

超声辅助酶解鳀加工副产物制备蛋白胨

赵培城¹, 唐连祥¹, 袁剑², 陈义方²,
王求娟², 丁玉庭^{1,3}, 刘书来^{1,3*}

(1. 浙江工业大学海洋学院, 浙江 杭州 310032;

2. 宁波今日食品有限公司, 浙江 宁波 315502;

3. 浙江工业大学海洋研究院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 为了提高水产加工副产物的利用率和附加值, 以鳀加工副产物为原料, 采用胰蛋白酶结合超声处理制备蛋白胨, 并分析了鳀加工副产物超声辅助酶解过程中蛋白酶活性、水解度、氮回收率、TCA-可溶性氮回收率、酶解产物分子量分布等指标的变化, 探究了超声辅助酶解的作用时间、温度以及超声功率等因素对鳀加工副产物酶解产物的影响, 通过单因素实验优化确定了蛋白胨制备的最佳酶解工艺条件。结果显示, 超声处理造成胰蛋白酶酶活发生显著变化, 在功率为120 W的超声场下, 胰蛋白酶酶活在30 min内呈上升趋势, 但在超声场处理30 min后, 胰蛋白酶的酶活呈明显下降趋势, 至4 h后酶活变化趋势趋于平缓。超声功率和酶解温度都会影响胰蛋白酶对鳀加工副产物的酶解效率, 在超声功率240 W和酶解温度50 °C条件下, 氮回收率比无超声处理组提高了18.66%, 水解度提高了30.43%, TCA-可溶性氮回收率提高了33.20%, 且超声处理有效提高了酶解液中小分子肽的含量。超声辅助酶解鳀加工副产物的最佳工艺条件为温度55 °C, 超声功率240 W, 酶解时间4 h, 此时氮回收率为81.40%, TCA-可溶性氮回收率为40.75%。

关键词: 鳀; 加工副产物; 超声辅助酶解; 蛋白胨; 制备

中图分类号: S 985.1; TS 254.9

文献标志码: A

鳀(*Katsuwonus pelamis*)是金枪鱼捕捞的主要品种, 其加工以罐装食品为主, 在加工过程中会产生包括内脏、鱼头、鱼骨和鱼皮等副产物, 约占总重量的50%~70%^[1]。副产物中富含蛋白质、脂肪等营养物质, 如果处理不当, 不仅会造成严重的环境污染, 也是一种资源的严重浪费^[2]。目前较普遍的处理方法是把这些加工副产物作为饲料、肥料来利用, 但附加值较低。通过酶解等技术充分利用其中的蛋白质生产蛋白胨等高附加值的产品是提高加工副产物资源利用率和产品附加值的有效途径。

近年来超声技术在食品工业中的应用越来越广泛。Dai等^[3]使用超声水浴的方法有效地提高了脱脂大麦虫(*Tenebrio molitor*)粉的酶解速率。

Li等^[4]将超声运用在大米蛋白的水解过程中, 大大提高了其水解效率。Stefanović等^[5]利用超声处理蛋清蛋白, 不仅提高了其水解度, 还使其水解物的抗氧化活性得到了提高。徐洋等^[6]将超声运用于酶解回收南极磷虾(*Euphausia superba*)虾壳中蛋白质的过程中, 加快了酶解速率, 有效缩短了酶解时间, 但超声技术在鱼类废弃资源利用方面的相关研究还鲜有提及。本研究拟采用超声与酶解技术共同作用来提高鳀加工副产物制备蛋白胨的利用率, 并考察酶解过程中不同工艺参数对酶活性、水解度、氮回收率、TCA-可溶性氮回收率等的影响, 探究超声辅助酶解技术在鳀加工副产物高值化利用中的可行性。

收稿日期: 2016-12-12 修回日期: 2017-02-27

资助项目: 浙江省重点研发计划项目(2015C02033)

通信作者: 刘书来, E-mail: slliu@zjut.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

鳔加工副产物(鱼头、鱼骨、鱼尾和内脏等)由宁波今日食品有限公司馈赠。胰蛋白酶(1:250)由北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司提供;氢氧化钠、碳酸钠、硫酸、硫酸铜、硫酸钾、盐酸、三氯乙酸、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、Folin-酚试剂等均为分析纯,购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 实验仪器

UV-7540型紫外可见光分光光度计,上海欣茂仪器有限公司;PHS-3C型数显酸度计,上海精科仪器有限公司;CR21G II高速冷冻离心机,日本日立公司;KQ-300DE型数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司;JJ-1精密增力搅拌器,新瑞仪器公司;HH系列数显恒温水浴锅,上海红星仪器有限公司;K9840型自动凯氏定氮仪,海能仪器公司;SOX406全自动脂肪测定仪,海能仪器公司;E2695高效液相色谱仪,美国Waters公司。

