

乳酸菌发酵法制备软壳脊尾白虾技术

陈小芳¹, 娄永江^{1*}, 王锦富²

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波南联冷冻食品有限公司, 浙江 宁波 315211)

摘要: 利用乳酸菌发酵作用制备软壳脊尾白虾, 研究了温度、时间、接种量等影响发酵的因素并采用响应面法优化了发酵技术参数。结果表明: 乳酸菌发酵制备软壳脊尾白虾最佳条件为: 时间 24 h, 接种量为 10^8 cfu/mL, 糖添加质量分数 20%, 温度 25 °C, 此时的脊尾白虾虾壳穿刺峰值为 169.4 g, 虾肉 pH 为 6.5, 虾风味保存良好。

关键词: 乳酸菌发酵; 脊尾白虾; 软化; 响应面优化

中图分类号: TS 254 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)05—0510—07

Study of Lactic Acid Fermentation Technology for Soft-Shell *Palaemon carincauda* Holthuis

CHEN Xiaofang¹, LOU Yongjiang^{1*}, WANG Jinfu²

(1. School of Marine Sciences of Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Ningbo Nanlian Frozen Food Co., Ltd, Ningbo 315211, China)

Abstract: By using the lactic acid fermentation technology to prepare the soft-shell *Palaemon carincauda* Holthuis, the factors including temperature, time, inoculum and other factors were studied. The fermentation parameters were optimized by using response surface method. The best conditions of preparation soft-shell *Palaemon carincauda* Holthuis for lactic acid bacteria fermentation were obtained as follows: fermentation time 24 h, inoculum 10^8 cfu/mL, the amount of sugar added 20%, and temperature 25 °C, under which the puncture peak of soft-shell *Palaemon carincauda* Holthuis reached to 169.4 g, and the pH of shrimp closed to 6.5 with well-preserved flavor.

Keywords: lactic acid fermentation, *Palaemon carincauda* Holthuis, soften, response surface optimization

脊尾白虾 (*Palaemon carincauda* Holthuis) 肉质细腻, 深受消费者的喜爱。然而由于虾壳质地坚硬, 极大地影响食用, 往往只能丢弃, 但壳中含有丰富的钙和甲壳素^[1-2], 资源浪费极为严重。对虾壳进行

软化是新思路, 在不影响虾风味的前提下将虾壳软化, 不仅能够在食用虾时没有坚硬的虾壳, 同时虾壳中含有的营养成分也易于吸收^[3-4], 可以有效地避免虾壳资源的浪费。

收稿日期: 2014-09-28

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项项目(013-E00180135100)。

* 通信作者: 娄永江(1965—), 男, 浙江嵊州人, 农学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事水产品加工方面的研究。

E-mail: louyongjiang@nbu.edu.cn

目前虾壳软化方法主要为化学法和酶法,化学法大多采用柠檬酸这一较为常用的食用酸,然而柠檬酸与虾壳中钙产生的柠檬酸钙不溶于水,无法吸收利用;酶法通过酶降解达到软化虾壳的目的,其软化效果不佳。国外已有利用乳酸菌发酵对虾加工废弃物的研究,乳酸菌发酵产生的乳酸会将虾头、虾壳中不溶性钙盐转化为可溶性乳酸钙为人体补充钙质,同时发酵可以消除一定的腥臭味^[5],发酵条件也较为温和。

作者以浙江舟山海塘养殖脊尾白虾为研究对象,通过对其虾壳乳酸菌软化技术的研究,为实现软壳脊尾白虾制品提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 脊尾白虾 浙江舟山海塘养殖品,条长6~8 cm。活体运输至实验室,于90~95℃含1%食盐、0.3%柠檬酸热水中漂烫2 min,迅速用流动水冷却至常温,包装后于-28℃(温差范围±2℃)下速冻至中心温度为-18℃,移至-18℃冷库冷藏备用。

