

响应面优化草鱼发酵工艺条件

周 吉, 裘迪红*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用一株植物乳杆菌为发酵菌种, 对草鱼进行发酵. 以总酸含量为主要指标, 在单因素试验的基础上, 运用 Design-Expert 7 Trial 统计分析软件, 设计 4 因素 5 水平试验, 建立加盐量、发酵温度、发酵时间和接种量的二次回归模型, 得到草鱼发酵的最优条件. 研究表明: 最优的发酵工艺条件为加盐量 5.5%, 发酵温度 29.5 °C, 发酵时间 25.9 h, 接种量 7.4%, 在此条件下发酵草鱼的总酸含量可达 15.61%, 且感官评分值达到 82.6 分.

关键词: 草鱼; 发酵工艺; 植物乳杆菌; 响应面法

中图分类号: TS254.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2014) 02-0013-06

草鱼俗名鲢鱼, 其蛋白质含量为 15%~20%, 是我国第一大淡水鱼, 因风味良好且营养丰富, 为人们所喜爱^[1]. 然而鱼类等水产品受到特定季节和地区的制约, 每年我国淡水鱼因贮运不当所造成的损失高达约 30%, 不仅造成了资源极大的浪费, 也制约了我国淡水鱼养殖业和加工业的健康发展^[2]. 虽然添加防腐剂及低温冷藏等常规保鲜技术对鱼肉制品能起到一定的保鲜作用, 但冻肉会因水分流失、纤维变粗而不够鲜美. 此外, 某些添加剂还会对食品风味造成许多负面效应^[3]. 而乳酸菌代谢产物作为有益生物保鲜剂的代表, 不但可以有效地延长肉及肉制品的货架期, 还能对其风味起到维持且改善的效果^[4]. 发酵鱼制品是一种新型的鱼类加工方法, 它是利用乳酸菌等食品微生物对鱼体进行发酵, 使其产生一定的风味并能在室温下保藏较长时间^[5]. 该产品风味独特、含盐量低, 改变了传统腌制品高盐的缺陷. 发酵可促进鱼肉中蛋白质的水解, 提高鱼制品中水溶性蛋白质含量、水溶性固形物含量和总酸含量, 降低 pH, 产生大量游离氨基酸, 增大必需氨基酸含量和比例, 改善鱼的感官品质^[6]. 同时, 微生物在发酵过程中还可以形成大量的风味成分, 使产品具有特殊风味^[7-9]. 由于总酸含量能够表征草鱼发酵以及产生各种代

谢产物的程度, 因此笔者选取总酸含量作为指标研究草鱼的发酵条件.

响应面法是一种优化工艺条件的有效方法^[10], 可以用于确定各因素及其交互作用在工艺过程中对响应值的影响, 并获得各影响因素与响应值之间的函数表达式, 即回归模型, 从而找到各因素的最佳组合以及最优的响应值^[11]. 响应面分析法较正交试验法在试验设计和结果表述方面更有优势, 考虑了试验的随机误差, 将复杂未知的函数关系在小区域内用简单的一次或二次多项式模型来拟合, 计算较简便, 是降低开发成本、优化加工条件、提高产品质量, 解决生产过程中的实际问题的一种有效方法, 已越来越多地应用于水产品加工领域^[12-13]. 笔者利用一株植物乳杆菌为发酵菌种, 以总酸含量为指标, 在单因素分析的基础上进行响应面试验设计, 并通过方差分析和验证试验对植物乳杆菌发酵草鱼工艺条件进行优化, 以期生产优质的发酵草鱼制品提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

草鱼鲜活, 尾重约 1 kg; 食盐、蔗糖均为食品

收稿日期: 2013-08-28.

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

基金项目: 浙江省高校人才工程项目 (2010442).

第一作者: 周 吉 (1988-), 女, 江苏淮安人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产品加工与保鲜. E-mail: 877036332@qq.com

*通信作者: 裘迪红 (1966-), 女, 浙江舟山人, 副教授, 主要研究方向: 水产品安全. E-mail: qiudihong@nbu.edu.cn

级;其他试剂为分析纯.

1.1.2 试验菌株

实验室分离自泡菜的一株植物乳杆菌,其鉴定号为 JX025073.1.

