

Chemical composition and major volatile compounds of the hydrolyzed product from *Kappaphycus alvarezii* by-products using flavourzyme

Nguyen Phuong Anh*, Pham Xuan Ky, Dao Viet Ha, Nguyen Thu Hong, Le Ho Khanh Hy, Doan Thi Thiet, Phan Bao Vy

Institute of Oceanography, VAST, Vietnam

*Email: phuonganh.46cntp@gmail.com

Received: 30 July 2019; Accepted: 6 October 2019

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

The chemical composition of flavourzyme hydrolysis product from *Kappaphycus alvarezii* by-products was analyzed. The results showed that the protein hydrolysate powder had high content of proteins (21.66 %) and low content of lipids (0.22 %). Hydrolyzed products contained about 15 free amino acids with relatively high content of some amino acids such as aspartic acid (1879 mg/100g), glutamic acid (1813 mg/100g), glycine (1121 mg/100g), tyrosine (1203 mg/100g)) and serine (3165 mg/100g). In addition, main volatile flavor compounds such as acetophenone; nonanal; indole; 2,4-di-tert-butylphenol; heptadecane; 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one have also been discovered. As a result, the by-products of *K. alvarezii* take a potential role in the food industry.

Keywords: *Kappaphycus alvarezii*, flavourzyme, by-products, hydrolysis.

Thành phần hóa học và các chất bay hơi chủ yếu của sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm rong sụn *Kappaphycus alvarezii* bằng flavourzyme

Nguyễn Phương Anh*, Phạm Xuân Kỳ, Đào Việt Hà, Nguyễn Thu Hồng, Lê Hồ Khánh Hỷ, Đoàn Thị Thiết, Phan Bảo Vy

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*Email: phuonganh.46cntp@gmail.com

Nhận bài: 30-7-2019; Chấp nhận đăng: 6-10-2019

Tóm tắt

Thành phần hóa học của sản phẩm thủy phân bằng flavourzyme từ phụ phẩm rong sụn *Kappaphycus alvarezii* được phân tích. Kết quả nghiên cứu cho thấy sản phẩm này có hàm lượng protein cao (21,66%), hàm lượng lipid thấp (0,22%). Trong sản phẩm thủy phân chứa khoảng 15 axit amin tự do với hàm lượng khá cao một số axit amin như axit aspartic (1879 mg/100g), axit glutamic (1813 mg/100 g), glycine (1121 mg/100 g), tyrosine (1203 mg/100g) và serine (3165 mg/100g). Ngoài ra, các hợp chất hương vị dễ bay hơi chủ yếu như acetophenone; nonanal; indole; 2,4-Di-tert-butylphenol; heptadecane; 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one cũng đã được phát hiện. Kết quả bước đầu cho thấy tiềm năng sử dụng của phụ phẩm của *K. alvarezii* trong ngành công nghiệp thực phẩm.

Từ khóa: *Kappaphycus alvarezii*, flavourzyme, phụ phẩm, thủy phân.

GIỚI THIỆU

Nguồn phế phẩm thủy sản có thể chứa các hợp chất có giá trị như các axit amin và peptide chuỗi ngắn có hương vị hấp dẫn [1–3]. Ví dụ như, axit glutamic và axit giàu peptide oligo gultamic từ protein thủy phân tạo ra hương vị umami. Ngoài ra, các axit amin và peptide từ protein thực vật thủy phân là tiền chất trong một loạt các phản ứng Maillard tạo ra các hương vị dễ bay hơi [1]. Hiện nay, các sản phẩm protein thủy phân từ phụ phẩm động vật thủy sản như cá, tôm, nghêu, cua,... được sử dụng rộng rãi để sản xuất hương liệu thủy sản [4]. Tuy nhiên, việc kiểm soát chất lượng các hương liệu từ protein động vật thường phức tạp bởi sự cần thiết phải loại bỏ chất béo của sản phẩm để giảm thiểu quá trình oxy hóa lipid [5]. Do đó, nguồn protein từ phế phẩm rong biển sau khi sử dụng để sản xuất agar có chứa các

axit amin như axit aspartic, axit glutamic, arginine và lysine gây hương vị và hàm lượng thấp chất béo được xem là nguồn hương liệu lý tưởng. Việc dùng enzyme thủy phân chọn lọc có kiểm soát điều kiện là một cách hiệu quả để làm giàu hợp chất dễ bay hơi, cải thiện các đặc tính hóa lý và chất lượng cảm quan của protein thực vật. Nó tạo ra các peptide mong muốn và axit amin có ít muối và các hợp chất gây ung thư [6]. Thành phần hợp chất sau thủy phân bằng enzyme có chứa các axit amin và peptide trọng lượng phân tử thấp với đặc tính hương vị độc đáo, ví dụ ngọt, mặn, chua, đắng, và vị umami [7].

