

文章编号: 1000-0615(2018)09-1497-13

DOI: 10.11964/jfc.20170310761

· 综述 ·

## 微生物促进传统鱼酱油发酵和品质改善的研究进展

宁豫昌<sup>1,2</sup>, 吴祖芳<sup>2\*</sup>, 翁佩芳<sup>2</sup>

(1. 河南牧业经济学院, 河南 郑州 450046;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 鱼酱油是一种在东亚和东南亚地区被广泛使用的海鲜调味品, 一般是以新鲜海鱼或虾为原料, 并拌入大量的食盐(一般20%~30%), 在开放环境下经过长期缓慢发酵而制成, 具有味道鲜美、营养丰富等特点。传统的鱼酱油生产存在发酵周期过长、生物胺积累、产品品质不一致等问题, 利用特定的微生物发酵剂有望解决上述问题。文章在概述传统鱼酱油生产工艺的基础上, 着重介绍了传统鱼酱油中的产酶微生物种类, 以及利用微生物促进鱼酱油发酵和改善鱼酱油产品品质的研究和应用情况。

**关键词:** 鱼酱油; 微生物; 发酵; 品质

**中图分类号:** TS 254.5

**文献标志码:** A

鱼酱油(fish sauce)是东亚和东南亚地区一类常见的天然海鲜调味品。各国鱼酱油传统酿造方法大同小异, 一般是以新鲜海鱼或虾为原料, 拌入大量食盐, 在开放环境下经长期缓慢发酵制成。中国生产鱼酱油历史悠久, 其传统生产工艺包括腌制和自溶(前期发酵)、日晒夜露(中期发酵)、过滤、晒炼、后期发酵、勾兑灭菌、成品包装。传统鱼酱油具有鲜味自然、口感圆润、可长期贮存等特点。传统鱼酱油存在的问题主要有生产周期过长(1~2年甚至更久)、盐浓度过高、易积累生物胺和亚硝基化合物等不利健康的物质<sup>[1]</sup>、不同产地或不同批次产品的品质常存在较大差异<sup>[2]</sup>、易形成腥味等不良气味<sup>[3]</sup>, 此外一些鱼酱油还含有一定量的重金属, 如铅、镉、砷等<sup>[4]</sup>, 严重影响了鱼酱油的市场竞争力和产业发展。

传统鱼酱油酿造过程中, 原料蛋白和脂肪在鱼自身内源酶和微生物的共同作用下, 降解产生氨基酸、脂肪酸等, 再经由复杂的化学反应和微生物代谢作用形成种类丰富的挥发性和非挥发性化合物, 构成鱼酱油独特的风味和口

感。江津津等<sup>[5]</sup>的研究指出, 嗜盐菌分泌的高温蛋白酶不仅能够促进原料发酵, 而且对鱼酱油挥发性气味的形成有贡献, 嗜盐乳酸菌有助于挥发性脂肪酸的形成, 并且能够加快鱼酱油的非酶褐变进程。Beddows等<sup>[6]</sup>研究发现, 通过细菌的代谢作用, 鱼酱油中的氨基酸能够衍生形成丙酸、正丁酸和正戊酸, 它们参与构成鱼酱油特有的干酪风味。可见, 微生物在原料分解和风味物质形成中发挥关键作用, 本文概述了目前鱼酱油生产中存在的主要问题, 阐述了近年来利用微生物促进传统鱼酱油发酵, 改善鱼酱油产品品质的研究和应用情况, 并就充分利用原料中的内源蛋白酶, 改进鱼酱油的传统生产工艺和提高产品风味等问题进行了探讨。

### 1 鱼酱油中主要的产酶微生物

鱼酱油发酵过程中, 微生物利用其产生的蛋白酶、肽酶、碱性磷酸酶等对原料底物进行分解和生物转化, 进而形成多肽、氨基酸、呈味氨基酸等重要的营养和风味物质。从传统鱼酱油中分离筛选这些特殊的产酶微生物, 并研

收稿日期: 2017-03-23 修回日期: 2017-10-13

资助项目: 国家自然科学基金(31471709); 宁波市科技富民项目(2016C10031)

通信作者: 吴祖芳, Email: wzfwf@163.com

究它们的产酶机理、酶催化特性、酶与产物之间的关系等,将有助于鱼酱油的酿造和品质改善。近年来,由传统鱼酱油中分离的微生物大多为蛋白酶产生菌,主要是一些嗜温和嗜盐/耐盐的细菌<sup>[7-8]</sup>。Yossan等<sup>[9]</sup>从泰国鱼酱油中分离的巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)能产生一种碱性蛋白酶,利用疏水相互作用和凝胶过滤层析技术将其纯化148倍后,酶活性从0.09 U/mg增至13.33 U/mg。氨基肽酶属外切蛋白酶,是乳酸菌蛋白水解系统的一部分,能够将肽和寡肽转化为氨基酸,这些氨基酸是进一步形成风味物质的前体<sup>[10-11]</sup>。Udomsil<sup>[12]</sup>从鱼酱油中分离到7株乳酸菌,它们的细胞内氨基肽酶对丙氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、精氨酸和谷氨酸底物均表现出较高的活性。Sinsuwan等<sup>[13-14]</sup>从鱼酱油中分离的一株枝芽孢杆菌(*Virgibacillus* sp.) SK37是一种中度嗜盐菌,其产生的枯草杆菌样胞外蛋白酶在25% NaCl溶液中仍具有蛋白水解活性,且该菌株还能产生6种碱性丝氨酸细胞结合蛋白酶,它们的催化活性和稳定性均表现出对NaCl的依赖性。Montriwong等<sup>[15]</sup>从泰国鱼酱油中筛选到一株

盐反硝化枝芽孢杆菌(*V. halodenitrificans*),其产生的蛋白酶具有耐盐性,耐多种表面活性剂和有机溶剂,以及广泛的耐酸碱碱性。Chaiyanan等<sup>[16]</sup>从鱼酱油中分离到一株泰国喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus thailandensis*),该菌株能够产生2种丝氨酸蛋白酶和1种金属蛋白酶。Sinsuwan等<sup>[17]</sup>从泰国鱼酱油中分离的枝芽孢杆菌SK33所产的丝氨酸蛋白酶,随着NaCl浓度升至25%,其活性却在增加,在NaCl浓度为0或者25%时,该蛋白酶均表现出很高的稳定性,该酶的另一个特征是在其最佳催化反应温度55 °C下,仍具有很高的稳定性,与之相反,多数微生物蛋白酶在此条件下往往是不稳定的<sup>[7]</sup>。Satomi等<sup>[18]</sup>从日本鱼酱油中分离到一株嗜盐四联球菌(*Tetragenococcus halophilus*),其质粒上具有完整的编码丙酮酰依赖性组氨酸脱羧酶的基因*hdcA*。Chuprom等<sup>[19]</sup>从虾酱油中分离到一株耐盐别样芽孢杆菌(*Allobacillus halotolerans*)MSP69,该菌株产生胞外碱性磷酸酶,能够增加产品中5'-GMP和5'-AMP的含量。表1列出了部分从不同鱼酱油中分离的微生物及其所产的酶。

