DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260320006
引用格式: 陈培盛, 陈鸿彬, 徐静蕾, 等. 超声预处理-酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的工艺优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(11): 31–40.
CHEN PS, CHEN HB, XU JL, *et al*. Optimization of the extraction process of proteins in *Trichiurus lepturus* processing by-products by ultrasonic pretreatment-enzyme method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(11): 31–40. (in Chinese with English abstract).

超声预处理-酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的工艺优化

陈培盛[1,2,3], 陈鸿彬[1], 徐静蕾[3], 孙会娟[3], 余中节[1,2], 孙 迪[1,2], 马庆保[1,2], 刘 宇[1,2], 姜 维[1,2,3*]

[1. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心(创新应用研究院), 舟山 316022; 2. 平阳县科技创新研究院, 温州 325400; 3. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 舟山 316022]

摘 要: 目的 建立超声预处理-酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的工艺, 并研究蛋白质的基本性质。**方法** 以带鱼加工副产物为原料, 通过单因素和正交试验优化了胰蛋白酶提取蛋白质的工艺条件。在此条件下, 对带鱼加工副产物进行酸预处理、碱预处理、热预处理和超声预处理, 并通过单因素和正交试验优化了超声预处理的工艺条件。**结果** 胰蛋白酶为最适蛋白酶, 温度 55 ℃, 料液比 1:2 (g:mL), 处理时间 1.5 h, 加酶量 0.5%为最佳提取工艺条件, 蛋白质回收率为 76.05%±0.69%。超声预处理的最佳工艺条件为: 超声功率 180 W, 超声时间 40 min, 超声温度 40 ℃。在超声预处理的最佳条件下提取蛋白质, 蛋白质回收率为 85.93%±0.62%, 氨基酸中含量最高的是甘氨酸, 其次为谷氨酸和丙氨酸, 并具有较强的 2,2'-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) diammonium salt, ABTS]阳离子自由基、2,2-联苯基-1-苦基肼基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除活性和 Fe^{3+}还原能力。**结论** 酶法和超声预处理实现了带鱼加工副产物中蛋白质的高效提取, 提取的蛋白质具有较强的抗氧化能力, 为带鱼加工副产物的高值化利用提供技术支撑。

关键词: 带鱼加工副产物; 蛋白质提取; 超声预处理; 酶法

Optimization of the extraction process of proteins in *Trichiurus lepturus* processing by-products by ultrasonic pretreatment-enzyme method

CHEN Pei-Sheng[1,2,3], CHEN Hong-Bin[1], XU Jing-Lei[3], SUN Hui-Juan[3], YU Zhong-Jie[1,2], SUN Di[1,2], MA Qing-Bao[1,2], LIU Yu[1,2], JIANG Wei[1,2,3*]

[1. *National Engineering Research Center for Marine Aquaculture* (*Institute of Innovation and Application*), *Zhejiang Ocean University*, *Zhoushan* 316022, *China*; 2. *Pingyang Institute of Science and Technology Innovation*, *Wenzhou* 325400, *China*; 3. *College of Marine Science and Technology*, *Zhejiang Ocean University*, *Zhoushan* 316022, *China*]

收稿日期: 2026-03-20
基金项目: 国家重点研发计划项目(2024YFD2101204)
第一作者: 陈培盛(2000—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: 13535937554@163.com
***通信作者:** 姜维(1987—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: jiangw@zjou.edu.cn

ABSTRACT: Objective To establish an extraction process of proteins in *Trichiurus lepturus* processing by-products by ultrasonic pretreatment-enzyme method and investigate the fundamental properties of the proteins. **Methods** Taking *Trichiurus lepturus* processing by-products as raw materials, the enzymatic extraction conditions of protein by trypsin were optimized through single-factor experiments and orthogonal tests. On this basis, 4 kinds of pretreatment methods including acid pretreatment, alkali pretreatment, thermal pretreatment and ultrasonic pretreatment were applied to *Trichiurus lepturus* processing by-products, and the process parameters of ultrasonic pretreatment were further optimized via single-factor experiments and orthogonal tests. **Results** Trypsin was the optimum protease, and the optimum enzymolysis conditions were as follows: Enzymolysis temperature 55 ℃, solid-liquid ratio 1:2 (g:mL), enzymolysis time 1.5 h, enzyme dosage 0.5%, the protein recovery of enzymatic hydrolysate was 76.05%±0.69%. The optimum technological conditions of ultrasonic pretreatment were as follows: Ultrasonic power 180 W, ultrasonic time 40 min, ultrasonic temperature 40 ℃. Proteins were extracted under optimal conditions of ultrasound pretreatment with a protein recovery rate of 85.93%±0.62%. The highest content among amino acids was glycine, followed by glutamate and alanine, and had strong 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) diammonium salt (ABTS) cationic radical, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, and Fe^{3+} reducing activity. **Conclusion** Ultrasonic pretreatment-enzyme method achieves efficient recovery of protein from *Trichiurus lepturus* processing by-products. The extracted proteins exhibit strong antioxidant capacity, providing technical support for the high-value utilization of *Trichiurus lepturus* processing by-products.

KEY WORDS: *Trichiurus lepturus* processing by-products; protein extraction; ultrasonic pretreatment; enzyme method

0 引 言

带鱼(*Trichiurus lepturus*)又叫刀鱼、牙带鱼，属硬骨鱼纲鲈形目带鱼科，是重要的经济鱼类，主要分布于西北太平洋、印度洋和大西洋[1]。2024 年，我国带鱼捕获量约 91 万吨，占全国海水鱼捕捞总量的 10.4%[2]。带鱼富含蛋白质、不饱和脂肪酸、必需氨基酸和矿物质，除鲜销外，主要被加工成鱼糜等水产制品[3]。带鱼加工过程中产生鱼头、鱼尾、碎肉、内脏、骨等下脚料，占整鱼重量 40%~50%，这些下脚料的蛋白质含量约为 12.16~16.44%[4−5]。带鱼下脚料富含蛋白质，未充分利用不仅会导致资源浪费，还会额外增加处置成本[6]。因此，亟需开发带鱼加工副产物中蛋白质的高效提取技术，提升带鱼资源的综合利用率和经济效益。