1.1.3 主要培养基

MRS 肉汤^[14]: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 葡萄糖 20 g, 碳酸钙 20 g, 柠檬酸二胺 2 g, 酵母提取物 5 g, 磷酸氢二钾 2 g, 硫酸镁 0.58 g, 硫酸锰 0.25 g, 乙酸钠 5 g, 吐温-80 1 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.2~6.4, 121 °C 灭菌 15 min.

种子培养基^[15]: 蛋白胨 1.0%, 牛肉膏 0.5%, 酵母膏 0.5%, 葡萄糖 2.0%, 番茄汁 10%, pH 6.5~6.7.

发酵培养基^[15]: 牛肉膏 1.0%, 葡萄糖: 乳糖 (1:1) 2.0%, 氯化钠 0.25%, 柠檬酸钠 0.5%, 吐温-80 0.05%, 硫酸镁 0.1%, 番茄汁 10%, pH 为 6.5.

1.1.4 仪器与设备

DK-S22 型电热恒温水浴锅、D3102 型电子天平、DHDT-9070A 型电热鼓风干燥箱,均为上海精宏实验设备有限公司;TDL-5 型高速离心机,上海安亭科学仪器厂;HWS 智能型恒温恒湿培养箱,宁波江南仪器厂;LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂.

1.2 方法

1.2.1 草鱼发酵工艺流程^[16]

新鲜草鱼→去头、去鳞、去内脏→清洗→沥干→整形→接种发酵→产品.

1.2.2 发酵剂的制备

将植物乳杆菌接种至 MRS 肉汤中, 35 °C 培养 24 h, 活化后以 3% 比例接种至种子培养基, 最后在发酵培养基中培养至菌体浓度为 $10^7 \sim 10^8$ CFU·mL⁻¹.

1.2.3 操作要点

将鱼体切割成长约 2.5 cm, 宽约 1.5 cm 的鱼块, 加入一定比例的食盐和蔗糖, 混合均匀, 在 4 °C 下放置一段时间. 然后在无菌条件下, 接种适宜比例的植物乳杆菌发酵液, 在一定温度下发酵一段时间, 即为所需的发酵草鱼制品.

1.2.4 总酸含量测定^[17]

取 10.0 g 样品研碎, 蒸馏水定容至 100 mL, 浸提 1 h 后抽滤, 取滤液 50 mL, 酚酞为指示剂, 用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 标准溶液滴定至呈现粉红色即为滴定终点. 记录消耗 NaOH 溶液的体积, 计算总酸

含量.

$$\text{总酸}(\%) = (\text{消耗 NaOH 溶液的体积} \times 0.1 \times 0.09 \times 2/10) \times 1000,$$

式中: 0.09 为每 mmol NaOH 相当于乳酸的质量, g.

1.2.5 游离氨基酸含量测定^[18]

采用茚三酮法测定游离氨基酸含量.

1.2.6 发酵草鱼感官品质评价方法

根据发酵鱼风味感官鉴定标准, 由 10 名具有食品感官品尝经验的人员组成感官评定小组, 对发酵草鱼的色泽、口感、组织形态及风味按照食品感官评价要求进行品评打分^[19], 以 10 人评分平均值作为样品的最终得分. 感官评价方法见表 1.

表 1 感官评定标准

色泽 S	口感 K	组织形态 Z	风味 F	分数
均匀有光泽	酸味柔和	柔软有弹性	基本无腥味, 有香甜味	70~100
色泽暗淡	酸味稍重	较硬或较疏松	稍腥, 香甜味不明显	60~70
色泽灰暗	酸味不明显或过酸	过硬或过疏松	腥味较重, 香甜味	0~60

2 结果与分析

2.1 发酵条件优化

由前期单因素试验可知发酵时间、发酵温度、加盐量和接种量对产酸的影响较为显著, 因此选取发酵时间、加盐量、接种量和发酵温度 4 个影响因素, 以总酸含量为响应值, 进行 4 因素 5 水平响应面分析试验. 试验因素水平见表 2.