表1 从不同鱼酱油中分离的微生物及其所产的酶

Tab. 1 Microbes isolated from different fish sauces and their enzymes

微生物种类 microbial species	酶的种类 enzyme kinds	文献 references
枯草芽孢杆菌JM-3 <i>Bacillus subtilis</i> JM-3	酸性蛋白酶 acidic protease	[7]
巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	碱性蛋白酶 alkaline protease	[9]
枝芽孢杆菌SK37 <i>Virgibacillus</i> SK37	胞外细胞结合蛋白酶 extracellular cell - binding protease	[14]
泰国喜盐芽孢杆菌 <i>H. thailandensis</i> nov.	胞外丝氨酸金属蛋白酶 extracellular serine metalloproteinases	[16]
枝芽孢杆菌SK33 <i>Virgibacillus</i> sp. SK33	丝氨酸蛋白酶 serine protease	[17]
嗜盐四联球菌 <i>Tetragenococcus halophilus</i>	组氨酸脱羧酶 histidine decarboxylase	[18]
耐盐别样芽孢杆菌MSP69 <i>A. halotolerans</i> MSP69	胞外碱性磷酸酶 alkaline nuclease	[19]
盐水四联球菌 <i>Tetragenococcus muritaticus</i>	组氨酸脱羧酶 histidine decarboxylase	[20]
嗜盐四联球菌MS33和M11 <i>T. halophilus</i> MS33 and M11	胞内氨基肽酶 intracellular aminopeptidase	[21]
木葡萄球菌 <i>Staphylococcus xylosus</i>	酪胺氧化酶 tyramine oxidase	[22]
肉葡萄球菌FS19 <i>S. carnosus</i> FS19	氨基氧化酶 amino oxidase	[23]
解淀粉芽孢杆菌FS05 <i>B. amyloliquefaciens</i> FS05	氨基氧化酶 amino oxidase	[23]
桔青霉YL-1 <i>Penicillium citrinum</i> YL-1	碱性丝氨酸蛋白酶 alkaline serine protease	[24]
喜盐芽孢杆菌SR5-3 <i>Halobacillus</i> sp. SR5-3	丝氨酸蛋白酶 serine protease	[25]
线芽孢杆菌RF2-5 <i>Filobacillus</i> sp. RF2-5	丝氨酸蛋白酶 serine protease	[26]
芽孢杆菌11-4 <i>Bacillus</i> sp. 11-4	蛋白酶I protease I	[27]
枯草芽孢杆菌CN2 <i>B. subtilis</i> CN2	碱性蛋白酶 alkaline protease	[28]
巨大芽孢杆菌KLP-98 <i>B. megaterium</i> KLP-98	酸性蛋白酶 acidic protease	[29]
地衣芽孢杆菌RKK-04 <i>B. licheniformis</i> RKK-04	丝氨酸蛋白酶 serine protease	[30]

## 2 利用微生物促进鱼酱油发酵的研究与应用情况

传统鱼酱油生产工艺中存在一个突出问题,即高浓度的食盐极大地抑制了原料自身和微生物的蛋白酶活性,导致发酵时间被显著延长。因此,如何在保证鱼酱油品质和风味的基础上缩短发酵时间,始终是鱼酱油研究的热点问题。近年来,中国和日本等国的学者在鱼酱油速酿方面开展了大量研究。其中,低盐保温工艺是在低盐甚至无盐条件下,通过保温激活原料自身所含的各类蛋白酶,从而在短时间内实现鱼肉的快速水解<sup>[31]</sup>。日本学者宇多川隆<sup>[32]</sup>研究了食盐浓度和温度对鱼酱油速酿的影响,结果发现,常温下当食盐浓度为20%时,原料自身内源蛋白酶的水解活性下降了70%~80%,而在55℃时进行无添加食盐发酵,原料中内源蛋白酶则可稳定地发挥作用,发酵15 h后,醪液中谷氨酸浓度已达到传统工艺发酵1个月的水平,效率提高50倍。外加酶或富含酶的内脏工艺是在低盐或无盐条件下,将商品蛋白酶或富含蛋白酶的鱼内脏添加到发酵原料中,并在保温条件下加速蛋白质水解。邹敏等<sup>[33]</sup>对用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶水解金带细鲐(*Selaroides leptolepis*)的条件进行了优化,结果发现,在最优条件下使用胰蛋白酶处理5 h能使蛋白水解度达到30.51%,用木瓜蛋白酶处理4 h能使水解度达到18.51%。Klomklao等<sup>[34]</sup>将富含蛋白酶的金枪鱼(*Thunnus sp.*)脾脏混入沙丁鱼(*Sardina sp.*)进行发酵,显著缩短了发酵时间。上述2种工艺虽能在短时间内完成鱼肉的水解,但是由于缺少微生物的发酵作用,产品风味较差,易形成苦腥味,因此,鱼酱油的速酿工艺需要结合微生物的发酵作用。

日本自20世纪80年代起,将外加曲法用于鱼酱油的速酿,取得了较好的效果,目前该工艺也已被我国某些企业采用。所谓外加曲法是将经过培养的成曲与盐渍后的鱼混合,通过保温和搅拌促进原料发酵。由于成曲中的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等微生物产生丰富的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等,能够将原料中的蛋白质、脂肪、碳水化合物等充分水解,再经微生物复杂的代谢作用,形成鱼酱油特有的风味。越智洋等<sup>[35]</sup>将酱油用米曲霉接种豆渣制曲,制好的成曲接种于鲢鳙(*Coryphaena hippurus*)发酵生产鱼酱

油,结果显示,产品中含有丰富的甜味氨基酸和苹果酸,且鲜味明显。Furutani等<sup>[36]</sup>研究了含有盐与曲的鱼酱醪中蛋白质的降解过程,在发酵初期,蛋白质的降解是由曲霉菌而非鱼自身的内源蛋白酶引起的,因此曲的加入能够更快地启动鱼蛋白的分解,但是未阐释其中的机理。Murakami等<sup>[37]</sup>分别用大米(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、大豆(*Glycine max*)制曲,然后以干鱼的热热水浸提物为原料,发酵制取鱼酱油,结果表明,大豆曲会影响鱼酱油的口感,而大米、小麦、大麦曲则会影响鱼酱油的风味,说明可通过不同曲的组合来控制鱼酱油的口感和风味,但是这方面的研究尚不多见。陈之瑶等<sup>[38]</sup>采用酶解鱼与豆粕大曲混合发酵(E-SFS)、酶解鱼与花生粕大曲混合发酵(E-PFS)、整鱼与豆粕大曲混合发酵(SFS)、整鱼与花生粕大曲混合发酵(PFS)4种速酿工艺进行对比,探究不同工艺对鱼酱油成品的非挥发性成分以及感官属性的影响,结果表明,经过30 d的发酵,4个样品中总氮含量均达到鱼酱油商业一级标准,其中E-SFS和E-PFS中鲜味氨基酸的比例最高,E-SFS的游离氨基酸总量最高,而SFS和PFS中苦味氨基酸比例最高。上述研究结果提示,在外加曲速酿鱼酱油的过程中,发酵原料亦会影响产品风味的形成。盐浓度对外加曲速酿鱼酱油的品质形成亦有影响,陶忠等<sup>[39]</sup>研究发现,当盐分含量为10%时,经过60 d发酵,大麦或大豆成曲发酵的鱼酱油其氨基酸态氮(AAN)含量可达到1.30 g/100 mL,但在15%的盐分含量下,无论添加哪种成曲发酵制备的鱼酱油其AAN含量都低于1.10 g/100 mL。

近年来,随着从鱼酱油中分离的耐盐/嗜盐细菌越来越多,各国研究者试图将其中一些性能优良的菌株作为发酵剂用于鱼酱油的速酿生产。Saithong等<sup>[40]</sup>从自然发酵的plaa-som(一种泰国传统的发酵淡水鱼制品)中分离到2种乳酸菌,即植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) IFRPD P15和罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*) IFRPD P17,这2株乳酸菌能够很好地缩短plaa-som的发酵周期。Akolkar等<sup>[41]</sup>研究了盐杆菌(*Halobacterium sp.*) SP1(1)对促进鱼酱油发酵的作用,结果显示,由于盐杆菌SP1(1)和鱼中自然存在的微生物菌群间产生了累加效应,与未接种盐杆菌SP1(1)的对照组相比,接种SP1(1)的样品在第10天和第20天

