

人工接种单一/复合乳酸菌对发酵鲑鱼鱼糜凝胶特性的影响

吕欣然¹, 王彦博¹, 王小咪¹, 白凤翎¹, 励建荣^{1*}, 郑万源²

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

国家鱼糜及鱼糜制品加工技术研发分中心 辽宁锦州 121013

²浙江兴业集团有限公司 浙江舟山 316120)

摘要 以鲑鱼鱼糜为研究对象,分别采用植物乳杆菌 LY1-3 单一和与清酒乳杆菌 LS 复配发酵,测定不同发酵时间的鱼糜的 pH 值、质构、凝胶强度、化学作用力及肌原纤维蛋白的变化。结果表明,与自然发酵组相比,复合和单一发酵组鲑鱼鱼糜 pH 值快速下降,鱼糜的硬度、胶着度和咀嚼度快速增加,且复配组比单一组分别提高了 22.30%,40.49%,43.11%。发酵 32 h 时鱼糜凝胶强度达到峰值,复配组比单一组增加了 37.99%。鱼糜发酵过程中,离子键含量持续下降,氢键含量与疏水作用力于 32 h 达到峰值,二硫键含量和非二硫键含量增加,且复配组比单一组化学作用力增加显著。此外,SDS-PAGE 图谱显示,随着发酵的进行,肌动蛋白和肌球蛋白轻链被快速降解,肌球蛋白重链被部分水解并形成新的大分子蛋白聚集体(100~135 ku),促进了鱼糜凝胶网络的形成。说明植物乳杆菌 LY1-3 单一或与清酒乳杆菌 LS 复合发酵均可改善鲑鱼鱼糜凝胶强度,且接种复配发酵组较好。本研究结果为开发乳酸菌发酵鱼糜制品提供理论参考。

关键词 鲑鱼鱼糜; 乳酸菌; 发酵; 凝胶特性

文章编号 1009-7848(2024)06-0074-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.007

鲑鱼学名“蓝点鲑”,广泛分布于我国渤海、东海、黄海等海域,由于其营养丰富、风味独特、价格低廉等特点而深受消费者的喜爱^[1]。目前,鲑鱼主要以鲜食和冻藏销售为主,然而长时间冻藏会使鱼肉的肌原纤维蛋白变性,导致其口感和品质降低。为进一步提高鲑鱼的经济利用价值,可将其深加工成一些鱼糜制品^[2]。鱼糜作为一款精制的优质蛋白产品,因其营养健康和食用方便等特点而备受欢迎^[3-4]。然而,原料鱼一般凝胶性能较差,导致鱼糜制品的品质较低。改善和增强鱼糜制品凝胶性能,已成为鱼糜制品加工亟待解决的关键问题^[5]。

利用微生物发酵技术改善鱼糜制品凝胶性能是目前研究的热点^[6]。发酵鱼糜是指利用微生物或其代谢产物,使鱼糜中的蛋白经一系列生物化学变化,形成具有高凝胶强度、强弹性、风味独特的鱼糜制品。传统自然发酵鱼糜发酵周期长,品质不

稳定。为确保鱼糜制品的稳定性和安全性,运用现代微生物技术,通过添加微生物型发酵剂来改善发酵鱼糜品质。乳酸菌为发酵鱼糜中最常见的发酵剂,依靠其产酸特性来促进鱼肉凝胶化。王乃富等^[7]探究了不同乳酸菌菌株发酵对鲮鱼鱼糜菌相和品质变化的影响,研究发现乳酸菌发酵在降低鲮鱼肉糜 pH 值的同时,还可以改善鲮鱼肉糜的凝胶强度和白度。Riebroy 等^[8]在黄鳍鲷鱼糜中接入不同种乳酸菌,均可显著提高黄鳍鲷鱼糜的凝胶强度。现阶段的研究多为单一发酵剂对鱼糜制品凝胶的影响,关于复合发酵剂发酵鱼糜的相关研究鲜有报道。

本课题组前期筛选获得 1 株产蛋白酶(66.8 U/mL)且可作为发酵食品安全(氨基酸脱羧酶阴性)生产的菌株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) LY1-3。本研究以鲑鱼鱼糜为研究对象,分别采用植物乳杆菌 LY1-3 单一和与清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)LS 复配发酵,测定发酵鱼糜质构特性、凝胶强度、持水力、化学作用力、肌原纤维等的变化,研究结果旨在为开发乳酸菌发酵鱼糜制品提供理论参考。

收稿日期: 2023-06-03

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901004);

国家自然科学基金面上项目(31972107)

第一作者: 吕欣然,女,博士,副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 鲑鱼,辽宁省锦州市林西路水产市场;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) LY1-3、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)LS,均为本院微生物实验室保藏。

MRS肉汤,杭州百思生物技术有限公司;氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、三氯乙酸(TCA),天津市化工三长有限公司;牛血清蛋白标准品、十二烷基硫酸钠(SDS)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、 β -巯基乙醇、考马斯亮蓝、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;处理液I(0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L 甘氨酸, 4 mmol/L EDTA, 8 mol/L 尿素, pH 8.0)、处理液II(处理液I + 0.15 mol/L β -巯基乙醇, pH 8.0)。