酸碱法是动物加工副产物中蛋白质提取的主要方法，但可能会腐蚀设备、导致蛋白质变性并增加环保压力[7]。近年来，研究人员尝试采用酶法提取动物加工副产物中的蛋白质，该方法过程温和且可控，有助于保持蛋白质的功能特性[8]。ZHANG 等[9]通过酶法从鸡骨架中提取蛋白质，蛋白质回收率为 50.45%。PAP 等[10]通过酶法从鲑鱼头部和脊骨中提取蛋白质，蛋白质回收率为 64%。单一酶法因酶与物料接触面少等原因导致蛋白质提取效率普遍不高。原料预处理可能一定程度提高酶法提取蛋白质的效率，常用的原料预处理方法包括热预处理[11]、酸预处理[12]、碱预处理[13]和超声预处理[14]。

本研究以带鱼加工副产物为原料，以蛋白质回收率为评价指标，通过单因素和正交试验优化酶法提取蛋白质工艺；比较不同预处理方法对酶法提取蛋白质效率的影响，进一步通过单因素和正交试验优化超声波预处理工艺；分析提取蛋白质的主要成分和抗氧化特性，为带鱼资源的高值化综合利用提供重要支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

带鱼加工副产物(浙江兴业集团有限公司)。

碱性蛋白酶(2×10^5 U/g)、中性蛋白酶(2×10^5 U/g)、胰蛋白酶(4×10^3 U/g)、风味蛋白酶(3×10^4 U/g)、木瓜蛋白酶(6×10^5 U/g)、酸性蛋白酶(5×10^4 U/g)、菠萝蛋白酶(1.2×10^6 U/g)(南京东恒华道生物科技有限公司)；硫酸亚铁、无水乙醇、三水醋酸钠、冰醋酸(分析纯)、氢氧化钠(纯度≥96%)、盐酸(纯度 36.0%~38.0%)、过硫酸钾(纯度≥99.5%)、六水氯化铁(纯度≥99%)(国药集团化学试剂有限公司)；2,2-联苯基-1-苦基肼基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)(纯度≥97%)、2,2'-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) diammonium salt, ABTS](纯度≥98%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

HH-1 恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)；SHZ-B 恒温水浴振荡器(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)；

PHS-3C 酸度计(上海仪电科学仪器股份有限公司); EL-204-IC 电子天平(精度 0.001 g, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); K9860 全自动凯氏定氮仪(济南海能仪器有限公司); GZX-9140 MBE 鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SZF-06A 粗脂肪测定仪(上海力辰邦西仪器科技有限公司); SpectraMax M2 多功能酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司); HITACHI LA8080 氨基酸分析仪(日本日立有限公司); Milli-Q 超纯水系统(上海密理博贸易有限公司); SCIENTZ-12N 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司); KLS-1200X 箱式炉(合肥科晶材料技术有限公司)。

1.3　试验方法

1.3.1　酶法提取带鱼加工副产物的蛋白质

称取带鱼加工副产物, 按比例加入一定体积的蒸馏水, 用盐酸调节 pH。加入一定量的蛋白酶, 置于恒温水浴振荡器处理一定时间, 95 ℃ 水浴处理 10 min。纱布过滤, 收集滤液, 得到提取的带鱼加工副产物蛋白质。

1.3.2　蛋白酶种类对蛋白质提取效果的影响

按照 1.3.1 方法, 在料液比 1:4 (g:mL)、处理时间 1 h 的条件下, 分别采用 1000 U/g 的碱性蛋白酶(pH 9, 50 ℃)、中性蛋白酶(pH 7, 45 ℃)、胰蛋白酶(pH 8, 50 ℃)、风味蛋白酶(pH 7, 50 ℃)、木瓜蛋白酶(pH 7, 50 ℃)、菠萝蛋白酶(pH 7, 50 ℃)和酸性蛋白酶(pH 3, 50 ℃)提取带鱼加工副产物的蛋白质, 测定蛋白质回收率, 筛选最佳蛋白酶。

1.3.3　酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的单因素试验

按照 1.3.1 方法, 采用胰蛋白酶提取带鱼加工副产物的蛋白质, 在料液比 1:4 (g:mL)、pH 8、加酶量 0.5%和处理时间 1 h 的条件下, 探究温度(40、45、50、55 和 60 ℃)对蛋白质回收率的影响; 在料液比 1:4 (g:mL)、pH 8、加酶量 0.5%和温度 50 ℃的条件下, 探究处理时间(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)对蛋白质回收率的影响; 在温度 50 ℃、pH 8、加酶量 0.5%和处理时间 1 h 的条件下, 探究料液比[1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 (g:mL)]对蛋白质回收率的影响; 在料液比 1:4 (g:mL)、pH 8、温度 50 ℃和处理时间 1 h 的条件下, 探究加酶量(0.1%、0.3%、0.5%、0.7%和 0.9%)对蛋白质回收率的影响。

1.3.4　酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的正交试验

基于单因素试验结果, 以蛋白质回收率为评价指标, 选择温度、处理时间、料液比和加酶量 4 个因素设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 因素编码见表 1。

1.3.5　预处理方法对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质效果的影响

采用碱处理、热处理、酸处理和超声处理对带鱼加工副产物进行预处理, 然后在 1.3.4 最优工艺条件下提取蛋白质, 测定蛋白质回收率。

表 1　酶法正交试验的因素水平表

Table 1　Factor level table for orthogonal experiment of enzyme method

水平	因素			
	A: 温度/℃	*B*: 处理时间/h	*C*: 料液比(g:mL)	*D*: 加酶量/%
1	45	0.5	1:1	0.3
2	50	1.0	1:2	0.5
3	55	1.5	1:3	0.7

(1)酸预处理

参考文献[15]方法进行修改。采用稀盐酸对带鱼加工副产物进行酸预处理: 按料液比 1:2 (g:mL)加入蒸馏水, 调节 pH 至 3.5, 在室温和 140 r/min 条件下搅拌处理 30 min。

(2)碱预处理

参照文献[13]方法进行修改。称取带鱼加工副产物, 按料液比 1:2 (g:mL)加入 2.0% (*m*:*V*) 氢氧化钠溶液, 在室温和 140 r/min 条件下搅拌处理 30 min。

(3)热预处理

参考文献[16]方法进行修改。带鱼加工副产物中添加蒸馏水, 在 85 ℃、料液比 1:2 (g:mL)和 140 r/min 的条件下搅拌处理 30 min。

(4)超声预处理

参考文献[17]方法进行修改。带鱼加工副产物中按 1:2 (*m*:*V*)添加蒸馏水, 在功率 160 W 和温度 50 ℃的超声条件下处理 60 min。

1.3.6　超声预处理单因素试验

按照 1.3.4 最优工艺条件, 在超声功率 160 W 和超声时间 60 min 的条件下, 探究超声温度(20、30、40、50 和 60 ℃)对蛋白质回收率的影响; 在超声功率 160 W 和超声温度 50 ℃的条件下, 探究超声时间(10、20、30、40、50 和 60 min)对蛋白质回收率的影响; 在超声时间 60 min 和超声温度 50 ℃的条件下, 探究超声功率(120、140、160、180 和 200 W)对蛋白质回收率的影响。

