

乳杆菌在腌制腊鱼制品中的应用

周长艳, 黄泽元*, 田国军
(武汉工业学院食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘要: 将腊鱼中的优势菌(干酪乳杆菌、香肠乳杆菌、乳酸乳杆菌)浓度比为 1:1:1 作为混合菌株直接接种, 研究混合菌株接种量、食盐添加量、腌制温度和腌制时间对腊鱼品质的影响, 并利用单因素和正交试验确定最佳工艺参数。结果表明, 腌制腊鱼的最佳工艺条件为: 混合菌种接种量 10^6 CFU/g、食盐添加量 5%、腌制温度 10°C 、腌制时间 4d。在此条件下生产的腊鱼质地紧密, 咸度低, 保留了传统腊鱼的香味, 其挥发性盐基氮(TVB-N)和过氧化值分别为 18.72mg/100g 和 0.18g/kg, 相对于自然发酵的腊鱼分别降低了 34.9% 和 51.6%。

关键词: 乳杆菌; 腊鱼; 单因素试验; 正交试验

Application of *Lactobacilli* in Cured Fish

ZHOU Chang-yan, HUANG Ze-yuan*, TIAN Guo-jun
(College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In the present study, *L. casei*, *L. farciminis* and *L. delbrueckii* were inoculated together at a ratio of 1:1:1 to produce cured grass carp. The effects of total inoculum amount, salt amount, curing temperature and curing time on the quality of cured fish were studied. The optimal levels of the parameters were optimized using one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods to be 10^6 CFU/g, 5%, 10°C and 4 d, respectively. Products with close texture, low salinity and the flavor of conventional cured fish were obtained under these conditions. The TVB-N and peroxide value were 18.72 mg/100 g and 0.18 g/kg, which decreased by 34.9% and 51.6%, respectively, when compared with naturally fermented cured fish.

Key words: *Lactobacillus*; cured fish; one-factor-at-a-time method; orthogonal array design

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)01-0215-04

腌腊鱼制品是我国传统的风味食品, 有很广阔的消费市场^[1]。传统的腊鱼主要是通过自然发酵生成, 其自然发酵是在较低的温度和较高的食盐浓度条件下进行^[2], 产品存在含盐量高、脂肪氧化过度等质量问题, 产品的使用安全性低^[3], 而且产品生产周期长, 易受环境的影响, 稳定性得不到保证。利用微生物纯化培养技术从传统发酵鱼制品中分离纯化得到有益微生物群体, 再进行扩大培养, 将有益微生物群体直接接种对鱼进行腌制发酵, 可以有效地避免传统发酵过程中的不足, 提高产品的安全性、风味及感官质量^[4]。本课题组在前期实验中, 从传统腊鱼中分离纯化得到优势乳酸菌主要为干酪乳杆菌、香肠乳杆菌和乳酸乳杆菌^[5-6], 并且得到混合菌种的最佳菌体浓度比(干酪乳杆菌、香肠乳杆菌、乳酸乳杆菌菌体浓度比 1:1:1)。本实验采取直接接种的方式, 通过单因素和正交试验以确定混合乳杆

菌生产腊鱼的最佳生产工艺参数, 以期在传统腊鱼生产的改进提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、菌种与培养基

草鱼、花椒、食盐、八角、桂皮、白糖、味精、生姜 市售。

干酪乳杆菌、香肠乳杆菌、乳酸乳杆菌, 前期在实验室分离纯化得到^[6]。

平板计数琼脂培养基^[7]、MRS 培养基^[7]。

1.2 方法

1.2.1 花椒盐的制作

称取 1000g 食盐在锅中翻炒至 200°C 后, 加入 50g 花椒、5g 八角、5g 桂皮, 拌匀后离火继续翻炒使温度

收稿日期: 2011-09-22

基金项目: 国家星火计划资助项目(2010GA760002)