表 2 响应面试验因素与水平

试验因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
加盐量(X_1)/%	3	4	5	6	7
发酵温度(X_2)/°C	20	25	30	35	40
发酵时间(X_3)/h	10	15	20	25	30
接种量(X_4)/%	6	7	8	9	10

响应面法试验设计方案及结果见表 3. 使用 Design-Expert 7 Trial 实验设计软件对试验结果进行多元回归拟合, 从而得到总酸含量 Y 与加盐量 X_1 、发酵温度 X_2 、发酵时间 X_3 和接种量 X_4 之间的二次多元回归模型:

$$Y=-37.72839+3.71594X_1+1.00042X_2+0.84323X_3+4.01031X_4-0.015375X_1X_2+0.018688X_1X_3-0.016562X_1X_4+0.014000X_2X_4-0.021062X_3X_4-0.32859X_1^2-0.015419X_2^2-0.013031X_3^2-0.22703X_4^2.$$

表 3 响应面法方案与试验结果

试验号	X_1 加盐量/%	X_2 发酵温度/°C	X_3 发酵时间/h	X_4 接种量/%	Y 总酸含量/%
1	-1	-1	-1	-1	6.56
2	1	-1	-1	-1	7.78
3	-1	1	-1	-1	8.73
4	1	1	-1	-1	7.46
5	-1	-1	1	-1	10.38
6	1	-1	1	-1	13.14
7	-1	1	1	-1	11.52
8	1	1	1	-1	12.56
9	-1	-1	-1	1	7.90
10	1	-1	-1	1	7.76
11	-1	1	-1	1	10.12
12	1	1	-1	1	10.54
13	-1	-1	1	1	10.27
14	1	-1	1	1	12.11
15	-1	1	1	1	11.85
16	1	1	1	1	12.42
17	-2	0	0	0	9.21
18	2	0	0	0	11.03
19	0	-2	0	0	8.21
20	0	2	0	0	10.21
21	0	0	-2	0	7.15
22	0	0	2	0	13.18
23	0	0	0	-2	9.43
24	0	0	0	2	14.06
25	0	0	0	0	14.97
26	0	0	0	0	15.41
27	0	0	0	0	14.56
28	0	0	0	0	15.58
29	0	0	0	0	15.33
30	0	0	0	0	15.45

方差分析结果见表 4。从表 4 可以看出, 该模型的 $P<0.0001$, 表明模型极显著, 且失拟项为 0.0631, 不显著, 从而说明方程对试验的拟合较好。

模型中一次项 X_3 、 X_4 和二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 差异极显著, 一次项 X_1 、 X_2 差异高度显著, 交互项 X_1X_3 和 X_3X_4 差异显著。该回归模型的校正决定系数为 94.25%, 说明模型与数据拟合度高, 试验误差小。在所选取的因素水平范围内, 各因素对结果的影响排序为: $X_3>X_4>X_2>X_1$ 。

表 4 二次多项式的方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值	显著性
模型	223.80	14	15.99	34.94	<0.0001	***
X_1	4.23	1	4.23	9.25	0.0082	**
X_2	7.37	1	7.37	16.11	0.0011	**
X_3	64.88	1	64.88	141.82	<0.0001	***
X_4	8.28	1	8.28	18.11	0.0007	***
X_1X_2	1.51	1	1.51	3.31	0.0890	
X_1X_3	2.24	1	2.24	4.89	0.0430	*
X_1X_4	0.070	1	0.070	0.15	0.7007	
X_2X_3	1.21	1	1.21	2.64	0.1247	
X_2X_4	1.25	1	1.25	2.74	0.1185	
X_3X_4	2.84	1	2.84	6.21	0.0249	*
X_1^2	47.39	1	47.39	103.58	<0.0001	***
X_2^2	65.21	1	65.21	142.54	<0.0001	***
X_3^2	46.58	1	46.58	101.81	<0.0001	***
X_4^2	22.62	1	22.62	49.44	<0.0001	***
残差	6.86	15	0.46			
失拟项	6.13	10	0.61	4.21	0.0631	
纯误差	0.73	5	0.15			
总变异	230.67	29				

注: (1) $R^2=0.9703$, $Adj-R^2=0.9425$ 。(2)***为差异极显著($P<0.001$); **为差异高度显著($P<0.01$); *为差异显著($P<0.05$)。

2.2 响应曲面分析

通过 Design-Expert 7 Trial 实验设计软件对试验结果进行处理, 得到响应曲面图, 如图 1 至图 6 所示。图 1 至图 6 直接反映了各因素对总酸含量的影响, 三维曲面图越凸的位点表示响应值越大^[20]。

2.2.1 加盐量和发酵温度对总酸含量的影响

从图 1 可以看出, 加盐量和发酵温度与总酸含量呈抛物线型关系, 且有一极大值点, 说明当其他条件一定时, 总酸含量随着加盐量和发酵温度的增加先迅速升高, 然后缓慢下降。加盐量为 5.5%, 发酵温度为 29.5 °C 时的总酸含量最大。这是由于适量的盐可以抑制腐败菌的生长, 从而给植物乳