1.3.7　超声预处理正交试验

基于单因素试验结果, 以蛋白质回收率为指标, 选取超声功率、超声时间和超声温度 3 个因素设计 $L_9(3^3)$正交试验, 因素编码见表 2。

表 2　超声预处理正交试验的因素水平表

Table 2　Factor level table for orthogonal experiment of ultrasonic pretreatment

水平	因素		
	E: 超声温度/℃	*F*: 超声时间/min	*G*: 超声功率/W
1	30	30	160
2	40	40	180
3	50	50	200

1.3.8 蛋白质回收率的测定

参考 GORGUC 等[18]的方法测定蛋白质回收率。

1.3.9 蛋白质的基本性质测定

(1)组成成分

按照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》的直接干燥法测定水分含量; 按照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》的索氏抽提法测定脂肪含量; 按照 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》测定灰分含量; 按照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》的凯氏定氮法测定蛋白质含量。

(2)氨基酸组成

采用氨基酸分析仪测定蛋白质的氨基酸组成。

(3) ABTS 阳离子自由基清除活性

参考 HAO 等[19]的方法测定 ABTS 阳离子自由基清除活性。

(4) DPPH 自由基清除活性

参考 SUN 等[20]的方法测定 DPPH 自由基清除活性。

(5) Fe^{3+}还原能力

参考 SOUSA 等[21]的方法测定 Fe^{3+}还原能力。

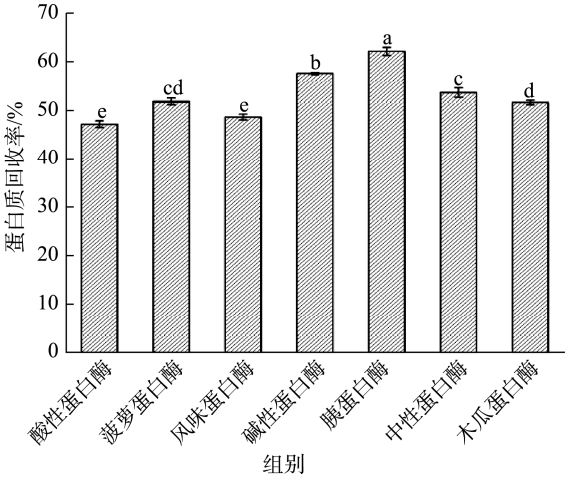
1.4 数据处理

所有数据表示为平均值±标准偏差(n=3); 使用 Origin 64 软件进行绘图; Excel 2021 对数据进行预处理, 采用 IBM SPSS 27 进行数据分析, 使用单因素方差分析和 Tukey 显著性检验, P<0.05 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶种类对蛋白质提取效果的影响分析

7 种商业蛋白酶对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 1 所示, 蛋白质回收率范围为 46.88%~61.82%, 不同蛋白酶的提取效果有明显差异, 主要归因于蛋白酶酶切位点的差异[22]。碱性蛋白酶是内切酶, 专门切割羧基端疏水氨基酸残基旁的肽键, 如谷氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和赖氨酸[23]。木瓜蛋白酶特异性广泛, 能够作用于蛋白质中的多种氨基酸残基, 尤其是含有精氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸的芳香族氨基酸的肽键[24]。菠萝蛋白酶切割碱性氨基酸(精氨酸)或芳香族氨基酸(苯丙氨酸和酪氨酸)羧基端的肽键[25]。风味蛋白酶兼具内切酶和外切酶的活性, 切割多肽链的末端[26]。中性蛋白酶在亮氨酸或苯丙氨酸氨基酸残基处切割肽键[27]。胰蛋白酶处理带鱼加工副产物的蛋白质回收率最高(61.82%±0.83%), 显著高于其他蛋白酶(P<0.05)。胰蛋白酶的主要作用位点是赖氨酸和精氨酸等碱性氨基酸的羧基和氨基[28], WANG 等[27]利用 4 种蛋白酶从三文鱼精巢中提取蛋白质, 胰蛋白酶处理三文鱼精巢的蛋白质回收率最高(74.12%)。本研究中胰蛋白酶处理带鱼加工副产物的蛋白质回收率(61.82%)略低于三文鱼精巢蛋白质回收率, 这可能与不同原料的蛋白质组成差异相关。因此, 本研究选择胰蛋白酶作为酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最佳蛋白酶。



注: 不同字母表示组间存在显著性差异(P<0.05), 下同。

图 1 蛋白酶种类对蛋白质回收率的影响(n=3)

Fig.1 Effects of protease types on protein recovery (n=3)

2.2 酶处理参数对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质效果的影响分析

2.2.1 温 度

温度对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 2(A)所示, 蛋白质回收率范围为 49.89%~61.55%。在 40~60 ℃内, 蛋白质回收率呈先上升后下降的趋势。在温度为 55 ℃时, 蛋白质回收率达到最大, 为 61.55%±0.96%。这是因为温度较低时, 分子热运动速率减慢, 降低了酶-底物复合物的形成速率[29]。而过高的温度可能会改变酶活性位点的结构, 阻止其与带鱼加工副产物结合, 阻碍催化反应[30]。因此, 50 ℃是酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最优温度条件。

2.2.2 处理时间

处理时间对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 2(B)所示, 蛋白质回收率范围为 36.78%~62.55%。随着处理时间的延长, 蛋白质回收率呈先上升后趋于平缓的趋势。当处理时间为 2.5 h 时, 蛋白质回收率达到最大, 为 62.55%±1.86%。其原因可能是处理时间过长导致带鱼加工副产物中蛋白质的可酶切位点已基本被水解, 酶促反应趋于平衡[31]。因此, 1.0 h 是酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最优处理时间条件。

2.2.3 料液比

料液比对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 2(C)所示, 蛋白质回收率范围为 46.92%~73.97%。随

着料液比的增加, 蛋白质回收率呈先上升后下降的趋势。当料液比为 1:2 (g:mL)时, 蛋白质回收率达到最大, 为 73.97%±1.69%。这可能是因为料液比的不断增大, 胰蛋白酶和带鱼加工副产物充分接触, 胰蛋白酶能够更高效地识别并切割带鱼加工副产物。而当料液比过大时, 溶液的黏稠度增加, 不利于胰蛋白酶与带鱼加工副产物的接触[32]。因此, 1:2 (g:mL)是酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最优料液比条件。