1.3 实验方法

鳔加工副产物基本成分的测定 粗蛋白的测定采用半微量凯氏定氮法^[7];粗脂肪的测定采用索氏提取法^[8];水分含量的测定采用直接干燥法^[9];灰分的测定采用马弗炉法^[10]。

酶解温度对超声酶解的影响 取鳔加工副产物10 g,切碎匀浆后沸水浴15 min使内源酶失活。然后加入40 mL蒸馏水和1%胰蛋白酶(鳔加工副产物/胰蛋白酶, W/W),置于超声设备中,超声功率初步设定为240 W。分别在温度为37、45、50、55和60 °C下酶解反应4 h。适时抽出超声设备中的水,并加入温水以维持超声酶解过程中温度的稳定。酶解结束后,沸水浴灭酶,冷却、离心、过滤,取上清液测定其相关指标。此外,在上述条件下,去除超声条件进行酶解,作为对照。

功率对超声酶解的影响 取鳔加工副产物10 g,切碎匀浆后沸水浴15 min使内源酶失活。然后加入40 mL蒸馏水和1%胰蛋白酶(鳔加工副产物/胰蛋白酶, W/W),反应温度50 °C,分别在超声功率为0、120、180、240和300 W的超声条件

下进行酶解。酶解结束后,沸水浴灭酶,冷却、离心、过滤,取上清液测定其相关指标。

水解度测定 水解度(degree of hydrolysis, DH)的测定采用甲醛滴定法^[11]。计算公式:

$$DH(\%) = \frac{\text{氨基态氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100$$

氮回收率的测定 取10 mL酶解液,用凯氏定氮法消化、定氮,测得酶解液中的氮含量,氮回收率(nitrogen recovery, NR)计算公式:

$$\text{氮回收率}(\%) = \frac{\text{水解液中氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100$$

TCA-可溶性氮回收率测定 取10 mL酶解液,加入等体积的质量分数为10%的TCA溶液,4 °C下静置30 min后离心取上清液。上清液采用凯氏定氮法消化、定氮,测得氮含量。计算公式:

$$TCA\text{-可溶性氮回收率}(\%) = \frac{\text{水解液中TCA-可溶性氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100$$

蛋白酶活测定 参考Folin-酚法^[12],吸取用缓冲液配制的2%酪蛋白溶液1 mL于试管中,在45 °C中水浴预热5 min后加入预热的已稀释酶解液1 mL,开始计时。反应10 min后,从水浴中取出,立即加入10%三氯乙酸溶液2 mL,摇匀,终止反应,继续置于水浴中保温20 min后过滤,取滤液1 mL,加入0.4 mol/L Na_2CO_3 溶液5 mL,吸取Folin-酚试剂1 mL,摇匀,同时另取一空白管,于45 °C恒温水浴显色20 min,在680 nm波长处比色,测光密度(OD_{680}),作为对照组。蛋白酶活性计算公式:

$$\text{蛋白酶活性}(U) = \frac{A \times 4 \times N}{10 \times V}$$

式中, A 代表由样品测得 OD 值,查标准曲线得相当的酪氨酸微克数; 4 代表4 mL反应液取出1 mL测定(即4倍); N 代表蛋白酶溶液的稀释倍数; 10 代表反应10 min; V 代表试样体积(mL)。

酶活残留率的测定 按上述蛋白酶活测定方法测定酶解反应前后的蛋白酶活,酶活残留率的计算公式:

$$\text{残留率}(\%) = \frac{\text{初始酶活} - \text{酶解反应后酶活}}{\text{初始酶活}} \times 100$$

分子量测定 鳔加工副产物酶解液分子量分布采用高效液相色谱法测定^[13-14]。先通过不同分子量蛋白质的标准品测得其标准曲线,然后

对样品谱图用峰面积归一化法计算不同分子量蛋白的分布情况, 按以下公式计算:

$$X(\%) = \frac{A}{A_{\text{总}}} \times 100$$

式中, X 代表试样中某相对分子质量范围的蛋白占有所有蛋白的质量分数(%); A 代表某相对分子质量范围内蛋白的峰面积; $A_{\text{总}}$ 代表各相对分子质量范围内蛋白的峰面积之和。

1.4 统计分析

本实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 的形式表示, 实验

数据采用SPSS进行方差分析, 采用最小显著性差异法(LSD)进行多重比较, 显著水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 鳔加工副产物基本成分的分析