时, 其主要的发酵过程监测指标如蛋白酶活性、肽的释放量、 $\alpha$ -氨基含量均较高, 因此, 盐杆菌 SP1(1)可以作为加快鱼酱油发酵的理想发酵剂。

### 3 利用微生物改善鱼酱油口感和风味的原理及应用

传统工艺生产鱼酱油, 气味浓郁独特, 但是易产生鱼腥味和其他杂味, 影响产品的市场接受度, 而速酿工艺生产鱼酱油, 其风味、口感、色泽等往往不及传统工艺。江津津等<sup>[5]</sup>的研究指出, 探究传统鱼酱油中的特征风味物质及其影响因素, 阐明微生物在风味物质形成中的作用, 可能是提升传统鱼酱油风味品质并指导快速发酵的突破点。鱼酱油风味物质形成的基本原理在于, 鱼肉蛋白和脂肪在鱼内源酶和微生物的共同作用下, 逐步分解、发酵并进一步反应, 进而形成富含多种呈味氨基酸和小肽, 以及各种挥发性和非挥发性风味物质的复杂混合化合物体系。不同种类微生物具有不同的代谢通路和特征, 在鱼酱油的风味物质形成中发挥不同作用。向军等<sup>[42]</sup>研究发现, 甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)产生的氨基肽酶可以有效地切除苦味肽氨基端的疏水氨基酸, 从而脱除苦味。黄紫燕等<sup>[43]</sup>研究认为, 酵母菌厌氧发酵产生的乙醇是鱼酱油中主要风味物质形成的前体, 而鱼酱油发酵中的另一优势菌——乳酸菌, 通过同型或异型乳酸发酵, 产生乳酸、乙酸等有机酸, 这些有机酸能够与乙醇等醇类通过酯化反应生成重要的芳香型物质酯类。李梦茹等<sup>[44]</sup>对戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)在模拟鱼酱油中的代谢行为及转录组学进行了分析, 发现柠檬烯和松萜的降解是戊糖片球菌的主要代谢通路之一, 该通路于挥发性成分的产生有关。

利用微生物代谢作用提高鱼酱油中某些特征风味物质的含量, 将有助于改善鱼酱油尤其是速酿鱼酱油的风味。Udomsil等<sup>[21]</sup>从自然发酵鱼酱油中分离的嗜盐四联球菌MS33和MRC5-5-2具有较高的胞内氨基肽酶活性, 它们能够产生2-甲基丙醇和苯甲醛, 这2种化合物有助于形成肉味和杏仁样味。Fukami等<sup>[45]</sup>研究了木葡萄球菌对鱼酱油风味形成的影响, 发现添加木葡萄球菌能够减轻样品中的鱼腥味、臭味和酸败味,

使产品风味得到明显改善。Udomsil等<sup>[46]</sup>将一种新的葡萄球菌(*S. piscifermentans*)CMC5-3-1接种发酵鱼酱油, 发现与未接种CMC5-3-1菌株的对照组相比, 实验组中产生了更高浓度的谷氨酸和2-甲基丙醛, 后者有助于黑巧克力气味的形成。已知产香酵母对酱油风味的形成很重要, 如埃切假丝酵母(*Candida etchellsii*)能够合成酱油中一种典型的重要风味化合物——2(5)-乙基-4-羟基-5(2)-甲基-3(2H)-咪喃酮<sup>[47]</sup>, 因此在鱼酱油发酵过程中添加产香酵母亦有可能改善鱼酱油的风味。吉川修司<sup>[48]</sup>研究了添加酵母菌对鱼酱油发酵和质量的影响, 结果显示, 与不添加酵母菌的对照组相比, 添加鲁氏酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)和*C. versatilis*的发酵鱼酱油中, 精氨酸和赖氨酸较少, 而甘氨酸、亮氨酸、鹅肌肽、鸟氨酸较多, 且琥珀酸只在添加了酵母菌的鱼酱油中检出。王磊等<sup>[49]</sup>以池沼公鱼(*Hypomesus olidus*)为原料, 通过加入固体麸曲发酵和加入鲁氏酵母及球拟酵母(*Torulopsis globosa*)进行后熟增香生产的鱼酱油, 氨基酸和有机酸等含量较高, 有明显的醇香和鲜香味。

### 4 微生物在降解鱼酱油生物胺中的作用

目前, 鱼酱油生产中亟需解决的另一个问题是生物胺的形成和积累。生物胺是存在于鱼酱油、发酵香肠、咸肉、咸鱼、干酪等产品中的碱性含氮化合物, 过多摄入可导致人体中毒, 甚至能与亚硝酸盐反应生成致癌物质亚硝胺<sup>[50]</sup>。因此, 生物胺的定量是评价鱼酱油质量的一个重要指标。在中国南方常见的13种鱼类和49种鱼类产品中确定了8种生物胺(组胺、色胺、腐胺、2-苯基-乙胺、尸胺、酪胺、亚精胺和精胺), 这些产品中总生物胺的范围为5.03~156.17 mg/kg, 平均值为44.17 mg/kg, 并且发酵类和包装类鱼产品中表现出更高的生物胺水平<sup>[51]</sup>。Brillantes等<sup>[52]</sup>通过固相萃取和高效液相色谱, 对549个商品鱼酱油样品的组胺含量进行分析, 结果显示, 组胺含量范围为100~1 000 mg/L, 其中大多数为200~600 mg/L。鱼酱油中关于组胺、腐胺、尸胺、酪胺最大浓度的报道分别是0.1220%、0.1257%、0.1429%、0.1178%<sup>[53]</sup>。Jiang等<sup>[54]</sup>利用丹磺酰氯(Dns-Cl)柱前衍生化和高效液相色谱荧光检测分析中国商品鱼酱油中的生物胺, 发现

腐胺、尸胺、组胺和酪胺是鱼酱油中主要的生物胺(>100 mg/kg), 而色胺、亚精胺和精胺则是微量生物胺(<25 mg/kg)。

鱼酱油中的生物胺是由原料中的蛋白质降解产生的氨基酸, 在腐败微生物氨基酸脱羧酶的作用下通过脱羧反应、转胺作用或醛和酮的转胺作用形成的。假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)中的某些种可以产生腐胺、组胺和酪胺, 肠道细菌是腐胺、尸胺最主要的产生菌, 有的还可以产生酪胺和组胺<sup>[55]</sup>, 葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)中一些种类和弧菌(*Vibrio* sp.)也是发酵肉制品中的主要产胺菌<sup>[56]</sup>。孙国勇等<sup>[57]</sup>研究了鱼酱油前期发酵过程中组胺变化情况, 发现组胺含量随时间延长呈先升高后降低的变化规律, 分析认为, 发酵初期粗盐在鱼体分布不均, 导致鱼体部分轻微腐败, 游离组氨酸在细菌组氨酸脱羧酶作用下, 分解产生组胺, 随着发酵进行, 盐分逐渐渗入鱼体并分布均匀, 逐渐升高的盐浓度和发酵体系中pH的变化抑制了产组胺菌的生长, 而产组胺分解酶的细菌逐渐繁殖, 从而使组胺含量降低, 最后2种微生物达到了某种平衡, 组胺含量趋于稳定。

