

利用乳酸菌发酵协同自溶作用回收虾头、虾壳中的蛋白质

段杉, 张影霞, 陆婷婷, 曹对喜, 陈静刁, 武利刚, 李桂森

(华南农业大学食品学院, 广东 广州, 510642)

摘要 采用乳酸菌发酵协同自溶作用回收利用虾头、虾壳中的蛋白质, 研究了发酵自溶的条件, 发现采用3株乳酸菌混合做发酵剂可以快速产酸, 在添加20%葡萄糖, 固液比1:2, 接种量10%, 39℃发酵120 h后, 发酵液pH值达到3.34, 蛋白质回收率达到94.0%, 水解液经CaCO₃中和, 经感官评定, 所获产品虾香浓郁, 无苦涩味和腥臭味。

关键词 虾头 虾壳, 乳酸菌, 自溶, 蛋白质

目前对虾加工以冻虾仁为主, 对虾的虾头、虾壳约占对虾体重的30%~40%, 加工产生的虾头、虾壳难以处理, 目前主要是低价销售用于生产饲料等, 还有少量用于生产甲壳素。实际上虾头、虾壳中还残留大量蛋白质, 另外还有多不饱和脂肪酸、V_E、虾青素、各种矿物质等成分, 值得利用。

对于虾头、虾壳的利用, 国内外已有大量研究, 这些研究主要是利用虾头、虾壳组织蛋白酶的自溶作用以及外加蛋白酶的水解作用将蛋白质水解分离出来。这些方法虽然可以回收蛋白质, 但酶解液腥臭味、苦涩味明显, 基本没有鲜味, 无法食用。

国外已有利用乳酸菌发酵对虾加工废弃物^[1~3]的研究。如将乳酸菌发酵与虾头、虾壳的自溶作用相结合产生如下优势: 第1, 乳酸菌发酵造成的高酸环境可以防止虾头、虾壳在自溶过程中发生腐败, 大大延长自溶时间; 高酸对于产品的后续处理和保藏也十分有利。第2, 自溶时间的延长以及乳酸菌产生的少量蛋白酶, 可以保证蛋白质的充分水解和高利用率, 无需再外加蛋白酶。第3, 乳酸菌发酵可以消除产品的苦涩味和腥臭味, 并可产生新的风味成分。第4, 发酵产生的乳酸会将虾壳、虾头中的不溶性钙盐转化为可溶性乳酸钙, 产品可以为人体补充钙质; 而脱钙后的虾头、虾壳用于生产甲壳素则更方便。第5, 发酵液中增殖的乳酸菌还可以调节肠道的微生态环境。

基于上述原因, 我们以乳酸菌发酵协同自溶作用回收虾头、虾壳蛋白质, 不需外加蛋白酶, 发酵液虾香浓郁, 无腥臭味和苦涩味, 可方便地用于调味品、水解蛋白制品、保健品等各个领域。

第一作者: 博士, 副教授。

收稿日期: 2008-10-13, 改回日期: 2008-11-26

1 材料与amp;方法

1.1 材料

虾头、虾壳: 由阳江市谊林海达速冻水产有限公司提供。

菌种: 发酵剂I(由3株乳酸菌混合组成): 华南理工大学轻工与食品学院赠送。乳杆菌 CICC 6064、嗜热链球菌 CICC 6038、嗜热链球菌 CICC 6063: 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.2 方法

1.2.1 pH的测定

pHS-25型酸度计测定。

1.2.2 水解度的测定

$$\text{水解度}(DH) / \% = \frac{F - F_1}{A - F_1} \times 100$$

式中: F_1 为虾头、虾壳原液中氨基酸态氮含量; F 为发酵液中的氨基酸态氮含量; A 为总氮。

氨基酸态氮用甲醛滴定法^[4]测定; 总氮的测定参考文献^[5], 用NaOH溶液处理虾头、虾壳, 排除甲壳素的干扰, 再用凯氏定氮法测定提取液中的总氮含量。

1.2.3 钙的测定

高锰酸钾滴定法^[4]。

1.2.4 葡萄糖的测定

直接测定法^[4]。

1.2.5 发酵液中乳酸菌浓度测定

发酵液稀释后用MRS固体培养基倒平板, 计算菌落数。

1.2.6 接种

将菌种接进10%的脱脂奶粉中活化数次, 然后转入MRS液体培养基, 培养20h后测定活菌数, 再

接到虾头、虾壳中。

1.2.7 发酵

则发酵条件如下:以虾头、虾壳重量为100%计,加入15%葡萄糖(质量分数),接种量10%(质量分数),固液比1:2,39℃发酵48h。

2 结果

2.1 发酵剂的筛选

将发酵剂I、发酵剂II(乳杆菌CICC 6064和嗜热链球菌CICC 6063以1:1混合)、发酵剂III(乳杆菌CICC 6064和嗜热链球菌CICC 6038以1:1混合)接种到虾头、虾壳中发酵48h,结果如表1所示。

