

不同发酵温度下虾油中细菌的 16S rDNA 分子生态分析以及蛋白酶系和产品品质的变化研究

胡小喜^{1,2}, 段杉¹, 王香君¹, 廖广强¹, 吴永和¹, 邝浩斌¹, 杨柳¹

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 惠州市爽口佳食品有限公司, 广东惠州 516132)

摘要: 本文采用 16S rDNA 高通量测序技术分析不同温度发酵下虾油菌相的变化, 采用酶谱电泳研究了虾油蛋白酶系的变化, 并结合测定各质量指标以探索细菌在虾油发酵中的作用。研究发现虾油中细菌数量远高于真菌数量, 显示了细菌对发酵的重要贡献。虾油菌相复杂, 且不同温度下菌相差异很大; 发酵中菌相及蛋白酶系均呈现动态变化, 25 °C 和 35 °C 发酵的虾油中蛋白酶失活较少, 且存在大量 *Tetragenococcus*, *Virgibacillus* 等产生良好风味成分的细菌; 而 45 °C 的虾油中蛋白酶失活严重, 且检出的细菌与产生良好风味无关, 感官评定也最差, 因此, 45 °C 不适合发酵虾油。发酵 30 d 时, 虾油中的氨基酸态氮、无盐可溶性固形物、挥发性盐基氮 (TVB-N) 和三甲胺 (TMA) 等均达到峰值, 此后各指标基本恒定, 但菌相仍变化较大且有 1 种新蛋白酶出现, 而且虾油风味继续改善。

关键词: 虾油; 鱼露; 16S rDNA; 蛋白酶系; 菌相

文章编号: 1673-9078(2015)10-156-162

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.027

16S Ribosomal DNA-based Analysis of Bacteria in Shrimp Sauce: Effect of Fermentation Temperature on Protease System and Product Quality

HU Xiao-xi^{1,2}, DUAN Shan¹, WANG Xiang-jun¹, LIAO Guang-qiang¹, WU Yong-he¹, KUANG Hao-bin¹, YANG Liu¹

(1. College of Food Science and Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Huizhou Shuangkoujia Group CO., Ltd, Huizhou 516132, China)

Abstract: Changes in the bacterial flora and the protease system in shrimp sauce at different fermentation temperatures were analyzed using 16S ribosomal DNA (rDNA) high-throughput sequencing and zymography methods, respectively. The role of bacteria in the fermentation of shrimp sauce was examined by measuring various quality indicators. The results showed that the bacteria count were significantly higher than that of fungi, indicating the important contribution of bacteria to the fermentation of shrimp sauce. The bacterial flora in shrimp sauce was very complex and showed significant differences at different temperatures. The bacterial flora and protease system underwent dynamic changes during fermentation. At 25 °C and 35 °C, fewer proteases were deactivated and a large number of flavor-forming bacteria were detected, including *Tetragenococcus* and *Virgibacillus*. However, at 45 °C, severe protease inactivation was observed and the detected bacteria were not related to flavor formation. Additionally, sensory evaluation showed the lowest values in these groups. Therefore, 45 °C is not a suitable temperature for the fermentation of shrimp sauce. The contents of amino nitrogen, saltless soluble solids, and total volatile base nitrogen (TVN-N) and trimethylamine (TMA) reached the maximum values after 30 days of fermentation, and then generally remained constant. However, there were significant changes in the bacterial flora; one novel protease was detected, and the flavor of shrimp sauce continued to improve.

Key words: shrimp sauce; fish sauce; 16S ribosomal DNA; protease system; bacterial flora

虾油与鱼露的生产很相似, 二者都是在高盐条件下, 分别以虾或鱼为原料, 经长时间发酵制成。发酵

收稿日期: 2014-12-30

基金项目: 国家星火科技计划项目 (2013GA780039)