Trên thế giới cũng đã có nhiều nghiên cứu về thành phần các chất dễ bay hơi tạo hương ở rong biển và các sản phẩm từ rong biển. Sugisawa et al., [8] đã khảo sát thành phần các hợp chất thơm dễ bay hơi đặc trưng được phân

lập từ *Ulva pertusa* tươi trong đó, 7-Heptadecene, Hexanal, (E)-2-octenal, (E)-2-nonenal, (Z,E)-2, 6-nonadienal, (E,E)-2,4-decadienal, (Z,Z)-8,11-heptadecadienal, (Z,Z,Z)-8,11,14-heptadeca-trienal và (Z)-8-heptadecenal là các hợp chất quan trọng tạo mùi đặc trưng của tảo lục *Ulva*. Nghiên cứu của Yamamoto et al., [9] cũng chỉ ra apocarotenoid chuỗi ngắn, dễ bay hơi là một trong những thành phần hương vị có tiềm năng nhất và góp phần tạo ra hương vị tảo và các sản phẩm từ tảo. Qi et al., [10] cho biết các protein thủy phân từ phụ phẩm của *Undaria pinnatifida* bằng flavourzyme sau khi khai thác polysaccharide có hương vị umami và mùi rong biển và chứa 18 hợp chất dễ bay hơi, trong đó hexanal, cedrol, nonanal, 2-heptenal, acetoin và heptanal là các chất chính. Một nghiên cứu của Izzreen et al., [11] ở loài *K. alvarezii* xác định được 82 các chất dễ bay hơi, bao gồm các hợp chất hóa học của hydrocarbon, aldehyde, xeton, este, rượu, các hợp chất halogen, hợp chất axit, hợp chất thơm và một số hợp chất khác. Vì vậy, phụ phẩm từ công nghiệp sản xuất carrageenan từ *K. alvarezii* có thể là nguồn nguyên liệu để sản xuất hương liệu thủy sản tự nhiên.

Rong sụn *Kappaphycus alvarezii* là một loài rong biển nhiệt đới, sinh trưởng và có nguồn gốc tự nhiên ở vùng biển Châu Á Thái Bình Dương, được di trồng vào Việt Nam từ những năm 1993. Đây là loài rong biển có giá trị kinh tế cao, là nguyên liệu cho công nghiệp chế biến carrageenan và có thể chế biến thành các dạng thực phẩm sử dụng trực tiếp từ rong tươi hay đã phơi khô. Hàng năm một lượng lớn bã rong được thải ra nhưng ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học của nguồn phế phẩm này. Để cung cấp dữ liệu làm cơ sở sử dụng nguồn phụ phẩm này, chúng tôi phân tích thành phần các chất tạo hương vị của sản phẩm thủy phân bằng flavourzyme từ phụ phẩm rong sụn *K. alvarezii*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Bã thải rong sụn *K. alvarezii* sau sản xuất carrageenan được thu nhận từ cơ sở sản xuất carrageenan của Công ty rau câu Sơn Hải, xã

Lợi Hải, huyện Thuận Bắc, tỉnh Ninh Thuận. Bã rong được vận chuyển lạnh về phòng Hóa sinh biển- Viện Hải dương học.

Flavourzyme (EC 232.752.2) được sản xuất bởi Novozymes, là protease có nguồn gốc từ *Aspergillus oryzae*, với hoạt độ 500 LAPU/g được sử dụng trong các thí nghiệm thủy phân. Điều kiện hoạt động tối ưu của Flavourzyme là nhiệt độ khoảng 50- 55°C, pH = 5,0 -7,0.

Phương pháp nghiên cứu

Thủy phân bã rong

Quy trình thủy phân mẫu được tiến hành theo Qi et al., [10], tóm tắt như sau: 100g bã rong được bổ sung thêm 100 ml nước, điều chỉnh pH 6,8 bằng 1N HCl. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 55°C trong 10 phút, sau đó cho flavourzyme theo tỷ lệ 0,7% theo khối lượng cơ chất, khuấy đều, đậy nắp kín, tiếp tục giữ ở 55°C trong 18 h. Tiếp theo, mẫu được đun ở nhiệt độ 100°C trong 15 phút để làm enzyme bất hoạt, để nguội ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp được lọc bằng vải lọc để loại bỏ cặn và ly tâm với tốc độ 15.000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 4°C nhằm thu nhận dịch chiết. Dịch chiết được đông khô dùng cho phân tích tiếp theo. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần (n = 3).

Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng lipid

Lipid được tách chiết theo phương pháp của Bligh and Dyer [12] với một sự thay đổi nhỏ. Lấy 3 g mẫu rong sau khi làm nguội được ngâm trong 30ml hỗn hợp dung môi chloroform - methanol - H₂O (Merck, P.A) theo tỷ lệ 1:2:0,4 trong 24 giờ. Mẫu được chiết lại với hỗn hợp dung môi trên 2 lần. Dịch chiết sau khi thu được lắc với chloroform (Merck, P.A) và một thể tích nước để có tỷ lệ chloroform - methanol - H₂O cuối cùng 1:1:0,5, để phân lớp và thu lớp chloroform. Mẫu được cô trên máy cô quay chân không (Laborota 4000, Heidolph, Đức) ở nhiệt độ 40 – 45 °C.

Định lượng protein

Bằng phương pháp dùng bicinchoninic acid (BCA) (Smith et al., [13]): Cân 50mg mẫu phụ phẩm rong chiết trong dung dịch đệm (ure buffer) có chứa 2- Mercaptoethanol 2%. Trộn thuốc thử A (BCA reagent A) và thuốc thử B (BCA reagent B) với tỷ lệ A:B = 50:1 (v:v). Cho hỗn hợp này vào các giếng trên một đĩa

microplate 96 giếng (100µl/giếng). Sau đó thêm 5 µl protein chuẩn Bovine serum albumin (Wako) ở các nồng độ 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1(mg/ml) vào mỗi giếng (cứ 1 nồng độ cho vào 3 giếng). Những giếng còn lại thêm mẫu cần đo protein đã pha loãng 100 lần với nước cất (5µl/giếng, cho vào 3 giếng). Lắc trộn đều mẫu trong các giếng và ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 562 nm. Hàm lượng protein trong mẫu được tính toán dựa theo phương trình tương quan được thiết lập giữa hàm lượng protein chuẩn và độ hấp phụ.

Thành phần axit amin

Được xác định theo Kechaou et al, [14]: 10mg mẫu được thủy phân bằng 200 µl HCl 6N trong 18h. Thêm 0,2mL đệm ammonium acetate pH 7 và 0,2 mL trifluoroacetylacetone (2% v/v trong methanol) vào 0,2mL dịch chứa hỗn hợp axit amin. Hỗn hợp được đựng trong bếp cách thủy ở 95°C, 25 phút. Để nguội và thêm 0,2 mL hỗn hợp dung môi (acetonitrile-nước-methanol-pyridine 42:42:8:8 v/v). Sau đó thêm 0,2 mL ethyl chloroformate và 0,2 mL đệm carbonate pH 9. Hỗn hợp được đánh siêu âm ở nhiệt độ 30°C, 15 phút. Thêm 1mL chloroform vào hỗn hợp và lắc đều, để tách lớp và thu hồi lớp chloroform được dùng để phân tích các axit amin bằng hệ thống sắc ký khí (GC, 2010, Shimadzu, Nhật Bản). Thể tích mẫu tiêm 1 µL. Chương trình cài đặt nhiệt độ như sau: từ 110°C tăng lên 320°C (32°C/phút, giữ trong 3 phút). Khí mang sử dụng là heli. Các axit amin được xác định dựa trên thời gian lưu so với 20 axit amin chuẩn.

Tách chiết và xác định thành phần hợp chất bay hơi

Tạo hương được thực hiện theo Mamede và Pastore [15]. Thành phần hợp chất bay hơi được phân tích trên hệ thống sắc ký khí ghép nối khối phổ (Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole MS), sử dụng bộ chiết vi rắn

SPME 60 µm PDM/DVB và cột mao quản DB - 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Chế độ ion hóa (EI) ở 70 eV, khoảng phổ (m/z) từ 40-550, nhiệt độ 250°C, thể tích mẫu tiêm 10 µL. Mẫu được ủ ở nhiệt độ 60°C và thời gian là 30 phút, tốc độ dòng 1 ml/phút, các hợp chất được xác định trên cơ sở so sánh, đối chiếu với thư viện phổ các chất (Replib, Wiley 2011, Nistdemo, Mainlib) được cung cấp cùng với hệ máy.

