

贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株与外源蛋白酶协同发酵 对鲢鱼鱼露品质的影响

贺晓丽¹, 翁佩芳^{1*}, 沈 颺², 吴祖芳¹

(1. 宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832; 2. 舟山海关, 浙江 舟山 316100)

摘要: 为进一步研究接种贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) SW5 菌株对发酵鲢鱼鱼露品质的影响, 以低值鲢鱼为原料, 通过接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株, 并添加多种蛋白酶协同发酵鲢鱼鱼露. 测定氨基酸态氮(AA-N)质量浓度、pH 值和总酸质量浓度的变化, 采用电子舌和色差仪测定鱼露发酵完成后发酵液的鲜味成分含量和色泽, 与商品鱼露和酶解液进行对比. 结果表明, 在发酵过程中, 采用贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株与中性蛋白酶协同发酵, 发酵第 7 天 AA-N 质量浓度达到最高, 为 $13.93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 符合市售一级鱼露标准. 3 个处理组的色泽和鲜味成分含量与商品鱼露相近. 综上所述, 通过接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株和蛋白酶对鲢鱼鱼露进行协同发酵, 可以缩短发酵周期, 提高鱼露的产量以及 AA-N 和鲜味成分的含量. 因此, 该菌株可用作海洋蛋白源物质的发酵深加工.

关键词: 鲢鱼; 贝莱斯芽孢杆菌 SW5; 蛋白酶; 协同发酵; 鱼露

中图分类号: TS264.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2023) 02-0015-08

鲢鱼是目前世界上单一鱼种年产量最高的鱼类^[1]. 著名的秘鲁鲢鱼在 2019 年的捕捞量达到 310 万 t^[2]. 在我国, 鲢鱼也是历史上年产量最大的单一鱼类. 我国水产捕捞量的大幅增长依赖于鲢鱼产业的发展, 其有效减轻了其他经济鱼类的捕捞压力, 从而推动了水产品(如鱼粉、鱼油)加工业在沿海地区的发展; 鲢鱼在黄海、东海乃至全国渔业中占有举足轻重的地位^[1]. 鲢鱼富含蛋白质、不饱和脂肪酸和鲜味成分^[3]. 蒋定文等^[4]对鲢鱼干的营养成分进行了测定, 其中粗脂肪(16.0%)、粗蛋白(59.4%)、多糖(0.24%)和总糖(1.34%)含量均较高; 氨基酸多达 17 种, 必需氨基酸有 7 种, 其质量占总氨基酸质量的 38.68%, 鲜味氨基酸质量占总氨基酸质量的 46.81%. 鲢鱼还含有 8 种单不饱和脂肪酸(MUFA)、6 种多不饱和脂肪酸(PUFA)和 13 种饱和脂肪酸(SFA), 其质量分别约占脂肪酸总质量的 34.35%、5.83%和 60.0%. 鲢鱼富含多种矿物元素,

如 Na、Mg、Fe、Zn 等, 其中微量元素 Fe 和 Zn 的含量相对较高. 因此, 利用鲢鱼酿造鱼露具有较高的开发利用价值.

鱼酱油即鱼露, 是我国广东、福建一带常见的一种调味品. 鱼露的原料一般为小鱼、虾和鱼的下脚料, 制作中通常用大量的盐腌制, 发酵完成后高温煮沸, 成品的颜色为琥珀色^[5]. 鱼露常见的生产工艺有两种, 一种是将鱼和盐混合后, 自然发酵而成, 但是发酵周期很长; 另一种工艺是外加酶和曲, 在温度适宜的情况下, 可以适当缩短发酵周期. 周崇禅^[6]通过添加蛋白酶制剂和米曲等, 研究了以鲢鱼为原料, 采用稀醪发酵制备低盐鲢鱼鱼露的速酿工艺, 但仍存在发酵周期较长等困扰. 鱼露发展经过了漫长的时间, 到今天依然被人们所喜爱, 与它具有独特的鲜味和咸味这两种风味是分不开的. 一般认为, 鱼露的鲜味成分以肌苷酸钠、鸟苷酸钠、谷氨酸钠、琥珀酸钠为主, 咸味则以氯化钠为

收稿日期: 2022-08-03.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省公益类项目(LGG19C200002); 舟山市公益类科技项目(2022C31050).