1.1.2 植物乳杆菌 宁波大学水产品加工与贮藏实验室保藏菌种。

1.1.3 试剂 MRS肉汤培养基、MRS琼脂培养基:杭州微生物试剂有限公司;氯化钠为分析纯。

1.1.4 主要仪器 食品物性测试仪(TA-XT Plus):Stable micro Systems(UK);酸度计 PHSJ-3F:上海雷磁;Sartorius分析天平:赛多利斯天平有限公司;冷冻离心机:湖南湘仪。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵菌液的制备 将植物乳杆菌接种于MRS肉汤培养基中,25℃培养24 h,重复1~2次,使菌种活化,4℃、3 000 r/min离心10 min,倾去上清液,加入预先灭菌冷却至4℃的0.85%的生理盐水,混匀后制成浓度约为10⁸ cfu/mL的乳酸菌液,4℃下冷藏备用。

1.2.2 虾体穿刺实验 使用TA-XT Plus食品物性测试仪进行穿刺实验^[6-7]。将处理后的脊尾白虾沥水5 min,平整放置,穿刺位置在虾体第二节虾壳处^[8]。物性仪参数设定为:P/2N探头,测试前后移动速度为5 mm,测试时的移动速度为1 mm,测试距离为4 mm。

1.2.3 虾肉pH测定 按照GB/T 5009.45-2003方

法测定^[9]。

1.3 实验设计

1.3.1 单因素试验 分别以时间(0~60 h)、温度(20~40℃)、接种量(10⁵~10⁹ cfu/mL)、糖质量分数(0%~24%)、固液比(1:1~1:3)、初始pH(5.5~7.5)为考察因素与水平,测定虾壳穿刺峰值和虾肉pH值,分析各因素对脊尾白虾的影响。

1.3.2 优化试验设计 采用软件Design-expert 8.0.6(State-Ease,Minneapolis,MN,USA)中的Box-Behnken模式进行响应曲面试验设计^[10-11],以穿刺峰值和虾肉pH为响应值,实验因子和水平见表1。

表1 响应面分析因子及水平表

Table 1 Analysis of factors and levels of response surface

因子	水平		
	-1	0	+1
X ₁ 发酵时间/h	12	24	36
X ₂ 接种量/(cfu/mL)	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
X ₃ 糖添加质量分数/%	12	18	24
X ₄ 发酵温度/℃	20	25	30

1.4 数据统计分析

所有数据利用Microsoft Excel进行统计处理,用SAS 9.2进行ANOVA分析,不同平均值之间利用LSD法进行差异显著性检验。用Design Expert 8.0.6建立响应曲面回归方程,响应曲面实验结果利用最小二乘法进行二次多项式回归统计分析,其基本模型如下:

$$Y=\beta_0+\sum\beta_iX_i+\sum\beta_{ii}X_i^2+\sum\sum\beta_{ij}X_iX_j$$

式中, β_0 、 β_i 、 β_{ii} 和 β_{ij} 为回归系数; X_i 和 X_j 为不同的自变量; Y 为响应变量。

2 结果与讨论

2.1 影响虾壳软化因素的研究

虾壳中的钙成分流失降低了其脆度,使得虾壳的韧性增强,软化效果越好,其韧性越强,使得探头穿刺过虾壳所需的力越大,穿刺峰值越大,软化效果和穿刺试验的穿刺峰值之间存在正相关的关系^[8]。

图1~6是各单因素与脊尾白虾虾壳软化效果的关系。可以看出,时间、接种量、蔗糖添加量、发酵温度对于虾壳的软化效果具有显著的影响($P<0.05$),而初始pH和固液比在一定范围内对于其影响较小,这与刘斯雅等^[12]采用植物乳杆菌发酵虾头、虾壳从而回收蛋白质和甲壳素的研究结果接近。这

固然与菌种本身的生长繁殖、代谢产物的积累有密不可分的关系,在一定范围内,发酵时间越长、温度越高、初始接种体积分数越大,软化效果越好。

但过多的乳酸会导致虾肉的 pH 过低,对虾肉的品质破坏严重。从图 1~6 中穿刺峰值和虾肉 pH 整体变化考虑,蔗糖添加量与发酵时间、接种体积分数、温度等四个因素影响显著,有待进一步优化。