表1 不同发酵剂发酵虾头、虾壳的结果

	pH	水解度/%
虾头、虾壳未经灭菌接种发酵剂I	3.99	21.6
虾头、虾壳未经灭菌接种发酵剂II	4.15	17.5
虾头、虾壳未经灭菌接种发酵剂III	4.27	16.8
虾头、虾壳先灭菌再接种发酵剂I	4.13	5.80

由表1知,虾头、虾壳灭菌后再接种发酵,蛋白质水解度只有5.8%(质量分数),远低于未灭菌直接接种发酵的水解度(21.6%)(质量分数),说明乳酸菌单独不能有效水解蛋白质,而与虾头自身组织蛋白酶一起协同作用可使水解度大大提高。因此以下的试验全部采用未灭菌的新鲜虾头、虾壳做原料。

从表1还可以看出,虾头、虾壳接种发酵剂I发酵后,其pH值最低,蛋白质水解度最高,因此,以下采用发酵剂I发酵。

2.2 发酵时间对虾头、虾壳发酵效果的影响

将发酵剂I接种到虾头、虾壳中,发酵不同时间,结果如表2所示。

表2 时间对虾头、虾壳发酵效果的影响

时间/h	pH	水解度/%
12	5.48	11.0
24	4.75	15.6
36	4.38	17.9
48	4.21	20.3
60	4.19	20.6
72	4.17	21.3

由表2知,48h内,蛋白质水解度随发酵时间显著提高,pH显著降低,达到4.2左右,这样的酸性条件足以防止腐败发生;48h后pH随时间变化很小,蛋白质水解度增幅不大。可见发酵48h较为合适。

2.3 加糖种类对虾头、虾壳发酵效果的影响

将发酵剂I接种到虾头、虾壳中,添加不同种类

的糖发酵48h,结果如表3所示。

表3 不同的糖对虾头、虾壳发酵效果的影响

糖种类	pH	水解度/%
乳糖	4.98	17.2
葡萄糖	4.31	20.6
蔗糖	4.60	19.2

注:各种糖加入量均为15%。

从表3可以看出,添加葡萄糖发酵,发酵液的pH最低,蛋白质水解度最高,可见葡萄糖的发酵性能优于乳糖和蔗糖。

2.4 葡萄糖加入量对虾头、虾壳发酵效果的影响

将发酵剂I接种到虾头、虾壳中,加入不同浓度的葡萄糖,发酵结果如表4所示。

表4 葡萄糖加入量对虾头、虾壳发酵效果的影响

葡萄糖加入量/%	pH	水解度/%
5	腐败	腐败
10	5.81	14.8
15	4.53	13.1
20	4.09	16.5
25	4.12	17.2

加5%葡萄糖的样品发生腐败;加10%的虽没有腐败,但pH值偏低;加20%的pH值最低,蛋白质水解度也很高,因此采用20%葡萄糖较合适。

2.5 温度对虾头、虾壳发酵效果的影响

将发酵剂I接种到虾头、虾壳中,于不同温度下发酵48h,结果表5所示。

表5 温度对虾头、虾壳发酵效果的影响

温度/℃	pH	水解度/%
37	4.51	16.1
39	4.53	18.9
41	4.65	17.2
43	4.63	16.5
45	4.60	16.5
50	4.86	17.7
55	5.06	18.0
60	5.33	19.3

注:葡萄糖加入量为20%,接种量为15%。

从表5可以看出,发酵温度在39℃时pH最低,蛋白质水解度在39℃时达到最高,提高发酵温度,则有所下降,所以发酵温度以39℃为宜。

2.6 固液比对虾头、虾壳发酵效果的影响

将发酵剂I接种到虾头、虾壳中,在不同的固液比条件下发酵48h,结果如表6所示。

表6 固液比对虾头、虾壳发酵效果的影响

固液比	pH	水解度/%
1:1.0	4.96	1.44
1:1.5	4.82	20.9
1:2.0	4.51	22.0
1:2.5	4.88	20.0
1:3.0	5.15	27.3

