

## 罗非鱼双菌可控发酵工艺优化与滋味研究

张诗韵<sup>1</sup>, 孙建安<sup>1\*</sup>, 徐云升<sup>2\*</sup>, 侯聪颖<sup>1</sup>, 毛相朝<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 海南热带海洋学院, 海南 三亚 572000)

**摘要:**为提高罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)加工产物的附加值,探究罗非鱼深加工的可行性,本研究通过单因素实验和响应面实验优化利用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)发酵罗非鱼的工艺条件,并对发酵罗非鱼和未发酵罗非鱼进行电子舌、游离氨基酸分析。结果表明,在发酵温度26℃,腌制盐浓度5.5%,接种量6%,发酵时间36h,腌制时间3h的条件下,发酵罗非鱼的氨基酸态氮值达到70.14 mg/100g,与未发酵罗非鱼相比,其游离氨基酸和必需氨基酸含量均增多,并具有发酵产品的特殊滋味。本研究对罗非鱼深加工的可行性进行了探究,可为罗非鱼发酵工艺优化提供技术支持。[中国渔业质量与标准,2020,10(4):26-36]

**关键词:**罗非鱼;可控发酵;酿酒酵母;乳酸乳球菌;响应面

中图分类号:TS254.4

文献标志码:A

文章编号:2095-1833(2020)04-0026-11

罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)又名非洲鲫、福寿鱼等,具有生长快、肉质嫩及蛋白质含量高等特点,是优质肉类来源<sup>[1]</sup>。中国2017年罗非鱼养殖产量达到158.5万t,在全国淡水鱼养殖市场中排第六位,仅次于草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫(*Carassius auratus*),目前仍保持较快增长<sup>[2]</sup>。中国罗非鱼产量居世界首位,且养殖产量、出口量还在逐年增加,在国际市场中的份额占比也逐渐增大<sup>[3]</sup>,但是目前中国罗非鱼产业也存在多种问题,如对内销售少、依赖出口、深加工程度不够和出口品种单一(主要为冻罗非鱼片与冻整条罗非鱼)等<sup>[4]</sup>。为提高罗非鱼产品的附加值,中国学者已成功开发诸多新产品:王文勇等<sup>[5]</sup>利用罗非鱼下脚料制得了香辣风味的罗非鱼下脚料罐头;薛佳等<sup>[6]</sup>利用罗非鱼下脚料进行低盐优质鱼露的研究,采用复合酶解(0.5%胰蛋白酶+0.5%风味蛋白酶)与固态米曲霉(*Aspergillus oryzae*)低盐保温发酵联用技术,得到了符合一级品标准要求的鱼露;张文婷等<sup>[7]</sup>研究三聚磷酸盐对提高罗非鱼鱼糜抗冻性的影响,结果表明三聚磷酸盐能适当防止罗非鱼鱼糜变性,最终提高其抗冻性。

研发罗非鱼加工的新产品,可提高罗非鱼附加

值,提高企业经济效益,有利于罗非鱼产业发展。发酵是一种古老的食物保藏技术,能延长鱼制品的保存时间,通过微生物和酶的综合作用,让鱼制品获得原来所不具有的质地、风味和口感等,并改善营养品质。而发酵鱼制品大多是当地传统特色食物,依靠环境中与鱼自身所带的微生物与酶等,在适宜的温度、湿度下,进行自然发酵而成。这些自然发酵产品受到加工环境、发酵条件的影响,随机性强,产品质量缺乏统一标准,难以实现规模化、工业化生产。而如果采取现代微生物发酵技术可以破解上面的问题,在鱼体上接种微生物发酵剂,不仅能够获得原来所期望的产品风味、营养及品质,还提升了产品的安全性,让工业化、标准化和规模化生产成为可能。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是发酵食品中的重要菌种,其生长较快,能大量消耗氧气,并抑制腐败菌、致病菌的生长繁殖,可水解脂质,利用脂肪酸合成酯类<sup>[8-9]</sup>,代谢产物还能赋予发酵食品特殊的风味<sup>[10]</sup>。Gao等<sup>[5]</sup>对接种不同发酵剂的酸鱼风味进行对比研究,发现酿酒酵母组中醇类、醛类物质含量最丰富。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)是发酵工业中常用的发酵剂之一,其为兼性厌氧菌,能够产生乳酸、乳酸链球菌素(nisin)等,可用来生产多种发酵乳制品,

收稿日期:2020-02-13;接收日期:2020-05-19

资助项目:2018年三亚市专项科研试制项目(2018KS01)

第一作者:张诗韵(1995-),女,硕士研究生,研究方向为生物工程,zhangshiyun95@163.com

通信作者:孙建安,副教授,主要研究方向为食品生物技术,sunjianan@ouc.edu.cn;徐云升,教授,研究方向为食品加工技术,lyxys@163.com

如干酪、酸奶和奶油等。Nisin 是乳酸乳球菌在发酵过程中产生的由 34 个氨基酸构成的小分子肽<sup>[11]</sup>,是细菌素的一种,能够抑制大部分革兰氏阳性菌的生长,具有良好的抑菌效果并且能够被人体消化,不会产生过敏等不良反应<sup>[12]</sup>。现已经被广泛应用在鱼类食品、罐头食品、乳制品及乙醇饮料等多种产品的防腐保鲜中<sup>[13]</sup>。然而,从成本控制方面考虑,将产生细菌素的培养物直接添加到食品中更为有利<sup>[14-15]</sup>。

目前在罗非鱼上接种微生物发酵剂的研究较少,已有红曲霉发酵半干罗非鱼的研究<sup>[16]</sup>,而未见将酿酒酵母与乳酸乳球菌应用到罗非鱼发酵中。本研究利用 2 种菌的生长、繁殖和代谢赋予罗非鱼发酵产品特殊风味,提高产品的氨基酸态氮、游离氨基酸含量,使发酵罗非鱼成为风味佳、营养价值高的食品,并且能够抑制腐败菌的生长,为产品的安全提供保障。本研究对罗非鱼的深加工进行初步探索,可为其工厂化生产提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜罗非鱼( $500 \pm 50$ ) g 购于海南省三亚市荔枝沟市场。乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)购于北纳创联生物技术有限公司。YPD 培养基、MRS 培养基购于 Solarbio 公司。其他试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

主要设备包括:JYL-C022E 匀浆机购置于九阳股份有限公司。BCM-1000 超净台购置于苏州净化设备有限公司。SPX 生化培养箱购置于新江南仪器有限公司。PHS-2F pH 计购置于上海精科仪器有