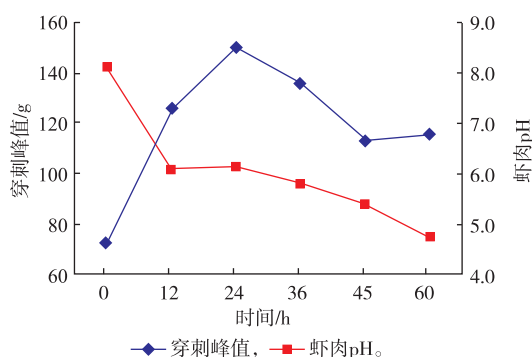


图 1 软化时间与脊尾白虾软化效果的关系

Fig. 1 Softening effect of time on *Palaemon carincauda* Holthuis

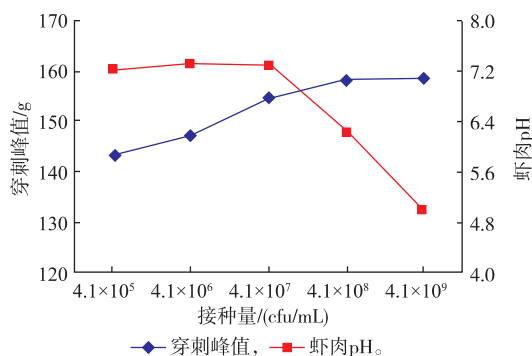


图 2 接种量与脊尾白虾软化效果的关系

Fig. 2 Softening effect of inoculation amount on *Palaemon carincauda* Holthuis

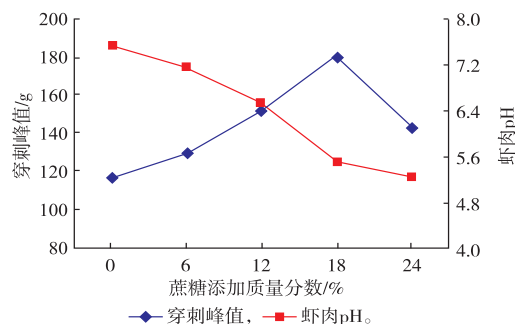


图 3 蔗糖添加质量分数与脊尾白虾软化效果的关系

Fig. 3 Softening effect of sucrose amount on *Palaemon carincauda* Holthuis

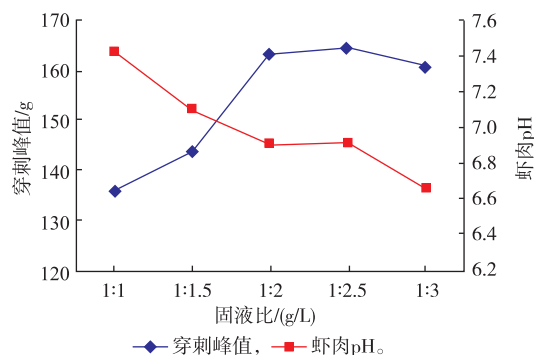


图 4 固液比与脊尾白虾软化效果的关系

Fig. 4 Softening effect of the ratio of solid to liquid on *Palaemon carincauda* Holthuis

