

红曲鲈鱼中原生乳酸菌菌株筛选及发酵工艺优化

Screening of autochthonous lactic acid bacteria and optimization of fermentation process in low-salt Zhayu of red rice

徐冬美^{1,2} 刘永乐^{1,2} 李向红^{1,2}

XU Dongmei^{1,2} LIU Yongle^{1,2} LI Xianghong^{1,2}

王发祥^{1,2} 黄轶群^{1,2} 马夏吟^{1,2}

WANG Faxiang^{1,2} HUANG Yiqun^{1,2} MA Xiayin^{1,2}

(1. 长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114;

2. 湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心, 湖南 长沙 410114)

(1. College of Food and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China; 2. Hunan Provincial Engineering Technology Research Center of Aquatic Food Resources Processing, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:目的:解决传统自然发酵鲈鱼发酵工艺不确定、发酵周期长、品质不稳定等问题。方法:从低盐红曲鲈鱼中分离出乳酸菌,考察菌株的抑菌能力、耐盐能力及产酸能力,筛选出适合发酵的乳酸菌,对红曲鲈鱼进行接菌强化发酵,并对发酵工艺中红曲米粉添加量、腌制时食盐添加量及发酵温度进行优化。结果:共分离出 22 株对大肠杆菌或金黄色葡萄球菌具有抑制作用的片球菌,其中戊糖片球菌 P-56 对大肠杆菌的抑菌效果最好,且对胆盐及酸具有较高的耐受能力;经过接菌发酵及工艺优化,发酵 4 d,鲈鱼 pH 值下降至 4.42, TCA-可溶性肽含量为 434.99 $\mu\text{mol/g}$,感官评分为 45.7。结论:乳酸菌发酵红曲鲈鱼的最佳工艺条件为:腌制盐添加量 4%,红曲米粉添加量 4%,发酵温度 32 $^{\circ}\text{C}$ 。

关键词:低盐发酵;红曲鲈鱼;乳酸菌;风味品质

Abstract: Objective: To solve the problems of an uncertain fermentation process, a long fermentation period, and the unstable quality of traditional naturally fermented preserved fish.

Methods: The lactic acid bacteria were isolated from low-salt preserved red fish, and the inhibition ability, salt tolerance, and acid production ability of the strains were investigated. The lactic acid bacteria suitable for fermentation were screened out, and the

fermentation of preserved red fish was intensified by inoculation. The amount of red rice flour added, the amount of salt added during curing, and the fermentation temperature were optimized in the fermentation process. **Results:** There were 22 strains of *Pediococcus* with inhibitory effect on *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* were isolated, among which *Pediococcus pentosaceus* P-56 had the best inhibitory effect on *Escherichia coli* and higher tolerance to bile salt and acid; After inoculation fermentation and process optimization. The pH value of the Zhayu decreased to 4.42 at 4 days of fermentation, the TCA-soluble peptide content was 434.99 $\mu\text{mol/g}$ and the sensory score reached 45.7. **Conclusion:** The optimal process conditions for the fermentation of preserved red fish with lactic acid bacteria were: 4% salt addition for curing, 4% red yeast rice flour addition and fermentation temperature of 32 $^{\circ}\text{C}$.

Keywords: low-salt fermentation; Zhayu with red currant; lactic acid bacteria; flavour quality

鲈鱼是湖南当地的一种传统发酵鱼制品,将预处理的鲈鱼切块后经食盐腌制脱水入味,自然晾晒,然后裹上适量的米粉、辣椒、生姜等进行固态自然发酵,形成的一种醇香浓郁、易于消化的发酵鱼制品^[1-2]。经过微生物的发酵,鱼肉蛋白质分解为多肽及氨基酸,产品的消化性及营养价值均得到提高^[3-4]。传统鲈鱼属于高盐发酵鱼制品,食盐添加量达 15%~20%^[5]。食盐的加入可以提高渗透压,从而抑制相关腐败微生物的增长,但过高的盐分会降低发酵鱼制品中微生物的多样性^[6],降低鱼肉的

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31972106);湖南省重点研发计划项目(编号:2022NK2032)

作者简介:徐冬美,女,长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者:马夏吟(1991—),女,长沙理工大学讲师,博士。

E-mail: maxiaoyin@csust.edu.cn

收稿日期:2023-01-17 **改回日期:**2023-05-08

水分含量,导致鱼块质地过硬,同时食盐摄入过多会引发高血压、冠心病等疾病^[7-10]。世界卫生组织推荐的食盐摄入量上限为 5 g/d^[11],所以发酵食品逐步向低盐化发展^[10]。

低盐发酵鱼制品中食盐添加量一般为 2%~4%,低盐发酵时鱼肉的风味口感更容易达到最佳^[12-13],同时长期减盐还可以降血压,减少患心脑血管等疾病的风险^[14-15]。传统的低盐发酵鲑鱼制作工艺简单,发酵环境及工艺配方存在不确定性,导致鲑鱼中的菌群组成难以控制,产品质量存在较大的差异性和随机性^[16]。乳酸菌作为多种发酵鱼制品中的优势菌株,在发酵过程中能够将碳水化合物转化为乳酸等有机酸,改善发酵鱼制品的口感和风味^[17]。此外,乳酸菌能够产生多种抑菌物质,如乳酸、乙酸及细菌素等,抑制发酵鱼制品中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等腐败菌的生长^[18]。因此将低盐与乳酸菌强化发酵相结合是当前发酵鱼制品实现工业化的一个趋势^[9]。

为了提升鲑鱼品质,An 等^[19]利用 3 种乳酸菌(植物杆菌、乳酸片球菌和戊糖片球菌)发酵鲑鱼,发现添加乳酸菌可以有效提高产品营养价值,赋予产品独特的风味。发酵食品中的原生微生物能够更好地适应自身的发酵环境,更有效地与原生环境中的腐败菌进行竞争^[20-23],因此从发酵产品自身分离原生菌株作为发酵剂可以加速产品发酵并提升发酵制品品质,包括增强风味和提高安全性等^[24-25]。

目前关于鲑鱼发酵工艺优化的研究主要集中在米粉和食盐的添加量、发酵温度、发酵时间及菌株接种量等方面^[2,26-28],而关于湖南本地特色鲑鱼——红曲鲑鱼的相关研究尚未见报道。红曲米粉是由红曲霉发酵的大米^[29],是中国传统药食两用品,含有由红曲霉发酵产生的纯天然色素红曲色素^[30-31]、麦角固醇、不饱和脂肪酸、B 族维生素及具有降低胆固醇功能的莫纳可林^[32],还具有防腐、抑菌等作用^[33-34],主要被应用于肉制品^[35-36]和饼干制品^[30,37]中。因此将红曲米粉添加到发酵鱼产品中,不仅可以促进原生发酵菌株的生长,还能够赋予产品良好的色泽和独特的风味,同时提高产品的营养保健功能^[38-40]。