2.2.4　加酶量

加酶量对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 2(D)所示, 蛋白质回收率范围为 39.82%~58.52%。蛋白质回收率随着加酶量的增加呈先上升后平缓的趋势, 当加酶量为 0.7%时, 蛋白质回收率达到最大值, 为 58.52%±1.44%。这可能是由于底物结合位点趋于饱和, 过量的酶无法进一步发挥作用[33]。因此, 0.5%是酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最优加酶量条件。

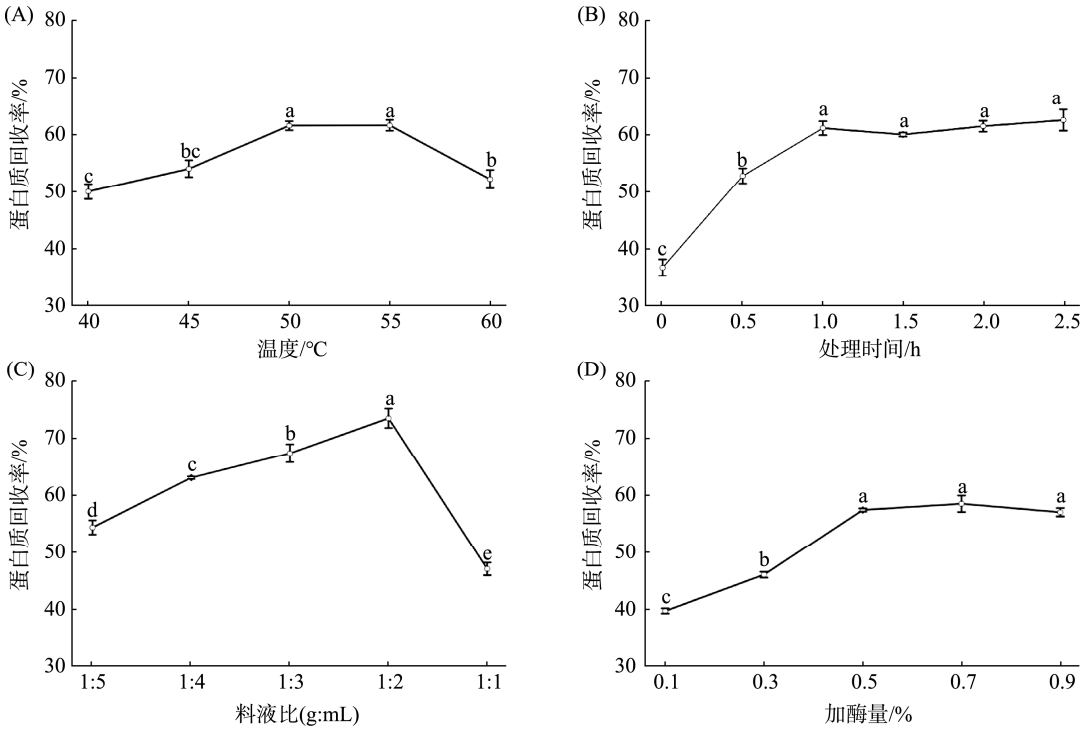


图 2　酶处理参数对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质效果的影响(n=3)

Fig.2　Effects of enzyme processing parameters on protein effects in enzyme extraction of *Trichiurus lepturus* processing by-products (n=3)

2.3　酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质条件的正交优化

根据单因素试验结果, 选取加酶量、处理时间、温度以及料液比的 3 个水平进行正交试验, 以蛋白质回收率为评价指标。试验设计及结果如表 3 所示。R 越大, 代表着指标受该因素的水平变化的影响越大。因此, 影响因素的主次顺序为料液比>加酶量>处理时间>温度。最佳条件组合为 $A_3B_3C_2D_2$, 即温度 55 ℃, 处理时间 1.5 h, 料液比 1:2 (g:mL), 加酶量 0.5%。经验证, 在此条件下, 蛋白质回收率为 76.05%±0.69%。

2.4　预处理方法对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果比较

预处理方法对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果比较如图 3 所示。经过超声预处理后, 蛋白质回收率由 76.05%提高至 80.87%。这可能是超声预处理一方面可能改变底物的表面结构, 例如使底物表面粗糙度和孔隙增加, 从而增加底物的比表面积; 另一方面可能破坏底物的紧密结构, 使底物的结构变得松弛。因此, 酶在后续的水解过程中可以更容易地与底物分子结合[34]。因此, 超声预处理可以提高蛋白质回收率。

2.5　超声参数对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质效果的影响

2.5.1　超声温度

超声温度对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 4(A)所示, 蛋白质回收率范围为 80.19%~85.68%。随着超声温度的增加, 蛋白质回收率呈现出先上升后下降的趋势, 在超声温度达到 40 ℃时, 蛋白质回收率达到最大值, 为 85.68%±0.40%。这是因为随着温度升高, 溶液的黏度系数和表面张力降低, 导致空化阈值降低, 所以更容易产生空化效应、强烈的冲击波和微喷流, 使蛋白质颗粒表

面结构松散, 有利于胰蛋白酶的水解[35]。与此同时, 蛋白质分子的布朗运动可能会加快, 可溶性蛋白质的溶解速率增加。然而, 随着温度的进一步升高, 空化气泡破裂会使溶液的蒸气压增加, 从而抑制空化作用[36]。因此, 40 ℃是酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最优超声温度条件。

表 3 酶法正交试验设计及结果(*n*=3)

Table 3 Design and results of orthogonal experimental of enzyme method (*n*=3)

编号	因素				蛋白质回收率/%
	A: 温度/℃	*B*: 处理时间/h	*C*: 料液比(g:mL)	*D*: 加酶量/%	
1	1	1	1	1	37.86
2	1	2	3	2	56.24
3	1	3	2	3	70.61
4	2	1	3	3	60.40
5	2	2	2	1	48.52
6	2	3	1	2	55.81
7	3	1	2	2	68.23
8	3	2	1	3	48.24
9	3	3	3	1	48.86
K_1	164.70	166.49	141.90	135.24	
K_2	164.73	153.00	187.37	180.27	
K_3	165.33	175.27	165.50	179.26	
k_1	54.90	55.50	47.30	45.08	
k_2	54.91	51.00	62.46	60.09	
k_3	55.11	58.42	55.17	59.75	
max	55.11	58.42	62.46	60.09	
min	54.90	51.00	47.30	45.08	
R	0.21	7.42	15.15	15.01	
主次顺序	*C*>*D*>*B*>*A*				
最佳组合	$A_3B_3C_2D_2$				

