Leu (*2*). The resulting angiotensin II is a potent vasoconstrictor, which stimulates the release of aldosterone and antidiuretic hormone or vasopressin and increases the retention of sodium and water and the regeneration of rennin. In addition, ACE, also termed kininase II, inactivates the vasodilators bradykinin (Arg-Pro-Pro- Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) and kallidin (Lys-bradykinin) in the kallikrein−kinin system by cleaving the C-terminal dipeptide Phe-Arg. These effects directly act in concert to raise blood pressure.

*Corresponding author. Tel: 216 74-274-088. Fax: 216 74-275-595. E-mail: mon_nasri@yahoo.fr; moncef.nasri@enis.rnu.tn.

Specific inhibitors of ACE have been shown to be useful as antihypertensive drugs. Three kinds of synthetic ACE inhibitors were designed; they are grouped by their ligand for the active site on ACE. Captopril, the major representative of his group, has a sulfydryl moiety, lisinopril and enalapril have a carboxyl moiety, and fosinopril has a phosphorus group (*3*). Although ACE inhibitory drugs have demonstrated their usefulness, they are not entirely without side effects, such as cough, lost of taste, renal impairment and angioneurotic edema (*4*). Therefore, research and development to find safer, innovative and economical ACE inhibitors is necessary for the prevention and remedy for hypertension.

A variety of ACE inhibitory peptides with various amino acids sequences have been purified and identified in hydrolysates from food proteins digested with different proteases such as milk protein (*5*), gelatin (*6*), wheat protein (*7*), sardinelle (*8*), sea cucumber (*9*), tuna (*10*), and tilapia (*11*). In contrast to the many ACE inhibitory peptides derived from vertebrate muscle, very few studies on ACE inhibitory peptides from invertebrate muscles have been conducted.

In this study, we investigated the ACE inhibitory activity of cuttlefish muscle protein hydrolysates obtained by various enzymatic treatments. Eleven new antihypertensive peptides were isolated from the hydrolysate obtained by treatment with crude protease extract from *Bacillus mojavensis* A21, and their amino

 Published on Web 02/24/2010 © 2010 American Chemical Society

acids sequences were determined. Furthermore, the inhibition pattern of the most active peptide on ACE was investigated and the stability was evaluated under simulated gastrointestinal digestion.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Angiotensin I-converting enzyme from rabbit lung and the ACE synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) were purchased from Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO). Acetonitrile was of HPLC grade. Sephadex G-25 was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Water was obtained from a Culligan system; the resistivity was approximately 18 MΩ. All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Materials. Cuttlefish (*Sepia officinalis*), in the size range of 8−10 cuttlefish/kg, was purchased from the fish market of Sfax city, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1:3 (w/w) and transported to the research laboratory within 30 min. The mantle was cleaned, deskinned and eviscerated and then stored in sealed plastic bags at −20 °C until used.

Proteolytic Enzymes. Alcalase 2.4L serine-protease from *Bacillus licheniformis* was supplied by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Pepsin (10 U, from porcine stomach mucosa), chymotrypsin (5 U, from bovine pancreas) and trypsin (10 U, from bovine pancreas) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Crude enzyme preparations from *Aspergillus clavatus* ES1 (*12*), *Bacillus licheniformis* NH1 (*13*) and *Bacillus mojavensis* A21 (*14*) were prepared in our laboratory.

Preparation of Cuttlefish Muscle Protein Hydrolysates (CMPHs) Using Various Proteases. Cuttlefish (*S. officinalis*) muscle (500 g), in 1000 mL of distilled water, was 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 then homogenized in a Moulinex blender for about 2 min. The samples were adjusted to optimal pH and temperature for each enzyme: Alcalase (pH 8.0; 50 °C), crude enzymes from *B. licheniformis* NH1 and *B. mojavensis* A21 (pH 10.0; 50 °C) and crude enzyme from *A. clavatus* ES1 (pH 8.0; 40 °C). Then, the substrate proteins were digested with enzymes at a 3:1 (U/mg) enzyme/protein ratio for 4 h. Enzymes were used at the same activity levels to compare hydrolytic efficiencies. During the reaction, the pH of the mixture was maintained at the desired value by continuous addition of 4 N NaOH solution. The enzymatic hydrolysis was stopped by heating the solutions at 80 °C during 20 min. Protein hydrolysates were then centrifuged at 5000*g* for 20 min to separate soluble and insoluble fractions. Finally, the soluble fractions were freeze-dried using freeze-dryer (Bioblock Scientific Christ ALPHA 1-2, Illkirch-Cedex, France) and stored at −20 °C for further use.

Determination of the Degree of Hydrolysis. The degree of hydrolysis (DH), defined as the percent ratio of the number of peptide bonds broken (h) to the total number of peptide bonds per unit weight (h_{tot}), in each case, was calculated from the amount of base (NaOH) added to keep the pH constant during the hydrolysis (*15*) as given below.

$$\mathrm{DH}\ (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{B \times \mathrm{Nb}}{\mathrm{MP}} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

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-NH_2 groups released during hydrolysis expressed as

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

where pH and pK are the values at which the proteolysis was conducted. The total number of peptide bonds (h_{tot}) in a fish protein concentrate was assumed to be 8.6 mequiv/g (*15*).

Chemical Analysis. The moisture and ash content were determined according to the AOAC (*16*) standard methods 930.15 and 942.05, respectively. Total nitrogen content of cuttlefish protein hydrolysates was determined by using the Kjeldahl method. 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. All measurements were performed in triplicate.

Determination of ACE Inhibition Activity. The ACE inhibition activity was measured as reported by Nakamura et al. (*17*). A sample solution (80 μL) containing different concentrations of protein hydrolysates was added to 200 μL containing 5 mM hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), and then preincubated for 3 min at 37 °C. CMPHs and HHL were prepared in 100 mM borate buffer, pH 8.3, containing 300 mM NaCl. The reactions were then initiated by adding 20 μL of 0.1 U/mL ACE from rabbit lung prepared in the same buffer and incubated for 30 min at 37 °C. The enzyme reaction was terminated by the addition of 250 μL of 1.0 M HCl. The released hippuric acid (HA) was quantified by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column connected to a system composed of a Waters TM 600 automated gradient controller pump module, a WaterWisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. The sample was then eluted using an acetonitrile gradient from 0 to 28% and from 28 to 47% in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) for 50 and 20 min, respectively. The eluate was followed at 228 nm. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 446 computer. Millennium software was used to acquire, analyze and plot chromatographic data. The average value from three determinations at each concentration was used to calculate the ACE inhibition rate as follows:

$$\text{ACE inhibition}\ (\%) = \left[\frac{B-A}{B-C}\right] \times 100$$

where A is the absorbance of HA generated in the presence of ACE inhibitor component, B the absorbance of HA generated without ACE inhibitors and C is the absorbance of HA generated without ACE (corresponding to HHL autolysis in the course of enzymatic assay).

The IC_{50} value was defined as the concentration of hydrolysate (mg/mL) required to reduce the hippuric acid peak by 50% (indicating 50% inhibition of ACE).

Purification and Characterization of ACE-Inhibitory Peptides. The freeze-dried hydrolysate (1 g), with a DH of 16% obtained by treatment with alkaline proteases from *B. mojavensis* A21, was suspended in 5 mL of distilled water, and then loaded onto a Sephadex G-25 gel filtration column (5 cm × 57 cm), pre-equilibrated and eluted with distilled water. Fractions (4 mL each) were collected at a flow rate of 30 mL/h, and the absorbance was measured at 226 nm. Fractions associated with each peak showing ACE inhibitory activity were pooled and freeze-dried. Peptides in fraction P_6 from Sephadex G-25, which exhibited the highest ACE inhibitory activity, were dissolved in distiller water, filtered through 0.22 μm, and then separated by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column (10 mm × 250 mm) (Grace-Vydac, USA). Peptides were eluted with eluent A (water containing 0.1% trifluoric acetic acid (TFA) for 20 min), then with a linear gradient of acetonitrile (0−50% in 35 min) containing 0.1% TFA at a flow rate of 1 mL/min. Online UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software. The ACE inhibitory activities of the eluted peaks were determined. The liquid chromatographic system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data.

Identification of the Amino Acid Sequence of ACE Inhibitory Peptides. The molecular mass and peptide sequencing were done on positive ion mode using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS), respectively. ESI mass spectrometry was performed using a triple quadrupole instrument Applied Biosystems API 3000 (PE Sciex, Toronto, Canada) equipped with an electrospray ion source. The system is controlled by the Analyst Software 1.4, allowing the control of the spectrometer, the analysis and the processing data. Interpretations of MS/MS spectra were made with Bioanalyst software. The freeze-dried samples from RP-HPLC were dissolved in acetonitrile/water (20/80; v/v) containing 0.1% formic acid for the positive mode. The solution was injected (nebulized) uninterrupted, by a pump (model 22, Harvard Apparatus, South Natick, MA) with a flow rate of 5 μL/min. The potential of ionization was of 5000 V in positive

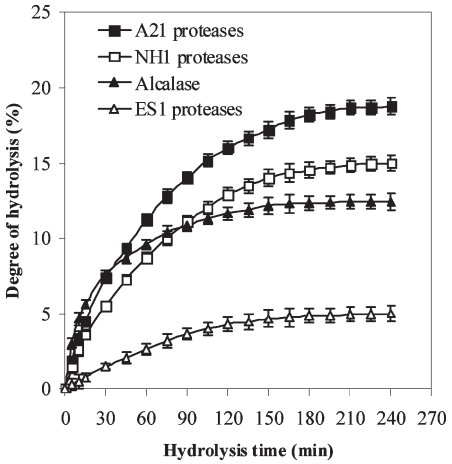


Figure 1. Hydrolysis curves of cuttlefish muscle proteins treated with different enzymes.

mode. At the time of the recording of the spectrum, 30 scans on average were added (MCA mode) for each spectrum. The gases used (nitrogen and air) were pure (up to 99%) and produced by a compressor Jun-Air 4000−40 M and a nitrogen generator Whatman model 75-72 (Whatman Inc., Haverhill, MA). Polypropylene glycol (PPG) was used for the calibration and the optimization of the machine. The peptide sequence was determined from the CID spectrum of the protonated analyze $[M + H]^+$ by MS/MS experiments. Peptide sequences were done using the bioanalyst software (Applied Biosystems, USA).

Stability of Ala-His-Ser-Tyr against Gastrointestinal Proteases. *In vitro* digestion of the potent purified ACE-inhibitory peptide (Ala-His-Ser-Tyr) was carried out according to the method of Kuba et al. (*18*). Peptide (0.2 mL, 1 mg/mL) was incubated with 0.05% pepsin (pH 2.0), chymotrypsin or trypsin (pH 8.0) for 3 h at 37 °C. In successive digestion test, the peptide was first incubated with pepsin for 3 h, evaporated in a centrifugal concentrator and then incubated for 3 h at 37 °C with both 0.025% (w/v) chymotrypsin and 0.025% (w/v) trypsin. The reactions were then heated for 5 min in boiling water to inactivate the enzyme. After enzymatic treatment, each sample was centrifuged and the supernatant was adjusted to pH = 8.3 and used for the ACE inhibitory activity determination.

Determination of ACE Inhibition Pattern. To clarify the inhibitory mechanism of the most potent peptide (Ala-His-Ser-Tyr) on ACE, different concentrations of the ACE inhibitory peptide were added to each reaction mixture according to the method of Wu and Ding (*19*), with slight modifications. The enzyme activities were measured with different concentrations of the substrate (HHL). ACE inhibitory pattern in the presence of the inhibitor was determined with Lineweaver−Burk plot (*20*).

Statistical Analysis. Statistical analyses were performed with Statgraphics ver. 5.1, professional edition (Manugistics Corp., USA) using ANOVA analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Correlation coefficient between degree of hydrolysis (DH) and ACE-inhibitory activity was performed by SPSS software using Pearson's correlation coefficient.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of Cuttlefish Protein Hydrolysates Using Various Proteases. The specificity of the enzyme used for the proteolysis and process conditions greatly influenced the molecular weight and amino acid residue composition of cuttlefish protein hydrolysates and thus their ACE inhibitory activities (*21*). In the present study, to produce ACE inhibitory peptides, cuttlefish muscle was hydrolyzed with various enzymes: Alcalase, crude enzyme preparations from *B. mojavensis* A21, *B. licheniformis* NH1 and *A. clavatus* ES1. The proximate composition of the cuttlefish muscle showed that it had high protein content (80.67 ± 0.26%). The ash and lipid contents of the muscle were 9.91 ± 0.04 and 3.4 ± 0.1%, respectively.

Table 1. Degrees of Hydrolysis of Cuttlefish Muscle Proteins, ACE Inhibitory Activities and IC_{50} Values of CMPH Obtained with Various Protease Treatments

enzyme	DH (%)	ACE inhibn (%)	IC_{50} (mg/mL)
A21 proteases	18.7	70.00 ± 1.00	1.12 ± 0.07
NH1 proteases	15.0	49.32 ± 0.62	2.01 ± 0.21
Alcalase	12.5	51.47 ± 1.50	1.84 ± 0.11
ES1 proteases	5.0	22.57 ± 1.30	4.43 ± 0.36

The extent of protein degradation by proteolytic enzymes was estimated by assessing the DH. The hydrolysis curves of cuttlefish proteins with the different enzymes after 4 h of incubation are shown in **Figure 1**. The hydrolysis of cuttlefish proteins was characterized by a high rate of hydrolysis for the first 1 h. The rate of enzymatic hydrolysis was subsequently decreased, and then the enzymatic reactions reached the steady-state phase when no apparent hydrolysis took place.

The crude protease from *B. mojavensis* A21 was the most efficient (DH = 18.7%), followed by the crude enzyme from *B. licheniformis* NH1 (DH = 15%), while that of *A. clavatus* ES1 was the least efficient (DH = 5%). High hydrolysis degree obtained with crude proteases from NH1 and A21 strains could be due to the fact that these extracts contain multiple proteases which offer the ability to achieve higher degree of hydrolysis of cuttlefish proteins (*14*, *22*). However, in the case of *A. clavatus* ES1, Hajji et al. (*23*) reported the production of only one protease by this strain.

The shape of hydrolysis curves is similar to those previously published for hydrolysates from smooth hound (*24*), Atlantic salmon (*25*), silver carp (*26*) and sardinelle (*8*).

ACE Inhibitory Activity of Cuttlefish Muscle Protein Hydrolysates. ACE inhibitory activity of the four CMPHs is presented in **Table 1**. ACE inhibitory activity of hydrolysates at 2 mg/mL varied greatly from 22.6% to 70.0%. The difference between ACE inhibitory activities might be attributed to the different molecular weights and different amino acid composition of ACE inhibitory peptides present in the CMPHs.

The protein hydrolysate generated by the crude enzyme preparation from *A. clavatus* ES1 showed the weakest ACE inhibitory activity with an IC_{50} value of 4.43 ± 0.36 mg/mL, while that obtained by the crude enzyme preparation from *B. mojavensis* A21 exhibited the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} value of 1.12 ± 0.07 mg/mL. The obtained results clearly show that high ACE inhibitory activity was observed only with hydrolysates with high DH, demonstrating that low molecular weight peptides had more ACE inhibitory activity than high molecular weight peptides. This is in line with previous works reporting that low molecular weight peptides exhibited higher activity than high molecular weight peptides (*9*, *27*). In addition, the obtained results suggest that protein hydrolysate prepared by treatment with crude protease from A21 strain possibly contained more potent ACE inhibitory activity peptides.

The IC_{50} value of A21 cuttlefish protein hydrolysate is lower than those of hydrolysates from oyster, scallop, codfish skin, and codfish bone, which presented an IC_{50} greater than 10 mg/mL (*28*), whereas it is higher than those of β-conglycinin and glycinin hydrolysates (0.126 and 0.148 mg/mL, respectively) (*29*).

Effect of the Degree of Hydrolysis on ACE Inhibitory Activity. Since the extent of hydrolysis highly influences the recovery and the functionality of the proteins, it is imperative to control the hydrolysis of proteins. Thus, cuttlefish muscle proteins were hydrolyzed by the crude enzyme from *B. mojavensis* A21, and the degree of hydrolysis and the ACE inhibition activity were measured. As shown in **Figure 2**, no ACE-inhibitory activity was detected with the undigested cuttlefish muscle proteins, while

ACE inhibitory activity of hydrolysates increased with extended incubation time. Higher ACE inhibition ($p < 0.05$) activity (87.11 ± 0.92% at 2 mg/mL) was obtained with a DH of 16% (about 2 h) and further digestion resulted in a decrease in the inhibition level (**Figure 2**).

The degree of hydrolysis (DH) is an important indicator used to describe a protein hydrolysis reaction (*15*). Many studies have suggested the importance of DH relating to ACE inhibitory activity. In the present study, we found that ACE-inhibitory activity was positively correlated with DH value ($r = 0.8333$, $p < 0.001$) based on Pearson's correlation analysis (**Figure 3**), suggesting that, for cuttlefish muscle proteins, it is essential to reach a certain level of degree of hydrolysis to allow maximum release of active peptides from inactive protein precursors.

The above results indicated that the hydrolysate obtained by treatment with crude enzyme preparation from *B. mojavensis* A21

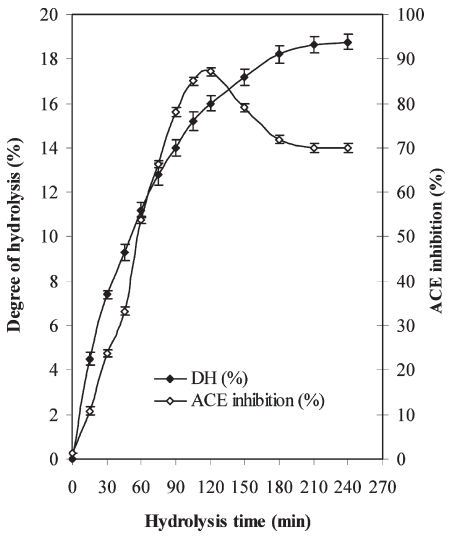


Figure 2. Comparison of ACE inhibitory activity and degree of hydrolysis of CMPH as a function of hydrolysis time.

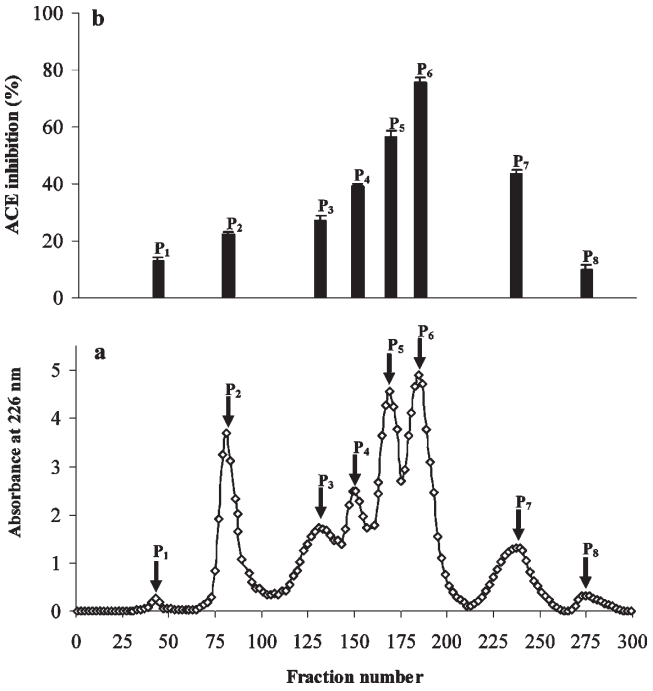


Figure 4. Elution profile of CMPH obtained with crude enzyme from *B. mojavensis* A21 separated by size exclusion chromatography on Sephadex G-25 (lower panel) and the ACE inhibitory activities of the separated fractions (P_1−P_8) (upper panel). Values presented are the means of triplicate analyses.

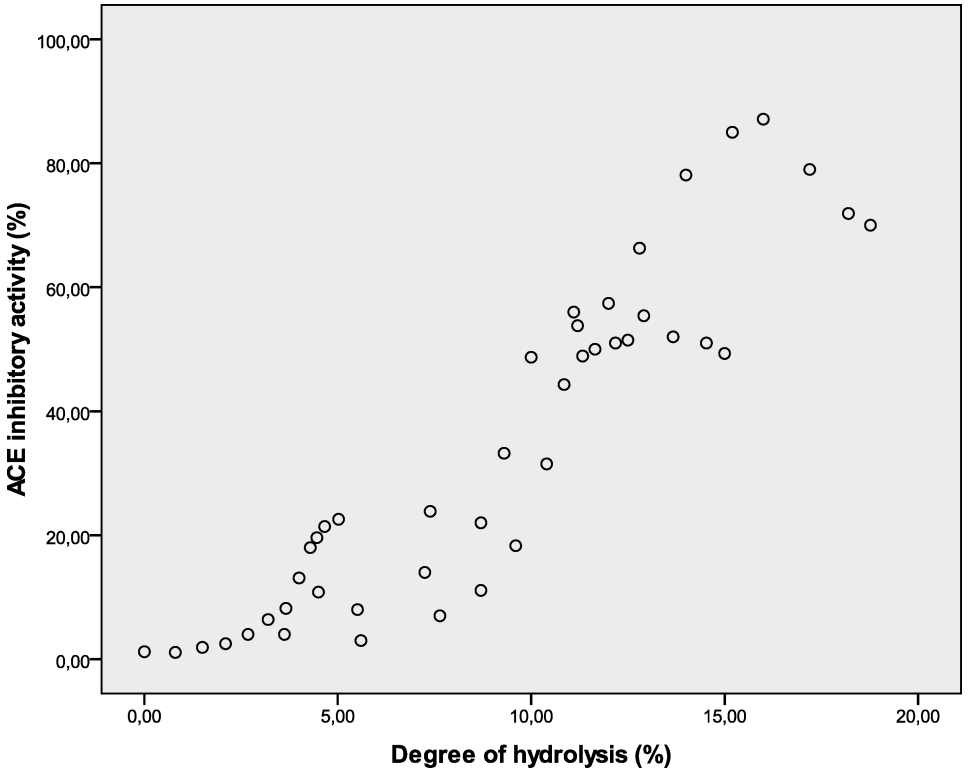


Figure 3. Relationship between degree of hydrolysis (DH) of cuttlefish muscle proteins treated with varied proteases and ACE-inhibitory activity based on Pearson's correlation analysis ($r = 0.8333$, $p < 0.001$).

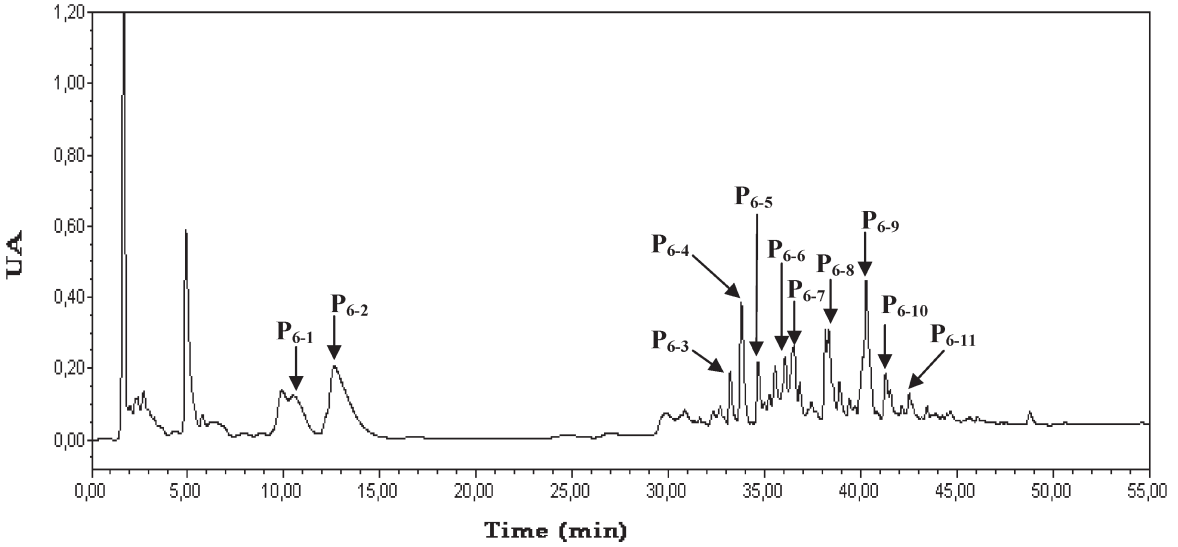


Figure 5. Purification of ACE inhibitory peptides in peak P_6 by reversed-phase HPLC chromatography on a Vydac C_{18} column (10 mm × 250 mm).

Table 2. Structure, Molecular Weight and IC_{50} Values of Peptides in Fraction P_6 from Gel Filtration Separated by RP-HPLC

fractions	mass $(M + H)^+$ in Da	sequence	IC_{50} value[a] (μM)
P_{6-1}	270.3	Gly-His-Gly	122.0
P_{6-2}	359.1	Gly-Asp-Ala-Pro	22.5
P_{6-3}	234.1	Ala-Gly-Ser	527.9
P_{6-4}	321.0	Ala-Gly-Ser-Ser	672.1
P_{6-5}	477.1	Ala-His-Ser-Tyr	11.6
P_{6-6}	331.2	Ala-Gly-Ser-Pro	37.2
P_{6-7}	520.1	Gly-Val-His-His-Ala	71.8
P_{6-8}	338.0	Asp-Phe-Gly	44.7
P_{6-9}	280.0	Phe-Gly-Gly	82.5
P_{6-10}	288.2	Ala-Val-Val	66.6
P_{6-11}	302.1	Ile-Ala-Val	153.4

[a] The IC_{50} value of each peptide is the mean of three experimental repeats.

possessed potent ACE inhibitory peptides. Therefore, this hydrolysate was selected for further study.

Isolation and Purification of ACE Inhibitory Peptides. The ACE inhibitory peptides, in cuttlefish muscle protein hydrolysates with a DH of 16%, treated with the *B. mojavensis* A21 proteases, were separated by gel filtration chromatography on a Sephadex G-25 column. As reported in **Figure 4a**, eight fractions were separated and designated as P_1−P_8. Each fraction was pooled and freeze-dried, and its ACE inhibitory activity was determined. All fractions (at 1 mg/mL) displayed ACE inhibitory activity as shown in **Figure 4b**. Of the eight fractions collected, fraction P_6 exhibited the highest level of ACE inhibitory activity (IC_{50} = 0.52 ± 0.03 mg/mL), followed by fraction P_5 (IC_{50} = 0.93 ± 0.07 mg/mL).

Fraction P_6 was further separated by RP-HPLC on a C_{18} column using a linear gradient of acetonitrile. As can be seen from the chromatographic profile at 214 nm, given in **Figure 5**, at least eleven subfractions designated P_{6-1}−P_{6-11} were present in fraction P_6. These fractions were collected, and their ACE inhibitory activities were determined. Although ACE inhibitory activity was observed in all subfractions, fraction P_{6-5} exhibited the highest inhibitory activity (IC_{50} value 0.0055 mg/mL) followed by P_{6-2}, P_{6-6} and P_{6-8} with IC_{50} values of 0.008, 0.0123, and 0.015 mg/mL, respectively. The other fractions showed moderate or very low ACE inhibitory activity.

Identification of the ACE Inhibitory Peptides. Peptides in subfractions P_{6-1}−P_{6-11} were analyzed by ESI-MS for molecular mass determination and by ESI-MS/MS for amino acid sequences. Eleven peptides were identified, and their IC_{50} values were determined (**Table 2**). These inhibitors are novel peptides with ACE inhibitory activity that had never been reported. The amino acid sequences of the three potent ACE inhibitors were Ala-His-Ser-Tyr, Gly-Asp-Ala-Pro and Ala-Gly-Ser-Pro, and their IC_{50} values were 11.6, 22.5, and 37.2 μM, respectively.

According to previous reports on the structure−activity relationships between different peptide inhibitors of ACE (*30*), binding to ACE is strongly influenced by the C-terminal amino acid residue. Gobbetti et al. (*31*) reported that peptides with Trp, Tyr, Phe, Pro or hydrophobic amino acids at the C-terminal were effective for ACE inhibitory activity. Several identified ACE inhibitory peptides have a proline residue in the C-terminal position, but this is neither sufficient nor essential to confer activity. Further, Cheung et al. (*32*) indicated that ACE prefers competitive inhibitors that contain hydrophobic amino acid residues such as Pro, Phe, and Tyr at the three positions from the C-terminal. In this study, two of the three potent ACE inhibitory activity peptides identified had Pro at C-terminal and the most potent inhibitory peptide had Tyr at the C-terminal position. On the other hand, several studies reported that hydrophobic amino acid residues were preferred at the N-terminal position. Among the eleven identified peptides, nine peptides had Ala, Gly or Ile at the N-terminal.

Interestingly, Ala-His-Ser-Tyr peptide with Tyr residue at C-terminal was found to possess the strong ACE-inhibitory activity with an IC_{50} value of 11.6 μM. The ACE inhibitory activity of the most potent inhibitor was higher than Ileu-Trp-Glu (IC_{50}, 315.3 μM) and Ileu-Ala-Glu (IC_{50}, 34.7 μM) peptides from the sea cucumber (*Acaudia molpadiodea*) hydrolysate (*9*), and Leu-Val-Gln-Gly-Ser (IC_{50}, 43.7 μM) from fermented soybean extract (*33*).

The peptides with moderate ACE inhibitory activity had a high content of branched and/or aromatic amino acids (Pro, Glu, Val, Phe and Tyr) in their peptide sequences such as Asp-Phe-Gly and Gly-Val-His-His-Ala peptides with IC_{50} values of 44.7 and 71.8 μM, respectively. Ala-Gly-Ser and Ala-Gly-Ser-Ser showed only weak ACE inhibitory activity. The presumed reason for this low level of activity inhibition was that these peptides were not sufficiently hydrophobic for ACE inhibition and contained Ser, a hydrophilic amino acid, at the C-terminal.

Table 3. *In vitro* Stability of Ala-His-Ser-Tyr to Digestive Proteases

enzyme	ACE inhibn (%)
control	100
pepsin	100
trypsin	99.2
chymotrypsin	98.9
pepsin + trypsin + chymotrypsin	98.1

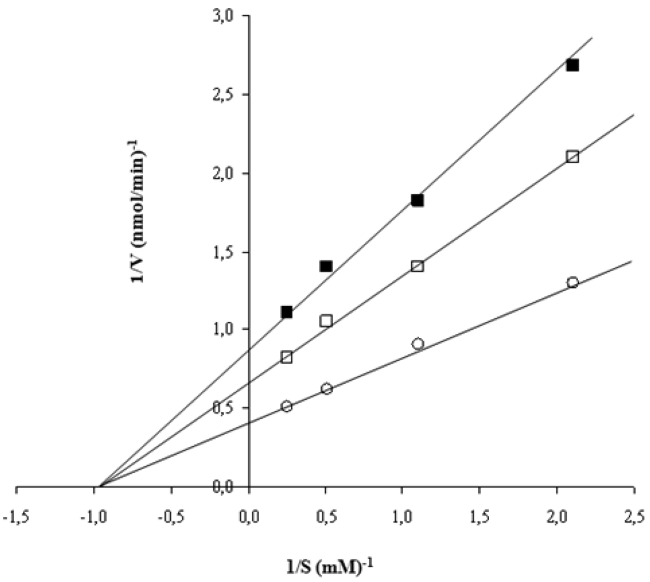


Figure 6. Lineweaver–Burk plot of the inhibition of ACE by the most potent purified peptide (Ala-His-Ser-Tyr) from cuttlefish muscle protein. ACE activity was measured in the absence or presence of inhibitory peptide (Ala-His-Ser-Tyr) as described in the text using HHL as the enzyme substrate (○, control; □, 25 μM; ■, 50 μM). 1/*V* and 1/*S* represent the reciprocal of velocity and substrate, respectively. Each point represents the mean value of three experiments.

Stability of Ala-His-Ser-Tyr against Gastrointestinal Protease. In order to exert an antihypertensive effect *in vivo*, the ACE inhibitory peptides must be absorbed in their intact form from intestine and further be resistant to plasma peptidase degradation to reach their target sites. Thus, to predict the antihypertensive effect *in vivo*, the stability of the most potent ACE inhibitory peptide, Ala-His-Ser-Tyr, against gastrointestinal proteases *in vitro*, was evaluated. As reported in **Table 3**, the peptide is stable, since incubation with gastrointestinal proteases did not change its activity ($p > 0.05$) (**Table 3**). Due to its digestion-resisting properties and long-lasting antihypertensive activity, this peptide may potentially be used as a functional food useful in prevention and/or treatment of hypertension.

Determination of ACE Inhibition Pattern of Ala-His-Ser-Tyr. The ACE inhibition pattern of the most potent ACE inhibitory peptide, Ala-His-Ser-Tyr, was investigated by Lineweaver–Burk plot (**Figure 6**). The kinetic study revealed that ACE inhibitor Ala-His-Ser-Tyr acts as a noncompetitive inhibitor. This indicates that the novel peptide cannot bind to the catalytic site of ACE and thus could not be hydrolyzed by the enzyme.

Although most of the reported peptides acted as competitive inhibitors for ACE, a few peptides inhibiting ACE activity in a noncompetitive manner have been reported, including Val-Gly-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Gln-Phe from algae protein waste (*34*), Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe from oyster (*Crassostrea talienwhanensis Crosse*) proteins (*35*), Phe-Gly-Ala-Ser-Thr-Arg-Gly-Ala from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein (*36*) and Ile-Phe-Leu and Trp-Leu from fermented soybean food (*18*). The inhibition site of the noncompetitive inhibitor on ACE was not specified, and the precise inhibition mechanism of ACE inhibitory peptide is also not yet clear.

Conclusion. ACE inhibitory peptides were selected from hydrolysates of continental proteins, and there were only a few reports on the identification of peptides from marine protein hydrolysates and in particular from invertebrate muscle. In the present study, cuttlefish muscle protein hydrolysates obtained by treatment with various proteases were found to possess ACE inhibitory activity. Among the four proteolytic preparations, crude enzyme from *B. mojavensis* A21, which contained multiple proteases, was the most suitable for the production of the hydrolysate with the highest ACE inhibitory activity.

By gel permeation chromatography on a Sephadex G-25, and reversed-phase HPLC, eleven ACE inhibitory peptides were purified from the muscle of cuttlefish hydrolysates with a DH of 16% and their sequences were identified by ESI-MS/MS and molecular weight analysis. The peptide Ala-His-Ser-Tyr displayed the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of 11.6 μM. Further, this purified peptide maintained inhibitory activity even after incubation *in vitro* digestion with gastrointestinal proteases. The kinetic study revealed that the ACE inhibitor of the potent peptide acts as a noncompetitive inhibitor.

The obtained results show that cuttlefish muscle is a promising protein source for the production of ACE inhibitory peptides that could be utilized to develop functional foods for prevention of hypertension. Further work should be done to purify and identify ACE inhibitory peptides in the other fractions collected by gel filtration. In addition, potent ACE inhibitory peptides should be tested on spontaneously hypertensive rats to examine their properties and functions as antihypertensive compounds *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. Mostafa Kouach and Dr. Gilbert Briand, Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse, Service Commun de Physicochimie, Faculté de Médecine Lille II, France, for analysis of peptide sequences.

LITERATURE CITED

(1) Murray, B. A.; FitzGerald, R. J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 773–791.
(2) Lavoie, J. L.; Sigmund, C. D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system; an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **2003**, *144*, 2179–2183.
(3) Cohen, M. L. Synthetic and fermentation-derived angiotensin converting enzyme inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1985**, *25*, 307–323.
(4) Cooper, W. O.; Hernandez-Diaz, S.; Arbogast, P. G.; Dudley, J. A. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 2443–2453.
(5) Pihlanto, A.; Virtanen, T.; Korhonen, H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 3–10.
(6) Zhao, Y.; Li, B.; Liu, Z.; Dong, S.; Zhao, X.; Zeng, M. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 1586–1591.
(7) Jia, J.; Ma, H.; Zhao, W.; Wang, Z.; Tian, W.; Luo, L.; He, R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chem.* **2010**, *119*, 336–342.
(8) Bougatef, A.; Nedjar-Arroume, N.; Ravallec-Plé, R.; Leroy, Y.; Guillochon, D.; Barkia, A.; Nasri, M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine-proteases. *Food Chem.* **2008**, *111*, 350–356.

(9) Zhao, Y.; Li, B.; Dong, S.; Liu, Z.; Zhao, X.; Wang, J.; Zeng, M. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptides* **2009**, *30*, 1028–1033.
(10) Lee, S. H.; Qian, Z. J.; Kim, S. K. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* **2010**, *118*, 96–102.
(11) Raghavan, S.; Kristinsson, H. G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem.* **2009**, *117*, 582–588.
(12) Hajji, M.; Kanoun, S.; Nasri, M.; Gharsallah, N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 791–797.
(13) El Hadj-Ali, N.; Agrebi, R.; Ghorbel-Frikha, B.; Sellami-Kamoun, A.; Kanoun, S.; Nasri, M. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 513–523.
(14) Haddar, A.; Agrebi, R.; Bougatef, A.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3366–3373.
(15) Adler-Nissen, J. A review of food hydrolysis specific areas. In *Enzymic hydrolysis of food proteins*; Adler-Nissen, J., Ed.; Elsevier Applied Science Publishers: Copenhagen, Denmark, 1986; pp 57−109.
(16) AOAC. *Official methods of analysis*; AOAC: Arlington, VA, 1995, Secs. 930.15−942.05.
(17) Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Sakai, K.; Okubo, A.; Yamazaki, S.; Takano, T. Purification and characterization of angiotensin I-converting-enzyme inhibitors from Sour Milk. *J. Dairy Sci.* **1995**, *78*, 777–783.
(18) Kuba, M.; Tanaka, K.; Tawata, S.; Takeda, Y.; Yasuda, M. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2003**, *67*, 1278–1283.
(19) Wu, J.; Ding, X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 367–375.
(20) Lineweaver, H.; Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 665–666.
(21) van der Ven, C.; Gruppen, H.; de Bont, D. B. A.; Voragen, A. G. J. Optimization of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 813–820.
(22) Hmidet, N.; El-Hadj Ali, N.; Haddar, A.; Kanoun, S.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M. Alkaline proteases and thermostable α-amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as laundry detergent additive. *Biochem. Bioeng. J.* **2009**, *47*, 71–79.
(23) Hajji, M.; Rebai, A.; Garsallah, N.; Nasri, M. Optimisation of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis Jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 915–923.
(24) Bougatef, A.; Hajji, M.; Balti, R.; Lassoued, I.; Triki-Ellouz, Y.; Nasri, m. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1198–1205.
(25) Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 657–666.
(26) Dong, S.; Zeng, M.; Wang, D.; Liu, Z.; Zhao, Y.; Yang, H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem.* **2008**, *107*, 1485–1493.
(27) Jung, W. K.; Kim, S. K. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* **2006**, *94*, 26–32.
(28) He, H. L.; Chen, X. L.; Wu, H.; Sun, C. Y.; Zhang, Y. Z.; Zhou, B. C. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 3499–505.
(29) Kuba, M.; Tana, C.; Tawata, S.; Yasuda, M. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 2191–2196.
(30) Turner, A. J.; Hooper, N. M. The angiotensin-I-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *23*, 177–183.
(31) Gobbetti, M.; Ferranti, P.; Smacchi, E.; Goffredi, F.; Addeo, F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. cremoris FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *9*, 3898–3904.
(32) Cheung, H. S.; Wang, F. L.; Ondetti, M. A.; Sabo, E. F.; Cushman, D. W. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 401–407.
(33) Rho, S. J.; Lee, J. S.; Chung, Y. I.; Kim, Y. K.; Lee, H. G. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 490–493.
(34) Sheih, I. C.; Fang, T. J.; Wu, T. K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem.* **2009**, *115*, 279–284.
(35) Wang, J.; Hu, J.; Cui, J.; Xuefang, B.; Dua, Y.; Miyaguchi, Y.; Lin, B. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* **2008**, *111*, 302–308.
(36) Je, J. Y.; Park, P. J.; Kwon, J. Y.; Kim, S. K. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7842–7845.

Received for review December 5, 2009. Revised manuscript received February 8, 2010. Accepted February 11, 2010. This work was funded by the Ministry of Higher Education, Scientific Research and Technology, Tunisia.

Trois nouveaux peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) à partir d'hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (*Sepia officinalis*) obtenus par traitement avec des protéases digestives

Rafik Balti, Naima Nedjar-Arroume, Ali Bougatef, Didier Guillochon, Moncef Nasri

Les protéases digestives d'origine animale comme la pepsine, la chymotrypsine et la trypsine ont été fréquemment utilisées pour la génération des peptides inhibiteurs de l'ECA. Les protéases alcalines d'origine microbienne ont été aussi largement utilisées dans la production d'hydrolysats doués d'activité antihypertensive à partir de différentes protéines alimentaires. Par contre, l'utilisation des protéases endogènes de poissons et des invertébrés marins dans la génération des peptides bioactifs n'a pas été bien développée. Le présent travail a pour objectif l'évaluation des activités antihypertensives des hydrolysats de protéines de muscle de la seiche commune (*S. officinalis*), préparés par l'action de l'extrait viscérale de sardinelle (*Sardinella aurita*), l'extrait intestinal de l'émissole lisse (*Mustelus mustelus*), l'extrait hépatopancréatique de la seiche commune (*S. officinalis*) ainsi que la trypsine et la chymotrypsine bovine.

Après 4 heures d'hydrolyse, le DH le plus élevé (11 %) est obtenu par l'extrait intestinal de l'émissole lisse, suivie par l'extrait viscérale de sardinelle (10 %), alors que les DH les plus bas sont obtenus avec la trypsine (7 %) et la chymotrypsine (7 %) bovine. L'activité antihypertensive *in vitro* des hydrolysats élaborés, a été étudiée en utilisant le HHL (Hippuryl-Histidine-Leucine) comme substrat. Tous les hydrolysats manifestent une activité inhibitrice de l'ECA et l'hydrolysat protéique traité avec l'extrait hépatopancréatique de la seiche commune présente l'activité antihypertensive *in vitro* la plus élevée (CI_{50} = 1,19 ± 0,17 mg/ml) pour un DH de l'ordre de 8 %.

Les CI_{50} des hydrolysats protéiques préparés par la trypsine et la chymotrypsine pancréatiques sont de l'ordre de 2,14 ± 0,05 mg/ml, 2,31 ± 0,09 mg/ml, respectivement. Ceux obtenus moyennant les extraits endogènes de la sardinelle et l'émissole lisse sont de l'ordre de 1,58 ± 0,20 mg/ml et 1,47 ± 0,08 mg/ml, respectivement.

L'étude de l'activité antihypertensive *in vitro* de l'hydrolysat préparé par l'extrait hépatopancréatique de la seiche commune en fonction du degré d'hydrolyse a révélé qu'elle

est maximale (64,47% à 2 mg/ml) pour un DH d'environ 8 %. Au-delà de ce DH l'activité antihypertensive demeure constante.

L'hydrolysat protéique correspondant au DH de 8 % obtenu à l'aide de l'extrait hépatopancréatique de la seiche commune a été ensuite fractionné sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25 en cinq fractions majoritaires (P_1-P_5). La fraction P_5 a montré le pouvoir d'inhibition de l'ECA le plus important avec une CI_{50} de l'ordre de 0,39 mg/ml. Cette fraction a été soumise à un nouveau fractionnement par HPLC, sur une colonne de silice C_{18} en phase inverse, en neuf sous-fractions majoritaires. Uniquement, trois sous-fractions nommées (A, B et C) ont présenté une activité inhibitrice de l'ECA. Ces sous-fractions ont été retenues pour identification des peptides.

L'analyse de ces trois sous-fractions par spectrométrie de masse (ESI/MS) et (ESI/MS/MS) nous a permis d'identifier trois nouvelles séquences peptidiques. Il s'agit de Met-Ala-Trp (407,2 Da), Val-Tyr-Ala-Pro (447,2 Da) et Val-Ile-Ile-Phe (491,1 Da). Les CI_{50} déterminées de ces peptides sont de l'ordre de 16,32 ; 6,1 et 8,7 µM, respectivement.

En général, les peptides inhibiteurs de l'ECA possèdent une proline ou un résidu aromatique du côté C-terminal et un acide aminé hydrophobe du côté N-terminal. En effet, le peptide le plus actif identifié au cours de ce travail (Val-Tyr-Ala-Pro) est caractérisé par la présence des résidus Val et Pro du côté N- et C-terminal, respectivement.

Lors de la fabrication des aliments, les protéines ou peptides qui les constituent subissent divers traitements qui peuvent modifier leurs caractéristiques physiques et leurs propriétés. Par exemple, le traitement thermique qui survient dans la plupart des procédés de fabrication de nos aliments provoque des changements de structure des molécules protéiques. L'altération de leur conformation native permet d'obtenir un état dénaturé, responsable de la perte de certaines propriétés comme la solubilité ou l'activité biologique. Il est donc intéressant d'étudier l'effet de ce paramètre sur l'activité biologique des peptides identifiés pour une éventuelle incorporation dans la formulation des aliments fonctionnels. En effet, la stabilité thermique des trois peptides purifiés a été investiguée. Chaque peptide a été incubé à différentes températures allant de 4 à 100 °C pendant 2 h puis son pouvoir antihypertensif *in vitro* a été déterminé. Les résultats obtenus ont montré une haute stabilité thermique de ces peptides. Ils conservent 100 % de leurs activités antihypertensives pour toutes les températures utilisées.

Afin d'exercer un effet hypotensive *in vivo*, les peptides inhibiteurs de l'ECA doivent être absorbés sous leur forme intacte au niveau de l'intestin et être résistants contre les

enzymes protéolytiques gastro-intestinales pour atteindre leurs cibles. Pour évaluer la résistance vis-à-vis de la digestion gastro-intestinale des trois peptides identifiés (Met-Ala-Trp, Val-Tyr-Ala-Pro et Val-Ile-Ile-Phe), chaque solution peptidique a été incubée en présence de protéases digestives (pepsine, trypsine et chymotrypsine) seule ou en combinaison puis l'activité inhibitrice de l'ECA résiduelle a été déterminée. Les résultats obtenus ont prouvé que tous les peptides résistent à l'action des enzymes protéolytiques digestives testées.

Dans le but de comprendre le mécanisme d'action des peptides identifiés, les cinétiques d'inhibition de ces derniers ont été réalisées. Les trois peptides ont montré un mécanisme d'inhibition non compétitif. Il en ressort que ces inhibiteurs peptidiques peuvent se lier à la fois, et avec une même affinité, sur l'ECA libre et sur l'ECA liée au substrat. Cependant, le peptide et le substrat n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au site actif, et le peptide à un autre site de fixation. Probablement, la fixation du peptide entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat en produit mais n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat.

Article 5:

Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases.

Balti Rafik, Nedjar-Arroume Naima, Bougatef Ali, Guillochon Didier & Nasri Moncef (2010). *Food Research International*, 43, 1136-1143.