具有氨基氧化酶的微生物能够通过氧化脱氨基作用降解生物胺并产生醛类、氨类和氢类物质<sup>[58]</sup>, 因此利用高产氨基氧化酶的微生物降低鱼酱油中生物胺含量的研究受到了广泛关注。姜维<sup>[59]</sup>从传统鱼酱油中筛选到一株汕头盐单胞菌(*Halomonas shantousis* nov.), 该菌能同时高效降解8种生物胺且自身不积累生物胺, 将其作为功能发酵剂用于鱼酱油的发酵, 结果显示, 汕头盐单胞菌能降低64.5%的组胺、59.2%的酪胺、71.0%的尸胺、63.4%的色胺、68.2%的苯乙胺、22.0%的腐胺和55.3%总生物胺。Zaman等<sup>[23]</sup>从鱼酱油中筛选到2株具有氨基氧化酶活性的细菌——肉葡萄球菌FS19和解淀粉芽孢杆菌FS05, 研究表明, FS19和FS05能分别使鱼酱油中的组胺浓度降低27.7%和15.4%。杨利昆等<sup>[60]</sup>从鱼酱油中筛选到10株具有生物胺降解能力的微生物, 其中奥默柯达酵母(*Kodamaea ohmeri*)M8降解生物胺的活性最强, 30 °C发酵9 d后, 组胺和酪胺降解率分别为 69.6% 和79.2%。Kimura等<sup>[61]</sup>研究了接种嗜盐四联球菌(NBRC 12172)抑制鱼酱油中组胺积累的情况, 发酵初期, 嗜盐四联球菌初始培养物的总生物量必须达到产组胺菌总生物量的

1 000倍以上才能有效抑制组胺积累。表2列举了部分具有生物胺降解活性的微生物种类及其氨基氧化酶的类型。

表 2 部分生物胺降解微生物及其氨基氧化酶类型

Tab. 2 Part of the microorganisms possessing biological amine degradation activity and their amino oxidase types

氨基氧化酶类型 amino oxidase type	微生物种类 microbial species	文献 references
组胺氧化酶 histamine oxidase	清酒乳杆菌 <i>L. sakei</i>	[18]
	木葡萄球菌 <i>S. xylosus</i>	[22]
	解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	[23]
	肉葡萄球菌 <i>S. carnosus</i>	[23]
	奥默柯达酵母 <i>K. ohmeri</i>	[60]
酪胺氧化酶 tyramine oxidase	变异微球菌 <i>Micrococcus varians</i>	[21]
	木葡萄球菌 <i>S. xylosus</i>	[22]
	奥默柯达酵母 <i>K. ohmeri</i>	[60]
腐胺氧化酶 coriolus oxidase	鲁宾斯微球菌 <i>Micrococcus rubens</i>	[22]
苯乙胺氧化酶 phenylethylamine oxidase	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	[31]

## 5 微生物对提高鱼酱油生物学功能的作用

随着人们消费水平和健康意识的提高, 生产更具营养价值和保健功效的鱼酱油, 将是未来新产品开发的重要方向。海洋鱼类的蛋白质结构、氨基酸组成甚至功能和陆地生物相比有较大的差别, 可以预见, 海洋鱼类蛋白中很可能蕴藏着许多功能特异、结构新颖的多肽类物质。如果选择合适的蛋白酶或微生物对海洋鱼类蛋白的多肽链进行水解切割, 把具有生物活性的肽片断释放出来, 就可以制备出功能多样的海洋生物活性肽。目前, 已有研究者从鱼酱油中分离到多种生物活性肽, 它们具有抗氧化、抗菌<sup>[62]</sup>, 抗高血压<sup>[63]</sup>、抗痛风<sup>[64]</sup>等作用, Sasaki等<sup>[65]</sup>从以鲑鱼为原料制备的鱼酱油中纯化得到一种新的血管紧张素-I转化酶抑制性三肽, 即Leu-Ala-Arg, 这种三肽可降低自发性高血压大鼠(*Rattus norvegicus*)的收缩压。不同的微生物所产生的蛋白酶往往具有不同的酶学性质, 对多肽链的酶切特异性也不尽相同, 因此, 可以利用特定的产蛋白酶微生物对鱼蛋白质进行发酵, 从而制备具有特殊生物学功能的保健型鱼酱

油。陈洁等<sup>[66]</sup>利用枯草芽孢杆菌对海产小杂鱼进行发酵,以DPPH自由基清除率来衡量发酵液的抗氧化能力,结果显示发酵液中含有具抗氧化作用的肽类混合物。于小航<sup>[67]</sup>利用米曲霉制备的成曲进行鳀鱼鱼酱油的酿造,经过Sephadex G-15凝胶色谱柱、DEAE-Sephrose FF阴离子交换色谱柱以及RP-HPLC C<sub>18</sub>半制备柱,从鱼酱油中分离纯化出2种抗氧化肽f2和f3,其中f3能显著减轻谷氨酸盐引起的大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞的损伤。

## 6 微生物在鱼酱油品质改善中的其他研究与应用

在鱼酱油酿造过程中,微生物除了能够缩短发酵时间、改善产品风味,防止或降低生物胺的积累,提高产品的营养和保健功效外,在低盐鱼酱油酿造,降低重金属离子含量,以及减少产品中的过敏物质等方面均可发挥积极作用。当前海洋环境日益受到生活和工业污水、垃圾等的污染,许多有害物质如重金属等逐渐在鱼体内,尤其是内脏中积累,从而使鱼酱油中重金属浓度超标的风险增大。宋晓昀等<sup>[68]</sup>采用原子吸收光谱法和火焰原子吸收法分别对大连市售常见海产品中的铅和镉进行含量测定,结果显示,海鱼中铅的平均含量为0.249 mg/kg,甲壳类中镉的平均含量为0.223 mg/kg。曲映红等<sup>[69]</sup>以智利外海茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)废弃物为原料酿造鱼酱油,经检测产品中的砷、镉含量均已超标。然而,关于从鱼酱油中去除重金属的研究却少见报道。大量研究表明,一些微生物如细菌、丝状真菌、酵母菌等对金属有很强的吸附能力,因此,具有重金属吸附能力,且耐盐、安全的微生物可有望用于去除鱼酱油中的重金属。刘文磊<sup>[70]</sup>将鲁氏酵母接种到鲑鱼内脏酶解液和鱼酱油中进行培养,当培养液中初始镉浓度为10 mg/L时,发酵结束后鲑鱼内脏酶解液和鱼酱油中镉的脱除率分别为21.5%和26.24%。Asksonthong等<sup>[71]</sup>研究发现,伸长盐单胞菌(*H. elongata*)和嗜盐四联球菌对鱼酱油中汞、铅、镉的去除率分别为12.70%、84.78%和75.83%,以及12.68%、91.27%和95.12%。

微生物在低盐鱼酱油酿造方面亦有应用。例如酵母菌在厌氧条件下能够转化葡萄糖为乙醇,而一定浓度的乙醇能够抑制腐败微生物生

长。前橋健二等<sup>[72]</sup>将分离自酱油醪中的鲁氏酵母按照10<sup>6</sup>个细胞/g的比例添加到发酵原料中,同时加入10%的葡萄糖作为酵母发酵所需的碳源,并拌入10%的食盐进行低盐发酵,在60 d的发酵过程中,乙醇浓度达到5%,菌落总数被控制在10<sup>2</sup> CFU/g,且最终制得的鱼酱油比市售传统产品的风味更佳。小清蛋白(parvalbumin)是细胞内一种钙结合蛋白,在鱼类、两栖类和脊椎动物的肌肉中广泛分布,研究表明,小清蛋白是一种主要的鱼类过敏原,即便已在高温下烹煮和接触胃肠道酶,小清蛋白仍能使易感人群过敏,甚至引发严重的过敏反应<sup>[73]</sup>。而目前关于鱼酱油中小清蛋白含量及其降解方法的研究却很少见。日本学者伊藤康江等<sup>[74]</sup>以米曲霉制备的麦曲和鲁氏酵母为发酵剂分别对鲈(*Scomber japonicus*)、鲱(*Clupea pallasii*)和鲭(*Pneumatophorus japonicus*)进行接种发酵,接种前3种鱼体内小清蛋白的含量分别为848 μg/g、1 144 μg/g、92 μg/g(湿重),常温下发酵6个月后,将压榨获得的醪液于4 °C保存1年,经检测,3种鱼酱油中的小清蛋白含量均低于1 μg/g的检测限,此外,作者进一步研究发现,巴西曲霉(*Aspergillus brasiliensis*)、嗜松青霉(*P. pinophilum*)、产黄青霉(*P. chrysogenum*)、小孢根霉(*Rhizopus microsporus*)均可以降解小清蛋白的活性。