1.1.2 仪器与设备 SG2-ELK pH计,瑞彬科技有限公司(广州);GS-800电泳拍照系统, Bio-Rad公司(美国);5804R冷冻高速离心机, Eppendorf公司(德国);UV2550紫外-可见分光光度计, 岛津仪器(苏州)有限公司;SPX-250智能生化培养箱,海曙赛福实验仪器厂(宁波);DL-CJ-2N型超级洁净工作台,东联哈尔仪器制造(北京);JHG-Q60-P100均质机,上海融合机械设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 单一/复合乳酸菌发酵剂的制备 将植物乳杆菌 LY1-3 单独或与清酒乳杆菌 LS 以 1:1 混合接种于 MRS 肉汤,置于 37 °C 下培养 24 h,传代培养 3 代后。将乳酸菌培养液于 8 000 g 离心 10 min,菌体用 0.85%生理盐水洗涤 3 次后,重悬于生理盐水溶液中,菌液浓度约 10^7 CFU/mL。

1.2.2 发酵鲑鱼鱼糜的制备 参照李文协等^[9]方法制备鲑鱼鱼糜。依据质量基准,在解冻后的鲑鱼鱼糜中加入 2%食盐、2%蔗糖粉、5%玉米淀粉、2%乳酸菌发酵剂,混匀后,置于 30 °C 培养 48 h,每隔 8 h 取样进行后续指标的测定。

1.2.3 肌原纤维蛋白的测定 参照李学鹏等^[10]方法提取发酵鱼糜中的肌原纤维蛋白。取 1 g 发酵鱼糜,加入 5 倍体积 10 mmol/L 的 Tris 盐酸盐缓冲液(pH 7.2),高速均质 90 s。在 4 °C 条件下 5 000×g 离心 10 min,弃上清液。上述过程重复 3

次。在最后 1 次沉淀中加入 5 倍体积的含 0.6 mol/L 氯化钠的 10 mmol/L Tris 盐酸盐缓冲液(pH 7.2),高速均质,在 4 °C 条件下 5 000×g 离心 10 min,保留上清液并调整蛋白质量浓度为 2 mg/mL。蛋白采用 12%的浓缩胶和 4%的分离胶,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

1.2.4 pH 值的测定 依据 GB5009.237-2016《食品安全国家标准 食品 pH 值测定标准》,取 10 g 发酵鲑鱼鱼糜均质静置 30 min 后,用 pH 计测定其 pH 值。

1.2.5 凝胶特性的测定 将发酵鱼糜切成大小均一的 1 cm³ 立方体,采用质构仪测定其凝胶特性,选取 P 0.5S 探头进行测试,速率为 1 mm/s,形变量 50%,计算其凝胶强度^[11]。同时,选取 P 50 探头,在速率 2 mm/s,形变量 50%条件下,测定发酵鱼糜样品的质构特性。

1.2.6 化学作用力的测定 分子间相互作用力:参考 Gomez 等^[12]方法稍作修改,将 10 g 发酵鱼糜样品分别与 50 mL 的 4 种溶液(A:0.05 mol/L 氯化钠;B:0.6 mol/L 氯化钠;C:0.6 mol/L 氯化钠与 1.5 mol/L 尿素混合;D:0.6 mol/L 氯化钠和 8 mol/L 尿素混合)混合均质,静置 1 h 后,于 4 °C 下 10 000×g 离心 20 min。然后用紫外分光光度计读取 280 nm 处的吸光度,以计算蛋白质浓度。离子键含量、氢键含量和疏水相互作用力按照以下公式进行表征值计算:

离子键表征值=溶液 B 蛋白浓度-溶液 A 蛋白浓度 (1)

氢键表征值=溶液 C 蛋白浓度-溶液 B 蛋白浓度 (2)

疏水相互作用表征值=溶液 D 蛋白浓度-溶液 C 蛋白浓度 (3)

巯基含量测定:参考 Monahan 等^[13]和陈晓倩等^[3]方法。将不同发酵时间的 1 g 鲑鱼样品分别置于 30 mL 处理液 I 中均质,并使用磁力搅拌器于 25 °C 连续搅拌 6 h,经 12 000×g 高速离心 20 min 后收集上清液。将等体积上清液和 0.1% DTNB 溶液混匀,于 40 °C 水浴 25 min,测定其吸光度 $A_{412\text{nm}}$ 。蛋白含量为样品直接溶解于 0.5 mol/L NaOH 溶液中蛋白的浓度。总巯基含量(SH_T)按公式(4)计算:

$$\text{巯基含量}(\mu\text{mol/g}) = \frac{A_{412\text{nm}} \times D \times 10^6}{c \times V \times 13600} \quad (4)$$

式中: $A_{412\text{nm}}$ 为吸光度; D 为稀释倍数; c 为蛋白质量,mg; V 为溶于0.5 mol/L NaOH溶液的体积,mL;13 600为摩尔消光系数,L/(mol·cm)。

二硫键含量测定:将不同发酵时间的1 g 鲱鱼样品分别置于30 mL处理液Ⅱ中均质,使用磁力搅拌器并于25℃搅拌6 h,添加TCA(0.5 g/mL)溶液至最终质量分数为5%,继续搅拌2 h后5 000 g离心弃去上清液。用5%TCA溶液漂洗2次后重悬于20 mL处理液Ⅰ中,经12 000×g高速离心20 min后收集上清液,按公式(4)计算上清液中巯基含量(SH_F)。二硫键含量按公式(5)计算:

$$\text{二硫键含量}(\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{SH}_T - \text{SH}_F}{2} \quad (5)$$