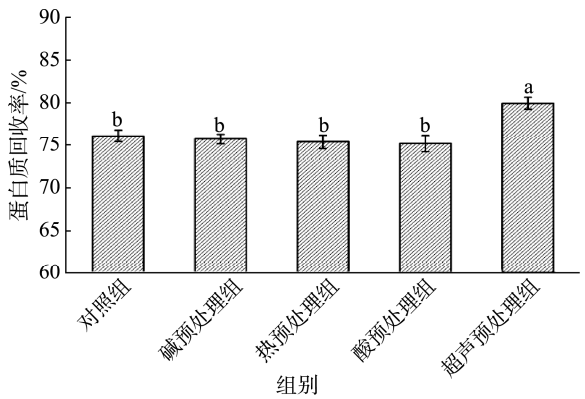


图 3 预处理方法对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的影响(*n*=3)

Fig.3 Effects of pretreatment methods on enzyme extraction of proteins in *Trichiurus lepturus* processing by-products (*n*=3)

2.5.2 *超声时间*

超声时间对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 4(B)所示, 蛋白质回收率范围为 77.19%~85.41%。随着超声时间的增加, 蛋白质回收率呈现出先上升后稳定的趋势, 在超声时间达到 60 min 时, 蛋白质回收率达到最大值, 为 85.41%±0.78%。一方面可能是因为在超声波作用下, 蛋白质二级和三级结构发生改变, 酶更易识别并结合多肽链上的特异性酶切位点[37]。另一方面可能是因为超声时间的增加, 产生的空化气泡越多, 气泡破裂后产生的局部冲击波越强, 蛋白质颗粒更加精细和均质化, 增强酶与底物的相互作用[35]。当超声时间超过 40 min, 蛋白质回收率趋于稳定, 这可能是由于细胞内可被释放的蛋白质已基本溶出, 提取体系中底物浓度达到饱和。因此, 40 min 是酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最优超声时间条件。

2.5.3 *超声功率*

超声功率对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质的效果如图 4(C)所示, 蛋白质回收率范围为 77.70%~85.31%。随着超声功率的增加, 蛋白质回收率呈现出先上升后稳定的趋势, 在超声功率达到 180 W 时, 蛋白质回收率达到最大值, 为 85.31%±1.13%。这可能是因为超声功率的增加可增加水分子的振动频率, 改变带鱼加工副产物蛋白质结构, 暴露更多潜在酶切位点, 提高胰蛋白酶与带鱼加工副产物的结合效率, 促进反应的进行[38]。因此, 180 W 是酶法提取带鱼加工副产物蛋白质的最优超声功率条件。

2.6 超声预处理条件的正交优化

根据单因素试验结果, 选取超声功率、超声时间和超声温度的 3 个水平进行正交试验, 以蛋白质回收率为评价指标。试验设计及结果如表 4 所示。*R* 越大, 代表指标受该因素的水平变化的影响越大。所以影响因素的主次顺序为超声功率>超声时间>超声温度。最佳条件组合为 $E_2F_2G_2$, 即超声功率 180 W, 超声时间 40 min, 超声温度 40 ℃。在此条件下, 蛋白质回收率为 85.93%±0.62%, 远高于已报道的鸡骨架(50%)[9]、鲑鱼头部/脊骨(64%)[10]和三文鱼精巢(74%)[27]蛋白质回收率。

2.7 蛋白质的主要组成成分

最佳工艺条件下, 超声预处理-酶法处理带鱼加工副产物制得提取物的蛋白质含量最高, 为 89.29%±1.14%, 表明采用的提取工艺可有效富集带鱼加工副产物中的蛋白质, 且纯度较高。水分含量为 4.94%±0.07%, 表明蛋白质干燥充分, 这不仅有利于降低蛋白质变性风险, 还能提高蛋白质贮藏稳定性, 减少微生物污染与品质劣变。灰分含量为 3.48%±0.16%, 主要来源于带鱼加工副产物自身含有的矿物质。较好地保留蛋白质本身的矿物质营养, 提高蛋白质的营养价值。脂肪含量最低, 仅为 1.07%±0.20%, 这可减少油脂氧化酸败产生的异味, 提高蛋白质贮藏稳定性, 降低脂肪对蛋白质功能特性的干扰。

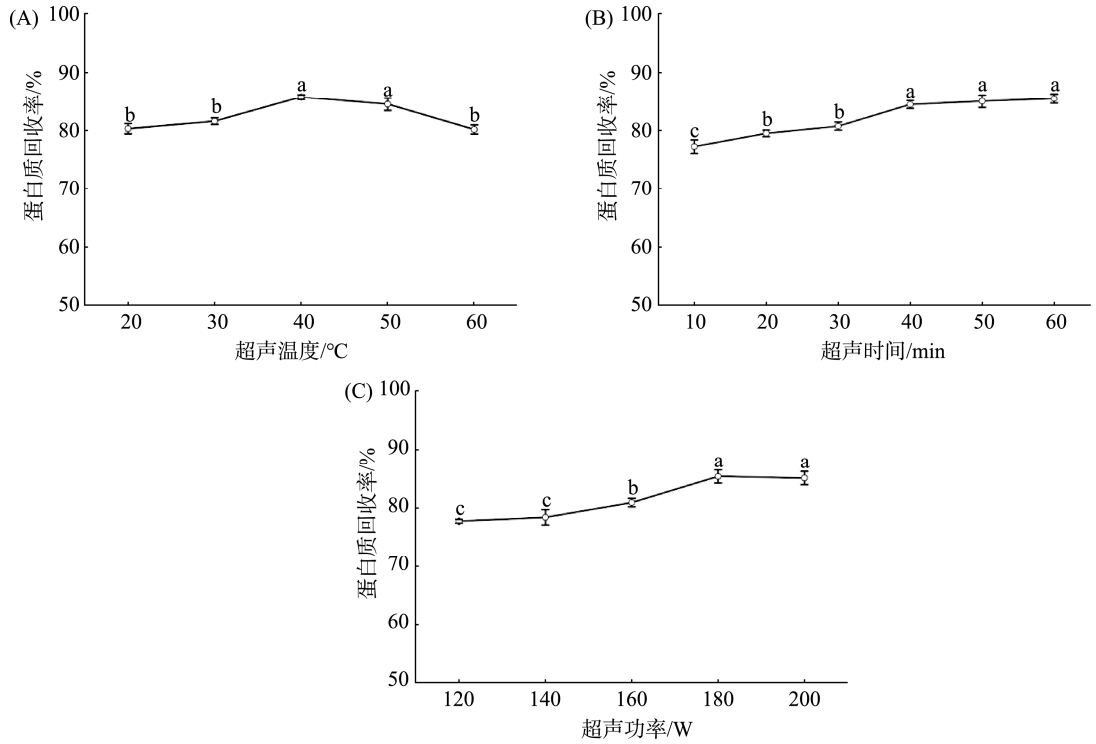


图 4　超声参数对酶法提取带鱼加工副产物中蛋白质效果的影响(n=3)