限公司。ZQZY-BS9 恒温振荡培养箱购置于上海知楚仪器有限公司。TS-5000Z 电子舌购置于日本 In-sent 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 可控发酵罗非鱼的制备

##### 1.3.1.1 原料准备

新鲜罗非鱼约 0.5 kg,去除内脏、头尾等,洗净,从鱼中部将鱼分成两半。

##### 1.3.1.2 盐水腌制

于 4 ℃ 条件下,盐水腌制一定时间,备用,盐水与鱼肉质量比为 1:1 ( $m/m$ )。腌制时,盐水渗透到鱼肉内部,不仅可使鱼肉入味,还可以抑制鱼肉腐败变质。

##### 1.3.1.3 微生物培养

乳酸乳球菌乳酸亚种在 MRS 液体培养基中 37 ℃ 条件下活化;酿酒酵母在 YPD 液体培养基中 28 ℃ 条件下活化,传代培养 2 次,菌液于 4 ℃,5 000 rpm 条件下离心 15 min,菌体沉淀用无菌生理盐水洗涤 2 次,调节菌体浓度为  $7 \sim 9 \lg \text{CFU/mL}$ 。

##### 1.3.1.4 发酵菌种的比例选择

发酵菌种比例的不同将对产品品质产生影响,因而本实验将酿酒酵母(以下简称 N)和乳酸乳球菌乳酸亚种(以下简称 R)以不同比例接种到原料鱼,并添加 5% 的蔗糖,25 ℃ 下进行 36 h 的恒温发酵,测定其 pH 值,并做空白实验。

##### 1.3.1.5 装坛发酵

发酵坛用开水清洗、沥干,并进行漏水与破损检查。检查完好装入鱼肉并补充合适的碳源于适宜温度发酵一定的时间,并保持水封。

##### 1.3.1.6 烘干脱水

将发酵完的鱼肉取出于 55 ℃ 下烘干脱水至水分含量到 50% 左右为终点,制得成品。

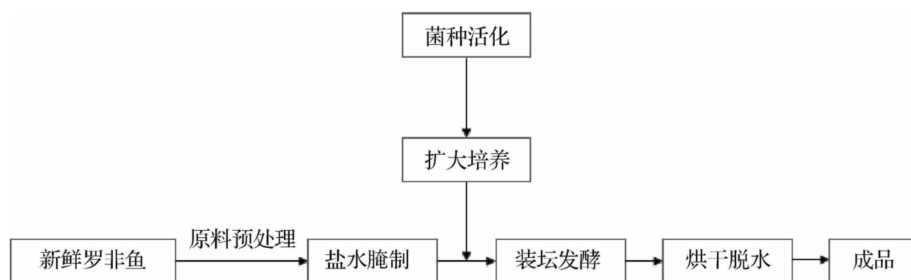


图1 工艺流程

Fig.1 Technological process



### 1.3.2 单因素实验

#### 1.3.2.1 发酵时间的影响

在确定发酵温度 25 ℃, 腌制盐水浓度 5%, 腌制 3 h, 菌液 5%, 蔗糖 5% 的条件下, 本实验探究 12 ~ 60 h 发酵时间对发酵效果的影响。

#### 1.3.2.2 接种量的影响

在确定发酵温度 25 ℃, 发酵 36 h, 腌制盐水浓度 5%, 腌制 3 h, 蔗糖 5% 的条件下, 本实验探究 1% ~ 9% 接种量对发酵效果的影响。

#### 1.3.2.3 腌制盐浓度的影响

在确定发酵温度 25 ℃, 发酵 36 h, 腌制 3 h, 菌液 5%, 蔗糖 5% 的条件下, 本实验探究 1% ~ 9% 盐水浓度对发酵效果的影响。

#### 1.3.2.4 发酵温度的影响

在确定腌制盐水浓度 5%, 腌制 3 h, 菌液 5%, 蔗糖 5%, 发酵 36 h 的条件下, 本实验探究 15 ~ 35 ℃ 发酵温度对发酵效果的影响。

#### 1.3.2.5 腌制时间的影响

在确定发酵温度 25 ℃, 发酵 36 h, 蔗糖 5%, 菌液 5%, 腌制盐水浓度 5% 的条件下, 本实验探究 1 ~ 5 h 腌制时间对发酵效果的影响。

### 1.3.3 Box-Behnken 实验

在单因素实验设计的基础上, 选取影响较大的 3 个因素进行后续实验。根据 Box - Behnken 实验设计原理, 以氨基酸态氮值为响应值, 设计三因素三水平响应面分析实验, 数据用 Design - Expert 统计处理, 确定最终可控发酵罗非鱼的工艺参数。因素水平如表 1 所示。

表 1 因素与水平表  
Tab. 1 Factors and levels

| 因素 Factors | 水平 Levels |    |    |
|------------|-----------|----|----|
|            | -1        | 0  | 1  |
| A 温度/℃     | 20        | 25 | 30 |
| B 腌制盐浓度/%  | 3         | 5  | 7  |
| C 接种量/%    | 3         | 5  | 7  |

### 1.3.4 氨基酸态氮的测定

采用双指示剂甲醛滴定法<sup>[17]</sup>。

### 1.3.5 挥发性盐基氮 (TVB-N) 的测定

采用 GB 5009. 228—2016《食品中挥发性盐基氮的测定》中的第一法: 半微量定氮法<sup>[18]</sup>。

### 1.3.6 电子舌的分析

样品制备: 取相同部位的鱼肉用搅拌机搅拌

1 min, 使鱼肉搅碎; 40 ℃ 水浴锅隔水加热鱼肉整体温度至 40 ℃; 称取 50 g 鱼糜和 200 g 蒸馏水, 于搅拌机中再次搅拌 1 min, 确保混合均匀; 混合物在 3 000 rpm 条件下离心 10 min; 待混合物分层后, 吸取上清液备用。采用日本 Insent 公司 TS - 5000Z 型电子舌进行分析。

### 1.3.7 游离氨基酸的分析

样品制备: 准确称取鱼肉 20 mg 于安培瓶中, 加入 10 mL 6 mol/L 的盐酸, 充氮气后封管。置于 110 ℃ 烘箱水解 24 h 后减压蒸干。用 0.02 mol/L 的盐酸定容至 10 mL, 备用。

异硫氰酸苯酯柱前衍生法: 样品 200 μL 于 1 mL 离心管中, 加入 100 μL 三乙胺溶液, 异硫氰酸苯酯 100 μL, 混匀, 室温放置 1 h, 然后加入 400 mL 正己烷振摇, 充分混匀并静置 10 min 分层, 取下层溶液, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 备用。