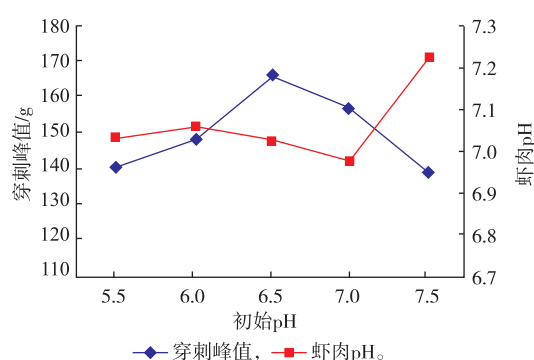


图 5 初始 pH 与脊尾白虾软化效果的关系

Fig. 5 Softening effect of initial pH on shrimp *Palaemon carincauda* Holthuis

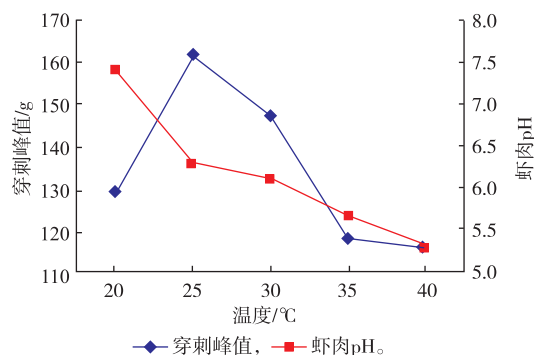


图 6 温度与脊尾白虾壳软化效果的关系

Fig. 6 Softening effect of temperature on *Palaemon carincauda* Holthuis

2.2 响应面法技术参数的优化

以穿刺峰值(Y_1)和虾肉 pH 值(Y_2)为响应值,按照优化试验设计进行试验,结果见表 2。通过 Design-Expert8.0.6 软件对响应值与各因素编码值进行回归拟合分析,得到回归方程为:

$$Y_1 = 166.04 + 15.45X_1 + 12.48X_2 + 6.19X_3 + 6.4X_4 - 4.00X_1X_2 - 4.96X_1X_3 + 1.07X_1X_4 - 2.32X_2X_3 + 6.76X_2X_4 -$$

$$1.07X_3X_4-16.18X_1^2-24.20X_2^2-12.33X_3^2-19.98X_4^2;$$
$$Y_2=6.68-0.83X_1-0.50X_2-0.022X_3-0.57X_4-0.28X_1X_2+0.000X_1X_3-0.27X_1X_4-0.16X_2X_3-0.32X_2X_4-0.26X_3X_4+0.021X_1^2-0.049X_2^2+0.035X_3^2+0.11X_4^2。$$

响应值所建立的回归方程模型具有高度的显著性 (P_1 、 P_2 均小于 0.000 1), 失拟项不显著 (P_1 =

0.025 6, P_2 =0.131 5 均大于 0.05), 模型决定系数 $R_1^2=0.984\ 3$ 、 $R_2^2=0.989\ 2$, 模型校正决定系数 $AdjR_1^2=0.968\ 6$ 、 $AdjR_2^2=0.978\ 5$, 模型信噪比 (Adeq. Precision) 分别为 27.040、35.440 大于临界值 4。说明两个模型的拟合程度较好, 试验误差小, 因此可以采用该模型来分析和预测虾壳软化及虾肉 pH 的变化。

表 2 响应曲面试验设计与结果

Table 2 Response surface experimental design and results

试验号	时间 X_1 /h	接种量 X_2 /(cfu/mL)	糖添加质量分数 X_3 /%	温度 X_4 /°C	穿刺峰值/g	虾肉 pH
1	0(24)	0(108)	-1(12)	1(30)	135.1	6.56
2	0	1(109)	0(18)	-1(20)	125.9	7.12
3	0	-1(107)	1(24)	0(25)	126.0	7.33
4	1(36)	0	0	1	155.9	5.21
5	0	0	1	-1	131.5	7.71
6	0	1	-1	0	140.0	6.27
7	0	-1	0	-1	112.4	7.44
8	0	1	0	1	145.5	5.37
9	-1(12)	0	0	1	121.2	7.28
10	0	1	1	0	149.7	5.81
11	0	0	0	0	167.0	6.61
12	-1	1	0	0	123.3	7.45
13	1	0	0	-1	138.8	6.84
14	0	0	1	1	146.8	5.96
15	0	-1	-1	0	107.1	7.15
16	0	0	0	0	165.1	6.64
17	0	0	0	0	164.7	6.64
18	0	-1	0	1	104.9	6.97
19	0	0	0	0	170.0	6.78
20	1	0	1	0	152.8	5.92
21	0	0	-1	-1	115.5	7.25
22	0	0	0	0	163.5	6.72
23	1	-1	0	0	133.1	6.49
24	1	1	0	0	144.7	5.11
25	-1	-1	0	0	95.7	7.72
26	-1	0	0	-1	108.4	7.83
27	1	0	-1	0	153.7	5.84
28	-1	0	-1	0	113.0	7.51
29	-1	0	1	0	131.9	7.59