Fig.4　Effects of ultrasound parameters on protein effects in enzymatic extraction of *Trichiurus lepturus* processing by-products (n=3)

表 4　超声预处理正交试验设计及结果(n=3)

Table 4　Design and results of orthogonal experimental of ultrasonic pretreatment (n=3)

编号	因素			蛋白质回收率/%
	E: 超声温度/℃	*F*: 超声时间/min	*G*: 超声功率/W	
1	1	1	1	78.78
2	1	2	2	83.20
3	1	3	3	81.75
4	2	1	2	81.40
5	2	2	3	84.99
6	2	3	1	81.79
7	3	1	3	80.47
8	3	2	1	80.68
9	3	3	2	85.13
K_1	243.73	240.65	241.24	
K_2	248.18	248.86	249.73	
K_3	246.27	248.67	247.21	
k_1	81.24	80.22	80.41	
k_2	82.73	82.95	83.24	
k_3	82.09	82.89	82.40	
max	82.73	82.95	83.24	
min	81.24	80.22	80.41	
R	1.48	2.74	2.83	
主次顺序	$G>F>E$			
最佳组合	$E_2F_2G_2$			

2.8　蛋白质的氨基酸组成

蛋白质的氨基酸组成如表 5 所示，蛋白质中检测到 19 种氨基酸，其中含量最高的是甘氨酸，占比 13.10%，其次为谷氨酸和丙氨酸，分别占 10.04%和 7.14%，必需氨基酸共 8 种，占比 24.93%，疏水性氨基酸共 8 种，占比 34.04%。研究表明，多肽的抗氧化活性与其含有的疏水性氨基酸密切相关，疏水性氨基酸含量越高，抗氧化作用越强[39]。因此，从氨基酸组成和含量上看，本研究提取的蛋白质可能具备较高抗氧化活性。

表 5　蛋白质的氨基酸组成

Table 5　Amino acid composition of protein

氨基酸种类	相对含量/%	氨基酸种类	相对含量/%
天冬氨酸	6.19	亮氨酸	4.03
苏氨酸	3.07	酪氨酸	1.88
丝氨酸	2.75	苯丙氨酸	2.65
谷氨酸	10.04	赖氨酸	3.44
甘氨酸	13.10	组氨酸	1.12
丙氨酸	7.14	精氨酸	6.55
半胱氨酸	1.06	脯氨酸	6.81
缬氨酸	3.20	羟赖氨酸	0.73
甲硫氨酸	1.90	羟脯氨酸	4.61
异亮氨酸	2.30		

2.9 蛋白质的抗氧化活性

蛋白质的抗氧化活性如图 5 所示。如图 5(A), 随着蛋白质质量浓度的增加, DPPH 自由基清除率呈现先上升后平缓的趋势。当蛋白质的质量浓度为 50 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率达到最大值, 为 85.78%±0.52%。这是因为随着蛋白质的质量浓度升高, 可与自由基反应的活性基团数量增加, 清除效率快速提升; 当质量浓度超过一定 40 mg/mL, 活性位点逐渐饱和, 清除率不再显著增加。如图 5(B), 随着蛋白质质量浓度的增加, ABTS 阳离子自由基清除率呈现先上升后平缓的趋势。当蛋白质的质量浓度为 3.0 mg/mL 时, ABTS 阳离子自由基清除率达到最大值, 为 90.22%±0.49%, 显著高于同浓度下的 DPPH 清除能力, 说明蛋白质对 ABTS 阳离子自由基具有更强的清除效率, 这可能与其表面暴露的极性氨基酸残基有关。如图 5(C), 随着蛋白质质量浓度的增加, 还原能力呈现先上升后平缓的趋势。当蛋白质的质量浓度为 50 mg/mL 时, 还原能力达到最大值, 为(1.21±0.13) mmol/L Fe^{2+}。Fe^{3+}还原能力反映了蛋白质供电子的能力, 与抗氧化活性呈正相关, 说明蛋白质分子中含有丰富的供电子基团, 可有效阻断自由基链式反应。因此, 本研究提取的蛋白质具有良好的抗氧化活性, 且活性表现出明显的浓度依赖性。这可能是由于超声预处理可破坏蛋白质的高级结构, 使胰蛋白酶更易接近酶切位点, 进一步提高活性肽段的释放效率; 胰蛋白酶的特异性酶切作用会产生更多低分子量多肽和疏水性氨基酸, 多肽和疏水性氨基酸能与自由基发生反应, 从而表现出较强的抗氧化性能[40]。