式中: SH_T 为总巯基含量, $\mu\text{mol/g}$; SH_F 为上清液中巯基含量, $\mu\text{mol/g}$ 。

溶解率:参照 Benjakul 等^[14]方法进行鱼糜溶解率的测定。将不同发酵时间的1 g 鲱鱼样品中分别加入20 mL pH 8.0的Tris盐酸盐缓冲液(20 mmol/L含体积分数1% SDS、体积分数2% β -巯基乙醇和8 mol/L尿素)进行均质。将均质后的匀浆煮沸2 min,搅拌冷却至室温,于4℃下10 000×g离心30 min后收集上清液。上清液中添加50%的冷三氯乙酸至终质量分数为10%,于4℃放置18 h后再次离心收集沉淀。用10%TCA洗涤2次后,溶解于0.5 mol/L NaOH溶液。用Bradford法测定蛋白含量,计算发酵鱼糜的溶解率^[15]。

1.2.7 数据处理与统计分析 所有试验均设置3次重复,用平均值±标准差的形式表示。采用SPSS18.0和Origin 8.5对结果进行统计分析和图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 鲱鱼鱼糜发酵过程中 pH 值的变化

鱼糜制品中 pH 值的变化可影响其肌原纤维蛋白氨基酸侧链电荷分布,改变蛋白质分子间的相互作用,导致蛋白质结构及诱导凝胶形成的化学作用力发生变化^[16]。图1是对照组(CK)、单一发酵剂组(LY1-3)和复合发酵剂组(LY1-3+LS)发酵鱼糜 pH 值的变化结果。从图中可知,发酵鱼糜的

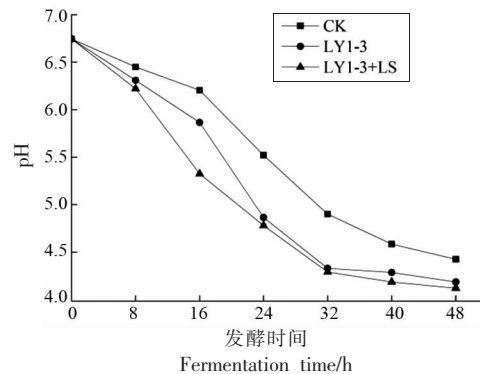


图1 鲱鱼鱼糜发酵过程中 pH 值的变化

Fig.1 Changes in pH value of mackerel surimi during fermentation

初始 pH 值接近中性,随着发酵时间的延长鱼糜的 pH 值均呈下降趋势。发酵 32 h 时,单一和复合发酵剂组的 pH 值迅速降至 4.33 和 4.19,但对照组 pH 值下降缓慢为 4.90。表明乳酸菌适应鲱鱼鱼糜生存环境后能够快速生长繁殖,产生大量有机酸,且复合发酵剂的产酸能力强于单一发酵剂的产酸能力。发酵 32~48 h,pH 值下降速率趋于缓慢,可能是由于发酵基质营养供给不足,使乳酸菌生长受到限制^[16]。李培瑜等^[17]用戊糖片球菌发酵鲱鱼糜,发酵 36 h 过程中鲱鱼鱼糜 pH 值从 6.16 降低到 4.84。本研究与其相似。

2.2 发酵过程中鱼糜凝胶特性的变化

质构特性主要包括硬度、弹性、黏聚性和回复性等参数,可用来判断鱼糜制品的新鲜度和凝胶内部是否发生细微变化^[18]。由表1可知,鲱鱼鱼糜初期凝胶未形成,无法通过质构仪测得其弹性、硬度等凝胶特性指标。单一发酵剂组与复合发酵剂组的发酵鱼糜凝胶的胶着度、咀嚼度和硬度随着发酵时间的延长呈先上升后下降的趋势,而弹性和黏聚性变化不大。鱼糜中的蛋白质因 pH 值降低而变性形成凝胶网络结构,使鱼糜组织间的硬度、胶着度和咀嚼度增大。在发酵后期,硬度、胶着度和咀嚼度都略微下降的原因可能是大量共价交联键的形成^[18]。单一发酵剂组和复合发酵剂组的硬度、胶着度和咀嚼度分别在 32 h 和 24 h 达到峰值,且复合发酵剂组发酵鱼糜凝胶的硬度、胶着度和咀嚼度比单一发酵剂组分别提高了 22.30%, 40.49%, 43.11%。说明添加发酵剂可有效提高鱼