第一作者: 贺晓丽(1992-), 女, 山东临沂人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品生物技术. E-mail: lxxsdxmm@163.com

*通信作者: 翁佩芳(1963-), 女, 浙江普陀人, 教授, 主要研究方向: 食品生物技术与食品安全. E-mail: wzfwpf@163.com

主。但是,鱼露的独特风味并不是仅仅由这些物质简单组合而成,而是由复杂的风味系统所赋予的水产原料发酵而成。据报道,鱼露主要成分有氨基酸、肽、有机酸、核酸羧基、挥发性酸、挥发性氮化物等^[7]。

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),也称为甲基营养型芽孢杆菌,是解淀粉芽孢杆菌的植物亚种^[8]。该菌株能从泥沙、土壤、植物根际、植物组织中分离出来,对人和动物无害,不对环境造成污染,并能产生次生代谢产物,对多种病原微生物有拮抗作用。近年来,对贝莱斯芽孢杆菌的研究主要集中在饲料、微生物食品加工与应用、医药、纺织、水产品、污水处理、植物保护等领域^[9]。贝莱斯芽孢杆菌具有抗菌谱广、生长速度快、分离培养容易、抗逆性强、生物安全性高等优点^[8]。虽然该菌株优点众多,研究领域也逐渐变广,但是,目前关于该菌株在鱼露发酵中的应用报道还很少,也没有发现该菌株与外源蛋白酶协同发酵的研究。因此,本研究以低值鲢鱼为原料,通过贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株和外源蛋白酶共同作用,测定发酵过程中鱼露的 pH 值、氨基酸态氮(AA-N)质量浓度、总酸质量浓度、色泽、鲜味成分含量等指标,来监测贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株与外源蛋白酶协同作用对发酵鲢鱼鱼露品质的影响,旨在找到贝莱斯芽孢杆菌发酵鲢鱼鱼露的正确处理方式,并通过蛋白酶与该菌种协同发酵来解决鱼露发酵周期长、AA-N 含量低等问题。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种:贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株,由宁波大学食品生物技术实验室保藏于中国微生物菌种保藏中心,保藏编号 CGMCC 1.16723。

鲢鱼:浙江省舟山兴业有限公司提供,使用前-40℃冰箱冷冻保存;鲢鱼酶解液、商品鱼露:均由浙江省舟山兴业有限公司提供;食盐:购于超市;LB 培养基:购于杭州微生物试剂股份有限公司;浓硫酸、浓盐酸、甲醛、氢氧化钠、硫酸铜、硫酸钾、氯化钙:均购于国药化学试剂股份有限公司;中性蛋白酶(酶活 $5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)、木瓜蛋白酶(酶活 $5 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$):均购于北京索莱宝科技有限公司;胰

蛋白酶(酶活 $2.5 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$):购于上海源叶生物科技有限公司;琼脂:购于大连美仑生物科技股份有限公司;水:按照 GB/T 6682 的标准,为 III 类水。

1.2 仪器与设备

FA2004 分析天平:上海舜宇恒平科学仪器有限公司;ZJ-HCB-1200 洁净工作台:广州梓净净化设备有限公司;SPX 智能生化保温箱:江南仪器厂;5418R 低温超速离心机:德国 Eppendorf 公司;HWS-11 恒温水浴锅:上海慧泰仪表制造有限公司;LDZX-40BI 立式蒸汽灭菌器:上海申安医疗器械厂;DM-40L262 -40℃冰箱:青岛海尔电器专用设备股份有限公司;BD-252WY -20℃冰箱:容声冰箱有限公司;SCIENTZ-18N 冷冻干燥机:宁波新芝仪器厂;TS-UR 振荡培养箱:浙江华盛源仪器有限公司;UPH-I-5T 超纯水器:成都超纯科技有限公司;SmarTongue 电子舌:上海瑞玢国际贸易有限公司;CR-400 色差仪:日本 KonicaMinolta 公司。

1.3 方法

1.3.1 种子液制备

将贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株从试管斜面接种到 LB 液体培养基中,并在 37℃、120 r·min⁻¹ 恒温振荡下培养 12 h,备用^[10]。

1.3.2 原材料处理

将-40℃冰箱中的冷冻鲢鱼放在流水中解冻,晾干。使用包括头部和内脏在内的整鱼进行实验。将鲢鱼和蒸馏水以质量比 1:0.6 混合,并使用绞肉机研磨成鱼糜,然后放入 280 mL 发酵瓶中,每瓶 150 g 鱼糜,分装 6 瓶,用封口膜密封。将 3 瓶置于高压蒸汽灭菌锅中,121℃,15 min 达到高压蒸汽灭菌的目的,冷却备用。另外 3 瓶放入 75℃的水浴锅中,当鱼糜样品的中心温度达到 75℃时,保持 21 min 达到巴氏杀菌的目的,冷却备用^[11]。