对于脊尾白虾穿刺峰值(Y_1)模型, 回归方程的方差分析结果表明, 因素的一次项和二次项的影响均非常显著 ($P<0.000\ 1$), 4 因素对脊尾白虾穿刺峰值影响的排序为时间(X_1)>接种量(X_2)>温度(X_4)>糖添加量(X_3)。在交互项中, X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_4 也具有显著的影响 ($P<0.05$), 见图 7~9。其原因在于, 利用

植物乳杆菌发酵法软化虾壳过程中, 不仅能分泌大量乳酸分解虾壳碳酸钙, 使脊尾白虾穿刺峰值上升, 同时也分泌出胞外蛋白酶系, 导致虾肉降解糜烂, 从而在穿刺测定时形成缓冲填, 造成穿刺峰值下降。

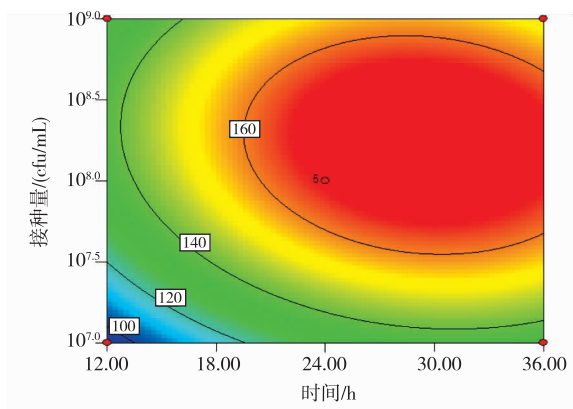


图7 时间与接种量对穿刺峰值的交互影响等高线图

Fig. 7 Contour plots of interaction effect between time and amount of inoculation on puncture peak

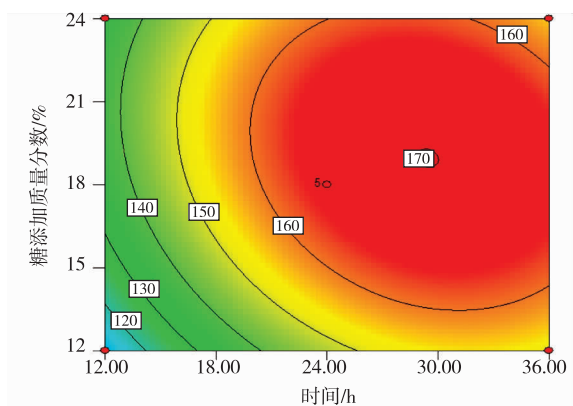


图8 时间与糖添加质量分数对穿刺峰值交互影响等高线图

Fig. 8 Contour plots of interactive effects between time and amount of sugar on puncture peak

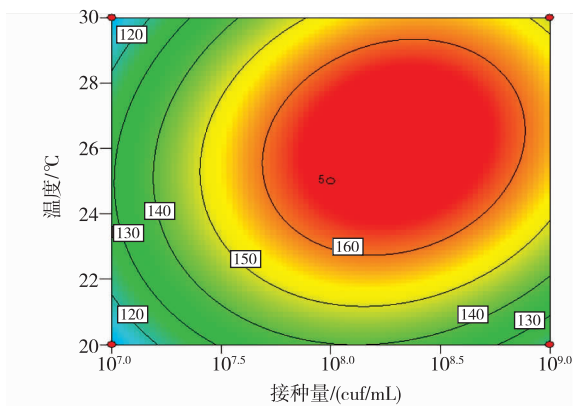


图9 接种量与温度对穿刺峰值交互影响等高线图

Fig. 9 Contour plots of interactive effects between inoculation quantity and temperature on puncture peak