## 7 讨论

鱼内脏和肌肉组织中含有丰富的内源蛋白酶,提高内源蛋白酶的利用率,对促进鱼酱油速酿具有重要意义。在实际应用中,内脏极易发生腐败而难以收集利用,此外鱼自身内源蛋白酶是一个复杂的酶系,使得发酵过程中难以准确控制各项工艺参数。针对上述问题,或可从以下几方面促进内源蛋白酶在鱼酱油酿造中的应用。一是开发适合规模化生产的内脏蛋白酶提取工艺,使内源蛋白酶得以被纯化并易于保存。目前主要通过缓冲液浸提、硫酸铵沉淀、透析、离子交换、超声波辅助提取等方法提取内源蛋白酶<sup>[75-76]</sup>,虽能获得高活性产物,但 these 方法大都处于实验室水平,尚未应用于规模化生产。二是确定不同种类鱼自溶过程中的关键性内源蛋白酶,研究其酶学性质、催化反应动力学、酶解产物形成规律等,从而指导内

源蛋白酶的提取和利用。例如,研究发现鳀鱼腌渍过程中的蛋白质水解主要由胰蛋白酶和糜蛋白酶引起,其中胰蛋白酶的最适催化反应条件为pH 9.0,温度55 °C,且Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>有助于保持其稳定性<sup>[77-78]</sup>。三是协调利用鱼自身内源蛋白酶与外源蛋白酶,以提高酶解效率并改善鱼酱油的品质。由于内源酶和外源酶的最适作用条件不同,因此一些学者常采用分段式发酵工艺实现内、外源蛋白酶的协调利用。例如,晁代秀<sup>[79]</sup>采用三段式发酵工艺,第一阶段加入商品蛋白酶Alcalase 2.4L和Papain进行快速酶解,第二阶段添加少量米曲霉自然发酵8个月,第三阶段60 °C保温发酵1周;杨颖等<sup>[80]</sup>采用了分段加盐的鱼酱油速酿工艺,即在发酵初始阶段按80 g/kg接入米曲霉成曲,并按100 g/kg加入食盐,低盐加曲发酵3周后,再补加食盐至250 g/kg继续发酵。上述工艺虽然取得了一定的效果,但是研究者均侧重于对现象的描述,而缺少对内、外源蛋白酶协同作用下产物形成机理的研究,使得这类工艺缺乏必要的理论基础。

在鱼酱油的加工生产中还需注意借鉴酱油生产中成熟、先进的生产工艺。酱油的生产工艺通常分为固态发酵和高盐稀态发酵。其中固态发酵又包括无盐、低盐和高盐固态发酵,无盐固态发酵由于产品风味差已基本被淘汰。低盐固态发酵工艺采用7%左右的盐水拌曲,酱醅水分在55%左右,最后用浸出法滤取酱油,该工艺生产酱油成本低,成品色泽较深、滋味鲜美,占我国酱油总产量的70%以上,但是香气不及高盐固态和高盐稀态发酵<sup>[81]</sup>。高盐固态发酵也称天然晒露法,原料制曲后与浓盐水(19%~21%)混合,置于大缸内,利用太阳热能促使酱醅成熟,发酵期间定期翻酱,优点是工艺简单、产品风味好,缺点是周期长、产量低、发酵过程不易监控,不便于实现机械化和自动化生产。传统鱼酱油生产与酱油的高盐固态发酵类似,不同之处在于高盐固态发酵采用米曲霉、酱油曲霉(*A. sojae*)等制曲,并在发酵结束后,通过浇淋压榨获得生酱油,而传统鱼酱油酿造无制曲环节,完全利用原料及环境中的耐盐微生物进行发酵,发酵结束后过滤获得产物。酱油的高盐稀态发酵使用小麦、豆粕为主要原料,成曲加入2~2.5倍量20 °Be的盐水,混合成稀醪状态,长时间低温或恒温发酵,在发酵

过程中添加耐盐的产香酵母和/或乳酸菌,在多种微生物的长期作用下生酯生香,形成独特的酱香味,是目前酿造高品质酱油的主要方法,此法便于实现机械化生产,但是设备投资大、成本高。目前,酱油的某些生产工艺已应用于鱼酱油的酿造,如鱼酱油的外加曲工艺即是参考了酱油生产中的制曲环节;有学者参考高盐稀态法中添加产香微生物的工艺,在鱼酱油发酵的后熟阶段接入产香酵母从而增加香味成分<sup>[49]</sup>。周崇禅<sup>[82]</sup>将高盐稀态法引入鱼酱油发酵工艺并加以改进,在鱼糜中加入60%的水,同时降低盐含量(15%),加入蛋白酶制剂和米曲加速发酵(发酵周期20 d),所得鱼酱油的氨基酸和挥发性风味化合物的种类和含量较市售二级产品更加平衡,该工艺改善了高盐稀态法在酱油生产中的局限性。

传统鱼酱油开放式的自然发酵使人们难以准确控制产品的风味和品质,这是影响产品质量稳定和提高的主要障碍。因此,提高鱼酱油的风味和品质,实现产品质量的稳定控制,还需进一步确定鱼酱油中关键特征性风味物质及其来源。鱼酱油的呈味物质组成十分复杂,融合了干酪味、肉香味、酸味、甜味、氨味、腌渍味、腥臭味、焦香味等,目前,研究者对鱼酱油的特征性风味物质尚缺乏统一认识。Fukami等<sup>[83]</sup>认为泰国鱼酱油的关键特征性风味物质是2-甲基丙醛、2-甲基丁醛、2-乙基吡啶、二甲基三硫,而Lapsongphon等<sup>[84]</sup>则认为甲硫醇、2-甲基丙醛、3-甲基丁醛、二甲基三硫化物,3-(甲硫基)丙醛和丁酸对泰国鱼酱油的整体风味贡献最大。肖宏艳等<sup>[85]</sup>的研究认为,潮汕鱼酱油的关键特征性风味物质是乙酸、2-甲基丙酸、丙酮、2-丁酮、吡啶和二甲基硫化物。在鱼酱油的滋味成分方面,一种观点认为鱼酱油的特殊滋味是大量多肽复合呈味的结果<sup>[86]</sup>,另一种观点则认为最能体现鱼酱油特征风味的化合物是谷氨酸、焦谷氨酸和丙氨酸<sup>[87]</sup>。最近日本学者研究发现,在各种传统鱼酱油中均检测到一种重要的厚味肽,即 $\gamma$ -glutamyl-valyl-glycine ( $\gamma$ -Glu-Val-Gly),并认为 $\gamma$ -Glu-Val-Gly是形成鱼酱油厚味的关键物质<sup>[88]</sup>。因此,提高鱼酱油的品质和风味,需要进一步加强基础研究,确定鱼酱油关键特征性风味物质的种类,探究形成这些物质的生化途径及影响因素。