1.3.3 鱼露样品制备

处理组 1:取鱼糜质量 5%的贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株的种子液,在 4℃下以 7000g 离心 15 min,得到菌体细胞,并将菌体细胞接种至高压蒸汽灭菌后的鱼糜中,在温度 37℃、转速 120 r·min⁻¹ 条件下发酵 3 d,加入鱼糜质量 14%的食盐继续发酵;处理组 2:取巴氏灭菌之后的鱼糜进行与处理组 1 相同的操作。每个处理组做 3 个平行。同时测定处理组 1 和处理组 2 的 AA-N 质量浓度、总酸质量浓

度、pH 等指标, 对比之后, 选出结果较好的一组进行后续实验。

将上述实验选出的优势组进行以下 3 组实验。A 组: 将 30 mL 0.08%^[6]胰蛋白酶(胰蛋白酶溶液提前在超净工作台内用 0.22 μm 滤膜过滤)、鱼糜质量 5% 的贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株的种子液、经离心 (7000g, 4 $^{\circ}\text{C}$) 15 min 得到的菌体细胞, 共同加入鱼糜中, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 120 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下发酵 3 d 后, 添加鱼糜质量 14% 的食盐, 继续发酵; B 组: 将胰蛋白酶换成木瓜蛋白酶, 其余操作均与 A 组相同; C 组: 将胰蛋白酶换成中性蛋白酶, 中性蛋白酶溶液需要用 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钙溶液配制, 激活其活性^[12], 其余操作均与 A 组相同。每个处理组做 3 个重复, 实验重复 3 次。

1.3.4 分析方法

(1)待测样品的制备。每天取 10 mL 发酵醪液, 利用高速冷冻离心机(7000g, 25 $^{\circ}\text{C}$)离心 10 min, 取出中层清液, 再次离心(7000g, 25 $^{\circ}\text{C}$) 10 min, 将中层清液取出过滤, 所得滤液于水浴锅中 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭菌 20 min, 制备成待测样品^[13]。

(2)营养成分的测定。水分: 采用直接干燥法, 参照 GB 5009.3—2016《食品中水分的测定》; 灰分: 采用马弗炉灰化法, 参照 GB 5009.4—2016《食品中灰分的测定》; 粗脂肪: 采用索氏抽提法, 参照 GB 5009.6—2016《食品中脂肪的测定》; 粗蛋白: 采用凯氏定氮法, 参照 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》。

(3)样品的测定。AA-N 质量浓度: 采用甲醛滴定法, 参照 GB 5009.235—2016《食品中 AA-N 的测定》; pH 值: 采用数字式 pH 计法; 总酸质量浓度: 采用 pH 计电位滴定法, 参照 GB 12456—2021《食品中总酸的测定》; 色泽: 采用数字式色差计法; 鲜味成分含量的测定: 采用电子舌法。

2 结果与分析

2.1 鲢鱼主要营养成分分析

对鲢鱼原料的粗蛋白、水分、粗脂肪、灰分等基本成分进行了测定分析, 结果见表 1。本研究所用鲢鱼的蛋白质含量符合杨颖等^[14]报道的鲢鱼蛋白质含量 18%~20%, 高于其他用于酿造鱼露的原料, 如董士远等^[15]报道的鲢鱼粗蛋白含量 18.61%

和徐伟^[16]报道的鲢鱼下脚料蛋白质含量 17.6%。鱼露是一种高氨基酸含量的调味品, 其氨基酸来源于原料中蛋白质在发酵过程中的持续水解, 所以原料中的蛋白质含量直接影响着鱼露产品中的 AA-N 质量浓度和发酵周期, 应当选择蛋白质含量高的材料作为鱼露酿造的原料。另外, 鲢鱼内脏中酶系丰富, 蛋白酶活力高^[14], 所以鲢鱼很适合用于发酵制备鱼露。

表 1 鲢鱼的主要营养成分(湿重) %

成分	质量分数
粗蛋白	19.32
水分	70.12
粗脂肪	3.82
灰分	5.63

2.2 不同灭菌方式对鱼露发酵过程中理化指标的影响

AA-N 是氨基酸形式的氮, 是鱼露风味的重要成分, 其质量浓度是决定发酵产物发酵程度的特征指标, 反映了鱼露产品的质量、原材料的质量和生产工艺水平。如果原料的蛋白质含量较高, 或制作工艺较好, 利用率较高, 产品中的 AA-N 质量浓度就会较高; 反之则产品的 AA-N 质量浓度就会比较低^[17]。

国家标准中对于鱼露 AA-N 质量浓度的规定见表 2, 其中确定了 AA-N 质量浓度的下限值为 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 并将产品分为一级、二级、三级 3 个级别。