作者简介: 胡小喜, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与营养

通讯作者: 段杉, 男, 博士, 副教授, 主要从事食品生物化学及水产品综合利用方向研究

过程中原料在自身各种内源酶以及微生物的综合作用下, 慢慢形成的富含多肽和氨基酸的风味独特的调味品。这类产品的生产主要集中在我国沿海以及东南亚国家。

近年来, 对虾加工产生了大量虾头虾壳, 分析表明虾头虾壳中含有约 40% 蛋白质 (占干重), 呈味氨基酸占比很高, 且富含蛋白酶、酯酶等各种内源酶,

适合制作虾油, Kim 等^[1]及本课题组^[2]均以虾头虾壳研制了虾油。

目前关于虾油的研究甚少,除了以上提及的 Kim 及本课题组的几篇论文外,尚未检索到其他论文。但有关鱼露的研究则相对较多,一般认为嗜盐乳酸菌在鱼露发酵过程中占优势地位并发挥重要作用^[3],如 *Tetragenococcus halophilus* 就是一种嗜盐乳酸菌,它可以在 25% 盐度的鱼露中生长,水解蛋白质产生大量氨基酸,并产生特征性气味成分^[4]。在鱼露中发现的其他主要细菌还包括 *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* 和 *Pediococcus*^[5-6], 上述细菌大多属于乳酸菌。细菌对鱼露发酵的贡献在很大程度上是由于其分泌的蛋白酶,因此,一些学者尝试从鱼露中分离蛋白酶产生菌并将其用于发酵过程,分离的细菌包括 *Tetragenococcus*^[7], *Virgibacillus* 和 *Bacillus*^[8], *Halobacterium*^[9]等。

虾油、鱼露的发酵机理复杂,涉及到各种微生物及酶系的作用,但目前关于鱼露中微生物的研究均采用平板计数和分离的方法,这难以反映其中微生物的真实状况;而关于各种酶系变化的研究则几乎没有。本课题组曾系统分析了虾油中蛋白酶系的变化,发现发酵过程中内源蛋白酶活性趋于降低,而多种细菌蛋白酶系逐渐增强,并呈现动态变化^[10]。本文在本课题组前述研究的基础上,采用 16S rDNA 高通量测序技术分析虾油发酵过程中细菌菌相的变化,并进一步分析菌相变化与蛋白酶系和质量指标变化之间的关系。

1 材料与方法

1.1 原材料

南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 的虾头虾壳,由阳江市海达水产有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 虾油发酵

将虾头虾壳绞碎,加入原料重 5% 的食盐混匀,于 45 °C 自溶(以 80 r/min 震荡)4 h,过滤得自溶液,补充食盐至浓度 25%(m/m),于 35 °C 保温发酵,定期补加蒸发掉的水分保持盐度恒定。

1.2.2 16S rDNA 分子生态分析

取 2 mL 虾油样品,12000 r/min 离心 2 min,弃上清,收集沉淀的菌体,采用广州东盛生物科技公司的细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取细菌 DNA。

将提取的细菌 DNA 提交到北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行测序分析,采用引物对 515f/806r

(515f: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'; 806r: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增细菌的 16S rDNA 的 V4 区。然后在 illumina Miseq 测序平台上进行双末端(PE)测序。对测序产生的 PE reads 进行拼接及拼接后的质控;统计拼接后得到的 reads 总数及每个样品的 reads 数,生成 OTU table 和 OTU heatmap;再进行物种注释。

1.2.3 细菌和真菌数量的检测

按 GB/T 4789.2-2003 方法稍作改进,分别用 0% 盐度和 10% 盐度的 PCA 培养基对细菌进行计数;用 0% 盐度和 10% 盐度的 PDA 培养基对真菌进行计数。

1.2.4 蛋白酶酶谱电泳

按段杉等^[10]的方法电泳。

1.2.5 理化指标测定

1.2.5.1 pH 值:以 PB-10 pH 计测定。

1.2.5.2 酸度:按 GB 5413.34-2010 方法测定。

1.2.5.3 无盐可溶性固形物:以 BK8280 糖度计测定可溶性固形物,减去盐度后即为无盐可溶性固形物。

1.2.5.4 氨基酸态氮(AAN):按 GB18186-2000 中的甲醛滴定法测定。

1.2.5.5 蛋白酶活力:按 SB/T 10317-1999 的方法测定。在 40 °C 下 10 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸定义为 1 个活力单位(U)。

1.2.5.6 游离氨基酸:按 GB/T 5009.124-2003 的方法,采用日立-8800 型氨基酸自动分析仪检测。色谱柱:日立 855-350 型;柱温:134 °C;检测波长:570 nm 和 440 nm;流速:0.35 mL/min。标准氨基酸为 Sigma 产品。

1.2.5.7 挥发性盐基氮(TVB-N)和三甲胺(TMA):采用康微皿法测定^[11]。

1.2.6 数据分析

所有理化指标进行三次平行测定,采用 SPSS Statistics 19 软件对数据进行单因素方差分析,数据表达成平均值±标准方差(Mean±S.D)。p<0.05 认为具有显著差异。