综上所述,在鱼酱油酿造过程中,微生物

对于原料蛋白质的分解、风味物质的形成、生物胺的产生和降解、生物活性物质的生成等均发挥重要作用,若能持续深入开展基础性科学研究,并将研究成果应用于生产工艺的改进,则有望在保持鱼酱油传统风味的基础上,实现鱼酱油加工生产的高效率和产品品质的不断提升。

#### 参考文献:

- [1] 徐莹,吕欣,刘炳杰,等.壳聚糖负载纳米 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 树脂脱除鱼露中的亚硝酸盐[J].中国渔业质量与标准,2015,5(4):48-54.  
Xu Y, Lv X, Liu B J, et al. Removal of  $\text{NO}_2^-$  from fish sauce by chitosan resin modified with nano-sized- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2015, 5(4): 48-54 (in Chinese).
- [2] 王秀娟,白政泽,翁佩芳,等.5种市售鱼酱油品质特性及其矿物质含量的分析比较[J].宁波大学学报(理工版),2017,30(1):52-58.  
Wang X J, Bai Z Z, Weng P F, et al. Analysis and comparison of quality characteristics and mineral content of five commercial fish sauce samples[J]. Journal of Ningbo University (NSEE), 2017, 30(1): 52-58(in Chinese).
- [3] 陶兴无,高冰.外加成曲发酵去除鱼露腥味的初步研究[J].中国酿造,2007(12):46-47.  
Tao X W, Gao B. Study on deodorization of fish sauce during fermentation by external Koji addition[J]. China Brewing, 2007(12): 46-47(in Chinese).
- [4] Sasaki T, Araki R, Michihata T, et al. Removal of cadmium from fish sauce using chelate resin[J]. Food Chemistry, 2015, 173: 375-381.
- [5] 江津津,梁兰兰,林婉玲,等.鱼露特征挥发性化合物的研究进展[J].水产学报,2017,41(6):984-992.  
Jiang J J, Liang L L, Lin W L, et al. Research progress of characteristic volatile compounds of fish sauce[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(6): 984-992(in Chinese).
- [6] Beddows C G, Ardeshir A G, Daud W J B. Development and origin of the volatile fatty acids in Budu[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1980, 31(1): 86-92.
- [7] Kim W J, Kim S M. Purification and characterization of *Bacillus subtilis* JM-3 protease from anchovy sauce[J]. Journal of Food Biochemistry, 2005, 29(5): 591-610.
- [8] Siringan P, Raksakulthai N, Yongsawatdigul J. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*)[J]. Food Chemistry, 2006, 98(4): 678-684.
- [9] Yossan S, Reungsang A, Yasuda M. Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process[J]. Science Asia, 2006, 32(4): 377-383.
- [10] Christensen J E, Dudley E G, Pederson J A, et al. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76(1-4): 217-246.
- [11] Smit G, Smit B A, Engels W J M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(3): 591-610.
- [12] Udomsil N. Role of lactic acid bacteria on chemical compositions of fish sauce[D]. Nakhon Ratchasima: Suranaree University of Technology, 2008.
- [13] Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawatdigul J. NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(5): C264-C269.
- [14] Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawatdigul J. Hydrolytic activity of *Virgibacillus* sp. SK37, a starter culture of fish sauce fermentation, and its cell-bound proteinases[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(8): 2651-2659.
- [15] Montriwong A, Rodtong S, Yongsawatdigul J. Detergent-stable salt-activated proteinases from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 176(2): 505-517.
- [16] Chaiyanan S, Chaiyanan S, Mauge T, et al. Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from fish sauce[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, 22(3): 360-365.
- [17] Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawatdigul J. A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce[J]. Food Chemistry, 2010, 119(2): 573-579.
- [18] Satomi M, Furushita M, Oikawa H, et al. Diversity of plasmids encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus* spp. isolated from Japanese fish sauce[J].



- International Journal of Food Microbiology*, 2011, 148(1): 60-65.
- [19] Chuprom J, Bovornreungroj P, Ahmad M, *et al.* Statistical optimization for the improved production of an extracellular alkaline nuclease by halotolerant *Allobacillus halotolerans* MSP69: scale-up approach and its potential as flavor enhancer of fish sauce[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 8: 236-247.
- [20] Konagaya Y, Kimura B, Ishida M, *et al.* Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92(6): 1136-1142.
- [21] Udomsil N, Rodtong S, Tanasupawat S, *et al.* Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 141(3): 186-194.
- [22] Martuscelli M, Crudele M A, Gardini F, *et al.* Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31(3): 228-232.
- [23] Zaman M Z, Bakar F A, Jinap S, *et al.* Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145(1): 84-91.
- [24] Xie L, Xiao Y Z, Gao X Y. Purification and characterization of a Halotolerant alkaline serine protease from *Penicillium citrinum* YL-1 isolated from traditional Chinese fish sauce[J]. *Food Biotechnology*, 2016, 30(2): 137-153.
- [25] Namwong S, Hiraga K, Takada K, *et al.* A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(6): 1395-1401.
- [26] Hiraga K, Nishikata Y, Namwong S, *et al.* Purification and characterization of serine proteinase from a Halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, 69(1): 38-44.
- [27] Nishiyama Y, Maeda H, Nagashima T, *et al.* Partial amino acid sequence of protease I produced by *Bacillus* sp. 11-4 isolated from Vietnamese fish sauces[J]. *Journal of the Japanese Society for Cold Preservation of Food*, 2003, 29(1): 25-31.
- [28] Uchida H, Kondo D, Yamashita S, *et al.* Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN<sub>2</sub> isolated from a Vietnamese fish sauce[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(6): 579-582.
- [29] Fu X T, You S G, Kim S M. Characterization of a salt-tolerant acid protease produced by *Bacillus megaterium* KLP-98 and its potential as a fermentation starter for the manufacture of fish sauce[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2008, 32(3): 279-298.
- [30] Toyokawa Y, Takahara H, Reungsang A, *et al.* Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1867-1875.
- [31] Haard N F. Protein hydrolysis in seafoods[M]//Shahidi F, Botta J R. Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality. London: Chapman and Hall, 1994: 10-33.
- [32] 宇多川隆. 速醸魚醤の開発とその利用[J]. 日本醸造協会誌, 2012, 107(7): 477-484.
- Uttagawa T. Rapid fermentation of fish sauce and its use[J]. *Journal of the Brewing Society of Japan*, 2012, 107(7): 477-484(in Japanese).
- [33] 邹敏, 傅力, 卢彬. 金带细鲐鱼露制作过程中酶解工艺的研究[J]. 中国调味品, 2015, 40(2): 17-22.
- Zou M. Study on enzymatic hydrolysis technology of *Caranx selaroides leptolepis* sauce[J]. *China Condiment*, 2015, 40(2): 17-22(in Chinese).
- [34] Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Effects of the addition of spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) on the liquefaction and characteristics of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbosa*)[J]. *Food Chemistry*, 2006, 98(3): 440-452.
- [35] 越智洋, 水谷政美, 山本英樹, 等. オカラを原料とした麴を用いたシイラ魚醤油の製造[J]. 日本食品保蔵学会誌, 2014, 40(4): 161-169.
- Ochi H, Mizutani M, Yamamoto H, *et al.* Manufacture of dolphin fish sauce using *Koji* that made of *Okara*[J]. *Food Preservation Science*, 2014, 40(4): 161-169(in Japanese).
- [36] Furutani A, Funatsu Y, Shozen K I, *et al.* Proteolytic process of two fish sauce meshes prepared from deepsea