Food Research International 43 (2010) 1136–1143

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases

Rafik Balti [a], Naima Nedjar-Arroume [b], Ali Bougatef [a], Didier Guillochon [b], Moncef Nasri [a,*]

[a] Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP 1173, 3038 Sfax, Tunisia
[b] Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 December 2009
Accepted 5 February 2010

Keywords:
Angiotensin I-converting enzyme
Inhibitory activity
Peptide
Cuttlefish muscle
Sepia officinalis
Fish endogenous proteases
Enzymatic treatment

ABSTRACT

The angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of protein hydrolysates prepared from muscle of cuttlefish (*Sepia officinalis*) by treatment with various digestive proteases were investigated. The most active hydrolysate was obtained with the crude protease extract from the hepatopancreas of cuttlefish (64.47 ± 1.0% at 2 mg of dry weight/ml) with a degree of hydrolysis of 8%. By gel filtration on Sephadex G-25 and RP-HPLC on C18 column, three novel peptides with high ACE-inhibitory activity were purified and their molecular masses and amino acid sequences were determined. The three peptides Val-Tyr-Ala-Pro, Val-Ile-Ile-Phe and Met-Ala-Trp with IC_{50} values of 6.1, 8.7 and 16.32 μM, respectively, were novel ACE-inhibitory peptides. Lineweaver–Burk plots suggest that the three purified peptides act as non-competitive inhibitors against ACE. These results suggest that some peptides from cuttlefish could be a beneficial ingredient for nutraceuticals against hypertension.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hypertension is a major chronic disease. It is defined as a systolic blood pressure above 140 mm Hg and/or a diastolic blood pressure above 90 mm Hg. Hypertension affects up to 30% of the adult population in most countries. However, more than 50% of hypertensive individuals are unaware of their condition (Chockalingam, 2008). It is estimated that 7.6 million premature deaths (about 13.5% of the global total) and 92 million deaths and disability-adjusted life years (DALYS) (6.0% of the global total) are attributable to high blood pressure (Lawes, Horrn, & Rodgers, 2008). Untreated hypertension can lead to stroke, coronary heart disease (CHD), kidney dysfunction, disability, and death. The angiotensin converting enzyme (ACE; EC. 3.4.15.1) plays an important physiological role in the regulation of blood pressure. The enzyme converts an inactive form of the decapeptide, angiotensin I, to a potent vasoconstrictor the octapeptide angiotensin II, and also inactivates bradykinin, a vasodilator (Li, Le, Liu, & Shi, 2005). Therefore, the inhibition of ACE activity is a good target for hypertension. The currently used synthetic drugs for the treatment of hypertension, e.g., captopril, and enalapril have certain side effects (Je, Park, Jung, Park, & Kim, 2005).

In recent years, peptides that can inhibit ACE are receiving special attention since they are considered as non pharmacological alternative for the prevention and control of systemic arterial hypertension (Vermeirssen, Van Camp, & Verstraete, 2004). These peptides, which are inactive within the sequence of the parent protein, are liberated during enzymatic digestion or food processing. Among these bioactive peptides, a variety of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides with various amino acid sequences have been found in hydrolysates from food proteins digested with different proteases under different hydrolysis conditions, such as milk protein (Gobbetti, Ferranti, Smacchi, Goffredi, & Addeo, 2000; Jérôme, Laurent, & Jean-Luc, 2002; Meisel, 1998; Rober, Razaname, Mutter, & Juillerat, 2004), soy-protein (Wu & Ding, 2002), egg protein (Yoshii et al., 2001), fish protein (Fujita & Yoshikawa, 1999; Sugiyama et al., 1991) and porcine muscle protein (Arihara, Nakashima, Mukai, Ishikawa, & Itoh, 2001). In contrast to the many ACE-inhibitory peptides derived from vertebrate muscle, very few studies on ACE-inhibitory peptides from invertebrate muscles have been conducted.

Animal digestives proteases such as pepsin, chymotrypsin and trypsin are frequently used in hydrolysis to produce ACE-inhibitory peptides (Lee, Qian, & Kim, 2010; Wang et al., 2008). Microbial alkaline proteases are also utilized in the production of ACE inhibitors from food proteins such as tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Raghavan & Kristinsson, 2009) and whey (Guo, Pan, & Tanokura, 2009). However, few research reports have been published on the utilization of endogenous enzymes from fish and aquatic invertebrates to produce bioactive peptides (Bougatef, Nedjar-Arroume, et al., 2008; Bougatef et al., 2009; Khantaphant & Benjakul, 2008).

* Corresponding author. Tel.: +216 74 274 088; fax: +216 74 275 595.
E-mail addresses: mon_nasri@yahoo.fr, moncef.nasri@enis.rnu.tn (M. Nasri).

0963-9969/$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodres.2010.02.013

In the present study, three new peptides with high ACE-inhibitory activity were isolated from cuttlefish protein hydrolysates, and their amino acid sequences were determined.

2. Materials and methods

2.1. Cuttlefish sample preparation

Cuttlefish (*S. officinalis*) was purchased from the fish market of Sfax city, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1:3 (w/w) and transported to the research laboratory within 30 min. The mantle was cleaned, deskinned and eviscerated and then stored in sealed plastic bags at −20 °C until used.

2.2. Enzymes and chemicals

Angiotensin I-converting enzyme from rabbit lung and the ACE synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile was of HPLC grade. Sephadex G-25 was purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Purified water was obtained from a Culligan system; the resistivity was approximately 18 MΩ. Other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Chymotrypsin and trypsin (from bovine pancreas), and pepsin (from porcine stomach mucosa) were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Crude protease extracts from sardinelle viscera (*Sardinella aurita*) (Ben Khaled et al., 2008), smooth hound intestines (*Mustelus mustelus*) (Bougatef, Balti, Jellouli, Triki-Ellouz, & Nasri, 2008), and cuttlefish hepatopancreas (*S. officinalis*) (Balti, Barkia, Bougatef, Ktari, & Nasri, 2009) were prepared in our laboratory.

2.3. Production of cuttlefish muscle protein hydrolysates (CMPHs)

Cuttlefish (*S. officinalis*) 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 then homogenized in a Moulinex® blender for about 2 min. The pH of the mixture was adjusted to the optimum activity value for each enzyme. The hydrolysis was performed at the same concentrations of enzyme and substrate ($E/S = 3$ U/mg) to compare hydrolytic efficiencies. During the reaction, the pH of the mixture was maintained at the desired value by continuous addition of 4 N NaOH solution. After the required digestion time the reaction was stopped by heating the solution at 80 °C during 20 min to inactivate the enzyme. The cuttlefish muscle protein hydrolysates were then centrifuged at 5000*g* for 20 min to separate insoluble and soluble fractions. Finally, the soluble phase was freeze-dried using freeze-dryer (Bioblock Scientific Christ ALPHA 1-2, IllKrich-Cedex, France) and stored at −18 °C for further use. Hydrolysis conditions for the preparation of CMPHs are summarized in Table 1.

2.4. Determination of the degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH), defined as the percent ratio of the number of peptide bonds broken (h) to the total number of peptide bonds in the substrate studied (h_{tot}), in each case, was calculated from the amount of base (NaOH) added to keep the pH constant during the hydrolysis (Adler-Nissen, 1986) as given below.

$$\mathrm{DH}\ (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{B \times \mathrm{Nb}}{\mathrm{MP}} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

Table 1
Hydrolysis conditions, DH and IC_{50} values of cuttlefish muscle protein hydrolysates obtained with various digestives proteases treatment.

Enzyme	Optimum conditions		DH (%)	IC_{50} (mg of dry weight/ml)
	Temperature (°C)	pH		
Trypsin	37	8.0	7.0	2.14 ± 0.05
Chymotrypsin	37	7.5	7.0	2.31 ± 0.09
Sardinelle proteases	45	8.0	10.0	1.58 ± 0.20
Cuttlefish proteases	50	8.0	8.0	1.19 ± 0.17
Smooth hound proteases	50	8.0	11.0	1.47 ± 0.08

E/S: 3 U/mg of protein.

where B is the amount of base 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-NH_2 groups released during hydrolysis expressed as:

$$\alpha = \frac{10^{\mathrm{pH}-\mathrm{p}K}}{1 + 10^{\mathrm{pH}-\mathrm{p}K}}$$

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

2.5. Determination of the ACE inhibition activity

The ACE inhibition activity was assayed as reported by Nakamura et al. (1995). For each assay, 80 µl of CMPH at different concentrations was added to 200 µl of 5 mM hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), and then preincubated for 3 min at 37 °C. CMPH and HHL were prepared in 100 mM borate buffer, pH 8.3, containing 300 mM NaCl. The reaction was then initiated by adding 20 µl of 0.1 U/ml ACE from rabbit lung prepared in the same buffer and incubated for 30 min at 37 °C. The enzyme reaction was stopped by the addition of 250 µl of 1 M HCl. The released hippuric acid (HA) was quantified by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column connected to a system composed of a Waters TM 600 automated gradient controller pump module, a WaterWisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. The sample was then eluted using an acetonitrile/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) gradient from 0% to 28% and from 28% to 47% for 50 and 20 min, respectively. The elution profile was monitored at 228 nm. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 446 computer. Millennium software was used to acquire, analyze and plot chromatographic data. The average value from three determinations at each concentration was used to calculate the ACE inhibition rate as follows:

$$\text{ACE inhibition}\ (\%) = \left[\frac{B - A}{B - C}\right] \times 100$$

where A is the absorbance of HA generated in the presence of ACE inhibitor component, B the absorbance of HA generated without ACE inhibitors and C is the absorbance of HA generated without ACE (corresponding to HHL autolysis in the course of enzymatic assay).

The IC50 value was defined as the concentration of inhibitor required to reduce the hippuric acid peak by 50% (indicating 50% inhibition of ACE).

2.6. Isolation and purification of ACE-inhibitory peptides

The lyophilized hydrolysate (1 g), with a DH of 8%, obtained by treatment with crude protease extract from cuttlefish hepatopancreas, was suspended in 5 ml of distilled water, then separated

onto a Sephadex G-25 gel filtration column (5 cm × 57 cm), pre-equilibrated and eluted with distilled water at a flow rate of 30 ml/h. Fractions (4 ml each) were collected and elution curves were obtained by measuring absorbance at 226 nm using an on-line spectrophotometer. Fractions that showed ACE-inhibitory activity were pooled and lyophilized. The most active fraction was dissolved in distilled water, filtered through 0.22 μm filters, and then separated by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column (10 mm × 250 mm) (Grace-Vydac, USA). Peptides were eluted with eluent A (water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)) for 20 min, then with a linear gradient of acetonitrile (0–50% for 35 min) containing 0.1% TFA at a flow rate of 1 ml/min. On-line UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software.

2.7. Mass spectrometry analysis

The molecular mass and peptide sequencing were done on positive ion mode using electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI–MS) and the tandem mass spectrometry (MS/MS). ESI mass spectrometry was performed using a triple quadrupole instrument Applied Biosystems API 3000 (PE Sciex, Toronto, Canada) equipped with an electrospray ion source. The system is controlled by the Analyst Software 1.4, allowing the control of the spectrometer, the analysis and the processing data. Interpretations of spectra (MS/MS) were made with the BioAnalyst software. The freeze-dried samples from RP-HPLC were dissolved in acetonitrile/water (20/80; v/v) containing 0.1% formic acid for the positive mode. The solution was injected (nebulised) continuously, by a pump (Model 22, Harward Apparatus, South Natick, USA) with a flow rate of 5 μl/min. The potential of ionisation was of 5000 V in positive mode. At the time of the recording of the spectrum, 30 scans on average were added (MCA mode) for each spectrum. The gases used (nitrogen and air) were pure (up to 99%) and produced by a compressor Jun-Air 4000-40M and a nitrogen generator Whatman model 75-72 (Whatman Inc., Haverhill, MA, USA). The polypropylene glycol (PPG) was used for the calibration and the optimisation of the machine. The peptide sequence was determined from the CID spectrum of the protonated analyse $[M+H]^+$ by MS/MS experiments. Peptide sequences were done using the BioAnalyst software (Applied Biosystems, USA).

2.8. Picotag amino acids analysis

Amino acids were analysed with a Waters Picotag Work station. Peptide hydrolysis was achieved with constant boiling in 6 M HCl containing 1% (w/v) phenol, for 24 h at 110 °C. The precolumn derivatization of amino acids with phenyl isothiocyanate and the HPLC separation of derivatized amino acids on a waters reverse-phase Picotag column (150 mm × 3.9 mm i.d.) were performed by the method of Bidlingmeyer, Cohen, Tarvin, Napier, and Hancock (1984). The detection wave length was 254 nm and the flow rate was 1 ml/min.

2.9. Stability study for ACE-inhibitory activity

2.9.1. Effect of temperature on ACE-inhibitory activity

The ACE-inhibitory peptides solutions (0.05 mg/ml, 0.5 ml) were subsequently incubated at different temperatures (4, 20, 40, 60, 80, and 100 °C) for 2 h. After the temperature was acclimated to room temperature (25 °C), the residual ACE-inhibitory activity was determined.

2.9.2. Effect of gastrointestinal proteases on ACE-inhibitory activity

The stability of purified ACE-inhibitory peptides against gastrointestinal proteases *in vitro* was assessed as reported by Kuba, Tanaka, Tawata, Takeda, and Yasuda (2003). Purified peptides solutions (1 mg/ml, 0.2 ml) were individually incubated with 0.2 ml of a 0.05% pepsin, chymotrypsin or trypsin solution (0.1 M glycine–HCl at pH = 2.0 or 0.1 M potassium phosphate buffer at pH = 8.0) and 0.2 ml of each buffer for 3 h at 37 °C. In successive digestion test, the peptide was first incubated with pepsin for 3 h, evaporated in a centrifugal concentrator and then incubated for 3 h at 37 °C with both 0.025% (w/v) chymotrypsin and 0.025% (w/v) trypsin. The reactions were then heated for 5 min in boiling water to inactivate the enzyme. After enzymatic treatment, each sample was centrifuged and the supernatant was adjusted to pH = 8.3 and used for the ACE-inhibitory activity determination.

2.10. Inhibitory kinetics study

To clarify the inhibitory mechanism of the most potent peptide (Ala-His-Ser-Tyr) on ACE, different concentrations of the ACE-inhibitory peptide were added to each reaction mixture according to the method of Wu and Ding (2002), with slight modifications. The enzyme activities were measured with different concentrations of the substrate (HHL). ACE inhibitory pattern in the presence of the inhibitor was determined with Lineweaver–Burk plot.

2.11. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Statgraphics Ver. 5.1, professional edition (Manugistics Corp., USA) using ANOVA analysis. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of cuttlefish protein hydrolysates using various digestive proteases

The biological activities of protein hydrolysates depend on the protein substrate, the specificity of the enzyme used for the proteolysis, the conditions used during hydrolysis and the degree of hydrolysis (Kristinsson & Rasco, 2000a; Nielsen, 1999). Since enzymes have specific cleavage positions on polypeptides chains, trypsin, chymotrypsin and crude protease extracts from sardinelle viscera (*S. aurita*), smooth hound intestines (*M. mustelus*) and cuttlefish hepatopancreas (*S. officinalis*) were used to produce peptides with different amino acids sequences and peptides lengths.

The extent of protein degradation by proteolytic enzymes was estimated by assessing the DH. The hydrolysis curves of cuttlefish proteins with the different enzymes after 4 h of incubation are shown in Fig. 1a. The hydrolysis of cuttlefish proteins was characterized by a high rate of hydrolysis for the first 1 h. The rate of enzymatic hydrolysis was subsequently decreased, and then the enzymatic reaction reached the steady-state phase when no apparent hydrolysis took place.

After a 4-h incubation, the higher DH (11.0%) was observed with crude protease extract from smooth hound intestines, followed by crude protease from sardinelle (10%), while the lower DH (7%) was obtained with bovine trypsin and chymotrypsin. The result was in accordance with Kristinsson and Rasco (2000b) who reported that serine proteases from Atlantic salmon (*Salmo salar*) pyloric caeca hydrolyzed the salmon muscle proteins most efficiently than commercial proteases such as Flavourzyme, Corolase and Alcalase.

The crude protease from smooth hound and sardinelle were the most efficient, since these extracts contained multiple proteases which offer the ability to achieve high degree of hydrolysis of

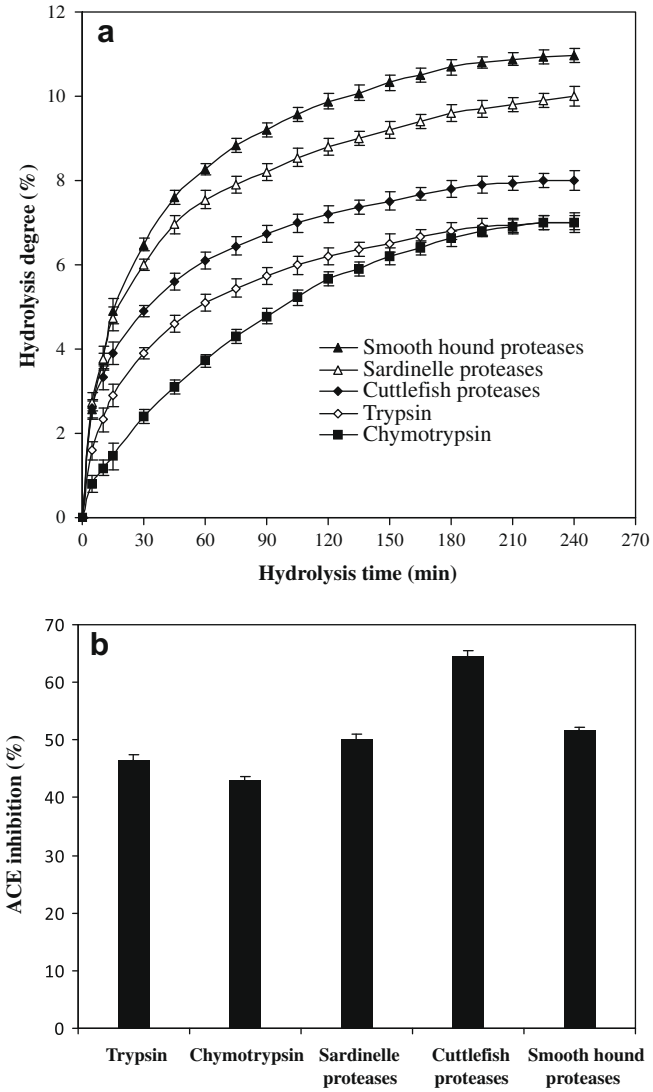


Fig. 1. Hydrolysis curves: (a) and ACE-inhibitory activities (b) of cuttlefish muscle proteins treated with various visceral proteases. Reaction conditions are illustrated in Table 1.

cuttlefish proteins (Ben Khaled et al., 2008; Bougatef et al., in press). In the case of crude protease from cuttlefish hepatopancreas, zymography activity staining revealed the presence of only one band of proteolytic activity (data not shown).

The shape of the hydrolysis curves is typical to those previously reported for muscle proteins of smooth hound (*M. mustelus*) (Bougatef, Hajji, et al., 2009), harp seal (*Phoca groenlandica*) (Shahidi, Synowiecki, & Balejko, 1994), yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) (Klompong, Benjakul, Kantachote, & Shahidi, 2007), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) (Guérard, Dufossé, De La Broise, & Binet, 2001) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Dong et al., 2008).

3.2. ACE-inhibitory activities of cuttlefish muscle protein hydrolysates obtained with various digestive proteases

The hydrolysates obtained after a 4-h incubation with various digestive proteases were then assayed for ACE-inhibitory activity. All protein hydrolysates, at 2 mg of dry weight/ml, showed relatively high ACE-inhibitory activities as shown in Fig. 1b. The highest ACE-inhibitory ($p < 0.05$) activity at 2 mg of dry weight/ml (64.47%) was observed with cuttlefish crude protease hydrolysate, although the DH is lower than those obtained by treatment with sardinelle or smooth hound crude proteases, followed by smooth hound crude protease hydrolysate (51.77%). Chymotryptic hydrolysate exhibited the lowest ACE-inhibitory activity (42.91%). The differences in ACE-inhibitory activities of the hydrolysates might be due to the different molecular weights and different amino acid composition of ACE-inhibitory peptides in the CMPHs.

The obtained results suggest that protein hydrolysates prepared by cuttlefish crude protease possibly contained more potent ACE-inhibitory peptides. The IC_{50} values of all hydrolysates are presented in Table 1. Compared with the previous reported values for shrimp protein hydrolysates ranging from 0.18 to 246.7 mg/ml (He, Chen, Sun, Zhang, & Gao, 2006), the cuttlefish muscle protein hydrolysate had moderate ACE-inhibitory activity.

The effect of hydrolysis degree on ACE-inhibitory activity was also investigated. As shown in Fig. 2, undigested cuttlefish by-products proteins exhibited low ACE-inhibitory activity (about 1.2%). The DH and ACE-inhibitory activity of protein hydrolysate increased with the increase of hydrolysis time. Higher ACE inhibition activity was obtained with a DH of 8%. Further digestion up to a DH value of 8% did not result in an increase in the ACE-inhibitory activity. Therefore, the hydrolysate, which had the most potent ACE-inhibitory activity, was selected for further study.

3.3. Isolation and purification of ACE-inhibitory peptides

The protein hydrolysate, obtained by treatment with crude enzyme from cuttlefish hepatopancreas, which displayed the highest ACE-inhibitory activity, was fractionated on a Sephadex G-25 gel filtration chromatography. As reported in Fig. 3a, there are five major absorbance peaks (P_1–P_5) at 226 nm. Fractions associated with each peak were collected, concentrated by lyophilisation and then evaluated for ACE-inhibitory activity. As shown in Fig. 3b,

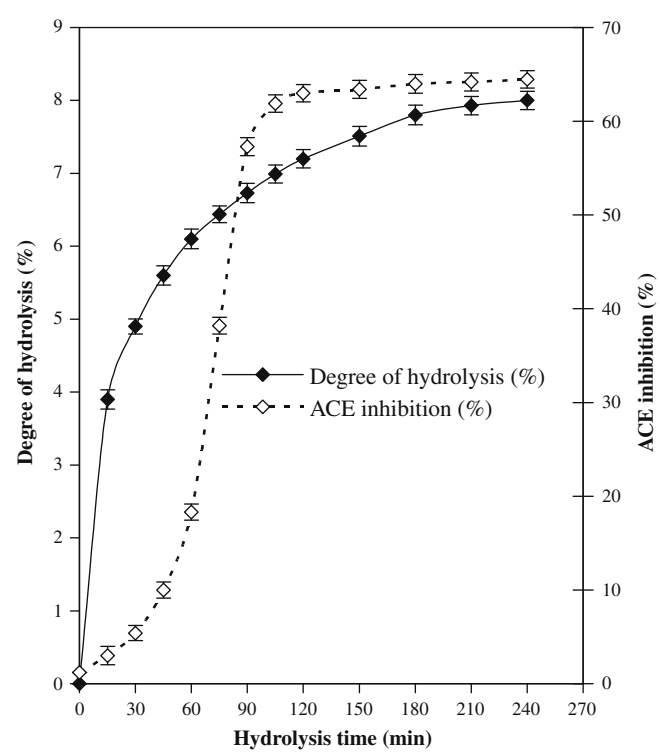


Fig. 2. Comparison of ACE-inhibitory activity and degree of hydrolysis of cuttlefish proteins as a function of hydrolysis time.

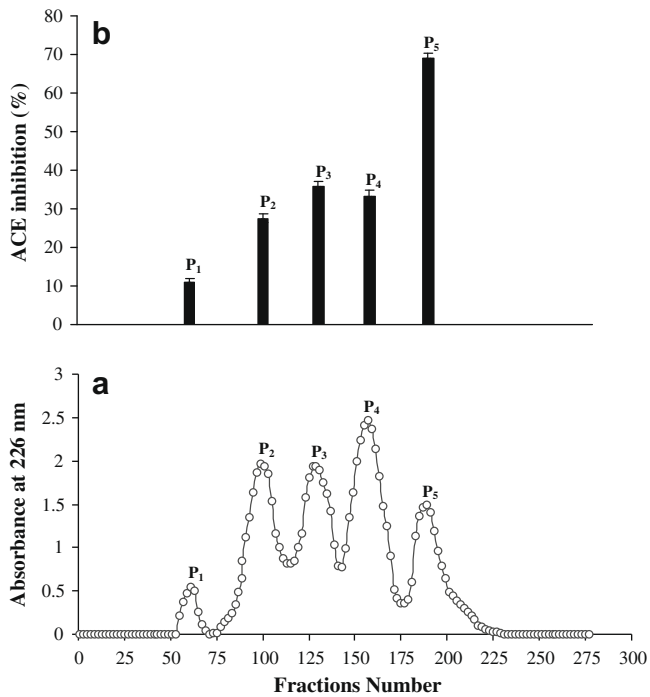


Fig. 3. Gel filtration chromatography of CMPH obtained with proteases extract from cuttlefish hepatopancreas on a Sephadex G-25 (a) and the ACE-inhibitory activities of the separated fractions (P_1–P_5) (b).

ACE-inhibitory activity at 1 mg of dry weight/ml was widely observed in all fractions, and fraction P_5 exhibited the highest activity with an IC_{50} value of 0.39 mg of dry weight/ml. Its yield was 13.09%. The IC_{50} values and yields of the five fractions are shown in Table 2.

Fraction P_5, which displayed the highest ACE-inhibitory activity, was further separated by RP-HPLC on a Vydac C_{18} column and fractionated into nine major sub-fractions ($P_{5\text{-}1}$–$P_{5\text{-}9}$). The elution profile of the peptides is shown in Fig. 4. Fractions were collected separately through repeated chromatography using reversed-phase HPLC column and concentrated in vacuo prior to testing the ACE-inhibitory activities. Only, three peptide fractions showing ACE-inhibitory activity were obtained, and designated *A*, *B* and *C*.

Table 3 shows the summary for the purification of the three ACE-inhibitory peptides from the cuttlefish muscle protein hydrolysate. The most potent ACE inhibitor was purified 440-fold using a two-step purification procedure.

3.4. Identification of the purified ACE-inhibitory peptides

Peptides in sub-fractions *A*–*C* were analysed by ESI–MS for molecular mass determination and ESI–MS/MS for the characterization of peptides. These active fractions were pure. Fig. 5 shows the positive Maldi spectrum of the most active fraction (fraction *B*). The accurate relative molecular mass of the peptide, deduced from the *m*/*z* value of $(M+H)^+$ by subtraction of one mass unit for the attached proton, is 447.2 Da. According to this molecular mass and tandem MS reported in Fig. 6, and the amino acid composition obtained by Picotag amino acid analysis (data not shown), the peptide identified was Val-Tyr-Ala-Pro. This purified peptide displayed the highest ACE-inhibitory activity with an IC_{50} value of 6.1 μM (Table 4).

The molecular masses of the other ACE inhibitors in fractions *A* and *C* from CMPH were estimated to be 407.2 and 491.1 Da, respectively, as determined by ESI–MS. Their amino acid sequences

Table 2
IC_{50} values and yields of fractions separated by gel filtration on a Sephadex G-25 column.

Fractions	Total peptide (mg)	Recovery yield (%)	IC_{50} value (mg of dry weight/ml)
P_1	83.1	8.31	3.86 ± 0.23
P_2	247.4	24.74	1.51 ± 0.17
P_3	192.7	19.27	1.09 ± 0.13
P_4	345.9	34.59	1.23 ± 0.01
P_5	130.9	13.09	0.39 ± 0.08

Table 3
IC_{50} values and purification folds of the three novel ACE-inhibitory peptides.

Purification step	IC_{50} value (mg/ml)	Purification fold
Cuttlefish muscle protein hydrolysate	1.19	1.00
Sephadex G-25 gel chromatography (fraction P_5)	0.39	3.05
RP-HPLC		
Fraction *A*	0.0066	180.30
Fraction *B*	0.0027	440.74
Fraction *C*	0.0042	283.33

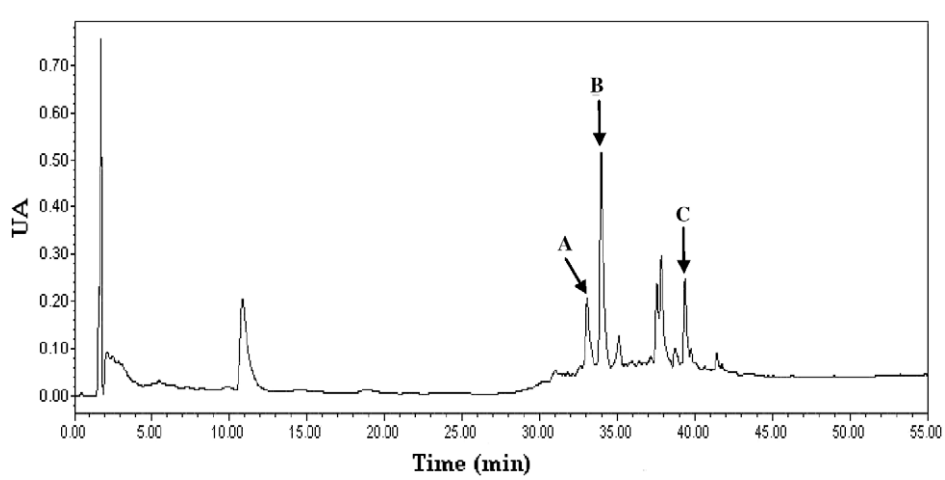


Fig. 4. Reverse-phase HPLC profile of fraction P_5 on a Vydac C_{18} column.

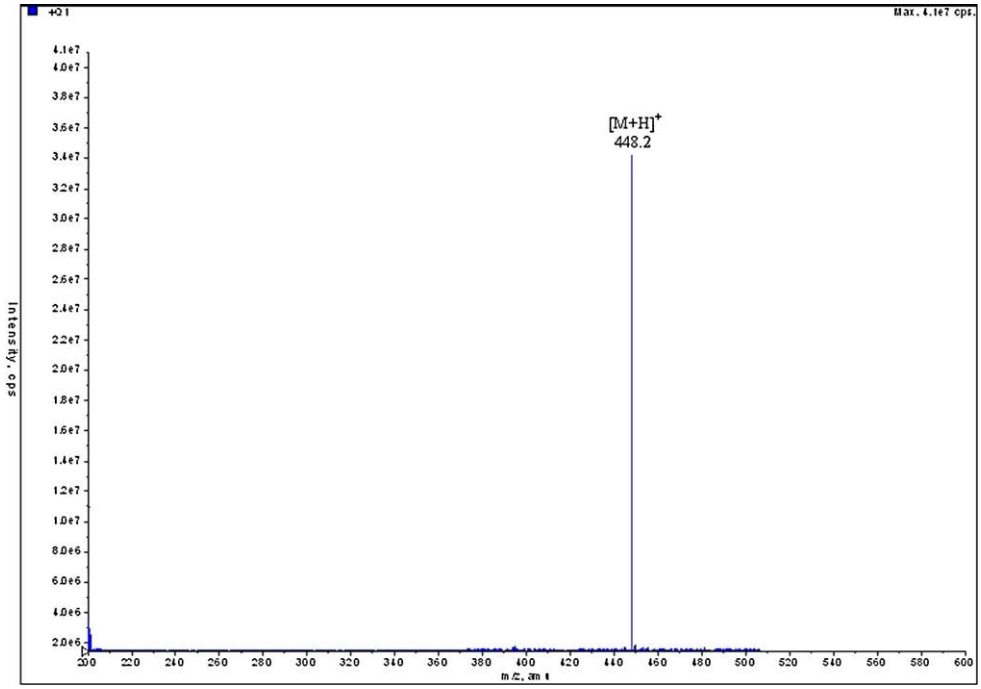


Fig. 5. Mass spectrum of the purified ACE-inhibitory peptide from fraction *B*. The ion at *m*/*z* 448.2 designated as a molecular cation $(M+H)^+$.

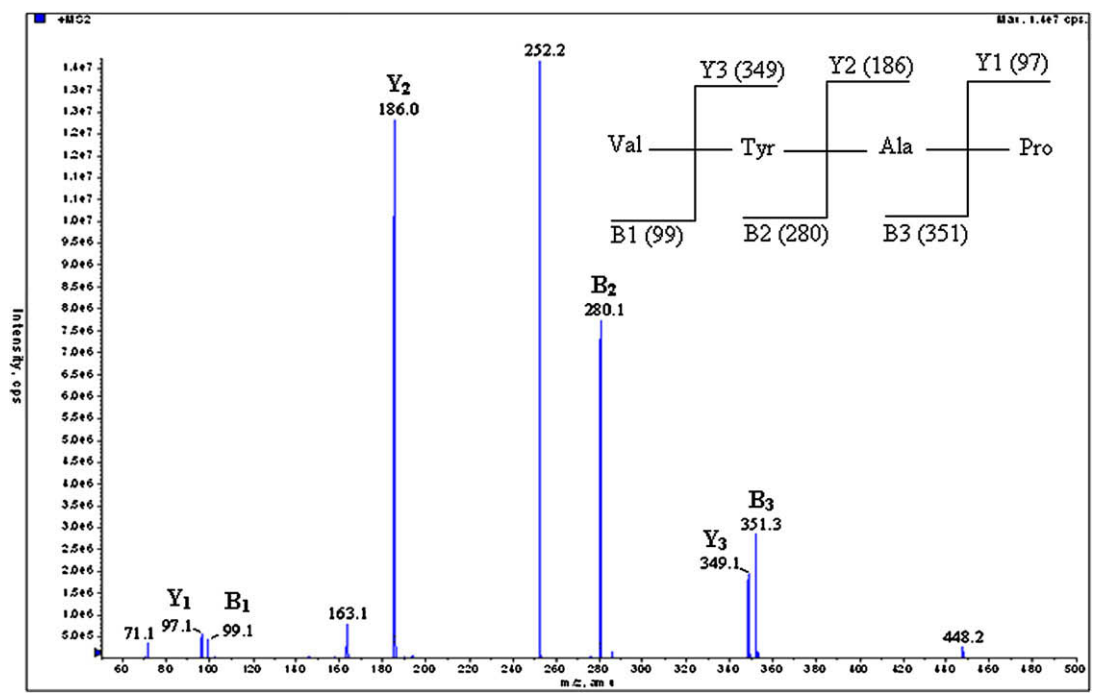


Fig. 6. ESI/MS/MS spectrum of the active fraction *B*. CID spectrum of $(M+H)^+$ ion of peptide Val-Tyr-Ala-Pro.

were Met-Ala-Trp and Val-Ile-Ile-Phe, as determined by MS–MS. All identified peptides are novel peptides with ACE-inhibitory activity that had not been reported.

In general, ACE-inhibitory peptides have a proline or aromatic residue at their C-terminal and a hydrophobic amino acid residue at the N-terminal (Cheung, Wang, Ondetti, Sabo, & Cushman, 1980). Among the N-terminal amino acids of the highly active short-chain peptides, the branched-chain aliphatic amino acids Ile and Val are predominant. Interestingly, the most potent ACE-inhibitory peptide (Val-Tyr-Ala-Pro) derived from cuttlefish muscle protein contains Val at the N-terminal and Pro at the C-terminal. Further, this peptide contains Tyr, an aromatic residue, in its peptide sequence.

3.5. Stability study of the purified peptide

The processing stability of the purified peptides after various temperature treatments is a prerequisite in preparing foods with "functional peptides". To investigate heat-stability of the purified peptides, each peptide was subjected to incubation for 2 h at

Table 4
Amino acids sequences of ACE-inhibitory peptides purified from cuttlefish muscle protein hydrolysate.

Fractions	Mass $(M+H)^+$ (Da)	Sequence	IC_{50} value (μM)
A	407.2	Met-Ala-Trp	16.32
B	448.2	Val-Tyr-Ala-Pro	6.1
C	491.1	Val-Ile-Ile-Phe	8.7

Table 5
ACE-Inhibitory activity of peptides following digestion by gastrointestinal proteases.

Enzyme	Relative ACE-inhibitory activities (%)		
	Met-Ala-Trp	Val-Tyr-Ala-Pro	Val-Ile-Ile-Phe
Control	100	100	100
Pepsin	99.1	99.1	99.7
Trypsin	98.7	98.8	98.0
Chymotrypsin	98.1	99.0	99.4
Pepsin + trypsin + chymotrypsin	97.5	97.9	96.2

temperatures ranging from 4 to 100 °C, and then ACE-inhibitory activities were determined. The results showed that preincubation did not change the inhibitory activity of the purified peptides and IC_{50} values of peptides before and after preincubation were the same (data not shown).

Gastrointestinal enzyme incubation *in vitro* provided an easy process to imitate the fate of these peptides under oral administration. Some ACE inhibitory substances failed to show the hypotensive activity after oral administration *in vivo*, due to the possible hydrolysis of these peptides by ACE or gastrointestinal proteases (Fujita, Yokoyama, & Yoshikaw, 2000; Li, Le, Shi, & Shrestha, 2004). To evaluate the stability of the purified peptides Met-Ala-Trp, Val-Tyr-Ala-Pro and Val-Ile-Ile-Phe under gastrointestinal enzymes digestion, each purified peptide was incubated with various gastrointestinal enzymes, including pepsin, trypsin and chymotrypsin, then subjected to ACE-inhibitory activity assays. The results showed that no apparent change was observed after *in vitro* incubation with gastrointestinal proteases ($p > 0.05$) (Table 5), suggesting that peptides may be resistant to digestion in the gastrointestinal tract, and that the active sequence of the peptide would not be destroyed by these proteases. In addition, peptides were found to be stable after incubation simultaneously with the digestive enzymes. Therefore, these peptides may have a potential antihypertensive effect.

3.6. Determination of ACE inhibition pattern

To clarify the inhibitory mechanism Lineweaver–Burk plots were determined for the three peptides: Met-Ala-Trp, Val-Tyr-Ala-Pro and Val-Ile-Ile-Phe. As shown in Fig. 7, the plots with an intersection on the 1/*S* axis indicate that all peptides are non-competitive inhibitors. This means that the peptide can combine with ACE enzyme molecule to produce a dead-end complex, regardless of whether a substrate molecule is bound or not. Competitive ACE inhibitors have been most frequently reported, and some non-competitive inhibitors have also been found in food such as chickpea (Pedroche et al., 2002), sardine (Matsufuji et al., 1994), oyster (Wang et al., 2008), and tuna (Qian, Je, & Kim, 2007). However, the inhibition site on ACE of these no-competitive inhibitors has not previously been investigated.

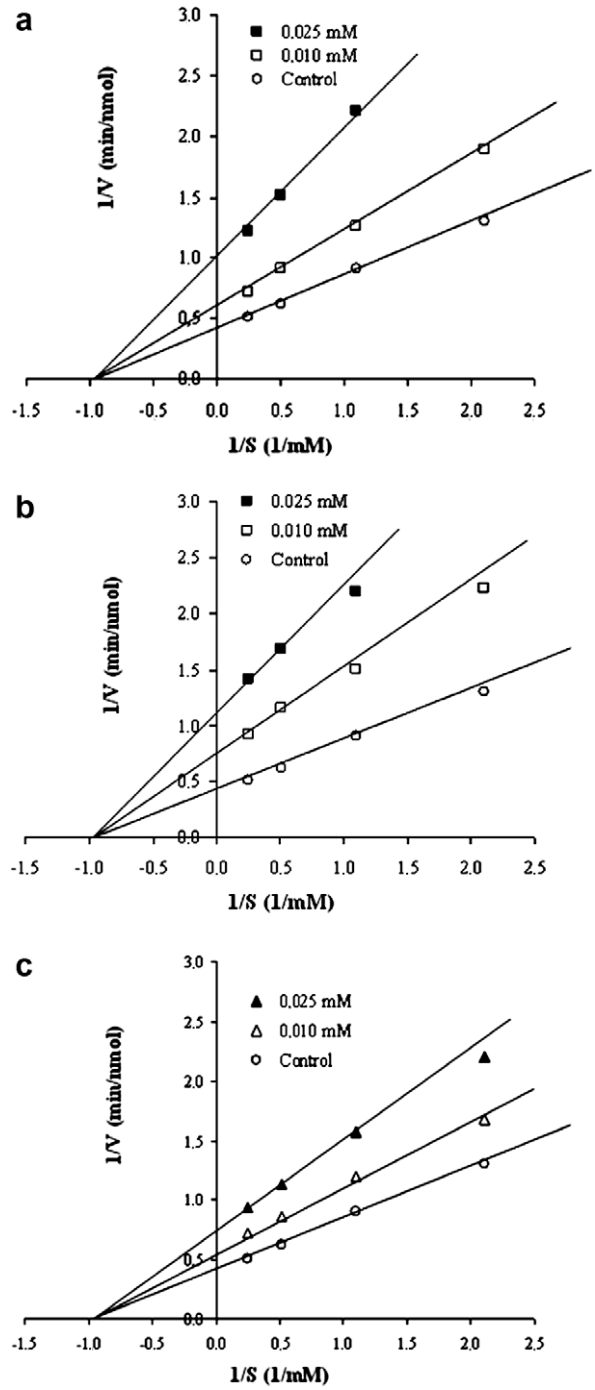


Fig. 7. Lineweaver–Burk plots of ACE inhibition by the purified peptides: (a) Met-Ala-Trp, (b) Val-Tyr-Ala-Pro and (c) Val-Ile-Ile-Phe. The ACE activities were measured in the presence or absence of the purified peptides. 1/*V* and 1/*S* represent the reciprocal velocity and substrate, respectively.

4. Conclusion

In the present study, cuttlefish muscle protein hydrolysates obtained by treatment with various digestive proteases were found to possess ACE-inhibitory activity. Three ACE-inhibitory peptides Val-Tyr-Ala-Pro, Val-Ile-Ile-Phe and Met-Ala-Trp were purified from the CMPH prepared with endogenous proteases from the same species using size exclusion chromatography and RP-HPLC. These results suggest that the cuttlefish (*S. officinalis*) muscle could be used as a source of ACE I inhibitory peptides after hydrolysis with gastrointestinal enzymes.

The role of these ACE-inhibitory peptides in spontaneously hypertensive rats should be further investigated.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Mostafa Kouach and Dr. Gilbert Briand "Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse, Service Commun de Physicochimie, Faculté de Médecine Lille II, France" for analysis of peptide sequences. This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia.

References

Adler-Nissen, J. (1986). A review of food hydrolysis specific areas. In J. Adler-Nissen (Ed.), *Enzymic hydrolysis of food proteins* (pp. 57–109). Copenhagen, Denmark: Elsevier Applied Science Publishers.

Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, S., & Itoh, M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeleta muscle proteins. *Meat Science, 57*, 319–324.

Balti, R., Barkia, A., Bougatef, A., Ktari, N., & Nasri, M. (2009). Heat-stable trypsin from cuttlefish (*Sepia officinalis*) hepatopancreas: Purification and characterization. *Food Chemistry, 113*, 146–154.

Ben Khaled, H., Bougatef, A., Balti, R., Triki-Ellouz, Y., Souissi, N., & Nasri, M. (2008). Isolation and characterisation of trypsin from sardinelle (*Sardinella aurita*) viscera. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 8*, 2654–2662.

Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L., Napier, J. R., & Hancock, W. S. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 336*, 93–104.

Bougatef, A., Balti, R., Jellouli, K., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2008). Trypsin-like protease from the intestine of smooth hound (*Mustelus mustelus*). Purification and characterization. In M. Nasri (Ed.), *Recent research developments in food by-products technology and biotechnology* (pp. 1–18). Research Signopost. ISBN: 978-81-308-0259-6.

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*, 1198–1205.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., et al. (2008). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine-proteases. *Food Chemistry, 111*, 350–356.

Bougatef, A., Ravallec, R., Nedjar-Arroume, N., Barkia A., Guillochon, D., & Nasri, M. (in press). Evidence of in vivo satietogen effect and control of food intake of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysate in rats. *Journal of Functional Food*. doi:10.1016/j.jff.2009.11.001.

Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. A., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of ACE. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry, 255*, 401–407.

Chockalingam, A. (2008). World hypertension day and global awareness. *The Canadian Journal of Cardiology, 24*, 441–444.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry, 107*, 1485–1493.

Fujita, H., Yokoyama, K., & Yoshikaw, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food protein. *Journal of Food Science, 65*, 564–569.

Fujita, H., & Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology, 44*, 123–127.

Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., & Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology, 66*, 3898–3904.

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, 11*, 1051–1059.

Guo, Y., Pan, D., & Tanokura, M. (2009). Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry, 114*, 328–333.

He, H. L., Chen, X. L., Sun, C. Y., Zhang, Y. Z., & Gao, P. J. (2006). Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresource Technology, 97*, 385–390.

Je, J. Y., Park, J. Y., Jung, W. K., Park, P. J., & Kim, S. K. (2005). Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chemistry, 90*, 809–814.

Jérôme, T., Laurent, M., & Jean-Luc, G. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysates of bovine α2-casein. *FEBS Letters, 531*, 369–374.

Khantaphant, S., & Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology B, 151*, 410–419.

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*, 1317–1327.

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000a). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40*, 43–81.

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000b). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*, 657–666.

Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S., Takeda, Y., & Yasuda, M. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 67*, 1278–1283.

Lawes, C. M. M., Horrn, S. V., & Rodgers, A. (2008). Global burden of blood-pressure-related disease. *Lancet, 371*, 1513–1518.

Lee, S. H., Qian, Z. J., & Kim, S. K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry, 118*, 96–102.

Li, G. H., Le, G. W., Liu, H., & Shi, Y. H. (2005). Mung-bean protein hydrolysates obtained with Alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International, 11*, 281–287.

Li, G. H., Le, G. W., Shi, Y. H., & Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research, 24*, 469–486.

Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., & Osajima, Y. (1994). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 58*, 2244–2245.

Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal, 8*, 363–373.

Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I-converting-enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science, 78*, 777–783.

Nielsen, P. M. (1999). Functionality of protein hydrolysates. In S. Damodaran & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 444–446). New York: Marcel Dekker.

Pedroche, J., Yust, M. M., Giron-Galle, J., Alaiz, M., Millan, F., & Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 82*, 960–965.

Qian, Z. J., Je, J. Y., & Kim, S. K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 8398–8403.

Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2009). ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry, 117*, 582–588.

Rober, M. C., Razaname, A., Mutter, M., & Juillerat, M. A. (2004). Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 6923–6931.

Shahidi, F., Synowiecki, J., & Balejko, J. (1994). Proteolytic hydrolysis of muscle proteins of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*, 2634–2638.

Sugiyama, K., Takada, K., Egawa, M., Yamamoto, L., Onzuka, H., & Oba, K. (1991). Hypotensive effect of fish protein hydrolysates. *Nippon Nogeikagaku Kaishi, 65*, 35–43.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition, 92*, 357–366.

Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Dua, Y., Miyaguchi, Y., et al. (2008). Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry, 111*, 302–308.

Wu, J., & Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International, 35*, 367–375.

Yoshii, H., Tachi, N., Ohba, R., Sakamura, O., Takeyama, H., & Itani, T. (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology C, 128*, 27–33.

Chapitre III :

Etude des propriétés fonctionnelles et biologiques des hydrolysats protéiques de la seiche commune

Article 6:

Balti R, Bougatef A, El-Hadj Ali N, Zekri D, Barkia A and 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, 2006-2014.

Article 7:

Balti R, Bougatef A, El-Hadj Ali N, Ktari N, Jellouli K, Nedjar-Arroume N, Dhulster P and Nasri M. **(2011)**. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases. *Journal of Amino Acids*, in press.