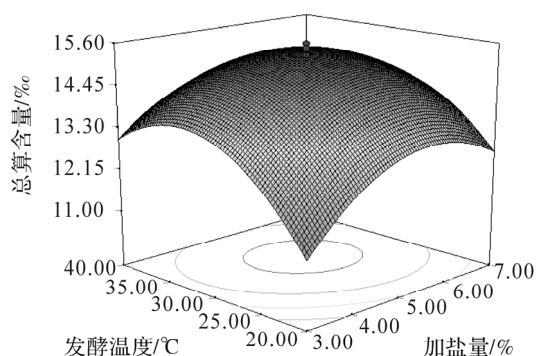


图1 加盐量和发酵温度对草鱼总酸含量的影响

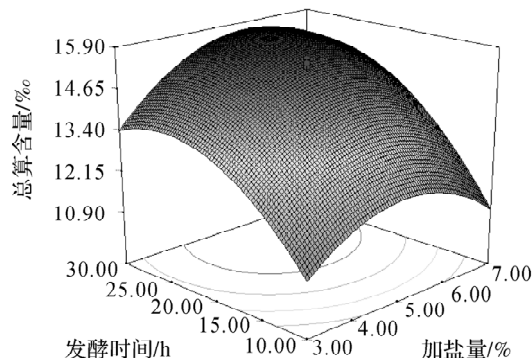


图2 加盐量和发酵时间对草鱼总酸含量的影响

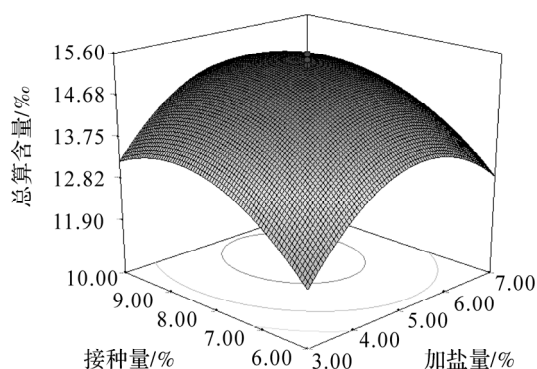


图3 加盐量和接种量对草鱼总酸含量的影响

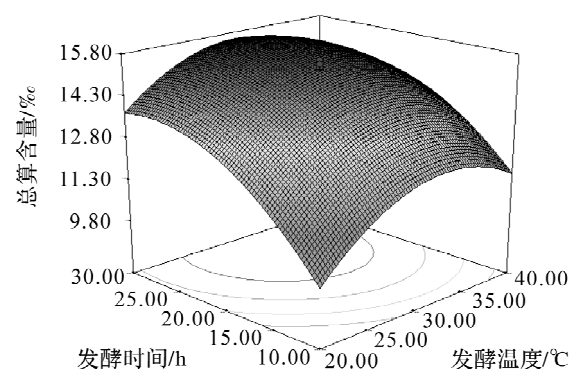


图4 发酵温度和发酵时间对草鱼总酸含量的影响

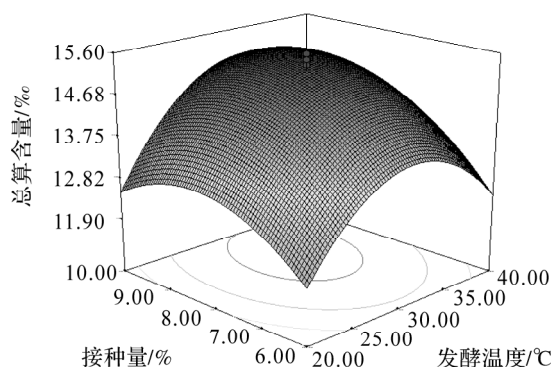


图5 发酵温度和接种量对草鱼总酸含量的影响

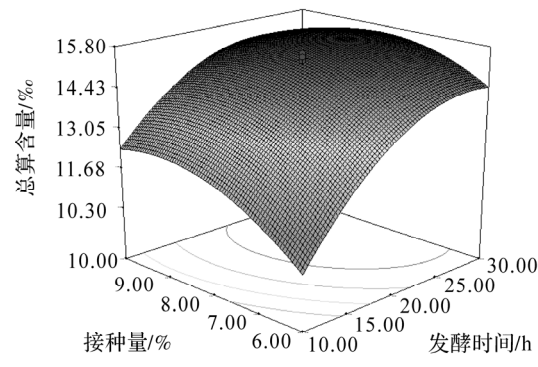


图6 发酵时间和接种量对草鱼总酸含量的影响

杆菌提供了有利条件,但是如果盐含量过高,则抑制了菌株的充分产酸.因为植物乳杆菌的最适生长温度在 30 °C 左右,低于或高于它其生长都会受到抑制.