鳔加工副产物中粗蛋白占22.56%, 远高于罗非鱼(*Oreochromis sp.*)碎肉^[15]、鳊(*Hypophthalmichthys nobilis*)鱼头、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)鱼头^[16]等。此外鳔加工副产物的灰分和脂肪含量均较低(表1)。

表1 鳔与其他水产品加工副产物的原料基本组成
Tab. 1 Nutrient content composition of *K. pelamis* by-products and other raw materials %

成分 ingredient	鳔加工副产物 <i>K. pelamis</i> by-products	罗非鱼碎肉 <i>Oreochromis sp. surimi</i>	鳊鱼头 head of <i>A. nobilis</i>	草鱼头 head of <i>C. idella</i>
粗蛋白 crude protein	22.56±0.47	18.92±0.32	12.91±2.15	13.81±1.14
水分 moisture	68.36±0.76	76.75±1.34	78.19±2.96	67.07±1.18
粗脂肪 crude fat	3.01±0.13	2.16±0.53	1.84±0.92	10.79±0.65
灰分 ash	2.89±0.06	1.29±0.63	6.45±0.85	7.30±0.94

2.2 温度对超声辅助酶解过程的影响

胰蛋白酶酶活在超声的作用下呈现先上升后下降的趋势(图1)。处理时间小于30 min时, 超声作用能一定程度地提高胰蛋白酶的酶活, 但当处理时间超过30 min后, 胰蛋白酶的酶活逐渐下降; 当处理时间达到1 h, 胰蛋白酶的酶活降至初始值左右, 并且随着处理时间的延长, 胰蛋白酶酶活仍呈下降趋势。在超声处理4 h后,

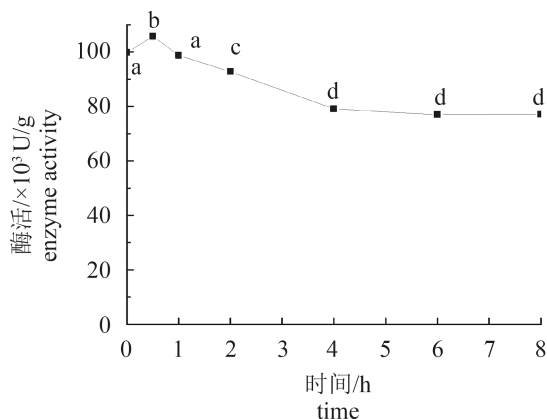


图1 超声处理下胰蛋白酶活性变化(120 W, 37 °C)

不同字母表示实验值存在显著性差异($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Changes of trypsin activity treated by ultrasound

Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$), the same below

其酶活降低了20%。

为了确定超声辅助酶解鳔加工副产物的处理时间, 将鳔加工副产物置于37 °C、超声功率120 W的条件下酶解, 考察氮回收率的变化情况。随着时间的延长, 氮回收率呈先上升后趋于平稳的趋势, 且在酶解开始的1 h内氮回收率上升趋势显著, 随酶解反应的进行逐渐趋于平缓(图2)。这与胰蛋白酶在超声作用下的酶活变化趋势一致(图1)。酶解4 h后的氮回收率无显著变化($P > 0.05$), 因此后续实验中的酶解时间定为4 h。

随着酶解温度的升高, 鳔加工副产物在胰蛋白酶水解过程中超声处理组与对照组的氮回收率均呈先上升后下降的趋势(图3)。对照组在55 °C时氮回收率达到最大值, 为69.01%, 与37 °C时相比提高了11.29%。而实验组在超声条件下, 氮回收率在50 °C时达到最大值, 为78.29%, 与同样条件下的对照组相比, 氮回收率提高了18.66%。对于水解度而言, 随着温度的升高, 也呈先上升后下降的趋势。与对照组相比, 随着温度的升高, 超声处理组的水解度变化趋势较大, 但对对照组和超声处理组的水解度均在55 °C时达到最大值, 分别为8.40%和6.44%, 超声作用有效地提高了鳔加工副产物的水解度(图4)。

三氯乙酸可以沉淀十肽以上的蛋白质, 因

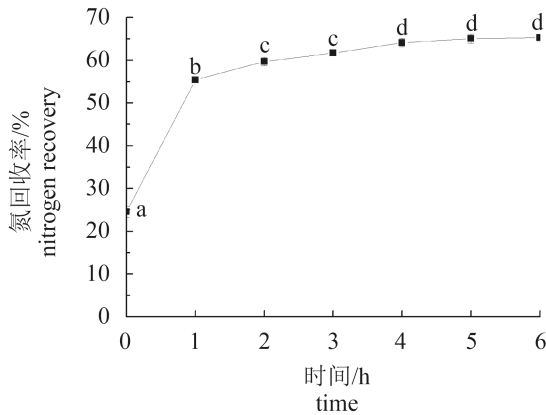


图2 鳃加工副产物超声辅助酶解过程中氮回收率变化(120 W, 37 °C)