采用 Agilent1100 液相色谱仪, Venusil - AA 氨基酸分析柱 4.6 mm × 250.0 mm, 5 μm 色谱柱。柱温: 40 ℃; 检测波长: 254 nm; 流动相 A: 0.1 mol/L 醋酸钠 (含 7 % 乙腈); 流动相 B: 80 % 乙腈; 流速: 1 mL/min, 进行梯度洗脱 (0 ~ 11 min, 100% ~ 93% A; 11 ~ 13.9 min, 93% ~ 88% A; 13.9 ~ 14 min, 88% ~ 85% A; 14 ~ 29 min, 85% ~ 66% A; 29 ~ 32 min, 66% ~ 30% A; 32 ~ 35 min, 30% ~ 0% A; 35 ~ 36 min, 0 ~ 100% A)。

采用呈味强度值 (taste activity value, TAV) 评价单个游离氨基酸对鱼肉的滋味贡献。滋味阈值指被人味觉所能感知到的最低浓度的数值, TAV > 1: 该物质对呈味有贡献, TAV 越大, 贡献越大; TAV < 1: 该物质对呈味没有贡献<sup>[19]</sup>。其评价公式为:

$$TAV = C_1 / C_2 \quad (1)$$

式中:  $C_1$  为滋味化合物的质量浓度 (mg/100 g);  $C_2$  为滋味阈值浓度 (mg/100 g)。

## 1.4 数据分析

单因素实验用 Origin 2017 软件进行分析, 响应面实验用 Design-Expert 8.0.6.1 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 未发酵罗非鱼的氨基酸态氮和 TVB-N

对未发酵罗非鱼进行氨基酸态氮和 TVB - N 的测定, 其值分别为 28.35 mg/100 g, 11.08 mg/100 g。

### 2.2 发酵菌种比例的确定

由于当发酵制品的 pH 值低于 4.6 时, 溶血梭状

芽孢杆菌 (*Clostridium haemolyticus*) 与 C 型和 D 型肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*) 无法生长,所以理想产品的 pH 值应小于 4.6,使产品获得更高的安全性。

图 2 为不同菌种比例对产品 pH 值的影响。从图中可以看出,在其他发酵条件均相同且适宜的情况下,菌种对罗非鱼可控发酵产品的 pH 影响较大,复合菌种体积比为 1:1 时, pH 最小,可能由于复合菌种产生了协同作用,在发酵初期由于发酵坛内存在一些空气,酿酒酵母进行有氧发酵并且消耗氧气,将发酵坛营造为无氧环境,为乳酸乳球菌营造了良好的生长环境,从而大量增殖,产生乳酸,导致 pH 降低。而若复合菌种中酿酒酵母的比例较高,酿酒酵母产生酒精过多可能会抑制乳酸乳球菌的生长,导致 pH 偏高。若复合菌种中酿酒酵母的比例偏低,酿酒酵母消耗氧气的速率变慢,乳酸乳球菌适宜生长的时间变少,也会使 pH 偏高。曾雪峰<sup>[10]</sup>的研究结论与本研究相似:接种混合发酵剂发酵的酸鱼比接种单一菌种发酵的酸鱼品质更好。综上,选择复合菌种比例为 1:1 作为最有利于罗非鱼可控发酵产品的制备条件。

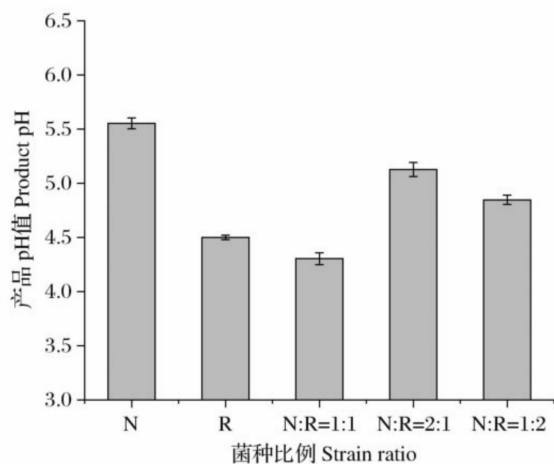


图 2 不同菌种比例对产品 pH 值的影响

N:酿酒酵母;R:乳酸乳球菌乳酸亚种

Fig. 2 Effects of different strains ratio on pH value of products

N: *Saccharomyces cerevisiae*; R: *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*

## 2.3 可控发酵罗非鱼的单因素实验结果

### 2.3.1 发酵时间的确定

氨基酸态氮值指的是以氨基酸形式存在的 N 元素的含量,是判断发酵食品发酵程度的特性指标,该值越大,表明产品的氨基酸含量越高,营养价值越高,滋味越好。

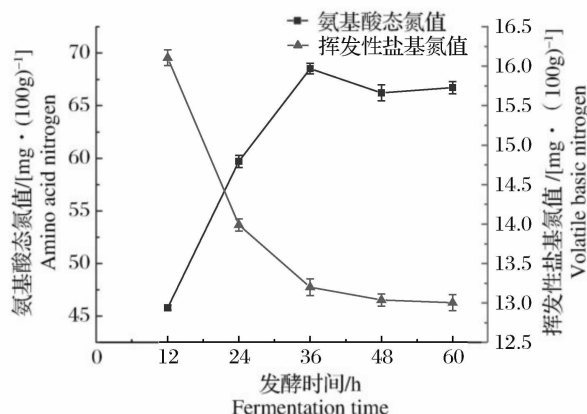


图 3 发酵时间对氨基酸态氮和 TVB-N 的影响

Fig. 3 Effects of fermentation time on amino acid nitrogen and volatile basic nitrogen

图 3 为发酵时间对氨基酸态氮和 TVB-N 的影响。由图可知,当发酵时间短于 36 h 时,氨基酸态氮值随着发酵时间的增多而增加,而当发酵时间超过 36 h 后,氨基酸态氮值趋于稳定。这是因为随着发酵时间的延长,菌体生长旺盛,数量增多,其分解蛋白质的量增多,并且随着发酵时间的延长,菌体产生的蛋白酶也越多,蛋白酶分解蛋白质增多,从而使氨基酸态氮值增多。而当发酵时间达到 36 h 之后,发酵液中可用碳源逐渐耗尽,菌体进入衰亡期,导致菌体数量不再增加,氨基酸态氮值也就不再增加。因此,从氨基酸态氮值的角度考虑,选择 36 h 为最佳发酵时间。

TVB-N 含量高,代表氨基酸被破坏的较多,营养价值将受到影响。在水产品中限值为 30 mg/100 g<sup>[20]</sup>。由图 3 可知,随着发酵时间的延长,TVB-N 值呈现逐渐下降直至趋于稳定的趋势,说明可较好地抑制腐败菌生长。因此,选择 36 h 为最佳发酵时间。