作者简介: 周长艳(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: zcy.com@163.com

* 通信作者: 黄泽元(1948—), 男, 教授, 本科, 研究方向为食品科学。E-mail: hzy120318@163.com

下降到50℃以下,然后加入200g白糖、50g味精和100g生姜片,拌匀至冷却后待用^[8]。在腌制过程中按照鲜鱼量加入1.41%花椒盐作为腌制调料(其中含食盐1%)。

1.2.2 工艺流程^[9]

新鲜草鱼除杂→洗净→切块(4cm左右的方块)→沥干→称其质量→加花椒盐→拌匀→接种→加重物压盖→腌制→干燥→成品→安全性检测

1.2.3 细菌活化及菌悬液的制备^[10]

在无菌操作条件下,用接种环挑取前期分离出的菌种,转接到5mL MRS液体培养基中,置于37℃恒温培养箱中培养24h,形成该菌株的液体培养物。取液体培养物1mL转接到10mL液体培养基中培养24h,使菌种活化,形成菌悬液原液,并对菌悬液原液计数。根据计数结果对菌悬液原液用无菌水稀释至 1×10^9 CFU/mL,再由高到低的顺序依次稀释,形成 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 CFU/mL菌悬液的应用液,供备用。

1.2.4 理化指标的测定

总酸度测定:按GB/T 12456—2008《食品中总酸的测定》中的NaOH滴定法进行测定。游离氨基酸含量测定:采用单指示剂甲醛滴定法。挥发性盐基氮(TVB-N)含量测定:采用微量扩散法。总蛋白含量测定:按GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法。总脂肪含量测定:按GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》中索氏提取法。过氧化值测定:按GB/T 5538—2005《动植物油脂 过氧化值测定》方法。

1.2.5 微生物指标的测定

菌落总数测定:按照GB 4789.2—2010《食品微生物学检验 菌落总数测定》进行测定;乳酸菌测定:按照GB 4789.35—2010《食品微生物学检验 乳酸菌检验》进行测定。

1.2.6 感官评定方法

由感官评定小组(由经验丰富的10人组成),按照参考文献^[11],分别从色泽、腥味、咸味、鲜味和硬度5个指标对腊鱼制品进行评定,每个指标均分为4级,评价标准见表1。

表1 感官评价标准^[12]

Table 1 Criteria for sensory evaluation of cured fish^[12]

指标	0~5分	6~10分	11~15分	16~20分
色泽	无光泽,灰白色	无光泽,颜色很浅	有光泽,颜色较浅	色泽鲜亮,颜色较好
腥味	腥味明显,有异味	腥味明显,无异味	略有腥味,无异味	无任何腥味、异味
咸味	无咸味	很咸或很淡	偏咸或偏淡	咸味适中
腌腊味	无腌腊味	腌腊味很淡	有腌腊味,不明显	腌腊味明显
硬度	鱼肉松散成小块	鱼肉松散	较松散,嚼劲较差	质地紧实,适口性好

1.2.7 试验设计

在自然发酵条件下,影响腌腊制品风味的因素主要有食盐添加量、腌制温度和腌制时间^[13]。本实验主要考察混合菌株接种量、食盐添加量、腌制温度和腌制时间对腊鱼品质的影响,根据单因素试验确定各指标的大致范围,在此基础上,采用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验及极差分析,确定试验的最终方案,正交试验因素水平见表2。

表2 正交试验因素水平表

Table 2 Coded values and corresponding real values of the optimization parameters tested in orthogonal array design

水平	因素			
	A 接种量/(CFU/g)	B 食盐添加量/%	C 腌制温度/℃	D 腌制时间/d
1	10^6	4	5	3
2	10^7	5	10	4
3	10^8	6	15	5

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 混合菌株接种量对腊鱼品质的影响

在食盐添加量7%、温度10℃条件下腌制5d。腌制结束后,干酪乳杆菌、香肠乳杆菌、乳酸乳杆菌混合菌体浓度比1:1:1,考察接种量对腊鱼总酸度、游离氨基酸、TVB-N、总蛋白及总脂肪含量的影响,试验结果见表3。