2 结果与讨论

2.1 不同温度下虾油中微生物数量的变化

表 1 显示,原料中的真菌数约为 10³cfu/mL 左右;而在发酵过程中,在各个温度下,无论以 0% 或 10% NaCl 的 PDA 培养基计数,虾油中真菌数均<30 cfu/mL,在很多样品中甚至检测不到,这说明原料中的真菌不耐高盐条件,也说明在虾油发酵过程中真菌几乎不起作用。Harikedua^[12]的研究发现鱼露中的真菌

数量也很少，这与本研究结果类似。

表 1 不同温度下虾油中真菌数量的变化

Table 1 Changes in total fungal count in shrimp sauce at different temperatures

真菌数量/(cfu/mL)	25℃		35℃		45℃	
	0%NaCl 的 PDA 培养基	10%NaCl 的 PDA 培养基	0%NaCl 的 PDA 培养基	10%NaCl 的 PDA 培养基	0%NaCl 的 PDA 培养基	10%NaCl 的 PDA 培养基
0(原料)	1080	789	1080	789	1080	789
5~90	<30	<30	<30	<30	<30	<30

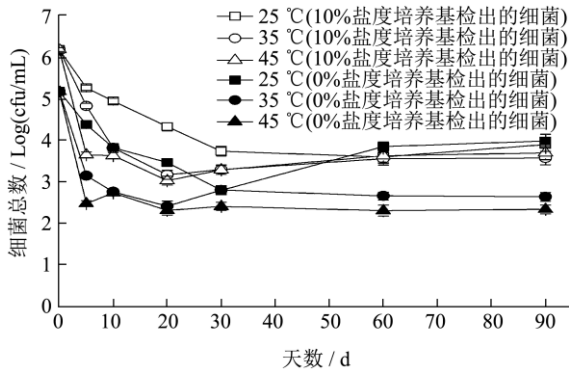


图 1 不同温度下虾油中细菌数量的变化

Fig.1 Changes in total bacterial count in shrimp sauce at different temperatures

由图 1 可知，在 0% 盐度培养基上，在发酵 30 d 内，检出的细菌数量从 $10^{6.2}$ cfu/mL 迅速下降至约 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ cfu/mL，30d 后数量基本保持稳定。这些现象说明，原料带来的细菌大多不耐高盐，在发酵初期迅速死亡。此外，需要注意的是，虾油的发酵是开放式的，不断受到环境中各种微生物的污染，因此，0% 盐度培养基上检出的细菌，不一定能在虾油中生存，而更可能是污染的细菌在高盐条件下处于休眠状态，在低盐培养基上再次萌发。

在 10% 盐度培养基上，在发酵 30 d 内，检出的细菌数量也由 $10^{5.2}$ cfu/mL 迅速下降至约 $10^{2.5} \sim 10^{3.0}$ cfu/mL，30 d 后 35℃ 及 45℃ 的虾油中细菌的数量基本保持稳定；而 25℃ 的虾油中细菌的数量则显著增加至约 $10^{4.0}$ cfu/mL。方差分析表明温度对 10% 盐度培养基上检出的细菌数量有非常显著的影响 ($p < 0.01$)。10% 盐度下检出的细菌应主要为耐盐或嗜盐细菌，以上结果说明，25℃ 的虾油中某些耐盐或嗜盐细菌逐渐增殖，这部分细菌可能对虾油的发酵有贡献。

2.2 不同温度下虾油中细菌菌相变化

针对不同发酵温度、不同发酵时间的虾油样品进行 16S rDNA 高通量测序，结果共检出 1285 属细菌，但绝大多数细菌的相对丰度很低，推测这些细菌属于污染的细菌。我们只对相对丰度超过 1% 的属进行统计，统计结果如图 2、3、4 所示。