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont écartées par les industries de transformation de produits de la pêche. Sachant qu'en même temps, les industriels sont obligés de traiter leurs déchets avant de les jeter. Ainsi, pour répondre aux besoins de l'industrie, il est nécessaire d'adopter une stratégie de récupération et de modification des protéines présentes dans les sous-produits halieutiques afin de les utiliser comme ingrédients dans les produits alimentaires. Toutefois, le développement de procédés de récupération des protéines ainsi que leur utilisation doit être plus économique que de traiter les déchets. En appliquant les technologies d'hydrolyse enzymatique pour cette récupération, il serait possible de produire une grande variété de produits. L'hydrolyse des protéines peut être soit chimique (acide ou basique), soit biochimique par hydrolyse enzymatique (autolyse ou par l'addition d'enzymes exogènes).

Parmi les techniques modernes de valorisation de protéines, l'emploi d'enzymes, notamment les protéases, connaît un succès considérable. Ce procédé permet une meilleure solubilisation des protéines sous forme d'hydrolysats protéiques. C'est un procédé moins onéreux et relativement facile à maîtriser, aboutissant à l'obtention de produits possédant des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles particulièrement intéressantes pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Liceaga et Li-Chan, 1999 ; Kristinsson et Rasco, 2000a,b ; Liaset *et al*., 2000 ; 2003).

Lorsqu'elles subissent une hydrolyse enzymatique avec des protéases, les protéines sont alors clivées en peptides. L'action des enzymes sur la formation de peptides est prépondérante puisqu'elles vont jouer sur la taille et la fonction des peptides générés lors de l'hydrolyse. En effet, les modifications apportées sont souvent requises pour la production de composés possédant des propriétés plus désirables qui pourraient par exemple entrer dans la formulation de produits alimentaires (Quaglia et Orban, 1987b).

La digestion enzymatique des protéines de produits d'origine marine est susceptible de libérer des peptides possédant une action biologique. Plusieurs peptides de poissons, d'algues ou de crustacés ont été isolés. De nombreuses activités ont été mises en évidence, en particulier concernant la prévention des complications cardio-vasculaires et métaboliques de l'obésité (diminution de la tension artérielle, de la peroxydation, de la coagulation, du cholestérol), mais aussi le renforcement des défenses contre l'infection, la prévention du cancer. Les protéines et les peptides présentent des effets distincts des autres sources azotées sur les sécrétions digestives et la satiété. Des études cliniques sont maintenant nécessaires pour confirmer ces résultats la plupart du temps obtenus par des études expérimentales.

La plupart des composés biologiquement actifs identifiés jusqu'à maintenant, sont des petits peptides (ou oligopeptides), dont la taille varie de 2 à 10 résidus acides aminés. Leur résorption au niveau de l'appareil digestif est dépendante de leurs tailles ainsi que de leurs propriétés hydrophiles/hydrophobes. Leur effet peut être local ou systémique, impliquant dans ce dernier cas leur résorption au niveau gastro-intestinal et leur distribution vers un organe ou tissu via la circulation sanguine.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs hydrolysats douée d'activité biologique ont été élaborés à partir des protéines agro-alimentaires d'origine animale (caséines : Tauzin *et al.*, 2002 ; protéines du lactosérum : Schlimme et Meisel, 1995 ; œufs : Fujita *et al*., 2000, Yoshii *et al*., 2001 ; hémoglobine bovine : Yaba Adjé *et al.*, 2011a,b) et végétales (maïs : Dziuba *et al*.,1995 ; pois chiches : Yust *et al.*, 2003 ; ou de RubisCO de tabac : Yang *et al*., 2001). Les principales activités biologiques caractérisées à ce jour sont de type immunomodulatrices (Mercier *et al.*, 2004), antithrombiques (Bouhallab et Touzé, 1995), opioïdes (Schlimme et Meisel, 1995), antimicrobiennes (Froidevaux *et al*., 2001, Nedjar Arroume *et al*., 2006, 2008), antihypertensives (Marczack *et al.*, 2003) et secrétagogue (Ravallec-Plé *et al*., 2000).

Au cours de ce chapitre, les co-produits (peau et viscères) et le muscle de la seiche commune (*S. officinalis*) ont été utilisés comme source de protéines pour la préparation d'hydrolysats protéiques et la mise en évidence des activités antioxydantes et antihypertensives. Egalement, les compositions physico-chimiques ainsi que certaines propriétés fonctionnelles ont été étudiées.

Influence du degré d'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles et l'activité antihypertensive des hydrolysats protéiques préparés à partir des co-produits de la seiche commune (*Sepia officinalis*)

Rafik Balti, Ali Bougatef, Nedra El-Hadj Ali, Dorra Zekri, Ahmed Barkia, Moncef Nasri

Les avancées scientifiques sur la composition chimique des co-produits et en particulier sur le processus d'hydrolyse enzymatique laissent entrevoir de nouvelles voies de valorisation à plus forte valeur ajoutée. Les hydrolysats de protéines de poisson peuvent être déshydratés pour obtenir une poudre contenant une forte teneur en protéines et présentant comparativement aux concentrés de protéines de poisson une meilleure stabilité, de meilleures propriétés fonctionnelles, une meilleure solubilité dans l'eau et des propriétés émulsifiantes améliorées. Le présent travail s'inscrit dans le cadre général de la valorisation des sous-produits de la pêche et porte essentiellement sur la transformation des déchets de la seiche commune (*S. officinalis*) en hydrolysats protéiques ou en peptones ayant des propriétés fonctionnelles et biologiques améliorées en utilisant l'extrait enzymatique de *Bacillus licheniformis* NH1.

La cinétique d'hydrolyse enzymatique des déchets de la seiche commune est caractérisée par une phase initiale rapide, durant laquelle un grand nombre de liaisons peptidiques est hydrolysé, après cette phase le DH tend à se stabiliser. Le DH final obtenu par la préparation enzymatique de *B. licheniformis* NH1 est de l'ordre de 13,5 %. Afin d'élargir le champ d'application de produits élaborés, trois hydrolysats protéiques de déchets de la seiche commune ayant des DH de 5 %; 10 % et 13,5 % ont été préparés et nommés respectivement $HPDS_1$, $HPDS_2$ et $HPDS_3$ par cette préparation.

En général, la composition physico-chimique des hydrolysats protéiques (HP) est très variable. Cette variation est étroitement liée au mode de préparation, à la matière première et aux enzymes protéolytiques utilisées. L'hydrolyse de déchets de la seiche commune est réalisée à 50 °C et à pH 10,0 avec un ratio enzyme/substrat de l'ordre de 0,5 U/mg de protéine. Les teneurs des principaux constituants (protéines, matières grasses, cendres et eau) des déchets de la seiche non hydrolysés (DSN) ainsi que des HPDS à différents DH ont été déterminées. L'étude comparative de la composition des différentes HPDS a montrée que ces derniers présentent approximativement la même composition. En effet, ils possèdent une teneur en protéine qui dépasse 75 % et une faible humidité (< 3 %), cette dernière

caractéristique contribue à la stabilité et la conservation du produit. La teneur en matière grasse est relativement élevée qui est comprise entre 2,8 % et 3,1 %.

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 des peptides à partir des HP. Elle donne des renseignements sur l'hydrophobie et l'hydrophilie de leurs composants. L'analyse des trois HPDS a montrée des profils peptidiques différents. En effet, le nombre de pics détectés par RP-HPLC donne une idée sur l'hétérogénéité des HPDS. 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 des trois HPDS peuvent être subdivisés en trois catégories d'hydrophobicité des peptides élués : faible, moyenne et élevée. L'hydrolysat protéique des déchets de la seiche commune préparé à DH 5% ($HPDS_1$) a présenté une concentration élevée en peptides moyennement hydrophobes et une faible concentration en peptides à faible hydrophobicité comparé aux $HPDS_2$ et $HPDS_3$.

Généralement, 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 degré d'hydrolyse des protéines, la nature de la protéine et de l'enzyme utilisée, etc. La solubilité est l'une des plus importantes propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des hydrolysats protéiques. Des études ont montré que l'augmentation de la solubilité est proportionnelle à l'augmentation du degré d'hydrolyse. L'étude de la solubilité des HPDS dans une gamme de pH allant de 3,0 à 10,0 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 98 % pour $HPDS_3$, 91 % pour $HPDS_2$ et 70 % pour $HPDS_1$ à pH 7,0, alors qu'elle ne dépasse pas 20 % à pH 4,0 pour les protéines non hydrolysés. L'hydrolyse enzymatique crée un changement structural des protéines par la génération de peptides de taille variable et ayant une solubilité beaucoup plus importante que celle des protéines intactes.

Les propriétés émulsifiantes des hydrolysats protéiques sont très sensibles à la variation du DH. Généralement, une hydrolyse poussée se manifeste par une perte des propriétés émulsifiantes. Au cours de cette étude, on a noté que l'évolution de la capacité émulsifiante est inversement proportionnelle à l'augmentation du degré d'hydrolyse. En effet, l'habilité de la $HPDS_1$ à former une émulsion est trois fois moins importante que celle de $HPDS_2$ et $HPDS_3$ ceci pourrait être expliqué par la nature des peptides générés à partir des protéines de déchets de la seiche. La diminution de la capacité émulsifiante des HPDS est due

essentiellement à la réduction de la charge des peptides. A pH 4,0 l'émulsion est faible, ceci pourrait être dû à la faible solubilité des HPDS à ce pH.

L'une des propriétés de surface des protéines se manifeste par la formation de mousse. La qualité de la mousse dépend de l'importance de son volume et de sa stabilité. La mousse est définie comme un système biphasique composé de bulles d'air entourées d'une phase liquide. Les mousses sont recherchées dans plusieurs applications telles que l'alimentation et les produits cosmétiques. Elles sont formées et stabilisées dans plusieurs cas par l'addition de protéines et de surfactants. Les protéines sont utilisées à leur état natif ou après modification par hydrolyse enzymatique. Ces modifications consistent en l'amélioration de certaines caractéristiques physico-chimiques des protéines pour augmenter leur capacité à former la mousse. Dans ce cadre, le pouvoir moussant (PM) des HPDS a été déterminé à pH 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 et 10,0. D'après les résultats obtenus, tous les HPDS possèdent des pouvoirs moussant nettement supérieurs à celui de DSN. $HPDS_1$, dont le DH est de l'ordre 5 % présente le PM le plus élevé (80 %) qui dépasse même celui des protéines natives des déchets de la seiche commune (63,6 %) à pH 4,0. Ceci pourrait être expliqué par l'hydrolyse partielle des protéines, les peptides générés sont plus flexibles en formant rapidement une couche interfaçiale stable et augmentant ainsi le pourcentage de diffusion à l'interface. Ceci permet une meilleure incorporation de l'air et une diminution de la tension interfaçiale améliorant ainsi les propriétés de la mousse, par contre l'extension de l'hydrolyse affecte ces propriétés.

En effet, il a été démontré aussi que la formation de la mousse diminue légèrement avec l'augmentation du DH à différent pH testés. Cette différence pourrait être attribuée au faible poids moléculaire des peptides qui retardent la formation d'un film stable entourant les bulles de gaz. Nous avons également étudié la stabilité de la mousse (SM) en fonction de pH. Les résultats ont montré que la stabilité diminue en augmentant le DH sauf pour le pH 8,0. Nos résultats sont en accord avec ceux de décrits pour d'autres hydrolysats de protéines d'origine marine.

La capacité de rétention d'huile des hydrolysats protéiques est une propriété fonctionnelle très intéressante pour les industries de viandes, de confiseries et de pâtisseries. Les capacités de rétention d'huile des HPDS élaborés ont été déterminées et comparées à celle de la caséine. Les résultats obtenus ont monté que tous les HPDS possèdent des excellentes capacités d'absorption d'huile. Il a été aussi prouvé qu'il y a une corrélation entre l'absorption d'huile et le degré d'hydrolyse. En effet, le $HPDS_1$ présente la meilleure capacité de rétention d'huile (1,97 ml/g) alors que $HPDS_3$ (1,81 ml huile/g) a présenté la capacité la plus faible par rapport aux $HPDS_2$ (1,87 ml/g) et $HPDS_1$. Toutefois, l'absorption d'huile par $HPDS_3$ est plus

importante que celle de DSN (1,224 ml/g) et de la caséine (1,4 ml/g), protéine alimentaire de référence.

La capacité de rétention d'eau influence les propriétés rhéologiques du système. Le changement de pouvoir de rétention d'eau dépend de la nature de l'enzyme, du traitement thermique appliqué à la matière première et du pH de l'hydrolyse. L'étude de la capacité de rétention d'eau par les différentes HPDS élaborés a montré une augmentation proportionnelle au DH. $HPDS_3$ possède une capacité de rétention d'eau (5,5 ml/g) significativement supérieure à celle obtenue par DSN (2,5 ml/g), utilisé comme contrôle. Cette augmentation de la capacité de rétention d'eau en fonction de DH pourrait être expliquée par l'exposition progressive des groupements polaires (-COOH et $-NH_2$) au cours de l'hydrolyse enzymatique.

Des travaux récents ont montré que les hydrolysats de protéines d'origine marine constituent une source potentielle de peptides bioactifs dotés de propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antihypertensives, etc. Dans le cadre d'une étude sur la production d'hydrolysats peptidiques potentiellement actifs, nous nous sommes proposé de mettre en évidence la présence d'activité antihypertensive *in vitro* dans les différents HPDS. Les résultats ont montré que l'hydrolyse par les protéases de *B. licheniformis* NH1 permet de générer des hydrolysats peptidiques doués d'une activité antihypertensive *in vitro* qui est presque absente dans le DSN. L'activité antihypertensive *in vitro* augmente avec le DH pour atteindre une valeur de l'ordre de 79,78 % pour $HPDS_3$. Cet hydrolysat possède une CI_{50} de l'ordre de 1 mg/ml.

Afin de d'obtenir des fractions actives voir même purifier et identifier le ou les peptides antihypertensifs, l'$HPDS_3$ a été fractionné sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25. Cinq fractions majoritaires ont été obtenues. Le test de l'activité antihypertensive a montré que la fraction 1 présente l'activité la plus importante qui est de l'ordre de 60,3 %.

Article 6:

Influence of enzymatic hydrolysis extent on the functional properties and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) by products.

Balti Rafik, Bougatef Ali, El-Hadj Ali Nedra, Zekri Dorra, Barkia Ahmad & Nasri Moncef (2010). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2006-2014.

Research Article

Received: 5 February 2010 Revised: 17 May 2010 Accepted: 18 May 2010 Published online in Wiley Interscience: 25 June 2010

(www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/jsfa.4045

Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products

Rafik Balti, Ali Bougatef, Nedra El-Hadj Ali, Dorra Zekri, Ahmed Barkia and Moncef Nasri*

Abstract

BACKGROUND: In Tunisia the cuttlefish-processing industry generates large amounts of solid wastes. These wastes, which may represent 35% of the original material and constitute an important source of proteins, are discarded without any attempt at recovery. This paper describes some functional properties and the angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of protein hydrolysates prepared by hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products with crude enzyme extract from *Bacillus licheniformis* NH1.

RESULTS: Cuttlefish by-product protein hydrolysates (CPHs) with different degrees of hydrolysis (DH 5, 10 and 13.5%) were prepared. All CPHs contained 750–790 g kg^{-1} proteins. Solubility, emulsifying capacity and water-holding capacity increased while fat absorption and foaming capacity decreased with increasing DH. All hydrolysates showed greater fat absorption than the water-soluble fraction from undigested cuttlefish by-product proteins and casein. CPHs were also analysed for their ACE-inhibitory activity. CPH3 (DH 13.5%) displayed the highest ACE inhibition (79%), with an IC_{50} value of 1 mg mL^{-1}.

CONCLUSION: Hydrolysis of cuttlefish by-product proteins with alkaline proteases from *B. licheniformis* resulted in a product with excellent solubility over a wide pH range and high ACE-inhibitory activity. This study suggests that CPHs could be utilised to develop functional foods for prevention of hypertension.
© 2010 Society of Chemical Industry

Keywords: cuttlefish by-product hydrolysates; *Sepia officinalis*; functional properties; angiotensin I-converting enzyme inhibitor; enzymatic hydrolysis

INTRODUCTION

Fish-processing by-products are commonly recognised as low-value resources with negligible market value. Additionally, their inappropriate disposal is a major cause of environmental pollution. Traditionally, fish-processing by-products have been converted to powdered fish flour for animal feed,[1] fertiliser and fish silage. However, most of these products are of low economic value. Novel processing methods are needed to convert underutilised species and by-products into more profitable and marketable products.

Many of these protein-rich by-products have a wide range of dynamic properties[2] and can potentially be used in foods as binders, emulsifiers and gelling agents. The application of enzyme technology to recover and modify fish proteins may produce a broad spectrum of food ingredients and industrial products for a wide range of applications. The enzymatic treatment of proteins generates peptides and amino acids, which can modify the biological and functional characteristics of the proteins and improve their quality,[3] and offers interesting opportunities for food applications. The biological activities and functional characteristics of peptides depend on their molecular size and structure and specific amino acids.[4] However, in some cases, extensive enzymatic hydrolysis may, on the contrary, impair some functional properties of food proteins or even cause off-flavours in the corresponding hydrolysates. The biological and functional properties of fish protein hydrolysates may be improved by the use of specific enzymes and by choosing a defined set of hydrolysis conditions such as time, pH and temperature to partially hydrolyse the proteins to the desired extent.[5]

In addition to their nutritional properties, protein hydrolysates from various sources have been found to possess biological

* *Correspondence to: Moncef Nasri, Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP 1173, 3038 Sfax, Tunisia. E-mail: moncef.nasri@enis.rnu.tn*

Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, BP 1173, 3038 Sfax, Tunisia

 © 2010 Society of Chemical Industry

activities such as antioxidant activity,[6–9] angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity,[10–14] etc. These functions are attributed to bioactive peptides, inactive within the sequence of parent proteins, which are released by enzymatic hydrolysis *in vivo* by digestive enzymes or *in vitro*. In particular, ACE-inhibitory peptides have recently received much attention in relation to the development of functional foods that contribute to homeostasis of the human body.[15]

Therefore the objective of the present study was to produce several protein hydrolysates from cuttlefish by-products with different degrees of hydrolysis using crude enzyme extract from *Bacillus licheniformis* NH1 and to investigate their functionality in terms of solubility, emulsifying and foaming properties. The ACE-inhibitory activity of the cuttlefish by-product protein hydrolysates (CPHs) was also studied.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

ACE (EC 3.4.15.1) extracted from rabbit lung and the ACE synthetic substrate hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was obtained from Fluka BioChemica (Buchs, Swizerland). Other chemicals and reagents used were of analytical grade.

Cuttlefish by-products

Cuttlefish by-products (skin and viscera) were obtained from IMPEX (Sfax, Tunisia). They were washed twice with water to eliminate the dark ink, which consists of a suspension of melanin granules in a viscous colourless medium, and then stored in sealed plastic bags at −20 °C for later use.

Enzyme

The crude enzyme preparation from *B. licheniformis* NH1 (4000 U mL^{-1}) was used for the production of hydrolysates.[16] Protease activity was determined according to the method of Kembhavi *et al.*[17] using casein as substrate. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µg tyrosine min^{-1} under the experimental conditions used.

Preparation of CPHs

Cuttlefish by-products (500 g) were first minced in a grinder (Charlotte HV3, Moulinex, Ecully, France) and then cooked at 90 °C for 15 min to inactivate endogenous enzymes. The cooked by-product sample was mixed with an equal amount of distilled water and homogenised in a Moulinex blender for about 2 min. The pH of the mixture was adjusted to the optimal value for enzyme activity. The hydrolysis was performed at pH 10 and 50 °C. The enzyme was added to the reaction to give an enzyme/substrate ratio of 0.5 U mg^{-1} protein. During the reaction the pH was maintained at the desired value by addition of 2 mol L^{-1} NaOH. After the required digestion time the reaction was stopped by heating the solution at 90 °C for 15 min to inactivate the enzyme. The cuttlefish by-product hydrolysate was centrifuged at 8500 × *g* for 30 min to separate insoluble and soluble fractions. Finally, the soluble phase was dried at 105 °C for 2 h.

Estimation of degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH), defined as the percentage ratio of the number of peptide bonds broken (h) to the total number of peptide bonds in the substrate studied (h_{tot}), was calculated in each case from the amount of base added to keep the pH constant during the hydrolysis,[18] as follows:

$$\begin{aligned} \mathrm{DH}\ (\%) &= (h/h_{tot}) \times 100 \\ &= (BN_b/M_p) \times (1/\alpha) \times (1/h_{tot}) \times 100 \end{aligned}$$

where B (mL) is the amount of base consumed to keep the pH constant during the reaction, N_b is the normality of the base, M_p (g) is the mass of protein (N × 6.25) and α is the average degree of dissociation of the α-NH_2 groups released during hydrolysis, expressed as

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

where pH and pK are the values at which the proteolysis was conducted. The total number of peptide bonds (h_{tot}) in the fish protein concentrate was assumed to be 8.6 meq g^{-1}.[18]

Chemical analysis

Moisture, fat and ash contents of CPHs were determined according to AOAC methods 930.15, 922.06 and 942.05 respectively.[19] Total nitrogen content was determined by Kjeldahl nitrogen analysis according to AOAC method 991.20.[19] Total crude protein content was estimated as total nitrogen content × 6.25. All measurements were performed in triplicate.

Analysis of CPHs by reverse phase high-performance liquid chromatography

The hydrophobicity of peptides from CPHs was determined using reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC; LC-10, Shimadzu, Kyoto, Japan). Peptide mixtures filtered at 0.22 µm were separated on a Shimadzu LC-10 C_{18} Eurosphère-100 column (250 mm × 8 mm). The column was equilibrated with solvent A (1 mL L^{-1} trifluoroacetic acid in ultrapure water) and peptides were eluted with a linear increase in solvent B (1 mL L^{-1} trifluoroacetic acid in acetonitrile) from 0% at 0 min to 80% at 60 min. The flow rate was 0.6 mL min^{-1}. The elution was monitored at 214 nm using a UV–visible spectrophotometer (Cecil CE 2021, Lab Equip Instruments Ltd, Ontario, Canada).

Solubility

Solubility of CPHs and undigested cuttlefish by-product proteins (UCP) was determined over a range of pH values from 3 to 10 as described by Tsumura *et al.*[20] with slight modifications. Briefly, 1 g of each sample was dissolved in 100 mL of distilled water and the pH was adjusted using 1 mol L^{-1} HCl or NaOH solution. The solution was stirred at room temperature (25 ± 1 °C) for 10 min and then centrifuged at 8000 × *g* for 10 min. After appropriate dilution the nitrogen content in the supernatant was determined by the biuret method.[21] The solubility of CPHs, defined as the amount of soluble nitrogen from the total nitrogen, was calculated as follows:

$$\text{nitrogen solubility (\%)} = \left(\frac{\text{supernatant nitrogen concentration}}{\text{sample nitrogen concentration}}\right) \times 100$$

Solubility analysis was carried out in duplicate.

 © 2010 Society of Chemical Industry

Foaming capacity and foam stability

Foaming capacity and foam stability of CPHs were determined according to the method of Lawhon *et al.*[22] with slight modifications. The sample (3 g) was dispersed in 100 mL of distilled water and the pH was adjusted to 2, 4, 6, 8 or 10. The mixture was homogenised in a Moulinex R62 homogeniser at room temperature (25 °C) for 2 min. The whipped sample was then immediately transferred into a 250 mL graduated cylinder and the total volume was read after 30 s. Foam expansion was expressed as the percentage increase in volume after homogenisation. Foaming capacity was calculated as

$$\text{foaming capacity (\%)} = [(A - B)/B] \times 100$$

where A (mL) is the volume after whipping and B (mL) is the volume before whipping. Foam stability (%) was calculated as the percentage volume of foam remaining after 3 min. The analysis was conducted in triplicate.

Emulsifying properties

Emulsifying properties were determined according to the method of Pearce and Kinsella.[23] Vegetable oil (10 mL) and 30 mL of 10 g L^{-1} CPH solution were mixed and the pH was adjusted to 2, 4, 6, 8 or 10. The mixture was homogenised for 3 min. Aliquots (50 µL) of the emulsion were pipetted immediately and mixed with 5 mL of 1 g L^{-1} SDS solution. The absorbance of the diluted solution at 500 nm was measured using a UV–visible spectrophotometer (Cecil CE 2021, Lab Equip Instruments Ltd). The absorbance measured immediately after emulsion formation (A_{500}) was used to calculate the emulsifying activity index (EAI) as follows:[23]

$$\text{EAI}(\text{m}^2\ \text{g}^{-1}) = (2 \times 2.303 \times A_{500})/[0.25 \times \text{protein weight (g)}]$$

Fat absorption

The ability of CPHs to absorb fat was determined as described by Shahidi *et al.*[24] and modified by Šližyte *et al.*[25] A 500 mg sample of dried hydrolysate was mixed with 10 mL of corn oil in a 50 mL centrifuge tube. The mixture was kept at room temperature (25 ± 1 °C) for 30 min, with mixing every 10 min, and then centrifuged at 2000 × *g* for 25 min. Free oil was then decanted and the fat absorption of the sample was determined from the weight difference. This test was performed in triplicate and fat absorption was reported in terms of mL fat absorbed g^{-1} CPH. Fat adhesion to the tube walls was evaluated in an empty tube.

Water-holding capacity

Water-holding capacity was determined according to the method of Okezie and Bello[26] with slight modifications. The sample (0.5 g) was dispersed in 50 mL of distilled water and mixed for 2 min. The mixture was kept at room temperature for 30 min and then centrifuged at 5000 × *g* for 30 min. The supernatant was filtered through Whatman No. 1 filter paper and the volume recovered was accurately measured. The difference between the initial volume of distilled water added to the protein sample and the volume of the supernatant was determined and the result was reported as mL water absorbed g^{-1} CPH.

Size exclusion chromatography

The dried hydrolysate (500 mg) was dissolved in 10 mL of distilled water. The resulting solution was fractionated by gel filtration on a Sephadex G-25 column (2.5 cm × 54 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated with distilled water. The column was eluted with distilled water at a flow rate of 60 mL h^{-1}. Fractions (5 mL each) were collected and the absorbance at 280 nm was measured using a UV–visible spectrophotometer (Cecil CE 2021, Lab Equip Instruments Ltd).

Determination of ACE-inhibitory activity

ACE-inhibitory activity was assayed as reported by Nakamura *et al.*[27] A volume of 80 µL containing different concentrations of CPH was added to 200 µL of 5 mmol L^{-1} HHL and preincubated at 37 °C for 3 min. CPH and HHL were prepared in 100 mmol L^{-1} borate buffer (pH 8.3) containing 300 mmol L^{-1} NaCl, The reaction was then initiated by adding 20 µL of 0.1 U mL^{-1} ACE from rabbit lung prepared in the same buffer. After incubation at 37 °C for 30 min the enzymatic reaction was stopped by adding 250 µL of 0.05 mol L^{-1} HCl. The liberated hippuric acid (HA) was extracted with ethyl acetate (1.7 mL) and then evaporated at 95 °C for 10 min. The residue was dissolved in 1 mL of distilled water and the absorbance of the extract at 228 nm was determined using a UV–visible spectrophotometer (Cecil CE 2021, Lab Equip Instruments Ltd). ACE-inhibitory activity was calculated using the equation

$$\text{ACE inhibition (\%)} = [(B - A)/B] \times 100$$

where A is the absorbance of HA generated in the presence of ACE inhibitor and B is the absorbance of HA generated without ACE inhibitor. The concentration of ACE inhibitor required to inhibit 50% of ACE activity under the above conditions was defined as IC_{50}. The IC_{50} value of the inhibitor compound was determined after logarithmic linearisation of the inhibition curve.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Statgraphics Version 5.1 Professional Edition (Manugistics Corp., Rockville, MD, USA) using analysis of variance (ANOVA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of protein hydrolysates from cuttlefish by-products

The physicochemical and biological properties of protein hydrolysates depend on the protein substrate, the specificity of the enzyme used for the proteolysis, the conditions used during hydrolysis and the degree of hydrolysis. In the present work the crude enzyme preparation from *B. licheniformis* NH1 (0.5 U mg^{-1} protein) was used for the production of protein hydrolysates. Furthermore, in order to study the effect of the DH on the yield of protein recovery and the evolution of functional properties and biological activities, hydrolysates with DH values of 5, 10 and 13.5% were generated by enzymatic treatment of cuttlefish by-product proteins.

The schema for the production of protein hydrolysates from cuttlefish by-products is presented in Fig. 1. The hydrolysis curve of cuttlefish proteins is shown in Fig. 2. The curve showed a high rate of hydrolysis for the first 1 h. The rate of hydrolysis subsequently decreased and the enzymatic reaction reached a steady state phase where no apparent hydrolysis took place. The DH reached about 13.5% after 300 min of hydrolysis. The shape of the hydrolysis

 © 2010 Society of Chemical Industry

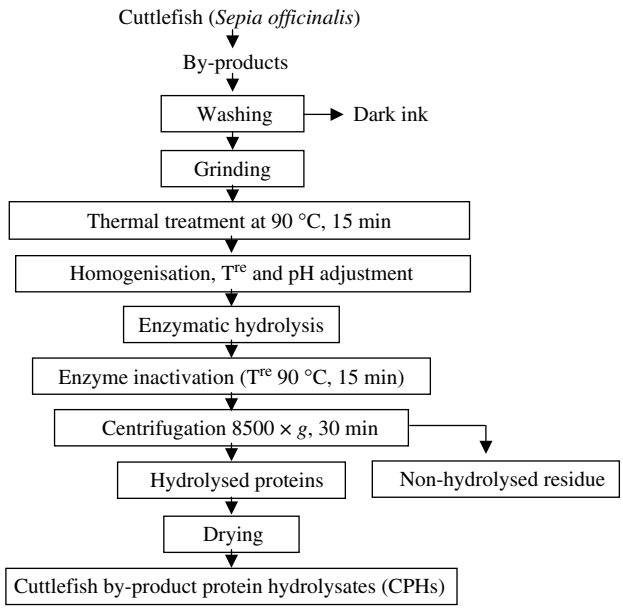


Figure 1. Flow sheet for preparation of CPHs.

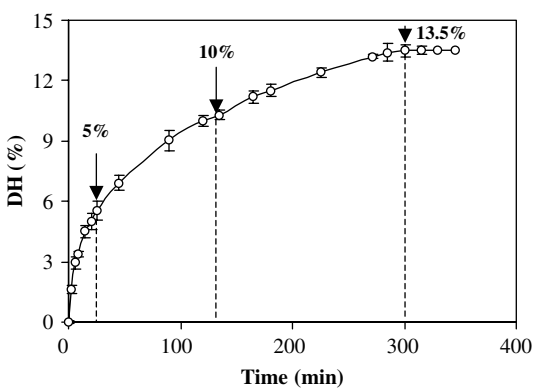


Figure 2. Hydrolysis curve of cuttlefish by-product proteins treated with crude enzyme extract from *Bacillus licheniformis* NH1. Arrows indicate the digestion times required to obtain DH 5, 10 and 13.5%.

curve is similar to that of previously published hydrolysis curves for sardine (*Sardina pilchardus*),[28] Atlantic salmon (*Salmo salar*),[29] herring (*Clupea harengus*)[30] and sardinella (*Sardinella aurita*)[31] protein hydrolysates

Chemical composition

The chemical composition of CPHs was determined and compared with that of UCP. As shown in Table 1, all three dried hydrolysates had approximately the same composition, with high protein content (750–790 g kg^{-1}) and relatively high lipid content (28.9–31.0 g kg^{-1}). Similar lipid levels (21–87 g kg^{-1}) were found by Šližyte *et al.*[32] in protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) by-products. However, low lipid contents were reported in salmon[29] and herring[30] protein hydrolysates. The retention of a high amount of fat in the final products may limit the use of this ingredient in food applications, because fish protein hydrolysates with high lipid content can have an undesirable taste and darken owing to changes in the lipids.[33] According to Spinelli *et al.*,[34] the level of lipid residues in fish protein hydrolysates must be lower than 5 g kg^{-1} in order to prevent negative alteration of the lipids during storage.

Table 1. Composition (g kg^{-1}) of UCP and CPHs

Sample	DH (%)	Moisture	Ash	Proteins	Lipids
UCP	–	36.3 ± 2.0	33.9 ± 0.5	712.3 ± 0.1	211.9 ± 1.5
CPH1	5	25.2 ± 3.0	103.1 ± 1.2	789.4 ± 0.7	31.0 ± 0.1
CPH2	10	10.1 ± 1.6	119.9 ± 1.7	785.6 ± 0.9	30.4 ± 0.2
CPH3	13.5	10.0 ± 1.1	150.9 ± 0.3	750.0 ± 1.1	28.9 ± 0.2

Values are mean ± standard error of triplicate measurements.

The ash content was 103.1, 119.9 and 150.9 g kg^{-1} in CPH1, CPH2 and CPH3 respectively. These results are similar to those of other published studies on fish protein hydrolysates.[29,35]

Characterisation of hydrolysates by RP-HPLC

Wilding *et al.*[36] reported that the hydrophilic/hydrophobic peptide ratio is the most important factor influencing functional properties such as foaming and emulsifying capacity. RP-HPLC is the most appropriate method to separate peptides in hydrolysates and can give a good idea of the hydrophobic/hydrophilic peptide ratio.[37] The retention time of peptides depends on their size as well as their polarity. The order of elution of peptides from a reverse phase column is dependent on their size. This is probably due to the more hydrophobic character of large peptides relative to short peptides. The order in which hydrophilic and hydrophobic residues appear in a peptide has also been shown to influence the elution profile of small peptides.[38]

The elution profiles of hydrolysis obtained by RP-HPLC are presented in Fig. 3. A number of peaks are detectable by RP-HPLC, illustrating the heterogeneous composition of the CPHs. The elution profile of hydrolysates can be grouped into three categories of hydrophobicity of eluted peptides: low, medium and high. The hydrolysate at 5% DH (CPH1) showed a higher concentration of medium-hydrophobic peptides but a lower concentration of low-hydrophobic peptides than CPH2 and CPH3. From the RP-HPLC profiles a slight decrease in hydrophobic peptides and an increase in hydrophilic peptides eluted earlier were noted as the DH increased.

Functional properties

Solubility

Solubility is one of the most important functional properties of proteins and protein hydrolysates.[39] Many other functional properties such as emulsification and foaming are affected by solubility.[36]

The solubility profiles of UCP and CPHs as a function of pH are presented in Fig. 4. UCP was less soluble than the hydrolysates, having a solubility below 20% at pH 3–10. Enzymatic hydrolysis considerably improved ($P < 0.05$) the solubility of cuttlefish by-product proteins at all pH values tested and CPH solubility increased with increasing DH. The hydrolysate with the highest DH (CPH3), which may contain lower-molecular-weight peptides, had excellent solubility at pH 6–10. At pH 7 the solubility of CPH1, CPH2 and CPH3 was about 70, 91 and 98% respectively, significantly higher than that of UCP.

The improvement in protein solubility by enzymatic treatment was attributed to the release of soluble peptides from insoluble

 © 2010 Society of Chemical Industry

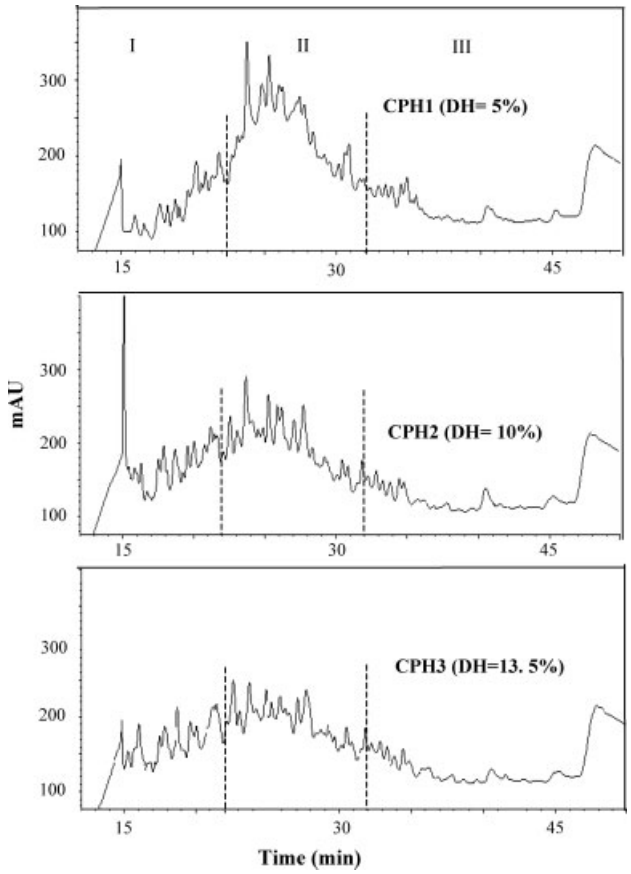


Figure 3. RP-HPLC profiles of CPHs: I, low hydrophobicity; II, medium hydrophobicity; III, high hydrophobicity.

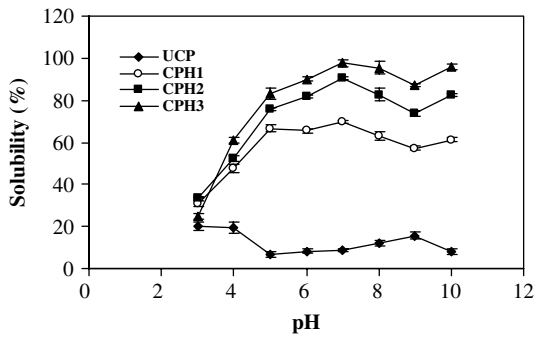


Figure 4. Solubility profiles of UCP and CPHs as a function of pH. Each value is the mean of duplicate measurements.

aggregates or precipitates, which increases the number of exposed ionisable amino and carboxyl groups.[4,18,28,40]

Thus limited enzymatic hydrolysis could be used as an effective alternative to improve the solubility of fish proteins. The excellent solubility of CPHs indicates that they may have many potential applications in formulated food systems.

Foaming capacity and foam stability

Proteins in dispersions cause a lowering of the surface tension at the water/air interface, thus creating foam.[41] The foaming properties of CPHs and UCP were determined by measuring their whippability at pH 2, 4, 6, 8 and 10 (Fig. 5). The results show an increase in the foaming capacity of the three hydrolysates compared with UCP at all pH values tested. For example, the foaming capacity of CPH1 (DH 5%) and UCP at pH 4 was 80 and 63% respectively (Fig. 5(a)). However, foaming capacity decreased slightly with increasing protein hydrolysis. This is in line with previous findings that good film cohesiveness is reached with high-molecular-weight peptides and partially hydrolysed proteins.[42,43] However, another report showed a significant decrease in foaming capacity upon proteolysis.[7]

The most stable foam was obtained with CPH1 (DH 5%) at pH 2, 4 and 6. In addition, foam stability decreased as the extent of hydrolysis increased, except at pH 8 (Fig. 5(b)). It is well known that larger protein components and partially hydrolysed proteins lead to higher foam stability.

Emulsifying properties

The EAI is a function of oil volume fraction, protein concentration and the type of equipment used to produce the emulsion.[32] The EAI of UCP and CPHs as a function of pH is shown in Fig. 6. Enzymatic hydrolysis considerably improved the EAI at all pH values tested. The hydrolysate at DH 5% exhibited lower EAI values than the other hydrolysates even though it contained more hydrophobic and larger peptides. CPH2 and CPH3 showed a similar pattern of EAI, which could be due to the fact that these two hydrolysates had similar peptide profiles according to RP-HPLC. The highest EAI value (68.69%) of these hydrolysates was obtained at pH 10. The improvement in emulsifying properties could be explained by the fact that hydrolysis liberated medium-molecular-weight peptides from the native protein, which would enhance the flexibility of the peptides of CPH2 at the oil/water interface, resulting in a larger surface area and, consequently, greater emulsion formation.[44] A direct relation between surface activity and peptide length was reported by Jost *et al.*,[45] and it is generally accepted that a peptide should have a minimum length of 20 residues to possess good emulsifying and interfacial properties.

These results differ from those of Klompong *et al.*[46] and Wasswa *et al.*,[47] who reported that the EAI decreased with increasing protein hydrolysis and that this decrease could be attributed to the presence of smaller peptides, which are less effective in stabilising emulsions.

The results in Fig. 6 also show that the EAI increased with increasing pH. The highest EAI for CPH2 and CPH3 was obtained at pH 10. The increase in EAI with increasing pH correlated with the increase in solubility of CPHs with increasing pH.

Fat absorption

The capacity of hydrolysates to absorb fat/oil is an important functional characteristic of ingredients used in the meat and confectionery industries. Several factors may affect the ability of hydrolysates to bind fat, such as bulk density of the protein,[48] degree of hydrolysis[49] and enzyme–substrate specificity.[50] Kristinsson[51] reported that fat absorption of salmon protein hydrolysate decreased with increasing DH. Sathivel *et al.*[49] investigated the functional properties of herring by-products and their hydrolysates and found comparable fat absorption to that of egg albumin.

Fat absorption of CPHs was determined and compared with that of UCP and casein. All CPHs exhibited excellent fat absorption, greater than that of both and casein (Table 2). CPH1 had the highest fat absorption (1.97 mL oil g^{-1} CPH), followed by CPH2 (1.87 mL oil g^{-1} CPH) and CPH3 (1.81 mL oil g^{-1} CPH) (Table 2). The

 © 2010 Society of Chemical Industry

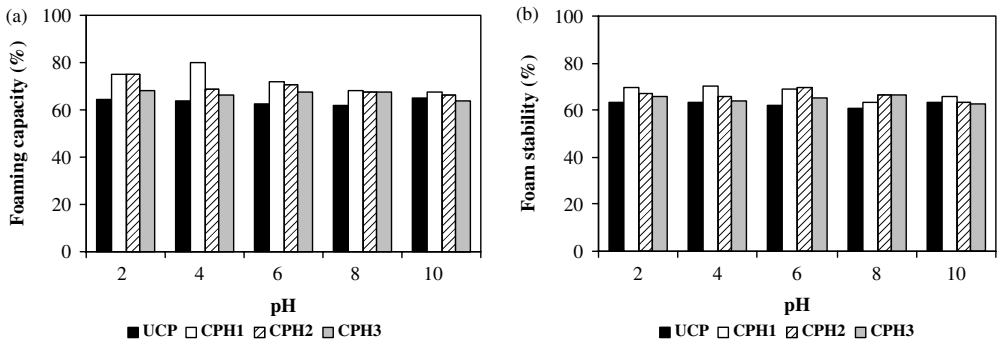


Figure 5. (a) Foaming capacity and (b) foam stability of UCP and CPHs at pH 2, 4, 6, 8 and 10.

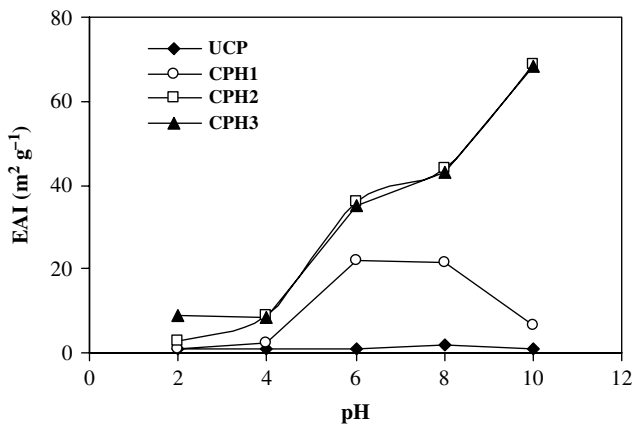


Figure 6. Emulsifying properties of UCP and CPHs at pH 2, 4, 6, 8 and 10.

decrease in fat absorption as the DH increased might be due to hydrolytic degradation of the protein structure. CPH1 contained larger peptides and more medium-hydrophobic peptides than the other hydrolysates. Other studies indicated that hydrophobic interactions are primarily responsible for the decrease in fat absorption.[30,52]

The results showed that CPHs exhibited good fat absorption and could be very useful in the meat and confectionary industries.

Water-holding capacity

Several studies have shown that fish protein hydrolysates have excellent water-holding capacity (WHC) and can increase the cooking yield when added to minced meat.[24,53]

As shown in Table 2, WHC increased with the extent of hydrolysis. CPH3 had significantly higher WHC than the control (UCP). Although WHC of CPH1 was lower than that of CPH2 and CPH3, it was similar to that of casein. The observed increase in WHC with increasing DH (and solubility) could be due to the increased presence of polar groups such as $-COOH$ and $-NH_2$ during enzymatic hydrolysis.

ACE-inhibitory activity

Hypertension is related to the incidence of coronary heart disease, and its treatment is effective in reducing the risk of the disease.[54,55] ACE plays an important role in the regulation of blood pressure. It raises blood pressure by converting the inactive decapeptide angiotensin I to the potent vasoconstrictor octapeptide angiotensin II, as well as inactivating the vasodilating nonapeptide bradykinin.[56] Therefore inhibition of ACE activity is a good target for antihypertension. ACE inhibitors are used in therapy against hypertension.

ACE-inhibitory peptides have recently received much attention in relation to the development of functional foods that contribute to homeostasis of the human body.[9] Since the discovery of ACE inhibitors in snake venom,[57] several reports have been published on the ACE-inhibitory activity of peptides from food proteins such as milk,[58,59] rapeseed,[60] whey,[61] porcine muscle,[62] fish[63,64] and soybean[65] proteins.

In this study, CPHs were also analysed for their ACE-inhibitory activity. All hydrolysates at 2 mg mL^{-1} (with different DH values) exhibited ACE-inhibitory activity, with CPH3 displaying the highest activity (79%) (Fig. 7). UCP showed very low antihypertensive activity. The IC_{50} value of CPH3 (1.0 ± 0.01 mg mL^{-1}) obtained after logarithmic linearisation was lower than those of hydrolysates from oyster, scallop, codfish skin and herring skin ($IC_{50} > 10$ mg mL^{-1}),[66] whereas it was higher than those of hydrolysates from bonito ($IC_{50} = 0.029$ mg mL^{-1}),[67] salmon ($IC_{50} = 0.038$ mg mL^{-1})[68] and sardine ($IC_{50} = 0.082$ mg mL^{-1}).[69] This can be attributed to the impact of enzyme specificity, which is a key factor influencing both the characteristics of hydrolysates and thus the nature and composition of the peptides produced. Proteolysis can operate either sequentially, releasing one peptide at a time, or through the formation of intermediates that are further hydrolysed to smaller peptides

Table 2. Fat absorption and water-holding capacity of CPHs compared with casein and UCP

Parameter	UCP	CPH1	CPH2	CPH3	Casein
Fat absorption (mL oil g^{-1} CPH)	1.224 ± 0.34	1.977 ± 0.17	1.867 ± 0.77	1.814 ± 0.24	1.4 ± 0.2
Water-holding capacity (mL water g^{-1} CPH)	2.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0	3.5 ± 0.5	5.5 ± 1.5	3.0 ± 0.7

Values are mean ± standard error of duplicate determinations.

 © 2010 Society of Chemical Industry

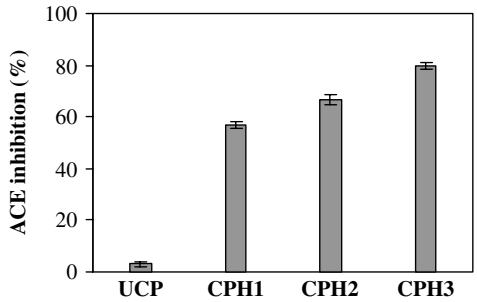


Figure 7. ACE-inhibitory activity of UCP and CPHs.