### 2.3.2 接种量的确定

图 4 为接种量对氨基酸态氮和 TVB-N 的影响。由图 4 可知,当接种量 < 5% 时,氨基酸态氮值随着接种量的增加而增加;当接种量 > 5% 时,氨基酸态氮值随着接种量的增加而减小。分析原因是:当接种量较小时,发酵液中所供给的能量足以供菌体生长繁殖,菌体生长旺盛,菌体自身能将蛋白质分解为氨基酸,菌体分泌的酶也能分解蛋白质;而当接种量较大时,发酵液所供给的能量不足,菌体生长受到抑制,因而分解蛋白质的能力下降。

TVB-N 值随着接种量的增加而减少直至趋于稳定,表明腐败菌受到了明显抑制,而当接种量 > 5% 时,再增加接种量并不会对腐败菌的抑制作用产生明

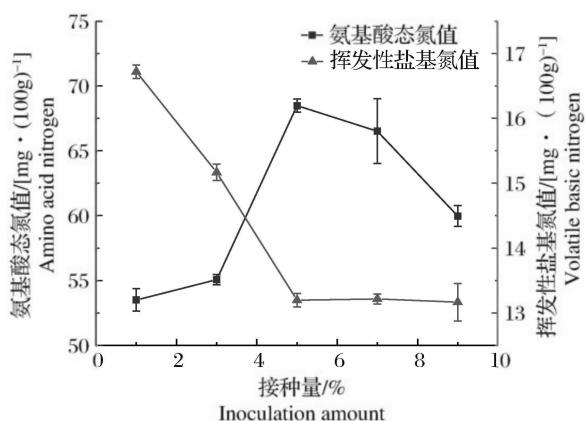


图4 接种量对氨基酸态氮和TVB-N的影响

Fig. 4 Effects of inoculation amount on amino acid nitrogen and volatile basic nitrogen

显效果。因此,优化实验的选择较优接种量水平为3%、5%和7%。

### 2.3.3 腌制盐浓度的确定

图5为腌制盐浓度对氨基酸态氮和TVB-N的影响。由图可知,随着腌制盐浓度的上升,氨基酸态氮值呈现先上升后降低的趋势,表明当腌制盐浓度较小时,添加的2种菌生长受到杂菌影响,导致氨基酸态氮值较小;当腌制盐浓度升高时,杂菌生长受到抑制,从而使氨基酸态氮值升高;而当盐浓度较高时,将会抑制乳球菌与酿酒酵母的生长繁殖,使得氨基酸态氮值下降。TVB-N值随着盐浓度的上升而下降,可能是因为盐抑制了鱼肉的腐败变质。食盐摄入多将会不利于人体健康,因而优化实验选择的较优腌制盐浓度水平为3%、5%和7%。

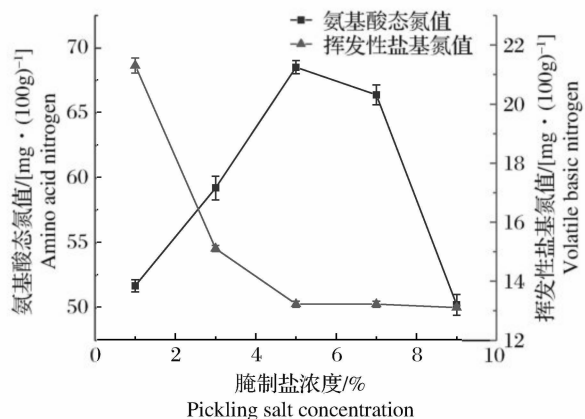


图5 腌制盐浓度对氨基酸态氮和TVB-N的影响

Fig. 5 Effects of pickling salt concentration on amino acid nitrogen and volatile basic nitrogen

### 2.3.4 发酵温度的确定

由图6可知,氨基酸态氮值在15~25℃范围内随着温度的升高而增加,在25℃达到峰值,温度超过25℃时随温度升高而减小,说明混合菌的最适生长温度为25℃左右,低温和高温均会影响菌的生长以及蛋白酶的分泌及活性。TVB-N值在15~25℃时略有降低,在25~35℃时升高,表明添加的2种菌抑制了腐败菌的生长,温度低时添加的菌与有害菌均生长较为缓慢,温度高时偏离了添加菌株的最适生长温度,有害菌生长加快,导致TVB-N升高,但是添加的菌株仍然能抑制有害菌生长,所以TVB-N仍在正常值范围内( $<30 \text{ mg}/100 \text{ g}$ )。因此,优化实验选择的较优温度水平为20、25及30℃。

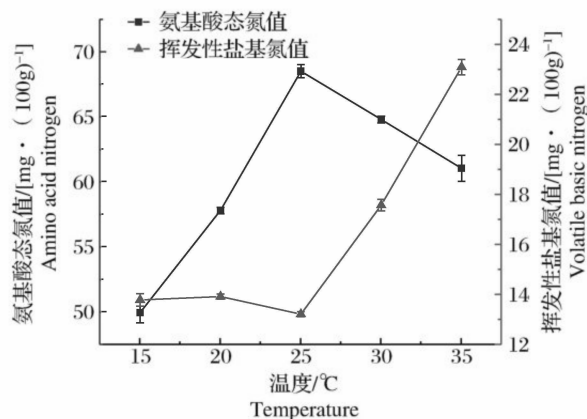


图6 温度对氨基酸态氮和TVB-N的影响

Fig. 6 Effects of temperature on amino acid nitrogen and volatile basic nitrogen

### 2.3.5 腌制时间的确定

图7为腌制时间对氨基酸态氮和TVB-N的影响。由图可知,氨基酸态氮值随着腌制时间的增加而增大,当腌制时间达到3h后,氨基酸态氮值趋于稳定,不再随着腌制时间的延长而增大。TVB-N值随着腌制时间的增加而降低。这表明腌制时间较短时,盐分在鱼肉中的扩散未达到饱和,鱼肉中的盐浓度不能明显抑制腐败菌生长,而随着腌制时间的增加,盐分往鱼肉中的扩散趋于饱和,鱼肉中的盐分能较好地抑制腐败菌生长,TVB-N趋于稳定。因此,优化实验选择最佳腌制时间水平为3h。

## 2.4 响应面法优化可控发酵罗非鱼工艺参数

利用Design Expert 8.0.6.1软件对表2中的实验数据进行回归分析,得到以氨基酸态氮值为响应值的三元二次多项回归方程:

$$\text{氨基酸态氮值} = 68.46 + 3.27A + 3.49B + 5.75C$$

$-0.28AB + 0.13^4C - 0.077BC - 6.93A^2 - 5.68B^2 - 7.66C^2$

式(2)