研究拟从低盐发酵的红曲鲑鱼中筛选发酵性能良好的原生乳酸菌菌株,并考察菌株在红曲鲑鱼发酵环境中的生长、产酸及耐受能力。进一步利用其进行红曲鲑鱼的接菌强化发酵,并对发酵工艺中红曲米粉添加量、腌制时食盐添加量及发酵温度进行优化,旨在分离筛选出适合鱼肉发酵的乳酸菌菌株,为发酵鲑鱼的工业化生产和鱼肉发酵剂的研究开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

草鱼、大米:市售;

食盐:湖南省湘澧盐化有限责任公司;

红曲米粉:江苏味品惠食品有限公司;

MRS 琼脂、肉汤培养基:广东环凯生物科技有限公司;

大肠杆菌 MG 1655、金黄色葡萄球菌 ATCC 43300:实验室保藏菌株;

快速纯化细菌基因组提取试剂盒、DNA 聚合酶和 Gelred 染液:诺唯赞(南京)股份有限公司;

氯化钠等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

牛津杯:M360960 型,上海三磨实业有限公司;

pH 计:ST 5000/B 型,奥豪斯国际贸易(上海)有限公司;

压力蒸汽灭菌筒:DT04-13-44 型,上海东亚压力容器制造有限公司;

双光束紫外可见分光光度计:TU-1901 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

恒温恒湿箱:LHS-250SC 型,上海一恒有限公司;

低温高速离心机:5430R 型,北京海天友诚科技有限公司;

PCR 仪:DYY-2C 型,北京六一生物科技有限公司;

双稳定时电泳仪:DYY-2C 型,北京六一生物科技有限公司;

凝胶成像分析仪:WD-9413C 型,北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 碳酸钙平板法筛选乳酸菌 取 5 g 发酵鲑鱼样品于无菌袋中,加入 5 mL 无菌生理盐水,捣碎混匀,加入 40 mL 无菌生理盐水混匀。吸取 1 mL 悬浊液至 9 mL 灭菌生理盐水中,震荡混匀,梯度稀释,从 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 3 个稀释度中分别取 100 μ L 稀释液涂布于含 1% CaCO_3 的 MRS 固体培养基平板上,每个梯度 2 个平行,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 48 h。挑选有溶钙圈的菌落并编号,-80 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏备用。

1.2.2 乳酸菌抑菌能力测定 采用牛津杯法^[41]。

1.2.3 菌株分子生物学鉴定 根据快速纯化细菌基因组 DNA 试剂盒对分离菌株的 DNA 进行提取,并进行 PCR 扩增,上游引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物为 1492R: 5'-TA'CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送往生工生物工程公司进行

测序。将菌株序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性分析和比对,运用 MEGA7.0 软件构建系统发育树,判定目的菌株分类地位。

1.2.4 乳酸菌耐受特性测定

(1) 耐盐能力:按 1% 的接种量于盐添加量分别为 0%,4%,6%,8% 的 MRS 液体培养基中接种活化后待测菌,混匀,测定接种 0,6,12 h 时菌液吸光度 $OD_{600\text{ nm}}$ 。

(2) 产酸能力:按 1% 的接种量于 MRS 液体培养基中接种活化后的待测菌,混匀。测定接种 0,4,8,12 h 时菌液 pH 值。筛选出耐盐能力和产酸能力最强的菌株进行后续乳酸菌耐酸和耐胆盐试验。

(3) 耐酸能力:按 1% 的接种量于不同 pH(3.0,4.0,5.0,6.0) 的 MRS 肉汤培养基中接种活化后的待测菌,混匀。测定接种 6,12 h 时菌液吸光度 $OD_{600\text{ nm}}$,并绘制生长曲线。

(4) 耐胆盐能力:按 1% 的接种量于胆盐添加量分别为 0.000%,0.025%,0.050%,0.075% 的 MRS 液体培养基中接种活化后的待测菌,混匀。测定接种 6,12 h 时菌液吸光度 $OD_{600\text{ nm}}$ 。

1.2.5 鲑鱼发酵工艺 参照张潇等^[26]的方法并修改。将新鲜草鱼 $[(2.5\pm 0.5)\text{ kg}]$ 宰杀后立即贮藏于碎冰中运回实验室,取背部白鱼肉切成 $3\text{ cm}\times 3\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 块状。将草鱼块于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 盐水 $[m_{\text{盐}}:m_{\text{鱼}}$ 为 $1:25,m_{\text{盐}}:V_{\text{水}}$ 为 $1:10\text{ (g/mL)}$]中腌制 24 h,用纸巾擦干, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 风干 2 h。将草鱼块与 20% 大米粉、4% 红曲米粉充分混匀装罐, $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 发酵 4 d。

1.2.6 鲑鱼发酵工艺优化

(1) 腌制盐添加量对鲑鱼发酵品质的影响:固定红曲米粉添加量为 4%,发酵温度为 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$,分别于发酵第 0,2,4 天取样,考察腌制盐添加量(2%,4%,6%,8%,10%)对鲑鱼发酵品质的影响。

(2) 红曲米粉添加量对鲑鱼发酵品质的影响:固定腌制盐添加量 4%,发酵温度 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$,分别于发酵第 0,2,4 天取样,考察红曲米粉添加量(1%,2%,3%,4%,5%)对鲑鱼发酵品质的影响。

(3) 发酵温度对鲑鱼发酵品质的影响:固定腌制盐添加量为 4%,红曲米粉添加量为 4%,分别于发酵第 0,2,4 天取样,考察发酵温度(22,27,32,37,42 $^{\circ}\text{C}$)对鲑鱼发酵品质的影响。

(4) 正交试验:根据单因素试验结果,以腌制盐添加量、红曲米粉添加量和发酵温度为试验因素,设计三因素三水平正交试验优化鲑鱼发酵工艺。

1.2.6 发酵产品相关指标测定

(1) pH 值:按 GB 5009.237—2016 执行。

(2) TCA-可溶性肽含量:根据 Phetsang 等^[42]的方法。

(3) 感官评分:参照于美娟等^[2]的方法并修改。由 10 位具有食品感官品尝经验的人员组成感官评定小组,将鲑鱼切成 3 cm 厚的片,随机编号,按表 1 对其色泽、气味、质地、酸味以及总体接受性进行评分。

表 1 感官评分表

Table 1 Sensory rating scale

指标	评分标准	感官评分
色泽(10 分)	色泽红润有光泽	8~10
	呈浅红色,稍暗淡	4~7
	色泽暗淡无光泽	1~3
气味(10 分)	香气宜人,无异味	8~10
	发酵香味一般,无异味	4~7
	无发酵香味,或异味极重	1~3
质地(10)	质地紧密,不松散	8~10
	肉质较紧密,	4~7
	肉质过硬,或易于散烂	1~3
酸味(10 分)	酸味适中	8~10
	酸味一般	4~7
	过酸或者酸香味极淡	1~3
总体接受性(10 分)	喜欢	8~10
	一般	4~7
	不喜欢	1~3

1.2.7 数据处理 使用 Origin 9.1 软件绘图,使用 SPSS 26.0 软件对数据进行显著性和相关性分析, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 碳酸钙平板法分离乳酸菌