表 1 鲛鱼鱼糜发酵过程中质构的变化

Table 1 Changes in texture of mackerel surimi during fermentation

发酵时间/h	处理组别	硬度/g	弹性	黏聚性	胶着度	咀嚼度/g	回复性
0	CK	—	—	—	—	—	—
	LY1-3	—	—	—	—	—	—
	LY1-3+LS	—	—	—	—	—	—
8	CK	300.18 ± 44.33 ^c	0.73 ± 0.01 ^c	0.63 ± 0.02 ^d	180.27 ± 10.82 ^d	129.74 ± 2.20 ^d	0.27 ± 0.00 ^c
	LY1-3	461.26 ± 7.18 ^f	0.76 ± 0.00 ^c	0.67 ± 0.01 ^d	261.36 ± 13.59 ^e	191.79 ± 4.91 ^f	0.27 ± 0.00 ^d
	LY1-3+LS	514.99 ± 9.28 ^e	0.80 ± 0.01 ^d	0.71 ± 0.00 ^c	356.80 ± 12.52 ^d	234.19 ± 12.57 ^f	0.29 ± 0.00 ^b
16	CK	362.13 ± 24.32 ^b	0.81 ± 0.00 ^c	0.66 ± 0.00 ^c	257.73 ± 12.96 ^c	214.19 ± 6.43 ^c	0.30 ± 0.00 ^b
	LY1-3	538.97 ± 24.39 ^e	0.81 ± 0.00 ^b	0.72 ± 0.01 ^c	361.96 ± 36.08 ^d	328.90 ± 10.07 ^c	0.320 ± 0.00 ^c
	LY1-3+LS	763.10 ± 9.46 ^d	0.85 ± 0.01 ^b	0.73 ± 0.01 ^b	527.76 ± 14.69 ^c	469.71 ± 21.06 ^d	0.37 ± 0.00 ^a
24	CK	446.38 ± 8.57 ^a	0.85 ± 0.00 ^b	0.74 ± 0.00 ^b	325.07 ± 15.09 ^b	281.63 ± 18.60 ^b	0.32 ± 0.01 ^a
	LY1-3	954.54 ± 11.00 ^b	0.90 ± 0.00 ^a	0.75 ± 0.00 ^b	615.64 ± 8.73 ^b	464.71 ± 9.38 ^c	0.39 ± 0.01 ^b
	LY1-3+LS	1427.03 ± 40.71 ^a	0.92 ± 0.02 ^a	0.78 ± 0.00 ^a	1141.39 ± 33.48 ^a	939.50 ± 28.90 ^a	0.28 ± 0.00 ^c
32	CK	488.64 ± 17.95 ^a	0.87 ± 0.00 ^a	0.76 ± 0.01 ^a	358.90 ± 11.84 ^a	322.03 ± 6.60 ^a	0.33 ± 0.00 ^a
	LY1-3	1166.90 ± 55.32 ^a	0.91 ± 0.00 ^a	0.77 ± 0.00 ^a	812.45 ± 27.50 ^a	656.48 ± 14.64 ^a	0.41 ± 0.01 ^a
	LY1-3+LS	1267.22 ± 89.69 ^b	0.84 ± 0.01 ^{bc}	0.61 ± 0.00 ^d	1027.02 ± 50.23 ^b	782.14 ± 12.57 ^b	0.23 ± 0.00 ^d
40	CK	245.06 ± 16.53 ^d	0.78 ± 0.00 ^d	0.67 ± 0.01 ^c	166.99 ± 12.51 ^d	141.96 ± 14.79 ^d	0.21 ± 0.01 ^d
	LY1-3	857.32 ± 9.96 ^e	0.82 ± 0.01 ^b	0.69 ± 0.00 ^d	471.53 ± 18.81 ^c	547.68 ± 14.91 ^b	0.223 ± 0.01 ^c
	LY1-3+LS	951.54 ± 4.52 ^e	0.82 ± 0.00 ^{cd}	0.61 ± 0.00 ^d	578.98 ± 4.67 ^c	579.79 ± 10.81 ^b	0.22 ± 0.01 ^c
48	CK	216.10 ± 6.10 ^d	0.64 ± 0.00 ^f	0.63 ± 0.01 ^d	135.39 ± 5.23 ^c	120.64 ± 5.00 ^d	0.16 ± 0.00 ^c
	LY1-3	628.78 ± 21.86 ^d	0.77 ± 0.02 ^c	0.57 ± 0.02 ^e	439.29 ± 5.82 ^c	390.25 ± 3.33 ^d	0.18 ± 0.00 ^f
	LY1-3+LS	844.05 ± 8.38 ^d	0.81 ± 0.01	0.60 ± 0.00 ^d	535.28 ± 11.31 ^c	429.63 ± 14.74 ^e	0.21 ± 0.01 ^c

注:同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

糜的硬度、胶着度和咀嚼度,且复合发酵剂组更佳。

凝胶强度的大小可反映鱼糜内部结构的牢固程度,值越大表明结构越稳定,鱼糜凝胶性能越好。图 2 可知,发酵 32 h 时凝胶强度达到峰值,且单一发酵剂组与复合发酵剂组的凝胶强度峰值比对照组分别增加了 78.30% 和 146.03%。这可能是由于鱼糜发酵过程中产生了大量的乳酸和有机酸,使 pH 值逐渐降低。当 pH 值接近鱼糜蛋白等电点时,蛋白质逐渐聚集沉淀,进而提高鱼糜凝胶强度。鱼糜 pH 值随着发酵进行逐渐降低远离蛋白等电点,凝胶强度下降^[9]。因此,32 h 是鲛鱼糜凝胶强度形成最佳时期,且复合发酵剂组凝胶强度优于单一发酵剂组。

2.3 发酵过程中化学作用力的变化

2.3.1 离子键、氢键及疏水相互作用的变化 离子键是蛋白质分子所带电荷间相互作用形成的化

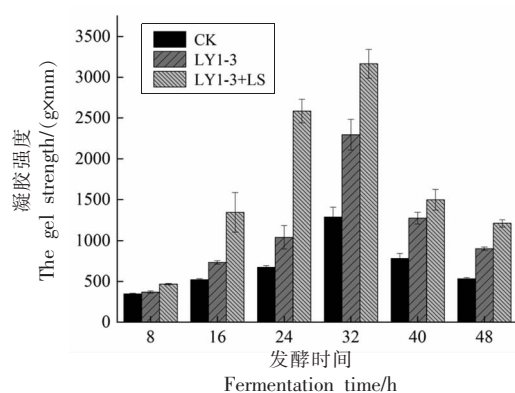


图 2 鲛鱼鱼糜发酵过程中凝胶强度的变化

Fig.2 Changes in gel strength of mackerel surimi during fermentation

学作用力,可增强蛋白质间的相互交联,有助于维持蛋白质三级结构的稳定。如图 3a 所示,随着发酵时间的延长发酵鱼糜中离子键含量大幅度下降,发酵 48 h 后,对照组、单一发酵剂组和复合发酵剂组的溶解蛋白质质量浓度由发酵初期的