表 2 根据 AA-N 判定鱼露等级的标准 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

等级	AA-N 质量浓度
一级	≥ 9.0
二级	≥ 6.5
三级	≥ 4.0

高压蒸汽灭菌和巴氏灭菌两种灭菌方式对鱼露发酵过程中 AA-N 质量浓度、pH、总酸质量浓度的影响如图 1 所示。

由图 1(a)可知, 随着发酵时间延长, 处理组 1 的 AA-N 质量浓度增长缓慢, 处理组 2 的 AA-N 质量浓度增加迅速。实验表明, 处理组 2 的 AA-N 质量浓度增长至第 5 天开始趋于平稳, 第 7 天上升到最高值, 为 12.23 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 达到市售一级鱼露水平^[20]。处理组 1 发酵第 7 天时 AA-N 质量浓度为 6.23 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,

达到市售三级鱼露水平并且依然呈增长趋势,并没有进入平稳期. 整个发酵过程中, 处理组 2 的 AA-N 质量浓度始终高于处理组 1, 究其原因, 高压蒸汽灭菌虽然保证了鱼露发酵过程中没有杂菌的污染, 但同时也使鳀鱼内脏中的多种酶类失去活性, 许多有益于发酵的微生物也一并被杀死, 单一的贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株产生的蛋白酶有限, 无法快速分解蛋白质产生氨基酸, 巴氏灭菌保留了鳀鱼内脏中的多种酶和有利于发酵的微生物, 能够很好地辅助贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株发酵鳀鱼鱼露. 所以, 处理组 2 的 AA-N 质量浓度快速上升, 而处理组 1 的 AA-N 质量浓度上升缓慢.

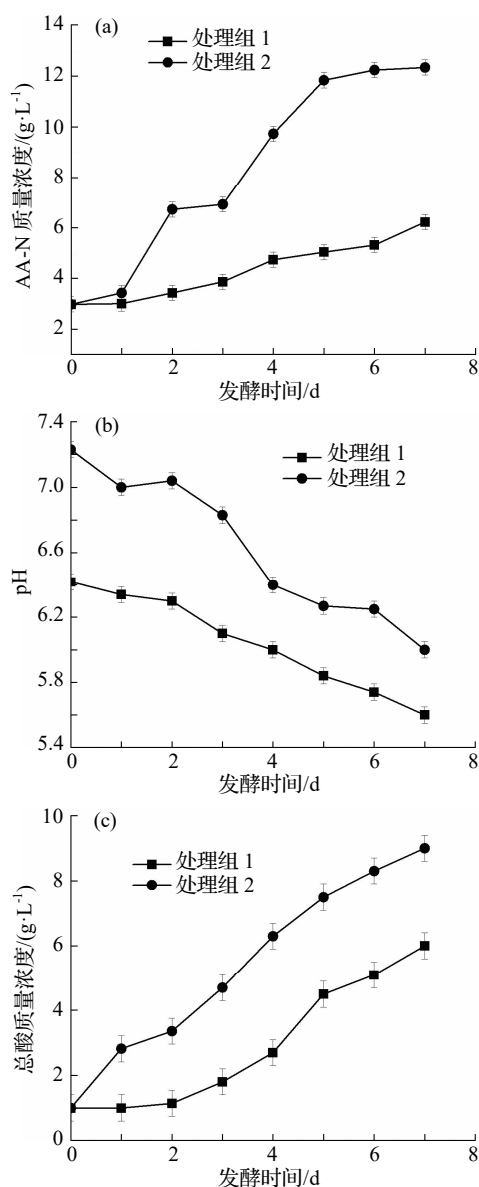


图 1 不同灭菌方式鱼露发酵过程中理化指标的变化

鱼露的 pH 值和总酸质量浓度的变化是游离氨基酸、有机酸类物质和含氮化合物分解产生的微碱性物质共同作用的结果^[18].

由图 1(b)可知, 随着发酵时间的延长, 两个处理组的 pH 值都呈缓慢下降的趋势, 至发酵第 7 天时, 发酵醪液 pH 值分别达到 5.6 和 6.0, 处理组 2 高于处理组 1.

由图 1(c)可知, 在整个发酵过程中, 处理组 1 和处理组 2 的总酸质量浓度呈上升趋势, 与 pH 变化趋势相对应, 且处理组 1 的增长速度明显比处理组 2 缓慢, 分析其中原因, 可能是单菌贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株的产酸能力比其他辅助发酵菌株共同发酵的产酸能力弱一些; 处理组 1 和处理组 2 发酵 7 d 后总酸质量浓度分别达到 6 g·L⁻¹ 和 9 g·L⁻¹, 处理组 2 高于处理组 1. 总酸质量浓度与鱼露的呈味有关, 鱼露中的有机酸可以提高其缓冲能力及增强呈味^[19].

通过以上 3 组指标对比, 发现巴氏灭菌之后接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株发酵效果更好, 发酵结束后 AA-N 质量浓度为 12.23 g·L⁻¹, 达到市售一级鱼露水平, 总酸质量浓度为 9 g·L⁻¹, pH 为 6.0, 鱼露发酵能在 7 d 左右完成. 鉴于上述结果, 最后选择巴氏灭菌方式进行后续实验.