注:葡萄糖加入量为20%,接种量为15%。

从表 6 可以看出,固液比 1:2 时 pH 值最低;蛋白质水解度基本上随着固液比的提高而增加,但固液比超过 1:1.5 后水解度增长缓慢。综合考虑,采用固液比 1:2。

2.7 接种量对虾头、虾壳发酵效果的影响

将不同量的发酵剂 I 接种到虾头、虾壳中,发酵 48h 后结果如表 7 所示。

表 7 接种量对虾头、虾壳发酵效果的影响

接种量/%	pH	水解度/%
5	4.41	22.3
10	4.17	20.6
15	3.95	18.9
20	4.23	16.5
25	4.29	13.4

注:葡萄糖加入量为 20%。

从表 7 可以看出,接种量 10%~15% 时 pH 值最低,但蛋白质水解度随着接种量的增加而减少,综合考虑后采用 10% 接种量。

2.8 虾头、虾壳发酵过程中的成分变化

虾头、虾壳发酵过程中各种成分的变化情况如表 8 所示。

由表 8 知,发酵 72 h 内,pH 持续下降,此后 pH 开始上升,活菌数急剧下降,而脱钙率持续上升,说明发酵 72 h 后乳酸菌细胞受到抑制,产酸已达到极限,而乳酸缓慢地将虾头、虾壳中的无机钙溶解出来。同时,随着发酵时间延长,蛋白回收率显著提高,至 120 h 时其回收率已达 94.0%;发酵过程中体系的 TVBN 值增长较小,说明腐败作用被有效抑制。

表 8 虾头、虾壳发酵过程中各种成分的变化

时间/h	pH 值	水解度/%	蛋白回收率/%	脱钙率/%	TVBN /mg·(100g) ⁻¹	剩余葡萄糖量/g	活菌数 /cfu·mL ⁻¹
0	—	—	—	—	1.86	2.00	0.5×10 ⁶
4	5.88	7.23	—	25.0	2.01	1.50	1.6×10 ⁶
8	4.25	11.1	—	37.9	4.17	1.14	1.06×10 ⁸
12	3.85	15.2	—	59.4	4.38	0.800	3.04×10 ⁸
24	3.43	16.2	57.1	72.8	4.47	0.619	5.44×10 ⁸
48	3.36	26.9	—	77.6	4.78	0.426	5.6×10 ⁸
72	3.22	21.6	84.8	82.1	6.37	0.300	5.25×10 ⁸
120	3.34	20.4	94.0	91.2	5.13	0.271	6.5×10 ⁶
168	3.36	12.5	—	91.3	6.48	0.145	<10 ⁵

注:葡萄糖加入量为 20%。

取经 120 h 发酵的虾头、虾壳发酵液,经分析其各种成分含量如表 9 所示。

2.9 虾头、虾壳发酵液的感官评定及成分分析

表 9 虾头、虾壳发酵液中各种成分的含量

总氮 /mg·mL ⁻¹	氨基酸态氮 /mg·mL ⁻¹	Ca /mg·mL ⁻¹	TVBN /mg·(100 mL) ⁻¹	滴定酸度 /mmol·(100mL) ⁻¹
7.42	2.28	4.91	5.13	24.1

所得发酵液经 CaCl₂、Na₂CO₃ 中和后,与经自溶获得的水解液对照,经感官评定,结果显示,发酵液风味优良、虾香浓郁,无腥臭味,基本无苦涩味,风味显著优于自溶液。

3 讨论

乳酸菌液化蛋白的能力较低,本研究也表明,乳酸菌单独难以有效液化虾头、虾壳蛋白;而虾头中包含了虾大部分内脏组织蛋白酶活性较高,完全可以将蛋白自溶液化^[6]。二者结合可以优势互补,在主要利用自溶作用液化蛋白的同时,通过乳酸菌发酵脱除腥臭味和苦涩味,并防止自溶过程发生腐败。感官评定结果表明:通过该方法得到的发酵液无不良风味,