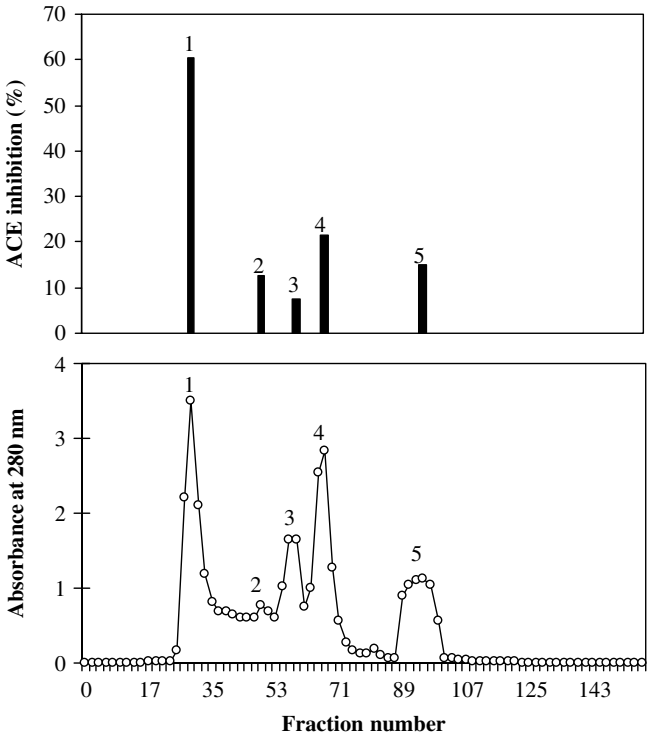


Figure 8. Separation of CPH3 by gel filtration (lower panel) and ACE-inhibitory activity of separated fractions (upper panel).

as proteolysis progresses, which is often termed the 'zipper mechanism'.[70]

CPH3, which displayed the highest ACE-inhibitory activity, was then subjected to gel filtration chromatography on a Sephadex G-25 column and separated into five major fractions (Fig. 8). All fractions were collected and freeze-dried and their ACE-inhibitory activity was measured. As shown in Fig. 8, ACE-inhibitory activity was observed in all fractions, with fraction 1, which contains high-molecular-weight peptides, exhibiting the highest level.

CONCLUSION

Protein hydrolysates with different DH (5, 10 and 13.5%) were generated from cuttlefish by-products by treatment with crude enzyme extract of *B. licheniformis* NH1. Extensive enzymatic hydrolysis of cuttlefish protein resulted in a considerable increase in solubility, WHC and emulsifying activity and a reduction in foaming capacity and fat absorption. The results also showed that CPHs exhibited high ACE-inhibitory activity, suggesting the presence of peptides with antihypertensive activity. This indicates that cuttlefish by-products could be used as a source of ACE-inhibitory peptides.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia. The authors would like to thank Mr Ayadi Hajji from the Faculty of Letters and Human Sciences of Kairouan, Tunisia for his help with the English.

REFERENCES

1 Ström T and Eggum BO, Nutritional value of fish viscera silage. *J Sci Food Agric* **32**:115–120 (1981).
2 Phillips LG, Whitehead DM and Kinsella J, Protein stability, in *Structure–Function Properties of Food Proteins*, ed. by Phillips LG. Academic Press, San Diego, CA, pp. 25–63 (1994).
3 Shahidi F, Sea food processing by-products, in *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*, ed. by Shahidi F and Botta JR. Blackie Academic and Professional, London, pp. 321–334 (1994).
4 Panyam D and Kilara A, Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci Technol* **7**:120–125 (1996).
5 Hall GM and Ahmad NH, Functional properties of fish protein hydrolysates, in *Fish Processing Technology*, ed. by Hall GM. Blackie Academic and Professional, New York, NY, pp. 249–265 (1992).
6 Jun SY, Park PJ, Jung WK and Kim SK, Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur Food Res Technol* **219**:20–26 (2004).
7 Je JY, Park PJ and Kim SK, Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res Int* **38**:45–50 (2005).
8 Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y and Nasri M, Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem* **114**:1198–1205 (2009).
9 Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, *et al*, Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem* **118**:559–565 (2010).
10 Jang A and Lee M, Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Sci* **69**:653–661 (2005).
11 Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Plé R, Leroy Y, Guillochon D, Barkia A, *et al*, Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine-proteases. *Food Chem* **111**:350–356 (2008).
12 Bougatef A, Balti R, Nedjar-Arroume N, Ravallec R, Yaba Adjé E, Lassoued I, *et al*, Evaluation of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates generated by gastrointestinal proteases: identification of the most potent active peptide. *Eur Food Res Technol* **231**:127–135 (2010).
13 Balti R, Nedjar-Arroume N, Bougatef A, Guillochon D and Nasri M, Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Res Int* **43**:1136–1143 (2010).
14 Balti R, Nedjar-Arroume N, Yaba Adjé E, Guillochon D and Nasri M, Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins. *J Agric Food Chem* **58**:3840–3846 (2010).
15 Ariyoshi Y, Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci Technol* **4**:139–144 (1993).
16 El Hadj-Ali N, Agrebi R, Ghorbel-Frikha B, Sellami-Kamoun A, Kanoun S and Nasri M, Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme Microb Technol* **40**:513–523 (2007).

 © 2010 Society of Chemical Industry

17 Kembhavi AA, Kulkarni A and Pant A, Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Appl Biochem Biotechnol* **38**:83–92 (1993).
18 Adler-Nissen J, A review of food hydrolysis specific areas, in *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, ed. by Adler-Nissen J. Elsevier Applied Science, Copenhagen, pp. 57–109 (1986).
19 AOAC, *Official Methods of Analysis* (16th edn). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1995).
20 Tsumura K, Saito T, Tsuge K, Ashida H, Kugimiya W and Inouye K, Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT – Food Sci Technol* **38**:255–261 (2005).
21 Gornall AG, Bardawill CJ and David MM, Determinations of serum proteins by means of the biuret reactions. *J Biol Chem* **177**:751–767 (1949).
22 Lawhon JT, Cater CM and Mattil KF, A comparative study of the whipping potential of an extract from several oilseed flours. *Cereal Sci Today* **17**:240–246 (1972).
23 Pearce KN and Kinsella JE, Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J Agric Food Chem* **26**:716–723 (1978).
24 Shahidi F, Han XQ and Synowiecki J, Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem* **53**:285–293 (1995).
25 Šližyte R, Daukšas E, Falch E, Storrø I and Rustad T, Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem* **40**:2021–2033 (2005).
26 Okezie BO and Bello AB, Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. *J Food Sci* **53**:450–454 (1988).
27 Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S and Takano T, Purification and characterization of angiotensin I-converting-enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* **78**:777–783 (1995).
28 Quaglia GB and Orban E, Enzymic solubilization of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *J Sci Food Agric* **38**:263–269 (1987).
29 Kristinsson HG and Rasco BA, Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J Agric Food Chem* **48**:657–666 (2000).
30 Liceaga-Gesualdo AM and Li-Chan ECY, Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *J Food Sci* **64**:1000–1004 (1999).
31 Souissi N, Bougatef A, Triki-Ellouz Y and Nasri M, Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technol Biotechnol* **45**:187–194 (2007).
32 Šližyte R, Rustad T and Storrø I, Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochem* **40**:3680–3692 (2005).
33 Gildberg A, Enzymatic processing of marine raw-materials. *Process Biochem* **28**:1–15 (1993).
34 Spinelli J, Koury B and Miller R, Approaches to the utilisation of fish for the preparation of protein isolates; enzymic modifications of myofibrillar fish proteins. *J Food Sci* **37**:604–608 (1972).
35 Suthasinee N, Sittiwat L, Manop S and Apinya A, Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J Food Eng* **70**:571–578 (2005).
36 Wilding P, Lilliford PJ and Regenstain JM, Functional properties of proteins in food. *J Chem Technol Biotechnol* **34**:182–189 (1984).
37 Lemieux L, Piot JM, Guillochon D and Amiot J, Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *Chromatographia* **31**:499–504 (1991).
38 Mahmoud MI, Malone WT and Cordle CT, Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J Food Sci* **57**:1223–1229 (1992).
39 O'Hare MJ and Nice EC, Hydrophobic high-performance liquid chromatography of hormonal polypeptides and proteins on alkylsilane bonded silica. *J Chromatogr* **171**:209–226 (1979).
40 Chobert JM, Bertrand-Harb C and Nicolas MG, Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J Agric Food Chem* **36**:883–892 (1988).
41 Surowka K and Fik M, Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. *Int J Food Sci Technol* **27**:9–20 (1992).
42 Bombara N, Pilosof AMR and Añón MC, Mathematical model for formation rate and collapse of foams from enzyme modified wheat flours. *J Food Sci* **59**:626–630 (1994).
43 Kong X, Zhou H and Qian H, Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem* **101**:615–620 (2007).
44 Puski G, Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. *Cereal Chem* **52**:655–664 (1975).
45 Jost R, Monti JC and Pahud JJ, Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. *J Dairy Sci* **60**:1387–1393 (1977).
46 Klompong V, Benjakul S, Kantachote D and Shahidi F, 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 Chem* **102**:1317–1327 (2007).
47 Wasswa J, Tang J, Gu XH and Yuan XQ, Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chem* **104**:1698–1704 (2007).
48 Kinsella JE, Functional properties of proteins in food: a survey. *Crit Rev Food Sci Nutr* **8**:219–280 (1976).
49 Sathivel S, Smiley S, Prinyawiwatkul W and Bechtel PJ, Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *J Food Sci* **6**:401–406 (2005).
50 Haque ZU, Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: a review. *J Dairy Sci* **76**:311–320 (1993).
51 Kristinsson HG, Reaction kinetics, biochemical and functional properties of salmon muscle proteins hydrolysed by different alkaline proteases. *Master's Thesis*, University of Washington, Seattle, WA (1998).
52 Haque ZU and Mozaffar Z, Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocolloids* **5**:559–571 (1992).
53 Kristinsson HG and Rasco BA, Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1**:43–81 (2000).
54 Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, *et al*, Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2. *Lancet* **335**:827–838 (1990).
55 MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, *et al*, Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1. *Lancet* **335**:765–774 (1990).
56 Erdös EG, Angiotensin-I converting enzyme. *Circ Res* **36**:247–255 (1975).
57 Ferreira SH, Bartelt DC and Greene LJ, Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* **9**:2583–2593 (1970).
58 Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E, Goffredi F and Addeo F, Production of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. cremoris FT4. *Appl Environ Microbiol* **66**:3898–3904 (2000).
59 Silva SV and Malcata FX, Caseins as source of bioactive peptides. *Int Dairy J* **15**:1–15 (2005).
60 Marczak ED, Usui H, Fujita H, Yang Y, Yokoo M, Lipkowski AW, *et al*, New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* **24**:791–798 (2003).
61 Vermeirssen VA, van der Bent A, Van Camp J, van Amerongen A and Verstraete W, A quantitative *in silico* analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie* **86**:231–239 (2004).
62 Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S and Itoh M, Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci* **57**:319–324 (2001).
63 Ichimura T, Hu JE, Aita DQ and Maruyama S, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and insulin secretion stimulative activity of fermented fish sauce. *J Biosci Bioeng* **96**:496–499 (2003).
64 Fahmi A, Morimura S, Guo HC, Shigematsu T, Kida K and Uemurac Y, Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochem* **39**:1195–1200 (2004).
65 Kuba M, Tana C, Tawata S and Yasuda M, Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochem* **40**:2191–2196 (2005).
66 He HL, Chen XL, Wu H, Sun CY, Zhang YZ and Zhou BC, High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme

 © 2010 Society of Chemical Industry

inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresour Technol* **98**:3499–3505 (2007).
67 Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa K, Chiba H and Yoshikawa M, Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**:1541–1545 (1992).
68 Ono S, Hosokawa M, Miyashita K and Takahashi K, Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *Int J Food Sci Technol* **41**:383–386 (2006).
69 Matsufuji H, Matsui T, Seki E, Osajima K, Nakashima M and Osajima Y, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**:2244–2245 (1994).
70 Panyam D and Kilara A, Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci Technol* **7**:120–125 (1996).

 © 2010 Society of Chemical Industry

Etude comparative des propriétés biochimiques et des activités antioxydantes des hydrolysats protéiques de la seiche (*Sepia officinalis*) préparés par l'Alcalase et les protéases de *Bacillus licheniformis* NH1

Rafik Balti, Ali Bougatef, Nedra El-Hadj Ali, Naourez Ktari, Kemel Jellouli, Naima Nedjar-Arroume, Pascal Dhulster, Moncef Nasri

L'oxydation des lipides, un des phénomènes majeurs de la détérioration des aliments, modifie considérablement leurs valeurs nutritionnelles et leurs qualités organoleptiques. C'est pourquoi les industriels ajoutent des substances antioxydantes dans les aliments pour prolonger leur durée de conservation. Quelques antioxydants synthétiques, à savoir l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT) et le n-propyl gallate, sont largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Malgré leurs pouvoirs anti-radicalaires très puissants par rapport aux antioxydants naturels comme l'α-tocophérol et l'acide ascorbique, l'utilisation de ces composés chimiques a été réduite ces dernières années à cause de leurs effets toxiques et cancérigènes. De ce faite, récemment une nouvelle stratégie a été développée pour l'obtention des agents antioxydants d'origine naturelle, spécialement des peptides issus des hydrolysats de protéines alimentaires.

Généralement, les conditions opératoires, le type d'enzyme utilisé et le degré d'hydrolyse affectent l'activité antioxydante. Essentiellement, les protéases utilisées affectent au même temps les propriétés fonctionnelles et antioxydantes des hydrolysats protéiques obtenus. L'utilisation d'une préparation enzymatique locale dans l'élaboration d'hydrolysat protéique s'avère très intéressante puisqu'elle permet de réduire le coût du produit fini en évitant l'achat des enzymes commerciales. Dans ce cadre, et afin de minimiser le coût de production des hydrolysats protéiques, nous avons mené une étude comparative entre les potentiels hydrolytiques d'une enzyme commerciale l'Alcalase® et la préparation enzymatique de *B. licheniformis* NH1.

Les deux cinétiques d'hydrolyses enzymatiques des protéines du muscle de la seiche commune (*S. officinalis*) sont caractérisées par une phase initiale rapide, durant laquelle un grand nombre de liaisons peptidiques est hydrolysé, après cette phase le DH tend à se stabiliser. En partant avec le même rapport E/S (3 U/mg), la préparation enzymatique de *B. licheniformis* NH1 a présenté des DH plus élevés que ceux obtenus par l'Alcalase® au

cours des premières 90 minutes d'hydrolyse. Les DH finaux obtenus par l'extrait enzymatique de NH1 et l'Alcalase® sont de l'ordre de 15 % et 12,5 %, respectivement.

La composition physicochimique des différents hydrolysats protéiques du muscle de la seiche commune (HPMS) et des protéines du muscle non hydrolysées (PMNH) a été déterminée. Les résultats obtenus ont montré que les teneurs en protéines des HPMS varient avec le type de traitement enzymatique effectué. En effet, après 4 h d'hydrolyse, HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %) possède une teneur de protéine relativement faible de l'ordre de 75,36 ± 0,68 %. Par contre, HPMS-NH1 (DH = 15 %) a présenté une haute teneur de protéines (80,11 ± 0,75 %). Au cours de l'hydrolyse enzymatique, les protéines sont solubilisées et les résidus non protéiques insolubles sont éliminés, ce qui aboutit a des hydrolysats riche en protéines. Ces résultats ont montré aussi une réduction de la teneur en lipide des HPMS par rapport aux PMNH, ceci est dû à l'élimination d'une partie de lipides lors de la séparation par centrifugation. Cette réduction améliore la stabilité du produit fini en empêchant son oxydation. Cependant, le taux de cendre dans les HPMS est toujours supérieur à celui des PMNH. Cette teneur élevée en cendre est probablement le résultat de la formation des sels par ajout de la base lors de l'hydrolyse enzymatique.

La solubilité est considérée comme l'une des plus importantes propriétés fonctionnelles des protéines et de leurs hydrolysats. D'autres propriétés fonctionnelles comme l'aptitude à l'émulsification et les propriétés moussantes sont affectées par la solubilité, car ces propriétés dépendront de la capacité de ces hydrolysats à se solubiliser. L'évolution de la solubilité des HPMS préparés à différents DH et des protéines natives (témoin) en fonction du pH 2,0 à 11,0 a été menée. Tous les hydrolysats ont une meilleure solubilité par rapport aux protéines natives, avec des valeurs nettement supérieures à 75 % dans la gamme de pH explorée.

L'activité antioxydante ne peut pas être mesurée directement mais plutôt déterminée par l'effet de l'antioxydant sur l'étendu de la réaction d'oxydation. On peut classer les différentes méthodes en deux groupes : les méthodes faisant intervenir l'auto-oxydation d'un substrat et celles dans lesquelles on étudie la réaction directe du supposé antioxydant avec un radical libre ou un ion. Nous avons justement utilisé une ou plusieurs méthodes de chaque type : l'auto-oxydation de l'acide linoléique, test de blanchiment du β-carotène et test d'inhibition du radical libre DPPH° et l'effet chélateur des métaux.

L'inhibition de la peroxidation lipidique des HPMS a été déterminée *in vitro* par mesure de leur habilité d'inhiber l'oxydation de l'acide linoléique dans un système émulsifié. Tous les HPMS préparés à différents DH sont capables de retarder significativement ($p < 0,05$) la peroxidation lipidique. Pour les deux préparations protéolytiques utilisées pour l'hydrolyse

des protéines du muscle de la seiche commune (*S. officinalis*), l'effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique augmente initialement et atteint sa valeur maximale après 4 h d'hydrolyse. L'étude comparative entre HPMS-NH1 (DH = 15 %), HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %) et des antioxydants commerciaux (α-tocophérol et BHA) dans l'inhibition de la peroxidation lipidique a été réalisée. Uniquement, HPMS-NH1 a présenté un effet comparable à celui de l'antioxydant naturel l'α-tocophérol. Toutefois, les niveaux d'inhibition des deux hydrolysats protéiques restent inférieurs à celui obtenu avec l'antioxydant synthétique le BHA. Généralement, il existe une relation directe entre le DH et l'activité antioxydante ce qui suggère que la composition spécifique de l'hydrolysat (taille des peptides, composition en acides aminés etc…) est un facteur crucial dans la recherche cette activité.

Dans le même contexte, l'activité antioxydante des HPMS a aussi été évaluée par le test de blanchiment de β-carotène. Les résultats de ce test ont montré que l'addition des différents HPMS au mélange acide linoléique-β-carotène empêche le blanchiment de ce dernier avec des activités variables selon le DH et la préparation enzymatique utilisée dans la préparation des hydrolysats protéiques. Au cours de la première heure d'hydrolyse, HPMS-Alcalase® achève rapidement une forte capacité d'inhibition du blanchiment de β-carotène (61,5 ± 1,66 %) que HPMS-NH1 (56,5 ± 2,31 %). A la fin de l'hydrolyse (DH final), les deux HPMS possèdent des activités antioxydantes similaires qui sont de l'ordre de 70 %. Les résultats ont montré également que ces hydrolysats protéiques présentent une capacité à inhiber la décoloration de β-carotène de façon dose-dépendante. HPMS-NH1 (DH = 15 %) présente la meilleure activité antioxydante (81,11 ± 1,73 % à 3 mg/ml). Les résultats obtenus soulignent l'efficacité de certains peptides contenus dans les HPMS dans le piégeage des radicaux libres en milieu émulsionné.

Le pouvoir anti-radicalaire des différents HPMS a été évalué moyennant le test au DPPH°. On a montré que le pouvoir anti-radicalaire des HPMS augmente en fonction du DH. Pour les différents DH choisis, HPMS-NH1 a présenté des pouvoirs anti-radicalaires plus élevés que ceux enregistrés pour HPMS-Alcalase®. De plus, on a aussi démontré que la capacité à neutraliser le DPPH° augmente en fonction de la concentration en HPMS. Les valeurs des CI_{50} (la concentration en peptides qui inhibe 50 % de l'oxydation) relatives à l'activité anti-radicalaire des HPMS-NH1 (DH = 15 %) et HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %) sont de l'ordre de 0,68 ± 0,017 mg/ml et 0,99 ± 0,024 mg/ml, respectivement.

Dans le présent travail, la capacité des HPMS à chélater le Fe^{2+} a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré que l'effet chélateur des HPMS augmente en fonction de DH. L'hydrolysat protéique produit par les protéases de la souche NH1 présente le meilleur

pouvoir chélateur quelque soit le DH. De plus, HPMS-NH1 (DH = 15 %) et HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %), obtenus après 4 heures d'hydrolyse, ont présenté les meilleurs capacités de chélations des ions Fe^{2+}, qui sont de l'ordre de 65,0 ± 1,77 % et 55,6 ± 1,45 %, respectivement. Egalement, les effets chélateurs de ces deux hydrolysats en fonctions de la concentration ont été réalisés et comparés à celui de l'EDTA, utilisé comme référence.

Les effets chélateurs des deux hydrolysats augmentent en fonction de la concentration en HPMS utilisée et atteignent leurs valeurs maximales à 2 mg/ml. Au-delà de cette concentration, le pouvoir chélateur des HPMS-NH1 et HPMS-Alcalase® demeure constant. Les valeurs des CI_{50} relatives à l'effet chélateur des HPMS-NH1 (DH = 15 %) et HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %) sont de l'ordre de 0,94 ± 0,24 mg/ml et 1,25 ± 0,68 mg/ml, respectivement. Néanmoins, le pouvoir chélateur des deux hydrolysats protéiques demeure inférieur à celui de l'EDTA, pour toutes les concentrations testées. A titre d'exemple, pour une concentration de 2 mg/ml, les capacités de chélations des ions Fe^{2+} des HPMS-NH1 (DH = 15 %), HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %) et l'EDTA sont de l'ordre de 74,0 ± 1,55 %, 61,2 ± 1,34 % et 98,0 ± 1,02 %, respectivement.

La composition en acides aminés semble jouer un rôle important dans l'expression de l'activité des peptides actifs. Pour cette raison, cette analyse a été effectuée pour HPMS-NH1 (DH = 15 %) et HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %), qui possèdent les meilleurs activités antioxydantes *in vitro*. Les deux hydrolysats ont présentés une richesse en histidine (11,23-11,61 %) et arginine (11,57-11,71 %). Par contre, ils possèdent des teneurs faibles en cysteine (0,15-0,17 %) et proline (0,29-0,33 %). De plus, HPMS-NH1 et HPMS-Alcalase® ont été caractérisés par des teneurs élevées en acides aminés essentiels de l'ordre de 50,04 % et 48,85 %, respectivement. Ce résultat a prouvé que l'hydrolysat protéique de la seiche commune possède une haute valeur nutritionnelle sur la base de sa composition en acides aminés. On a aussi remarqué des teneurs relativement élevées en acides aminés hydrophobes pour HPMS-NH1 (DH = 15 %) et HPMS-Alcalase® (DH = 12,5 %) et qui sont de l'ordre de 32,36 % and 33,64 %, respectivement. Ce résultat peut expliquer en partie l'activité antioxydante des deux hydrolysats préparés.

Article 7:

Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases.

Balti Rafik, Bougatef Ali, El-Hadj Ali Nedra, Ktari Naourez, Jellouli Kemel, Nedjar-Arroume Naima, Dhulster Pascal & Nasri Moncef (2011). *Journal of Amino Acids*, in press.

SAGE-Hindawi Access to Research
Journal of Amino Acids
Volume 2011, Article ID 107179, 11 pages
doi:10.4061/2011/107179

Research Article

Comparative Study on Biochemical Properties and Antioxidative Activity of Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Protein Hydrolysates Produced by Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 Proteases

Rafik Balti,[1] Ali Bougatef,[1] Nedra El Hadj Ali,[1] Naourez Ktari,[1] Kemel Jellouli,[1] Naima Nedjar-Arroume,[2] Pascal Dhulster,[2] and Moncef Nasri[1]

[1] *Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Université de Sfax, B P 1173, Sfax 3038, Tunisia*
[2] *Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

Correspondence should be addressed to Rafik Balti, rafikbalti1981@gmail.com

Received 27 March 2011; Accepted 11 July 2011

Academic Editor: Nabil Miled

Copyright © 2011 Rafik Balti et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Antioxidative activities and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using Alcalase 2.4 L and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases with different degrees of hydrolysis (DH) were determined. For the biochemical properties, hydrolysis by both enzymes increased protein solubility to above 75% over a wide pH range. The antioxidant activities of cuttlefish protein hydrolysates (CPHs) increase with increasing DH. In addition, all CPHs exhibited antioxidative activity in a concentration-dependent manner. NH1-CPHs generally showed greater antioxidative activity than Alcalase protein hydrolysates ($P < 0.05$) as indicated by the higher 1,1-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferrous chelating activity. Both Alcalase and NH1 protein hydrolysates were able to retard lipid peroxidation and β-carotene-linoleic acid oxidation. Alcalase-CPH (DH = 12.5%) and NH1-CPH (DH = 15%) contained 75.36% and 80.11% protein, respectively, with histidine and arginine as the major amino acids, followed by glutamic acid/glutamine, serine, lysine, and leucine. In addition, CPHs have a high percentage of essential amino acids made up 48.85% and 50.04%. Cuttlefish muscle protein hydrolysates had a high nutritional value and could be used as supplement to poorly balanced dietary proteins.

1. Introduction

Free radical-mediated lipid peroxidation and antioxidants are attracting considerable research interest in many areas. Lipid oxidation is one of the major deteriorative processes in many types of foods, leading to the changes in food quality and nutritional value. Additionally, potentially toxic reaction products can be produced [1]. In particular, investigators report that free radicals, generated by oxidation, play a critical role in a variety of health disorders, including the processes of ageing, cancer, diabetes mellitus, inflammation, coronary heart, and neurological disorders, such as Alzheimer's disease [2]. Therefore, it is important to inhibit the oxidation and formation of free radicals occurring in the living body and foodstuffs [3].

Some synthetic antioxidative agents, such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), and propyl gallate, are commonly used as free radical scavengers in food and biological systems. Although, these synthetic antioxidants show stronger antioxidant activity than those of natural antioxidants such as α-tocopherol and ascorbic acid, the use of these chemical compounds has begun to be restricted because of their induction of DNA damage and their toxicity [4]. Thus, increasing attention has been directed to the development of safe and effective functional foods and antioxidative agents from natural sources, especially peptides derived from hydrolyzed food proteins.

Recently, protein hydrolysates from several fish species, such as silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [5], brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*) [6], sardinelle (*Sardinella aurita*) [7], smooth hound (*Mustelus mustelus*) [8], oyster (*Crassostrea gigas*) [9], yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) [10], round scad (*Decapterus maruadsi*) [11],

yellowfin sole (*Limanda aspera*) [12], herring (*Clupea harengus*) [13], and mackerel (*Scomber austraasicus*) [14], have been reported to possess antioxidative activities.

The operational conditions employed in the processing of protein isolates, the type of protease, and the degree of hydrolysis affect the antioxidant activity [15]. Especially the, proteinases used can affect both the functional properties and antioxidative activity of the protein hydrolysate obtained [12]. Protein hydrolysate from Alaska pollack frame prepared by mackerel intestine crude enzyme exhibited antioxidative activity in a linoleic acid model system [16]. Prawn hydrolysate prepared using pepsin showed the most potent antioxidative activity than those prepared by other enzymes [17]. Levels and compositions of free amino acids and peptides were reported to determine the antioxidant activities of protein hydrolysates [14]. Moreover, the utilization of proteins or their hydrolysates for food and/or cosmetic applications not only presents additional advantages over other antioxidants but also confers nutritional and functional properties [18].

Recently, protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) enriched in angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides have been produced successfully using Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases [19]. Nevertheless, a little information regarding the characteristic and antioxidative activity of hydrolysates prepared using both enzymes has been reported. The objective of this study was to investigate the antioxidative activity of protein hydrolysates from cuttlefish muscle prepared using Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases in a model system and the effect of concentration on their activities. Meanwhile, solubility of hydrolysates derived from cuttlefish muscle was evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulphonic acid)-1,2,4-triazine (Ferrozine), butylated hydroxyanisole (BHA), α-tocopherol, and linoleic acid were purchased from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo, USA). All other chemicals, namely ammonium thiocyanate, ferric chloride, EDTA, Tween-40, and sodium hydroxide were of analytical grade.

2.2. Fish Sample. Cuttlefish (*S. officinalis*), in the size range of 8–10 cuttlefish/kg, was purchased from the fish market of Sfax city, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1 : 3 (w/w), and transported to the research laboratory within 30 min. The mantle was cleaned, deskinned, and eviscerated and then stored in sealed plastic bags at −80°C until used.

2.3. Enzyme. The crude enzyme preparation from *B. licheniformis* NH1 [20] and Alcalase 2.4 L obtained from Novo Nordisk (Bagsverd, Denmark) was used for the production of protein hydrolysates. Protease activity was determined according to the method of Kembhavi et al. [21] using casein as a substrate. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μg tyrosine per minute under the experimental conditions used.

2.4. Production of Protein Hydrolysates from Cuttlefish Muscle. Cuttlefish (*S. officinalis*) 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 then homogenized in a Moulinex blender for about 2 min and hydrolyzed with enzymes under optimal conditions: the crude enzyme preparation from *B. licheniformis* NH1 (pH 10.0 and 50°C) and Alcalase 2.4 L (pH 8.0 and 50°C). The enzyme was added to the reaction at the same enzyme/substrate ratio (E/S = 3 U/mg) to compare hydrolytic efficiencies. During the reaction, the pH of the mixture was maintained constant by continuous addition of 4 M NaOH solution. After the required digestion time, the reaction was stopped by heating the solution at 80°C during 20 min to inactivate the enzyme. The cuttlefish muscle protein hydrolysates were then centrifuged at 5000 ×g for 20 min to separate insoluble and soluble fractions. Finally, the soluble phase was freeze dried using freeze dryer (Bioblock Scientific Christ ALPHA 1-2, IllKrich-Cedex, France) and stored at −20°C for further use.

2.5. Degree of Hydrolysis Determination (DH). The degree of hydrolysis (DH), defined as the percent ratio of the number of peptide bonds broken (h) to the total number of peptide bonds in the studied substrate (h_{tot}), was calculated from the amount of base (NaOH) added to keep the pH constant during the hydrolysis [22] as given below:

$$\text{DH (\%)} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100, \quad (1)$$

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 × 6.25), and α is the average degree of dissociation of the α-NH_2 groups released during hydrolysis expressed as:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}}, \quad (2)$$

where pH and pK are the values at which the proteolysis was conducted. The total number of peptide bonds (h_{tot}) in a fish protein concentrate was assumed to be 8.6 meq/g [22].

2.6. Proximate Analysis. Moisture and ash content were determined according to the AOAC [23] standard methods 930.15 and 942.05, respectively. Total nitrogen content of the substrate and selected hydrolysate products was determined by using the Kjeldahl method. 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. All measurements were performed in triplicate. The protein and fat contents were expressed on a dry weight basis.

2.7. Amino Acid Analysis. For analysis of amino acids, the dry samples were dissolved in distilled water at 1 mg/mL, and 50 μL of each sample were dried and hydrolysed in vacuum-sealed glass tube at 110°C for 24 h in the presence of constant boiling 6 N HCl containing 1% (w/v) phenol and using norleucine as internal standard. After hydrolysis, samples were again vacuum dried, dissolved in application buffer and injected into a Beckman 6300 amino acid analyzer (Beckman Instruments Inc., Fullerton, Calif, USA).

2.8. Solubility. Solubility of cuttlefish protein hydrolysates was carried out according to Tsumura et al. [24] with slight modifications. Briefly, 200 mg of freeze-dried hydrolysates of cuttlefish protein were suspended in 20 mL deionized distilled water, and the pH of the mixture was adjusted to different values from 2.0 to 11.0 using either 2 N HCl or 2 N NaOH solutions. The mixtures were stirred for 10 min at room temperature (25 ± 1°C) and then centrifuged at 8000 ×g for 10 min. After appropriate dilution, the nitrogen content in the supernatant was determined by Biuret method [25]. The nitrogen solubility of the sample, defined as the amount of soluble nitrogen from the total nitrogen, was calculated as follows:

$$\text{Nitrogen solubility (\%)} = \frac{\text{Supernatant nitrogen concentration}}{\text{Sample nitrogen concentration}} \times 100. \quad (3)$$

Solubility analysis was carried out in triplicate.

2.9. Determination of Antioxidant Activities

2.9.1. Inhibition of Linoleic Acid Autoxidation. Inhibition activity of *in vitro* lipid peroxidation of cuttlefish protein hydrolysates was determined by assessing their ability to inhibit oxidation of linoleic acid in an emulsified model system [26]. Briefly, freeze-dried hydrolysates of cuttlefish protein (5 mg) were dissolved in 2.5 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and added to a 2.5 mL of 50 mM linoleic acid in ethanol (95%). The final volume was then adjusted to 6.25 mL with distilled water. The mixture was incubated in a 10 mL tube with silicon rubber caps at 45°C for 12 days in a dark, and the degree of oxidation was evaluated by measuring the ferric thiocyanate values according to the method of Mitsuda et al. [27]. Aliquot (0.1 mL) of reaction mixture was mixed with 4.7 mL of 75% ethanol followed by the addition of 0.1 mL of 30% ammonium thiocyanate and 0.1 mL of 20 mM ferrous chloride solution in 3.5% HCl. After stirring for 3 min, the degree of colour development, which represents the linoleic acid oxidation, was measured at 500 nm. The antioxidative capacity of the inhibition of peroxide formation in linoleic acid system was expressed as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[1 - \frac{A_{500} \text{ of sample}}{A_{500} \text{ of control}}\right] \times 100, \quad (4)$$

α-tocopherol, a natural antioxidant agent, and BHA, a synthetic antioxidant agent, were used as reference, and distilled water as control.

2.9.2. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity. DPPH radical-scavenging activity was measured, using the method described by Bersuder et al. [28]. A 500 μL test sample was mixed with 500 μL of 99.5% ethanol and 125 μL of 99.5% ethanol containing 0.02% DPPH. This mixture was shaken then kept in a dark at room temperature for 60 min before measuring absorbance at 517 nm. DPPH radical-scavenging activity was calculated according to the following equation:

$$\text{DPPH radical-scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{A_{517} \text{ of sample}}{A_{517} \text{ of control}}\right] \times 100. \quad (5)$$

The control was conducted in the same manner except that distilled water was used instead of sample. A lower absorbance of the reaction mixture indicated a higher DPPH scavenging activity. Butylated hydroxyanisole (BHA) was used as a standard.

2.9.3. Ferrous Chelating Activity. The chelating activity on Fe^{2+} was determined, using the method of Decker and Welch [29]. One millilitre of sample solution was mixed with 3.7 mL of distilled water. The mixture was then reacted with 0.1 mL of 2 mM $FeCl_2$ and 0.2 mL of 5 mM 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine) for 20 min at room temperature. The absorbance was read at 562 nm. The control was prepared in the same manner except that distilled water was used instead of the sample. EDTA was used as reference. Chelating activity (%) was then calculated as follows [29]:

$$\text{Chelating activity (\%)} = \left[1 - \frac{A_{562} \text{ of sample}}{A_{562} \text{ of control}}\right] \times 100. \quad (6)$$

2.9.4. β-Carotene-Linoleic Acid Assay. Antiautooxidant activity was assayed using the β-carotene bleaching method [30]. In brief, 0.5 mg β-carotene in 1 mL chloroform was mixed with 25 μL of linoleic acid and 200 μL of Tween-40. The chloroform was evaporated under vacuum at 45°C; then 100 mL distilled water was added, and the resulting mixture was vigorously stirred. The emulsion obtained was freshly prepared before each experiment. An aliquot (2.5 mL) of the β-carotene-linoleic acid emulsion was transferred to tubes containing 0.5 mL of each sample. The tubes were immediately placed in water bath and incubated at 50°C for 2 h. Thereafter, the absorbance of each sample was measured at 470 nm. A control consisted of 0.5 mL of distilled water instead of the sample solution. BHA was used as positive standard:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \left[1 - \frac{\left(\text{Abs}^{0}_{\text{sample}} - \text{Abs}^{120}_{\text{sample}}\right)}{\left(\text{Abs}^{0}_{\text{control}} - \text{Abs}^{120}_{\text{control}}\right)}\right] \times 100. \quad (7)$$

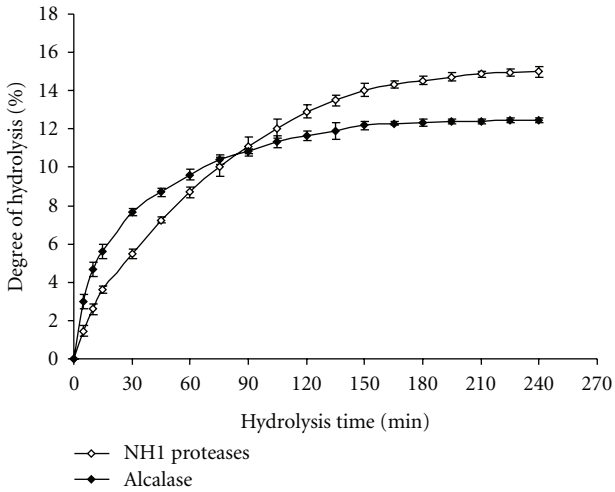


Figure 1: Degree of hydrolysis (DH) of CPHs during hydrolysis with Alcalase and NH1 proteases at 3 U/mg enzyme/substrate. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.

2.10. Statistical Analysis. One-way analysis of variance (ANOVA) was used, and mean comparison was performed by Duncan's multiple range test [31]. Statistical analyses were performed with Statgraphics ver. 5.1, professional edition (Manugistics Corp., Rockville, MD, USA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Preparation of Protein Hydrolysates from Cuttlefish Muscle. It has been demonstrated that biological activities of proteins can be increased through hydrolysis with certain enzymes, and some peptides or fractions possess stronger activity than others [19]. Furthermore, the specificity of the enzyme used for the proteolysis, the conditions used during hydrolysis and the DH greatly influenced the molecular weight and amino acid composition of protein hydrolysates, and thus their biological activities [32].

The hydrolysis of the cuttlefish proteins with NH1 proteases or Alcalase was characterized by a high rate of hydrolysis for the first 1 h (Figure 1). The rate of enzymatic hydrolysis was subsequently decreased, and then the enzymatic reaction reached the steady-state phase when no apparent hydrolysis took place. The shape of hydrolysis curves is similar to those previously published for many protein substrates such as fish [33], whey [34], and wheat gluten [35]. The decrease in the reaction rate could be explained by a decrease in the concentration of peptide bonds available for hydrolysis, enzyme deactivation, and/or the inhibition of the enzyme by the products formed at high degree of hydrolysis. These products act as effective substrate competitors to the undigested or partially digested fish proteins.

With the same *E/S* ratio, NH1 proteases showed higher DH values for cuttlefish protein hydrolysis than Alcalase beyond 90 min hydrolysis period. The higher ($P < 0.05$) level of DH by NH1 proteases treatment may be due to the fact that NH1 crude enzyme contains multiple proteases and, therefore, is a more efficient enzyme choice than Alcalase for preparing cuttlefish protein hydrolysates. Therefore, the susceptibility, to hydrolysis, of cuttlefish muscle proteins depends on the type of enzyme used.

Table 1: Proximate composition (%) of undigested cuttlefish muscle protein and freeze-dried CPHs[a].

Compositions (%)	UCMP	NH1-CPH	Alcalase-CPH
Moisture	5.76 ± 0.01	4.13 ± 0.02	4.96 ± 0.04
Protein[b]	79.15 ± 0.48	80.11 ± 0.75	75.36 ± 0.68
Lipids[b]	5.19 ± 0.24	0.68 ± 0.02	0.91 ± 0.05
Ash[b]	6.08 ± 0.71	12.44 ± 0.17	10.12 ± 0.53

[a] Mean ± SD from triplicate determinations.
[b] Dry weight basis.
UCMP: undigested cuttlefish muscle protein.

3.2. Proximate Composition. Proximate composition of soluble fractions of freeze-dried CPHs compared to that of undigested cuttlefish proteins is shown in Table 1. The proximate composition of the undigested cuttlefish muscle proteins (UCMP) showed that it had high protein content (79.15 ± 0.48%). The ash and lipid contents of UCMP were 6.08 ± 0.71% and 5.19 ± 0.24%, respectively. Alcalase and NH1 CPHs powders had a white to light yellow color appearance with almost no fishy odor and taste.

The protein content of CPHs varied with both enzyme treatments (Table 1). After 4 h of hydrolysis, Alcalase-CPH had the least protein content (75.36 ± 0.68%). However, NH1-CPH showed a higher protein content (80.11 ± 0.75%). During hydrolysis, proteins were solubilised, and the insoluble nonprotein matter was removed, resulting in the high protein content in the resulting hydrolysate [36]. The obtained results are similar to those of other studies on fish protein hydrolysates that have ranged protein from 63.4 to 90.8% [13, 37]. Generally, alkaline proteases exhibit a greater capability to solubilize fish protein compared to neutral and acidic proteases, with exception of pepsin [38].

Interestingly, both dried cuttlefish protein hydrolysates had low lipid content values 0.68 ± 0.02% and 0.91 ± 0.05%, in Alcalase-CPH and NH1-CPH, respectively. A low lipid contents were reported in salmon [39] and herring [40] protein hydrolysates. The retention of a high amount of fat in the final products may limit the use of this ingredient in food applications, because fish protein hydrolysates with high lipid content can have an undesirable taste and darken owing to changes in the lipids [41]. According to Spinelli et al. [42], the level of lipid residues in fish protein hydrolysates must be low.

The ash content was 10.12% and 12.44% in Alcalase-CPH, and NH1-CPH respectively, representing the salt formed during pH adjustment using alkaline solution (NaOH, 4 M). These results are similar to those of other published studies on fish protein hydrolysates [39, 43].

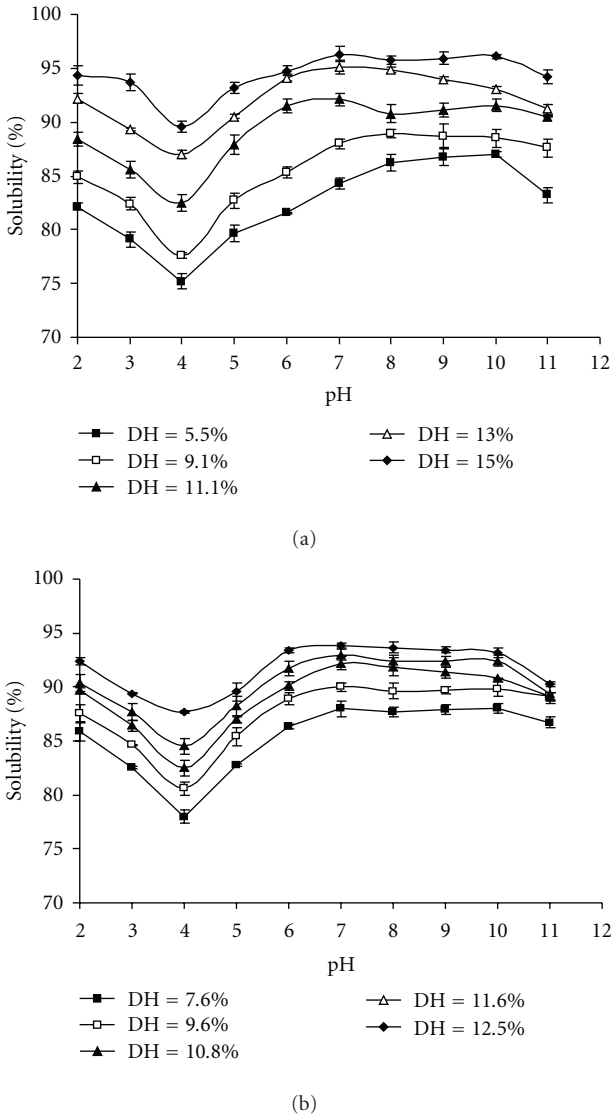


Figure 2: Solubility profiles of CPHs with different degrees of hydrolysis as influenced by pHs: (a) DH = 5.5%, DH = 9.1%, DH = 11.1%, DH = 13.0%, DH = 15.0% with proteases from *B. licheniformis* NH1, respectively; (b) DH = 7.6%, DH = 9.6%, DH = 10.8%, DH = 11.6%, DH = 12.5% with Alcalase, respectively. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.

3.3. Solubility. Functional properties influence the usefulness of an ingredient in food and govern the physical behavior during preparation, processing, and storage [44]. Solubility is one of the most important properties of proteins and protein hydrolysates [45]. Many other functional properties such as emulsification and foaming are affected by solubility. The pH solubility profiles of CPHs at different DH are shown in Figure 2. All CPHs presented typical bell-shaped solubility curves with minimum solubility at pH 4, which may correspond to the isoelectric point of protein hydrolysates, and high solubility at acidic and alkaline pH. The solubilities of CPHs were quite low at pH 4, whereas solubilities above 78% were noticeable at other pHs tested. Undigested cuttlefish muscle protein (UCMP) was less soluble than the hydrolysates, having a solubility of 7.86 ± 0.026% and 15.86 ± 0.056% at pH 4.0 and 9.0, respectively (data not shown).

As shown in Figure 2, the solubility increased with increasing protein hydrolysis. At pH 7.0, the solubility of Alcalase-CPH (DH = 12.5%) and NH1-CPH (DH = 15%) reached about 93.8 ± 0.22 and 96.33 ± 0.7%, respectively, significantly higher ($P < 0.05$) than that of the UCMP (12.05 ± 0.017%). The obtained results are in line with those of Klompong et al. [10] and Gbogouri et al. [37] who reported that hydrolysates of yellow stripe trevally meat protein and salmon byproduct had an excellent solubility at high degrees of hydrolysis. From these results, we can deduce that the solubility increases with the protein fraction with lower molecular mass at higher degrees of hydrolysis. The smaller peptides are expected to have proportionally more polar residues, with the ability to form hydrogen bonds with water and increase solubility [37].

In addition, the lowest solubility of CPHs observed at pH 4.0 could be attributed to both net charge of peptides, which increase as pH moves away from pI, and surface hydrophobicity, that promotes the aggregation via hydrophobic interaction [46]. The pH affects the charge on the weakly acidic and basic side chain groups, and hydrolysates generally show low solubility at their isoelectric points [47].

Table 2: Inhibition of lipid peroxidation by CPHs at different degrees of hydrolysis was determined as described in the text after 8 days[a].

NH1-CPH		Alcalase-CPH	
DH (%)	Inhibition of lipid peroxidation (%)	DH (%)	Inhibition of lipid peroxidation
UCMP	2.00 ± 0.01	UCMP	2.00 ± 0.01
3.6	18.60 ± 1.27	5.6	25.30 ± 2.40
5.5	29.00 ± 1.55	7.6	37.00 ± 2.75
7.2	45.00 ± 1.83	8.7	42.00 ± 1.97
9.1	52.00 ± 2.05	9.6	46.50 ± 2.61
11.1	58.00 ± 2.68	10.8	52.00 ± 2.19
12.9	65.00 ± 1.62	11.6	56.50 ± 2.05
14.5	69.00 ± 1.55	12.3	58.00 ± 1.83
15.0	74.00 ± 1.62	12.5	58.30 ± 2.26

[a] Mean ± SD from triplicate determinations.