- smelt and waste from *Kamaboko* processing using soy sauce *Koji* mold in the early stage of fermentation[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2012, 78(4): 726-735.
- [37] Murakami M, Satomi M, Ando M, *et al.* Evaluation of new fish sauces prepared by fermenting hot-water extraction waste of stock from dried fish using various *kojis*[J]. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2009, 7(2): 175-181.
- [38] 陈之瑶, 张业辉, 唐道邦, 等. 不同速酿工艺生产鱼露的非挥发性成分比较[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(1): 261-265.
- Chen Z Y, Zhang Y H, Tang D B, *et al.* Comparison of non-volatile components of fish sauces prepared with different fast fermentation processes[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(1): 261-265(in Chinese).
- [39] 陶忠, 陈书霖, 曹敏杰, 等. 制曲原料对低盐发酵鱼露性质的影响[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(21): 42-46.
- Tao Z, Chen S L, Cao M J, *et al.* Effects of *Koji*-materials on the properties of low-salt fish sauce[J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(21): 42-46(in Chinese).
- [40] Saithong P, Panthavee W, Boonyaratanakornkit M, *et al.* Use of a starter culture of lactic acid bacteria in *plaa-som*, a Thai fermented fish[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110(5): 553-557.
- [41] Akolkar A V, Durai D, Desai A J. *Halobacterium* sp. SPI(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1): 44-53.
- [42] 向军, 张金虎, 柴海云, 等. 甲基营养型芽孢杆菌产氨肽酶的发酵优化[J]. *中国酿造*, 2012, 31(5): 45-50.
- Xiang J, Zhang J H, Chai H Y, *et al.* Fermentation optimization for aminopeptidase production of *Bacillus methylotrophilus*[J]. *China Brewing*, 2012, 31(5): 45-50(in Chinese).
- [43] 黄紫燕, 朱志伟, 曾庆孝, 等. 传统鱼露发酵的微生物动态分析[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(7): 18-22.
- Huang Z Y, Zhu Z W, Zeng Q X, *et al.* Study on the trends of microorganisms in traditional fermentation fish sauce[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(7): 18-22(in Chinese).
- [44] 李梦茹, 王香君, 段杉, 等. 一株戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)在模拟鱼露中的代谢行为及转录组学分析[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(8): 54-63.
- Li M R, Wang X J, Duan S, *et al.* Metabolic behavior and transcriptomic analysis of a *Pediococcus pentosaceus* strain in simulated fish sauce[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(8): 54-63(in Chinese).
- [45] Fukami K, Funatsu Y, Kawasaki K, *et al.* Improvement of fish-sauce odor by treatment with bacteria isolated from the fish-sauce mush (Moromi) made from frigate mackerel[J]. *Journal of Food Science*, 2004, 69(2): fms45-fms49.
- [46] Udomsil N, Rodtong S, Tanasupawat S, *et al.* Improvement of fish sauce quality by strain CMC5-3-1: a novel species of *Staphylococcus* sp.[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(9): M2015-M2022.
- [47] 冯杰. 埃切假丝酵母产香机理及其对酱油风味的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- Feng J. Mechanism of aroma production for the improvement of soy sauce flavor by *Candida etchellsii*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012 (in Chinese).
- [48] 吉川修司. 耐盐性微生物スターターの接種が魚醤油の発酵および品質に与える影響[J]. *日本醸造協会誌*, 2011, 106(8): 515-527.
- Yoshikawa S. Effect of halotolerant starter microorganisms inoculation to the fermentation and the quality of fish sauce[J]. *Journal of the Brewing Society of Japan*, 2011, 106(8): 515-527(in Japanese).
- [49] 王磊, 杨柳, 陈宇飞. 池沼公鱼鱼露后熟工艺的研究[J]. *中国调味品*, 2015, 40(9): 41-44, 50.
- Wang L, Yang L, Chen Y F. Study on post-mature process of fish sauce of pond smelt[J]. *China Condiment*, 2015, 40(9): 41-44, 50(in Chinese).
- [50] Sen N P, Seaman S W, Baddoo P A, *et al.* Formation of *N*-nitroso-*N*-methylurea in various samples of smoked/dried fish, fish sauce, seafoods, and ethnic fermented/pickled vegetables following incubation with nitrite under acidic conditions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(4): 2096-2103.
- [51] Zhai H L, Yang X Q, Li L H, *et al.* Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern China[J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 303-308.
- [52] Brillantes S, Samosorn W. Determination of histamine in fish sauce from Thailand using a solid phase extraction and high-performance liquid chromatography[J]. *Fisheries Science*, 2002, 67(6): 1163-1168.

- [53] Zaman M Z, Abdulmir A S, Bakar F A, *et al.* A review: microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce[J]. *American Journal of Applied Sciences*, 2009, 6(6): 1199-1211.
- [54] Jiang W, Xu Y, Li C S, *et al.* Biogenic amines in commercially produced Yulu, a Chinese fermented fish sauce[J]. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 2014, 7(1): 25-29.
- [55] Halász A, Baráth, Simon-Sarkadi L, *et al.* Biogenic amines and their production by microorganisms in food[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5(2): 42-49.
- [56] Auerswald L, Morren C, Lopata A L. Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood[J]. *Food Chemistry*, 2006, 98(2): 231-239.
- [57] 孙国勇, 曾庆孝, 江津津. 鱼露前期发酵过程中组胺变化规律研究[J]. *中国调味品*, 2008, 33(6): 64-67.  
Sun G Y, Zeng Q X, Jiang J J. Histamine changes during the early fermentation process in the manufacture of fish sauce[J]. *China Condiment*, 2008, 33(6): 64-67(in Chinese).
- [58] 陈辉, 周秋树. 鱼露中生物胺的研究进展[J]. *肉类研究*, 2016, 30(1): 40-45.  
Chen H, Zhou Q S. Biogenic amines in fish sauce: a Review[J]. *Meat Research*, 2016, 30(1): 40-45(in Chinese).
- [59] 姜维. 一株耐盐性高效生物胺降解新菌的筛选、分类鉴定及应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.  
Jiang W. Study on the screening, taxonomic analysis and application of one novel, salt-tolerant and high efficient biogenic amines degrading bacterium[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [60] 杨利昆, 付湘晋, 胡叶碧, 等. 鱼露中生物胺降解菌的筛选及其特性[J]. *食品科学*, 2012, 33(11): 158-162.  
Yang L K, Fu X J, Hu Y B, *et al.* Screening of strains with degradation activity for biogenic amines in fish sauce[J]. *Food Science*, 2012, 33(11): 158-162(in Chinese).
- [61] Kimura M, Furutani A, Fukui Y, *et al.* Isolation and identification of the causative bacterium of histamine accumulation during fish sauce fermentation and the suppression effect of inoculation with starter culture of lactic acid bacterium on the histamine accumulation in fish sauce processing[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2015, 81(1): 97-106.
- [62] Gowda S G S, Narayan B, Gopal S. Bacteriological properties and health-related biochemical components of fermented fish sauce: an overview[J]. *Food Reviews International*, 2016, 32(2): 203-229.
- [63] 萧凤岐. 鱼露的春天[J]. *中国酿造*, 2004, 23(6): 1-4, 7.  
Xiao F Q. Prosperity of fish syrup[J]. *China Brewing*, 2004, 23(6): 1-4, 7(in Chinese).
- [64] 刘洋. 海洋鱼抗痛肽的制备及其作用机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.  
Liu Y. Study on anti-gout mechanism of peptides prepared from marine fish[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014 (in Chinese).
- [65] Sasaki T, Koudou M, Michihata T, *et al.* Purification and antihypertensive activity of a novel angiotensin-i converting enzyme inhibitory peptide from fish sauce, *Ishiru*[J]. *Japanese Journal of Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 10(1): 45-49.
- [66] 陈洁, 黄佩佩, 宋茹. 枯草芽孢杆菌发酵鱼蛋白制备抗氧化型发酵液工艺的初步研究[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2011, 30(3): 254-258.  
Chen J, Huang P P, Song R. Preparing antioxidant ingredient derived from fish protein fermentation by *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2011, 30(3): 254-258(in Chinese).
- [67] 于小航. 鲢鱼调味品及抗氧化肽的研究与制备[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.  
Yu X H. The study and production of anchovy condiments and antioxidant peptides[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [68] 宋晓昀, 李瑞, 张磊, 等. 大连市售海产品铅、镉污染状况分析与评价[J]. *实用预防医学*, 2013, 20(12): 1474-1475.  
Song X Y, Li R, Zhang L, *et al.* Analysis and evaluation on the contamination status of lead and cadmium in marine products bought from the markets in dalian[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2013, 20(12): 1474-1475(in Chinese).
- [69] 曲映红, 刘志东, 陈舜胜. 利用茎柔鱼废弃物酿制鱼露的研究[J]. *食品工业*, 2014, 35(7): 12-14.  
Qu Y H, Liu Z D, Chen S S. Study on fish sauce brewed by the waste of *Dosidicus gigas*[J]. *The Food Industry*, 2014, 35(7): 12-14(in Chinese).