3.406,4.692,4.247 g/L 下将至 0.691,0.119,0.047 g/L。这应该是因为乳酸菌发酵产酸, H^+ 与 COO^- 在蛋白质中结合成 $-COOH$, 从而减少蛋白质分子中侧链羧基和侧链氨基之间形成的离子键。表明在维持鲛鱼鱼糜凝胶构象稳定的化学作用力中, 离子键不起主要作用。

氢键是维持蛋白质二级结构的主要作用力, 对稳定结合水起着重要作用, 随氢键含量的增加鱼糜凝胶强度逐渐增加, 氢键对维持凝胶网络结构稳定具有积极作用^[20], 同时, 也是增加凝胶强度的重要化学键之一。如图 3b 所示, 体现氢键表征值的发酵初期的溶解蛋白质质量浓度在 1.26~1.50 g/L, 低于离子键初始含量, 发酵 24 h 内 3 组发酵鱼糜中氢键含量几乎没有变化。当发酵 32 h 时由于 pH 值接近肌原纤维蛋白等电点时, 氨基酸侧链正负电荷互相中和, 导致蛋白质分子间氢键含量增加。与对照组氢键峰值相比, 单一发酵剂和复合发酵剂组氢键含量分别提高了 55.6% 和

71.0%, 说明复合发酵剂更有利于增加鱼糜中的氢键作用力。

疏水相互作用是维持凝胶结构的另一主要非共价作用力, 在蛋白质变性展开时, 邻近多肽的非极性片段疏水部分的相互作用。适当的疏水相互作用有利于蛋白凝胶的重新聚集, 形成稳定的网状结构, 且具有较好质构和持水力^[21-22]。如图 3c 所示, 在整个发酵过程中疏水作用力呈先上升后下降的趋势, 这可能是因为发酵前期随着蛋白三级结构的展开, 疏水氨基酸残基暴露, 使疏水作用力增加。发酵 32 h 后, 随着蛋白质的重新聚合, 暴露的疏水氨基酸残基又重新进入肌原纤维蛋白内部, 使疏水相互作用呈下降趋势^[23]。与对照组疏水作用峰值相比, 单一发酵剂和复合发酵剂组疏水作用分别提高了 23.8% 和 33.3%, 说明发酵鲛鱼鱼糜中添加单一发酵剂或复合发酵剂可有效提高疏水相互作用强度, 进而改善鲛鱼鱼糜凝胶强度, 且复合发酵剂更佳。

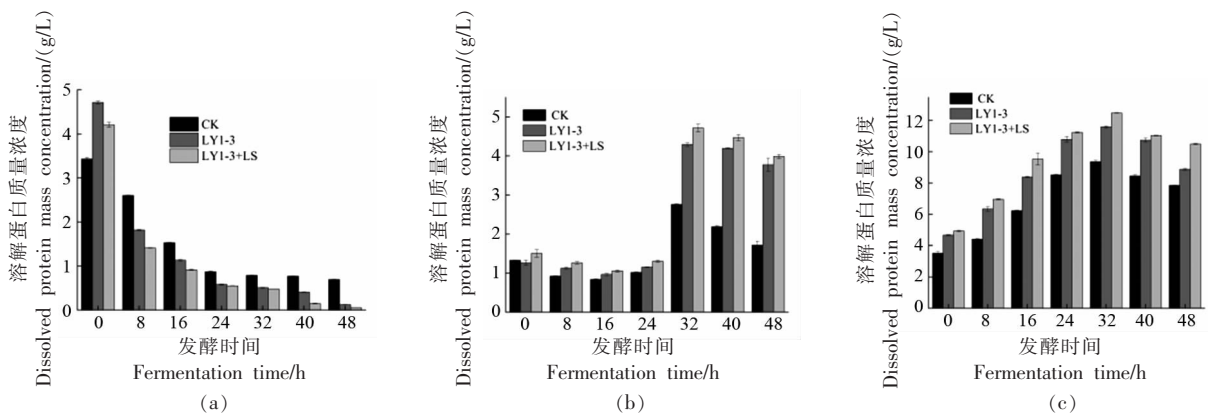


图3 鲛鱼鱼糜发酵过程中离子键(a)、氢键(b)和疏水作用力(c)的变化

Fig.3 Changes in ionic bond change (a), hydrogen bonding (b) and hydrophobicity (c) of mackerel surimi during fermentation

2.3.2 二硫键的变化 二硫键可以稳定蛋白质的折叠构象并降低构象熵, 从而增加蛋白的热力学稳定性^[24], 改善鱼糜感官品质和营养特性^[25]。如图 4 所示, 随着发酵时间的延长, 二硫键含量呈逐渐上升的趋势。发酵初期单一发酵剂组、复合发酵剂组与对照组无显著差异。发酵 48 h, 与对照组相比, 单一发酵剂组和复合发酵剂组的二硫键含量分别提高了 5.11% 和 9.84%, 说明添加单一发酵剂或复合发酵剂可以提高蛋白质中二硫键的含量,

进而提高鱼糜凝胶结构的稳定性, 且复合发酵剂更佳。

2.3.3 非二硫键的变化 非二硫共价键是鱼糜中的内源性 TGase 催化肌球蛋白重链生成共价交联键, 可促进凝胶网络结构的形成^[26]。含尿素、 β -巯基乙醇和 SDS 的 Tris-HCl 缓冲溶液可以破坏鱼糜凝胶网络中除非二硫共价键 (主要为 ϵ -(γ -Gln)-Lys 共价键) 以外的所有共价键, 因此 ϵ -(γ -Glu)-Lys 等非二硫共价键的含量随着溶解率的升