Hiệu suất thủy phân protein được xác định theo công thức của Rao et al., (2000) [16]:

$$\text{Hiệu suất} = [(Po \times O) - (Pr \times R)] \times 100 / (Po \times O)$$

Trong đó: *Po*, *Pr*: Hàm lượng protein trong phụ phẩm ban đầu và sau khi thủy phân bằng enzyme; *O*, *R*: Khối lượng tương ứng của mẫu trước và sau khi thủy phân.

Xử lý số liệu

Hiệu suất thủy phân protein, hàm lượng protein, lipid được tính toán bằng Excel, thể hiện bằng giá trị trung bình ± SE.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thành phần hóa học cơ bản của phụ phẩm rong sụn *K. alvarezii* và sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm rong sụn

Thành phần hóa học cơ bản của phụ phẩm rong sụn *K. alvarezii* và sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm rong sụn được trình bày trong bảng 1.

Phụ phẩm rong sụn chứa 4,83 % protein, 0,36 % lipid. Hàm lượng protein của sản phẩm thủy phân 21,66 % và hàm lượng lipid 0,22 %. Hàm lượng lipid thấp rất thuận lợi cho quá trình thủy phân và không ảnh hưởng đến chất lượng đậm thu nhận.

Kết quả tính toán cho thấy hiệu suất thủy phân protein phụ phẩm rong sụn bằng flavourzyme là 76,02 ± 0,93 %.

Bảng 1. Thành phần hóa học cơ bản của phụ phẩm rong sụn và sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm rong sụn

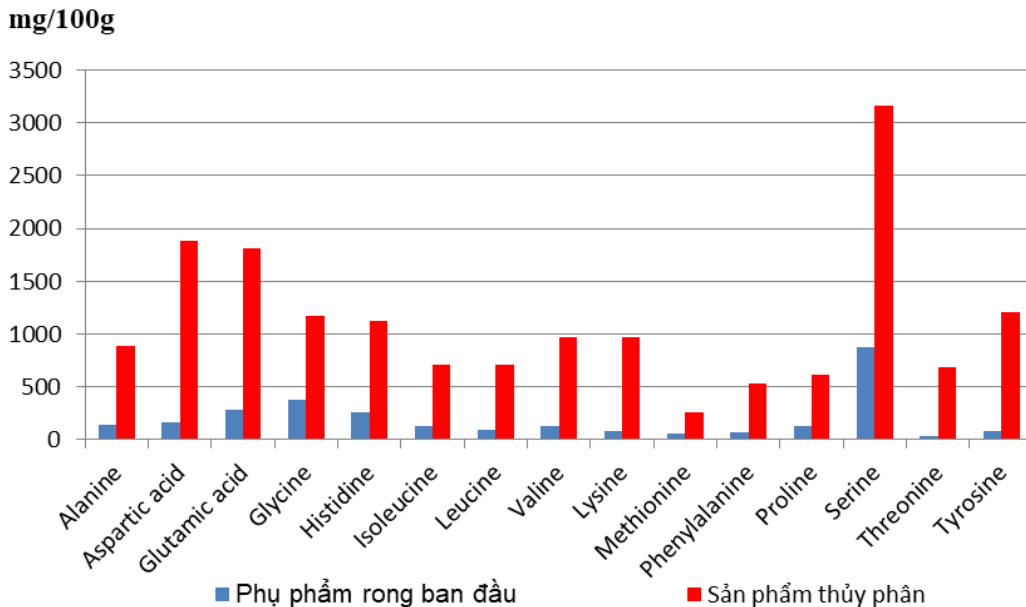
Thành phần hóa học cơ bản	Phụ phẩm rong (% khối lượng)	Sản phẩm thủy phân (% khối lượng)
Nước	84,02 ± 0,31	
Protein	4,83 ± 0,06	21,66 ± 0,03
Lipid	0,36 ± 0,03	0,22 ± 0,02

Thành phần và hàm lượng axit amin của phụ phẩm rong sụn *K. alvarezii* và sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm rong sụn

Thành phần và hàm lượng axit amin của phụ phẩm rong được trình bày ở hình 1.