Fig. 2 Changes of nitrogen recovery of *K. pelamis* by-products with trypsin and ultrasonic treatment

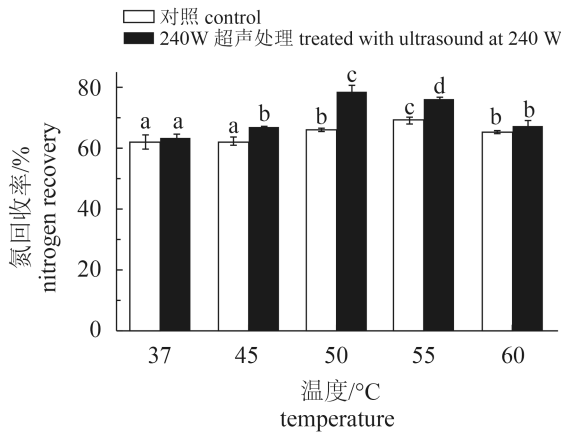


图3 不同温度下鳃加工副产物酶解4 h后氮回收率的变化

相同处理组中具有不同字母表示存在显著性差异($P<0.05$), 下同

Fig. 3 Changes in nitrogen recovery of *K. pelamis* by-products with trypsin after incubation for 4 h at different temperature

The columns at the same treated having the different letters are significantly different ($P<0.05$), the same below

此TCA-可溶性蛋白测定的是酶解液中十肽以下的小肽的含量。随着酶解温度的升高, 对照组TCA-可溶性蛋白回收率变化不大, 而超声处理组的TCA-可溶性蛋白回收率呈明显的先上升后下降的趋势, 在55 °C时, 其回收率达到最大值, 为46.30%, 较对照组提高了33.20%(图5)。TCA-可溶性氮回收率的变化也刚好印证了氮回收率与水解度的变化。

对不同温度条件下酶解4 h后的胰蛋白酶酶活进行分析, 结果显示, 当恒温酶解4 h后, 胰

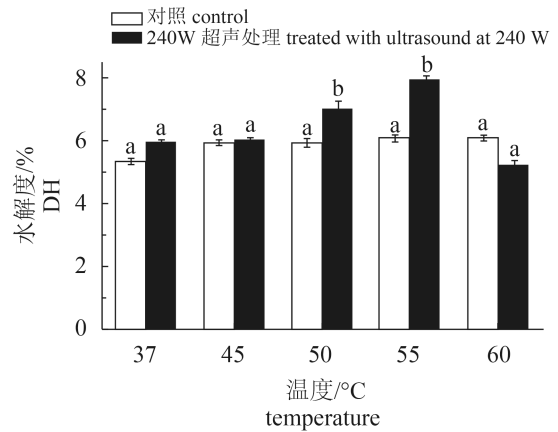


图4 不同温度下鳃加工副产物酶解4 h后的水解度变化

Fig. 4 Changes in degree of hydrolysis (DH) of *K. pelamis* by-products with trypsin after incubation for 4 hours at different temperature

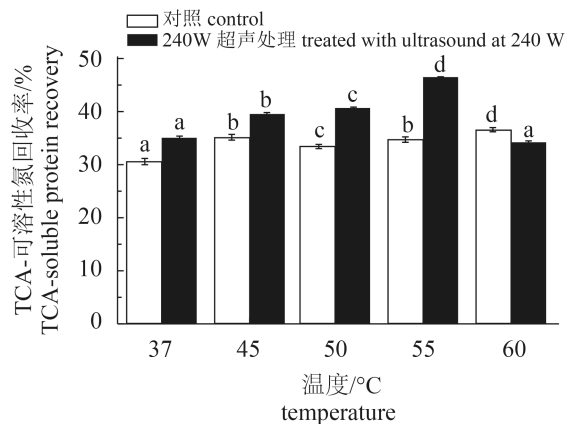


图5 不同温度下鳃加工副产物酶解4 h后的TCA-可溶性氮回收率变化

Fig. 5 Changes in TCA-soluble protein recovery of *K. pelamis* by-products with trypsin after incubation for 4 h at different temperature

蛋白酶的残留酶活均在50%以上, 而随着温度的升高胰蛋白酶酶活残留率逐渐下降(表2)。不同酶解温度下, 超声处理组的胰蛋白酶残留率均高于对照组。这表明在酶解过程中, 超声可以在一定程度上减少胰蛋白酶的失活。