3.4. Antioxidant Activity

3.4.1. Inhibition of Linoleic Acid Autoxidation. In vitro lipid peroxidation inhibition activities of CPHs were determined by assessing their ability to inhibit oxidation of linoleic acid in an emulsified model system. As shown in Table 2, all hydrolysates with different DH could act as significant retarders ($P < 0.05$) of lipid peroxidation. The hydrolysates inhibiting lipid oxidation exhibited a nonlinear pattern. For the tow protease preparations used for hydrolysis reaction of cuttlefish muscle protein, the effect of inhibiting lipid

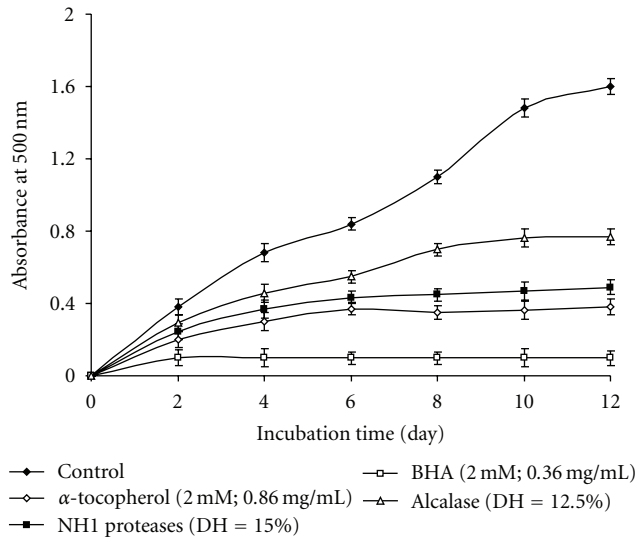


Figure 3: Comparison of inhibition of lipid peroxidation between NH1-CPH (DH = 15.0%), Alcalase-CPH (DH = 12.5%), at 1 mg/mL, α-tocopherol (2.0 mM; 0.86 mg/mL), and BHA (2.0 mM; 0.36 mg/mL). Bars represent standard deviations from triplicate determinations.

oxidation increased initially and peaked on 4.0 h of hydrolysis. According to Dong et al. [48], the effect of inhibiting lipid oxidation of Alcalase-hydrolyzed carp protein increased initially and peaked on 1.5 h of hydrolysis, followed by a slight decline during the 6 h of hydrolysis. Wu et al. [14] found that the antioxidant activity of hydrolysates derived from mackerel protein reached a maximum after 10 h of hydrolysis and then declined slightly during the 25 h of hydrolysis.

The comparative study between NH1-CPH (DH = 15%) and Alcalase-CPH (DH = 12.5%) and commercial antioxidants (α-tocopherol and BHA) on the inhibition of lipid peroxidation were conducted and illustrated in Figure 3. Only NH1-CPH presents a comparable effect than natural antioxidant α-tocopherol. However, both hydrolysates have moderate protective effect on lipid peroxidation in comparison with a synthetic antioxidant BHA.

Generally, the lack of a direct relationship between antioxidant activity and DH suggested that the specific composition (e.g., type of peptides, ratio of different freed amino acids) was an important factor as well [49]. Many researchers reported that low molecular weight peptides showed higher antioxidant activity [50]. In addition, Kong and Xiong [49] reported that if the hydrolysis of zein protein with Alcalase became too extensive (time of hydrolysis >4 h), the hydrolysate could reduce the peptide's ability to act as a physical barrier to prevent oxidants from reaching the lipid fraction in the liposome.

3.4.2. DPPH Radical Scavenging Activity. DPPH is a stable free radical that shows maximum absorbance at 517 nm. When DPPH radicals encounter a proton-donating substrate such as an antioxidant, the radicals would be scavenged, and the absorbance is reduced [51]. The decrease in absorbance is taken as a measure for radical-scavenging. Thus, the DPPH radicals were widely used to investigate the scavenging activity of some natural compounds. Table 3 shows the DPPH radical scavenging activities of CPHs with different DH. Both hydrolysates exhibited significant hydroxyl radical scavenging activity ($P < 0.05$).

Table 3: DPPH radical scavenging activity of CPHs with different DH at a sample concentration of 2.0 mg/mL[a].

NH1-CPH		Alcalase-CPH	
DH (%)	DPPH scavenging activity (%)	DH (%)	DPPH scavenging activity (%)
UCMP	1.67 ± 0.01	UCMP	1.67 ± 0.01
3.6	25.00 ± 1.32	5.6	13.00 ± 1.09
5.5	40.22 ± 1.08	7.6	28.66 ± 1.64
7.2	55.60 ± 1.30	8.7	44.40 ± 1.20
9.1	60.50 ± 1.45	9.6	53.00 ± 1.32
11.1	67.30 ± 1.54	10.8	58.30 ± 0.98
12.9	70.22 ± 1.25	11.6	63.30 ± 1.24
14.5	70.33 ± 2.26	12.3	65.80 ± 1.82
15.0	71.50 ± 0.01	12.5	66.06 ± 1.42

[a] Mean ± SD from triplicate determinations.

The DPPH radical scavenging activity of CPHs increased with increasing DH. At all designated DH, NH1-CPH showed higher activity than did Alcalase-CPH ($P < 0.05$). For NH1 proteases, when DH was increased from 3.6% to 15%, the DPPH radical scavenging activity markedly increased from 25.0% to 71.5%. The result suggested that the peptides in different hydrolysates might be different in terms of chain length and amino acid sequence, which contributed to varying capabilities of scavenging DPPH radicals. The increase in DPPH radical scavenging activity of both protein hydrolysates was in agreement with Thiansilakul et al. [11] who reported the increase in DPPH radical scavenging activity as the DH of the hydrolysate from round scad muscle protein prepared using Flavourzyme and Alcalase increased. However, Klompong et al. [10] found that DPPH radical scavenging activity of protein hydrolysate prepared from the muscle of yellow stripe trevally using Flavourzyme and Alcalase decreased when DH increased. Invert correlation between DH and DPPH radical scavenging activity was obtained for protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates using Protamex [52]. You et al. [53] reported that loach protein hydrolysate showed the greater DPPH radical scavenging activity when DH increased.

The scavenging effect of all CPHs on DPPH radical scavenging was concentration dependent (Figure 4). The result clearly indicated that hydrolysate produced by NH proteases exhibited the highest radical scavenging activity (75.0 ± 2.26% at 3 mg/mL). However, the hydrolysate showed a lower radical-scavenging activity than BHA (89.87 ± 1.5%) at the same concentration.

The IC_{50} values were determined. The lower IC_{50} indicates higher free radical scavenging ability. Hydrolysate

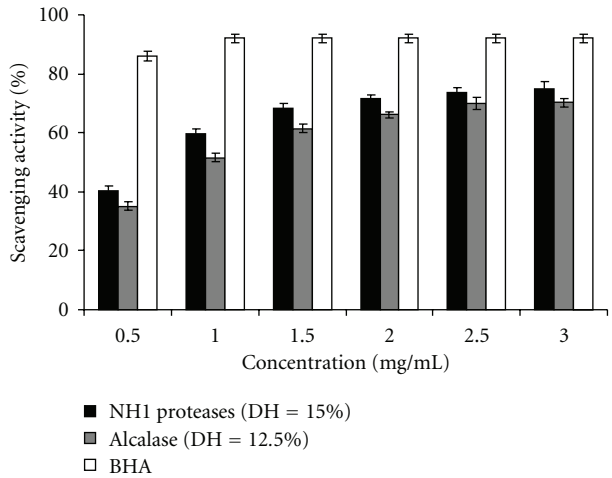


Figure 4: DPPH scavenging activity of NH1-CPH (DH = 15.0%) and Alcalase-CPH (DH = 12.5%) at different concentrations. BHA was used as positive control. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.

Table 4: Metal chelating activity of CPHs with different DH at a sample concentration of 2.0 mg/mL[a].

NH1-CPH		Alcalase-CPH	
DH (%)	Metal chelating activity (%)	DH (%)	Metal chelating activity (%)
UCMP	1.22 ± 0.02	UCMP	1.22 ± 0.02
3.6	26.00 ± 1.32	5.6	16.00± 1.25
5.5	36.00 ± 2.36	7.6	21.00 ± 1.17
7.2	44.60 ± 1.14	8.7	27.00 ± 0.81
9.1	48.80 ± 0.21	9.6	37.00 ± 1.48
11.1	56.40 ± 1.06	10.8	46.40 ± 1.16
12.9	62.00 ± 1.13	11.6	52.00 ± 1.00
14.5	64.00 ± 0.84	12.3	54.00 ± 0.65
15.0	65.00 ± 1.88	12.5	55.60 ± 0.33

[a] Mean ± SD from triplicate determinations.

obtained by treatment with NH1 proteases showed an active radical scavenger with IC_{50} about 0.68 mg/mL ± 0.017 than Alcalase protein hydrolysate (IC_{50} = 0.99 mg/mL ± 0.024). DPPH is a stable free radical and can be scavenged with a proton-donating substance, such as an antioxidant [54]. Therefore, protein hydrolysates from cuttlefish muscle more likely contained peptides acting as hydrogen donors, thereby scavenging free radicals by converting them into more stable products.

3.4.3. Ferrous Chelating Activity. Ferrous chelating activities of NH1-CPH and Alcalase-CPH, determined at a sample concentration of 2.0 mg/mL, are presented in Table 4. The chelating activity of hydrolysates increased with DH. NH1-CPH showed a higher chelating activity ($P < 0.05$) than Alcalase-CPH at any designated DH. Ferrous ion (Fe^{2+}) is the most powerful prooxidant among metal ions [55], leading to the initiation and acceleration of lipid oxidation by interaction with hydrogen peroxide in a Fenton reaction to produce the reactive oxygen species, hydroxyl free radical ($OH^{\bullet}$) [56]. Therefore, chelation of metal ions by peptides in hydrolysates could retard the oxidative reaction. The result indicated that a higher DH rendered NH1-CPH and Alcalase-CPH with higher metal chelating activities. The shorter chain of peptides might lose their ability to form the complex with Fe^{2+}. For both crude protease preparations used, NH1-CPH (DH = 15%) and Alcalase-CPH (DH = 12.5%), obtained after 4 h of hydrolysis, exhibited a higher ferrous-chelating abilities 65.0 ± 1.77% and 55.6 ± 1.45%, respectively. The increased metal chelating activity could be increased through hydrolysis with certain enzymes.

Peptides in NH1-CPH and Alcalase-CPH could effectively chelate the Fe^{2+}, leading to the retardation of initiation stage. The result indicated that the excessive hydrolysis of muscle protein resulted in the enhanced ferrous chelating activity, compared with the limited hydrolysis. The higher chelating activities of both hydrolysates were coincidental with the higher DPPH and *in vitro* lipid peroxidation inhibition activity, as the DH increased. Fe^{2+} chelating activity of round scad protein hydrolysate prepared using Alcalase showed the increase in chelating activity with increasing DH, but those treated with Flavourzyme showed no difference in activity at all DH tested [11]. With the same enzymes used, chelating activity of protein hydrolysate prepared from the muscle of yellow stripe trevally increased with increasing DH [10]. Higher ferrous chelating activity was reported for hydrolysate of silver carp using Alcalase and Flavourzyme when DH increased [48]. Apart from Fe, other transition metals, such as Cu and Co, can affect the rate of lipid oxidation and decomposition of hydroperoxide. Theodore et al. [52] reported that Cu^{2+} chelating activity of catfish protein hydrolysate increased with increasing DH.

Some proteins and peptides can chelate metal ions like Fe^{2+} due to the presence of carboxyl and amino groups in the side chains of acidic and basic amino acids [57]. Alcalase is endopeptidase capable of hydrolyzing proteins with broad specificity for peptide bonds and is prefered for the uncharged residue [10], whereas NH1 proteases is a mixture of multiple proteases, which can produce both amino acids and peptides [58]. Hydrolysates showing different antioxidative activities might be attributed to the differences in the exposed side chains of peptides as governed by the specificity of different proteases towards peptide bonds in the proteins [59]. DH also greatly influenced the peptide chain length. The higher DH was, the more cleavage of peptide chains took place. Peptides with various sizes and compositions had different capacities of scavenging or quenching free radicals [10, 11]. NH1 proteases and Alcalase more likely cleaved the peptide bonds in cuttlefish muscle at different positions, resulting in the different products with varying antioxidative activities.

The ferrous chelating activity, at different concentration, was also studied with NH1-CPH and Alcalase-CPH having, respectively, a DH of 15% and 12.5%, and compared with that of the EDTA (Figure 5). As shown in Figure 5, both

Table 5: Antioxidant activity using the β-carotene bleaching method of CPHs with different DH at a sample concentration of 2.0 mg/mL[a].

NH1-CPH		Alcalase-CPH	
DH (%)	Antioxidant activity (%)	DH (%)	Antioxidant activity (%)
UCMP	1.43 ± 0.01	UCMP	1.43 ± 0.01
3.6	16.50 ± 2.65	5.6	26.50 ± 1.22
5.5	31.50 ± 1.61	7.6	41.50 ± 1.47
7.2	44.50 ± 1.30	8.7	54.50 ± 1.60
9.1	56.50 ± 2.31	9.6	61.50 ± 1.66
11.1	67.50 ± 1.68	10.8	64.50 ± 1.47
12.9	72.00 ± 1.42	11.6	67.50 ± 1.68
14.5	72.20 ± 1.01	12.3	69.50 ± 1.10
15.0	72.60 ± 0.65	12.5	70.90 ± 0.98

[a]Mean ± SD from triplicate determinations.

activities increased with increasing hydrolysate concentration, and reached a maximum activity with 2 mg/mL, and further increase in hydrolysate concentration did not affect the activity. The IC_{50} values were about 0.94 ± 0.24 mg/mL and 1.25 ± 0.68 mg/mL, for NH1-CPH, and Alcalase-CPH respectively. However, both hydrolysates showed a lower metal chelating activity than did EDTA at all concentrations tested. For example, at 2 mg/mL the metal chelating activities of NH1-CPH, Alcalase-CPH, and EDTA were 74.0% ± 1.55, 61.2% ± 1.34, and 98% ± 1.02, respectively.

3.4.4. Antioxidant Activity in β-Carotene Linoleic Acid Emulsion Model System. The antioxidative activity of cuttlefish protein hydrolysates, NH1-CPH, and Alcalase-CPH were studied in β-carotene linoleic acid oxidation model system as presented in Table 5. When the oxidation of linoleic acid occurs, free radicals formed are able to attack the highly unsaturated β-carotene molecules. As a result, β-carotene is oxidized, leading to the losses in chromophore and characteristic orange colour of β-carotene [60]. The presence of antioxidant in linoleic acid emulsion system hinders β-carotene bleaching, due to the chain-breaking inhibition of lipid peroxidation by neutralizing the linoleic free radical formed.

As shown in Table 5, NH1-CPH and Alcalase-CPH inhibited significantly ($P < 0.05$) the oxidation of β-carotene to different degrees. During the first hour of hydrolysis, Alcalase-CPH achieved rapidly a higher ability to prevent the bleaching of β-carotene (61.5 ± 1.66%) than NH1-CPH (56.5 ± 2.31%). When hydrolysis reached a final DH, both hydrolysates showed a similar antioxidant activity, approximately 70%.

The antioxidant activity of NH1-CPH (DH = 15%) and Alcalase-CPH (DH = 12.5%) at different concentrations was also evaluated (Figure 6). As can be seen in Figure 6, the antioxidant activity of both cuttlefish protein hydrolysates increased with increasing sample concentration. The NH1 protein hydrolysate showed the highest ability to prevent bleaching of β-carotene with 81.11% inhibition at 3 mg/mL.

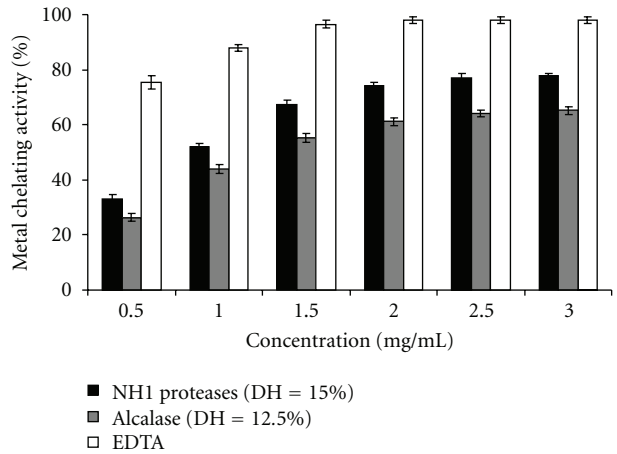


Figure 5: Relative chelating activity of NH1-CPH (DH =15.0%) and Alcalase-CPH (DH = 12.5%) at different concentrations. EDTA was used as positive control. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.

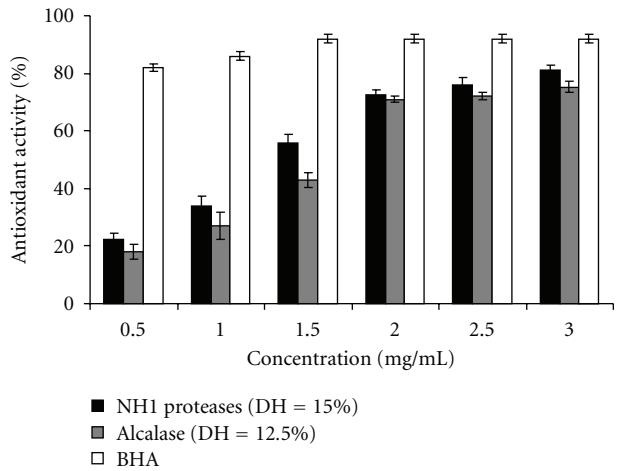


Figure 6: Antioxidant activity using the β-carotene bleaching method of NH1-CPH (DH = 15.0%) and Alcalase-CPH (DH = 12.5%) at different concentrations. BHA was used as positive control. Bars represent standard deviations from triplicate determinations.

Thereafter, the lower β-carotene bleaching in the systems containing these hydrolysates was observed, compared with the system added with BHA. The ability of hydrolysates to prevent the bleaching of β-carotene was more likely governed by their amphiphilic properties of amino acids compositions. Localization/orientation at the interface of hydrophobic part of peptides to oil phase and of hydrophilic portion to aqueous phase at the interface is the major principle for emulsion stabilization [60]. The result suggested that protein hydrolysates tested contained peptides with both hydrophilic and hydrophobic portions, in which the peptide segments with hydrophobicity in nature could adsorb at the oil droplet, while the hydrophilic domains preferably suspended in the aqueous phase. The localization of peptides with antioxidative activity at the oil-water interface could

Table 6: Amino acid composition (% mole) of CPHs using Alcalase and NH1 proteases. Values shown are mean values of three measurements.

Amino acid[a]	Alcalase-CPH	NH1-CPH
Aspartic acid	6.01	6.14
Threonine[c]	2.10	2.66
Serine	9.14	9.80
Glutamic acid	11.33	9.54
Glycine	3.05	3.11
Alanine	3.65	3.60
Valine[c]	6.01	6.89
Methionine[c]	2.95	3.01
Isoleucine[c]	3.62	3.81
Leucine[c]	8.78	8.90
Tyrosine	5.80	5.72
Phenylalanine[c]	4.01	3.99
Histidine[c]	11.61	11.23
Lysine[c]	9.77	9.55
Arginine	11.71	11.57
Cysteine	0.17	0.15
Proline	0.29	0.33
TAA[d]	100	100
THAA[d]	32.36	33.64
TEAA/TAA%	48.85	50.04

[a]The aspartic and glutamic acid contents include, respectively, asparagines and glutamine.
[b]Undigested cuttlefish muscle protein.
[c]Essential amino acids.
[d]TAA ≡ total amino acids; THAA ≡ total hydrophobic amino acids; TEAA ≡ total essential amino acids.

favor their antioxidative activity for oil droplet. As a result, the antioxidative activity could be maximized at the interface of emulsion.

3.5. Amino Acid Composition. Amino acid compositions of CPHs are shown in Table 6. Both hydrolysates contained histidine and arginine as the major amino acids and were also rich in glutamic acid/glutamine, leucine, lysine, and serine. However, both hydrolysates contained low level of cysteine and proline. From the results, both hydrolysates contained a low level of proline up to 0.29% and 0.33%.

Based on total amino acids, essential amino acids made up 48.85% and 50.04% of Alcalase-CPH and NH1-CPH, respectively. Therefore, they could serve as the excellent source of useful nutrients. Generally, the differences in amino acid composition between both hydrolysates depended on the existing differences in enzyme specificity and hydrolysis conditions [47].

As presented in Table 6, the total content of hydrophobic amino acids of cuttlefish protein hydrolysates obtained at DH of 12.5% and 15% with Alcalase and NH1 proteases was higher, which accounted for 32.36% and 33.64% of the total amino acids, respectively. Amino acids in cuttlefish protein hydrolysates are possibly involved in antioxidative activity. Amino acids have been known to exhibit antioxidant activity; tryptophan and histidine showed high antioxidative activity in comparison with methionine, cysteine, glycine, and alanine [61]. Antioxidative activity of histidine or a histidine containing peptide may be attributed to the chelating and lipid radical-trapping ability of the imidazole ring, whereas the tyrosine residue in the peptide may act as a potent hydrogen donor [16]. Generally, aromatic amino acids are considered to be effective radical scavengers, because they can donate protons easily to electron-deficient radicals. At the same time, their antioxidative stability can remain via resonance structures [62]. From the results, cuttlefish protein hydrolysate had a high nutritional value, based on its amino acid profile.

4. Conclusions

The objective of this work was to investigate biochemical properties and the potential antioxidant effect of cuttlefish muscle protein during hydrolysis. The cuttlefish protein hydrolysed with alkaline proteases from *B. licheniformis* NH1 (NH1-CPH) and Alcalase (Alcalase-CPH) resulted products with an excellent solubility over a wide pH range. The antioxidative activity of protein hydrolysate from cuttlefish muscle was governed by enzymes used. Moreover, NH1-CPH and Alcalase-CPH exhibited high antioxidant activity, and the highest activities were obtained with a DH of 15% and 12.5%, respectively. Although both hydrolysates were less effective than positive controls like BHA, fish hydrolysates in general are considered safe products, and they are not subjected to restricted use in foods. Therefore, cuttlefish muscle protein hydrolysate can be used in food systems as a natural additive possessing antioxidative properties.

Further works should be done to isolate and identify the specific peptides in cuttlefish protein hydrolysates that are responsible for the overall antioxidative capability.

Acknowledgment

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia.

References

[1] M. N. Maillard, M. H. Soum, P. Boivin, and C. Berset, "Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content," *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, vol. 29, no. 3, pp. 238–244, 1996.

[2] D. A. Butterfield, A. Castegna, C. B. Pocernich, J. Drake, G. Scapagnini, and V. Calabrese, "Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 13, no. 8, pp. 444–461, 2002.

[3] B. Halliwell, M. A. Murcia, S. Chirico, and O. I. Aruoma, "Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 35, no. 1-2, pp. 7–20, 1995.

[4] N. Ito, M. Hirose, S. Fukushima, H. Tsuda, T. Shirai, and M. Tatematsu, "Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 24, no. 10-11, pp. 1071–1082, 1986.

[5] S. Zhong, C. Ma, Y. C. Lin, and Y. Luo, "Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 126, no. 4, pp. 1636–1642, 2011.

[6] S. Khantaphant, S. Benjakul, and H. Kishimura, "Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases," *Process Biochemistry*, vol. 46, no. 1, pp. 318–327, 2011.

[7] A. Bougatef, N. Nedjar-Arroume, L. Manni et al., "Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins," *Food Chemistry*, vol. 118, no. 3, pp. 559–565, 2010.

[8] A. Bougatef, M. Hajji, R. Balti, I. Lassoued, Y. Triki-Ellouz, and M. Nasri, "Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases," *Food Chemistry*, vol. 114, no. 4, pp. 1198–1205, 2009.

[9] Z. J. Qian, W. K. Jung, H. G. Byun, and S. K. Kim, "Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage," *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 9, pp. 3365–3371, 2008.

[10] V. Klompong, S. Benjakul, D. Kantachote, and F. Shahidi, "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*, vol. 102, no. 4, pp. 1317–1327, 2007.

[11] Y. Thiansilakul, S. Benjakul, and F. Shahidi, "Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 266–287, 2007.

[12] S. Y. Jun, P. J. Park, W. K. Jung, and S. K. Kim, "Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein," *European Food Research and Technology*, vol. 219, no. 1, pp. 20–26, 2004.

[13] S. Sathivel, P. J. Bechtel, J. Babbitt et al., "Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates," *Journal of Food Science*, vol. 68, no. 7, pp. 2196–2200, 2003.

[14] H. C. Wu, H. M. Chen, and C. Y. Shiau, "Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)," *Food Research International*, vol. 36, no. 9-10, pp. 949–957, 2003.

[15] E. A. Pena-Ramos and Y. L. Xiong, "Antioxidant activity of soy protein hydrolyzates in a liposomial system," *Journal of Food Science*, vol. 67, no. 8, pp. 2952–2956, 2002.

[16] J. Y. Je, P. J. Park, and S. K. Kim, "Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate," *Food Research International*, vol. 38, no. 1, pp. 45–50, 2005.

[17] K. Suetsuna, "Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle," *Marine Biotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 5–10, 2000.

[18] A. Moure, H. Domínguez, and J. C. Parajó, "Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates," *Process Biochemistry*, vol. 41, no. 2, pp. 447–456, 2006.

[19] R. Balti, N. Nedjar-Arroume, E. Y. Adjé, D. Guillochon, and M. Nasri, "Analysis of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 6, pp. 3840–3846, 2010.

[20] N. E. Hadj-Ali, R. Agrebi, B. Ghorbel-Frikha, A. Sellami-Kamoun, S. Kanoun, and M. Nasri, "Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Sepia officinalis* NH1," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, no. 4, pp. 515–523, 2007.

[21] A. A. Kembhavi, A. Kulkarni, and A. Pant, "Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from Bacillus subtilis NCIM No. 64," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 38, no. 1-2, pp. 83–92, 1993.

[22] J. Adler-Nissen, *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier, New York, NY, USA, 1986.

[23] AOAC, *Official Methods of Analysis*, Secs, Arlington, Va, USA, 1995.

[24] K. Tsumura, T. Saito, K. Tsuge, H. Ashida, W. Kugimiya, and K. Inouye, "Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis," *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, vol. 38, no. 3, pp. 255–261, 2005.

[25] A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David, "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 177, no. 2, pp. 751–766, 1949.

[26] T. Osawa and M. Namiki, "Natural antioxidants isolated from Eucalyptus leaf waxes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 33, no. 5, pp. 777–780, 1985.

[27] H. Mitsuda, K. Yasumoto, and K. Iwami, "Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid," *Eiyo to Shokuryo*, vol. 19, pp. 210–221, 1996.

[28] P. Bersuder, M. Hole, and G. Smith, "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*, vol. 75, no. 2, pp. 181–187, 1998.

[29] E. A. Decker and B. Welch, "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, no. 3, pp. 674–677, 1990.

[30] I. I. Koleva, T. A. Van Beek, J. P. H. Linssen, A. De Groot, and L. N. Evstatieva, "Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods," *Phytochemical Analysis*, vol. 13, no. 1, pp. 8–17, 2002.

[31] R. G. D. Steel and J. H. Torrie, *Principle and Procedure of Statistics*, McGraw–Hill, New York, NY, USA, 1980.

[32] C. Van der Ven, H. Gruppen, D. B. A. De Bont, and A. G. J. Voragen, "Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology," *International Dairy Journal*, vol. 12, no. 10, pp. 813–820, 2002.

[33] K. C. Hsu, "Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product," *Food Chemistry*, vol. 122, no. 1, pp. 42–48, 2010.

[34] W. A. M. Mutilangi, D. Panyam, and A. Kilara, "Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins," *Journal of Food Science*, vol. 60, no. 5, pp. 1104–1109, 1995.

[35] X. Kong, H. Zhou, and H. Qian, "Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates," *Food Chemistry*, vol. 102, no. 3, pp. 759–763, 2007.

[36] S. Benjakul and M. T. Morrissey, "Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, no. 9, pp. 3423–3430, 1997.

[37] G. A. Gbogouri, M. Linder, J. Fanni, and M. Parmentier, "Influence of hydrolysis degree on the functional properties of

salmon byproducts hydrolysates," *Journal of Food Science*, vol. 69, no. 8, pp. C615–C622, 2004.

[38] B. D. Rebeca, M. T. Pena-vera, and M. Diaz-Castaneda, "Production of fish protein hydrolysates with bacteria proteases; yield and nutritional value," *Journal of Food Science*, vol. 56, no. 2, pp. 309–314, 1991.

[39] H. G. Kristinsson and B. A. Rasco, "Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 3, pp. 657–666, 2000.

[40] A. M. Liceaga-Gesualdo and E. C. Y. Li-Chan, "Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*)," *Journal of Food Science*, vol. 64, no. 6, pp. 1000–1004, 1999.

[41] A. Gildberg, "Enzymic processing of marine raw materials," *Process Biochemistry*, vol. 28, no. 1, pp. 1–15, 1994.

[42] J. Spinelli, B. Koury, and R. Miller, "Approaches to the utilisation of fish for the preparation of protein isolates; enzymic modifications of myofibrillar fish proteins," *Journal of Food Science*, vol. 37, no. 4, pp. 604–608, 1972.

[43] S. Nilsang, S. Lertsiri, M. Suphantharika, and A. Assavanig, "Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases," *Journal of Food Engineering*, vol. 70, no. 4, pp. 571–578, 2005.

[44] O. R. Fennema, "Amino acids, peptides, and proteins," in *Food Chemistry*, pp. 321–420, Marcel Dekker, New York, NY, USA, 1996.

[45] J. E. Kinsella, "Functional properties of proteins in foods: a survey," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 7, no. 3, pp. 219–280, 1976.

[46] D. A. Sorgentini and J. R. Wagner, "Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins," *Food Research International*, vol. 35, no. 8, pp. 721–729, 2002.

[47] J. M. Chobert, C. Bertrand-Harb, and M. G. Nicolas, "Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 36, no. 5, pp. 883–892, 1988.

[48] S. Dong, M. Zeng, D. Wang, Z. Liu, Y. Zhao, and H. Yang, "Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)," *Food Chemistry*, vol. 107, no. 4, pp. 1485–1493, 2008.

[49] B. H. Kong and Y. L. Xiong, "Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 16, pp. 6059–6068, 2006.

[50] N. Rajapakse, E. Mendis, W. K. Jung, J. Y. Je, and S. K. Kim, "Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties," *Food Research International*, vol. 38, no. 2, pp. 175–182, 2005.

[51] K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, and T. Nakamura, "Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 40, no. 6, pp. 945–948, 1992.

[52] A. E. Theodore, S. Raghavan, and H. G. Kristinsson, "Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 16, pp. 7459–7466, 2008.

[53] L. You, M. Zhao, C. Cui, H. Zhao, and B. Yang, "Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 10, no. 2, pp. 235–240, 2009.

[54] M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature*, vol. 181, no. 4617, pp. 1199–1200, 1958.

[55] R. Yomauchi, Y. Tatsumi, M. Asano, K. Kato, and Y. Ueno, "Effect of metal salts and fructose on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions," *Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 52, no. 3, pp. 849–850, 1988.

[56] H. O. Hultin, "Oxidation of lipids in seafoods," in *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*, F. Shahidi and J. R. Botta, Eds., pp. 49–74, Blackie Academic, New York, NY, USA, 1994.

[57] A. G. P. Samaranayaka and E. C. Y. Li-Chan, "Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*)," *Food Chemistry*, vol. 107, no. 2, pp. 768–776, 2008.

[58] N. Hmidet, N. El Hadj Ali, N. Zouari-Fakhfakh, A. Haddar, M. Nasri, and A. Sellemi-Kamoun, "Chicken feathers: a complex substrate for the co-production of α-amylase and proteases by *B. licheniformis* NH1," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 37, no. 9, pp. 983–990, 2010.

[59] T. Bayram, M. Pekmez, N. Arda, and A. S. Yalçin, "Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment," *Talanta*, vol. 75, no. 3, pp. 705–709, 2008.

[60] W. Binsan, S. Benjakul, W. Visessanguan et al., "Composition, antioxidative and oxidative stability of mungoong, a shrimp extract paste, from the cephalothorax of white shrimp," *Journal of Food Lipids*, vol. 15, no. 1, pp. 97–118, 2008.

[61] T. Riisom, R. J. Sims, and J. A. Fioriti, "Effect of amino acids on the autoxidation of safflower oil in emulsions," *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 57, no. 10, pp. 354–359, 1980.

[62] N. Rajapakse, E. Mendis, H. G. Byun, and S. K. Kim, "Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 16, no. 9, pp. 562–569, 2005.

Chapitre IV :

Extraction de la gélatine

Article 8:

Balti R, Jridi M, Sila A, Souissi N, Nedjar-Arroume N, Guillochon D and Nasri M (**2011**). Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. *Food Hydrocolloids*, 25, 943-950.

La gélatine n'est pas une protéine de nature, elle dérive d'une protéine fibreuse le collagène, constituant principal de la peau, les arrêtes et les tissus conjonctifs. La gélatine est produite par hydrolyse partielle du collagène natif. Au cours du procédé de fabrication de la gélatine, la matière première brute d'origine animale (peau, os, cartilage ou ligament) est traitée avec un acide ou une base diluée, aboutissant à un clivage partiel des liaisons, ce qui conduit à des modifications de la structure spatiale de la protéine et l'obtention du collagène hydrosoluble à chaud, appelé gélatine (Schrieber et Gareis, 2007).

La gélatine est vitreuse, fragile, légèrement jaunâtre ou blanchâtre et quasiment sans goût et sans odeur. Elle est fournie sous différentes formes : gros granulés, poudre fine ou feuilles. La gélatine non gélifiante est utilisée principalement pour sa valeur riche en protéines. Ingrédient traditionnel de la cuisine familiale depuis des siècles, la gélatine est aujourd'hui devenue un produit industriel aux multiples utilisations. Elle est très utilisée pour ses applications culinaires, pharmaceutiques, photographiques et techniques ; mais c'est aussi un ingrédient primordial dans l'industrie agroalimentaire.

La demande mondiale de la gélatine a augmenté au cours de ces dernières années. Des rapports récents indiquent que la production mondiale annuelle de la gélatine est presque de 326,000 tonnes, avec 46 % de la gélatine extraite à partir de la peau du porc, suivie par la gélatine bovine qui représente 29,4 %, 23,1 % de la gélatine est extraite à partir des os et 1,5 % à partir d'autres sources (GME, 2008). Cependant, bien que la gélatine possède de nombreuses applications, le pessimisme et des soucis persistent toujours chez les consommateurs en ce qui concerne son utilisation (Asher, 1999). Depuis plusieurs années, que ce soit au Etats Unis ou en Europe, la consommation de viandes bovines diminue, ce qui réduit progressivement la ressource en os et peaux de cette origine. Ce phénomène a été accentué ces dernières années par la crise de l'encéphalopathie spongiforme bovine et les mesures réglementaires consécutives. En ce qui concerne les gélatines d'origine porcine, leur développement est limité par des nouveaux débouchés trouvés pour la matière première de départ, couennes alimentaires et snacks pour apéritifs par exemple et par des considérations religieuses interdisant leur utilisation dans certains pays. De plus, récemment plusieurs recherches ont été menées pour prouver que le collagène et la gélatine extraite à partir des tissus des animaux sont capables de transmettre des vecteurs pathogènes comme les prions (Wilesmith, *et al*., 1991). La recherche d'autres matières premières pouvant servir à la fabrication de la gélatine et donc particulièrement importante.

Les chercheurs académiques et industriels continuent toujours à la recherche d'une alternative à la gélatine et de trouver des nouvelles sources de gélatine qui pourrait être plus

acceptée. On s'attend dans l'avenir le plus proche que la peau et les os issus de transformation des volailles constitueront la matière première d'extraction de la gélatine, mais la production commerciale est actuellement reste très limitée à cause des rendements très bas obtenus. La peau des volailles représente aussi une matière première désirée pour d'autres applications alimentaires (Schrieber et Gareis, 2007). D'autre part, on sait depuis longtemps que la peau, les écailles et les arêtes de poisson renferment également du collagène qui s'apparente à celui trouvé chez les mammifères. Depuis plusieurs années, l'industrie de la pêche et de la conserverie, pour répondre à la demande des consommateurs en produits frais et de qualité, notamment celle de filets de poissons, a développé la découpe des poissons dès leur capture ou à terre après décongélation des poissons. Il en résulte une certaine disponibilité en sous-produits de la pêche, peaux de poisson en particulier, que l'on peut envisager de transformer en gélatine. De ce fait, la gélatine marine extraite à partir des co-produits de transformation de poisson a été mise en évidence comme une meilleure alternative aux gélatines des mammifères, particulièrement par ces propriétés intéressantes comme sa basse température de fusion qui facilite sa dissolution au niveau de la bouche. Ceci a été notamment réalisé par la société NORLAND PRODUCTS qui produit depuis 1985 des solutions aqueuses de gélatine de poisson par extraction acide de peaux de cabillaud. Les gélatines correspondantes ne sont toutefois pas gélifiantes dans les conditions habituelles de mesure de la force en gel des gélatines et restent liquides en solution même lorsque la concentration en gélatine s'élève jusqu'à 45 %. Cependant, la production de la gélatine de poisson est toujours faible, elle contribue seulement à environ 1 % de la production mondiale annuelle de gélatine (Arnesen et Gildberg, 2006).

La gélatine extraite à partir des sources marines se présente comme une alternative possible à la gélatine bovine (Rustad, 2003 ; Kim et Mendis, 2006 ; Wasswa *et al*., 2007). Un des avantages majeurs de la gélatine d'origine marine est qu'elle n'est pas associée au risque de la maladie de la vache folle. La gélatine extraite à partir des produits de la mer est acceptable par l'Islam, et peut être utilisée avec des restrictions minimales dans le Judaïsme et l'Hindouisme. La conversion du collagène en gélatine soluble est achevée par un chauffage en milieu acide ou basique (Karim et Bhat, 2009). La solubilisation thermique du collagène est due au clivage de certaines liaisons covalentes inter et intramoléculaire de la protéine. En plus, certaines liaisons amides au niveau de la chaîne élémentaire de la molécule du collagène sont hydrolysées (Bailey et Light, 1989).

Récemment, la gélatine d'origine marine a été extraite à partir de plusieurs espèces de poisson et d'invertébrés marins à savoir le tilapia du Mozambique (*Oreochromis*

mossambicus), le tilapia du Nile (*O. nilotica*) (Jamilah et Harvinder, 2002), la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) (Kołodziejsk *et al*., 2004 ; Arnesen et Gildberg, 2006), la perche du Nile (*Lates niloticus*) (Muyonga *et al*., 2004), le thon albacore (*Thunnus albacares*) (Cho *et al*., 2005), le saumon Atlantique (*Salmo salar*) (Arnesen et Gildberg, 2007), la courbine barbiche (*Johnius dussumieri*), le comète fine (*Decapterus macrosoma*) (Cheow *et al*., 2007) et le poisson chat (*Ictalurus Punctatus*) (Liu *et al*., 2008).

Rappelons que l'industrie de la seiche génère de grandes quantités de déchets solides et liquides qui peuvent causer un problème majeur de l'environnement. En effet, la méthode de transformation de la seiche conduit à l'obtention de plusieurs types de déchets et essentiellement la peau qui représente à elle seule environ 7 %. Il est donc fort intéressant d'utiliser cette matière première pour l'extraction de biomolécules à intérêt industriel. Dans ce contexte, le présent travail s'inscrit dans le cadre général de valorisation des déchets de la seiche et à pour objectif la mise en place d'un procédé enzymatique pour l'extraction de la gélatine, ainsi que l'étude ces propriétés fonctionnelles et texturales.

Extraction par voie enzymatique de la gélatine à partir de la peau de la seiche (*Sepia officinalis*) et étude comparative de ces propriétés fonctionnelles avec celles de la gélatine bovine commerciale

Rafik Balti, Mourad Jridi, Assaad Sila, Nabil Souissi, Naima Nedjar-Arroume, Didier Guillochon, Moncef Nasri

Généralement, la gélatine marine et spécialement celle extraite à partir des poissons est produite par un procédé basé sur un traitement acide doux (gélatine type A). Ce traitement est particulièrement appliqué pour des matériaux moins réticulés comme le collagène de la peau de porc. Le traitement acide permet de déstabiliser les molécules de collagènes et se traduit par une faible hydrolyse des liaisons peptidiques et une dégradation négligeable des acides aminés. Chez certaines espèces marines, le collagène est hautement réticulé et stable aux traitements thermique et acide. Donc des rendements d'extraction très faibles de la gélatine résultante ont été généralement obtenus en utilisant le procédé traditionnel. Afin d'améliorer ces rendements des protéases acides telle que la pepsine peuvent être employées. Dans ce contexte, la gélatine a été extraite à partir de la peau de la seiche commune (*S. officinalis*) en utilisant l'extrait stomacal de l'émissole lisse (*M. mustelus*) (ESEL) comme outil enzymatique. De plus, la composition physico-chimique et certaines propriétés fonctionnelles et texturales de la gélatine extraite ont été déterminées et comparées avec celles de la gélatine bovine halal commerciale.

Les peaux de la seiche commune (*S. officinalis*) ont été tout d'abord découpées en morceaux (0,5 × 0,5 cm), puis lavées à l'eau de robinet pour éliminer les composés indésirables. Le procédé adopté consiste à réaliser un prétraitement alcalin pour éliminer les pigments et les protéines non collagènes. Les peaux ont subit un traitement par une solution de NaOH (0,05 M) avec un rapport de 1:10 (w/v) pendant 2 h à température ambiante (22 ± 1 °C). Les peaux ainsi traitées ont été par la suite abondamment lavées à l'eau de robinet froide jusqu'à neutralité pour éliminer l'excès de base. Le premier traitement est un traitement acide effectué avec une solution d'acide acétique (0,2 M) avec un ratio de 1:10 (w/v) pendant 48 h à 4 °C. Cette étape a pour objectif le gonflement et le ramollissement des peaux en préparation à la dénaturation et l'extraction de la gélatine. Le traitement acide a été rendu plus efficace, notamment dans l'amélioration du rendement d'extraction par l'ajout d'un extrait enzymatique acide. L'extrait enzymatique appliqué dans cette étape est l'extrait gastrique de

l'émissole lisse utilisée à des rapports enzyme/substrat (E/S) allant de 2,5 à 15 U/g. Le second traitement a pour objectif l'extraction de la gélatine. Cette extraction a été effectuée dans un milieu neutralisé (pH~7,5) à 50 °C pendant 18 h sous agitation continue de 200 rpm. Enfin, la solution de gélatine a été collectée par centrifugation puis le surnagent a été séché par lyophilisation.

Le rendement d'extraction de la gélatine à partir de la peau de la seiche commune sans ajout d'extrait acide (Contrôle) est uniquement de 2,21 %, alors que ce rendement augmente en fonction des rapports E/S utilisés. Le meilleur rendement en hydroxyproline (52,37 %) a été obtenu en utilisant l'ESEL à raison de 15 U/g. Ce rendement de la gélatine extraite avec l'ESEL est approximativement 5 fois plus élevé que celui obtenu sans traitement enzymatique. D'autre part, le rendement d'extraction calculé par rapport à la matière première humide de départ est de l'ordre de 7,84 %, obtenu avec le même rapport E/S utilisé.

En général, la composition des gélatines est très variable. Cette variation est étroitement liée au mode de préparation, à l'espèce et au type de tissu utilisé. Les teneurs des principaux constituants (protéines, matières grasses, cendres et eau) de la peau de la seiche brute ainsi que ceux de la gélatine extraite à partir de la peau de la seiche (GPS) et la gélatine bovine halal commerciale (GBH) ont été déterminées. L'analyse physicochimique de la peau utilisée comme matrice pour l'extraction de la gélatine a indiqué une teneur en protéines de l'ordre de 14 % et une humidité de 82,77 %.

L'étude comparative de la composition de la GPS et la GBH a montré que les deux gélatines présentent approximativement la même composition. En effet, elles possèdent une teneur en protéine qui dépasse 90 % et une faible humidité (< 10 %), cette dernière caractéristique contribue à la stabilité et la conservation du produit. La teneur en matière grasse est également faible ce qui empêche l'oxydation de la gélatine lors du stockage.

La détermination de la composition en acides aminés de la GPS et la GBH a été réalisée. Ces deux gélatines ont montré une composition typique du collagène type I, le résidu glycine représente approximativement le 1/3 du nombre total des acides aminés. De plus, il a été noté que la teneur en imino acides (proline et hydroxyproline) est plus élevée au niveau de la gélatine bovine (219 résidus/1000) qu'au niveau de la gélatine extraite à partir de la peau de la seiche commune (180 résidus/1000). Également, la composition en acides aminés des deux gélatines a montré des teneurs faibles en méthionine et tyrosine. Par contre, la teneur en sérine de la GPS (49 résidus/1000) est plus élevée par rapport à celle de la GBH (29 résidus/1000). Également, la teneur en hydroxyproline de la GPS est relativement élevée (84 résidus/1000), alors qu'elle demeure faible que celle de la gélatine bovine (96 résidus/1000).

A part la composition en acides aminés, les propriétés fonctionnelles de la gélatine sont influencées par la distribution des masses moléculaires, la structure et la composition de ces sous-unités. Les gélatines GPS et GBH ont été analysées sur gel de polyacrylamide (7,5 %) dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les profils électrophorétiques de la GPS et la GBH obtenus ont montré une répartition très similaire des chaînes protéiques. Egalement, ces deux gélatines ont présenté une distribution des masses moléculaires typique au collagène type I à savoir deux types de bande qui correspondent aux chaînes α (α_1 et α_2) et la chaîne β (dimère des chaînes α_1 et α_2) qui sont initialement présent au niveau de la molécule mère du collagène. Des fragments protéiques de masses moléculaires inférieures à celles des chaînes α ont été également observés mais leur nombre est minime. Ces fragments résultent de l'hydrolyse partielle de certaines liaisons inter-chaînes au cours de la conversion thermique du collagène en gélatine.

Le pouvoir gélifiant (force du gel) est l'une des caractéristiques rhéologiques principale des gels de gélatines. Cette propriété est exprimée en degré bloom. Le bloom est la force maximale mesurée lors de la pénétration d'un cylindre standardisé à une profondeur de 4 mm et avec une vitesse de 1 mm/seconde dans un gel de gélatine préparé à une concentration de 6,67 % et maturé pendant 18 h à 4 °C. La force du gel dépend essentiellement de la composition en acides aminés et les ratios des chaînes α et la richesse en chaîne β. Le résultat obtenu a montré que les gélatines GPS et GBH possèdent des forces de gel de l'ordre de 181 g et 259 g, respectivement. Généralement, la gélatine marine possède une dureté du gel inférieure à celles des gélatines des mammifères. Cette variation des valeurs de degré bloom pourrait être expliquée par la faible teneur en imino acides et en glycine qui contribue au renforcement de la structure en trois hélices. D'autre part, le degré d'hydrolyse de la gélatine résultante influe considérablement sur la valeur de la dureté du gel.