高而降低。如图 4b 所示,随发酵时间的延长溶解率逐渐降低,表明非二硫共价键含量逐渐升高。经 48 h 发酵后,对照组、单一发酵剂组和复合发酵剂组的溶解率分别降至 8.74%, 8.22% 和 8.10%, 单一发酵剂组和复合发酵剂组的溶解率均低于对照组,且复合发酵剂组溶解率低于单一发酵剂组。由于溶解率和非二硫键含量呈负相关,说明经单一

发酵剂组与复合发酵剂组的鱼糜非二硫键含量均高于对照组的非二硫键含量,且复合发酵剂组鱼糜的非二硫键含量高于单一发酵剂组。这可能是由于乳酸菌产酸使鲛鱼鱼糜中的内源蛋白酶激活并产生作用,导致蛋白质结构发生变化,使得非二硫键大量生成^[3]。

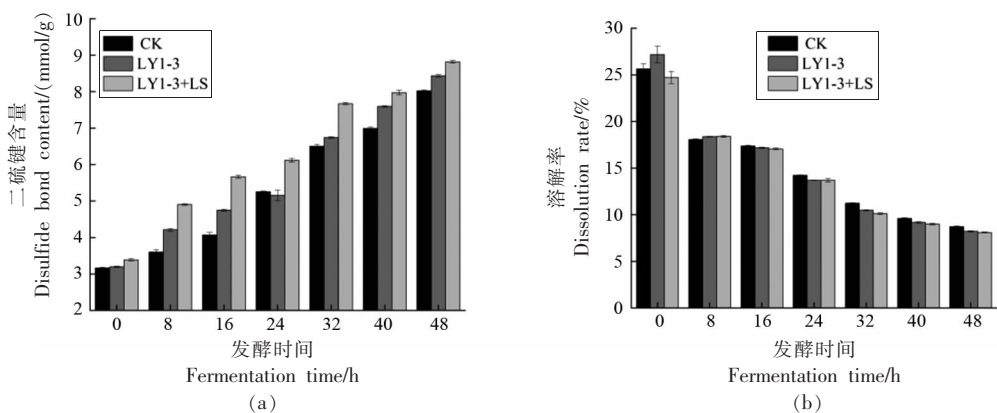


图 4 鲛鱼鱼糜发酵过程中二硫键 (a) 和非二硫键 (b) 的变化

Fig.4 Changes in disulfide bond (a) and non-disulfide bond (b) of mackerel surimi during fermentation

2.4 肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 分析

蛋白电泳可以分析发酵鱼糜肌原纤维蛋白亚基的结构变化,特别是肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC, 分子质量在 220 ku 左右),肌动蛋白(Actin, ACT, 分子质量在 44.3 ku 左右)和肌球蛋白轻链(Myosin light chain, MLC, 分子质量在 21 ku 左右)的变化,肌球蛋白和 ATC 的降解、变性及重聚集对形成凝胶网络结构具有重要作用^[27]。由图 6 可知。各组 ACT 和 MLC 条带变化

显著,随着发酵时间的延长,ACT 和 MLC 条带逐渐消失,且复合发酵剂组降解蛋白的能力更强。同时,各组 MHC 蛋白条带逐渐减弱,单一/复合发酵剂组与自然发酵组没有显著性差异,但与发酵 0 h 相比,各组在发酵 8 h 时,在 100~135 ku 范围出现新的蛋白条带。这可能是酸性条件下肌肉组织中的内源蛋白酶和乳酸菌产生的蛋白酶被激活,使 ACT 和 MLC 快速降解,并部分水解 MHC,重新形成大分子蛋白聚集物,这些变化促进了鱼

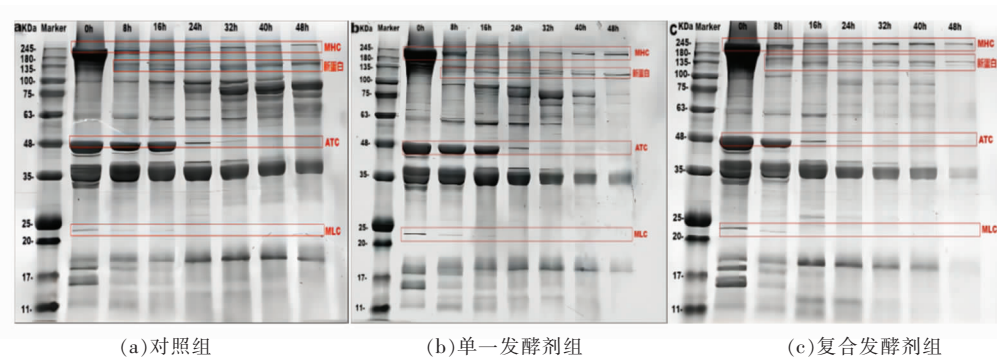


图 5 鲛鱼鱼糜发酵过程中肌原纤维蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of myofibrillar protein of mackerel surimi during fermentation

糜凝胶网络的形成。复合发酵组降解蛋白能力更强的原因可能是乳酸菌在发酵过程中自身也产生了酸性蛋白酶,从而加速了蛋白降解速率。陈晓倩等^[3]应用棒状乳杆菌发酵秘鲁鱿鱼鱼糜时,肌动蛋白和肌球蛋白重链均被降解,发酵24 h后,在100~135 ku范围出现新的大分子蛋白条带,构成了鱼糜凝胶体的重要组成部分,本研究结果与其相似。