通过碳酸钙平板法分离筛选乳酸菌,共涂布 84 个平板,得到 27 个含有溶钙圈的平板,根据其菌落形态特征挑取分离得到 100 株菌,分离得到的菌株均能产生酸性物质可以使碳酸钙溶解,初步鉴定为乳酸菌。

2.2 牛津杯法筛选具有抑菌能力的菌株

由表 2 可知,分离得到的 100 株菌株中有 22 株菌具有抑菌效果。其中,对大肠杆菌有抑制效果的有 11 株菌,分别为 P-14、P-28、P-52、P-53、P-56、P-57、P-71、P-72、P-83、P-76 和 P-78,抑菌效果最显著的是 P-56。对金黄色葡萄球菌有抑制效果的有 13 株菌,分别为 P-8、P-21、P-23、P-30、P-33、P-67、P-69、P-76、P-78、P-80、P-81、P-89 和 P-94,抑制效果最显著的是 P-94。由于制备上清液过程中已将 pH 调至 6.5,故排除有机酸抑菌的可能性。推测乳酸菌在生长代谢过程中产生了细菌素和乳酸等物质,从而抑制了指示细菌的生长^[43-44]。因此选择有抑菌圈的 22 株乳酸菌菌株作为后续试验菌株。

表 2 分离菌株对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌能力[†]
Table 2 Isolate the results of the strain's bacteriostatic ability to *E. coli* and *Staphylococcus aureus*

菌株	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	菌株	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	菌株	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
P-1	—	—	P-35	—	—	P-69	—	+
P-2	—	—	P-36	—	—	P-70	—	—
P-3	—	—	P-37	—	—	P-71	+	—
P-4	—	—	P-38	—	—	P-72	+	—
P-5	—	—	P-39	—	—	P-73	—	—
P-6	—	—	P-40	—	—	P-74	—	—
P-7	—	—	P-41	—	—	P-75	—	—
P-8	—	+	P-42	—	—	P-76	++	+
P-9	—	—	P-43	—	—	P-77	—	—
P-10	—	—	P-44	—	—	P-78	++	+
P-11	—	—	P-45	—	—	P-79	—	—
P-12	—	—	P-46	—	—	P-80	—	+
P-13	—	—	P-47	—	—	P-81	—	+
P-14	+	—	P-48	—	—	P-82	—	—
P-15	—	—	P-49	—	—	P-83	+	—
P-16	—	—	P-50	—	—	P-84	—	—
P-17	—	—	P-51	—	—	P-85	—	—
P-18	—	—	P-52	+	—	P-86	—	—
P-19	—	—	P-53	+	—	P-87	—	—
P-20	—	—	P-54	—	—	P-88	—	—
P-21	—	+	P-55	—	—	P-89	—	+
P-22	—	—	P-56	+++	—	P-90	—	—
P-23	—	+	P-57	+	—	P-91	—	—
P-24	—	—	P-58	—	—	P-92	—	—
P-25	—	—	P-59	—	—	P-93	—	—
P-26	—	—	P-60	—	—	P-94	—	++
P-27	—	—	P-61	—	—	P-95	—	—
P-28	+	—	P-62	—	—	P-96	—	—
P-29	—	—	P-63	—	—	P-97	—	—
P-30	—	+	P-64	—	—	P-98	—	—
P-31	—	—	P-65	—	—	P-99	—	—
P-32	—	—	P-66	—	—	P-100	—	—
P-33	—	+	P-67	—	+			
P-34	—	—	P-68	—	—			

[†] “—”表示无抑菌作用;“+”表示抑菌环形成直径≤10 mm;“++”表示抑菌环形成直径≤12 mm;“+++”表示抑菌环形成直径≤14 mm。

2.3 乳酸菌 16S rDNA 鉴定及同源性分析

由表 3 和图 1 可知,22 株菌均属于片球菌属,主要是戊糖片球菌和乳酸片球菌,其中 P-8、P-21、P-30、P-52、P-81 菌株与乳酸片球菌 ABRIIFBI-55 的相似度均高于 99%;P-28、P-33、P-57、P-71、P-83 菌株与乳酸片球菌 PMC65 的相似度均高于 99%;P-23、P-69、P-78 菌株与乳酸片球菌 R10 的相似度均高于 99%;P-72 和 P-14 菌株与

戊糖片球菌 6340 的相似度均高于 99%;P-67 和 P-94 菌株与戊糖片球菌 4348 的相似度为 100%;P-53、P-56、P-76、P-80、P-89 分别来自不同种戊糖片球菌,且相似度均高于 99%。有研究^[5,44-45]从湘西传统发酵鱼中鉴定出的主要菌属为植物乳杆菌和戊糖片球菌。戊糖片球菌不仅可以产生大量乳酸还可以产生Ⅱ类细菌素,抑制病原菌的生长^[46]。

表 3 各菌株 16S 序列对比结果及相似度

Table 3 The results and similarity of the 16S comparison of each strain

菌株编号	16S 序列比对最相似菌株	相似度/%	抑菌能力
P-8	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain ABRIIFBI-55	99.45	金黄色葡萄球菌
P-21		99.11	金黄色葡萄球菌
P-30		99.73	金黄色葡萄球菌
P-52		99.10	大肠杆菌
P-81		100.00	金黄色葡萄球菌
P-83	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain PMC65	99.86	大肠杆菌
P-71		99.45	大肠杆菌
P-57		99.86	大肠杆菌
P-33		99.73	金黄色葡萄球菌
P-28		99.18	大肠杆菌
P-23	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain R10	99.86	金黄色葡萄球菌
P-69		99.73	金黄色葡萄球菌
P-78		99.93	大肠杆菌和金黄色葡萄球菌
P-14	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain 6340	99.79	大肠杆菌
P-72		99.25	大肠杆菌
P-67	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain 4348	100.00	金黄色葡萄球菌
P-94		100.00	金黄色葡萄球菌
P-53	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain opq3	99.79	大肠杆菌
P-56	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain 8362	100.00	大肠杆菌
P-76	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain 252	100.00	大肠杆菌和金黄色葡萄球菌
P-80	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain 6643	99.86	金黄色葡萄球菌
P-89	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain 6337	99.66	金黄色葡萄球菌

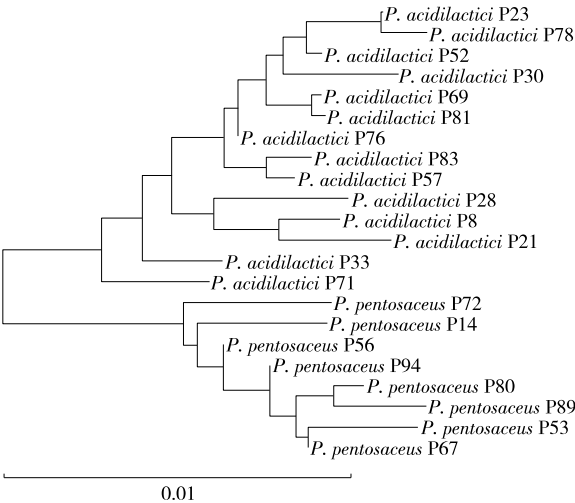


图 1 鲈鱼中部分乳酸菌分离株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of lactic acid bacteria isolated from Zhayu