对于脊尾白虾虾肉 pH(Y_2)模型,回归方程的方差分析结果表明,方程中仅时间(X_1)、接种量(X_2)、温度(X_4)三个因素的线性和温度(X_4)的平方项的影响显著 ($P < 0.0001$),4个因素对虾肉 pH 值影响的排序为时间(X_1)>接种量(X_2)>温度(X_4)>糖添加质量分数(X_3)。

在交互项中, X_1X_2 、 X_1X_4 、 X_2X_4 、 X_3X_4 也具有显著影响($P < 0.05$),见图 10–13。这与植物乳杆菌发酵产生的乳酸的含量有关,大量乳酸除去作用于虾壳碳酸钙部分,渗入虾肉中改变虾肉的 pH 值。

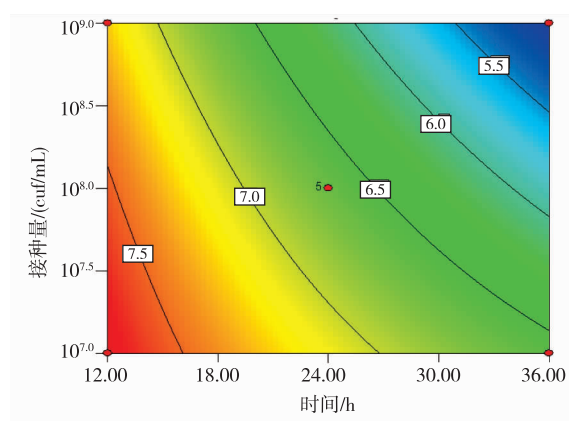


图10 时间与接种量对虾肉 pH 的交互影响等高线图

Fig. 10 Contour plots of interaction effect between time and amount of inoculation on shrimp pH

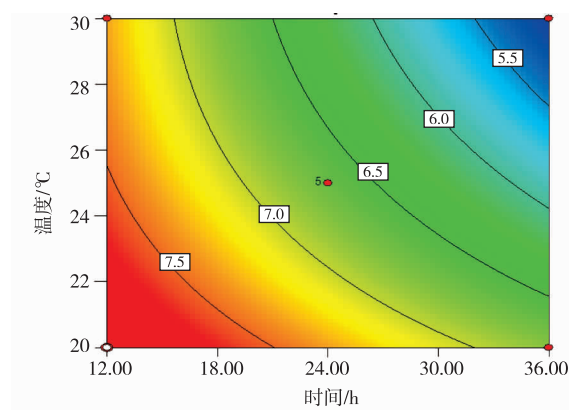


图11 时间与温度对虾肉 pH 的交互影响等高线图

Fig. 11 Contour plots of interaction effect between time and temperature on shrimp pH

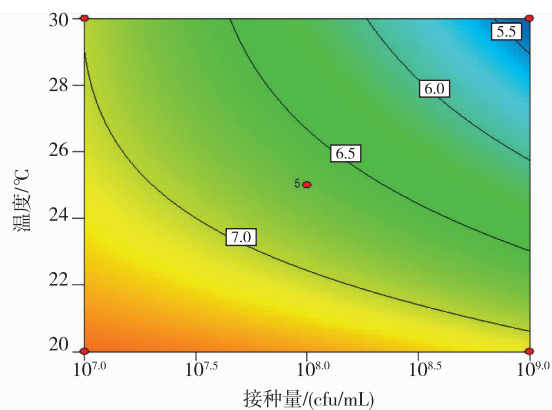


图 12 接种量与温度对虾肉 pH 的交互影响等高线图

Fig. 12 Contour plots of interaction effect between inoculation amount and temperature on shrimp