La gélatine est utilisée en industrie alimentaire, pharmaceutique et dans d'autres applications techniques grâce à ces propriétés de surface. Elle est utilisée comme un agent de mouillage, moussant et émulsifiant. L'étude des propriétés émulsifiantes des la GPS et la GBH a été réalisée par la détermination des indices de l'activité émulsifiante (IAE) et de la stabilité de l'émulsion (ISE) à différentes concentrations. Les IAE des deux gélatines augmentent en fonction de la concentration de la gélatine utilisée. Une forte concentration en protéine facilite son adsorption à l'interface (huile/eau). A la même concentration de gélatine utilisée, la capacité émulsifiante de la GBH est meilleure que celle de la GPS. Toutefois, les valeurs de l'IAE de la gélatine commerciale sont légèrement supérieures ce qui pourrait être expliqué par des différences des propriétés intrinsèques entre les deux protéines. Par contre,

les ISE de la GPS sont supérieurs à ceux obtenus avec la GBH pour les différentes concentrations utilisées, ce qui suggère la haute stabilité de l'émulsion préparée avec la gélatine extraite à partir de la peau de la seiche commune.

La capacité de la formation de mouse est une autre propriété de surface des protéines très recherchée dans la technologie alimentaire (confiserie) et spécialement dans la fabrication de la guimauve. La qualité de la mousse dépend de l'importance de son volume et de sa stabilité. Dans ce cadre, le pouvoir moussant (PM) et la stabilité de la mousse (SM) des gélatines GPS et GBH ont été déterminés à différentes concentrations. On a remarqué que ces deux propriétés augmentent en fonction de la concentration de la gélatine (0,5 %-2 %) puis ils tendent à se stabiliser. Quand on compare les propriétés moussantes des deux gélatines, le pouvoir moussant et la stabilité de la mousse de la GPS sont légèrement inférieurs à celles de la GBH. Les propriétés moussantes de la gélatine sont aussi influencées par la source, ses propriétés intrinsèques, sa composition en acides aminées et surtout sa conformation en solution et au niveau de l'interface (air/eau).

La capacité de rétention d'huile et le pouvoir de rétention d'eau sont des propriétés fonctionnelles étroitement liées à la texture qui se manifestent par l'intéraction entre l'eau, huile et les autres composants. Ces propriétés fonctionnelles sont intéressantes pour les industries de viandes, de confiseries et de pâtisseries. Au cours de ce travail, on a montré que la GPS possède une capacité de rétention d'huile plus élevée que celle de la gélatine commerciale. Ce résultat peut être du à la haute teneur en acides aminés hydrophobes de la GPS. En effet, les teneurs des résidus tyrosine, leucine et isoleucine sont de l'ordre de 5, 29 et 22 résidus/1000 au niveau de la GPS qui demeurent élevée ($p < 0.05$) par rapport à ceux de la gélatine bovine (1, 25 et 11 résidus/1000, respectivement). La capacité de rétention de l'huile varie selon le degré d'exposition des résidus hydrophobes de la gélatine. Par contre, la GPS possède un pouvoir de rétention d'eau inférieur à celui de la gélatine commerciale. D'une manière générale, la capacité de rétention d'eau d'une protéine quelconque est influencée par sa teneur en acides aminés hydrophiles. En effet, les teneurs d'hydroxyproline de la GPS et la GBH sont de l'ordre de 84 et 96 résidus/1000, respectivement.

Article 8:

Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process.

Balti Rafik, Mourad Jridi, Assaad Sila, Nabil Souissi, Nedjar-Arroume Naima, Guillochon Didier & Nasri Moncef (2011). *Food Hydrocolloids*, 25, 943-950.

Food Hydrocolloids 25 (2011) 943–950

Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd

Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process

Rafik Balti [a], Mourad Jridi [a], Assaad Sila [a], Nabil Souissi [a], Naima Nedjar-Arroume [b], Didier Guillochon [b], Moncef Nasri [a,*]

[a] *Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, B.P "1173-3038" Sfax, Tunisia*
[b] *Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A Lille I, BP 179, 59653 Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 January 2010
Accepted 10 September 2010

Keywords:
Gelatin
Cuttlefish skin
Functional properties
Crude acid protease
Gel strength

ABSTRACT

The characteristics and functional properties of gelatin from skin cuttlefish (*Sepia officinalis*) were investigated and compared to those of halal bovine gelatin (HBG). The gelatin extraction efficiency was improved by an acid-swelling process in the presence of smooth hound crude acid protease extract (SHCAP). The yields of gelatins from cuttlefish skin after 48 h with acid and with crude acid protease (15 units/g alkaline-treated skin) were 2.21% and 7.84%, respectively. The gelatin from skin cuttlefish had high protein (91.35%) but low fat (0.28%) contents. Compared to HBG, the cuttlefish-skin gelatin (CSG) has different amino acids composition than halal bovine gelatin. CSG contained slightly low hydroxyproline and proline (180‰) than HBG (219‰), whereas the content of serine was higher (49‰ versus 29‰). The gel strength of the gelatin gel from CSG (181 g) was lower than that of HBG (259 g) ($p < 0.05$) possibly due to lower hydroxyproline content. Cuttlefish-skin gelatin exhibited a similar emulsifying activity but greater emulsifying and foam stability than the halal bovine gelatin ($p < 0.05$). Foam formation ability, foam stability and water-holding capacity of CSG were slightly lower than those of the HBG, but fat-binding capacity was higher in the cuttlefish gelatin.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gelatin, a fibrous protein that is derived from collagen by heat treatment, is widely used in food, pharmaceutical, cosmetic and photographic applications because of its unique chemical and physical characteristics (Karim & Bhat, 2009). Conversion of collagen into soluble gelatin can be achieved by heating the collagen in either acid or alkali. The extraction process (temperature, time, and pH) can influence the length of the polypeptide chains, and the functional and biological properties of the gelatin. Generally, gelatin is manufactured from the waste generated during animal slaughter and processing, i.e., skin and bone (Patil, Dalev, Mark, Vassileva, & Fakirov, 2000). Due to the outbreak of mad cow disease or Bovine Spongiform Encephalopathy in 1980 as well as the unacceptability of gelatin produced from bovine and/or porcine sources for Muslims, Jews and Hindus, the search for alternative gelatin raw materials has been initiated and accelerated. As a consequence, there is increasing interest from the skins and bones from fish processing by-products (Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Nagai, & Tanaka, 2005). Therefore, gelatin from marine fish is a possible alternative for mammalian gelatins (Gòmez-Guillèn et al., 2009; Karim & Bhat, 2009).

Recently, skin gelatins from several fish species such as cod and hake (Fernandez-Diaz, Montero, & Gòmez-Guillèn, 2001), Nile perch (Muyonga, Cole, & Duodu, 2004), skate (Cho, Jahncke, Chin, & Eun, 2006), bigeye snapper and brownstripe red snapper (Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan, & Tanaka, 2006), Alaska pollock (Zhou, Mulvaney, & Regenstein, 2006) and Atlantic salmon (Arnesen & Gildberg, 2007) have been extracted and characterized.

Generally, fish gelatin is produced by a mild acid treatment process (type A gelatin) (Gòmez-Guillèn & Montero, 2001; Muyonga et al., 2004). Acid treatment has been used to disrupt acid-labile cross-links with negligible peptide bond hydrolysis and amino acid degradation (Slade & Levine, 1987). Since collagen cross-links are stable to thermal and acid treatment (Galea, Dalrymple, Kuypers, & Blakeley, 2000), a low yield of the resulting gelatin is generally obtained with the traditional process. To increase the extractability, some proteases may be carefully employed. Pepsin has been reported to cleave peptides in the telopeptide region of native collagen, thus the yield of partially cleaved collagen can be increased (Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan, & Tanaka, 2005). Due to a surplus of fish viscera,

* Corresponding author. Tel.: +216 74 274 088; fax: +216 74 275 595.
E-mail addresses: mon_nasri@yahoo.fr, moncef.nasri@enis.rnu.tn (M. Nasri).

0268-005X/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodhyd.2010.09.005

especially stomach, pepsin of fish origin can be recovered and used to increase the extraction efficiency of gelatin. Therefore, the objective of this study was to extract and characterise the gelatin from cuttlefish (*Sepia officinalis*) skin using a fish acid protease-aided process and to study its physicochemical characteristics as well as its functional properties.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Bovine haemoglobin, trichloroacetic acid, glycine and ammonium sulphate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Sodium dodecyl sulphate (SDS), acrylamide, ammonium persulphate, *N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyl ethylene diamine (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250 were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Food grade halal bovine gelatin (HBG) was obtained from Groupe EURALIS (Brive la Gaillarde, France). Other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. Preparation of cuttlefish skin

Cuttlefish by-products were obtained from marine processing industry "IMPEX" at Sfax City, Tunisia. The samples were packed in polyethylene bags, placed in ice with a sample/ice ratio of approximately 1:3 (w/w) and transported to the research laboratory within 30 min. Upon arrival, it was washed twice with water to eliminate the dark ink, which consists of a suspension of melanin granules in a viscous colorless medium. Cuttlefish by-products were separated and only cuttlefish outer skin was collected and then stored in sealed plastic bags at −20 °C until used for gelatin extraction and analysis.

2.3. Preparation of smooth hound crude acid protease (SHCAP)

Smooth hound (*Mustelus mustelus*) was purchased from the local market at Sfax City, Tunisia. After the fish was washed with tap water, internal organs were separated into individual organs and only stomach was collected. The stomach was rinsed with cold distilled water, cut into pieces with a thickness of 1–1.5 cm and then homogenized for 1 min with 10 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, at a ratio of 1:2 (w/v). SHCAP was prepared as described by Bougatef, Balti, Ben zaied, Souissi, and Nasri (2008). The homogenate was centrifuged at 10,000 × *g* for 15 min at 4 °C using a Hermele Z36HK refrigerated centrifuge (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany). The pellet was discarded and the supernatant was collected and adjusted to pH 2.0 with 1 M HCl and the mixture was allowed to stand at 25 °C for 30 min. The suspension was centrifuged for 30 min at 4 °C at 5000 × *g*. The supernatant was then fractionated with ammonium sulphate (20–70% saturation). The pellet was recovered by centrifuging at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C. The precipitate was suspended in 50 mM Glycine–HCl buffer (pH 2.0) and dialyzed 24 h at 4 °C against repeated changes in the same buffer. Dialysate was used as crude acid protease extract. Proteolytic activity was assayed using haemoglobin as a substrate by the method of Anson (1938) at pH 2.0 and 40 °C for 15 min. One unit of protease activity against haemoglobin was defined as the amount of enzyme that catalyzed an increase of 1.0 in the absorbance at 280 nm per minute under the assay conditions.

2.4. Extraction of gelatin from cuttlefish skin using the fish protease-aided process

2.4.1. Removal of non-collagenous proteins

Skin cuttlefish was firstly treated with NaOH in order to remove non-collagenous proteins. Cuttlefish skins (100 g) were soaked in 1000 ml of 0.05 M NaOH. The mixture was stirred for 2 h at room temperature (22 ± 1 °C). The alkaline solution was changed every 30 min. The alkaline-treated skins were then washed with tap water until neutral pH wash water was obtained.

2.4.2. Effect of SHCAP on gelatin extraction

Gelatin was extracted according to the method of Nalinanon, Benjakul, Visesssanguan, and Kishimura (2008) with a slight modification. The alkaline-treated skins were soaked in 0.2 M acetic acid with a solid/solvent ratio of 1:10 (w/v) and subjected to limited hydrolysis with smooth hound crude acid protease (SHCAP) at levels from 0 to 15 units/g alkaline-treated skin. The mixtures were stirred for 48 h at 4 °C. The pH of the mixtures was then raised to 7.5 using 10 M NaOH. The mixtures were stirred gently for 1 h at 4 °C to terminate protease activity. SHCAP-treated skin mixtures were then incubated at 50 °C for 18 h with continuous stirring to extract the gelatin from the skin. The mixtures were centrifuged at 10,000 × *g* for 30 min using a refrigerated centrifuge to remove insoluble material. The supernatant was collected and freeze dried (Bioblock Scientific Christ ALPHA 1-2, IllKrich-Cedex, France). The powder obtained referred to as cuttlefish-skin gelatin (CSG) was stored at 4 °C until used.

The extraction yield was calculated. The concentration of crude acid protease giving the highest yield was chosen for further study.

2.5. Analysis of gelatin

2.5.1. Proximate analysis

The moisture, ash and fat contents of the gelatin powder were determined according to the AOAC methods number 927.05, 942.05 and 920.39 B, respectively (AOAC, 2000). The protein content was determined by estimating its total nitrogen content by Kjeldahl method according to the AOAC method number 984.13 (AOAC, 2000). A factor of 5.4 was used to convert the nitrogen value to protein. All measurements were performed in triplicate.

The yield of gelatin was calculated based on wet weight of fresh skin.

$$\text{Yield}\ (\%) = \frac{\text{Weight of freeze dried gelatin (g)}}{\text{Wet weight of fresh skin (g)}} \times 100$$

2.5.2. Hydroxyproline content

Hydroxyproline content was determined by the method described in ISO (1978), with slight modifications. Freeze-dried gelatin sample (100 mg) was hydrolyzed with 5 ml of HCl 6 N for 12 h at 110 °C using a dry bath. After acid hydrolysis, the sample solutions were neutralized with 6 N NaOH. Acetate/citrate buffer (2 ml) was added and the samples were brought to a total volume of 25 ml with 0.3 M NaCl. An aliquot was transferred into a test tube, and then isopropanol (300 μl) and oxidant solution (600 μl) (mixture of 7% (w/v) chloramine T and acetate/citrate buffer, pH 6.0 at a ratio of 1:4 (v/v)) were added and mixed thoroughly. After 4 min, 4 ml of Ehrlich's reagent solution (2 g of *p*-dimethylaminobenzaldehyde in 3 ml of 60% (v/v) perchloric acid (w/v)) was added and the mixture was agitated for 25 min at 60 °C in a water bath. The absorbance of the solution was measured with a spectrophotometer (T70, UV/VIS spectrometer, PG Instruments Ltd, China) at 660 nm. The hydroxyproline content of the sample solutions was calculated from a calibration curve derived from an analytical grade hydroxyproline standard purchased from Sigma Chemical Co. Hydroxyproline content was expressed as mg/g of sample.

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Hyp content of supernatant (g/ml)} \times \text{volume of supernatant (ml)}}{\text{Hyp content of raw material (g/g)} \times \text{weight of raw material used (g)}} \times 100$$

2.5.3. Determination of colour

The colour of the dry gelatin samples was determined using a ColorFlex spectrocolorimeter (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA, USA) based on three colour co-ordinates, namely L^* (lightness), a^* (redness/greenness) and b^* (yellowness/blueness) (Jamilah & Harvinder, 2002). The sample was filled in a 64 mm glass sample cup with three readings in the same place and triplicate determinations were taken per sample. The white tile and black glass were used to standardize the equipment.

2.6. Determination of gel strength

Gel strength of gelatin was determined according to the method of Gòmez-Guillèn et al. (2002) using 6.67% gels (w/v) prepared by mixing the dry gelatin in distilled water at 60 °C for 30 min and cooling down the solution in a refrigerator at 7 °C (maturation temperature) for 16–18 h. The gel strength of gelatin gel was determined at 7 °C using a Model TA-TX2 texture analyzer with a 5 kN load cell equipped with a 1.27 cm diameter flat-faced cylindrical Teflon plunger. The dimensions of the sample were 3.8 cm in diameter and 2.7 cm in height. Gel strength was expressed as maximum force (in grams), required for the plunger to press the gel by 4 mm depression at a rate of 0.5 mm/s (BSI, 1975). The measurement was performed in triplicate.

2.7. Determination of amino acid composition

In order to determine the amino acid composition, dry gelatin was dissolved in distilled water at 1 mg/ml, and 50 μl of a sample was dried and hydrolyzed in vacuum-sealed glass tubes at 110 °C for 24 h in the presence of constant boiling 6 N HCl containing 0.1% phenol and using norleucine (Sigma–Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) as the internal standard. After hydrolysis, samples were again vacuum-dried, dissolved in application buffer and injected into Beckman 6300 amino acid analyzer (Beckman Instruments Inc., Fullerton, Calif., U.S.A.). Determinations were performed in triplicate and data correspond to mean values. Standard deviations were in all cases lower than 2%.

2.8. Electrophoretic analysis

Gelatin solutions were mixed with the loading buffer (2% SDS, 5% mercaptoethanol, and 0.002% bromophenol blue) in a proportion of 1:4. Protein samples (25 and 30 μg protein) were heat-denatured at 90 °C for 5 min and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis as described by Laemmli (1970) in a Mini Protean unit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using 4% stacking and 7% resolving gels. After electrophoresis, the gel was stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 dissolved in water, methanol and trichloroacetic acid (5:4:1) and de-stained using a solution containing methanol, distilled water and acetic acid at a ratio of 5:4:1. Coomassie brilliant blue R-250. Type I collagen from calf skin was used as a marker for α-chain and β-component mobilities.

2.9. Determination of functional properties

2.9.1. Determination of emulsifying properties

The emulsion activity index (EAI) and the emulsion stability index (ESI) of gelatins were determined according to the method of Pearce and Kinsella (1978) with a slight modification. The gelatin solutions were prepared by dissolving dry gelatin in distilled water at 60 °C for 30 min. Thirty millilitres of gelatin solutions at different concentrations (0.5%, 1%, 2%, 3% and 4%) were homogenized with 10 ml of soybean oil for 1 min at room temperature (22 ± 1 °C) using Moulinex® R62 homogenizer. Aliquots of the emulsion (50 μl) were taken from the bottom of the container at 0 and 10 min after homogenization, and diluted 100-fold with 0.1% SDS solution. The mixtures were mixed thoroughly for 10 s using a vortex mixer. The absorbance of the diluted solutions was measured at 500 nm using a spectrophotometer (T70, UV/VIS spectrometer, PG Instruments Ltd, China). The absorbances measured immediately (A_0) and 10 min (A_{10}) after emulsion formation were used to calculate the emulsifying activity index (EAI) and the emulsion stability index (ESI) as follows (Pearce & Kinsella, 1978). All determinations are means of at least three measurements.

2.9.2. Determination of foaming properties

Foam expansion (FE) and foam stability (FS) of gelatin solutions were tested according to the method of Shahidi, Xiao-Qing, and Synowiecki (1995), with a slight modification. Twenty millilitres of gelatin solution at different concentrations (0.5%, 1%, 2%, 3% and 4%) were homogenized using a Moulinex® R62 homogenizer to incorporate the air for 1 min at room temperature (25 ± 1 °C). The whipped sample was then immediately transferred into a 50 ml graduated cylinder, and the total volume was measured at 0, 30 and 60 min after whipping. Foam capacity was expressed as foam expansion at 0 min, which was calculated according to the following equation.

$$\text{FE (\%)} = \frac{V_T - V_0}{V_0} \times 100$$

Foam stability was calculated as the volume of foam remaining after 30 and 60 min.

$$\text{FS (\%)} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

where V_T is the total volume after whipping (ml); V_0 is the volume before whipping; V_t is the total volume after leaving at room temperature for different times (30 and 60 min). All determinations are means of at least two measurements.

2.9.3. Determination of water-holding capacity

Water-holding capacity was measured by a partially modified method of Lin, Humbert, and Sosulki (1974). 0.5 g of gelatin was placed in a centrifuge tube and weighed (tube with gelatin). Distilled water (50 ml) were added, and held at room temperature for 1 h. The gelatin solutions were mixed for 5 s every 15 min. The gelatin solutions were then centrifuged at 450 × *g* for 20 min. The upper phase was removed and the centrifuge tube was drained for 30 min on a filter paper after tilting to a 45° angle. Water-holding capacity was calculated as the weight of the contents of the tube after draining divided by the weight of the dried gelatin, and expressed as the weight% of dried gelatin.

2.9.4. Determination of fat-binding capacity

Fat-binding capacity was measured by a partially modified method of Lin et al. (1974). 0.5 g of gelatin was placed in a centrifuge tube and weighed (tube with gelatin). 10 ml soybean oil were added, and held at room temperature for 1 h. The gelatin solutions

were mixed with vortex mixer for 5 s every 15 min. The gelatin solutions were then centrifuged at 450 × *g* for 20 min. The upper phase was removed and the centrifuge tube was drained for 30 min on a filter paper after tilting to a 45° angle. Their capacities were calculated as the weight of the contents of the tube after draining divided by the weight of the dried gelatin, and expressed as the weight% of dried gelatin.

2.10. Statistical analysis

All data were subjected to Analysis of Variance (ANOVA) and differences between means were evaluated by Duncan's Multiple Range Test (Steel & Torrie, 1980). The SPSS statistic program (Version 10.0) (SPSS, 1.2, 1998) was used for data analysis.

3. Results and discussion

3.1. Effect of SHCAP levels on the extraction of gelatin

The yields of gelatin extracted from cuttlefish skin using SHCAP at different levels (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 and 15 units/g alkaline-treated skin) after a 48 h treatment are shown in Table 1. The yield of gelatin from the whole skin without treatment with SHCAP was only 2.21%, while it increased with increasing crude enzyme level. The hydroxyproline yield was 52.37% when the cuttlefish skin was treated with SHCAP at 15 units/g alkaline-treated skin. The yield of gelatin extracted with the aid of crude protease was approximately 5-fold higher than that of gelatin extracted without enzyme. On the other hand, the extraction yield of gelatin calculated based on wet weight of fresh skin was 7.84% obtained with the same SHCAP level. This extraction yield was markedly higher than those described by Gòmez-Guillèn et al. (2002) for squid skin-derived gelatin obtained by heating at 45 °C. The direct procedures used for preparing fish gelatin typically involve a mild chemical pretreatment of the raw material and mild temperature conditions during the extraction process. In general, a mild acid pretreatment of the fish skin is used prior to gelatin extraction (Gòmez-Guillèn & Montero, 2001; Jamilah & Harvinder, 2002; Montero & Gòmez-Guillèn, 2000).

Our findings are in line with previous works reported by Petersen and Yates (1977) and Nalinanon et al. (2008) who reported a marked increase in the yield of the gelatin extracted when proteases were added during the swelling process with acetic acid compared to the yield of the gelatin extracted without enzyme.

3.2. Proximate composition

The proximate composition of fresh cuttlefish skin indicated a high protein content of 14% and moisture content of 82.77%. The fat content of cuttlefish skin was less than 2% (Table 2).

Table 1
Total hydroxyproline and yields of gelatin extracted from the skin of cuttlefish treated with SHCAP at different levels. Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

SHCAP levels (units/g alkaline-treated skin)	Total extracted Hyp (mg/g alkaline-treated skin)	Yield[a] (%)	Yield[b] (%)
0	2.01 ± 0.02	10.64 ± 0.12	2.21 ± 0.12
2.5	3.58 ± 0.14	19.31 ± 0.09	2.89 ± 0.02
5	4.85 ± 0.05	25.87 ± 0.24	3.74 ± 0.24
7.5	6.22 ± 0.25	34.00 ± 0.05	5.03 ± 0.09
10	7.73 ± 0.01	41.22 ± 0.07	5.98 ± 0.13
12.5	8.63 ± 0.11	46.48 ± 0.18	6.52 ± 0.02
15	9.91 ± 0.08	52.37 ± 0.31	7.84 ± 0.19

[a] Calculated based on the hydroxyproline content.
[b] Calculated based on wet weight.

Table 2
Proximate composition of cuttlefish skin, CSG and HBG. Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

Composition (% wet wt)	Cuttlefish skin	CSG	HBG
Moisture	82.77 ± 0.24	6.48 ± 0.24	8.52 ± 0.43
Protein	14.00 ± 0.18	91.35 ± 0.17	90.22 ± 0.68
Fat	1.28 ± 0.15	0.28 ± 0.01	0.21 ± 0.04
Ash	0.63 ± 0.09	0.046 ± 0.00	0.29 ± 0.11
Colour			
L^*	–	79.24 ± 0.41	81.20 ± 1.61
a^*	–	−0.11 ± 0.01	−0.24 ± 0.02
b^*	–	11.77 ± 0.40	19.21 ± 0.32

The proximate composition of cuttlefish skin and halal bovine gelatins is shown in Table 2. Skin gelatin of cuttlefish had high protein (91.35%) and low moisture (6.48%), fat (0.28%) and ash (0.046%) contents, suggesting the efficient removal of fat and minerals from the skin material (Table 1). Gelatin consists of most protein and water. So, the presence of ash, lipid and other impurity at very low contents are important for the quality of gelatins (Jones, 1977). Gelatin from skin cuttlefish contained lower ash content than the recommended maximum of 2.6%. The colour values of gelatins are also shown in Table 2. In general, satisfactory gelatin should have little colour (Jones, 1977). The L^* and b^* values of the bovine gelatin were significantly ($p < 0.05$) higher than the cuttlefish-skin gelatin while the a^* value of both gelatins was not significantly different ($p > 0.05$). Bovine gelatin was more yellowish than the cuttlefish-skin gelatin.

3.3. Amino acid composition of gelatins

The amino acid composition of CSG and HBG expressed as residues per 1000 total amino acid residues is shown in Table 3. Both gelatins exhibited typical type I collagen Gly content,

Table 3
Amino acid composition of the cuttlefish (*S. officinalis*) skin gelatin (CSG) compared to the halal bovine gelatin (HBG).

Amino acids	Number of residues/1000	
	CSG	HBG
Hydroxyproline (Hyp)	84	96
Aspartic acid (Asx)	63	44
Threonine (Thr)	23	17
Serine (Ser)	49	29
Glutamic acid (Glx)	92	74
Proline (Pro)	96	123
Glycine (Gly)	321	341
Alanine (Ala)	81	115
Cysteine (Cys)	0	0
Valine (Val)	22	21
Methionine (Met)	6	5
Isoleucine (Ile)	22	11
Leucine (Leu)	29	25
Tyrosine (Tyr)	5	1
Phenylalanine (Phe)	10	12
Hydroxylysine (Hyl)	15	7
Histidine (His)	18	5
Arginine (Arg)	51	48
Lysine (Lys)	13	26
Total	1000	1000
Imino acids (Pro + Hyp)	180	219
Pro hydroxylation (%)	46.7 ± 0.4	43.9 ± 1.1
Lys hydroxylation (%)	53.6 ± 0.8	21.3 ± 1.5

Determinations were performed in triplicate and data correspond to mean values. Standard deviations were in all cases lower than 2%. Proline and lysine hydroxylation are also shown (mean ± SD).
Asx = Asp + Asn; Glx = Glu + Gln.

representing approximately 1/3 of the total amino acids. Glycine is the most dominant amino acid in gelatin (Arnesen & Gildberg, 2002). As described by Asghar and Henrickson (1982), 50–60% of α-chains consist of tripeptides having the general formula Gly-X-Y, where X is generally proline and Y is mainly hydroxyproline. The numbers of imino acid contents (proline and hydroxyproline), in the bovine-hide gelatin were higher than the cuttlefish-skin gelatin (219 versus 180 residues/1000, respectively) ($p > 0.05$). Gelatins made from warm-blooded animal tissues have been reported to have a higher imino acid content, hydroxyproline in particular (Norland, 1990). The imino acid content of skin gelatin from cuttlefish was higher than those reported in giant squid and Alaska pollock gelatins (170 and 150 residues per 1000 residues, respectively) (Giménez, Gómez-Estaca, Aleman, Gòmez-Guillèn, & Montero, 2009; Zhou et al., 2006) but lower than those in bigeye snapper and giant catfish skin gelatins (195 and 211 residues per 1000 residues, respectively) (Jongjareonrak et al., 2006, 2010).

The amino acid composition of both gelatins showed low content of methionine and tyrosine and no cysteine that are characteristics of all gelatins. However, the content of serine in CSG (49‰) was higher than that in HBG (29‰).

Further, the Hyp content of the cuttlefish-skin gelatin was relatively high (84 residues/1000), although, lower than the one for halal bovine gelatin (96 residues/1000) ($p > 0.05$). The stability of the triple helical structure in renatured gelatins has been reported to be proportional to the total content of imino acids, given that Pro + Hyp rich regions are likely to be involved in the formation of nucleation zones (Ledward, 1986a). In particular, Hyp is believed to play a key role in the stabilization of the triple-stranded collagen helix due to its hydrogen bonding ability through its hydroxyl group (Burjandze, 1979; Ledward, 1986a; Mizuno, Hayashi, & Bächinger, 2003).

In relation to fish skin-derived gelatins like sole, megrim, cod or hake (Gòmez-Guillèn et al., 2002), cuttlefish gelatin is characterized by a noticeably higher amount of Hyp and a lower content of Ala, frequently found in highly insoluble collagens with a high degree of cross-linking (Montero, Borderıas, Turnay, & Lyzarbe, 1990). Other significant observation was the high degree of hydroxylation of lysine (53.6%) for cuttlefish-skin gelatin in comparison to the halal bovine gelatin (21.3%). Lys and Hyl residues and aldehydes derived from them by oxidative deamination are responsible for both intra- and intermolecular covalent cross-linking reactions, mainly in the telopeptide non-helical regions. Hyl-derived cross-linkages show higher stability than those formed by Lys (Bateman, Lamande, & Ramshaw, 1996).

3.4. SDS-PAGE patterns of gelatin

Apart from amino acid composition, the functional properties of gelatin are also influenced by the distribution of the molecular weights, structures, and composition of its subunits. CSG and HBG were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 1). SDS-PAGE pattern showed a similar molecular-weight distribution of cuttlefish-skin gelatin compared to commercial halal bovine gelatin indicating that both gelatins had similar components. Both gelatins contained α_1 and α_2 chains as the major constituents and were characterized to be type I. In addition, it can be seen that CSG contains a higher proportion of α_2 component.

Nevertheless, there were appreciable differences in α-chain yields in the electrophoretic profile between both gelatins. Commercial halal bovine gelatin exhibited a α_1/α_2 ratio of around 2 (native ratio found in type I collagen), indicating that the native structure is maintained. In contrast, intensities for the bands for the α_1 and α_2 chains in the cuttlefish-skin gelatin were nearly similar. On the other hand, very high molecular-weight polymers resulting from residual heat-stable cross-links were present in both types of gelatin, as revealed by the high-intensity bands at the tops of the polyacrylamide gels.

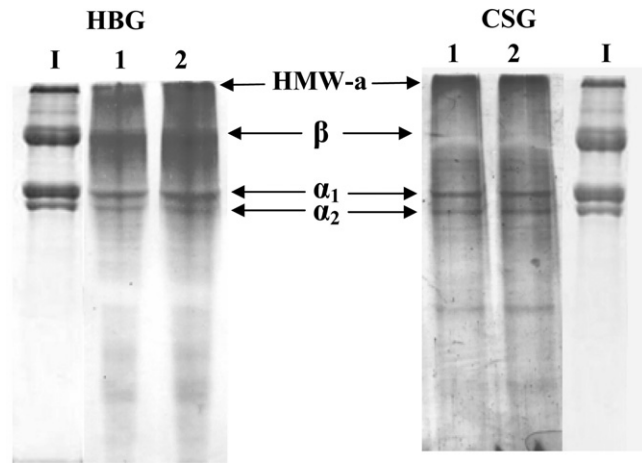


Fig. 1. SDS-PAGE profiles of the halal bovine and cuttlefish-skin gelatins. **1**: 25 μg/ml; 2: 30 μg/ml and **I**: calf skin collagen type I. HMW-a, high molecular-weight aggregates.

The larger band intensity of the β-chain was found in halal bovine gelatin compared with that of cuttlefish skin. Due to the higher molecular weight of the β-chain, dimer of α-chain in skin, it could not be extracted effectively as evidenced by the lower band intensity in the resulting gelatin. One possible explanation lies in the high degree of heat-stable cross-linking due to the higher content of hydroxylysine residues, as it is revealed by the analysis of amino acids (Table 3), which could prevent the extraction of these polymers. Similar results were reported by Giménez et al. (2009) for gelatin from giant squid gelatin. Another hypothesis may be a possible selective effect of pepsin in the telopeptide region of collagen, inducing the cleavage of mainly α-chains.

3.5. Gel strength

Gel strength is one of the most important functional properties of gelatin. Typically, fish gelatin has less gel strength than mammalian gelatin (Gilsenan & Ross-Murphy, 2000). Gel strength is a function of complex interactions determined by amino acid composition and the ratio of α-chain and the amount of β-component.

The gelling strength of commercial gelatins ranges from 100 to 300, but gelatins with blooms values of 250–260 are the most desirable (Holzer, 1996). In general, gelatin with low molecular-weight distribution has lower gelling properties than high molecular-weight gelatin (Badii & Howell, 2005).

The gel strength after overnight maturation at 7 °C was noticeably different between CSG and HBG. As expected, gel strength was significantly ($p < 0.05$) lower in the cuttlefish-skin gelatin (181 ± 2 g) than in the halal bovine gelatin (259 ± 2 g), suggesting the difference in gel forming ability of the two specific gelatins used. This significant difference ($p < 0.05$) among these gelatins in gel strength could be due to intrinsic characteristics, such as molecular-weight distribution and amino acid composition as well as the type of extraction treatments. According to the amino acid composition (Table 3), low gel strength of extracted gelatin may be due to the possible low content of proline and hydroxyproline which could result in less organized triple helical structures. Proline and hydroxyproline are thought to be responsible for the stability of the triple-helix of collagen structure through hydrogen bonding between free water molecules and hydroxyl group of the hydroxyproline in gelatin (Burjandze, 1979; Ledward, 1986b; Fernandez-Diaz et al., 2001).

Another possible explanation for the difference in gel strength is the molecular-weight distribution of the cuttlefish-skin gelatin which had a lower amount of native structures-monomers and dimmers compared with HBG that had considerably higher amounts of α1-chains and β components (Sims, Bailey, & Field, 1997). This molecular-weight distribution, in which the two α-chains comprising the β-component are already crosslinked, enables the chains to form triple helices upon cooling and contributes to helix growth during gel maturation.

The quality of gelatin is generally determined by the gel strength or bloom value, including low (<150), medium (150–220) and high bloom (220–300) (Johnston-Bank, 1983). Gelatins with different gel strength were reported for Atlantic salmon (108 g), cod (71 g) (Arnesen & Gildberg, 2007), sin croaker (125 g), shortfin scad (177 g) (Cheow, Norizah, Kyaw, & Howell, 2007), bigeye snapper (105.7 g), brownstripe red snapper (218.6 g) (Jongjareonrak et al., 2006), young and adult Nile perch (217 g and 240 g, respectively) (Muyonga et al., 2004).

3.6. Emulsifying properties of gelatin

Gelatin is used as a foaming, emulsifying and wetting agent in food, pharmaceutical, medical and technical applications due to its surface-active properties.

Emulsion activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) of CSG and HBG at different concentrations are presented in Table 4. EAI of both gelatins increased with the increase of gelatin concentration. Protein at high concentrations facilitated more protein adsorption at interface (Yamauchi, Schimizu, & Kamiya, 1980). At the same concentrations used, EAI of HBG was higher than that of CSG ($p < 0.05$). This possibly resulted from the difference in the intrinsic properties, amino acid composition and conformation of proteins between gelatins from both sources (Damodaran, 1997). High solubility of the protein in the dispersing phase increases the emulsifying efficiency, because the protein molecules should be able to migrate to the surface of the fat droplets rapidly (Sikorski, 2001). Kim, Jeon, Lee, and Lee (1996) reported that emulsifying properties of gelatin from cod bone were similar to those of a commercial emulsifier, such as Tween-80.

ESI of CSG was higher than that of HBG at all levels reflecting the higher stability of emulsion added with CSG. CSG might form the stronger film with higher uniformity around oil droplets. Hill (1996) reported that gelatin in bulk solution will form gels, which become stronger with increasing time.

3.7. Foam capacity and foam stability of gelatin

Foam formation ability is another important property of gelatin for commonly used foods such as marshmallows. Foam expansion 0, 30 and 60 min after whipping was determined to evaluate the foam capacity and foam stability of both gelatins.

Foam expansion (FE) and Foam stability (FS) of CSG and HBG at various concentrations are shown in Table 5. FE and FS of both gelatins increased with increasing gelatin concentrations from 0.5% to 2%, then remained nearly constant. Foams with higher concentration of proteins were denser and more stable because of an increase in the thickness of interfacial films (Zayas, 1997). Foam formation is generally controlled by transportation, penetration and reorganisation of protein molecules at the air–water interface. A protein must be capable of migrating rapidly to the air–water interface, unfolding and rearranging at the interface to express good foaming ability (Halling, 1981). The foaming capacity of protein was improved by making it more flexible, by exposing more hydrophobic residues and by increasing its capacity to decrease surface tension (Mutilangi, Panyam, & Kilara, 1996). Foam stability rapidly increased with protein concentration, depending on the protein surface properties (Halling, 1981). Bolnedi and Zayas (1995) reported that high viscosity at higher concentrations was effective in preventing gravity deformation of the film in protein foams.

When comparing the foaming properties between both gelatins, FE and FS of HBG were slightly higher ($p < 0.05$) than those of CSG. Foaming properties of protein might be influenced by the source of

Table 4
The emulsifying properties of cuttlefish-skin gelatin (CSG) and halal bovine gelatin (HBG) at different concentrations. Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

Gelatin	Concentration (%)	EAI (m^2/g)	ESI (min)
CSG	0.5	17.22 ± 0.24	51.28 ± 0.11
	1	23.67 ± 0.36	49.14 ± 0.81
	2	31.01 ± 1.31	41.25 ± 1.80
	3	38.34 ± 1.25	36.74 ± 1.61
	4	41.87 ± 0.73	28.33 ± 2.92
HBG	0.5	19.22 ± 0.55	41.56 ± 0.74
	1	27.02 ± 2.50	39.77 ± 1.43
	2	34.00 ± 1.34	34.04 ± 1.73
	3	39.25 ± 0.65	30.32 ± 2.90
	4	43.86 ± 0.23	23.45 ± 5.69

Table 5
The foaming properties of cuttlefish-skin gelatin (CSG) and halal bovine gelatin (HBG) at different concentrations. Values are given as mean ± SD from triplicate determinations.

Gelatin	Concentration (%)	FE (%)	FS (%)	
			30 min	60 min
CSG	0.5	103.44 ± 0.52	83.11 ± 0.07	72.15 ± 2.12
	1	113.77 ± 1.53	105.32 ± 0.32	87.24 ± 0.71
	2	124.22 ± 1.10	110.13 ± 0.29	100.35 ± 1.41
	3	130.18 ± 1.16	118.61 ± 0.16	105.83 ± 2.12
	4	134.52 ± 0.82	112.50 ± 0.44	100.72 ± 0.68
HBG	0.5	110.00 ± 0.72	80.22 ± 0.71	70.42 ± 1.51
	1	119.16 ± 1.31	100.94 ± 1.88	82.00 ± 0.98
	2	130.77 ± 1.55	106.33 ± 1.44	98.77 ± 0.55
	3	137.52 ± 1.15	114.07 ± 0.02	102.11 ± 1.74
	4	141.38 ± 2.04	112.22 ± 0.22	100.33 ± 1.84

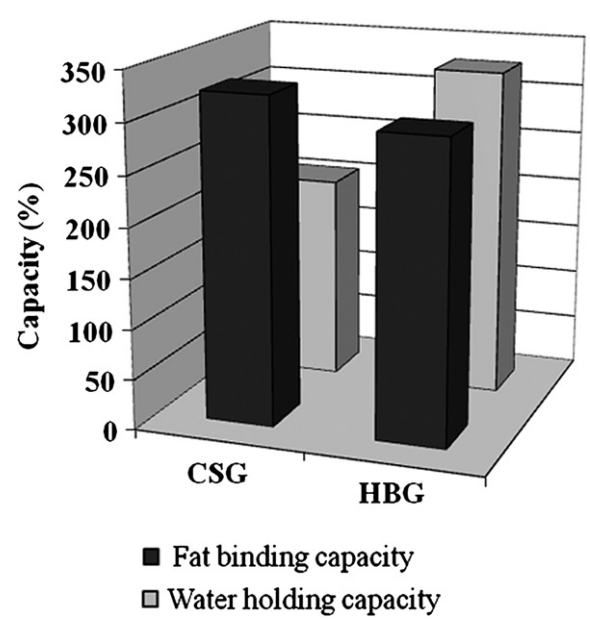


Fig. 2. Water-holding capacity and fat-binding capacity of cuttlefish (*S. officinalis*) skin gelatin as compared with halal bovine gelatin.

the protein, intrinsic properties of protein, the compositions and conformations of the protein in solution and at the air/water interface (Phillips, Davis, & Kinsella, 1989; Wilde & Clark, 1996; Zayas, 1997). Owing to the larger content of high molecular-weight molecules of HBG, stronger films could be formed leading to greater foam stability.

3.8. Water-holding and fat-binding capacities of gelatin

Water-holding and fat-binding capacities are functional properties that are closely related to texture by the interaction between components such as water, oil and other components. Water-holding capacity and fat-binding capacity of both gelatins are shown in Fig. 2. CSG had high fat-binding capacity but low water-holding capacity than HBG. Fat-binding capacity depends on the degree of exposure of the hydrophobic residues inside gelatin. As shown in Table 3, the hydrophobic amino acids, tyrosine, leucine and isoleucine, represent 5, 29 and 22 residues/1000 of CSG which were higher ($p < 0.05$) than those from bovine-hide gelatin (1, 25 and 11 residues/1000, respectively).

Water-holding capacity is believed to be affected by the amount of hydrophilic amino acids. The amounts of hydroxyproline in CSG and HBG were 84 and 96 residues per 1000 residues, respectively.

4. Conclusion

Gelatin extraction from cuttlefish skin was improved by the protease-aided process using smooth hound crude acid protease extract. Cuttlefish-skin gelatin had an amount of some amino acids different from those of halal bovine gelatin.

The functional properties, including foam capacity, foam stability and gel strength of gelatin from cuttlefish skin were greater than that of the calf skin gelatin tested. Gelatin from cuttlefish skin contained α- and β-components.

This report indicates that CSG could be a useful additive in food materials.

Acknowledgment

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Tunisia.

References

Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and the cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology, 22*, 79–89.

AOAC. (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Arnesen, J. A., & Gildberg, A. (2002). Preparation and characterisation of gelatin from the skin of harp seal (*Phoca groendlandica*). *Bioresource Technology, 92*, 191–194.

Arnesen, J. A., & Gildberg, A. (2007). Extraction and characterisation of gelatin from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology, 98*, 53–57.

Asghar, A., & Henrickson, R. L. (1982). *Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems*. In *Advances in food research, Vol. 28*. London: Academic Press. (pp. 232–372).

Badii, F., & Howell, N. K. (2005). Fish gelatin, structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids, 20*, 630–640.

Bateman, J. F., Lamande, S. R., & Ramshaw, J. A. M. (1996). Collagen superfamily. In W. D. Comper (Ed.), *Molecular components and interactions. Extracellular matrix, Vol. 2* (pp. 22–27). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

Bolnedi, V., & Zayas, J. F. (1995). Foaming properties of selected plant and animal proteins. *Journal of Food Science, 60*, 1025–1029.

Bougatef, A., Balti, R., Ben Zaied, S., Souissi, N., & Nasri, M. (2008). Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry, 107*, 774–784.

BSI (British Standards Institution). (1975). *Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods)*. London: BSI.

Burjandze, T. V. (1979). Hydroxy-proline content and location in relation to collagen thermal stability. *Biopolymers, 18*, 931–936.

Cheow, C. S., Norizah, M. S., Kyaw, Z. Y., & Howell, N. K. (2007). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chemistry, 101*, 386–391.

Cho, S. H., Jahncke, M. L., Chin, K. B., & Eun, J. B. (2006). The effect of processing conditions on the properties of gelatin from skate (*Raja kenojei*) skins. *Food Hydrocolloids, 20*, 810–816.

Damodaran, S. (1997). Protein-stabilized foams and emulsions. In S. Damodaran, & A. Paraf (Eds.), *Food proteins and their applications* (pp. 57–110). New York, NY: Marcel Dekker.

Fernandez-Diaz, M. D., Montero, P., & Gòmez-Guillèn, M. C. (2001). Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by the coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. *Food Chemistry, 74*, 161–167.

Galea, C. A., Dalrymple, B. P., Kuypers, R., & Blakeley, R. (2000). Modification of the substrate specificity of porcine pepsin for the enzymatic production of bovine hide gelatin. *Protein Science, 9*, 1947–1959.

Gilsenan, P. M., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids, 14*, 191–195.

Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Aleman, A., Gòmez-Guillèn, M. C., & Montero, M. P. (2009). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatine. *Food Hydrocolloids, 23*, 585–592.

Gòmez-Guillèn, M. C., & Montero, P. (2001). Extraction of gelatin from mergrim (*Lepidorhombus boscii*) skins with several organic acids. *Journal of Food Science, 66*, 213–216.

Gòmez-Guillèn, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology, 20*, 3–16.

Gòmez-Guillèn, M. C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids, 16*, 25–34.

Halling, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsion. *Critical Review in Food Science and Nutrition, 13*, 155–203.

Hill, S. E. (1996). Emulsions. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st ed.). (pp. 153–185) Bury St. Edmunds: St Edmundsbury Press.

Holzer, D. (1996). Gelatin production. US patent 5,484,888.

ISO. (1978). International Organization for Standardization ISO 3496-1978. Meat and meat products-determination of L(−)-hydroxyproline content (reference method).

Jamilah, B., & Harvinder, K. G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry, 77*, 81–84.

Johnston-Bank, F. A. (1983). From tannery to table: an account of gelatin production. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 68*, 141–145.

Jones, N. R. (1977). Uses of gelatin in edible products. In A. G. Ward, & A. Courts (Eds.), *The science and technology of gelatins* (pp. 365–394). New York: Academic Press.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 85*, 1203–1210.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids, 20*, 1216–1222.

Jongjareonrak, A., Rawdkuen, S., Chaijan, M., Benjakul, S., Osako, K., & Tanaka, M. (2010). Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). *LWT – Food Science and Technology, 43*, 161–165.

Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids, 23*, 563–576.

Kim, S. K., Jeon, Y. J., Lee, B. J., & Lee, C. K. (1996). Purification and characterization of the gelatin from the bone of cod (*Gadus macrocephalus*). *Korean Journal of Life Science, 6*, 14–26.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry, 89*, 363–372.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature, 227*, 680–685.

Ledward, D. A. (1986a). Gelation of gelatin. In J. R. Mitchell, & D. A. Ledward (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 171–201). London: Elsevier Applied Science Publishers.

Ledward, D. A. (1986b). Gelation of gelatin. In J. R. Mitchell, & D. A. Ledward (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 233–289). London: Elsevier Applied Science Publishers.

Lin, M. H. Y., Humbert, E. S., & Sosulki, F. W. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science, 39*, 368–370.

Mizuno, K., Hayashi, T., & Bächinger, H. P. (2003). Hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix. Further characterization of peptides with 4 (R)-hydroxyproline in the Xaa position. *Journal of Biological Chemistry, 278*, 32373–32379.

Montero, P., Borderıas, J., Turnay, J., & Lyzarbe, M. A. (1990). Characterization of hake (*Merluccius merluccius* L.) and trout (*Salmo irideus* Gibb) collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38*, 604–609.

Montero, P., & Gòmez-Guillèn, M. C. (2000). Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science, 65*, 434–438.

Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., & Kilara, A. (1996). Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science, 61*, 270–274.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Extraction and physicochemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids, 18*, 581–592.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Visesssanguan, W., & Kishimura, H. (2008). Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids, 22*, 615–622.