2.2.2 加盐量和发酵时间对总酸含量的影响

从图2可以看出,加盐量和发酵时间与总酸含量呈抛物线型关系,且有一极大值点.这一点出现在加盐量 5.5%,发酵时间 25.9 h 时的交汇点.这说明当其他条件一定时,加盐量 5.5%,发酵时间

25.9 h 时的总酸含量最高.从图3还可以看出,总酸含量随着加盐量和发酵时间的增加先上升后下降,回归方程中的二次项呈显著($P < 0.05$),这说明加盐量和发酵时间二者之间有显著的交互作用.

2.2.3 加盐量和接种量对总酸含量的影响

从图3可看出,加盐量和接种量与总酸含量呈抛物线型关系,且有一极大值点在加盐量 5.5%,接种量 7.4%处.随着加盐量和接种量的增加,总酸含量呈现先上升后下降.因为适量的盐可以抑

制腐败菌,为植物乳杆菌的生长提供了有利条件,但若盐度过高,则会抑制菌株的充分产酸。同时,接种量过大导致发酵菌株不能充分生长,且发酵中、后期分解蛋白质产生碱性氨基酸及氨,导致酸度下降。

2.2.4 发酵温度和发酵时间对总酸含量的影响

从图4可看出,当发酵时间一定时,总酸含量随着发酵温度的升高,先迅速升高,达到最高值后又迅速下降;当发酵温度一定时,总酸含量随着发酵时间的延长,先升高后缓慢下降。在发酵温度29.5℃,发酵时间25.9h处有一极值点。回归方程中的二次项呈显著($P>0.05$),二者的交互作用不显著。

2.2.5 发酵温度和接种量对总酸含量的影响

从图5可看出,发酵温度和接种量与总酸含量呈抛物线型关系。当发酵温度一定时,总酸含量随着接种量的增加先上升后下降。当接种量一定时,总酸含量随着发酵温度的升高也是呈现先上升后下降。在其他条件一定时,发酵温度为29.5℃,接种量为7.4%时,总酸含量最高。

2.2.6 发酵时间和接种量对总酸含量的影响

从图6可以看出,发酵时间和接种量与总酸含量呈抛物线型关系,且有一极大值点。这一点出现在发酵时间25.9h,接种量7.4%时的交汇处。当其他条件一定时,总酸含量随着加盐量和发酵时间的增加先迅速上升后缓慢下降,回归方程中的二次项呈显著($P<0.05$),说明发酵时间和接种量二者之间有显著的交互作用。

2.3 验证试验

通过求解回归方程得到草鱼发酵最佳工艺条件为加盐量5.5%、发酵温度29.5℃、发酵时间25.9h、接种量7.4%,模型的预测总酸含量的理论值可达15.61‰。为了检验预测结果是否偏离实际值,则对模型推导所得的最优条件做验证试验。验证试验中,发酵草鱼总酸含量为15.51‰,与预测值非常接近,说明响应面法分析所得的优化模型是可靠的。

为了检验该工艺条件下发酵草鱼的品质,在相同条件下做自然发酵,并对两种产品进行对比,结果见表5。从表5可以看出,接种发酵草鱼的总酸含量、游离氨基酸含量和感官品质评分均明显优

于自然发酵草鱼。

表5 验证试验中发酵草鱼品质对比

样品	总酸含量/‰	游离氨基酸含量/‰	感官品质评分
接种发酵草鱼	15.51±0.03	14.21±0.07	82.6±0.5
自然发酵草鱼	11.78±0.05	10.58±0.02	71.4±0.6