2.3 超声功率对超声辅助酶解过程的影响

随着超声功率的增加, 鳃加工副产物酶解过程中氮回收率先上升后趋于平稳(图6)。在超声功率达到240 W后氮回收率趋于稳定, 为81.40%。TCA-可溶性氮回收率随超声功率的变化, 趋势与氮回收率基本一致, 同样在超声功率为240 W

表 2 不同温度下酶解4 h后的酶活残留率

Tab. 2 Remnant enzyme activity in the enzymatic hydrolysate incubation for 4 hours at different temperature %

温度/°C temperature	对照组 control group	超声处理组 experiment group
37	72.14±1.13 ^a	70.84±1.27 ^a
45	64.84±0.99 ^b	71.21±0.66 ^a
50	64.04±0.42 ^b	74.17±0.52 ^b
55	61.69±0.49 ^c	74.47±0.28 ^b
60	57.64±1.08 ^d	69.34±1.13 ^a

注: 每列中数值上不同小写字母表示存在显著性差异(P<0.05)
Notes: different letters in the same column indicate that the enzyme activity are significantly different (P<0.05)

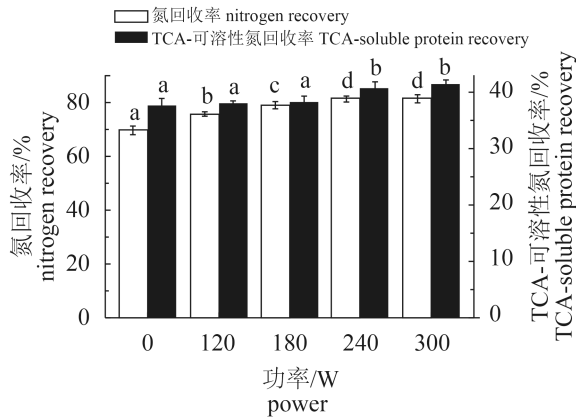


图 6 不同超声功率下鲢加工副产物酶解4 h后的氮回收率和TCA-可溶性氮回收率的变化

相同指标中具有不同字母表示存在显著性差异(P<0.05)

Fig. 6 Changes in nitrogen recovery and TCA-soluble protein recovery of *K. pelamis* by-products with trypsin after incubation for 4 h treated with different power of ultrasound

The columns at the same index having the different letters are significantly different (P<0.05)

时达到最大值, 为40.75%。酶解鲢加工副产物的水解度随超声功率的增大呈先上升后趋于平稳的趋势。这与氮回收率和TCA-可溶性氮回收率的变化趋势一致。超声功率120 W时, 鲢加工副产物的水解度比对照组提高了15.02%。而超声功率增加至240 W时, 水解度达到最大值, 为8.30%, 比对照组高了28.70%。但当超声功率达到300 W时, 水解度略有降低(图7)。

3000 u以上的大分子蛋白随着功率的增大呈先下降后上升的趋势, 而600 u以下的小分子肽则随着功率的增大呈现先减少后增加的趋势。

总体而言, 分子量大于3000 u的蛋白均为酶解液的主要部分, 达50%以上, 而600~3000 u的部分次之, 低于600 u的小分子肽含量最低(图8)。

3 讨论

3.1 温度对超声辅助酶解过程的影响

随着生物技术的兴起, 蛋白胨作为许多微生物培养基中的主要组成成分, 需求量逐年增加。而鲢加工副产物由于其高蛋白、低灰分和低脂肪的特点, 极适合作为蛋白类产品的加工原料, 具有开发成蛋白胨产品的潜能。

本实验为了探究超声作用在胰蛋白酶酶解

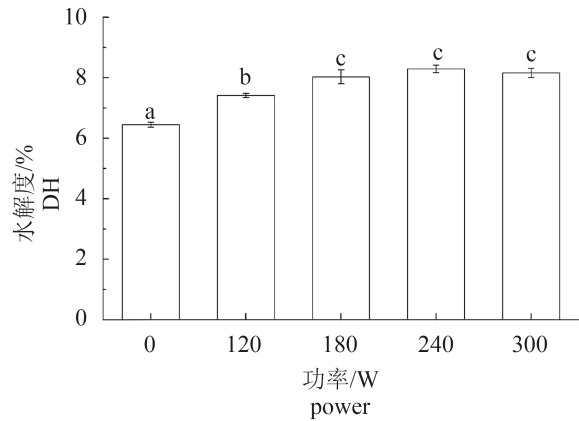


图 7 不同超声功率下鲢加工副产物酶解4 h后的水解度变化

Fig. 7 Changes of degree of DH during ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of *K. pelamis* by-products