虾香浓郁,明显优于自溶的产品。

造成虾头、虾壳蛋白水解液苦涩味的主要成分为苦味肽,造成腥臭味的成分较复杂,包括三甲胺、各种挥发性胺、氨基戊醛、氨基戊酸等许多成分,这些不良风味成分在发酵过程中发生了怎样的变化,尚待阐明。

通常乳酸菌比常见的腐败菌更能适应较高的环境温度,另据报道虾头自溶酶的最适温度为 60℃^[6],因此本研究曾试图提高发酵温度,第 1 可以抑制腐败菌,第 2 可以提高自溶酶的活性。但结果表明,尽管我们所采用的混合乳酸菌发酵剂在 60℃ 时仍可发酵,但超过 45℃ 后,随发酵温度提高,体系 pH 及水解度明显下降;而 39℃ 发酵时最终 pH 最低、水解度

最高,并且多次试验都未发生腐败。这说明该温度下乳酸菌生长良好,酶活力强,产酸迅速,能有效抑制腐败菌生长。

Bhaskar 等人^[3]采用 *Pediococcus acidolactici* 发酵虾头、虾壳,72h 后矿物质、蛋白脱除率分别为 72.5% 和 97.9%;采用本研究的条件发酵 72h 和 120h 后,钙盐脱除率分别达到 82.1% 和 91.2%,蛋白回收率分别为 84.8% 和 94.0%,可见虾头、虾壳中的蛋白质、钙盐基本被脱除。从表 8 还可以发现,随着发酵时间延长,蛋白回收率持续提高,但与其对应的水解度却有所下降,说明部分水解释放出的游离氨基酸被乳酸菌吸收,导致滴定结果下降,但由于乳酸菌仍保留在液相,所以总的蛋白质回收率仍然提高。

本研究发现,采用不同批次的虾头、虾壳原料,发酵结果有一定差异。由于对虾养殖生产的季节、饲料、加工过程、鲜度等的差异,一定会造成成分上的差异。为更好地控制发酵条件,实现工业化生产,需要进一步揭示这些成分变化与发酵性能之间的内在联系。

- 1 Luis A Cira, Sergio Huerta, George M Hall, et al. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37: 1 359 ~ 1 366
- 2 N M Sachindra, N Bhaskar, G S Siddegowda, et al. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 1 642~1 646
- 3 N Bhaskar, P V Suresh, P Z Sakhare, et al. Shrimp bio-waste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteination/demineralization and carotenoid recovery[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1 427~1 434
- 4 黄晓钰,刘邻渭. 食品化学综合实验书[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002. 131~132,148~150,197~200
- 5 姜启兴,夏文水. 影响酶法回收整虾加工下脚料中虾青素及蛋白质的因素[J]. *食品工业科技*,2004 25(7):54~56
- 6 朱志伟,曾庆孝,林奕封. 罗非鱼肉的酶法水解控制和复合研究[J]. *食品与发酵工业*,2003,29(7):55~58

Recovery of Protein from Shrimp Waste by Synergistic Action of Lactic Acid Fermentation and Autolysis

Duan Shan, Zhang Yingxia, Lu Tingting, Cao Duixi,
Chen Jingdiao, Wu Ligang, Li Guisen

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

ABSTRACT In this paper, the combined action of lactic acid fermentation and autolysis was deployed in the shrimp waste protein utilization. The research on fermentation condition revealed that the waste was quickly acidified by using the mixture of 3 strains of *Lactobacillus* as starter. With 20% glucose added, the solid-liquid ration 2 : 1, the inoculum size 10%, and fermented at 39℃ for 120 h, the pH of obtained liquor reached 3.34, and the recovery rate of protein reached 90.4%. After the liquor was neutralized by calcium carbonate, the sensory evaluation concluded that it was full of desirable shrimp aroma with no trace of the fish odor and bitterness.

Key words shrimp waste, lactic acid bacteria, autolysis, protein

更正 《食品与发酵工业》2008年第34卷第12期1~4页“*Thermomyces lanuginosus*”的译名“绵毛嗜热丝菌”应为“绵毛嗜热丝孢菌”。

《食品与发酵工业》2008年第34卷第12期第13页页脚注释部分:“王陶教授为通讯作者”,应为“王陶讲师为通讯作者”。

《食品与发酵工业》2008年第34卷第11期第160页刊登的英文题目为“Application of *Actinomucor elegans* in Surface Mould-Ripened Cheese”。