- [70] 刘文磊. 耐盐鲁氏酵母脱除水溶液及鱿鱼内脏酶解液中重金属能力的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.  
Liu W L. Removal of heavy metal from aqueous solution and squid visceral enzymatic hydrolysate by *Zygoaccharomyces rouxii*[D]: Qingdao: Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [71] Asksonthong R, Siripongvutikorn S, Usawakesmanee W. Evaluation of harmful heavy metal (Hg, Pb and Cd) reduction using *Halomonas elongata* and *Tetragenococcus halophilus* for protein hydrolysate product[J]. *Functional Foods in Health and Disease*, 2016, 6(4): 195-205.
- [72] 前橋健二, 山本泰. 酵母を利用した低食塩魚醤油の開発[J]. 日本食品保蔵科学会誌, 2007, 33(6): 315-321.  
Maehashi K, Yamamoto Y. Development of low-salt fish sauce using high levels of yeast[J]. *Food Preservation Science*, 2007, 33(6): 315-321(in Japanese).
- [73] 农小献, 宾石玉, 蒙涛, 等. 小清蛋白研究进展[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(6): 887-891.  
Nong X X, Bin S Y, Meng T, *et al.* Research progress of parvalbumins[J]. *Letters in Biotechnology*, 2011, 22(6): 887-891(in Chinese).
- [74] 伊藤康江, 塩見一雄, 三枝静江, 等. ゴマサバ, ハマトピウオ, ムロアジを利用したくさやと魚醤油に含まれる魚肉アレルギー原因物質パルブアルブミンの定量[R]. 東京都: 東京都農林総合研究センター研究報告, 2015.  
Ito Y, Shiomi K, Saegusa S, *et al.* Quantitation of parvalbumin in *kusaya* and fish sauce made from blue mackerel, coast flying fish, and mackerel scad[R]. Tokyo: Research Report on Tokyo Metropolitan Agriculture, 2015(in Japanese).
- [75] 张培, 申铨日, 邵素娟, 等. 金鲳鱼内脏酸性蛋白酶的提取及应用研究[J]. 食品科技, 2017, 42(1): 236-241.  
Zhang P, Shen X R, Shao S J, *et al.* Extraction and application of acid protease from golden pompano viscera[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(1): 236-241(in Chinese).
- [76] 张岚, 衣杰荣. 超声波辅助提取鲶鱼内脏蛋白酶的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 302-307, 329.  
Zhang L, Yi J R. Ultrasonic-assisted extracting process of protease from catfish viscera[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(22): 302-307, 329(in Chinese).
- [77] Heu M S, Pyeon J H, Kim H R, *et al.* Purification and characterization of alkaline proteinases from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 1991, 15(1): 51-66.
- [78] 吕英涛, 康从民, 韩春超, 等. 鳀鱼内源蛋白酶初步研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 270-273.  
Lü Y T, Kang C M, Han C C, *et al.* Endogenous proteases from digestive tract of anchovy[J]. *Food Science*, 2009, 30(17): 270-273(in Chinese).
- [79] 晁岱秀. 分段式快速发酵鱼露工艺的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.  
Chao D X. Study on accelerated fermentation of fish sauce by subsection[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010 (in Chinese).
- [80] 杨颖, 陆胜民, 陈剑兵, 等. 鳀鱼鱼露的加曲、分段速酿工艺[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(11): 87-91.  
Yang Y, Lu S M, Chen J B, *et al.* Study on rapid brewing of *Engraulis japonicus* sauce through adding Koji and adding salt by subsection[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2009, 35(11): 87-91(in Chinese).
- [81] 张艳芳. 多菌株制曲促进酶系优化与提高酱油质量的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.  
Zhang Y F. Study on optimizing enzyme system by using multi-strains during Koji making and improving quality of soy sauce[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009 (in Chinese).
- [82] 周崇禅. 鳀鱼鱼露稀醪发酵工艺的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.  
Zhou C C. Study on dilute-mash fermentation process (DMFP) of anchovy fish sauce[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010(in Chinese).
- [83] Fukami K, Ishiyama S, Yaguramaki H, *et al.* Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(19): 5412-5416.
- [84] Lapsongphon N, Yongsawatdigul J, Cadwallader K R. Identification and characterization of the aroma-impact components of Thai fish sauce[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(10): 2628-2638.
- [85] 肖宏艳, 曾庆孝. 潮汕鱼露发酵过程中挥发性风味成分分析[J]. 中国调味品, 2010, 35(2): 92-96.  
Xiao H Y, Zeng Q X. Analysis of volatile aroma compounds during Chaoshan Yu-lu fermentation[J]. *China Condiment*, 2010, 35(2): 92-96(in Chinese).

- [86] Park J N, Ishida K, Watanabe T, *et al.* Taste effects of oligopeptides in a Vietnamese fish sauce[J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(4): 921-928.
- [87] Park J N, Watanabe T, Endoh K, *et al.* Taste-active components in a Vietnamese fish sauce[J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(4): 913-920.
- [88] Miyamura N, Kuroda M, Kato Y, *et al.* Quantitative analysis of  $\gamma$ -glutamyl-valyl-glycine in fish sauces fermented with *Koji* by LC/MS/MS[J]. *Chromatography*, 2016, 37(1): 39-42.

## Research progress in the utilization of microorganisms to promote fermentation process and quality of traditional fish sauce

NING Yuchang<sup>1,2</sup>, WU Zufang<sup>2\*</sup>, WENG Peifang<sup>2</sup>

(1. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** Fish sauce is a widely used seafood condiment in East and Southeast Asia. Fresh fish or shrimp is generally used as raw material, and mixed with a lot of salt (usually 20%-30%), and then produced by long-term fermentation in an open environment. Fish sauce is characterized by delicious taste, nutrient-rich and so on. There are some problems of traditional fish sauce such as too long fermentation time, bio-amine accumulation, product quality inconsistencies and so on, however, the use of specific microbial starters is expected to solve these problems. On the basis of summarizing the traditional fish sauce production process, this paper focused on the enzyme-producing microbial species in traditional fish sauce, as well as researches and applications of using microorganisms to promote fish sauce fermentation and improve the quality of fish sauce products.

**Key words:** fish sauce; microorganism; fermentation; quality

**Corresponding author:** WU Zufang. E-mail: wzfwpf@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31471709); Ningbo Science and Technology to Enrich the People Project (2016C10031)