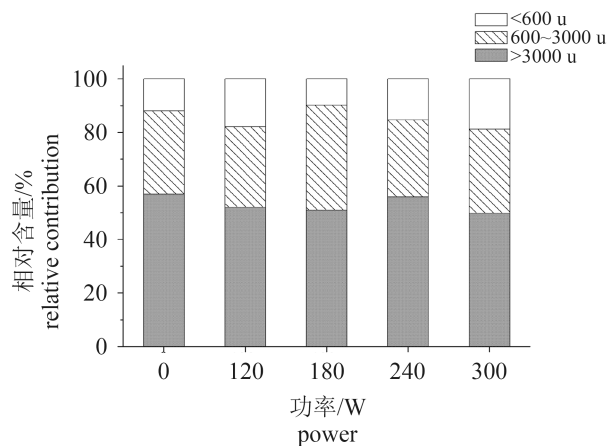


图 8 不同超声功率下鲢加工副产物酶解4 h后的蛋白分子组成

Fig. 8 Molecular weight distribution of hydrolysates of *K. pelamis* by-products

鳃加工副产物制备蛋白胨过程中的影响,首先考察了超声作用对于胰蛋白酶活性的影响,发现在超声的作用下,胰蛋白酶酶活随时间的延长呈先上升后下降的趋势,本实验结果与Dai等^[3]的研究中碱性蛋白酶在超声中的酶活变化基本吻合。有研究显示,超声的作用会使蛋白酶的荧光发射光谱发生不可逆的红移,荧光强度也会随着超声时间的延长而减弱,表明蛋白酶在超声的作用下构象会发生改变,从而使得蛋白酶的活性也随之变化^[3]。然而,适当的构象变化可以使蛋白酶活性增强。但是如果蛋白酶长时间处在超声中,其构象就会出现过度的变化,使蛋白酶活性减弱^[17]。超声对胰蛋白酶活性的这种影响,使得在超声辅助酶解鳃加工副产物的过程中,氮回收率的增长率也随着时间的延长呈现出先增加后减少的趋势。这为后续超声在胰蛋白酶酶解鳃加工副产物中的应用奠定了基础。

在温度对超声辅助酶解鳃加工副产物影响的实验中发现,无论有无超声作用,温度的改变都会影响胰蛋白酶对于鳃加工副产物的酶解效果,但是在超声辅助酶解过程中,氮回收率的变化趋势更为显著。这是因为超声作为一种能量形式,同时具备加热和空化两种作用,在不同条件下会促进或抑制酶活。在温度较低条件下,超声能在提升反应温度的同时由于空化作用而提高酶与底物的接触机率,从而有效提高酶解效率。但随着温度的升高,加热效应减弱而空化效应增强,剧烈的搅动以及空化产生的局部高温、高压使得酶的构象发生变化,从而使得酶解效率急剧下降^[18]。

而在不同温度下超声辅助酶解处理组的水解度均高于其对照,这与Zou等^[19]在研究超声处理对猪脑蛋白水解肽物化性质、功能性肽和抗氧化活性的影响研究中的水解度变化规律一致。此外Li等^[20]研究了多频超声和多频超声结合碱处理对大米蛋白水解的影响,结果也表明超声处理能明显提高大米蛋白的水解度。这可能是因为超声一方面破坏了溶质分子间的作用力,包括范德华力、氢键等,而且超声也会改变底物的构象,使其更易与酶结合;另一方面增加了酶与底物的结合速率和酶解产物的释放速率,从而促进酶解的进程^[4]。

对不同温度下酶解4 h后的胰蛋白酶酶活残留率的比较也可发现,超声作用能有效减轻温

度使胰蛋白酶失活的情况。这是由于在超声作用下,酶的构象会发生一定程度的改变^[3],从而减轻了温度对酶活性的影响。此外,超声条件下,酶更易与底物结合,而底物也在一定程度上对酶起到了保护作用。这也说明超声在胰蛋白酶酶解鳃加工副产物的过程中不仅能有效地增加酶解速率,提高氮回收率,还能在一定程度上防止胰蛋白酶活性减弱。