3 结论

植物乳杆菌 LY1-3 单独或与清酒乳杆菌 LS 复合后均能在鲑鱼鱼糜中快速繁殖产酸提高鱼糜凝胶强度。发酵32 h时鱼糜凝胶强度达到峰值,复配组比单一组增加了37.99%。鲑鱼鱼糜发酵过程中离子键含量持续下降,二硫键和非二硫键含量持续增加,氢键和疏水相互作用力于32 h达到峰值,且复配组比单一组化学作用力增加显著,说明二硫键、非二硫共价键、氢键以及疏水相互作用在形成和维持发酵鲑鱼糜凝胶网络中起主要作用。同时,SDS-PAGE 图谱显示,随着发酵的进行,酸性蛋白酶被激活,肌动蛋白和肌球蛋白轻链被快速降解,肌球蛋白重链被部分分解形成新的大分子蛋白聚集物,促进了发酵鱼糜凝胶网络的形成。综上所述,植物乳杆菌 LY1-3 单一或与清酒乳杆菌 LS 复合发酵均可改善鲑鱼鱼糜凝胶强度,且接种复合发酵组效果更佳。由于发酵鱼糜凝胶形成过程中较为复杂,因此乳酸菌对其形成机理在蛋白质二级结构变化方面有待进一步探究。

参 考 文 献

- [1] 农业部渔业局. 2020 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 89-92.
Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture. 2020 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020: 89-92.
- [2] 陈媚依. 鹧鸪茶提取物对鱼糜制品凝胶特性及保藏品质的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
CHEN M Y. Effects of the *Mallotus obongifolius* extract on gelation properties and preservation quality of surimi-based products[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.
- [3] 陈晓倩, 吴祖芳, 翁佩芳. 棒状乳杆菌发酵秘鲁鱿鱼糜凝胶特性的变化及其形成机理[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 186-191.
CHEN X Q, WU Z F, WENG P F. Changes in gel properties and formation mechanism of giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) during fermentation by *Lactobacillus coryneformis*[J]. Food Science, 2019, 40(4): 186-191.
- [4] 陈梅珍, 陈旭, 蔡茜茜, 等. 典型加工条件下鱼糜肌原纤维蛋白品质变化规律及调控方法研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(11): 204-213.
CHEN M Z, CHEN X, CAI Q Q, et al. Research advances in the quality changes and control methods of surimi myofibrillar protein under typical processing conditions[J]. Food Science, 2022, 43(11): 204-213.
- [5] 丁玉庭, 鲍晓瑾, 刘书来. 鱼糜制品凝胶强度的提高及其影响因素[J]. 浙江工业大学学报, 2007, 35(6): 631-635.
DING Y T, BAO X J, LIU S L. Improvement of surimi gel properties and the influencing factors[J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2007, 35(6): 631-635.
- [6] 赵跃, 李春生, 王悦齐, 等. 罗非鱼鱼糜自然发酵过程中微生物群落结构对其品质形成的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 8.
ZHAO Y, LI C S, WANG Y Q, et al. Effect of microbial community structure on quality formation of naturally fermented tilapia surimi[J]. Food Science, 2021, 42(18): 8.
- [7] 王乃富, 李春阳, 阎征, 等. 乳酸菌发酵对鳙鱼肉糜菌相与品质的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(7): 92-96.
WANG N F, LI C Y, YAN Z, et al. Effect of lactic acid fermentation on microflora and physico-chemical properties of minced bighead carp[J]. Food Science, 2011, 32(7): 92-96.
- [8] RIEBROY S, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W. Properties and acceptability of Som-fug, a Thai fermented fish mince, inoculated with lactic acid bacteria starters[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(4): 569-580.
- [9] 李文协, 李学鹏, 刘慈坤, 等. 臭氧水漂洗对鲑鱼鱼糜品质及肌原纤维蛋白氧化的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 7-15.