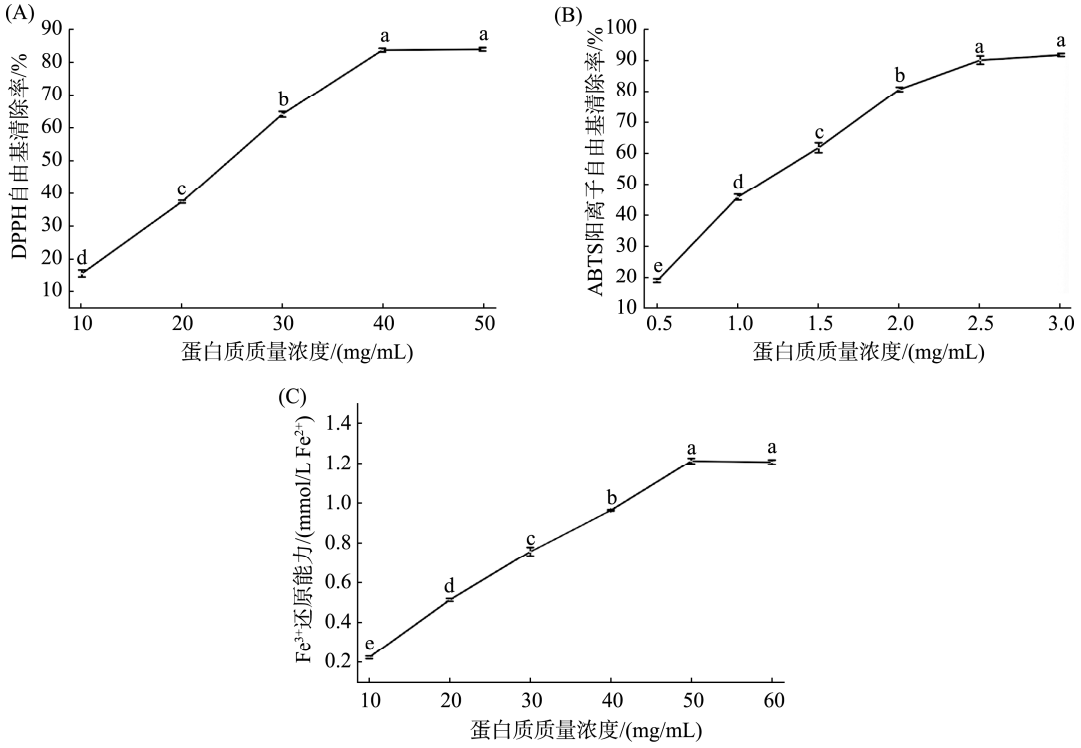


图 5 蛋白质的抗氧化活性(n=3)

Fig.5 Antioxidant activity of protein (n=3)

3 结 论

本研究以带鱼加工副产物为原料, 通过单因素和正交试验优化了胰蛋白酶提取蛋白质的工艺条件并研究蛋白质的基本性质。在此条件下, 对带鱼加工副产物进行酸预处理、碱预处理、热预处理和超声预处理, 并通过单因素和正交试验优化了超声预处理的工艺条件。结果表明: 胰蛋白酶为最适蛋白酶, 温度 55 ℃, 料液比 1:2 (g:mL), 处理时间 1.5 h, 加酶量 0.5%为最佳工艺条件, 蛋白质回收率为 76.05%±0.69%。超声空化效应可破坏细胞结构, 细化蛋白质颗粒, 增大酶与底物的接触面积, 从而强化酶解反应, 提升蛋白质回收率, 最佳超声条件为: 超声功率 180 W, 超声时间 40 min, 超声温度 40 ℃。蛋白质回收率为 85.93%±0.62%。提取的蛋白质具有高蛋白、低脂肪且营养丰富的特点, 氨基酸中含量最高的是甘氨酸, 其次为谷氨酸和丙氨酸。同时, 蛋白质含有丰富的疏水性氨基酸, 这些残基可与自由基发生反应, 赋予蛋白质较强的抗氧化能力。本研究为带鱼加工副产物的蛋白质提取提供了参考, 为后期蛋白质的开发利用奠定了理论基础。

参考文献

[1] 杜萍, 陈全震, 李尚鲁, 等. 东海带鱼资源变动及其栖息地驱动因子研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(1): 126–132.
DU P, CHEN QZ, LI SL, *et al*. Advances in the *Trichiurus lepturus* changes and habitat driving factors in the east China sea [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(1): 126–132.

[2] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.
Bureau of Fisheries and Fisheries Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024.

[3] SHUI SS, YAN HB, TU CH, *et al*. Cold-induced denaturation of muscle proteins in hairtail (*Trichiurus lepturus*) during storage: Physicochemical and label-free based proteomics analyses [J]. Food Chemistry: X, 2022, 16: 100479.

[4] 李文珠, 陈鸿彬, 周芮冰, 等. 带鱼下脚料降血糖肽酶法制备及其稳定性研究[J/OL]. 食品工业科技, 1–16. [2026-03-12]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025070394
LI WZ, CHEN HB, ZHOU RB, *et al*. Preparation and stability of hypoglycemic peptides from hairtail waste [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1–16. [2026-03-12]. https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025070394

[5] 陈佳琪. 带鱼副产物糖蛋白的制备、结构表征及抗疲劳活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2024.
CHEN JQ. Preparation, structural characterization and anti-fatigue activity of glycoprotein from by-products of hairtail [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2024.

[6] 王晓玲, 张芹, 张洪芳, 等. 带鱼蛋白水解肽制备条件优化[J]. 食品工业, 2019, 40(5): 90–93.
WANG XL, ZHANG Q, ZHANG HF, *et al*. Study on the preparation conditions of hairtail hydrolyzed [J]. Food Industry, 2019, 40(5): 90–93.

[7] ZHOU YH, WU W, ZHANG N, *et al*. Deep eutectic solvents as new media for green extraction of food proteins: Opportunity and challenges [J]. Food Research International, 2022, 161: 111842.

[8] JI XM, CUI SX, ZHAO ZJ, *et al*. Enzymatic hydrolysis of chicken bone for protein recovery [J]. Food Bioscience, 2025, 65: 106133.

[9] ZHANG X, LI XZ, LIU SQ. Enzymatic hydrolysis of minced chicken carcasses for protein hydrolysate production [J]. Poultry Science, 2023, 102(8): 102791.

[10] PAP N, MAKINEN S, NURMI M, *et al*. Optimization of protein recovery from Atlantic salmon (*Salmo salar*) head and backbone by response surface methodology and characterization of functional properties and nutritional value [J]. Journal of Food Science and Technology, 2026, 63(4): 703–713.

[11] ALVARADO CG, TOLDRA F, MORA L. Effect of thermal pretreatment and gastrointestinal digestion on the bioactivity of dry-cured ham bone enzymatic hydrolyzates [J]. Food Research International, 2024, 188: 114513.

[12] YANG ZX, SHA XM, WANG H, *et al*. Effect of acid pretreatments with various acid types on gelling properties and identification characteristics of pigskin gelatin [J]. Food Chemistry: X, 2025, 26: 102211.

[13] GUIQIN C, KAYLEE M, LAURA N, *et al*. Valorisation of keratin waste: Controlled pretreatment enhances enzymatic production of antioxidant peptides [J]. Journal of Environmental Management, 2022, 301: 113945.

[14] ZHANG JW, TU ZC, HU ZZ, *et al*. Efficient preparation of oyster hydrolysate with aroma and umami coexistence derived from ultrasonic pretreatment assisted enzymatic hydrolysis [J]. Food Chemistry, 2024, 437: 137881.

[15] CAO SM, WANG Y, XING LJ, *et al*. Structure and physical properties of gelatin from bovine bone collagen influenced by acid pretreatment and pepsin [J]. Food and Bioproducts Processing, 2020, 121: 213–223.