表3 接种量对腊鱼品质的影响

Table 3 Effect of total inoculation amount on the quality of cured fish

接种量/(CFU/g)	总酸度/%	游离氨基酸含量/%	TVB-N含量/(mg/100g)	总蛋白含量/%	总脂肪含量/%
10^5	0.344	0.190	19.49	19.29	6.10
10^6	0.372	0.221	18.91	19.52	6.25
10^7	0.408	0.254	18.34	19.78	6.44
10^8	0.453	0.265	17.65	20.25	6.62
10^9	0.463	0.279	17.30	20.46	6.73
0	0.280	0.185	28.74	18.80	5.78

从表3可以看出,随着接种量的增大,腊鱼中总酸度、游离氨基酸、总蛋白、总脂肪含量逐渐上升,明显高于自然发酵的空白对照组,而TVB-N含量逐渐下降,很明显低于空白对照组。当接种量达到 10^6 CFU/g时,试验组总酸含量、游离氨基酸含量、总蛋白含量、总脂肪含量增加很明显,TVB-N值也有较大的下降趋势。当接种量大于 10^8 CFU/g时,这5个指标变化均趋于平缓。因此, $10^6 \sim 10^8$ CFU/g是比较适宜生产的接种量范围。

2.1.2 食盐添加量随腌制时间变化对腊鱼品质的影响

在前期对分离出来的菌株做了耐盐性实验, 结果表明混合菌株在 10% 食盐条件下仍具有活力, 考虑到食盐添加量对腊鱼品质的影响, 本试验选取 3%~11% 的梯度食盐添加量作为试验范围^[6]。在接种量 10^6 CFU/g、温度 10℃ 的条件下腌制。考察不同食盐添加量条件下腊鱼 TVB-N 值和过氧化值随腌制时间的变化情况, 结果见图 1、2。

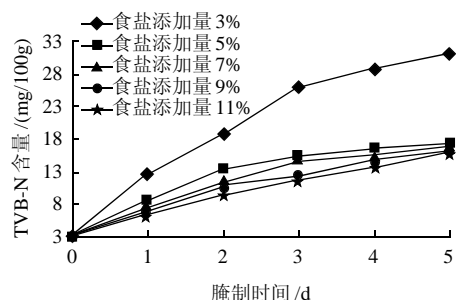


图1 食盐添加量随腌制时间变化对 TVB-N 值的影响

Fig. 1 Effect of salt amount and curing time on TVB-N of cured fish

由图 1 可知, 在相同时期, 随着食盐用量的增大, 腊鱼的 TVB-N 值呈减小趋势, 而随着腌制时间的延长, 各试验组的 TVB-N 值逐渐增大。当添加 3% 食盐时, TVB-N 值明显高于其他试验组, 而食盐添加量在 5%~11% 时, 腊鱼的 TVB-N 值相差很小。因此, 腊鱼腌制过程中食盐添加量应高于 3%。

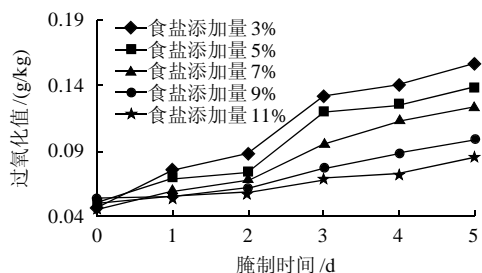


图2 食盐添加量随腌制时间变化对过氧化值的影响

Fig. 2 Effect of salt amount and curing time on peroxide value of cured fish

由图 2 可知, 腊鱼过氧化值随着食盐添加量的增大而降低, 但随着腌制时间的延长而增大。食盐添加量 3%、5% 和 7% 试验组腌制 3d 后, 过氧化值增至较高水平, 此后变化趋于平缓。食盐添加量 9% 和 11% 试验组在整个腌制过程中, 过氧化值均处于较低水平。因此, 从样品过氧化值的角度考虑, 应采用较高的食盐添加量。