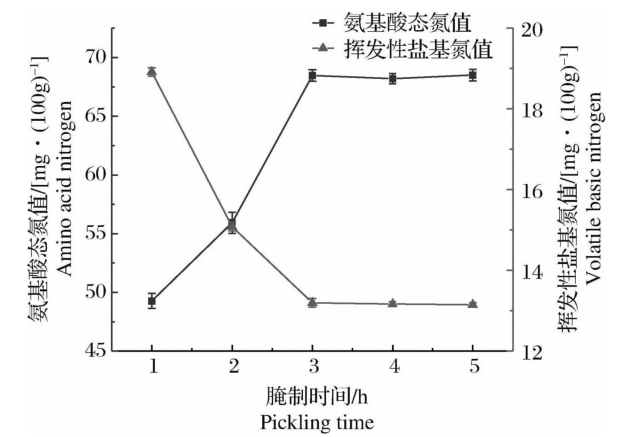


图7 腌制时间对氨基酸态氮和 TVB-N 的影响

Fig.7 Effects of pickling time on amino acid nitrogen and volatile basic nitrogen

所得方程的方差分析结果见表3。一次项 A、B、C 和二次项 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> 以及交互作用 AB、AC 对回归方程有显著影响,同时,回归模型  $P < 0.0001$ ,失拟项  $P > 0.05$ 。由统计分析可知,回归模型相关系数  $Pred R - Squared = 0.9995$ ,调整系数  $Adj R - Squared = 0.99$ ,信噪比  $Adeq Precision = 369.784$ ,信噪比结果  $> 4$ ,说明所建立的回归方程拟合程度较好,可以用来确定罗非鱼发酵最佳工艺条件。

选择 Design Expert V 8.0.6.1 软件分析计算回归方程,得出罗非鱼人工发酵最佳工艺条件:发酵温度 26.16℃,腌制盐浓度 5.60%,接种量 5.75%,在此条件下进行发酵,氨基酸态氮值的理论值能达到 70.45 mg/100 g。出于对实验操作可行性的考虑,在实际操作时采用的条件为:发酵温度 26℃,腌制盐浓度 5.5%,接种量 6%,在此条件下进行验证实验,得到的氨基酸态氮值为 70.14 mg/100 g,略低于理论值。

表2 可控发酵工艺响应面分析方案及结果

Tab.2 The program and effects of Box-Behnken analysis of controlled fermentation process

| 实验序号<br>Experiment number | A 温度/℃<br>Temperature | B 腌制盐浓度/%<br>Pickling salt concentration | C 接种量/%<br>Inoculation amount | 氨基酸态氮值/[mg·(100 g) <sup>-1</sup> ]<br>Amino acid nitrogen |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1                         | 30                    | 3                                        | 5                             | 56.00                                                     |
| 2                         | 25                    | 5                                        | 5                             | 68.55                                                     |
| 3                         | 25                    | 5                                        | 5                             | 68.47                                                     |
| 4                         | 20                    | 5                                        | 7                             | 56.30                                                     |
| 5                         | 30                    | 5                                        | 3                             | 51.22                                                     |
| 6                         | 25                    | 3                                        | 3                             | 45.80                                                     |
| 7                         | 25                    | 5                                        | 5                             | 68.50                                                     |
| 8                         | 30                    | 5                                        | 7                             | 63.01                                                     |
| 9                         | 25                    | 7                                        | 3                             | 53.00                                                     |
| 10                        | 20                    | 5                                        | 3                             | 45.02                                                     |
| 11                        | 20                    | 7                                        | 5                             | 56.28                                                     |
| 12                        | 30                    | 7                                        | 5                             | 62.35                                                     |
| 13                        | 25                    | 5                                        | 5                             | 68.40                                                     |
| 14                        | 25                    | 5                                        | 5                             | 68.40                                                     |
| 15                        | 20                    | 3                                        | 5                             | 48.80                                                     |
| 16                        | 25                    | 7                                        | 7                             | 64.29                                                     |
| 17                        | 25                    | 3                                        | 7                             | 57.40                                                     |

表 3 回归模型系数及显著性检验结果

Tab. 3 Regression model coefficients and significance test results

| 来源              | 平方和 Sum of square | 自由度 Degrees of freedom | 均方 Mean square          | F 值 F value | P 值 P value |
|-----------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-------------|-------------|
| 模型              | 1 100. 290        | 9                      | 122. 250                | 17 830. 58  | <0. 000 1   |
| A - 温度          | 85. 610           | 1                      | 85. 610                 | 12 485. 59  | <0. 000 1   |
| B - 盐浓度         | 97. 440           | 1                      | 97. 440                 | 14 211. 60  | <0. 000 1   |
| C - 接种量         | 264. 390          | 1                      | 264. 390                | 38 560. 16  | <0. 000 1   |
| AB              | 0. 320            | 1                      | 0. 320                  | 46. 56      | 0. 002 0    |
| AC              | 0. 063            | 1                      | 0. 063                  | 9. 12       | 0. 019 4    |
| BC              | 0. 024            | 1                      | 0. 024                  | 3. 50       | 0. 103 4    |
| A <sup>2</sup>  | 202. 040          | 1                      | 202. 040                | 29 466. 52  | <0. 000 1   |
| B <sup>2</sup>  | 135. 820          | 1                      | 135. 820                | 19 808. 82  | <0. 000 1   |
| C <sup>2</sup>  | 247. 180          | 1                      | 247. 180                | 36 051. 45  | <0. 000 1   |
| 残差 Residual     | 0. 048            | 7                      | $6. 856 \times 10^{-3}$ |             |             |
| 失拟项 Lack of Fit | 0. 031            | 3                      | $1. 036 \times 10^{-6}$ | 2. 45       | 0. 203 5    |
| 纯误差 Pure Error  | 0. 017            | 4                      | $4. 230 \times 10^{-3}$ |             |             |
| 总和 Cor Total    | 1 100. 340        | 16                     |                         |             |             |

注:  $P < 0.01$  差异性极显著;  $P < 0.05$  差异性显著。

根据上述回归方程可以得出不同因素的响应面图和等高线图:

由图 8A 可知,当温度固定时,随着盐浓度的升高,氨基酸态氮值呈现先上升后下降的趋势;当盐浓度固定时,随着温度的升高,氨基酸态氮值先上升,到达峰值后下降。说明温度与盐浓度都会影响氨基酸态氮值:盐浓度过低不足以抑制腐败菌的生长,盐浓度过高则会抑制有益菌的生长;温度过低或过高都会影响添加菌株的生长及酶活,从而影响氨基酸态氮值,因此要在合适的盐浓度与温度下才能获得较高的氨基酸态氮值。由图 8B 可知,当温度固定时,随着接种量的增加,氨基酸态氮值先上升,到达峰值后下降;当接种量固定时,随着温度的升高,氨基酸态氮值先上升,到达峰值后下降。说明接种量会影响氨基酸态氮值:接种量少,在有限时间内,菌产生的蛋白酶少,从而导致氨基酸态氮值少;接种量多,提供的碳源不足,也会影响菌的生长,进而导致氨基酸态氮值少。温度也会影响氨基酸态氮值,只有在适宜的温度下,菌体才能较快生长、蛋白酶有较高活力,才能较好地分解蛋白质,产

生氨基酸态氮。由图 8C 可知,当盐浓度固定时,随着接种量的增加,氨基酸态氮值先上升,到达峰值后下降;当接种量固定时,随着盐浓度的升高,氨基酸态氮值先上升,到达峰值后下降。

从氨基酸态氮的角度分析,可控发酵罗非鱼中的含量达 70.14 mg/100 g,未发酵罗非鱼为 28.35 mg/100 g。氨基酸态氮的值越高代表营养价值越高,滋味越好,因此,可控发酵罗非鱼的营养价值优于未发酵罗非鱼。

## 2.5 游离氨基酸的分析

罗非鱼在发酵期间,微生物与酶的共同作用会促进罗非鱼中肌原纤维蛋白、肌浆蛋白的降解,使得游离氨基酸的含量上升<sup>[22]</sup>。一些游离氨基酸是香味的前体物质、具有呈味作用,还会与有机酸、核苷酸、总糖和无机盐等相互作用,对鱼肉鲜味的呈现有重要作用。发酵罗非鱼样品中游离氨基酸的总量显著高于未发酵罗非鱼,说明罗非鱼发酵过程中由于蛋白质降解产生大量游离氨基酸。除甘氨酸外,其余游离氨基酸的含量均高于未发酵罗非鱼。



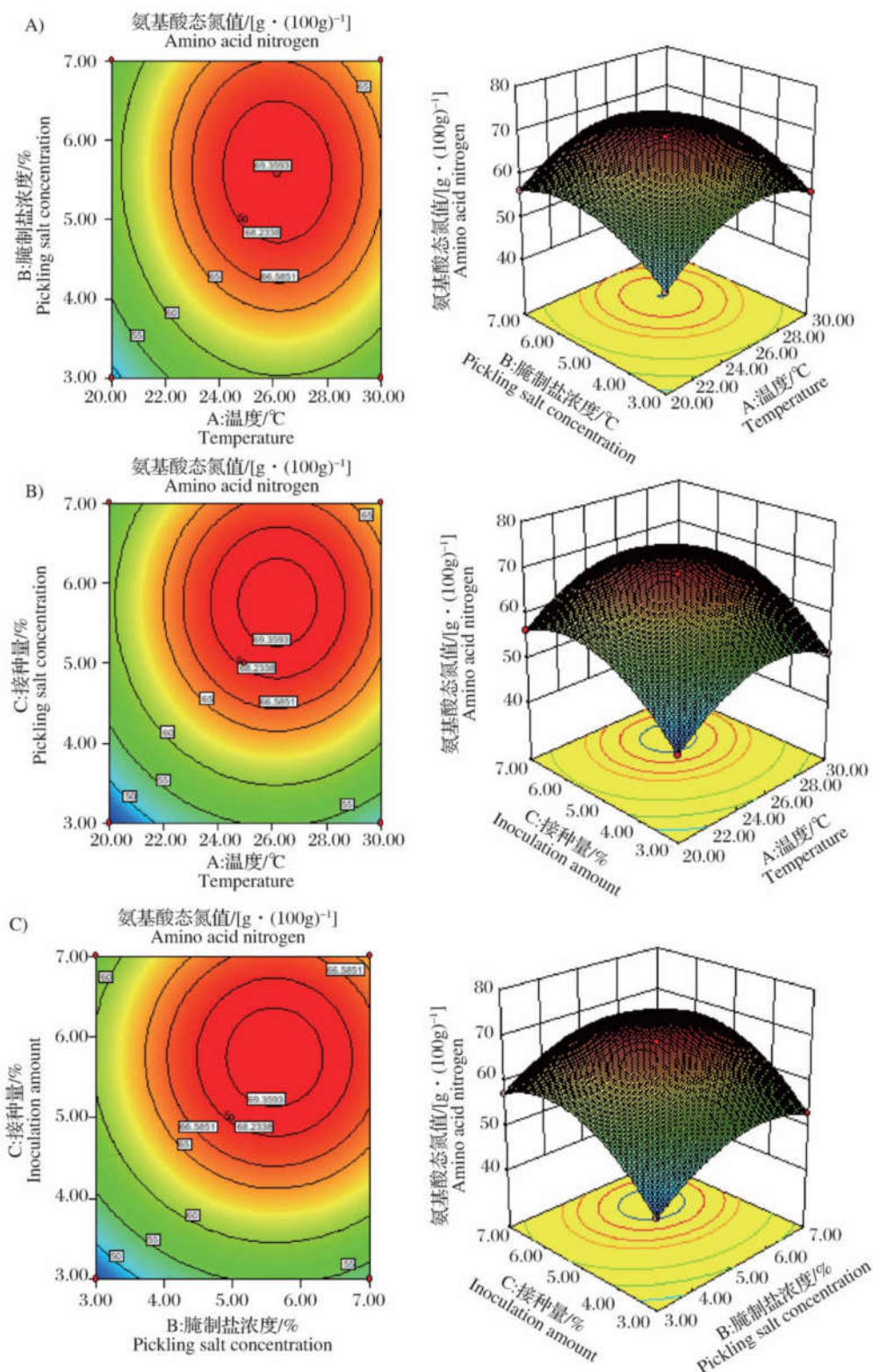


图8 各因素交互作用对氨基酸态氮值的影响

A) 温度和腌制盐浓度; B) 温度和接种量; C) 腌制盐浓度和接种量

Fig. 8 Effects of interactions of various factors on amino acid nitrogen values

A) Temperature and pickling salt concentration; B) Temperature and inoculation amount; C) Pickling salt concentration and inoculation amount