2.3 接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 与外源蛋白酶协同发酵的蛋白酶种类筛选

为促进贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株鳀鱼发酵过程中蛋白质的水解速度, 通过添加蛋白酶来增加鱼露的产量, 提高 AA-N 质量浓度, 根据贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株的温度、pH 等发酵条件, 选择食品工业中常用的胰蛋白酶(A 组)、中性蛋白酶(B 组)和木瓜蛋白酶(C 组)等不同蛋白酶制剂进行协同发酵实验^[21], 3 种蛋白酶都能在鱼露发酵条件下很好地发挥作用. 通过测定 AA-N 质量浓度、pH、总酸质量浓度等的变化情况, 选择最佳蛋白酶种类进行鳀鱼鱼露的协同发酵.

2.3.1 蛋白酶种类对鱼露发酵过程中 AA-N 质量浓度、pH、总酸质量浓度的影响

贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株与胰蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶协同发酵, 对鳀鱼鱼露发酵过程中 AA-N 质量浓度、pH、总酸质量浓度的影响结果如图 2 所示.

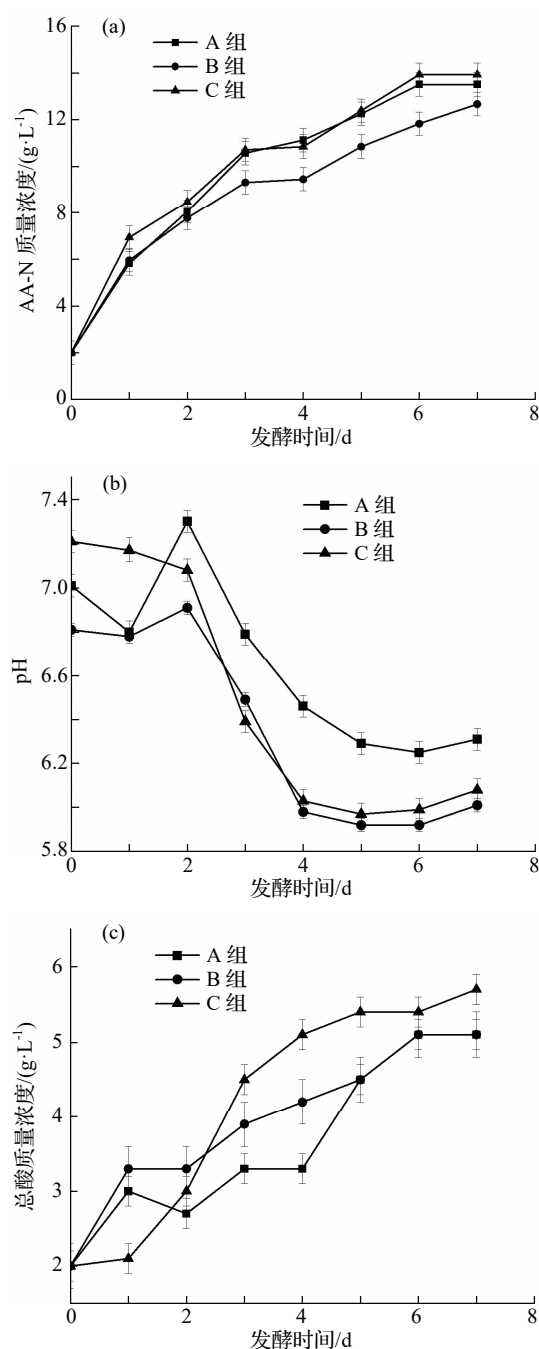


图2 不同处理方式鱼露发酵过程中理化指标的变化

由图2(a)可知,随着发酵时间的延长,3个处理组 AA-N 质量浓度都增长迅速,但是又各不相同。A组和B组前期的增长速度很相近,但是后期A组的增长速度更快一些,明显高于B组。C组前3d的增长速度高于其余两组,后期速度变缓,但是整体发酵结果C组更加突出,发酵完成时AA-N质量浓度为 $13.93\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,也为最高,B组的AA-N质量浓度最低,为 $12.51\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,A组发酵完成时AA-N质量浓

度为 $13.51\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综上所述,最终的AA-N质量浓度C组高于A组高于B组,3个处理组加入蛋白酶后,发酵完成时AA-N质量浓度都超过不加蛋白酶的处理组1和处理组2,并且都达到了一级鱼露的标准。证明加入蛋白酶加快了蛋白质分解成氨基酸的速度,增加了发酵过程中AA-N的产量。