可见, 当食盐添加量大于 3%, 腌制时间不低于 3d 时, 可达到较好的腌制效果。考虑成本、产品风味等因素, 食盐添加量的大致范围取为 5%~7%, 腌制时间为 3~5d。

2.1.3 腌制温度随腌制时间变化对腊鱼品质的影响

在接种量 10^6 CFU/g、食盐添加量 7% 的条件下腌制, 考察不同温度条件下腊鱼 TVB-N 含量、游离氨基酸含量、过氧化值、细菌总数和乳酸菌总数随腌制时间的变化情况, 结果见图 3~6。

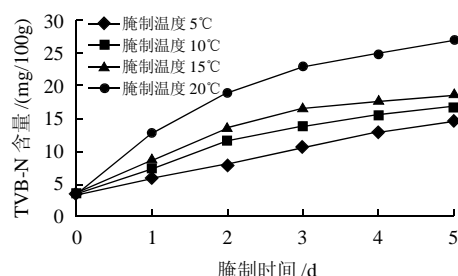


图3 腌制温度随腌制时间变化对 TVB-N 值的影响

Fig. 3 Effect of curing temperature and curing time on TVB-N of cured fish

由图 3 可知, 在相同时期, 随着腌制温度的升高, 腊鱼 TVB-N 值逐渐增大。20℃ 条件下腊鱼的 TVB-N 值明显高于其他试验组。高温条件加速了蛋白质、脂肪等大分子物质的降解, 因此为了保证腊鱼的品质, 应选择低温条件下腌制。

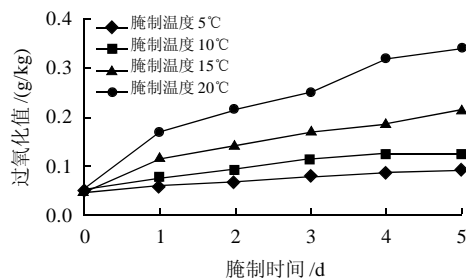


图4 腌制温度随腌制时间变化对过氧化值的影响

Fig. 4 Effect of curing temperature and curing time on peroxide value of cured fish

由图 4 可知, 在相同时期, 20℃ 试验组过氧化值明显高于其他试验组。各试验组过氧化值均随腌制时间的延长而增大, 5、10℃ 条件下上升较为缓慢, 在腌制 3d 结束时, 过氧化值变化趋于平缓。

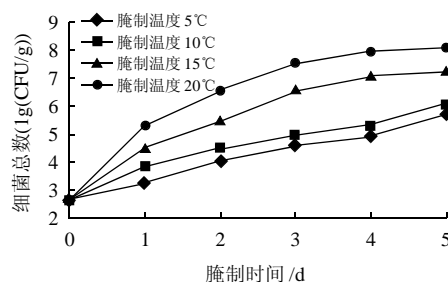


图5 腌制温度随腌制时间变化对细菌总数的影响

Fig. 5 Effect of curing temperature and curing time on total number of bacteria

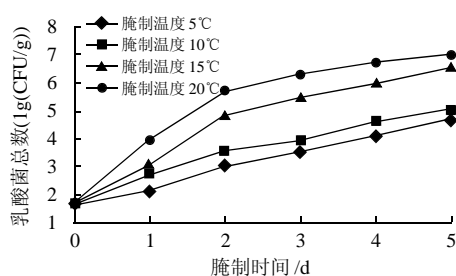


图6 腌制温度随腌制时间变化对乳酸菌总数的影响

Fig. 6 Effect of curing temperature and curing time on total number of lactic acid bacteria

由图5、6可知,不同腌制温度条件下,细菌总数的变化趋势与乳酸菌总数的变化趋势相同。随着温度的升高,细菌总数和乳酸菌总数均呈上升趋势。5℃和10℃条件下,细菌总数和乳酸菌总数在整个腌制过程中都处于较低水平。随着腌制时间的延长,各试验组细菌总数和乳酸菌总数都逐渐增大,腌制3d结束时,变化趋于平缓。从细菌总数与乳酸菌总数的变化情况可以看出,从腌制初期至腌制结束,乳酸菌均占很大比例,进一步说明乳酸菌为腊鱼加工过程中的优势微生物。