- LI W X, LI X P, LIU C K, et al. Effects of ozone water rinsing on the qualities and oxidation of surimi myofibrillar proteins of spanish mackerel surimi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 7-15.
- [10] 李学鹏, 周凯, 周明言, 等. 自由基氧化对大黄鱼肌原纤维蛋白交联和聚集的影响[J]. 中国食品学报, 2015, 15(4): 13-21.
- LI X P, ZHOU K, ZHOU M Y, et al. Effects of radical oxidation on the cross-linking pattern of myofibrillar protein in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(4): 13-21.
- [11] 宋洁, 李文协, 王金厢, 等. 不同浓度臭氧水漂洗对鲛鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(6): 1-9.
- SONG J, LI W X, WANG J X, et al. Effect of ozone water rinsing on gel properties of spanish mackerel surimi[J]. Food Research and Development, 2022, 43(6): 1-9.
- [12] GOMEZ-GUILLEN M C, BORDERIAS A J, MONTERO P. Chemical interactions of nonmuscle proteins in the network of Sardine (*Sardina pilchardus*) muscle gels[J]. LWT-Food Science and Technology, 1997, 30(6): 602-608.
- [13] MONAHAN F J, GERMAN J B, KINSELLA J E. Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1995, 43(1): 46-52.
- [14] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, PECHARA T S. Suwari gel properties as affected by transglutaminase activator and inhibitors [J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 91-99.
- [15] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L et al. Protein measurement with Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.
- [16] 张兴, 杨玉玲, 马云, 等. pH对肌原纤维蛋白及其热诱导凝胶非共价键作用力与结构的影响[J]. 中国农业科学, 2017, 50(3): 564-573.
- ZHANG X, YANG Y L, MA Y, et al. Effects of pH on the non-covalent forces and structure of myofibrillar protein and heat induced gel [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(3): 564-573.
- [17] 李培瑜, 刘弈彤, 李思源, 等. 鲛鱼糜发酵过程中理化特性及挥发性风味成分变化[J]. 肉类研究, 2020, 34(5): 59-63.
- LI P Y, LIU Y D, LI S Y, et al. Changes in physicochemical properties and volatile flavor compounds of *Scomberomorus niphonius* surimi during fermentation[J]. Meat Research, 2020, 34(5): 59-63.
- [18] 梁恽红, 卢涵, 张香美. 蛋白二、三级结构对鱼糜凝胶质构和持水力的影响及其测定方法研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2021, 52(10): 87-96.
- LIANG Y H, LU H, ZHANG X M. Research progress on the effects of protein secondary and tertiary structures on texture and water-holding capacity of surimi gel and protein structure determination methods[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2021, 52(10): 87-96.
- [19] 王洋, 桂萌, 韦云路, 等. 复合发酵剂在新型快速发酵鲟鱼肠中的应用[J]. 食品科技, 2015, 40(3): 141-147.
- WANG Y, GUI M, WEI Y L, et al. Production of novel rapidly fermented sturgeon sausage using mixed starter culture[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(3): 141-147.
- [20] 张小燕, 刘德明. 化学作用力对超高压诱导猪肉凝胶强度的影响研究[J]. 肉类工业, 2015(7): 22-24.
- ZHANG X Y, LIU D M. Study on effect of chemical force on strength of ultra - high pressure induced pork gel[J]. Meat Industry, 2015(7): 22-24.
- [21] 王崑, 仪淑敏, 李学鹏, 等. 鱼糜凝胶的形成机制及混合鱼糜研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 231-237.
- WANG W, YI S M, LI X P, et al. Formation mechanism of surimi gelation and research progress on blend surimi[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(1): 231-237.
- [22] CHEN J, DENG T, WANG C, et al. Effect of hydrocolloids on gel properties and protein secondary structure of silver carp surimi[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(5): 2252-2260.
- [23] DU X, LI H, DONG C, et al. Effect of ice structuring protein on the microstructure and myofibrillar protein structure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by freeze-thaw processes[J]. LWT, 2021, 139: 110570.
- [24] MITRA A, SARKAR N. The role of intra and in-

- ter-molecular disulfide bonds in modulating amyloidogenesis: A review[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2022, 716: 109113.
- [25] XU Y, XIA W, YANG F, et al. Protein molecular interactions involved in the gel network formation of fermented silver carp mince inoculated with *Pedibacillus pentosaceus*[J]. Food Chemistry, 2010, 120(3): 717-723.
- [26] 汪雪娇. 微波处理对鱼肉制品咸度感知的增强作用与减盐鱼糜的加工适应性[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- WANG X J. Saltiness perception enhancement of fish products by microwave treatment and processing adaptability in salt-reduced surimi[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [27] NÚÑEZ-FLORES R, CANDO D, BORDERÍAS A J, et al. Importance of salt and temperature in myosin polymerization during surimi gelation[J]. Food Chemistry, 2018, 239: 1226-1234.
- [28] 杨方. 鱼肉内源酶对发酵鱼糜凝胶和抗氧化特性影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- YANG F. Study on gelation and antioxidant properties of fermented surimi influenced by fish endogenous muscle enzymes[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.

Effect of Artificial Inoculation of Single/Compound Lactic Acid Bacteria on Gel Characteristics of Fermented Spanish Mackerel Surimi

Lü Xinran¹, Wang Yanbo¹, Wang Xiaomi¹, Bai Fengling¹, Li Jianrong^{1*}, Zheng Wanyuan²

¹National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, National R&D Branch Center of Surimi and Surimi Products Processing, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

²Zhejiang Xingye Industrial Group Co., Ltd., Zhoushan 316120, Zhejiang)

Abstract Spanish mackerel surimi was used as the research object in the study and fermented with *Lactobacillus plantarum* LY1-3 single and in complex with *Lactobacillus sake* LS, respectively. The changes of pH, texture, gel strength, chemical force and myofibrillar protein of surimi under different fermentation times were determined of fermented Spanish mackerel surimi. The results showed that, compared with the natural fermentation group, the hardness, adhesion and chewability of surimi increased rapidly, as the result of the rapid decrease of the pH in fermented Spanish mackerel surimi groups. Meanwhile, those of the compound group increased by 22.30%, 40.49% and 43.11% than that the single fermentation group, respectively. The gel strength of surimi reached the maximum values at 32 h of fermentation, and the compound group increased by 37.99% compared with the single group. During the fermentation process of surimi, the ionic bond content continued to decrease, the hydrogen bond content and hydrophobic force reached the maximum values at 32 h, and the disulfide bond content and non-disulfide bond content increased. The chemical force of the complex group increased significantly than that of the single group. In addition, SDS-PAGE indicated that actin, myosin light chain were rapidly degraded, and myosin heavy chain was partially hydrolyzed during fermentation. Meanwhile, a new high molecular weight protein fractions in the range of 100-135 ku was formed, which promoted the formation of surimi gel network. These results demonstrated that the gel strength of fermented Spanish mackerel surimi could be improved by inoculation with *L. plantarum* LY1-3 alone or combined with *L. sake* LS, and the compound fermentation group was better than that of the single group. The results of this study provide a theoretical reference for the development of lactobacillus-fermented surimi products.

Keywords Spanish mackerel surimi; lactic acid bacteria; fermentation; gel characteristics