2.4 乳酸菌耐盐及产酸能力筛选

由图 2 可知,各菌株 OD_{600 nm} 值随 NaCl 添加量的增

大而减弱,当 NaCl 添加量为 4% 时,P-14、P-21、P-33、P-56、P-71 5 株菌受影响小,能生长良好,其余菌株生长抑制明显,其中 P-56 的生长状态最好;当盐添加量为 6% 时,培养 6 h 后全部菌株被抑制,培养 12 h 时菌株 P-30、P-56 有生长趋势,其中 P-56 的生长情况最好;当盐添加量为 8% 时,各菌株基本不再生长。

由图 3 可知,培养早期(4 h 时),不同乳酸菌菌株 pH 差异显著($P<0.05$),即各菌株产酸能力不一致,其中产酸能力最好的为菌株 P-94。同时此阶段菌体生长快速、代谢加快,表明乳酸菌开始大量繁殖,产酸量迅速升高,菌体代谢速度也加快。培养 12 h 时,pH 下降变缓,pH 值为 3.99~4.20,各菌株之间差异不显著($P>0.05$),产酸能力减弱,表明细菌代谢减慢,菌体生长已进入稳定期,其中产酸能力最强的为菌株 P-94。

2.5 乳酸菌 P-56 和 P-94 的耐酸和耐胆盐能力

由图 4 可知,随着培养时间的延长,两株菌的酸度越强,其 OD_{600 nm} 值越低。P-56 和 P-94 均能够在 pH 5.0 的 MRS 肉汤培养基中,生长情况良好,此阶段两株菌的生长抑制作用小,可以正常进行生长繁殖,其中 P-56 的耐

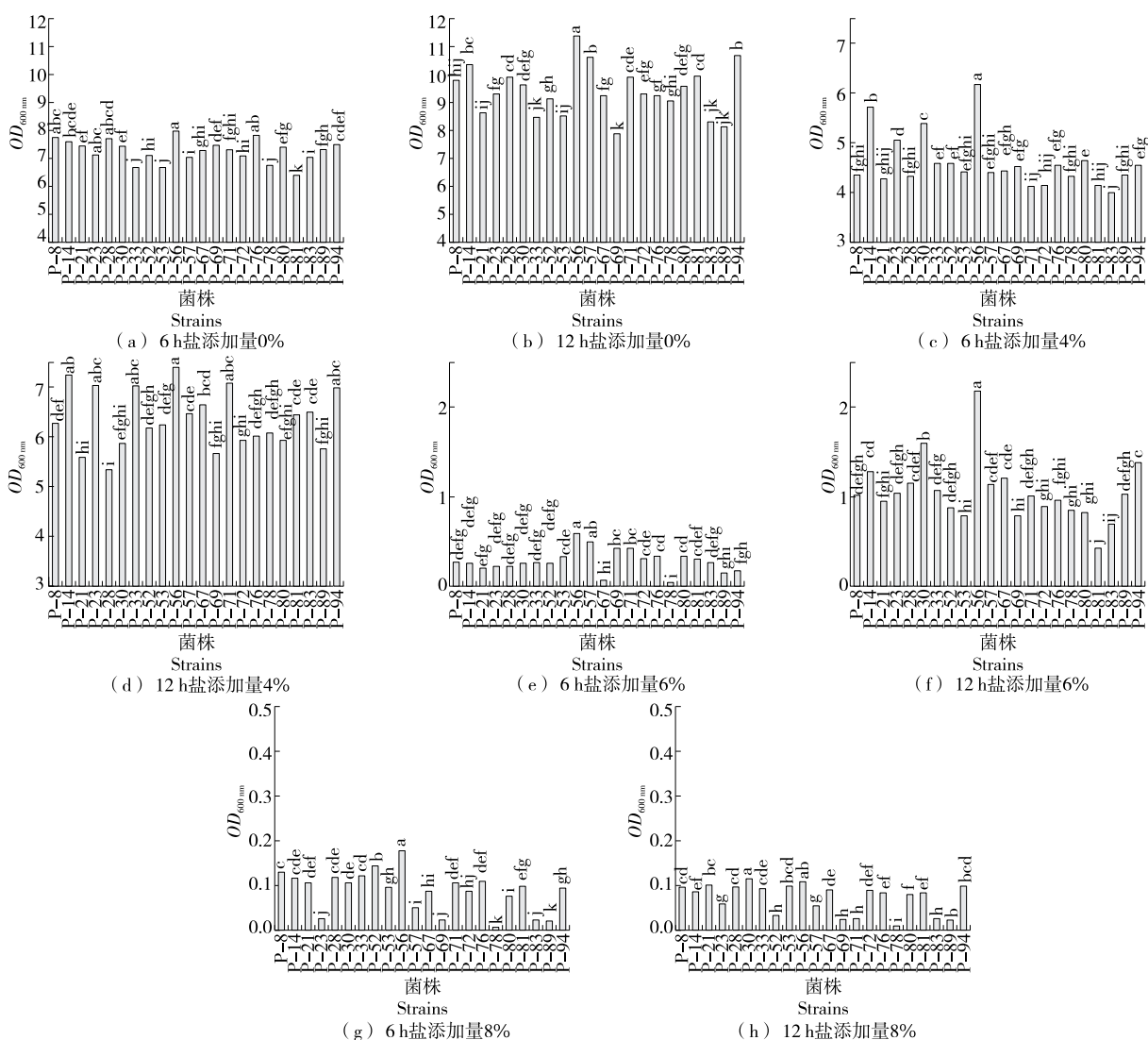


图 2 不同盐添加量下各菌株的生长情况

Figure 2 Growth of each strain in different salt concentrations

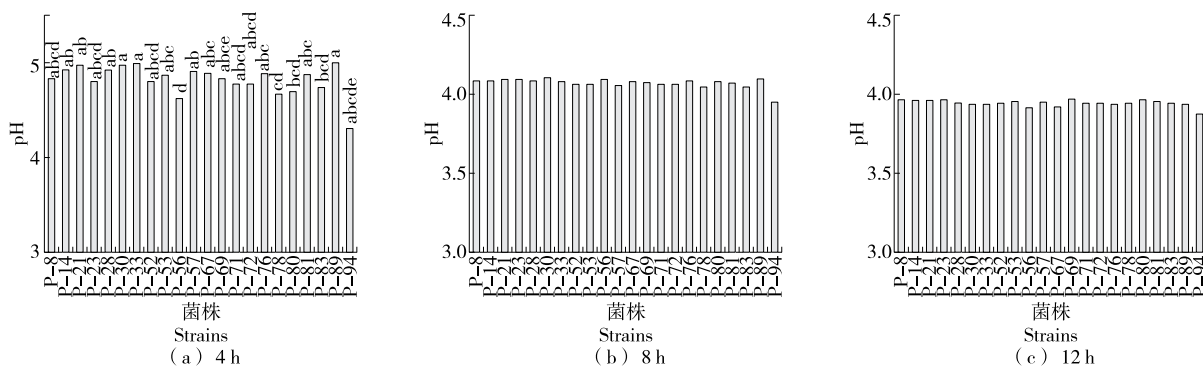


图 3 不同生长时间下各菌株的产酸能力

Figure 3 The size of acid production capacity of each strain at different times

酸性强于 P-94。在 pH 4.0 培养 12 h 后, $OD_{600\text{nm}}$ 值有小幅度上升, 酸度增加对乳酸菌生长有明显的抑制作用; 而

pH 3.0 时两株菌的 $OD_{600\text{nm}}$ 值均低于 1.000, 可判定乳酸菌不生长。因此 P-56 和 P-94 耐受最低 pH 值为 4.0, 其