可见,腌制温度应低于20℃,结合成本、产品风味及口感等,最适腌制温度范围取5~15℃,最佳腌制时间仍然是3~5d。

2.2 混合乳杆菌腌制腊鱼的工艺优化

表4 正交试验结果及分析表

Table 4 Orthogonal array design and results

试验号	A	B	C	D	感官评分(总分100)
1	1	1	1	1	78.2
2	1	2	2	2	82.8
3	1	3	3	3	72.3
4	2	1	2	3	75.7
5	2	2	3	1	75.3
6	2	3	1	2	77.1
7	3	1	3	2	68.0
8	3	2	1	3	72.9
9	3	3	2	1	71.4
K_1	233.3	221.9	228.2	224.9	
K_2	228.1	231.0	229.9	227.9	
K_3	212.3	220.8	215.6	220.9	
k_1	77.77	73.97	76.07	74.97	
k_2	76.03	77.00	76.63	75.97	
k_3	70.77	73.60	71.87	73.63	
R	7.00	3.40	4.76	2.34	

在单因素试验基础上,按照正交试验设计表进行正交试验,通过感官评分确定最佳腌制工艺,结果见表4。各因素对感官评分影响的大小顺序为: $A > C > B > D$,即接种量影响最大,其次为腌制温度,然后是食盐添加量,腌制时间影响最小。混合乳杆菌腌制腊鱼工艺条件的最佳组合为 $A_1B_2C_2D_2$,即混合菌种接种量为 10^6 CFU/g,食盐添加量为5%,腌制温度为10℃,腌制时间为4d,感官评分最高,为82.8分。

3 结 论

通过单因素和正交试验所确定的乳杆菌生产腊鱼的最优工艺参数为:混合菌种接种量为 10^6 CFU/g,食盐添加量为5%,腌制温度为10℃,腌制时间为4d。该条件下生产出的腊鱼具有红棕色光泽,质地良好,保留了传统腊鱼的香腊味,而且由于乳杆菌的作用,还具有柔和酸味,产品的TVB-N值为18.72mg/100g,过氧化值为0.18g/kg。与自然发酵过程相比,混合乳杆菌生产腊鱼的时间比传统的方法缩短了3d,同时其TVB-N值和过氧化值分别降低了34.9%和51.6%。

参考文献:

- [1] 李明华. 2001年上半年日本鱼类产品的进口总量[J]. 水产科技, 2002(4): 45-46.
- [2] 谢静,熊善柏,曾令斌,等. 腊鱼加工中的乳酸菌及其特性[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(6): 32-36.
- [3] 林洪. 水产品安全性[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 175-178.
- [4] 刘树立,王春艳,王华,等. 肉制品发酵剂的研究进展[J]. 中国调味品, 2007(4): 31-36.
- [5] WOOD B J B. Microbiology of fermented foods[M]. New York and London: Elsevier Applied Science, 1985: 270-290.
- [6] 田国军,尚艳艳,黄泽元. 腊鱼中优势乳酸菌的分离、纯化及性质鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(6): 78-81.
- [7] 张刚. 乳酸细菌: 基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 416-427.
- [8] 钱名全. 咸干鱼的加工[J]. 内陆水产, 1998(8): 28-30.
- [9] 杨锡洪,吴海燕,解万翠,等. 风味咸鱼中乳酸菌和葡萄球菌的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 192-194.
- [10] 蒋云升,汪志君,于海,等. 如式香肠用发酵剂多菌种混培养技术的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 410-413.
- [11] 张水华,孙君社,薛毅. 食品感官鉴别[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2005: 102-109.
- [12] 张凤宽,易小艳,尤丽新,等. 发酵牛肉香肠生产工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 182-186.
- [13] 戴瑞彤. 腌腊制品生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 88-95.