3 结论

通过单因素实验和响应面优化实验得到植物乳杆菌发酵草鱼的最佳工艺条件为:加盐量5.5%、发酵温度29.5℃、发酵时间25.9h、接种量7.4%。在确定了最佳工艺条件后进行验证试验,对发酵后的产品的总酸含量、游离氨基酸含量和感官评分等指标进行检测发现,植物乳杆菌对草鱼肉品质具有一定的改善作用,鱼肉有光泽,口感柔和、有弹性;总酸和游离氨基酸含量与自然发酵相比有较大的增加,使发酵鱼肉的营养性得到加强,这些都凸显出接种发酵肉制品比一般肉制品具有一定的优越性,为今后的工业化运用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 余兰玉. 鱼类保鲜加工技术[J]. 渔业致富指南, 2006(13):54-56.
- [2] 曾令彬. 腊鱼加工中微生物菌群、理化特性及挥发性成分的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [3] 李气清. 我国肉类食品的发展状况与质量监控[J]. 肉类研究, 2001(1):729-731.
- [4] 张燕, 周常义, 苏文金, 等. 乳酸菌及其代谢产物在食品保鲜中的应用研究进展[J]. 农产品加工学刊, 2012(4): 21-26.
- [5] Manuela F. Accelerated ripening of dry fermented sausages[J]. Trends in Food Science and Technology, 2000, 6(11):202-206.
- [6] 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(28):268-272.
- [7] Wonnop V, Soottawat B, Hitapha T S. Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of ham inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*[J]. Swiss Society of Food Science and Technology, 2006(39):814-826.
- [8] 李宗军, 江汉湖, 李红琼, 等. 湘西侗族传统发酵肉的产品特性[J]. 湖南农业大学学报, 2002, 28(1):61-63.
- [9] 周传云, 聂明, 万佳蓉. 发酵肉制品的研究进展[J]. 食

- 品与机械, 2004, 20(2):27-30.
- [10] 曹荣, 刘淇, 殷邦忠. 响应面法优化海参性腺酶解工艺[J]. 食品科学, 2012, 2(33):29-33.
- [11] 姜松, 车长远, 栗春艳. 大豆分离蛋白凝胶制备条件的响应曲面法优化研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(2): 46-49.
- [12] 冯金晓, 薛长湖, 徐莹, 等. 响应面法优化 Protease M 酶解牡蛎工艺的研究[J]. 食品科技, 2009, 34(5):184-187.
- [13] 曹文红, 章超桦, 洪鹏志. 响应面法优化南美白对虾虾头自溶工艺的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1):158-162.
- [14] 王友湘, 陈庆森, 阎亚丽. 用于乳酸菌分离鉴定的几种培养基的筛选及应用[J]. 食品科学, 2007(9):374-378.
- [15] 于修鑑. 乳酸菌高密度培养及浓缩型发酵剂研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2004.
- [16] 赵德畅, 宁喜斌. 短乳杆菌发酵鲢鱼块工艺参数的优化研究[J]. 黑龙江农业科学, 2010(11):103-105.
- [17] 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, 4(10):219-226.
- [18] 张水华. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [19] Berdague J L, Monteil P, Montel M C. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage[J]. Meat Science, 1993, 3(35):275-287.
- [20] Guo Xingfeng, Tian Shaojun, Small D M. Generation of meat-like flavourings from enzymatic hydrolysates of proteins from *Brassica* sp.[J]. Food Chemistry, 2010, 119(1):167-172.

Optimization on Fermenting Conditions of Grass Carp with Response Surface Method

ZHOU Ji, QIU Di-hong*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to effectively prolong the preserving period of the processed grass carp and improve its flavor and commercial value, the experiment conducted in this research tries to ferment grass carp by applying *Lactobacillus plantarum* as the strains. Taking the total acid content as the main variable, and based on a single-factor experiment, a four-factor and five-level test in this study is designed using the Design-Expert 7 statistical analysis software, and the optimal condition of the fermentation of grass carp is obtained through a quadratic regression model which contains the variables of the amount of salt, fermentation temperature, fermentation time and inoculation amount. Based on the test result, the optimal fermentation condition is that the amount of salt, the fermentation temperature, the fermentation time and the inoculation amount should be configured with ratio of 5.5%, 29.5 °C, 25.9 h and 7.4% respectively, and only on this condition can the total acid content and the score of sensory assessment reach 15.61‰ and 82.6, respectively.

Key words: grass carp; fermentation; *Lactobacillus plantarum*; response surface methodology

(责任编辑 史小丽)