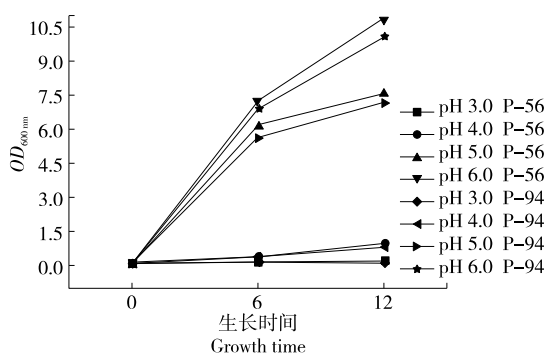


图4 不同酸度下 P-56 和 P-94 的生长曲线

Figure 4 Growth curves of P-56 and P-94 at different acid levels

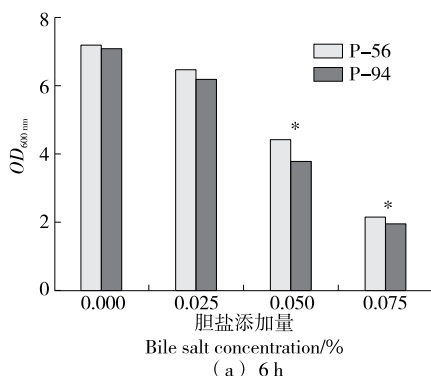
* 表示差异显著 ($P < 0.05$)

图5 不同时间下 P-56 和 P-94 的耐胆盐能力

Figure 5 P-56 and P-94 have the size of bile salt tolerance at different times

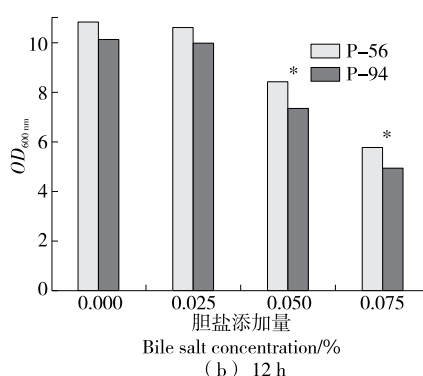
* 表示差异显著 ($P < 0.05$)

图5 不同时间下 P-56 和 P-94 的耐胆盐能力

Figure 5 P-56 and P-94 have the size of bile salt tolerance at different times

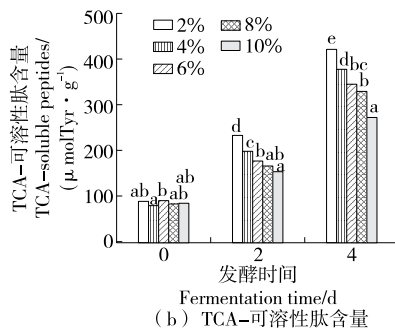
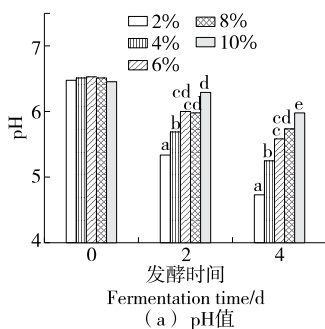
字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图6 腌制盐添加量对发酵鲑鱼品质的影响

Figure 6 Effects of curing salt content on the quality of naturally fermented Zhayu

pH 值随腌制盐添加量的升高而缓慢下降,当腌制盐添加量为 10% 时,pH 值无显著变化。TCA-可溶性肽含量随发酵时间的延长逐渐升高,表明发酵过程中肌肉蛋白的水解量较大^[47]。但是腌制盐添加量越大,TCA-可溶性肽含量越少。从感官评分来看,当腌制盐添加量为 4% 时,其风味更丰富,总体接受度最好。因此,选择腌制盐添加量的最适 3 个水平为 4%,6%,8%。

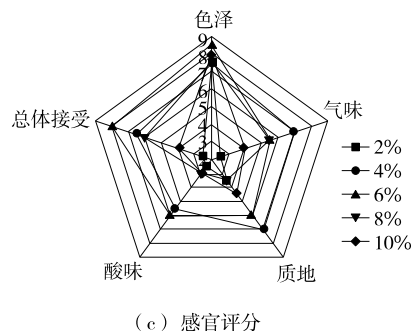
2.6.2 红曲米粉添加量对鲑鱼品质的影响 由图 7 可知,

中 P-56 的耐酸性比 P-94 的强。

由图 5 可知,两株菌的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值随胆盐添加量的增加而降低。当生长时间为 6 h 时,P-56 和 P-94 在胆盐添加量为 0.025% 时的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值无显著差异 ($P > 0.05$);在胆盐添加量为 0.050%,0.075% 时的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值差异显著 ($P < 0.05$),其中 P-56 的耐受能力强于 P-94 的。当生长时间为 12 h 时,P-56 和 P-94 在胆盐添加量为 0.025% 时的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值无显著差异 ($P > 0.05$);在胆盐添加量为 0.050%,0.075% 的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值差异显著 ($P < 0.05$)。综上,菌株 P-56 的耐胆盐能力较强。

2.6 鲑鱼发酵工艺优化

2.6.1 腌制盐添加量对鲑鱼品质的影响 由图 6 可知,



pH 随发酵时间的延长逐渐降低,但不同红曲米粉添加量下,pH 值变化不显著。TCA-可溶性肽含量随发酵时间的延长逐渐升高,红曲米粉添加量对 TCA-可溶性肽含量无显著性影响。从感官评分来看,当红曲米粉添加量为 1%,2% 时,鲑鱼的酸味并不明显,总体接受度不高。因此,选择红曲米粉添加量的最适 3 个水平为 3%,4%,5%。