表 4 不同鱼肉游离氨基酸含量  
Tab. 4 Free amino acids contents of different fish

| 氨基酸种类<br>Amino acid species | 呈味特性<br>Flavor characteristics | 未发酵鱼肉<br>Unfermented fish | 可控发酵鱼肉<br>Controlled fermented fish | 滋味阈值 <sup>[21]</sup> /[mg · (100 g) <sup>-1</sup> ]<br>Taste threshold |
|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Asp 天冬氨酸                    | 鲜味                             | 1.0                       | 15.0                                | 3                                                                      |
| Thr 苏氨酸                     | 甜味                             | 3.0                       | 16.6                                | 260                                                                    |
| Ser 丝氨酸                     | 甜味                             | 3.5                       | 16.0                                | 150                                                                    |
| Glu 谷氨酸                     | 鲜味                             | 7.0                       | 57.0                                | 5                                                                      |
| Gly 甘氨酸                     | 甜味                             | 85.5                      | 53.5                                | 130                                                                    |
| Ala 丙氨酸                     | 甜味                             | 17.0                      | 65.0                                | 60                                                                     |
| Cys 半胱氨酸                    | 甜味/苦味                          | 8.5                       | 28.0                                | ND                                                                     |
| Val 缬氨酸                     | 甜味/苦味                          | 3.0                       | 33.5                                | 40                                                                     |
| Met 甲硫氨酸                    | 苦味                             | 0.5                       | 24.5                                | 30                                                                     |
| Ile 异亮氨酸                    | 苦味                             | 1.5                       | 27.5                                | 90                                                                     |
| Leu 亮氨酸                     | 苦味                             | 2.5                       | 56.0                                | 190                                                                    |
| Tyr 色氨酸                     | 苦味                             | 2.0                       | 24.5                                | ND                                                                     |
| Phe 苯丙氨酸                    | 苦味                             | 4.5                       | 38.5                                | 90                                                                     |
| His 组氨酸                     | 苦味                             | 16.0                      | 38.5                                | 50                                                                     |
| Lys 赖氨酸                     | 苦味                             | 10.0                      | 42.5                                | 20                                                                     |
| Arg 精氨酸                     | 苦味                             | 4.0                       | 5.5                                 | 50                                                                     |
| Pro 脯氨酸                     | 甜味                             | 6.0                       | 12.5                                | 300                                                                    |
| 总量                          |                                | 175.5                     | 554.6                               |                                                                        |

注:ND 表示滋味阈值无数据。

表 5 不同鱼肉呈味氨基酸含量及呈味强度值(TAV 值)  
Tab. 5 Taste amino acid contents and TAV values of different fish

| 呈味氨基酸<br>Taste amino acid | 未发酵鱼肉 Unfermented fish                      |                    |  | 可控发酵鱼肉 Controlled fermented fish            |                    |  |
|---------------------------|---------------------------------------------|--------------------|--|---------------------------------------------|--------------------|--|
|                           | 含量/[mg · (100 g) <sup>-1</sup> ]<br>Content | TAV 值<br>TAV value |  | 含量/[mg · (100 g) <sup>-1</sup> ]<br>Content | TAV 值<br>TAV value |  |
| Asp 天冬氨酸                  | 1.0                                         | 0.33               |  | 15.0                                        | 5.00               |  |
| Glu 谷氨酸                   | 7.0                                         | 1.20               |  | 57.0                                        | 11.40              |  |
| Gly 甘氨酸                   | 85.5                                        | 0.66               |  | 53.5                                        | 0.41               |  |
| Ala 丙氨酸                   | 17.0                                        | 0.28               |  | 65.0                                        | 1.08               |  |
| Ser 丝氨酸                   | 3.5                                         | 0.02               |  | 16.0                                        | 0.11               |  |
| Pro 脯氨酸                   | 6.0                                         | 0.02               |  | 12.5                                        | 0.04               |  |
| 总量                        | 120.0                                       |                    |  | 219.0                                       |                    |  |

属于鲜味氨基酸的谷氨酸、天冬氨酸及丙氨酸的 TAV 值 > 1(表 5),表明这 3 种呈味氨基酸对味觉起着较为明显的作用。谷氨酸已被证明是食品中的味觉活性成分<sup>[23]</sup>,在发酵罗非鱼中,其 TAV 值最高,

达到了 11.4,与鸟苷酸、腺苷酸及鱼死后体内积累的 5'-肌苷酸二钠盐复配能够产生鲜味相乘作用<sup>[24]</sup>,还可引出肉类、鱼贝类、果实类、海藻类和食用菌等的鲜味成分<sup>[25]</sup>,是呈现发酵罗非鱼鲜味的重要成分。

表6 不同鱼肉必需氨基酸含量

Tab.6 Essential amino acid contents of different fish

mg · (100 g)<sup>-1</sup>

| 必需氨基酸                | 未发酵鱼肉            | 可控发酵鱼肉                    |
|----------------------|------------------|---------------------------|
| Essential amino acid | Unfermented fish | Controlled fermented fish |
| Lys 赖氨酸              | 10.0             | 42.5                      |
| Phe 苯丙氨酸             | 4.5              | 38.5                      |
| Met 甲硫氨酸             | 0.5              | 24.5                      |
| Thr 苏氨酸              | 3.0              | 16.6                      |
| Ile 异亮氨酸             | 1.5              | 27.5                      |
| Leu 亮氨酸              | 2.5              | 56.0                      |
| Val 缬氨酸              | 3.0              | 33.5                      |
| Tyr 色氨酸              | 2.0              | 24.5                      |
| 总量                   | 27.0             | 263.6                     |

发酵罗非鱼制品中,人体必需氨基酸含量显著上升,说明可控发酵罗非鱼的氨基酸组成优于未发酵罗非鱼。

综上所述,可控发酵罗非鱼所含的游离氨基酸、呈味氨基酸、鲜味氨基酸及必需氨基酸含量均大于未发酵罗非鱼,说明可控发酵罗非鱼的营养及风味均有所提升。

2.6 电子舌的分析

未发酵罗非鱼和发酵罗非鱼的味觉雷达图如图9所示,发酵前后鱼肉味道有较大差异,说明发酵对罗非鱼的味道有较程度的改变。发酵后的鱼肉苦味和涩味均有较程度的降低。咸味有所提高,这是因为发酵罗非鱼在加工工艺中进行了盐水腌制,盐分进入鱼肉,赋予鱼肉咸味。鲜味有较大提升,这与前文所测定的游离氨基酸含量、氨基酸态氮含量相吻合,说明发酵能使鱼肉蛋白质分解为小分子的肽和氨基酸,使鱼肉鲜味提升。总体来说,发酵后的罗非鱼味道更好。