3.2 功率对超声辅助酶解过程的影响

超声功率也会影响胰蛋白酶对鳃加工副产物的酶解效果。随着超声功率的增大,酶解效率呈上升趋势,在以往的研究中也得出了类似的结论^[21-23]。超声功率对胰蛋白酶酶解鳃加工副产物的影响主要有两个方面:一方面超声作用可以在一定程度上改变酶构象,从而提高酶活性^[3, 23],而且超声自身具备的机械和能量双属性,在其功率增加时使得空化和加热作用加剧,能有效地加速酶解反应的传质、传热过程^[18],从而加快酶解效率,增加可溶性蛋白的含量;另一方面,随着超声功率的增大,超声的空化效应增强,也能促使一部分不溶性蛋白的结构发生改变而变得可溶^[18]。

不同超声功率下酶解液的蛋白分子量组成情况与Nguyen等^[24]的研究中黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)副产物的水解蛋白分子量分布相似。超声作用能有效提高酶解液中低分子量蛋白质的含量,而有研究表明蛋白胨中高含量的低分子量肽类更有利于微生物的生长繁殖^[25]。这也为超声辅助酶解鳃加工副产物生产高质量的蛋白胨产品提供了依据。

本研究通过超声辅助酶解的方式对鳃加工副产物进行高值化利用。在没有对鳃加工副产物进行分级的情况下,对其中大部分的蛋白进行了回收利用。在超声功率为240 W、酶解温度55 °C时,氮回收率和TCA-可溶性氮回收率均达到最大值,分别为81.40%和40.75%。且超声能有效地提高分子量3000 u以下的蛋白胨和小分子肽的含量。这也为更加高效地利用鳃加工副产物提供了一种可行的途径。

参考文献:

- [1] 叶彬清,王锡昌,陶宁萍,等. 鱼类副产物利用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(21): 15-19.

- Ye B Q, Wang X C, Tao N P, *et al.* Research on progress of utilisation of fish processing by-products[J]. Food Research and Development, 2014, 35(21): 15-19(in Chinese).
- [2] Safari R, Motamedzadegan A, Ovissipour M, *et al.* Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 73-79.
- [3] Dai C H, Ma H L, Gu X H, *et al.* Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of defatted larva flour of *Tenebrio molitor* (L.)[J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2011, 9(3): 101-106.
- [4] Li S Y, Yang X, Zhang Y Y, *et al.* Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 31: 20-28.
- [5] Stefanović A B, Jovanović J R, Grbavčić S Ž, *et al.* Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production[J]. European Food Research and Technology, 2014, 239(6): 979-993.
- [6] 徐洋, 吕大强, 王舒婷, 等. 超声辅助酶法回收南极磷虾壳中蛋白质的研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(14): 97-100.
- Xu Y, Lu D Q, Wang S T, *et al.* Research on the protein extracted from antarctic krill shell with ultrasonic-assisted enzymatic method[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(14): 97-100(in Chinese).
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB5009. 5-2010食品安全国家标准, 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB5009. 5-2010 National food safety standard determination of protein in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010 (in Chinese).
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 9695. 7-2008 肉与肉制品总脂肪含量测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 9695. 7-2008 Meat and meat products-determination of total fat content[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008 (in Chinese).
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB 5009. 3-2010 食品安全国家标准, 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009. 3-2010 National food safety standard determination of moisture in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010 (in Chinese).
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 5009. 4-2010 食品安全国家标准, 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- The Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 5009. 4-2010 National food safety standard determination of ash in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2010 (in Chinese).
- [11] 赵新淮, 冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. 东北农业大学学报, 1995, 26(2): 178-181.
- Zhao X H, Fong Z B. A study on the determination of the degree of hydrolysis in soy protein hydrolysates[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1995, 26(2): 178-181(in Chinese).
- [12] 中华人民共和国商业部. SB/T 10317-1999 蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- Ministry of Commerce of the People's Republic of China. SB/T 10317-1999 Measurement of proteinase activity[S]. Beijing: Standards Press of China, 1999 (in Chinese).
- [13] Nikolaev I V, Sforza S, Lambertini F, *et al.* Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization[J]. Food Chemistry, 2016, 197: 611-621.
- [14] 王国强, 何力, 贾鲁君, 等. 长鳍金枪鱼鱼皮胶原蛋白制备工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(7): 105-110.
- Wang G Q, He L, Jia L J, *et al.* Study on the preparation of collagen peptide from *Albacore tuna* skin[J]. Food Research and Development, 2016, 37(7): 105-110(in Chinese).
- [15] 张萍. 酶解罗非鱼碎肉制备生化试剂蛋白胨的工艺研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- Zhang P. Study on preparation technology of biochemical reagent-peptone by enzymolysis tilapia surimi[D]. Fu Zhou: Fujian Agriculture and Forestry