2.6.3 发酵温度对鲑鱼品质的影响 由图 8 可知,当发酵温度为 42 ℃ 时,发酵第 4 天的 pH 下降到 4 左右,

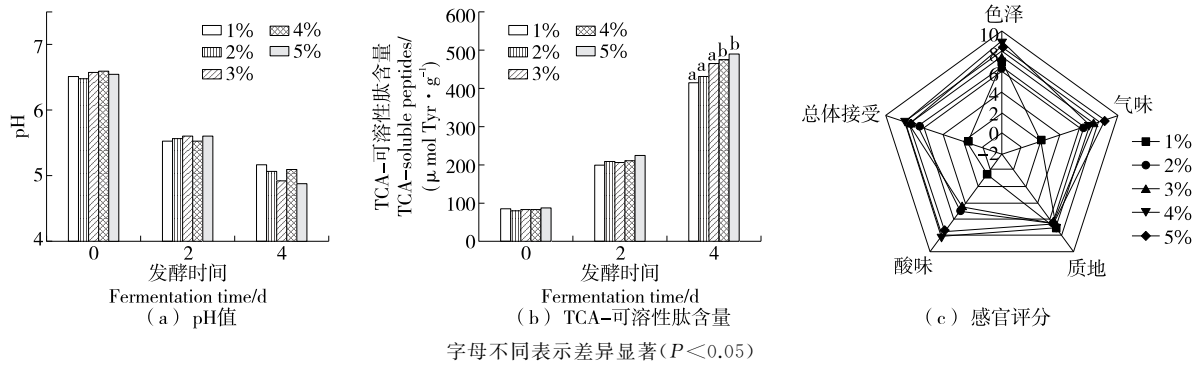


图 7 红曲米粉添加量对发酵鲑鱼品质的影响

Figure 7 Effects of red yeast rice powder on the quality of naturally fermented Zhayu

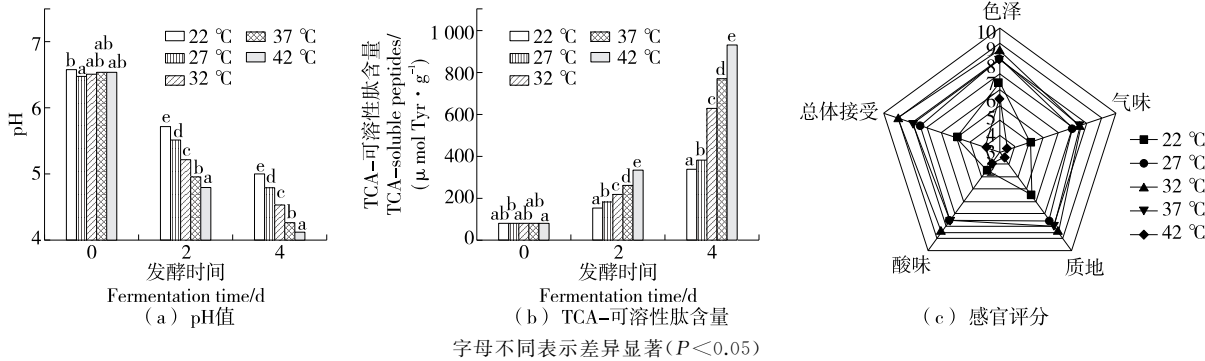


图 8 发酵温度对发酵鲑鱼品质的影响

Figure 8 Effects of fermentation temperature on the quality of naturally fermented Zhayu

TCA-可溶性肽含量增长最快并达到最高,但是鲑鱼样品肉质糜烂松散,呈过度酸化腐败现象。当发酵温度为 22 °C 时,pH 下降缓慢,同时其风味也不够丰富宜人。因此,选择发酵温度的最适 3 个水平为 27,32,37 °C。

2.6.4 正交试验 在单因素试验基础上,选择腌制盐添加量、发酵温度和红曲米粉添加量为试验因素,采用三因素三水平正交试验优化鲑鱼制品加工工艺,各因素水平见表 3,试验设计及结果见表 4。

表 3 正交试验因素水平表

Table 3 Orthogonal test factors and level table

水平	A 腌制盐添加量/%	B 发酵温度/°C	C 红曲米粉添加量/%
1	4	27	3
2	6	32	4
3	8	37	5

由表 4 可知,各因素对鲑鱼 pH 值的影响顺序为腌制盐添加量>发酵温度>红曲米粉添加量,最佳工艺条件为 A₁B₃C₂,即腌制盐添加量 4%,发酵温度 37 °C,红曲米粉添加量 4%,此发酵工艺下得到的鲑鱼酸味宜人,但是鱼肉不够紧密。各因素对鲑鱼 TCA-可溶性肽含量的影

响顺序为发酵温度>红曲米粉添加量>腌制盐添加量,最佳工艺条件为 A₃B₂C₂,即腌制盐添加量 8%,发酵温度 32 °C,红曲米粉添加量 4%,此发酵工艺下得到的鲑鱼质地松软,但是发酵味较淡。各因素对鲑鱼感官评分的影响顺序为发酵温度>红曲米粉添加量>腌制盐添加量,最佳工艺条件为 A₁B₂C₂,即腌制盐添加量 4%,发酵温度 32 °C,红曲米粉添加量 4%,此发酵工艺下得到的鲑鱼滋味丰富,酸味浓郁,硬度适中。

综上,对 3 组最优组合进行重复验证,发现 A₁B₃C₂ 组由于发酵温度过高,导致鱼肉蛋白质过度降解,质地松散;A₃B₂C₂ 组由于腌制盐添加量过高,发酵速度缓慢,同时高盐的渗透导致鱼肉弹性下降,整体接受性差。A₁B₂C₂ 组综合品质高,为最适工艺组合。发酵剂样品中较高的酸度、较低的盐度以及较高的肌肉蛋白水解和脂质氧化,有助于发酵过程中赋予酸鱼独特的风味^[48]。

3 结论

研究从红曲鲑鱼制品中筛选出一株具有良好耐盐和耐酸特性的菌株 P-56,通过鉴定该菌株为戊糖片球菌。红曲鲑鱼制品的最优发酵工艺条件为腌制盐添加量 4%、红曲米粉添加量 4%、发酵温度 32 °C;此条件下的红曲鲑

表 4 正交试验方案及结果

Table 4 Orthogonal test scheme and results

试验号		A	B	C	pH 值	TCA-可溶性肽含量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	感官评分
1		1	1	1	5.49	275.87	36.9
2		1	2	2	4.42	434.99	45.7
3		1	3	3	4.15	287.33	28.7
4		2	1	2	5.74	203.42	31.4
5		2	2	3	5.58	356.40	37.9
6		2	3	1	5.61	337.20	35.5
7		3	1	3	5.83	234.08	27.3
8		3	2	1	4.86	394.33	35.2
9		3	3	2	4.55	427.57	36.9
pH 值	k_1	4.687	5.687	5.320	最优组合 $A_1B_3C_2$		
	k_2	5.643	4.953	4.903			
	k_3	5.080	4.770	5.187			
	R	0.956	0.917	0.417			
TCA-可 溶 性 肽 含 量	k_1	332.730	237.790	335.800	最优组合 $A_3B_2C_2$		
	k_2	299.007	395.240	355.327			
	k_3	351.993	350.700	292.603			
	R	52.986	157.450	62.724			
感官评分	k_1	37.100	31.867	35.867	最优组合 $A_1B_2C_2$		
	k_2	34.933	39.600	38.000			
	k_3	33.133	33.700	31.300			
	R	3.967	7.733	6.700			

鱼制品的综合品质显著提升。后续将重点研究不同原生乳酸菌对鲑鱼制品的影响,探究可以作为鱼肉发酵剂的优势菌株。

参考文献

[1] 康慎敏, 徐睿, 武瑞赞. 乳酸菌在发酵鱼制品中的应用[J]. 中国水产, 2021(7): 84-87.
KANG S M, XU R, WU R Z. Application of lactic acid bacteria in fermented fish products[J]. China Fisheries, 2021(7): 84-87.