由图2(b)可知,随着发酵时间的延长,3个处理组的pH值都是缓慢下降,至发酵第7天时,A、B、C组发酵醪液最终pH值分别达到6.31、6.01和6.08,A组高于B组与C组。3个组的最终pH值都明显高于处理组1和处理组2,与Hoang等^[22]研究低盐发酵条件对酱油品质影响过程中pH的变化趋势相一致。

由图2(c)可知,整个发酵过程中,3个处理组的总酸质量浓度整体呈上升趋势,但C组的增长趋势高于其余两组。发酵完成时,A、B、C组鱼露总酸分别达到 $5.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,C组高于A组与B组,A组和B组的最终趋势重合,并且最终发酵的总酸质量浓度低于处理组1和处理组2。分析其中原因,可能是蛋白酶与贝莱斯芽孢杆菌SW5菌株协同发酵时,微生物分解蛋白质通道发生变化,导致发酵过程产生的有机酸减少^[23]。

2.3.2 鱼露发酵完成后鲜味成分含量的分析

通过前期预实验,确定了商品鱼露与3个处理组的鲜味含量都比较高,而电子舌的探头对于鲜味标品谷氨酸钠的感知阈值有限,于是提前对所有样品进行了稀释10倍的处理。氨基酸是鲜味的主体贡献物质,与鲜味成分含量成正相关^[24]。通过电子舌测定发酵鱼露中鲜味成分的含量,与上述实验中AA-N质量浓度进行对比,确定最佳蛋白酶种类。

贝莱斯芽孢杆菌SW5菌株分别与胰蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶协同发酵,对鲢鱼鱼露发酵过程中鲜味成分含量的影响以及与商品鱼露、鲢鱼酶解液样品的对比结果如图3所示。

通过电子舌分析,5种样品分布在图以内,相互之间没有重叠,重复性较好;且DI值分别为99.91%和97.38%(DI值反映整体区分效果),说明电子舌能很好地将5种样品区分开^[25]。鲢鱼酶解液的鲜味含量低于1.0%的谷氨酸钠,呈味较差,商品鱼露与A组、B组和C组的鲜味含量相近,在

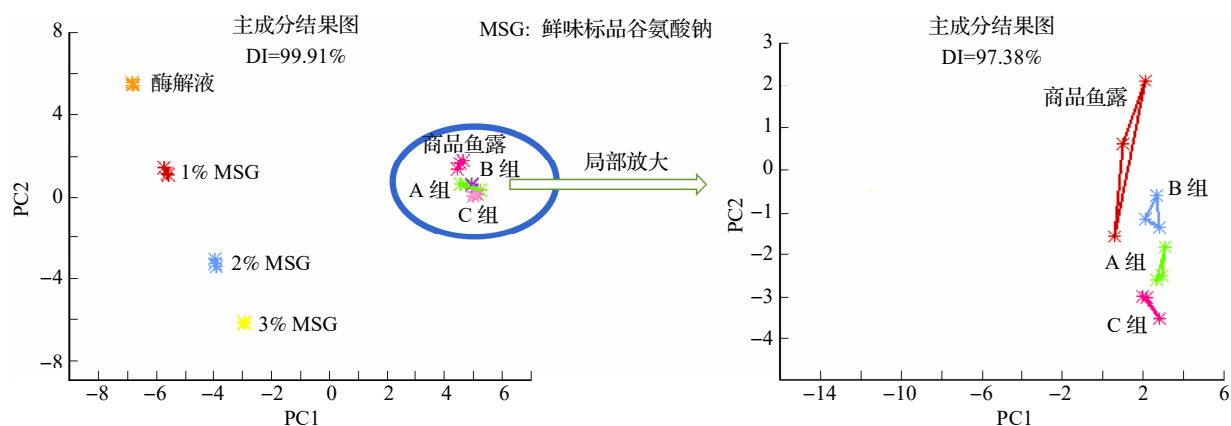


图3 电子舌测定鲜味成分含量

1.0%谷氨酸钠到 2.0%谷氨酸钠之间,局部放大之后可以看出,鲜味含量B组低于A组低于C组,即呈味效果木瓜蛋白酶与贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株协同发酵的效果最差,其次是胰蛋白酶和贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株协同发酵,结果最好的为中性蛋白酶和贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株协同发酵,与 AA-N 质量浓度测定的结果一致。