Norland, R. E. (1990). Fish gelatin. In M. N. Voight, & J. K. Botta (Eds.), *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability* (pp. 325–333). Lancaster, PA: Technomic Publishing Co.

Patil, R. D., Dalev, P. G., Mark, J. E., Vassileva, E., & Fakirov, S. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in lake and river waters. *Journal of Applied Polymer Science, 76*, 29–37.

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26*, 716–723.

Petersen, B. R., & Yates, J. R. (1977). Gelatin extraction. United-States Patent 4 064008. Novo Industri AS.

Phillips, L. G., Davis, M. J., & Kinsella, J. E. (1989). The effects of various milk proteins on the foaming properties of egg of white. *Food Hydrocolloids, 3*, 163–169.

Shahidi, F., Xiao-Qing, H., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry, 53*, 285–293.

Sikorski, Z. E. (2001). Functional properties of proteins in food systems. In Z. E. Sikorski (Ed.), *Chemical and functional properties of food proteins* (pp. 113–136). Lancaster, PA: Technomic Publishing Comp. Inc.

Sims, T. J., Bailey, A. J., & Field, D. S. (1997). The chemical basis of molecular weight differences in gelatins. *The Imaging Science Journal, 45*, 171–177.

Slade, L., & Levine, H. (1987). Polymer-chemical properties of gelatin in foods. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, & A. J. Bailey (Eds.), *Collagen as food. Advances in meat research, Vol. 4* (pp. 251–266). New York: Van Nostrand Reinhold.

Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1980). *Principle and procedure of statistics* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.

Wilde, P. J., & Clark, D. C. (1996). Foam formation and stability. In G. M. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality* (1st ed.). (pp. 110–152) Bury St. Edmunds: St Edmundsbury Press.

Yamauchi, K., Schimizu, M., & Kamiya, T. (1980). Emulsifying properties of whey proteins. *Journal of Food Science, 45*, 1237–1244.

Zayas, J. F. (1997). Solubility of proteins *Functionality of proteins in food*. Berlin/UK: Springer-Verlag/Harwood Academic Publishers. (pp. 6–22, 22–27).

Zhou, P., Mulvaney, S. J., & Regenstein, J. M. (2006). Properties of Alaska pollock skin gelatin: a comparison with Tilapia and pork skin gelatins. *Journal of Food Science, 71*, 313–321.

Conclusion & Perspectives

La valorisation des co-produits dans l'industrie halieutique représente un enjeu économique et géopolitique très important. La quantité très élevée de co-produits générés, estimée à 50 % ces dernières années, est une source potentielle incontournable de biomolécules à haute valeur ajoutée.

Au cours de ce travail, nous avons pu isoler différentes biomolécules à partir des produits et co-produits de la seiche commune (*S. officinalis*). En effet, notre étude a porté sur l'extraction de quelques protéases digestives, isolement et identification de peptides antihypertensifs et l'élaboration d'hydrolysats protéiques. Nous avons par ailleurs évalué les propriétés fonctionnelles et biologiques des hydrolysats protéiques de la seiche commune en vue d'une éventuelle utilisation dans divers domaines, notamment en agroalimentaire. En outre, la gélatine a été extraite à partir de la peau de la seiche commune.

La première partie expérimentale de ce travail a ainsi consisté à l'extraction et la purification des protéases digestives de la seiche commune (*S. officinalis*). La trypsine a été purifiée à homogénéité par une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (20-60 %), une filtration sur Sephadex G-100, une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-cellulose, une deuxième filtration sur Sephadex G-75 et une chromatographie échangeuse d'anions sur Mono Q-Sepharose. La trypsine présente une masse moléculaire de l'ordre de 24 kDa sur SDS-PAGE. La séquence N-terminale des 12 premiers acides aminés de la trypsine est **IVGGKESSPYNQ**. L'alignement de cette séquence avec celles des banques de données a montré que la trypsine de la seiche commune présente une forte identité avec les autres trypsines des invertébrés marins. Les optima de pH et de température sont 8,0 et 70 °C, respectivement.

Une deuxième protéase alcaline « la chymotrypsine » a été aussi purifiée à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune par une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sepharose, ultrafiltration (10 kDa), une filtration sur Sephadex G-200 et une chromatographie hydrophobe sur Phenyl-Sepharose. Le facteur de purification et le rendement final sont de l'ordre de 120 et 23 %, respectivement. La purification a conduit à l'obtention d'une bande unique sur SDS-PAGE et sur gel natif ayant une masse moléculaire de l'ordre de 28 kDa. La séquence N-terminale de la chymotrypsine est **IVGGQEATIGEYPWQAALQV**. L'enzyme purifiée présente une activité spécifique sur SAAPFpNA, substrat spécifique de la chymotrypsine, de l'ordre de 68,52 U/mg. Cette protéase possède des optima de pH et de température de 8,5 et 55 °C, respectivement. La chymotrypsine de la seiche commune est hautement stable à des températures inférieures à 50 °C et dans une large gamme de pH allant de 6,0 à 11,0. La chymotrypsine de la seiche

commune hydrolyse uniquement les peptides à longue chaîne en présence de Phe ou Leu en position P_1, contrairement aux chymotrypsines des mammifères.

La seconde partie des travaux relatifs aux enzymes digestives d'origine marine a porté sur l'extraction de la cathepsine D à partir de la même espèce. Cette protéase est purifiée par une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (30-60 %), une filtration sur Sephadex G-100, une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-Sepharose, une deuxième filtration sur Sephadex G-75 et une chromatographie échangeuse de cations sur Mono S-FPLC. La masse moléculaire de la cathepsine D estimée par SDS-PAGE est de l'ordre de 37,5 kDa. La séquence de l'extrémité N-terminale des 13 premiers acides aminés de la cathepsine D est **APTPEPLSNYMDA**. L'activité de la cathepsine est maximale à pH 3,0 et 50 °C sur l'hémoglobine, utilisée comme substrat. Elle est stable à des températures inférieures à 45 °C et dans une gamme de pH de 3,0 à 5,0. Son activité est inhibée par la pepstatine A : il s'agit donc d'une protéase aspartique.

La deuxième partie de ce travail entre dans le cadre d'un programme de recherche qui porte sur la production, la purification et l'identification de peptides bioactifs à partir de produits et co-produits de la pêche, nous avons élaborer différents hydrolysats protéiques enrichis en peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) à partir du muscle de la seiche commune moyennant plusieurs protéases microbiennes, animales et digestives de poissons.

L'étude a porté tout d'abord sur la mise en évidence de l'activité antihypertensive *in vitro* dans tous les hydrolysats élaborés. La préparation enzymatique de *Bacillus mojavensis* A21 et l'extrait hépatopancréatique de la seiche commune génèrent les hydrolysats les plus actifs, et les meilleures activités sont obtenues pour des hydrolysats ayant des DH respectifs de 16 et 8 %. Ces derniers ont été fractionnés par filtration sur gel de Sephadex G-25 puis par chromatographie liquide haute performance de phase inverse (RP-HPLC). 14 nouveaux peptides inhibiteurs de l'ECA ont été identifiés. Les peptides Val-Tyr-Ala-Pro, Val-Ile-Ile-Phe, Met-Ala-Trp et Ala-His-Ser-Tyr présentent les activités inhibitrices de l'ECA les plus élevées avec des CI_{50} de l'ordre de 6,1; 8,7; 16,32 et 11,6 µM, respectivement.

Dans la troisième partie nous avons étudié l'influence de degré d'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles et l'activité antihypertensive dans les hydrolysats protéiques préparés à partir des déchets (peau et viscères) de la seiche commune (HPDS). Nous avons pu démontrer que les HPDS 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 émulsifiante et le pouvoir de rétention d'eau augmentent avec le DH par contre, le pouvoir

moussant et le pouvoir de rétention d'huile décroissent avec le DH. L'analyse biochimique par RP-HPLC a montré une grande hétérogénéité en termes de composition peptidique entre les différents HPDS.

Dans le même contexte nous avons mené une étude comparative des propriétés biochimiques et des activités antioxydantes des hydrolysats protéiques du muscle de la seiche commune (HPMS) préparés par l'Alcalase® et la préparation enzymatique de *B. licheniformis* NH1. La mise en évidence de l'activité antioxydante a été étudiée moyennant plusieurs tests (l'activité anti-radicalaire, l'inhibition de peroxydation lipidique *in vitro,* le test de blanchiment de la β-carotène et l'effet chélateur). HPMS-NH1 (DH = 15 %) inhibe considérablement l'autoxidation de l'acide linoléique *in vitro* et présente un effet comparable à celui de l'antioxydant naturel l'α-tocophérol. Ce hydrolysat possède également les meilleurs pouvoirs anti-radicalaire et chélateurs avec des CI_{50} de l'ordre de 0,68 ± 0,017 mg/ml et de 0,94 ± 0,24 mg/ml, respectivement.

La composition en acides aminés des hydrolysats préparés présente une richesse en histidine (11,23-11,61 %) et arginine (11,57-11,71 %). Par contre, ils possèdent des teneurs faibles en cysteine (0,15-0,17 %) et proline (0,29-0,33 %). De plus, HPMS-NH1 et HPMS-Alcalase® ont été caractérisés par des teneurs élevées en acides aminés essentiels de l'ordre de 50,04 % et 48,85 %, respectivement. Ce résultat prouve que l'hydrolysat protéique de la seiche commune possède une haute valeur nutritionnelle sur la base de sa composition en acides aminés.

Finalement, dans la quatrième partie nous nous sommes intéressés à l'extraction par voie enzymatique de la gélatine à partir de la peau de la seiche commune (*S. officinalis*) en utilisant l'extrait stomacal de l'émissole lisse (*M. mustelus*) (ESEL). On a démontré que l'utilisation de cet extrait au cours du traitement par l'acide acétique 0,2 M améliore d'une manière significative le rendement d'extraction de la gélatine. Le meilleur rendement en hydroxyproline (52,37 %) a été obtenu en utilisant l'ESEL à raison de 15 U/g.

La gélatine extraite à partir de la peau de la seiche (GPS) possède une teneur en protéine qui dépasse 90 % et une faible humidité (6,48 %). Comparé à la gélatine bovine commerciale (GBH), la GPS possède une composition en acides aminés différente. La teneur en imino acides (proline et hydroxyproline) est plus élevée au niveau de la GBH (219 résidus/1000) qu'au niveau de la GPS (180 résidus/1000). Alors que, la teneur en sérine de la GPS (49 résidus/1000) est plus élevée par rapport à celle de la GBH (29 résidus/1000).

La force du gel de la gélatine GPS est de l'ordre de 180 g qui demeure inférieur à celle de la gélatine bovine (250 g). L'étude comparative de certaines propriétés fonctionnelles a montré que l'activité émulsifiante, le pouvoir moussant et la stabilité de la mousse de la GPS

sont comparables à celles de la GBH alors qu'elle possède une stabilité de l'émulsion et un pouvoir de rétention d'huile plus importants.

Les retombés de ce travail se manifestent par une :

- ✓ valorisation de co-produits des industries de transformation des produits de la mer.
- ✓ extraction et purification de protéases alcalines et acides à usages biotechnologiques et industriels.
- ✓ mise au point de procédés de production de peptides bioactifs à partir d'hydrolysats enzymatiques de protéines issues de produits et co-produits marins.
- ✓ mise en place d'un procédé enzymatique d'extraction de la gélatine d'origine marine.

La suite des travaux portera essentiellement sur :

- ✓ l'étude des éventuelles applications des protéases purifiées dans diverses applications biotechnologiques.
- ✓ le clonage et l'expression des gènes codant pour la trypsine, la chymotrypsine et cathepsine D. Ainsi que l'étude de la structure-fonction de ces enzymes par modélisation.
- ✓ la purification et l'identification des peptides antioxydants.
- ✓ la mise en évidence d'autres activités biologiques, notamment antimicrobienne, antithrombotique, satiétogène, antivirale, secrétagogue, etc.
- ✓ l'optimisation par plan d'expérience l'extraction de la GPS.

Références bibliographiques

A

Abubakar A., Saito T., Aimar M. V. & Itoh T. (1996). New derivation of the inhibitory activity against angiotensin converting enzyme (ACE) from sweet cheese whey. *Tohoku J. Agric. Res*., 47, 1-8.

Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y. & Itoh T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci*., 81, 3131-3138.

Achouri A., Wang Z. & Xu S. (1998). Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food Res. Intern*., 31, 617-623.

Adler-Nissen J. (1976). Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. food Chem*., 24, 1090-1093.

Adler-Nissen J. (1982). Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J. Chem. Tech. Biotechnol*., 32, 138-156.

Adler-Nissen J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science publisher. London and New York.

Agin V., Chichery R., Chichery M. P., Dickel L., Darmaillacq A. S. & Bellanger, C. (2006). Behavioural plasticity and neural correlates in adult cuttlefish. *Life Env*., 56, 81-87.

Ahmad M., Benjakul S., Ovissipour M. & Prodpran T. (2011). Indigenous proteases in the skin of unicorn leatherjacket (*Alutherus monoceros*) and their influence on characteristic and functional properties of gelatin. *Food Chem.*, 127, 508-515.

Al-Saidi G., Rahman M. S., Al-Alawi A. & Guizani N. (2011). Thermal characteristics of gelatin extracted from shaari fish skin Effects of extraction conditions. *J. Therm. Anal Calorim*., 104:593-603.

Amiza M. A. & Owusu A. R. K. (2002). A Single Step Purification of Gastricsin-Like Proteinase from Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *J. Biol. Sci*., 2, 591-595.

Andreeva N. S. & Rumsh L. D. (2001). Analysis of crystal structurs of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Sci*., 10, 2431-2450.

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.

Antonios T. F. T. & Macgregor G. A. (1995). Angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertension: potential problems. *J. Hypertens.*, 13, 11-16.

Aoki H., Ahsan M. N., Matsuo K., Hagiwara T. & Watabe S. (2003). Purification and characterization of collagenolytic proteases from the hepatopancreas of northern shrimp (*Pandalus eous*). *J. Agri. Food Chem*., 51, 777-783.

Arason S., Thoroddsson G. & Valdimarsson G. (1990). The production of silage from waste and industrial fish: the Icelandic experience. In S. Keller (Ed.), Making profits out of seafood wastes, (pp. 79-85). Proceedings of the International Conference on Fish By-products, Anchorage, Alaska.

Arihara K., Nakashima Y., Mukai T., Ishikawa S. & Itoh M. (2001). Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci.*, 57, 319-324.

Arnesen J. A. & Gildberg A. (2002). Preparation and characterisation of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groenlandica*). *Bioresource Technol*., 82, 191-194.

Arnesen J. A., & Gildberg A. (2006). Extraction of muscle proteins and gelatin from cod head. *Process Biochem*., 41, 697-700.

Arnesen J. A. & Gildberg A. (2007). Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technol*., 98, 53-57.

Arnt J. R., & Walther B. T. (1989). Purification and characterization of chymotrypsin, trypsin and elastase like proteinases from cod (*Gadus moruha* L.). *Comp. Biochem. Physiol*., 93B, 317-324.

Arunchalam K. & Haard N. F. (1985). Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadus saida*). *Comp. Biochem. Physiol*., 80B, 467-473.

Asgeirsson B. & Bjarnason J. B. (1991). Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol*., 99B, 327-335.

Asgeirsson B. & Bjarnason J. B. (1993). Properties of elastase from Atlantic cod, a cold-adapted proteinase. *Biochim. Biophys. Acta*., 1164, 91-100.

Asgeirsson B., Leth-Larsen R., Thorolfsson M., Nedertoft M. M & Hojrup P. (1998). The third serine proteinase with chymotrypsin specificity isolated from Atlantic cod (*Gadus morhua*) is a type-II elastase. *Euro. J. Biochem.*, 255, 638-646.

Asher, D. M. (1999). The transmissible spongiform encephalopathy agents: concerns and responses of the United States regulatory agencies in maintaining the safety of biologics. Developments in Biological Standardization, 100, 103-118.

Aspmo S. I., Horn S. J. & Eijsink V. G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem*., 40, 1957-1966.

Astawan M., Wahyuni M., Yasuhara T., Yamada K., Tadokoro T. & Maekawa A. (1995). Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 425-429.

Avena-Bustillos R. J., Olsen C. W., Chiou B., Yee E., Bechtel P. J. & McHugh T. H. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *J. Food Sci*., 71, 202-207.

B

Badii F. & Howell N. K. (2006). Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20, 630-640.

Bailey A. J. & Light N. D. (1989). Connective tissue in meat and meat products. London & New York: Elsevier Applied Science. pp. 238-242.

Balti R., Barkia A., Bougatef A., Ktari N. & Nasri M. (2009). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): Purification and characterization. *Food Chem*., 113, 146-154.

Balti R., Bougatef A., El-Hadj Ali N., Zekri D., Barkia A. & Nasri M. (2010a). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *J. Sci. Food Agric.*, 90, 2006-2014.

Balti R., Hmidet N., Jellouli K., Nedjar-Arroume N., Guillochon D. & Nasri M. (2010b). Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10623-10630.

Balti R., Jridi M., Sila A., Souissi N., Nedjar-Arroume N., Guillochon D. & Nasri M. (2011). Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. *Food Hydrocolloids.*, 25, 943-950.

Balti R., Bougherra F., Bougatef A., Ben Khaled H., Nedjar-Arroume N., Dhulster P., Guillochon D. & Nasri M. (2012). Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptides substrates: purification and biochemical characterization. *Food Chem.*, 130, 475-484.

Baranowski E. S., Nip W. K. & Moy J. H. (1984). Partial characterization of a crude enzyme extract from the fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Food Sci.*, 49, 1494-1505.

Barkia A., Bougatef A., Nasri R., Fetoui E., Balti R. & Nasri M. (2010). Trypsin from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterisation. *Fish Physiol. Biochem.*, 36, 893-902.

Benjakul S. & Morrissey M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3423-30.

Ben Khaled H., Bougatef A., Balti R., Triki-Ellouz Y., Souissi N. & Nasri M. (2008). Isolation and characterization of trypsin from sardinelle (*Sardinella aurita*) viscera. *J. Sci. Food Agric*., 88, 2654-2662.

Ben Khaled H., Jellouli K., Souissi N., Ghorbel S., Barkia A. & Nasri M. (2011). Purification and characterization of three trypsin isoformsfrom viscera of sardinelle (*Sardinella aurita). Fish Physiol. Biochem*., In press.

Beevers G., Lip G. Y. H. & O'brien E. (2001). ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *Brit. Med. J.*, 322, 912-916.

Boletzky S.V. (1983). *Sepia officinalis*. In: *Cephalopod Life Cycle.* P.R. Boyle (Ed.). vol. 1. Academic Press, pp. 31-52.

Boletzky S. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Adv. Mar. Biol.*, 44, 143-203.

Bonow R. O., Smaha L. A., Smith S. C., Mensah G. A. & Lenfant C. (2002). The international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation.*, 106, 1602-1605.

Bordenave S., Fruitier I., Ballandier I., Sannier F., Gildberg A., Batista I. and Piot J. M. (2002). HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on Guinea pig ileum and ACE activity. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 32, 65-77.

Borresen T. (1992). Biotechnology, by-products and aquaculture. In E. G. Bligh (Ed.), Seafood science and technology (pp. 278-287). Oxford, UK: Maston Book Services Ltd.

Boucaud-Camou E. & Boucher-Rodoni (1983). Feeding and digestion in cephalopods. In 'The Mollusca' vol 5, Physiology part 2 (New York: Academic Press) pp. 149-187.

Bougatef A., Souissi N., Fakhfakh N., Triki-Ellouze Y & Nasri M. (2007). Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food. Chem.*, 102, 343-350.

Bougatef A., Nedjar-Arroume N., Ravalec-Plé R., Lereoy Y., Guillochon D., Barkia A. & Nasri M. (2008a). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chem.*, 111, 350-356.

Bougatef A., Balti R., Ben Zaied S., Souissi N. & Nasri M. (2008b). Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chem.*, 107, 774-784.

Bougatef A., Balti R., Nedjar-Arroume N., Ravallec Plé R., Adjé-Yaba E., Souissi N., Lassoued I., Guillochon D. & Nasri M (2010a). Evaluation of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates generated by gastrointestinal proteases: Identification of the most potent active peptide. *Eur. Food Res. Technol.*, 231, 127-135.

Bougatef A., Balti R., Rim N., Jellouli K., Souissi N. & Nasri M. (2010b). Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: smooth hound (*Mustelus mustelus*). *J. Agric. Food Chem.*, 58, 5763-5769.

Bouhallab S. & Touzé C. (1995). Continous hydrolysis of caseino macropeptides in a membrane reactor. Kinetic stady and gram-scale. Production of antithrmobic peptides. *Lait.*, 75, 251.

Boyle P. & Boletzky S. (1996). Cephalopod populations: definition and dynamics. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B. Sci*., 351, 985-1002.

Brier S., Maria G., Carginale V., Capasso A., Wu Y., Taylor R. M., Nicholas B. B., Clemente C. & Engen J. R. (2007). Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii*. *FEBS J*., 274, 6152-6166.

Brew K. (2003). Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. *Trends Pharmacol. Sci.*, 24, 391-394.

Buinov A. A., Ginzburg A. S. & Syroedov V. L. (1977). Hygroscopic properties of fish protein hydrolysates, dried as foam, *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Pishchevaya Technologiya.*, 3, 110-116.

Buga S. A., Chimirov Y. I. & Prenyakov O. I. (1993). Complex processing of cephalopod molluscs or their parts, by enzymatic hydrolysis, using proteolytic enzme, followed by separation of molluscs and precipitation and separation of proteins. Brevet SU 1837802.

Byun H. G. & Kim S. K. (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochem*., 36, 1155-1162.

C

Camacho PaezPáez B., Robles Medina A., Camacho Rubio F., Gonzáles Moreno P. & Molina Grima E. (2002). Production of structured triglycerides rich in N-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprilic acid in a packedbed reactor: equilibrium and kinetics. *Chem. Eng. Sci.*, 57, 1237-1249.

Cancre I., Ravallec R., Van Wormhoudt A. V., Stenberg E., Gildberg A. & Le Gal Y. (1999). Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. *Marine Biotechnol*., 1, 489-494.

Cano-Lopez A., Simpson B. K. & Haard N. F. (1987). Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic Cod. *J. Food Sci.*, 52, 503-506.

Cao M. J., Osatomi K., Suzuki M., Hara K., Tachibana K. & Ishihara, T. (2000). Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of carp. *Fish. Sci*., 66, 1172-1179.

Cao M. J., Chen W. Q., Du C. H, Yoshida A, Lan W. G., Liu G. M. & Su W. J. (2011). Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus). Comp. Biochem. Physiol*., 158 B, 59-265.

Cao W., Zhang C., Hong P., Ji H. & Hao J. (2010). Purification and identification of an ACE inhibitory peptide from the peptic hydrolysate of *Acetes chinensis* and its antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Int. J. Food Sci. Technol*., 45, 959-965.

Castillo-Yañez F. J., Pacheco-Aguilar R., Lugo-Sanchez M. E., García-Sanchez G. & Quintero-Reyes I. E. (2009). Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chem.*, 112, 634-639.

Castillo-Yañez F. J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F. L., Navarrete-Del Toro M. A. & Félix-López M. (2006). Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Food Chem.*, 99, 252-259.

Castillo-Yañez F. J., Pacheco-Aguilar R., Garcia-Carreño F. L. & Toro M. A. N. D. (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem*., 85, 343-350.

Castillo-Yanez F. J., Pacheco-Aguilar R., Garcia-Carreno F. L. & Navarrete-Del Toro M. A. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Montery sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 140B, 91-98.

Chaveesuk R., Smith J. P. & Simpson B. K. (1993). Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. *J. Aqua. Food Prod. Technol.*, 3, 59-77.

Cheftel C., Micheal A., Wang D. I. C. & Tannenbaum S. R. (1971). Enzymatic solubilisation of fish protein concentrate: batch studies applicable to continuous enzyme recycling process. *J. Agr. Food Chem*., 19, 155-161.

Cheow C. S., Norizah M. S., Kyaw Z. Y. & Howell N. K. (2007). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chem*., 101, 386-391.

Cho S. M., Gu Y. S. & Kim S. B. (2005). Extraction optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatine compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*., 19, 221-229.

Cho S. M., Kwak K. S., Park D. C., Gu Y. S., Ji C. I., Jang D. H., Lee Y. B. & Kim S. B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids.*, 18, 573-579.

Chobert J. M., Bertrand-Harb C. & Nicolas M. G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 883-887.

Choi H. S., Cho H. Y., Yang H. C., Ra K. S. & Suh H. J. (2001). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Res. Int.*, 34, 177-182.

Chen J. R., Yang S. C., Suetsana K. & Chao J. C. J. (2004). Soybean protein-derived hydrolysate affects blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Biochem*., 28, 61-73.

Chen W. Q., Cao M. J., Yoshida A., Liu G. M., Weng W.Y., Sun L. C. & Su W. J. (2009). Study on Pepsinogens and Pepsins from Snakehead (*Channa argus*). *J. Agric. Food Chem*., 57, 10972-10978.

Chen Y. H., Liu Y. H., Yang Y. H., Feng H. H., Chang C. T., Chen C. C. (2002). Antihypertensive effect of an enzymatic hydrolysate of chicken essence residues. *Food Sci. Technol. Res.*, 8, 144-147.

Chen Zhen Y., Peng C., Jiao R., Wong Y. M., Yang N. & Huang Y. (2009). Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4485-4499.

Cheung H. S., Wang F. L., Ondetti M. A., Sabo E. F. & Cushman D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.*, 255, 401-407.

Cheow C. S., Norizah M. S., Kyaw Z. Y. & Howell N. K. (2007). Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chem.*, 101, 386-391.

Clark J., Macdonald N. L. & Stark J. R. (1985). Metabolism in marine flat fish III. Measurement of elastase activity in the digestive tract of Dover sole (*Solea solea L.*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B, 695-700.

Cohen T. & Gertler A. (1981). Pancreatic proteolytic enzymes from Carp (*Cyprinus carpio*) I. Purification and physical properties of trypsin, chymosin, elastase and carboxypeptidase B. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B, 647-653.

Cole, C. G. B. (2000). Gelatin. In F. J. Francis (Ed.), Encyclopedia of food science and technology (2nd ed.). (pp. 1183-1188) New York: Wiley.

Cremades O., Parrado J., Alvarez O. M. C. & Jover M. (2003). Isolation and characterization of carotenoproteins from crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chem*., 82, 1-8.

Cushman D. W. & Ondetti M. A. (1999). Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat. Med.*, 5, 1110-1112.

Cushman D. W., Pluščec J., Williams N. J., Weaver E. R., Sabo E. F., Kocy O., Cheung H. S. & Ondetti M. A. (1973). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia.*, 29, 1032-1035.

D

Demetriades K., Coupland J. N. & McClements D. J. (1997). Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl. *J. Food Sci.*, 62, 342-348.

Dendinger J. E. & O'Connor K. L. (1990). Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol*., 95B, 525-530.

De-Vecchi S. D. & Coppes Z. (1996). Marine fish digestive proteases relevance to food industry and south-west Atlantic region a review. *J. Food Biochem.*, 20, 193-214.

de Wolf F. A. (2003). Collagen and gelatin. In: Progress in biotechnology, vol. 23. Elsevier Science B.V. pp. 133-218.

DGPA (2009). Base de données de la direction générale de la pêche et de l'aquaculture (Tunisie).

Dickel L., Chichery M. P. & Chichery R. (2001). Increase of learning abilities and maturation of the vertical lobe complex during post-embryonic development in the cuttlefish, *Sepia*. *Dev. Psychobiol.*, 39, 92-98.

Diniz F. M. & Martin A. M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol*., 31, 419-26.

Diniz F. M. & Martin A. M. (1997). Effect of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *LWT*., 30, 266-272.

Dixon B. (1990). Cod waste yields useful enzymes. *Biotechnol*., 8, 791.

Dostal D. E., Booz G. W. & Baker K. M. (1994). The Cardiac Renin-Angiotensin System : an Overview. *The Cardiac Renin Angiotensin System*/ ed. by Lindpaintner & Ganten. New York : Futura Publishing Co. Inc. pp. 1-20.

Drago S. R. & Gonzalez R. J. (2001). Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innov Food Sci Emer Technol*., 1, 269-273.

Dumay J., Barthomeuf C. & Bergé J. P. (2004). How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. *J. Aquatic Fish Product Technol*., 13, 69-84.

Duarte J., Vinderola G., Ritz B., Perdigón G. & Matar C. (2006). Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiol*., 211, 341-350.

Dziuba J., Minkiewicz P., Puska K. & Dabrowski S. (1995). Plant seed storage proteins as potential precursors of bioactives peptides. *Polish J. Food Nutr. Sci*., 4, 31-42.

E

Eastoe J. E. & Leach A. A. (1977). Chemical constitution of gelatin. In A. G. Ward, & A. Courts (Eds.), the science and technology of gelatin. New York: Academic Press, pp. 73-107.

Eisen A. Z., Henderson K. O., Jeffrey J. J. & Bradshaw R. A. (1973). A collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator*. Purification and properties. *Biochemistry*, 12, 1814-1822.

El Hadj Ali N., Hmidet N., Bougatef A., Nasri R. & Nasri M. (2009). A Laundry Detergent-Stable Alkaline Trypsin from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Purification and Characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 10943-10950.

El Hadj Ali N., Hmidet N., Zouar-Fakhfakh N., Ben Khaled H. & Nasri M. (2010). Alkaline Chymotrypsin from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Purification and Characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9787-9792.

El Hadj Ali N., Hmidet N., Ghorbel-Bellaaj O., Fakhfakh-Zouari N., Bougatef A. & Nasri M. (2011). Solvent-stable digestive alkaline proteinases from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: characteristics, application in the deproteinization of shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. *Appl. Biochem. Biotechnol*., 164, 1096-1110.

El-Shemy M. G. (1997). Characterization of affinity purified trypsin from hybrid tilapia (*Tilapia nilotica/aurea*). *J. Food Biochem*., 21, 163-175.

Enari H., Takahashi Y., Kawarasaki M., Tada M. & Tatsuta K. (2008). Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from salmon muscle and their antihypertensive effect. *Fisheries Sci*., 74, 911-920.

Ernst E. (1987). Cardiovascular effects of garlic (*Allium sativum*): a review. *Pharmatherapeutica*, 5, 83-89.

Erskine P. T., Coates L., Mali S., Gill R. S., Wood S. P., Myles D.A. & Cooper, J. B. (2003). Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides. *Prot. Sci*., 12, 1741-1749.

Escudero E., Sentandreu M. A., Arihara K. & Toldra F. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides generated from in vitro gastrointestinal digestion of pork meat. J. *Agric. Food Chem*., 58, 2895-2901.

Esposito T. S., Marcuchi M., Amaral I. P. G., CarvalhoJR. L. B. & Bezerra R. S. (2010). Trypsin from the Processing Waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and Its Compatibility with Oxidants, Surfactants and Commercial Detergents. *J. Agric. Food Chem*., 58, 6433-6439.

F

FAO (2006). Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Rome, pp. 62.

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

FAO (2010). Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Rome, pp. 14.

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

Ferreira S. H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol*., 24, 163-169.

Ferreira S. H., Bartelet D. C. & Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*., 9, 2583-2593.

Fidantsi A. & Doxastakis G. (2001). Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Coll. Sur. B.*, 21, 119-124.

Fitzgerald R. J. & Meisel H. (2000). Milk protein derived inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *Br. J. Nutr.*, 84, 33.

Fitzgerald A. J., Rai P. S., Marchbank T., Taylor G. W., Ghosh S., Ritz B. W. & Playford R. J. (2005). Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut.*, 54, 775-781.

Fong W. P., Chan Y. M. & Lau K. K. (1998). Isolation of two chymotrypsins from grass carp. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 45, 409-418.

Froidevaux R., Krier F., Nedjar-Arroum N., Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Ruckebusch C., Dhulster P. & Guillochon D. (2001). Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS letters.*, 491, 159-163.

Fruton J. S. (1987). Aspartyl proteinases. In X. Neuberger, & K. Brocklehurst (Eds.), Hydrolytic enzymes. London, UK : Elsevier Science, pp. 1-37.

Fuchise T., Kishimura H., Sekizaki H., Nonami Y., Kanno G., Klomklao S., Benjakul S. & Chun B. S. (2009). Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). *Food Chem.*, 116, 611-616.

Fujii M., Matsumura N., Mito K., Shimizu T., Kuwahara M., Sugano S. & Karaki H. (1993). Antihypertensive effects of peptides in autolysate of bonito bowels on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 2186-2188.

Fujita H., Yamagami T. & Ohshima K. (2001). Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in the borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr. Res.*, 21, 1149-1158.

Fujita H., Yokoyama K. & Yoshikawa M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J. Food Sci.*, 65, 564-569.

Fujita H. & Yoshikawa M. (1999). LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*., 44, 123-127.

Fujita, H., Yokoyama R., Yasumoto R. & Yoshikawa M. (1995). Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*., 22, 304-305.

Furushiro M., Sawada H., Hirai K., Motoike M., Sansawa H., Kobayashi S., Watanuki M. & Yokokura T. (1990). Blood pressure-lowering effect of extract from *Lactobacillus casei* in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2193-2198.

G

Galazka V. B., Dickinson E. & Ledward D. A. (1999). Emulsifying behavior of globulin Vicia faba in mixtures with sulphated polysaccharides: Comparison of thermal and high-pressure treatments. *Food Hydrocolloids*., 13, 425-435.

Garbers D. L. & Dubois S. K. (1999). The molecular basis of hypertension. *Annu. Rev. Biochem*., 68, 127-155.

Garcia-Carreno F. L. & Haard N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.*, 17, 97-113.

Garcia-Carreno F. L., Hernandez-Cortes M. P. & Haard N. F. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive system of a fresh water and marine decapod. *J. Agri. Food Chem.*, 42, 1456-1461.

Gates B. J. & Travis J. (1969). Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry*., 8, 4483-4489.

Gerasimova N. A. & Kupina N. M. (1996). Properties of proteases from internal organs of the king crab. *App. Biochem. Microbiol*., 32, 375-378.

Gildberg A. (1993). Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.*, 28, 1-5.

Gildberg A. & Raa J. (1983). Purification and characterization of pepsins from Arctic fish Capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 75A, 337-342.

Gildberg A. (1988). Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B, 425-435.

Gildberg A., Bogwald J., Johansen A. & Stenberg E. (1996). Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 11B, 97-101.

Gildberg A., Olsen R. & Bjarnason J. B. (1990). Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol*., 96B, 323-330.

Gildberg A. (1992). Recovery of proteinases and protein hydrolysate from fish viscera. *Bioresource Technol*., 39, 271-276.

Gildberg A. (1987). Purification and characterisation of cathepsin D from the digestive gland of the pelagic squid *Todarodes sagittatus*. *J. Sci Food Agric*., 39, 85-94.

Gildberg A. (1994). Enzymatic descaling of fish. 24th annual meeting of Western European Fish Technologist Association (WEFTA), 25-29 septembre 1994, ifremer, Nantes.

Gildberg A., Arnesen J. A. & Carlehög M. (2002). Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.*, 38, 475-480.

Gildberg A. & Overbo K. (1990). Purification and characterization of pancreatic elastase from Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 97B, 775-782.

Gildberg A., Espejo-Hermes J. & Magno-Orejana F. (1984). Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing salt content. *J. Sci. Food Agri*., 35, 1363-1369.

GME (2008). Gelatin Manufacturers of Europe. http://www.gelatine.org/en/gelatine/ overview/127.htm. Accessed 15.03.08.

Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. & Addeo F., (2000). Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *Cremosis* FT4. App. *Env. Microbiol.*, 66, 3898-3904.

Gomez-Guillen M. C., Ihl M., Bifani V., Silva A. & Montero P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae Turcz*). *Food Hydrocolloids*., 21, 1133-1143.

Gomez-Guillen M. C., Turnay J., Fernandez-Diaz M. D., Ulmo N., Lizarbe M. A. & Montero P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids.*, 16, 25-34.

Gómez-Ruiz J. Á., Ramos M. & Recio I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.*, 12, 697-706.

Gonzáles De Llano D., Herraiz T. & Polo M. C. (1996). Peptides. *Handbook of food analysis, vol. 1*/ ed. by L.M.L. Nollet. Marcel Dekker Inc, pp. 229-276.

Gopakumara K. (1990). Biochemistry of melanosis in shellfish and its prevention. *Ann. Indust. Fish. Assoc*., 7, 17-20.

Grant G. A., Eisen A. Z. & Bradshaw R. A. (1981). Collagenolytic protease from fiddler crab (*Uca pugilator*). *Methods in Enz*., 80, 722-734.

Groppe J. & Morse D. (1993). Molluscan chymotrypsin-like protease; structure, localization and substrate specificity. *Arch. Biochem Biophys*., 305, 159-169.

Guerra A. (2006). Ecology of *Sepia officinalis*. *Life Env*., 56, 97-107.

Guérard F., Dufossé L., De La Broise D. & Binet A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *J. Mol. Catal B. Enzym.*, 11, 1051-1059.

Guizani N., Rolle R. S., Marshall M. R. & Wie C. I. (1991). Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Com. Biochem. Physiol*., 98B, 517-521.

Gunstone F. D. (2002). Market report. *Lipid Technol*., 14, 48.

Gunstone F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *J. Sci. Food Agric*., 79, 1535-1549.

Gu R. Z., Li C. Y., Liu W. Y., Yi W. X., Cai M. Y. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. *Food Res Int*., 44, 1536-1540.

H

Haard N. F. (1992). A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aquatic Food Prod. Technol*., 1, 17-35.

Haard N. F. (1998). Speciality enzymes from marine organisms. *Food Technol*., 7, 64-67.

Haard N. F. & Simpson B. K. (1994). Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. In A. M. Martin (Ed.), Fisheries processing: biotechnological applications. London, UK: Chapman and Hall, pp. 132-154.

Haard N. F. (1986). Atlantic Cod Gastric Protease. Characterization with Casein and Milk Substrate and Influence of Sepharose Immobilization on Salt Activation, Temperature Characteristics and Milk Clotting Reaction. *J. Food Sci*., 51, 313-316.

Haard N. F. (1994). Protein hydrolysis in seafoods. In F. Shahidi, & J. R. Botta (Eds.), Seafoods chemistry, processing technology and quality. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional, pp. 11-33.

Haddar, A., Bougatef, A, Balti, R., Souissi, N., Koched, W. & Nasri, M. (2011). Physicochemical and functional properties of gelatin from tuna (*Thunnus thynnus*) head bones. *J. Food Nut. Res*., 50, 3, 150-159.

Han X. Q. (1993). Recovery of digestive enzymes from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and their utilization in food processing, MSc thesis. Dept. Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, St. John's, NF, Canada.

Han X. Q. & Shahidi F. (1995). Extraction of harp seal gastric proteases and their immobilization on chitin. *Food Chem.*, 52, 71-76.

Haque Z. U. (1993). Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: a review. *J. Dairy Sci.*, 76, 311-320.

Hartsuck J. A., Marciniszyn J., Huang J. S. & Tang J. (1977). Intramolecular activation of pepsinogen. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 95, 85-102.

Hata Y., Nakajima K., Uchida J. I., Hidaka H. & Nakano T. (2001). Clinical effects of brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (wakame), on blood pressure in hypertensive subjects. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 30, 43-53.

Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y. & Takano T. (1996). A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64, 767-771.

Hau P. V. & Benjakul S. (2006). Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snaper (*Pricanthus maracanthus*). *J. Food Biochem.*, 30, 478-495.

Hernandez-Cortes P., Whitaker J. R. & Garcia-Carreno F. L. (1997). Purification and characterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda). *J. Food Biochem.*, 21, 497-514.

Hernández-Ledesma B., Recio I., Ramos M. & Amigo L. (2002). Preparation of ovine and caprine β-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int. Dairy J.*, 12, 805-812.

Herregods G., Van Camp J., Morel N., Ghesquiere B., Gevaert K., Vercruysse L., Dierckx S., Quanten E. & Smagghe G. (2011). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Gelatin Hydrolysates and Identification of Bioactive Peptides. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 552-558.

Heu M. S., Kim H. R. & Pyeun, J. H. (1995). Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy (*Engraulis japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B, 557-568.

Holzer D. (1996). Gelatin production. US patent 5, 484,888.

Hoyle N. & Merritt J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci*., 59, 76-79.

Hsu F. L., Lin Y. H., Lee M. H., Lin C. L. & Hou W. C. (2002). Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6109-6113.

Hsu K. C, Cheng M. L. & Hwang J. S (2007). Hydrolysates from Tuna Cooking Juice as an Anti-hypertensive Agent. *J. Food Drug Anal*., 15, 169-173.

Huang W. H., Sun J., He H., Dong H. W. & Li J. T. (2011). Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.*, 128, 968-973.

Huda N., Abdullah A. & Badji S. A. (2001). Functional properties of surimi powder from three Malaysian marine fish. *Int. J. Food Sci. Technol*., 36, 401-406.

Hyun C. K. & Shin H. K. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process. Biochem.*, 36, 65-71.

I

Ijäs H., Collin M., Finckenberg P., Pihlanto-Leppälä A., Korhonen H., Korpela R., Vapaatalo H. & Nurminen M. L. (2004). Antihypertensive opiod-like milk peptide α-lactorphin : lack of effect on behavioural tests in mice. *Int. Dairy J.*, 14, 201-205.

Itou K., Nagahashi R., Saitou M. & Akahane Y. (2007) Antihypertensive effect of *narezushi*, a fermented mackerel product, on spontaneously hypertensive rats. *Fisheries Sci*., 73, 1344-1352.

J

Jackson, E. K. & Garrison J. C. (1996). Renin and Angiotensin. In Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W and Goodman-Gilman A. (Eds.). The Pharmacological Basis of Therapeutics New York : Mc Graw-Hill Edition, pp. 733-758.

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 Chem*., 121, 178-184.

Jamilah B. & Harvinder K. G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chem*., 77, 81-84.

Jang J. H., Jeong S. C., Kim J. H., Lee Y. H., Ju Y. C., Lee J. S. (2011). Characterisation of a new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Pleurotus cornucopiae*. *Food Chem*., 127, 412-418

Janson J. & Rydén L. (1998). Protein purification, principles, high resolution methods and applications, 2nd ed. NY: John Wiley & Sons. New York.

Je J. Y., Park P. J. & Kim S. K. (2005). Antioxydant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theraga chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int*., 38, 45-50.

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 biochem*., 42, 840-846.

Jellouli K., Bougatef A., Daassi D., Balti R., Barkia A. & Nasri M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. *Food Chem*., 116, 644-650.

Jellouli K., Balti R., Bougatef A., Hmidet N., Barkia A. & Nasri M. (2011). Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes capriscus*). *LWT*., 44, 1965-1970.

Jia J., Ma H., Zhao W., Wang Z., Tian W., Luo L. & He R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chem*., 119, 336-342.

Jiang Y. K., Sun L. C., Cai Q. F., Liu G. M., Yoshida A., Osatomi K. & Cao, M. J. (2010). Biochemical characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *J. Agric. Food Chem*., 58, 8069-8076.

Johnson H. M. (2002). Perspectives de marché dans le secteur international du poisson et des fruits de mer. Autres produits/usages et questions de salubrité alimentaire. *Bureau du Commissaire au développement de l'aquaculture*, pp. 43.

Jongjareonrak A., Benjakul S., Visessanguan W., Prodpran T. & Tanaka M. (2006a). Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*., 20, 492-501.

Jongjareonrak A., Benjakul S., Visessanguan W. & Tanaka M. (2006b). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *Eur Food Res Technol*., 222, 229-230.

Jung W. K., Mendis E., Je J. Y., Park P. J., Son B. W., Kim H. C., Choi Y. K. & Kim S. K. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*., 94, 26-32.

Jun S. Y., Park P. J., Jung W. K. & Kim S. K. (2004) - Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Tech.*, 219, 20-26.

K

Kajimoto O., Nagakawa S., Kajimoto Y., Takashiba M. & Shimano K. (2005). Hypotensive effects and safety of tea beverage containing peptide derived from sardine muscle hydrolyzate on high normal blood pressure and mild hypertensive subjects. *Jap. Pharmacol. Therap.*, 33, 1127-1140.

Kalac J. (1978). Studies on herring (*Clupea harengus L.*) and capelin (*Mallotus villosus L.*) pyloric caeca protease. III. Characterization of the anionic fractions of chymotrypsins. *Biologia*., 33, 939-949.

Kanno G., Yamaguchi T., Kishimura H., Yamaha E. & Saeki H. (2010). Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh-water. *Fish Physiol. Biochem*., 36, 637-645.

Kato H. & Suzukit T. (1971). Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C. *Biochemistry*., 10, 972-980.

Karim A. A. & Bhat R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23, 563-576.

Karaki H., Doi K., Sugano S., Uchiwa H., Sugai R., Murakami U., Takemoto S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1990, 96C, p. 367-371.

Karamac M., Amarowicz R. & Henryk K. (2002). Effect of temperature and enzyme/substrat ratio on the hydrolysis of pea protein isolates by trypsin. *J. of Food Sci*., 20, 1-5.

Kasankala L. M., Xue Y., Weilong Y., Hong S. D. & He Q. (2007). Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Catenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Bioresource Technol*., 98, 3338-3343.

Kawakami A., Kayahara H. & Tadasa K. (1995). Taste evaluations of angiotensin I converting enzyme inhibitors, Leu-Lys-Tyr analogues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 709-710.

Kawamura Y., Nishimura K., Matoba T. & Yonezawa D. (1984). Effects of protease inhibitors on the autolysis and protease activities of Antarctic krill. *Agri. Biol. Chem.*, 48, 923-930.

Kawasaki T., Osajima K., Seki E., Yoshida M., Asada K., Matsui T. & Osajima Y. (1998). Antihypertensive effect of Val-Tyr, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolysate, on hypertensives. *J. Hypertens.*, 16, 25.

Kawasaki T., Seki E., Osajima K., Yoshida M., Asada K., Matsui T. & Osajima Y. (2000). Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolysate, on mild hypertensive subjects. *J. Hum. Hypertens.*, 2000, 14, 519-523.

Khantaphant S. & Benjakul S. (2010). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem.*, 120, 658-664.

Kim S. K. & Mendis E. (2006). Bioactive compounds from marine processing by-products - A review. *Food Res. Int.*, 39, 383-393.

Kim Y. K., Yoon S., Yu D. Y., Lönnerdal B. & Chung B. H. (1999). Novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α_{S1}-casein expressed in *Escherichia coli*. *J. Dairy Res.*, 66, 431-439.

Kim Y. K. & Chung B. H. (1999) A novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from human α_{S1}-casein. *Biotechnol. Let.*, 21, 575-578.

Kim S. K., Byun H. G., Park P. J. & Shahidi F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2992-2997.

Kishimura H. & Hayashi K. (2002). Isolation and characteristics of trypsin from the pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132B, 485-490.

Kishimura H., Hayashi K., Miyashita Y. & Nonami Y. (2005). Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *J. Food Biochem.*, 29, 459-469.

Kishimura H., Tokuda Y., Klomklao S., Benjakul S. & Ando S. (2006). Enzymatic characteristics of trypsin from pyloric ceca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*). *J. Food Biochem.*, 30, 466-477.