[2] 于美娟, 谭欢, 马美湖, 等. 腌制工艺对固态发酵鲑鱼品质的影响[J]. 湖南农业科学, 2017(3): 90-93.
YU M J, TAN H, MA M H, et al. Effect of curing process on the quality of solid fermented Zhayu[J]. Hunan Agricultural Science, 2017(3): 90-93.

[3] MELINI F, MELINI V, LUZIATELLI F, et al. Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review[J]. Nutrients, 2019, 11(5): 1 189.

[4] ANIL K A. Quality ingredients and safety concerns for traditional fermented foods and beverages from Asia: A review [J]. Fermentation, 2019, 5(1): 5010008.

[5] 林城杏. 传统高盐发酵酸鱼乳酸菌菌群结构及强化发酵作用

研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019: 3-10.

LIN C X. Research on the structure of lactic acid bacteria flora and strengthening fermentation effect of traditional high-salt fermented sour fish[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019: 3-10.

[6] LEE S H, JUNG J Y, JEON C O. Microbial successions and metabolite changes during fermentation of salted shrimp (saeujeot) with different salt concentrations [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e90115.

[7] INGUGLIA E S, ZHANG Z H, TIWARI B K, et al. Salt reduction strategies in processed meat products: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 59: 70-78.

[8] 聂黔丽, 王修俊, 周雯, 等. 低钠复合盐腌制对苗岭腊肉品质的影响[J]. 包装工程, 2021, 42(19): 114-121.
NIE Q L, WANG X J, ZHOU W, et al. Effect of low sodium compound salt curing on the quality of Miaoling cured meat[J]. Packaging Engineering, 2021, 42(19): 114-121.

[9] XU Y S, LI L, REGENSTEIN J M, et al. The contribution of autochthonous microflora on free fatty acids release and flavor development in low-salt fermented fish[J]. Food Chemistry, 2018, 256: 259-267.

[10] 田旭艳. 低盐发酵鳊鱼品质提升工艺及冻藏稳定性研究[D].

- 无锡: 江南大学, 2022: 3-7.
- TIAN X Y. Study on the quality enhancement process and freezing stability of low-salt fermented bream [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022: 3-7.
- [11] BROWN I J, TZOULAKI I, CANDEIAS V, et al. Salt intakes around the world: Implications for public health[J]. *International Journal of Epidemiology*, 2009, 38(3): 791-813.
- [12] 何丽娜. 发酵工艺对鲤鱼质构及食用品质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 5-24.
- HE L N. Effect of fermentation process on the texture and eating quality of carp[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019: 5-24.
- [13] 雷跃磊, 卢素芳, 张光华, 等. 湖北风味发酵鳊鱼加工关键工艺[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(16): 155-160.
- LEI Y L, LU S F, ZHANG G H, et al. Key process of processing fermented Mandarin fish with Hubei flavor[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2018, 39(16): 155-160.
- [14] VENMATHI E, NIRUPAMA A. Impact of perceived self-efficacy among hypertensives in adapting to low salt diet [J]. *Current Medical Issues*, 2022, 20(2): 57-62.
- [15] YANG G H, ZHOU X, JI W J, et al. Effects of a low salt diet on isolated systolic hypertension: A community-based population study[J]. *Medicine*, 2018, 97(14): e0342.
- [16] 谭汝成, 欧阳加敏, 卢晓莉, 等. 接种植物乳杆菌和戊糖片球菌发酵对鱼鲑品质的影响[J]. *食品科学*, 2007(12): 268-272.
- TAN N C, OUYANG J M, LU X L, et al. Effect of fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* on the quality of fermented fish products[J]. *Food Science*, 2007(12): 268-272.
- [17] WANG S, YUAN X, DONG Z, et al. Characteristics of isolated Lactic acid bacteria and their effects on the silage quality [J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(6): 819-827.
- [18] 朱雯娟, 安俊莹, 张雪梅, 等. 梅香鱼发酵菌株的筛选及对品质的影响[J]. *食品科学*, 2015, 36(23): 162-166.
- ZHU W J, AN J Y, ZHANG X M, et al. Screening of fermentative strains of plum-flavored fish and their effects on quality[J]. *Food Science*, 2015, 36(23): 162-166.
- [19] AN Y Q, CAI X W, CONG L, et al. Quality improvement of Zhayu, a fermented fish product in China: Effects of inoculated fermentation with three kinds of lactic acid bacteria[J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2756-2756.
- [20] XU Y S, ZANG J H, REGENSTEIN J M, et al. Technological roles of microorganisms in fish fermentation: A review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(6): 1000-1012.
- [21] HAN J, ZHANG J B, LIN X P, et al. Effect of autochthonous lactic acid bacteria on fermented Yucha quality [J]. *LWT*, 2020, 123(C): 109060.
- [22] GAO P, WANG W X, JIANG Q X, et al. Effect of autochthonous starter cultures on the volatile flavour compounds of Chinese traditional fermented fish (Suan yu) [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(7): 1630-1637.
- [23] 孙熙洽, 崔承弼, 齐仕博, 等. 低盐泡菜中耐酸性乳酸菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. *食品与机械*, 2022, 38(1): 24-31, 37.
- SUN X H, CUI C M, QI S B, et al. Screening, identification and characteristics of acid-tolerant lactic acid bacteria in low-salt pickles[J]. *Food & Machinery*, 2022, 38(1): 24-31, 37.
- [24] SPERANZA B, RACIOPPO A, BENEDEUCE L, et al. Autochthonous lactic acid bacteria with probiotic aptitudes as starter cultures for fish-based products [J]. *Food Microbiology*, 2017, 65: 244-253.
- [25] ZANG J H, XU Y S, XIA W S, et al. Correlations between microbiota succession and flavor formation during fermentation of Chinese low-salt fermented common carp (*Cyprinus carpio* L.) inoculated with mixed starter cultures [J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103487.
- [26] 张潇. 鲑鱼工业化生产关键技术研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2018: 2-4.
- ZHANG X. Research on key technologies for industrial production of preserved fish[D]. Changsha: Zhongnan University of Forestry Science and Technology, 2018: 2-4.
- [27] 卢晓莉. 鱼鲑制品中乳酸菌的分离、筛选及应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 6-39.
- LU X L. Isolation, screening and application of lactic acid bacteria from fermented fish products[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007: 6-39.
- [28] 龚吉军, 唐静, 李忠海, 等. 响应曲面法优化鲑鱼发酵条件[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(4): 219-226.
- GONG J J, TANG J, LI Z H, et al. Optimization of fermentation conditions of preserved fish by response surface method [J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2010, 10(4): 219-226.
- [29] JIRASATID S, NOPHARATANA M, KITSUBUN P, et al. Degradation kinetics of monacolin K in red yeast rice powder using multiresponse modeling approach [J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 116(2): 436-443.
- [30] 李剑, 高向阳, 黄国平, 等. 红曲米粉在饼干中的着色研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(3): 205-220.
- LI J, GAO X Y, HUANG G P, et al. Study on the coloring of red yeast rice powder in biscuits[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(3): 205-220.
- [31] VENDRUSCOLO F, BÜHLER R M M, DE CARVALHO J C, et al. Monascus: A reality on the production and application of microbial pigments[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 178(2): 211-223.
- [32] KALAIIVANI M, SABITHA R, KALAISELVAN V, et al. Health Benefits and clinical impact of major nutrient, red yeast rice: A review[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2010, 3(3): 333-339.
- [33] 王玉芬, 张建国. 红曲色素在肉制品中的应用[J]. *肉类工业*, 2002(12): 4-7.