2.3.3 鱼露发酵完成后色泽与商品鱼露和鲢鱼酶解液对比

用色差仪测量色泽时有 3 个参数: L^* 、 a^* 、 b^* , 其中, L^* 值表示亮度,也称为光泽度, $L^* > 0$, 表示样本趋向于白色, $L^* < 0$, 表示样本趋向于黑色, L^* 为正值且值越大, 样本趋向于白色的程度越大, L^* 为负值且绝对值越大, 样本趋向于黑色的程度越大; a^* 值表示红绿度, $a^* > 0$, 表示样本趋向于红色, $a^* < 0$, 表示样本趋向于绿色, a^* 为正值且值越大, 样本趋向于红色的程度越大, a^* 为负值且绝对值越大, 样本趋向于绿色的程度越大; b^* 值表示黄蓝度, $b^* > 0$, 表示样本趋向于黄色, $b^* < 0$, 表示样本趋向于蓝色, b^* 为正值且值越大, 样本趋向于黄色的程度越大, b^* 为负值且绝对值越大, 样本趋向于蓝色的程度越大。

人的心理和食感具有非常微妙和复杂的关系,即使味道很好的食品,如果色泽不正,也会影响人的食感。因此,在食品品质评价中,色泽是最重要的评价项目之一^[26]。贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株分别与胰蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶协同发酵,对鲢鱼鱼露色泽的影响以及与商品鱼露、鲢鱼酶解液的对比结果见表 3。

表3 酶解液、商品鱼露及实验 3 种样品的色泽对比

样品	L^*	a^*	b^*
酶解液	13.91	10.60	4.89
商品鱼露	9.93	2.92	3.02
A 组	9.38	4.48	2.39
B 组	9.44	5.01	2.74
C 组	9.74	3.54	2.61

经过色差仪的测定, L^* 、 a^* 、 b^* 3 个数值中, 酶解液的 L^* 值偏大, 商品鱼露和 A 组、B 组、C 组的数值较为接近; 酶解液的 a^* 值偏大, 商品鱼露和 A 组、B 组、C 组的数值接近; 5 个组的 b^* 值都相近。关于鱼露的色泽, 国家标准为橙黄色至棕红色, 由肉眼辨别鲢鱼酶解液与商品鱼露两种样品, 鲢鱼酶解液偏白色, 商品鱼露为棕红色。综上所述, 3 个处理组的色泽都接近商品鱼露, 色泽符合国标要求。

2.3.4 接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株与外源蛋白酶协同发酵的鱼露主要指标分析

贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株分别与胰蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶协同发酵鲢鱼鱼露的 pH、总酸质量浓度、AA-N 质量浓度与商品鱼露、鲢鱼酶解液的对比结果见表 4。

表4 5 种样品的 pH 和总酸、AA-N 质量浓度对比

样品	pH	总酸质量浓度/ (g·L ⁻¹)	AA-N 质量浓度/ (g·L ⁻¹)
酶解液	6.34	2.7	3.43
商品鱼露	5.06	9.6	11.13
A 组	6.83	5.7	13.51
B 组	6.01	5.1	12.67
C 组	6.08	5.1	13.93

由表4可知, 鲢鱼酶解液的AA-N质量浓度为 $3.43\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 低于三级鱼露的标准, 总酸质量浓度为 $2.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH为6.34. 商品鱼露的AA-N质量浓度为 $11.13\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 符合一级鱼露的标准, 总酸质量浓度为 $9.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH为5.06. 而加入中性蛋白酶和接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株协同发酵(C组)的发酵结果最好, 发酵完成后AA-N质量浓度最高, 为 $13.93\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 达到市售一级鱼露水平, 总酸质量浓度为 $5.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH为6.08. 并且, 加入蛋白酶之后, 更有利于鲢鱼的蛋白质水解, 使发酵鱼露的产量远远高于不加入蛋白酶时的产量.

3 结论

通过选择合适的灭菌方式, 接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株协同外源蛋白酶发酵鲢鱼生产鱼露, 能有效地加速鲢鱼蛋白质的分解, 提高AA-N质量浓度, 增加鱼露产量, 并具有较好的产酸特性, 使产品pH降低, 总酸升高, 鲜味的呈味效果也有相应的提高. 最终确定了鱼糜的灭菌方式为巴氏灭菌, 外源蛋白酶种类为中性蛋白酶, 发酵完成时的鱼露产品AA-N质量浓度为 $13.93\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 总酸质量浓度为 $5.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH为6.08, 为一级鱼露. 本研究为贝莱斯芽孢杆菌在发酵鱼露方面的应用提供了参考, 对比其他鲢鱼鱼露发酵方式在发酵时间和AA-N产量等方面有明显的优势.