Kết quả phân tích cho thấy phụ phẩm rong sụn có 15 loại axit amin, trong đó hàm lượng axit amin tổng số là 2842 mg/100 g, tổng axit

amin thiết yếu là 1996 mg/100 g. Các axit amin có hàm lượng cao trong bã rong gồm serine 877 mg/100 g, glycine 377 mg/100 g, glutamic acid 277 mg/100 g và histidine 256 mg/100 g. Các axit amin có hàm lượng thấp hơn là threonine 34 mg/100 g, methionine 59 mg/100g và tyrosine 77 mg/100 g.



Hình 1. Thành phần và hàm lượng axit amin trong phụ phẩm rong và trong sản phẩm thủy phân

Trong khi đó, sản phẩm thủy phân chứa 15 loại axit amin với hàm lượng axit amin tổng số là 16671 mg/100 g, trong đó tổng axit amin thiết yếu là 10772 mg/100 g chiếm tỉ lệ 64,6% tổng lượng axit amin. Hàm lượng tổng các axit amin gây vị đắng bao gồm histidine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, glycine, proline là 6074 mg/100 g. Hàm lượng tổng axit aspartic và axit glutamic gây vị umami là 3692 mg/100g và hàm lượng tổng threonine, serine, arginine, alanine gây vị ngọt là 4734 mg/100g. Kết quả này cho thấy sản phẩm thủy phân bằng flavourzyme chứa hàm lượng cao của một số chất tạo hương vị. Theo Qi et al., [10] các mùi chính của sản phẩm thủy phân từ bã rong *Undaria pinnatifida* có đặc tính mùi của táo, xanh, ngọt, mỡ và nhựa. Nó chứa 5 axit amin tự do với hàm lượng cao như alanine (5080 mg/100g), axit glutamic (3950 mg/100 g), axit aspartic (3900 mg/100 g),

proline (2240 mg/100 g) và glycin (2110 mg/100 g). Kato et al., [2] cho rằng các axit amin tự do và peptit tự do đóng vai trò rất quan trọng tạo nên vị giác, đóng vai trò quan trọng tạo nên hương vị đặc trưng của thực phẩm.

Trong khảo sát của chúng tôi, sản phẩm thủy phân có hàm lượng các axit amin khá cao, cao gấp 6 đến 7 lần so với các axit amin cùng loại trong sản phẩm phụ phẩm rong ban đầu. Sản phẩm thủy phân protein từ phụ phẩm cá tuyết đỏ bằng flavourzyme cũng chứa hàm lượng cao các axit amin tự do, trong đó glutamin đã tăng 6-9 lần so với phụ phẩm ban đầu [5].

Từ các kết quả trên cho thấy hàm lượng cao các chất tạo mùi vị trong sản phẩm thủy phân và nó có tiềm năng để sử dụng làm chất bổ sung hương vị cho các thực phẩm để tạo hương vị khác nhau.

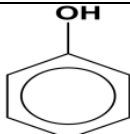
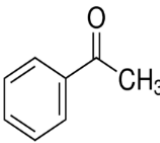

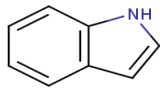
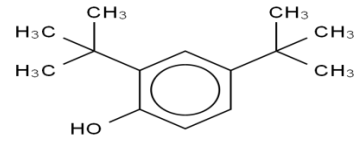

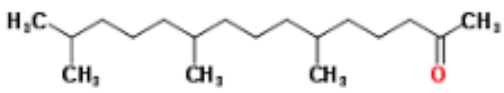
Thành phần các chất bay hơi tạo hương trong sản phẩm thủy phân

Thành phần các chất bay hơi tạo hương trong sản phẩm thủy phân được trình bày trong bảng 2.

Các hợp chất tạo hương dễ bay hơi trong sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm rong sụn *K. alvarezii* bằng flavourzyme được xác định bao gồm nonanal; acetophenone; heptadecane; indole; 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one; phenol; 2,4-di-tert-butylphenol. Trong đó, nonanal, heptadecane kết hợp với hương vị cam quýt, mùi béo mang hương vị của cua biển [17]. Acetophenone tạo nên mùi của hoa hạnh

nhân. 2-pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl giống như mùi khói, indole của băng phiến, mùi cháy. Theo nghiên cứu của Qi et al., [10] các protein thủy phân từ phụ phẩm của *U. pinnatifida* bằng flavourzyme sau khi khai thác polysaccharide có chứa 18 hợp chất dễ bay hơi, trong đó hexanal, cedrol, nonanal, 2-heptenal, acetoin và heptanal là các chất chính. Các hợp chất dễ bay hơi này thể hiện mùi của rong biển, mùi của lá, hoa, chất béo và mùi cam quýt, kết hợp với thành phần axit amin của nó thể hiện đặc tính hương vị của nó biểu thị bằng mùi của táo biển sau đó là mùi tôm, cua, vị ngọt và vị umami.