Kishimura H., Tokuda Y., Klomklao S., Benjakul S. & Ando, S. (2006b). Comparative study of enzymatic characteristics of trypsins from the pyloric ceca of yellow taim (*Seriola quinqueradiata*) and brown hakeling (*Physiculus japonicus*). J. *Food Biochem.*, 30, 521-534.

Kishimura H., Tokuda Y., Yabe M., Klomklao S., Benjakul S. & Ando S. (2007). Trypsins from the pyloric ceca of jacopever (*Sebastes schlegelii*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterizaton. *Food Chem*., 100, 1490-1495.

Kishimura H., Klomklao S., Benjakul S. & Chun B. S. (2008). Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chem*., 106, 194-199.

Kishimura H., Klomklao S., Nalinanon S., Benjakul S., Chun B. S. & Adachi K. (2010) Comprative study on thermal stability of trypsin from the pyloric ceca of threadfin hakeling (*Laemonema Longipes*). *J. Food Biochem*., 34, 50-65.

Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W. & Shahidi F. (2011). Effect of extraction temperature on functional properties and antioxidative activities of gelatin from shark skin. *Food Bioprocess Technol*., In press.

Ko1odziejska I., Kaczorowski K., Piotrowska B. & Sadowska M. (2004). Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chem*., 86, 203-209.

Kolkovski S. (2001). Digestive enzymes of fish larvae and juveniles - implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*., 200, 181-201.

Klomklao S., Kishimura H., Yabe M. & Benjakul S. (2007a). Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comp. Biochem. Physiol*., 147B, 682-689.

Klomkalo S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., Simpson B. K. & Saeki H. (2007b). Purification and characterization of trypsins from the spleen tuna skipjack (*Katsuwonus pelamis*) spleen. *Food Chem*., 100, 1580-1589.

Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. & Simpson B. K. (2007c). Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). *Comp. Biochem. Physiol.* 148B, 382-389.

Klomkalo S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H., Simpson B. K. & Saeki H. (2006a). Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol*., 144B, 47-56.

Klomklao S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. & Simpson B. K. (2006b). Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol*). *J. Agric. Food Chem*., 54, 5617-5622.

Klomklao S., Kishimura H. & Benjakul S. (2009a). Trypsin from the pyloric ceca of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): Purification and Characterization. *J. Agric. Food Chem*., 57, 7097-7103.

Klomklao S., Kishimura H., Nonami Y. & Benjakul S. (2009b). Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the Intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chem*., 115, 155-162.

Klomklao S., Kishimura H., Benjakul, S. Simpson B. K. & Visessanguan W. (2010). Cationic trypsin: a predominant proteinase in pacific saury (*Cololabis Saira*) pyloric ceca. *J. Food Biochem*., 34, 1105-1123.

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 Chem*., 102, 1317-1327.

Kohama Y., Matsumoto S., Oka H., Teramoto T., Okabe M. & Mimura T. (1988). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 332-337.

Kohama Y., Oka H., Kayamori Y., Tsujikawa K., Mimura T., Nagase Y. & Satake M. (1991). Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2169-2170.

Kohmuram., Nio N., Kubo K., Minoshima Y., Munekata E. & Ariyoshi Y. (1989). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β-casein. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2107-2114.

Ko1odziejska I., Skierka E., Sadowska M., Ko1odziejski W. & Niecikowska C. (2008). Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chem*., 107, 700-706.

Komai T., Kawabata C., Amano M., Lee B. R. & Ichishima E. (2004). Todarepsin, a new cathepsin D from hepatopancreas of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *Comp. Biochem. Physiol*., 82, 373-382.

Konagaya S. (1985). Partial purification of cathepsin D from muscle of chum sahon in spawning migration. *Bulletin Tokai Rea. Fisheries Res. Lab*., 116, 49-55.

Kotzamanis Y. P., Gisbert E., Gatesoupe F. J., Zambonino Infante J. & Cahu C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol*., 147B, 205-214.

Koueta N. & Boucaud-Camou E. (1986) Comparative study of the secretion of the posterior salivary glands of decapod cephalopods - *Sepia officinalis* L. *Cell Mol. Biol*., 32, 333-341.

Koury B., Spinelli J. & Wieg D. (1971). Protein autolysis rates at various pH's and temperatures in hake and Pacific herring, and their effect on yield in the preparation of fish protein concentrate. *Fish Bull*., 69, 241-246.

Kristjansson M. M. & Nielsen H. H. (1992). Purification and characterization of two chymotrypsin-like proteases from the pyloric caeca of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol*., 101B, 247-253.

Kristjansson M. M., Gudmundsdottir S., Fox J. W. & Bjarnason J. B. (1995). Characterization of collagenolytic serine proreinase from the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol*., 110B, 707-717.

Kristinsson H. G. (1998). Reaction kinetics, biochemical and functional properties of salmon muscle proteins hydrolysed by different alkaline proteases. Master's thesis, University of Washington, Seattle, WA.

Kristinsson H. G. & Rasco B. A. (2000a). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. Cri. Rev. Food Sci. Nut., 40, 43-81.

Kristinsson H. G. & Rasco B. A. (2000b). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J. Agric. Food Chem*., 48, 657-666.

Krause W. G. A. & Seiler M. (1992). Hydrolysis of casein and casein components by acid proteases with milk clotting properties-kinetic investigations. In : Food Proteins. Structures and functionality. (Eds.) K.D. Shwenke and R. Mothes. New York, pp. 87-92.

Kuehler C. A. & Stine C. M. (1974). Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein. *J. Food Sci.* 39, 379-384.

Kurtovic I. Marshall S. N. & Simpson B. K. (2006). Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol*., 143B, 432-440.

L

Langmyhr E. (1981). Enzymatic hydrolysis of fish protein. *Diss. Abs. Int*., 43, 758.

Le-chevalier P., Sellos D. & Van-Wormhoudt X. (1995). Purification and partial characterization of chymotrypsin-like proteases from digestive gland of the scallop *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol*., 110B, 777-784.

Lee D. K. P. & Warthesen J. J. (1996). Preparative methods of isolating bitter peptides from cheddar cheese. J. *Agric. Food Chem*., 44, 1058-1063.

Lee S. H., Qian Z. J. & Kim S. K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.*, 118, 96-102.

Lee D., Kim J., Park J., Choi Y. & Lee J. (2004). Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*., 25, 621-627.

Lehninger A., Nelson D. & Cox M. (1993). Principles of Biochemistry. 2nd edition Worth Publishers. New York, NY.

Li C. H., Matsui T., Matsumoto K., Yamasaki R. & Kawasaki T. (2002). Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *J. Pep. Sci.*, 8, 267-274.

Li G., Qu M., Wan J. & You J. (2007). Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with *in vivo* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac. J. Clin. Nutri*., 16, 275-280.

Lian P. Z., Lee, C. M. & Park E. (2005). Characterization of squid-processing by-product hydrolysates and its potential as aquaculture feed ingredient. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5587-5592.

Liaset B., Lied E. & Espe M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J. Sci Food Agric*., 80, 581-589.

Liaset B., Julshamm K. & Epse M. (2003). Chemical composition and theoretical nutrition evaluation of produced fraction from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex TM. *Process Biochem*., 38, 1747-1759.

Liceaga G. A. M. & Li-chan E. C. Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Food Chem. Toxicol*., 64, 1000-1004.

Linder M., Fanni J. & Parmentier M. (2001). Enzyme-catalysed enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids of salmon oil : optimisation of reaction conditions. *OCL*., 8, 73-7.

Linder M., Matouba E., Fanni J. & Parmentier M. (2002). Enrichment of salmon oil with n-3 PUFA by lipolysis, filtration and enzymatic re-esterification. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 455-62.

Liu Z. Y., Wang Z., Xu S. Y. & Xu L. N. (2007). Two trypsin isoforms from the intestine of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J. Comp. Physio.l B*., 177, 655-666.

Liu H., Li D. & Guo S. (2008). Rheological properties of channel catfish (*Ictalurus punctaus*) gelatine from fish skins preserved by different methods. *LWT*., 41, 414-419.

Lobo L. (2002). Coalescence during emulsification; 3. Effect of gelatin on rupture and coalescence. *J. Colloid Inter. Sci*., 254, 165-174.

Lu B. J., Zhou L. G., Cai Q. F., Hara K., Maeda A., Su W. J. & Cao M. J. (2008). Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chem*., 110, 352-360.

Lu B. J., Zhou L. G., Cai Q. F., Hara K., Maeda A., Su W. J. & Cao M. J. (2008). Purification and characterisation of trypsins from the pyloric caeca of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Food Chem*., 110, 352-360.

Lu J., Ren D. F., Xue Y. L., Sawano Y,. Miyakawa T. & Tanokura M. (2010). Isolation of an Antihypertensive Peptide from Alcalase Digest of *Spirulina platensis*. J. *Agric. Food Chem*., 58, 7166-7171.

M

Maehashi K., Matsuzaki M., Yamamoto Y. & Udaka S. (1999). Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysates of food proteins and characterization of their taste properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 63, 555-559.

Maeno M., Yamamoto N. & Takano T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, 79, 1316-1321.

Mahmoud M. I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol*., 58, 89-94.

Mahmoud M. I., Malone W. T. & Cordle C. T (1992). Enzymatic hydrolysis of casein : effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.*, 57, 1223-1229.

Makinodan Y., Nakagawa T. & Hujita M. (1991). Participation of muscle cathepsin D in ripening of *Funasushi* (fermented seafood made of crucian *carp*). *Nipoon Suisan Gakkaishi*., 57, 1911-1916.

Mangold K. (1989). Organes génitaux. In 'Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes'. Paris, pp. 459-492.

Marcuschi M., Espósito T. S., Machado M. F. M., Hirata I. Y., Machado M. F. M., Silva M. V., Carvalho Jr. L. B., Oliveira V. & Bezerra R. S. (2010) Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochem. Biophys. Res. Comm*., 396, 667-673.

Marczak E. D., Usui H., Fujita H., Yang Y., Yokoo M., Lipkowski A. & Yoshikawa M. (2003). New hypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptide*s., 24, 791-798.

Marinard Biotech (2003). Production de chitosane à partir de co-produits de crevette. *Proc. Les coproduits marins des usines de transformation : une valeur à exploiter*. Rencontres technologiques du Centre Québequois de valorisation des biotechnologies, Québec.

Marquez C. & Fernandez V. (1998). Significant process variable in enzymatic hydrolysis of vegetable Protein. *Chem. Biochem. Eng. Q*., 37, 1223-1235.

Martinez A. & Olsen R. L. (1989). Characterization of pepsins from cod. (editorial comment). *US Biochem. Corp*., 61, 22-23.

Martone C. B., Borla O. P. & Sanchez J. J. (2005). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technol*., 96, 383-387.

Maruyama S. & Suzuki H. A. (1982). Peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1393-1394.

Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N., Suzuki H. (1987). Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1581-1586.

Maruyama S., Miyoshi S., Kaneko T. & Tanaka H. (1989a). Angiotensin-I- converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agri. Biol. Chem*., 53, 1077-1081.

Maruyama S., Miyoshi S. & Tanaka H. (1989b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2763-2767.

Maruyama S., Nakagomi K., Tomizuka N. & Suzuki H. (1985). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1405-1409.

Marczak E. D., Usui H., Fujita H., Yang Y., Yokoo M., Lipkowski A. & Yoshikawa M. (2003). New hypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides*., 24, 791-798.

Masuda O., Nakamura Y. & Takano T. (1996). Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.*, 126, 3063-3068.

Matsufuji H., Matsui T., Ohshige S., Kawasaki T., Osajima K. & Osajima Y. (1995). antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 1398-1401.

Matsufuji H., Matsui T., Seki E., Osajima K., Nakashima M. & Osajima Y. (1994). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 2244-2245.

Matsui T., Osajima Y., Uezono K. & Kawasaki T. (1998). Metabolism of endogenous val-tyr with antihypertensive effect in human plasma. *J. Hypertens.*, 16, S138.

Matsui T., Li C. H. & Osajima Y. (1999). Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J. Pept. Sci.*, 5, 289-297.

Matsui T., Li C. H., Tanaka T., Maki T., Osajima Y. & Matsumoto K. (2000). Depressor effect of wheat germ hydrolysate and its novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide, Ile-Val-Tyr, and the metabolism in rat and human plasma. *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 427-431.

Matsui T., Yukiyoshi A., Doi S., Sugimoto H., Yamada H. & Matsumoto K. (2002) Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *J. Nutr. Biochem.*, 13, 80-86.

Matsumura N., Fujii M., Takeda Y., Sugita K., & Shimizu T. (1993a). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 695-697.

Matsumura N., Fujii M., Takeda Y. & Shimizu T. (1993b). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1743-1744.

Maubois J. L., Leonil J., Trouve R. & Bouhallab S. (1991). Les peptides du lait à activité physiologique III. Peptides du lait à effet cardiovasculaire : activité antithrombotique et antihypertensive. *Lait*, 71, 249-255.

Meisel H. (1997). Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livest. Prod. Sci.*, 50, 125-138.

Meisel H. (2003). Casokinins as inhibitors of angiotensin-converting enzyme. In: Sawatzki G, Renner B, editors. New perspectives in Infant Nutrition. Thieme, pp. 153.

Mercier A., Gauthier S. F. & Fliss I. (2004). Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *Int. Dairy J.*, 14, 175-183.

Messenger J. B. (1977). Prey-capture and learning in the cuttlefish, *Sepia*. *Symposia of the Zoological Society of London*, 38, 347-376.

Miguel M. & Aleixandre A. (2006). Antihypertensive Peptides Derived from Egg Proteins. Recent Adv. Nutr. Sci., 136, 1457-1460.

Miguel M., Gómez-Ruiz J. A., Recio I. & Aleixandre A. (2010). Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, 1422.

Miller R. & Groninger H. S. (1976). Functional properties of enzyme-modified acylated fish protein derivatives. *J. Food Sci.*, 41, 268-272.

Miller G. D., Jarvis J. K. & Mc Bean L. P. (2000). Handbook of Dairy Foods and Nutrition, CRC Press. États-unis, pp. 423.

Mito K., Fujii M., Kuwahara M., Matsumura N., Shimizu T., Sugano S. & Karaki H. (1996). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. *Eur. J. Pharmacol.*, 304, 93-98.

Miyoshi S., Ishikawa H., Kaneko T., Fukui F., Tanaka H. & Maruyama S. (1991a). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in a α-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1313-1318.

Miyoshi S., Kaneko T., Yoshizawa Y., Fukui F., Tanaka H. & Maruyama S. (1991b) Hypotensive activity of enzymatic α-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1407-1408.

Mohr V. (1980). Enzymes Technology in meat and fish industries. *Process Biochem.*, 32 : 18-21.

Morr C. V., German B., Kinsella J. E. & Regenstein J. M. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J. Food Sci.*, 50, 1715-1718.

Moreno M. C. M. & Cuadrado V. F. (1993). Fernandez. Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and kinetics. *Process Biochem.*, 481-490.

Morinaga Y., Iwai K., Tomita H., Takaya Y., Naraoka T. & Matsu H. (2010). Chemical nature of a new antihypertensive peptide derived from jellyfish. *Food Sci. Technol. Res.*, 16, 333-340.

Mullally M. M., Meisel H., Fitzgerald R. J. (1996). Synthetic peptides corresponding to α-lactalbumin and β-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, 377, 259-260.

Mullally M. M., Meisel H. & Fitzgerald R. J. (1997a). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.*, 7, 299-303.

Mullally M. M., Meisel H., Fitzgerald R. J. (1997b). Identification of a novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β-lactoglobulin *FEBS Let.*, 402, 99-101.

Muyonga J. H., Cole C. G. B. & Duodu K. G. (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*., 18, 581-592.

Mycek M. J., Genner S. B. & Perper M. M. (1992). Pharmacology, Harvey, R. A. et Charnpe. P. C. (eds). J. B. Lippincott Company, Phidalelphie, pp. 459.

N

Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamasaki S. & Takano T. (1995a). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, 78, 777-783.

Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. & Takano T. (1995b). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, 78, 1253-1257.

Nakamura Y., Masuda O. & Takano T. (1996). Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 488-489

Nakashima Y., Arihara K., Sasaki A., Mio H., Ishikawa S. & Itoh M. (2002). Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *J. Food Sci.* 67, 434-437.

Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguan W. & Kishimura H. (2008). Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloids*., 22, 615-622.

Nalinanon S., Benjakul S. & Kishimura H. (2010a). Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chem.*, 121, 49-55.

Nalinanon S., Benjakul S. & Kishimura H. (2010b). Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Eur. Food Res. Technol*., 231, 259-269.

Natesh R., Schwager S. L. U., Sturrock E. D. & Acharya K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature.*, 421, 551-554.

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, 969-977.

Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Miloudi K., Daoud R., Krier F., Kouach M., Briand G. & Guillochon D. (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*., 27, 2082-2089.

Neuberger A. & Brocklehurst K. (1987). Hydrolytic Eqmes. Elsevier. New York

Nielsen H. H & Borresen T. (1997). The influence of intestinal proteinases on ripening of salted herring. In J. B. Luten, T. Borresen, & J. Oehlenschlager (Eds.), Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, pp. 293-303.

Nii Y., Fukuta K., Yoshimoto R., Sakai K. & Ogawa T. (2008). Determination of antihypertensive peptides from an izumi shrimp hydrolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 72, 861-864.

Noda M. & Murakami K. (1981). Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of two acid proteinases from the stomach. *Biochim. Biophys. Acta*., 65B, 27-34.

Norris E. R. & Elam D. W. (1940). Preparation and properties of crystalline salmon pepsin. *J. Biol. Chem*., 134, 443-454.

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. *Chem. Eng. J*., 65, 187-194.

Nurminen M. L., Sipola M., Kaarto H., Pihlanto-leppälä A., Piilola K., Korpela R., Tossavainen O., Korhonen H. & Vapaatalo H. (2000). α-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*., 66, 1535-1543.

O

Okamoto A., Matsumoto E., Iwashita A., Yasuhara T., Kawamura Y., Koizumi Y. & Yanagida F. (1995a). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory action of fish sauce. *Food Sci. Technol. Int.*, 1, 101-106.

Okitani A., Matsumoto T., Yohko Kitamura Y. & Kato H. (1981). Purification of cathepsin D from rabbit skeletal muscle and its action towards myofibrils. *Biochim. Biophys. Acta*., 662, 202-209.

Ondetti M. A., Rubin B. & Cushman D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science.*, 196, 441-444.

Onodenalore A. C. & Shahidi F. (1995). Protein dispersions and hydrolysates from Shark (*Isurus oxyrinchus*). *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 5, 43-59.

Oshima G., Shimabukuro H. & Nagasawa K. (1979). Peptide inhibitors of angiotensin I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 566, 128-137.

P

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 Chem.*, 109, 782-789.

Page C. L., Curtis M. J., Walker M. J., Sutter M. C. & Hoffman B. B. (1999). Physiopathologie et maladies cardiovasculaires. Pharmacologie intégrée. Bruxelles : De Boeck Université, pp. 153-196.

Pavlisko A., Rial A., Vecchi S. D. & Coppes Z. (1997a). Properties of pepsin and trypsin isolated from the digestive tract of *Parona signata* ''palometa''. *J. Food Biochem.*, 21, 289-308.

Pavlisko A., Rial A. & Coppes Z. (1997b). Characterization of trypsin purified from the pyloric caeca of the southwest Atlantic white croaker *Micropogonias furnieri* (Sciaenidae). *J. Food Biochem.*, 21, 383-400.

Periago M., Jesus V. M., Luisa R. G., Rincon F. & Martinez C. (1998). Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.*, 63, 71-78.

Perez-Losada M., Nolte M. J., Crandall K. A. & Shaw P. W. (2007). Testing hypotheses of population structuring in the Northeast Atlantic Ocean and Mediterranean Sea using the common cuttlefish *Sepia officinalis*. Mol. Ecol., 16, 2667-2679.

Petersen B. R. (1981). The impact of the hydrolysis process on recovery and use of proteins. *In*: Enzymes of Foods processing. (Eds) G.G. Birch, N. Blakebrough, and K.J. Parker. Elsevier Applied Science Publishers. London, pp. 149-175.

Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelsson G., Bergé J. P., Guérard F., Chabeaud A. & Piot J. M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochem.*, 41, 1217-1222.

Pihlanto-Leppälä A., Virtanen T. & Korhonen H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *Int. Dairy. J.*, 20, 3-10.

Pihlanto-Leppälä A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 347-356.

Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T. & Korhonen H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.*, 67, 53-64.

Pihlanto-Leppälä A., Rokka T. & Korhonen H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.*, 8, 325-331.

Pinczon du Sel G. & Daguzan J. (1992). Contribution à la connaissance du régime alimentaire de la seiche *Sepia officinalis* L.; (Mollusque Céphalopode) dans le nord du golfe de

Gascogne et dans le golfe de Morbihan: Résultats préliminaires. In : Ifremer, les Mollusques Marins, Biologie et Aquaculture. Actes de Colloque, vol. 14. Société Française de Malacologie, pp. 155-172.

Plascencia-Jatomea M., Olvera-Novoa M. A., Arredondo-Figueroa J. L., Hall G. M. & Shirai K. (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. S*ci. of Food and Agricult*., 82, 753-759.

Polgar L. (1989). Mechanisms of Protease Action. CRC Press Inc. Boca Raton, FL.

Powers J. P. S. & Hancock R. E. W. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*., 24, 1681-1691.

Power L. & Voigt M. N. (1990). Process for preparing lump fish roe caviar from non-cured roe. In M. N. Voigt, & J. R. Botta (Eds.), Advances in fisheries technology for increased profitability. Lancaster, PA: Technomic Publication, pp. 111-120.

Q

Quaglia G. B. & Orban E. (1987). Enzymic Solubilisation of proteins of Sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *J. Sci. Food Agric*., 38, 263-269.

Quaglia G. B. & Orban E. (1987b). Influence of degree of hydrolysis on the solubility of protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric*., 38, 271-276.

Qian Z. J., Je J. Y. & Kim S. K. (2007). Antihypertensive effect of angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, (*Thunnus obesus*). *J. Agric. Food Chem*., 55, 8398-8403.

R

Raa J. (1990). Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: a success story in Norway. In M. N. Voigt, & J. R. Botta (Eds.), Advances in fisheries technology for increased profitability. Lancaster, PA: Technomic Publication Company, pp. 509-524.

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

Rajapakse N., Mendis E., Byun H. G., Kim S. K. (2005b). Purification and *in vitro* antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J. Nutr. Biochem., 16*, 562-569.

Raghavan S. & Kristinsson H. G. (2009). ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem*., 117, 582-588.

Rahman M. S., Al-Saidi G. S. & Guizani M. (2008). Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chem*., 108, 472-481.

Ramakrishan M., Hultin H. O. & Atallah M. T. (1987). A comparison of dogfish and bovine chymotrypsins in relation to protein hydrolysis. *J. Food Sci*., 52, 1198-1202.

Rao R., Manohar B., Sambaiah K. & Lokesh B. R. (2002). Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 FA-enriched structured lipids from cocnut oil: Optimization of reaction by response surface methodology. *J. AOCS.*, 79, 885-890.

Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. & Deshpande V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*., 62, 597-635.

Ravallec-Plé R. (2000). Valorisation d'hydrolysats d'origine marine: optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, pp. 171.

Ravallec-Plé R., Charlot C., Pires C., Braga V., Batista I., Van Wormhoudt A., Le Gal Y. & Fouchereau-Péron M. (2001). The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric*., 81, 1120-1125.

Rawlings N. D., Morton F. R., Kok C. Y., Kong J. & Barret A. J. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nuc. Acids. Res*., 80, 1-5.

Rebeca B. D., Pena-Vera M. T. & Diaz-Casteneda M. (1991). Production of fish protein and hydrolysates with bacterial proteases: yield and nutritional value. *J. Food Sci*., 56, 309-314.

Refstie S., Olli J. J. & Standal H. (2004). Feed intake, growth and protein utilization by post-smolt Alantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*., 239, 331-349.

Richard G. (2001). Valorisation des co-produits issus de la transformation de la seiche. DESS Exploitation des Ressources Vivantes Côtières, Caen, pp. 33.

Rocha F., Guerra A. & Gonzalez, A. (2001) A review of reproductive strategies in cephalopods. *Biological Review*., 76, 291-304.

Rousseau M., Batista I., Le Gal Y. & Fouchereau-Péron M. (2001). Purification of a functional competitive antagonist for calcitonin gene related peptide action from sardine hydrolysate. *EJB*., 4, 25-32.

Roy P., Colas B. & Durand P. (1996). Purification, kinetical and molecular characterizations of a serine collagenolytic protease from greenshore crab (*Carcinus maenas*) digestive gland. *Comp. Biochem. Physiol*., 115B, 87-95.

Rojo L., Sotelo-Mundo R., García-Carreño F. & Gráf L. (2010). Isolation, biochemical characterization, and molecular modeling of American lobster digestive cathepsin D1. *Comp. Biochem. Physiol*., 157B, 394-400.

Rustad T. (2003). Utilisation of marine by-products. Elec. J. Env. Agric. Food Chem., 2, 458-463.

Ryhänen E. L., Pihlanto A. & Pahkala E. (2001). A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.*, 11, 441-447.

S

Sadowska M., Kolodziejska I. & Niecikowska C. (2003). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.*, 81, 257-262.

Saiga A., Kanda K., Wei Z., Okumura T., Kaneko T. & Nishimura T. (2002). Hypotensive activity of muscle protein and gluten hydrolysates obtained by protease treatment. *J. Food Biochem.*, 26, 391-401.

Saiga A., Okumura T., Makihara T., Katsuta S., Shimizu T., Yamada R. & Nishimura T. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1741-1745.

Saiga A., Okumura T., Makihara T., Katsuda S. I., Morimatsu F. & Nishimura T. (2006). Action mechanism of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from chicken breast muscle. *J. Agric. Food Chem*., 54, 942-945.

Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y. & Itoh T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83, 1434-1440.

Saito M., Kawai M., Hagino H., Okada J., Yamamoto K., Hayashida M. & Ikeda T. (2002). Antihypertensive effect of Nori-peptides derived from red alga *Porphira Yesoensis* in hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.*, 15, 210.

Saito Y., Wanezaki K., Kawato A. & Imayasu S. (1994a). Antihypertensive effects of peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 812-816.

Saito Y., Wanezaki K. & Kawato A. (1994b). Imayasu S. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1767-1771.

Sajid M. & McKerrow J. H. (2002). Cysteine protease of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasit*., 120, 1-21.

Sakharov I. Y., Glyanzev S. P., Litvin F. E. & Savvina T. V. (1993). Potent debriding ability of collagenolytic protease isolated from the hepatopancreas of the king crab *Paralithodes camtschatica*. *Arch. Derm. Res*., 285, 32-35.

Sakharov I. Y., Litvin F. E. & Artyukov A. A. (1994). Purification and characterization of two serine collagenolytic proteases from crab Paralithodes camtschatica. *Comp.Biochem.Physiol.*, 108B, 561-568.

Sanchez-Chiang L., Cisternas E. & Ponce O. (1987). Partial purification of pepsins of adult and juvenile salmon fish (*Oncorhynchus keta*). Effect of NaCl on proteolytic activities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B, 793-797.

Sanchez-Chiang L. & Ponce O. (1981). Gastric zymogens and gastrisins from *Merluccaius gayi*-purification and properties. *Comp.Biochem.Physiol.*, 68B, 251-257.

Sathivel S., Bechtel P. J., Babbitt J., Smiley S., Crapo C., Reppond K. D. & Prinyawiwatkul W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Food Sci.*, 68, 2196-2200.

Sato M., Oba T., Yamagushi T., Nakano T., Kahara T., Funayama K., Kobayashi A. & Nakano T. (2002a). Antihypertensive effects of hydrolysates of wakame (*Undaria pinnatifida*) and their angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Ann. Nutr. Metab.*, 46, 259-267.

Sato M., Hosokawa T., Yamaguchi T., Nakano T., Muramoto K., Kahara T., Funayama K., Kobayashi A. & Nakano T. (2002b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6245-6252.

Schlimme E. & Meisel H. (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins: Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung*., 39, 1.

Schrieber R. & Gareis H. (2007). Gelatine handbook. Weinhem: Wiley-VCH GmbH & Co.

Seki E., Kawasaki T., Yoshida M., Osajima K., Tamaya K., Matsui T. & Osajima Y. (1999). Antihypertensive effect of sardine peptide and Val-Tyr in spontaneously hypertensive rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 52, 271-277.

Sekizaki H., Itoh K., Murakami M., Toyota E. & Tanizawa K. (2000). Anionic trypsin from chum salmon: activity with p-aminophenyl ester and comparaison with bovine and *Streptomyces griseus* trypsins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 127B, 337-346.

Sepulvida P., Marciniszun J., Iane Liu J. R. & Tang D. J. (1975). Primary structure of porcine pepsin III-Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment, CB2A and the complete structure of porcine pepsine. *J. Biol. Chem.*, 250, 5082-5088.

Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T. & Korpela R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 326-330.

Seppo L., Kerojoki O., Suomalainen T. & Korpela R. (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension- a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, 53, 124-127.

Semenova S. A., Rudenskaya G. N., Lyutova L. V. & Nikitina O. A. (2008). Isolation and properties of collagenolytic serine proteinase isoenzyme from king crab *Paralithodes camtschatica*. *Biochemistry*., 73, 1125-1133.

Sesoko S. & Kaneko Y. (1985). Cough associated with the use of captopril. *Arch. Intern. Med.*, 145, 1524.

Shahidi F. & Kamil Y. V. A. J. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol*., 12, 435-464.

Shahidi F., Han X. Q. & Synowiecki J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food. Chem.*, 53, 285-293.

Shahidi F. (1994). Proteins from seafood processing discards. In Z. E. Sikorski, B. S. Pan, & F. Shahidi (Eds.), Seafoods proteins. NewYork, NY: Chapman and Hall, pp. 171-193.

Shahidi F. (2006). Maximising the value of marine by-products. Memorial University of New foundland, Canada, pp. 560.

Shahidi F. & Wanasundara U. N. (1998). Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Sci. Technol.*, 9, 230-240.

Shamsuzzaman K. & Haard N. F. (1984). Purification and characterization of a chymosin like protease from gastric mucosa of harp seal (*Paophilus groenlandicus*). *Can. J. Biochem. Cell. Biol*., 62, 699-708.

Shapiro A. P. (1987). Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme in the Management of Hypertension. *Clinical Studies in Medical Biochemistry/* ed. by R.H. GLEW, S.P. PETERS. New York : Oxford University Press, pp. 241-252.

Sheih I. C., Fang T. J. & Wub T. K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem*., 115, 279-284.

Shin Z. I., Yu R., Park S. A., Chung D. K., Ahn C. W., Nam H. S., Kim K. S., Lee H. J. (2001). His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3004-3009.

Shiozaki K., Shiozaki M., Masuda J., Yamauchi A., Ohwada S., Nakano T., Yamaguchi T., Saito T., Muramoto K. & Sato M. (2010). Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Fish Sci*., 76, 865-872.

Shotton D. M. (1970). In S. P. Colowik, & N. O. Kaplan (Eds.), Methods in enzymology. Academic Press, NewYork, pp. 113-140.

Simpson B. K. (2000). Digestive proteases from marine animals. In N. F. Haard, & B. K. Simpson (Eds.), Seafood enzymes. New York, NY: Marcel Dekker, Inc, pp. 191-213.

Simpson B. K. & Haard N. F. (1987a). Cold-adapted enzymes from fish. In D. Knorr (Ed.), Food Biotechnology. New York, NY: Marcel Dekker, pp. 495-527.

Simpson B. K. & Haard N. F. (1987b). Trypsin and trypsin-like enzyme from the stomachless cunner. Catalytic and other physical characteristics. *J. Agric. Food Chem*., 35, 652-656.

Simpson B. K., Smith J. P. & Yaylayan V. (1989). Kinetic and thermodynamic characteristics of a digestive protease from Atlantic cod; *Gadus morhua*. *J. Food Biochem*., 13, 201-213.

Simpson B. K. & Haard N. F. (1984). Trypsin from Greenland cod as a food-processing aid. *J. Appl. Biochem.*, 6, 135-143.

Simpson B. K. & Haard N. F. (1985). Characterization of trypsin fraction from cunner (*Tautogolabrus adspersus*). *Comp. Biochem. Physiol*., 80B, 475-480.

Simpson B. K., Smith J. P. & Haard N. F. (1991). Marine enzymes. In Y. H. Hui (Ed.), Encyclopedia of Food Science and Technology. NewYork, NY: John Wiley and Sons, pp. 1645-1653.

Sikorski Z. E., Gildberg A. & Ruiter A. (1995). Fish products. In A. Ruiter (Ed.), Fish and fishery products; composition, nutritive properties and stability. Oxon, UK:Cab International, pp.315-346.

Sipola M., Finckenberg P., Santisteban J., Korpela R., Vapaatalo H. & Nurminen M. L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, 52, 745-754.

Sipola M., Finckenberg P., Vapaatalo H., Pihlanto-Leppälä A., Korhonen H. & Korpela R., Nurminen M. L. (2002). α-lactorphin and β-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*., 71, 1245-1253.

Šližyte R., Mozuraitytė R., Martínez-Alvarez O., Falch E., Fouchereau-Peron M. & Rustad T. (2009). Functional, bioactive, antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus mohua*) backbones. *Process Biochem*., 44, 668-677.

Souchet N. & Laplante S. (2011). Recovery and Characterization of a Serine Collagenolytic Extract from Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) By-products. *Appl. Biochem. Biotechnol*., 163, 765-779.

Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y. & Nasri M. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Tech. Biotech.*, 45, 187-194.

Souza A. A. G., Amaral I. P. G., Espirito Santo A. R., Carvalho Jr L. B. & Bezerra R. S. (2007). Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculates*). *Food Chem*., 100, 1429-1434.

Smacchi E. & Gobbetti M. (2000). Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiol.*, 17, 129-141.

Spinelli J. & Dassou J. A. (1982). Fish Proteins: their modification and potential uses in the food industry. *Chem Biochem Mar. Food Prod*., 1, 13-25.

Stefansson G. & Steingrimsdottir U. (1990). Application of enzymes for fish processing in Iceland-present and future aspects. In M. N. Voigt, & J. R. Botta (Eds.), Advances in fisheries technology for increased profitability. Lancaster, PA Technomic Publication, pp. 237-250.

Strom T. & Raa J. (1991). From basic reasearch to newindustries within marine biotechnology: successes and faliures in Norway. In H. K. Kuang, K. Miwa, & M. B. Salim (Eds.), Proceedings of seminar on advances in fishery post-harvest technology in southeast Asia. Singapore: Changi Point, pp. 63-71.

Stryer L. (1988). Biosynthesis of amino acids and heme. In: Biochemistry, 3 ed., W.H. Freeman & Co., New York, NY, pp.575-626.

Suetsuna K. (1998a). Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis*. *J. Mar. Biotechnol.*, 6, 163-167.

Suetsuna K. (1998b). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *J. Nutr. Biochem.*, 9, 415-419.

Suetsuna K. & Chen J. R. (2001). Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Mar. Biotechnol.*, 3, 305-309.

Suetsuna K. (1991a). Effects of an oral administration of tripeptides derived from sardine muscle, soybean and pig plasma on blood pressures in hypertensive rats, and angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Clin. Repor.t*, 25, 2245-2261.

Suetsuna K. (1991b). Biological properties of angiotensin I-converting enzyme inhibitors, an octapeptide derived from sardine muscle. *Clin. Report.*, 25, 3422-3428.

Suetsuna K. & Osajima K. (1989). Blood pressure reduction and vasodilatory effects *in vivo* of peptides originating from sardine muscle. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 42, 47-54.

Suetsuna K. & Nakano T. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *J. Nutr. Biochem.*, 11, 450-454.

Suetsuna K., Maekawa K. & Chen J. R. (2004). Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.*, 15, 267-272.

Suh H. J., Whang J. H. & Lee H. (1999). A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I converting enzyme. *Biotechnol. Let.*, 21, 1055-1058.

T

Takayanagi T. & Yokotsuka K. (1999). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 65-68.

Tang H. G., Wu T. X., Zhao Z. Y. & Pan X. D. (2008). Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea R.*). *Zhejiang Univ Sci B.*, 9, 684-690.

Tanji M., Yakabe E., Kageyama T., Yokobori S. I., Ichinose M., Miki K. I. H. & Takahashi K. (2007). African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146B, 412-420.

Tanji M., Kageyama T. & Takahashi K. (1988). Tuna pepsinogens and pepsins. Purification and characterization and amino terminal sequences. *Euro. J. Biochem.*, 177, 251-259.

Tauzin J., Miclo L. & Gaillard J. L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{S2}-casein. *FEBS Lett*., 531, 369-374.

Tavares J. F. P., Baptista J. A. B. & Marcone M. F. (1997). Milk coagulating enzymes of tuna fish waste as a rennet substitute. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, 48, 169-176.

Thiansilakul Y., Benjakul S., Shahidi F. (2007). Composition, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem*., 103, 1385-1394.

Titani K., Sasagawa T., Woodburg R. G., Ericsson L. H., Dörsam H., Kraemer M., Neurath H. & Zwilling R. (1983). Amino acid sequence of crayfish (*Astacus fluviatilis*) trypsin If. *Biochemistry*., 22, 1459-1465.

Tomé D. (1998). Peptides fonctionnels. *Danone World Newsletter*, n° 17.

Tsai I. H., Chuang K. L. & Chuang J. L. (1986). Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). *Comp. Biochem. Physiol*., 85B, 235-239.

Tsai I. H., Lu P. & Chuang J. L. (1991). The midgut enzymes of shrimp *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*. *Biochem. Biophys*., 1080, 59-67.

Tsu C. A., Perona J. J., Fletterick R. J. & Craik C. S. (1997). Structural basis for the broad substrate specificity of fiddler crab collagenolytic serine protease. *Biochemistry*., 36, 5393-5401.

Twining S. S., Alexander P. A. & Glick D. M. (1983). A pepsinogen from rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol*., 75B, 109-112.

U
V

Valdimarsson G. & James D. (2001). World fisheries-utilisation of catches. *Ocean Coas. Manag*., 44, 619-633.

Van Dyke, R. W. (1989). Mechanisms of digestion and absorption of food. In: Gastrointestinal disease, pathphsiology, diagnosis, management. Sleinsenger, M. & Fordtran, J. (Eds.); 4th edition; Saunders: Philadelphia, pp. 1062-1088.

Venugopal V. & Shahidi F. (1994). Thermostable water dispersions of myofibrillar proteins from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *J. Food Sci*., 59, 265-276.

Vieira G. H. F., Martin A. M. & Saker S. S. (1995). Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian Lobster (*Panulirus* spp) Processing wastes. *J. Sci. Food Agric*., 69, 61-65.

Voutsinas L. P., Cheung E. & Nakai S. (1983). Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci*., 48, 26-32.

W

Wako Y., Ishikawa S. & Muramoto K. (1996). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, 60, 1353-1355.

Wako Y., Abe Y. & Handa T. (1999). Ishikawa S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in fish water soluble protein hydrolyzates prepared by bioreactor. *Food Sci. Technol. Res.*, 5, 378-380.

Walsh K. A. & Wilcox P. E. (1970). Serine proteases. In G. E. Perlmann, & L. Lorand (Eds.), Methods in enzymology. NewYork, NY: Academic Press, pp. 31-41

Wang C., Tian J. & Wang Q. (2011). ACE inhibitory and antihypertensive properties of apricot almond meal hydrolysate. *Eur. Food Res. Technol*., 232, 549-556

Wang J., Hu J., Cui J., Xuefang B., Dua Y., Miyaguchi Y. & Lin B. (2008). Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*., 111, 302-308.

Wang Q., Gao Z. X., Zhang N., Shi Y., Xie X. L. & Chen Q. X. (2010). Purification and Characterization of Trypsin from the Intestine of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus x O. aureus*). *J. Agric. Food Chem*., 58, 655-659.

Wang Z., Taylor K. D. & Yan X. (1992). Studies on the protease activities in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) and their role in the phenolase activation process. *Food Chem*., 42, 111-116.

Ward O. P., Rao M. B. & Kulkarni, A. (2009). Protease, production. Encyclopedia of Microbiology, pp. 495-515.

Wasswa J., Tang J. & Gu X. (2007). Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. *Food Rev. Int*., 23, 159-174.

Weil J. H. (1979). Biochimie générale. Masson, Paris.

Weng W. Y., Wu T., Chen W. Q., Liu G. M., Osatomi K., Su W. J. & Cao M. J. (2011). Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from the stomach of rice field eel (*Monopterus albus* Zuiew). *Fish Physiol. Biochem*. In press.

Wilding P., Lilliford P. J. & Regenstain J. M. (1984). Functional properties of proteins in food. *J. Chem. Technol. Biotechnol*., 34, 182-189.

Wilesmith J. W., Ryan J. B. M. & Atkinson M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Veterinary Record*., 128, 199-203.

Winstanley M. (1979). The aging of rneat. *J. Nutr. Food Sci*., 5, 5-10.

Wong D. W. S. (1995). Food enzymes; structure and mechanism. NewYork: Champman and Hall.

Wu T., Sun L. C., Du C. H., Cai Q. F., Zhang Q. B., Su W. J. & Cao M. J. (2009). Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chem.*, 115, 137-142.

Wu H. C., Chen H. M. & Shiau C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxydant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.*, 36, 949-957.

Wu J. & Ding X. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 501-506.

Wu Z. & Jiang G. (2008). Purification and Characterization of Trypsin-like Enzymes from Neomysis japonica Using BApNA as Substrate. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 14, 75-80.

Wu Z., Jiang G., Xiang P. & Xu H. (2008a). Anionic Trypsin from North Pacific Krill (*Euphausia pacifica*): Purification and Characterization. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 14,113-120.

Wu Z., Jiang G., Xiang P., Yang D. & Wang N. (2008b). Purification and characterization of trypsin-like enzymes from North Pacific krill (*Euphausia pacifica*). *Biotechnol Lett.*, 30, 67-72.

X

Xu X., Balchen S., jonsson G. & Adler-Nissen J. (2000). Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a flat membrane reactor. *JAOCS.*, 77, 1035-1041.

Xu X. (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 287-303.

Xu R. A., Wong R. J., Rogers M. L. & Fletcher G. C. (1996). Purification and characterization of acidic proteases from the stomach of the deepwater finfish orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*). *J. Food Biochem.*, 20, 31-48.

Y

Yaba Adjé E., Balti R., Kouach M., Guillochon D. & Nedjar-Arroume N. (2011a). α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Eur. Food Res. Technol.*, 232, 637-646.

Yaba Adjé E., Balti R., Kouach M., Dhulster P., Guillochon D. & Nedjar-Arroume N. (2011b). Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *Int. J. Biol. Macr.*, in press.

Yamamoto N., Akino A. & Takano T. (1994a). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, 77, 917-922.

Yamamoto N., Maeno M. & Takano T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.*, 82, 1388-1393.

Yang S., Yunden J., Sonoda S., Doyama N., Lipkowski A. W., Kawamura Y. & Yoshikawa M. (2001). Rubiscolin, a δ selective opioid peptide derived from plant Rubisco. *FEBS lett.*, 509, 213-217.

Yang F., Su W. J., Lu B. J., Wu T., Sun L. C., Hara K. & Cao M. J. (2009). Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chem.*, 116, 860-866.

Yang Y., Marczak E. D., Yokoo M., Usui H. & Yoshikawa M. (2003). Isolation and antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach rubisco. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4897-4902.

Yang Y., Tao G., Liu P. & Liu J. (2007). Peptide with anigiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7891-7895.

Yano S., Suzuki K. & Funatsu G. (1996). Isolation from α-zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 661-663.

Yokoyama K., Chiba H. & Yoshikawa M. (1992). Peptide inhibitors for angiotensin I converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1541-1545.

Yoshii H., Tachi N., Ohba R., Sakamura O., Takeyama H. & Itani T. (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128 C, 27-33.

Yust M. M., Pedroche J., Giron-Calle J., Alaiz M., Millan F. & Vioque J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.*, 81, 363-365.

Z

Zefirova O. N., Mamaeva A. V., Chupov V. V., Valuev L. I. & Plate N. A. (1996). Synthesis and properties of immobilized collagenolytic *Paralithoides camtschatica*. *App. Biochem. Microbiol.*, 32, 461-464.

Zhao Y., Li B., Liu Z., Dong S., Zhao X. & Zeng M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochem.*, 42, 1586-1591.

Zhou Q., Liu G. M., Huang Y. Y., Weng L., Hara K., Su W. J. & Cao M. J. (2008). Pepsinogens and pepsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5401-5406.

Zhou Q., Fu X., Zhang L., Su W. & Cao M. (2007). Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus Houttuyn*) pepsinogens and pepsins. *Food Chem*., 103, 795-801.

Zhao Y., Li B., Dong S., Liu Z., Zhao X., Wang J. & Zeng M. (2009). A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. *Peptide*s., 30, 1028-1033.

Zotos A. & Taylor K. D. A. (1996). Partial purification and characterization of proteases from Norway lobster (*Nephrops norvegicus)* and their role in the phenolase activation process. *Food Chem.*, 56, 61-68.

UNIVERSITE DE SFAX
Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax

UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES
Ecole Polytech'Lille

Valorisation des produits et co-produits de la seiche commune (*Sepia officinalis*) pour l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et nutraceutique

Résumé : Le travail de la thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation enzymatique des produits et des co-produits de la pêche et ce dans l'optique de produire des fonctions et des produits de haute valeur ajoutée. Dans un premier temps, on s'est intéressé à la purification et la caractérisation biochimiques des protéases digestives (trypsine, chymotrypsine et cathepsine D) à partir de l'hépatopancréas de la seiche commune (*S. officinalis*). Ensuite, nous avons utilisé ces protéases digestives ainsi que d'autres protéases d'origine microbienne dans l'élaboration des hydrolysats protéiques enrichis en peptides bioactifs. 14 nouveaux peptides antihypertensifs ont été identifiés. Dans un autre volet, on s'est intéressé à l'étude de l'influence de degré d'hydrolyse et le type d'enzyme sur les propriétés fonctionnelles et biologiques dans les hydrolysats protéiques préparés à partir des co-produits (peau et viscères) et le muscle de la seiche commune. Enfin, un procédé enzymatique destiné à l'extraction de la gélatine à partir de la peau de la seiche commune a été développé. L'étude comparative de certaines propriétés fonctionnelles et texturales de la gélatine extraite avec celle d'origine bovine commerciale a été aussi réalisée.

Mots clés : seiche commune, protéases digestives, peptides antihypertensifs, activités biologiques, propriétés fonctionnelles, gélatine.

Value added products from cuttlefish (Sepia officinalis) for food and nutraceutical applications

Abstract : The aim of this project was to improve the biotechnological exploitation of marine ressources to obtain value added products for food and nutraceutical applications. First, several digestives proteases (trypsin, chymotrypsin and cathepsin D) from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*) were purified and characterized. In the second part, these digestive proteases and other microbial proteases were used to generate protein hydrolysates enriched in bioactive peptides. 14 novel ACE inhibitory peptides were isolated and identified. The influence of the degree of hydrolysis and enzyme type on functional and bioactive properties of protein hydrolysates from cuttlefish by-products (skin and viscera) and muscle of the same species was studied. Finally, gelatin from the skin of cuttlefish was extracted using protease-aided process. The characteristics, functional and textural properties of this protein were investigated and compared to those of commercial bovine gelatin.

Key words: cuttlefish, digestive proteases, antihypertensive peptides, biological activities, functional properties, gelatin.