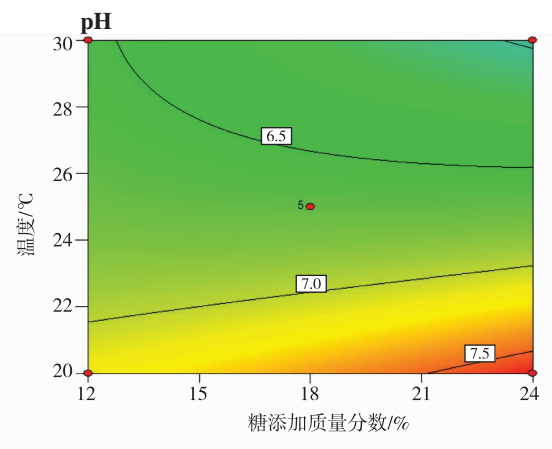


图 13 糖添加质量分数与温度对虾肉 pH 的交互影响等高线图

Fig. 13 Contour plots of interactive effects between amount of sugar and temperature on shrimp pH

理想的软壳脊尾白虾制备技术应在具有较高的软化程度,并且尽可能对虾肉的品质不造成过大的影响,同时还要考虑能耗及后续工艺的影响。因

此在结合响应面模型分析的基础上,以响应曲面二次回归模型中穿刺峰值的最大值,虾肉 pH 6.5 为响应值,以时间、接种量、糖添加质量分数和温度为实验因素,利用软件 Design-Expert 8.0.6 对回归模型优化,得出脊尾白虾乳酸菌发酵最佳软化工艺为:时间 25.78 h,接种量为 $10^{8.11}$ cfu/mL,糖添加质量分数 19.21%,温度 24.94 °C,此时的虾壳穿刺峰值为 169.425,虾肉 pH 6.499。为考虑实际生产工艺与生产的连续性,将时间调整为 24 h,接种量 $10^{8.0}$ cfu/g,糖添加质量分数 20%,温度 25 °C,并以此工艺进行脊尾白虾发酵试验。在该条件下,所得的虾壳穿刺峰值为 166.148 g,虾肉 pH 6.64,与理论值相比相对误差<5%。这说明二次多项式数学模型进行等高线叠加所得到的优化技术参数符合设计目标,实验设计和数学模型具有可靠性和重现性。可见采用响应面法可实现多目标同步优化乳酸菌发酵制备软壳脊尾白对虾,得到具有实际应用价值的技术参数。

3 结 语

作者研究了乳酸菌发酵法制备软壳脊尾白虾,虾壳软化率(128.8%)明显高于崔宏博等^[8]报道的采用乙酸与木瓜蛋白酶结合法的软化率(60.5%),同时乳酸菌发酵过程中能产生乙酸、乳酸等与虾壳中钙结合产生乳酸钙,渗透进入虾体可以提高钙的生物利用率^[13]。另外乳酸菌能有效抑制其他微生物的活动,降低虾肌肉总挥发性盐基氮的生成量^[14]。

采用乳酸菌发酵法制备软壳脊尾白虾,与对照组相比虾壳的穿刺峰值明显增大,而同时虾肉的风味未有明显变化,可以预见,随着对该研究的深入,乳酸菌发酵在水产品加工中将是一个重要的加工手段。

参考文献:

- [1] 王兴强,阎斌伦,马甦,等. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 齐鲁渔业,2005,22(8):21-23.
WANG Xingqiang, YAN Binlun, MA Sheng, et al. Study on the biology and cultral ecology of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Shandong Fisheries*, 2005, 22(8): 21-23. (in Chinese)
- [2] 邵银文,王春琳,励迪平,等. 脊尾白虾自然群体与养殖群体的营养差异[J]. 水利渔业,2008,28(4):34-37.
SHAO Yinwen, WANG Chunlin, LI Diping, et al. Nutrient differences between natural populations and cultured populations of white shrimp[J]. *Reservoir Fisher*, 2008, 28(4): 34-37. (in Chinese)
- [3] 曹荣. 对虾生物保鲜与其熟制品保藏技术的研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.
- [4] 彭燕,曾霞. 南美白对虾头部的营养成分分析及评价[J]. 茂名学院学报,2007,17(1):25-27.
PENG Yan, ZENG Xia. Analysis and assessment of nutritive composition in *Penaeus vannamei* head [J]. *Journal of Maoming*