- University, 2009 (in Chinese).
- [16] 黄春红, 曾伯平, 董建波. 青鱼、草鱼、鲢鱼和鳙鱼鱼头营养成分比较[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2008, 20(3): 46-48,57.
- Huang C H, Zeng B P, Dong J B. Comparison of nutrients in the head of black carp, grass carp, silver carp and bighead carp[J]. Journal of Hunan University of Arts and Science (Natural Science Edition), 2008, 20(3): 46-48,57(in Chinese).
- [17] Kadkhodae R, Povey M J W. Ultrasonic inactivation of *Bacillus* α -amylase. I. Effect of gas content and emitting face of probe[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15(2): 133-142.
- [18] 杨进妹, 王婷, 何荣海. 超声对酶解反应的影响[J]. 农产品加工, 2010(7): 70-71,73.
- Yang J M, Wang T, He R H. The influence of ultrasonic for enzymatic hydrolysis reaction[J]. Farm Products Processing, 2010(7): 70-71,73(in Chinese).
- [19] Zou Y, Wang W, Li Q, *et al.* Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(3): 431-443.
- [20] Li S Y, Yang X, Zhang Y Y, *et al.* Enzymolysis kinetics and structural characteristics of rice protein with energy-gathered ultrasound and ultrasound assisted alkali pretreatments[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 31: 85-92.
- [21] 黄卓烈, 林茹, 何平, 等. 超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 89-93.
- Huang Z L, Lin R, He P, *et al.* Study on the effect of ultrasound on the activities of catalase and polyphenol oxidase from yeasts[J]. China Biotechnology, 2003, 23(4): 89-93(in Chinese).
- [22] Chen L, Chen J S, Ren J Y, *et al.* Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(6): 2600-2609.
- [23] 陈小丽, 黄卓烈, 何平, 等. 超声波对木瓜蛋白酶催化活性影响的机理研究[J]. 应用声学, 2008, 27(6): 469-474.
- Chen X L, Huang Z L, He P, *et al.* Study on effect of ultrasound on catalysis activity of papain[J]. Applied Acoustics, 2008, 27(6): 469-474(in Chinese).
- [24] Nguyen T M H, Sylla K S B, Randriamahatody Z, *et al.* Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using Protamex protease[J]. Food Technology and Biotechnology, 2011, 49(1): 48-55.
- [25] Fallah M, Bahram S, Javadian S R. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media[J]. Food Science and Nutrition, 2015, 3(2): 153-157.

Preparation of peptone by ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) by-products

ZHAO Peicheng¹, TANG Lianxiang¹, YUAN Jian², CHEN Yifang²,
WANG Qiujian², DING Yuting^{1,3}, LIU Shulai^{1,3*}

(1. Ocean College, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China;

2. Ningbo Today Food Co. Ltd., Ningbo 315502, China;

3. Institute of Ocean Research, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: *Katsuwonus pelamis* processing by-products, including viscera, fish head, fish gills and fish skin, contain protein, fat and other nutrients. Ineffective utilization of these by-products will lead to the waste of nutritious resources and serious environmental pollution. In order to provide a practical method to improve the utilization of by-products, the peptone was prepared by ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of *K. pelamis* by-products by trypsin. The effects of time, temperature and power of ultrasonic on the changes of protease activity, degree of hydrolysis, nitrogen recovery, TCA-soluble nitrogen recovery and molecular weight distribution of the hydrolysate were investigated during the ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis of *K. pelamis* by-products. The conditions of peptone preparation were optimized by single factor experiment. The results showed that the enzymatic activity of trypsin was significantly changed by ultrasound treatment, and the activity of trypsin increased within 30 min under the ultrasonic power 120 W. However, after 30 min, the activity of trypsin decreased obviously, until 4 h later the enzyme activity tended to decrease gently. The power of ultrasonic and the temperature of enzymatic hydrolysis all affect the enzymatic efficiency of enzymatic hydrolysis of *K. pelamis* by-products. Under the conditions of ultrasonic power 240 W and 50 °C, the recovery of nitrogen increased by 18.66%, the degree of hydrolysis increased by 30.43% and the recovery of TCA-soluble nitrogen increased by 33.20%, compared with non-ultrasound group. And ultrasound also can effectively improve the small molecule peptide in the enzymatic solution. The optimum conditions were temperature 55 °C, ultrasonic power 240 W, hydrolytic time 4 h. Under these conditions, the recovery of nitrogen was 81.40% and the recovery of TCA-soluble nitrogen was 40.75%.

Key words: *Katsuwonus pelamis*; by-product; ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis; peptone; preparation

Corresponding author: LIU Shulai. E-mail: slliu@zjut.edu.cn

Funding projects: Key Research and Development Project of Zhejiang Province (2015C02033)