Bảng 2. Thành phần các chất bay hơi chính trong sản phẩm thủy phân từ phụ phẩm rong sụn *K. alvarezii* bằng flavourzyme

STT	Thời gian lưu (phút)	Tên hợp chất	Công thức phân tử
1	10,50	Phenol	
2	12,82	Acetophenone	
3	13,76	Nonanal	
4	17,01	Indole	
5	19,95	2,4-Di-tert-butylphenol	
6	22,27	Heptadecane	
7	23,77	6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one	

Kết quả nghiên cứu này cho thấy cùng với một số loài rong khác, phụ phẩm rong sụn *K.*

alvarezii có tiềm năng để khai thác các chất tạo hương vị ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm.

Tóm lại, sản phẩm thủy phân bằng flavourzyme từ phụ phẩm rong sụn chứa một số acid amin tạo vị và hợp chất bay hơi tạo hương có tiềm năng sử dụng trong ngành thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Sonklin, C., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen O., 2011. Physicochemical and flavor characteristics of flavoring agent from mungbean protein hydrolyzed by bromelain. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 59(15), 8475-8483.
- [2] Silva, V.M, Park, K.J., Hubinger, A.D., 2010. Optimization of the enzymatic hydrolysis of Mussel Meat. *Journal of Food Science*, 75(1), 36-42.
- [3] Jiang, H.J., Kim, M.C., Jung, E.J., Shin, E.C., Lee, S.J., Kim, S.B., Lee, Y.B., 2005. Optimization and flavor quality of enzymatic hydrolysate from dark muscle of skipjack. *Preventive Nutrition & Food Science*, 10(1), 11-16.
- [4] Laohakunjit, N., Selamassakul, O., Kerdchoechuen, O., 2014. Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.). *Food Chemistry*, 158(8), 162-170.
- [5] Imm, J.Y.; Lee, C.M., 1999. Production of seafood flavor from Red Hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2360-2366.
- [6] Weir, G.S.D., 1992. Proteins as a source of flavor. *Biochemistry of food proteins*: 363-395.
- [7] Su, G., Cui, C., Zheng, L., Yang, B., Ren, J., Zhao, M., 2012. Isolation and identification of two novel umami and umami-enhancing peptides from peanut hydrolysate by consecutive chromatography and MALD-TOF/TOF MS. *Food Chemistry* 135(2): 479-485.
- [8] Sugisawa, H., Nakamura, K., and Tamura, H., 1990. The aroma profile of the volatiles in marine green algae (*Ulva pertusa*). *Food Reviews International* 6(4): 573-589.
- [9] Yamamoto, M., Baldermann, S., Yoshikawa, K., Fujita, A., Mase, N., and Watanabe, N., 2014. Determination of volatile compounds in four commercial samples of Japanese green algae using solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry. *The Scientific World Journal* : 1-8.
- [10] Hang Qi, Zhe Xu, Yu-bo Li, Xiao-lin Ji, Xiu-fang Dong and Chen-xu Yu, 2016. Seafood flavorings characterization as prepared from the enzymatic hydrolysis of *Undaria pinnatifida* sporophyll by product. *International Journal of Food Properties*, DOI: 10.1080/10942912.2016.1256302.
- [11] Izzreen, N.Q.M.N. and Ratnam, V.R., 2011. Volatile compound extraction using solid phase micro extraction coupled with gas chromatography mass spectrometry (SPMEGCMS) in local seaweeds of *Kappaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystem*. *Journal of Food Research* 18 (4):1449-1456.
- [12] Bligh, E. G., and Dyer, W. J., 1959. A rapid methods of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- [13] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.
- [14] Kechaou, E.S., J., Dumay, C., Donnay Moreno, P., Jaouen, J.P., Gougou, J.P., Bergé and R.B., Amar. 2009. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pichardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(2), 158-164.

- [15] Maria, E.O., Mamede, Glaucia, M., Pastore, 2006. Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must. *Food Chemistry*, 96, 586–590.
- [16] Rao, M. S., Munoz, J., & Stevens, W. F., 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp bio waste. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 808-813.
- [17] Yu, H. Z., Chen, S. S., 2010. Identification of characteristic aroma-active compounds in steamed mangrove crab (*Scylla serrata*). *Food Research International*, 43(8): 2081-2086.