- University, 2007, 17(1):25-27.(in Chinese)
- [5] 段杉,张影霞,陆婷婷,等. 利用乳酸菌发酵协同自溶作用回收虾头、虾壳中的蛋白质[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 80-83.
- DUAN Shan, ZHANG Yingxia, LU Tingting, et al. Recovery of protein from shrimp waste by synergistic action of lactic acid fermentation and autolysis[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2009, 35(2): 80-83.(in Chinese)
- [6] 李里特. 食品物性学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [7] Wilkinson C, Dijksterhuis G B, Minekus M. From food structure to texture [J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2000 (11): 442-450.
- [8] 崔宏博, 刘鑫, 薛勇, 等. 南美白对虾虾壳软化及其制品的研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 11(5): 52-56.
- CUI Hongbo, LIU Xin, XUE Yong, et al. Study of the shrimp shell softening treatment and the shrimp product [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010, 11(5): 52-56.(in Chinese)
- [9] GB/T5009.45-2003 水产品卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [10] Box G E P, Hunter W G. Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building [M]. New York: Wiley, 1990.
- [11] 刘斯雅, 林瑞君, 庄泽娟, 等. 植物乳杆菌发酵虾头、虾壳回收蛋白质和甲壳素的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 24(4): 408-411.
- LIU Siya, LIN Ruijun, ZHUANG Zehua, et al. Recovery of protein and chitin from shrimp waste by lactic acid fermentation with *L.plantarum*[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2011, 24(4): 408-411.(in Chinese)
- [12] 张祥刚, 周爱梅. 南美白对虾虾头、虾壳化学成分的对比研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(3): 224-227.
- ZHANG Xianggang, ZHOU Aimei. Comparative study of chemical compositions of white shrimp head and shell [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2009, 25(3): 224-227.(in Chinese)
- [13] 周晔, 王国霞, 黄文庆, 等. 乳酸菌对南美白对虾保鲜效果的初步探讨[J]. 广东农业科学, 2010, 10: 117-119.
- ZHOU Ye, WANG Guoxia, HUANG Wenqing, et al. Primary study on the application of lactic acid bacterium in *Penaeus vannamei* preservation[J]. **Guangdong Agricultural Sciences**, 2010, 10: 117-119.(in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 第八届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会

开始日期: 2016-08-19

结束日期: 2016-08-23

所在城市: 内蒙古自治区 呼和浩特市

主办单位: 中国微生物学会微生物资源专业委员会、国家微生物资源平台

承办单位: 内蒙古农业大学、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、内蒙古乳酸菌学会

摘要截稿日期: 2016-07-10

全文截稿日期: 2016-07-10

联系人: 孟和毕力格 13514718220、钟 智 1369471831

E-MAIL: ncmr2016@caas.ac.cn

<http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=3728>

会议背景介绍: 为了加强微生物资源学领域学术交流, 全面推进我国微生物基因组学研究, 提升微生物资源研究、保护和可持续利用水平, 更好服务于国家生物产业发展战略需求, 促进微生物资源学学术交流与发展。由中国微生物学会微生物资源专业委员会、国家微生物资源平台共同主办, 内蒙古农业大学、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、内蒙古乳酸菌学会等单位共同承办的第八届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会将于2016年8月19-23日在内蒙古自治区呼和浩特市召开。

此次会议将为与会代表提供一个学术交流、成果展示以及项目合作的极好平台。大会将特邀两院院士及国内外著名专家学者到会交流, 重点就微生物资源的开发和利用, 大数据时代微生物组学技术的发展以及微生物与人类健康等议题展开讨论。热忱欢迎微生物资源领域的同行莅临大会, 齐聚一堂, 共享微生物资源领域盛事。