- WANG Y F, ZHANG J G. Application of red yeast pigment in meat products[J]. Meat Industry, 2002(12): 4-7.
- [34] 童群义. 红曲霉产生的生理活性物质研究进展[J]. 食品科学, 2003(1): 163-167.
- TONG Q Y. Progress in the study of physiologically active substances produced by *Aspergillus oryzae*[J]. Food Science, 2003(1): 163-167.
- [35] KIM C S, KIM H Y. Physicochemical properties of emulsion-type sausage added red yeast rice powder[J]. Korean Journal of Food Science and Technology, 2017, 49(4): 396-400.
- [36] IJHUI C, HYUK K J, KI K B, et al. Physicochemical properties of chicken thigh meat sausage manufactured with red yeast rice powder[J]. Korean Journal of Poultry Science, 2019, 46(1): 11-15.
- [37] 葛磊, 乔峰, 陈育红, 等. 红曲藜麦高蛋白饼干的研制[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(10): 42-45.
- GE L, QIAO F, CHEN Y H, et al. Development of red quinoa high-protein biscuits[J]. Grain and Fats, 2019, 32(10): 42-45.
- [38] 陈晶晶, 李佳根, 李兆琦, 等. 红曲米粉对香卤鲑鱼中晚期糖基终产物的影响[J]. 肉类工业, 2022(9): 19-23.
- CHEN J J, LI J G, LI Z Q, et al. Effect of red yeast rice flour on the mid-and late-stage glycosylated end products of aromatic marinated squid[J]. Meat Industry, 2022(9): 19-23.
- [39] 吴康. 红曲菌发酵半干鲢鱼研制及其风味分析[D]. 广州: 暨南大学, 2020: 3-9.
- WU K. Development and flavor analysis of red yeast fermented grass carp[D]. Guangzhou: Jinan University, 2020: 3-9.
- [40] 王乃富, 李春阳, 阎征, 等. 红曲霉发酵对鲮鱼肉糜品质和生物活性影响研究[J]. 广西农学报, 2010, 25(2): 54-57.
- WANG N F, LI C Y, YAN Z, et al. Study on the effect of red *Aspergillus* fermentation on the quality and biological activity of bighead carp minced meat[J]. Guangxi Journal of Agriculture, 2010, 25(2): 54-57.
- [41] 余之蕴, 黄宝莹, 刘海卿, 等. 牛津杯法测定食品添加剂对五种益生菌的抑菌活力[J]. 食品工业, 2016, 37(1): 171-174.
- YU Z Y, HUANG B Y, LIU H Q, et al. Determination of the antibacterial activity of food additives against five probiotic bacteria by Oxford cup method[J]. Food Industry, 2016, 37(1): 171-174.
- [42] PHETSANG H, PANPIPAT W, UNDELAND I, et al. Comparative quality and volatilomic characterisation of unwashed mince, surimi, and pH-shift-processed protein isolates from farm-raised hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) [J]. Food Chemistry, 2021, 364: 130365.
- [43] YANG J, LU J, ZHU Q Z, et al. Isolation and characterization of a novel *Lactobacillus plantarum* MMB-07 from traditional Suanyu for *Acanthogobius hasta* fermentation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(2): 161-166.
- [44] 曾雪峰, 夏文水. 湘西传统酸鱼中乳酸菌的分离及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(12): 40-44.
- ZENG X F, XIA W S. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional sour fish in Xiangxi [J]. Food and Fermentation Industry, 2012, 38(12): 40-44.
- [45] 王华娟. 酸鱼中乳酸菌的分离鉴定及其可控发酵工艺研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2016: 3-36.
- WANG H J. Isolation and identification of lactic acid bacteria from sour fish and its controlled fermentation process [D]. Wuhan: Wuhan Light Industry University, 2016: 3-36.
- [46] 王艳婷. 戊糖片球菌 C-2-1 产细菌素的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 3-12.
- WANG Y T. Study on the production of bacteriocins by *Pentachybotrys* spp. C-2-1 [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016: 3-12.
- [47] WANG W X, XIA W S, GAO P, et al. Proteolysis during fermentation of Suanyu as a traditional fermented fish product of China[J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20: S166-S176.
- [48] ZENG X F, XIA W S, JIANG Q X, et al. Effect of autochthonous starter cultures on microbiological and physico-chemical characteristics of Suanyu, a traditional Chinese low salt fermented fish[J]. Food Control, 2013, 33(2): 344-351.
- (上接第 97 页)
- [22] 李康, 李长河, 刘明政, 等. 多工位定向挤压鲜核桃破壳装置设计与试验[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2023, 41(3): 265-273.
- LI K, LI C H, LIU M Z, et al. Design and experiment of multi-station directional extrusion shell breaking device for fresh walnut [J]. Journal of Shihezi University(Natural Science), 2023, 41(3): 265-273.
- [23] 石明村, 刘明政, 李长河, 等. 凸轮摇杆双向挤压核桃破壳装置设计与试验[J]. 农业机械学报, 2022, 53(1): 140-150.
- SHI M C, LIU M Z, LI C H, et al. Design and experiment of cam rocker bidirectional extrusion walnut shell breaking device [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2022, 53(1): 140-150.
- [24] 曹成茂, 刘权, 葛俊, 等. 刀削结合滚动摩擦进料竹笋剥皮机设计与试验[J]. 农业机械学报, 2022, 53(9): 142-150.
- CAO C M, LIU Q, GE J, et al. Design and experiment of bamboo shoots peeling machine with rolling friction feeding based on knife-cutting method[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2022, 53(9): 142-150.
- [25] 赖庆辉, 袁海阔, 胡子武, 等. 滚筒板齿式三七种苗分离装置结构设计与试验[J]. 农业机械学报, 2018, 49(4): 121-129.
- LAI Q H, YUAN H K, HU Z W, et al. Design and experiment on seedling separation device of panax notoginseng seedlings based on roller zigzag mechanism[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(4): 121-129.