参考文献:

- [1] 唐明芝, 连大军, 卢岩, 等. 东黄海区鲢鱼资源变动及渔业管理[J]. 水产科学, 2002, 21(2):44-45.
- [2] 杨帆. 秘鲁提前结束B捕季, 鱼粉暴涨2000元/吨, 这将给饲料厂带来哪些冲击?[J]. 当代水产, 2020, 45(2):40-41.
- [3] 盛利燊. 预处理和品质改良技术对干制丁香鱼品质和贮藏稳定性的影响研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2011.
- [4] 蒋定文, 林梦, 沈先荣, 等. 鲢鱼的营养分析与评价[J]. 中国海洋药物, 2010, 29(4):50-54.
- [5] 柯欢. 花骨鱼鱼露产品开发及其品质评价[D]. 成都: 成都大学, 2021.
- [6] 周崇禅. 鲢鱼鱼露稀醪发酵工艺的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [7] 赵华杰, 何妍, 杨荣华, 等. 鱼露风味的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(7):123-128.
- [8] Dunlap C A, Kim S J, Kwon S W, et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3):1212-1217.
- [9] 陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 等. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(9):26-33.
- [10] 杨海宁, 宁豫昌, 王昌毓, 等. 接种贝莱斯芽孢杆菌 SW5 菌株对发酵鲢鱼鱼露品质的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(10):2013-2022.
- [11] 邱澄宇. 巴氏杀菌加热中3种淡水鱼肌肉的变性研究[J]. 中国水产科学, 2002, 9(1):69-72.
- [12] 董爱文, 卜晓英, 于华忠. 一种大鲵蛋白肽益生菌产品: CN108925633A[P]. 2018-12-04.
- [13] 赵久香. 淡水鱼加工副产物速酿鱼露的工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [14] 杨颖, 陆胜民, 陈剑兵, 等. 鲢鱼鱼露的加曲、分段速酿工艺[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(11):87-91.
- [15] 董士远, 刘尊英, 曾名湧, 等. 两种酶水解鲢鱼蛋白产物功能性质研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12):94-98.
- [16] 徐伟, 吕英涛, 薛长湖, 等. 鲢鱼加工副产物内源蛋白酶自水解工艺优化[J]. 食品工业科技, 2008, 29(8):176-179.
- [17] 吴朝朝. 利用淡水鱼加工副产物速酿低盐鱼露工艺和风味的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- [18] 张豪. 两段法快速发酵鱼露的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.
- [19] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health[J]. Food Research International, 1996, 29(7):675-690.
- [20] 崔春. 海产低值鱼深度酶解工艺与机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2005.
- [21] 陶红丽, 朱志伟, 曾庆孝, 等. 鱼露快速发酵技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3):161-165.
- [22] Hoang N X, Ferng S, Ting C H, et al. Effect of initial 5 days fermentation under low salt condition on the quality of soy sauce[J]. LWT, 2018, 92(1):234-241.
- [23] Xu Y S, He L N, Xia W S, et al. The impact of fermentation at elevated temperature on quality attributes and biogenic amines formation of low-salt fermented fish[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(3):723-733.
- [24] 刘忠英, 冉乾松, 潘科, 等. 基于电子舌的3种氨基酸

- 单体呈味特性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(4):296-302.
- [25] 刘鑫, 牟柏德, 鞠铭, 等. 基于 SPME-GC-MS、电子鼻、电子舌技术联用对不同替代盐干腌火腿风味成分表征[J]. 食品科学, 2022, 43(6):246-256.
- [26] 金征宇, 江波, 杨瑞金, 等. 食品科学: 学科基础与进展[M]. 北京: 科学出版社, 2010.

Effects of inoculation with *Bacillus velezensis* SW5 and exogenous protease on the quality of fermented anchovy fish sauce

HE Xiaoli¹, WENG Peifang^{1*}, SHEN Biao², WU Zufang¹

(1.College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.Zhoushan Customs District, Zhoushan 316100, China)

Abstract: In order to examine the effect of inoculation with *Bacillus velezensis* SW5 on the quality of fermented anchovy fish sauce, the co-fermentation of *Bacillus velezensis* SW5 and various proteases was carried out. Changes in amino acid nitrogen (AA-N), pH value, total acid content were determined during fermentation. Meanwhile, the umami taste profile and color differences among the end products of fermentation were also investigated by using electronic tongue and colorimeter, compared with the commercial fish sauce and enzymatic hydrolysate of anchovy. The results showed that the AA-N content reached the highest of 13.93 g·L⁻¹ on the 7th day of fermentation, via co-fermentation with SW5 and neutral protease. It is the first-class standard of commercial fish sauce. The color and umami taste of the three treatment groups were similar to those of commercial fish sauce. In conclusion, inoculation of *Bacillus velezensis* SW5 and addition of protease to synergistically fermented fish sauce can decrease the fermentation period and improve the yield of fish sauce, the total amino acid nitrogen content, the effect of umami and taste. The strain can be used as an excellent microbial strain for deep processing of marine protein source fermentation.

Key words: anchovy; *Bacillus velezensis*; protease; synergistic fermentation; fish sauce

(责任编辑 韩 超)