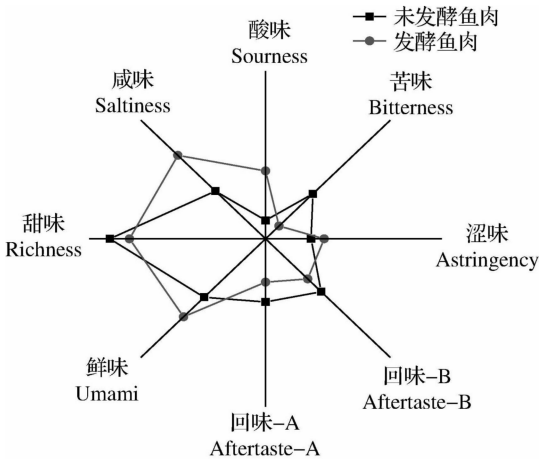


图9 电子舌雷达图

Fig.9 Electronic tongue radar chart

3 结论

本研究探究了罗非鱼发酵技术,将酿酒酵母与乳酸乳球菌应用到罗非鱼发酵中,通过单因素实验与响应面实验得到发酵罗非鱼的最佳工艺条件是:发酵温度 26 ℃,腌制盐浓度 5.5%,接种量 6%,腌制时间 3 h,发酵时间 36 h。发酵罗非鱼与未发酵的鱼相比,发酵罗非鱼氨基酸态氮值升高,达到 70.14 mg/100 g;游离氨基酸含量增多,达到 554.6 mg/100 g;必需氨基酸含量增多,达到 263.6 mg/100 g。发酵罗非鱼具有特殊的发酵风味,风味与营养成分均较好,本研究为罗非鱼的深加工进行了初步探索。

参考文献:

[1] 赵志霞,吴燕燕,李来好,等. 我国罗非鱼加工研究现状[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 363-367, 373.

[2] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会. 2018 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.

[3] 王世表,宋铎,黄磊. 中国罗非鱼产业现状、存在问题和发展对策[J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(5): 27-31.

[4] 赵海军,杨彬彬,郝跃,等. 我国罗非鱼出口现状及对策[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 5100-5106.

[5] 王文勇,张英慧,赖长生. 罗非鱼带骨鱼排罐头的加工工艺研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(8): 99-105.

[6] 薛佳. 罗非鱼加工下脚料速酿低盐优质鱼露的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.

[7] 张文婷,李婕,陈健. 三聚磷酸盐提高罗非鱼鱼糜抗冻性研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(8): 15-19.

[8] Gao P, Wang W, Jiang Q, et al. Effect of autochthonous starter cultures on the volatile flavor compounds of Chinese traditional fermented fish (Suan yu) [J]. Int J Food Sci Tech, 2016, 51(7): 1630-1637.

[9] Pei G, Wang W, Xia W, et al. Lipolysis and lipid oxidation caused by Staphylococcus xylosus 135 and Saccharomyces cerevisiae 31 isolated from Suan yu, a traditional Chinese low-salt fermented fish[J]. Int J Food Sci Tech, 2016, 51(2): 419-426.

[10] 曾雪峰. 淡水鱼发酵对酸鱼品质影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.

[11] 吴小芳. 乳酸乳球菌 LspA 对 NisI 成熟及 nisin 产量影

- 响的研究[D]. 天津: 天津大学, 2018.
- [12] 田文利, 吴琼, 吕红线, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)的研究进展[J]. 食品工业, 2000(3): 28-30.
- [13] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis* [J]. Appl microbiol biot, 2005, 68(6): 705-717.
- [14] LO'Sullivan, Ross R, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality[J]. Biochimie (Paris), 2002, 84(5/6): 593-604.
- [15] Eva R, Beatriz G, Gaya P, et al. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk[J]. Int Dairy J, 2000, 10(1): 7-15.
- [16] Zhang C, Song Z, Li F, et al. Influence of *Monascus* fermentation on storage characteristics of semidry salted Tilapia[J]. J Aquat Food Prod Technol, 2017, 26(10): 1122-1133.
- [17] 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.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中挥发性盐基氮的测定: GB 5009.228—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [19] 王蔚新. 酸鱼发酵过程中蛋白质降解及其风味形成机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [20] Sikorski Z, Kolakowska A, et al. Seafood: Resource, Nutritional Composition and Preservation[M]. Florida: CRC Press, 1990(3): 29-54.
- [21] 薛永霞, 卫赛超, 张菊, 等. 尼罗罗非鱼制作传统上海熏鱼过程中的风味变化[J]. 水产学报, 2019, 43(7): 1661-1677.
- [22] 韦诚. 发酵过程中酸肉蛋白质的变化及其对食用品质的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [23] Park J N, Watanabe T, Endoh K I, et al. Taste active components in a Vietnamese fish sauce [J]. Fisheries Sci, 2002, 68(4): 913-920.
- [24] 刘静泊, 陈季旺, 夏文水, 等. 风干武昌鱼的营养及挥发性成分[J]. 食品科学, 2015, 36(18): 80-84.
- [25] 罗殷, 王锡昌, 刘源. 黄鳍金枪鱼食用品质的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 476-480.

## Study on controlled fermentation process optimization and taste of tilapia (*Oreochromis mossambicus*)

ZHANG Shiyun<sup>1</sup>, SUN Jianan<sup>1\*</sup>, XU Yunsheng<sup>2\*</sup>, MAO Xiangzhao<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572000, China)

**Abstract:** In order to increase the added value of processed *Oreochromis mossambicus* products, the feasibility of further processing for tilapia was explored. In this study, single-factor experiments and response surface experiments were conducted to optimize the fermentation conditions for *Oreochromis mossambicus* using *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis*. Electronic tongue and free amino acid analysis were performed on fermented *Oreochromis mossambicus* and unfermented *Oreochromis mossambicus*. The results showed that under a fermentation temperature of 26℃, a salt concentration of 5.5%, an inoculation amount of 6%, a fermentation time of 36 h, and a curing time of 3 h, the amino acid nitrogen value of fermented *Oreochromis mossambicus* reached 70.14 mg/100g. Compared with unfermented *Oreochromis mossambicus*, the content of free amino acids and essential amino acids are increased, which has the special taste of fermented products. This study explored the feasibility of further processing of *Oreochromis mossambicus* and provided technical support for the optimization of tilapia fermentation process. [Chinese Fishery Quality and Standards, 2020, 10(4): 26–36]

**Key words:** *Oreochromis mossambicus*; controlled fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactococcus lactis*; response surface

**Corresponding author:** SUN Jianan, sunjianan@ouc.edu.cn; XU Yunsheng, lyxys@163.com

(责任编辑: 徐锦华)