[16] ZHAO R, LU SW, LI SZ, *et al*. Enzymatic preparation and processing properties of DPP-IV inhibitory peptides derived from wheat gluten: Effects of pretreatment methods and protease types [J]. Foods, 2024, 13(2): 216.

[17] REN HW, QIN TZ, ZHOU Q, *et al*. Preparation, purification and identification of antioxidant peptides from the placenta of Tibetan sheep [J]. Food Bioscience, 2025, 63: 105560.

[18] GORGUC A, BIRCAN C, YILMAZ MF. Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds [J]. Food Chemistry, 2019, 283: 637–645.

[19] HAO YJ, XING LH, WANG ZX, *et al*. Study on the anti-inflammatory activity of the porcine bone collagen peptides prepared by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 101: 106697.

[20] SUN CN, LIU YN, LIU SY, *et al*. Identification and molecular mechanism of novel antioxidant peptide from fish sauce: A combined quantum chemistry and molecular simulation [J]. Food Chemistry, 2024, 463: 141108.

[21] SOUSA FC, SANTOS PM, BARBOSA PR, *et al*. Pepsin immobilization on activated carbon and functionalized with glutaraldehyde and genipin for the synthesis of antioxidant peptides of goat casein [J]. Food Research International, 2024, 186: 114161.

[22] ZHENG KW, WU YY, DAI QF, *et al*. Extraction, identification, and molecular mechanisms of α-glucosidase inhibitory peptides from defatted Antarctic krill (*Euphausia superba*) powder hydrolysates [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 266: 131126.

[23] BING SJ, CHEN XS, ZHONG X, *et al*. Structural, functional and antioxidant properties of *Lentinus edodes* protein hydrolysates prepared by five enzymes [J]. Food Chemistry, 2024, 437: 137805.

[24] 代清菲, 郑克炜, 吴园园, 等. 鳘鱼暗色肉黄嘌呤氧化酶抑制肽的制备、性质及活性作用[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(10): 1–11.
DAI QF, ZHENG KW, WU YY, *et al*. Preparation, properties, and activity of xanthine oxidase inhibitory peptides from skipjack tuna dark meat [J]. Food Research and Development, 2025, 46(10): 1–11.

[25] XU Y, YANG Y, MA CM, *et al*. Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates [J]. Food Research International, 2023, 173: 113473.

[26] QUE YX, LIU XR, LIU PY, *et al*. Structural, functional and antioxidant characteristics of enzymatic hydrolysates from *Cantharellus cibarius* protein [J]. Food Chemistry, 2025, 486: 144626.

[27] WANG Y, ZHAO J, WANG XW, *et al*. Innovative insights into the enzymatic hydrolysis of salmon milt: Structural and functional analysis influenced by protease type and enzymolysis time [J]. Food Chemistry,

2025, 463: 141154.

[28] FAN LH, MAO XY, WU QZ. Purification, identification and molecular docking of novel antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates [J]. Molecules, 2022, 27(23): 8423.

[29] BUI TP, PHAM TK, VO LDT. Earthworm (*Perionyx excavatus*) protein hydrolysate: Hypoglycemic activity and its stability for the hydrolysate and its peptide fractions [J]. Processes, 2023, 11(8): 2490.

[30] JIN YT, ZHOU P, ZHU CZ, *et al*. Preparation of antioxidant peptides from chicken bone proteins and the influence of their compositional characteristics on antioxidant activity [J]. Foods, 2024, 13(24): 4171.

[31] SARAH MG, XIAO Z, SAM DA, *et al*. Response surface methodology and optimization of hydrolysis conditions for the *in vitro* calcium-chelating and hypoglycemic activities of casein protein hydrolysates prepared using microbial proteases [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2024, 18(4): 3069–3084.

[32] CHEN BB, XIA Z, YE HD, *et al*. Response surface optimization of selenium-enriched *Moringa oleifera* seed peptides with antioxidant, ACEI and XOI activities [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(2): 1289–1299.

[33] 陶瑾, 张莉方, 徐宁莉, 等. 青稞蛋白降血糖肽的纯化、结构鉴定及体外降血糖和抗氧化活性[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(11): 92–99.
TAO J, ZHANG LF, XU NL, *et al*. Purification and structural identification of hypoglycemic peptide from highland barley protein and hypoglycemic and antioxidant activity *in vitro* [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2023, 38(11): 92–99.

[34] QIAN JY, CHEN D, ZHANG YZ, *et al*. Ultrasound-assisted enzymatic protein hydrolysis in food processing: Mechanism and parameters [J]. Foods, 2023, 12(21): 4027.

[35] WANG Y, ZHANG ZL, HE RH, *et al*. Improvement in enzymolysis efficiency and changes in conformational attributes of corn gluten meal by dual-frequency slit ultrasonication action [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 64: 105038.

[36] 卿纯, 申佳微, 张雅洁, 等. 双孢菇抗氧化肽制备工艺优化[J/OL]. 甘肃农业大学学报, 1–16. [2026-01-28]. DOI: https://link.cnki.net/urlid/62.1055.S.20251119.1043.002
QING C, SHEN JW, ZHANG YJ, *et al*. Optimization of preparation process for antioxidant peptide from *Agaricus bisporus* [J/OL]. Journal of Gansu Agricultural University, 1–16. [2026-01-28]. DOI: https://link.cnki.net/urlid/62.1055.S.20251119.1043.002

[37] NUNEZ SM, BARRERA C, CARDEBES C, *et al*. Effect of ultrasonic pretreatment on enzymatic hydrolysis of proteins from food industry by-products and their functional properties [J]. LWT, 2025, 231: 118374.

[38] 李振威, 马文越, 刘姝, 等. 超声辅助酶法制备南极磷虾降血糖肽的工艺优化及其肽段鉴定[J]. 广东海洋大学学报, 2025, 45(4): 116–126.
LI ZW, MA WY, LIU S, *et al*. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic preparation of hypoglycemic peptides from Antarctic krill and peptide identification [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2025, 45(4): 116–126.

[39] QUAN ZZ, WANG ZH, WANG ZX, *et al*. Study on the antioxidant and antiosteoporotic activities of the oyster peptides prepared by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2025, 112: 107211.

[40] 刘鑫源, 徐睿绮, 张蕊, 等. 白扁豆多肽制备工艺优化及其功能特性研究 [J/OL]. 食品工业科技, 1–21. [2026-01-28]. DOI: https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025090238
LIU XY, XU RQ, ZHANG R, *et al*. Optimization of enzymatic hydrolysis technology, and functional properties of white lentils peptides [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1–21. [2026-01-28]. DOI: https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025090238

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)