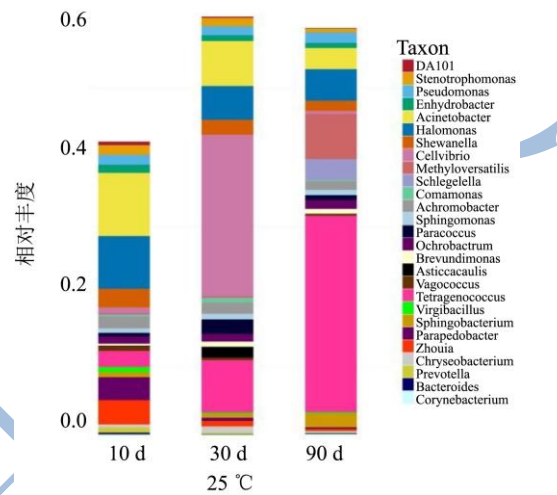


图 2 25℃下虾油中细菌菌相的变化

Fig.2 Changes in bacterial flora of shrimp sauce at 25℃

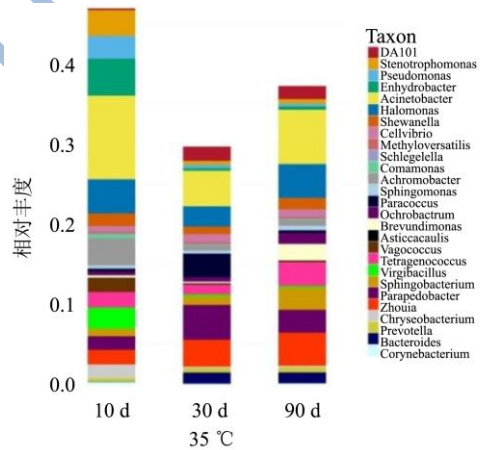


图 3. 35℃下虾油中细菌菌相的变化

Fig.3 Changes in bacterial flora of shrimp sauce at 35℃

图 2 显示 25℃ 发酵时，*Tetragenococcus* 的相对丰度逐渐增加，由第 10 d 的 2.31% 上升至 30 d 的 7.58%，再到 90 d 的 28.31%，成为第 90 d 的绝对优势菌；而 *Acinetobacter*、*Shewanella*、*Zhouia* 的相对丰度则缓慢递减，分别由发酵第 10 d 的 9.11%、2.67%、3.50% 下降至第 90 d 的 3.05%、1.47%、1% 以下；*Halomonas* 则基本保持稳定。在整个发酵过程中，*Cellvibrio* 的相对丰度波动较大，在第 30 d 占比达到 23.26%，但在第 90 d 又剧烈下降至 1% 以下。在发酵第 90 d 的优势菌依次为 *Tetragenococcus*，

Methyloversatilis, *Halomonas* 和 *Acinetobacter*。

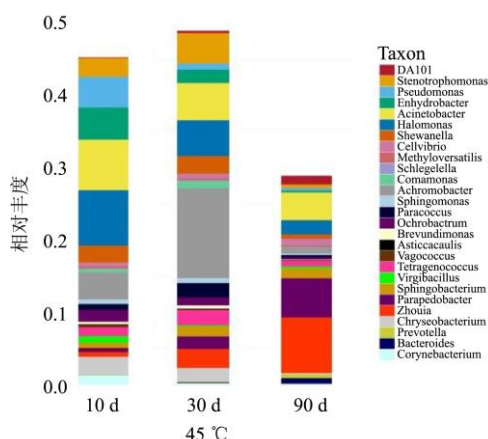


图4 45 °C下虾油中细菌菌相的变化

Fig.4 Changes in bacterial flora of shrimp sauce at 45 °C

图 3 显示 35 °C 条件下随着发酵时间延长 *Virgibacillus* 和 *Pseudomonas* 的相对丰度逐渐减少,而 *Zhouia* 则逐渐增加,发酵至第 90 d 时主要优势菌依次为 *Acinetobacter*, *Halomonas*, *Zhouia*, *etragenococcus*, *Sphingobacterium*, *Parapedobacter* 和 *Brevundimonas*。

图 4 显示 45 °C 发酵, *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enhydrobacter* 和 *Shewanella* 的相对丰度逐渐下降;而 *Zhouia*, *Parapedobacter* 逐渐增加; *Tetragenococcus*, *Achromobacter* 的相对丰度则波动较大,分别由第 10 d 的 1.22%、3.71% 上升至第 30 d 的 2.13% 和 12.41% 后出现下降趋势,发酵 90 d 时的优势菌依次为 *Zhouia*, *Parapedobacter*, *Acinetobacter* 和 *Halomonas*。

从以上结果可以看出,虾油的菌相很复杂。一般认为, *Tetragenococcus* 和 *Halomonas* 均耐高盐^[3,4] *Virgibacillus* 产生蛋白酶^[13]。 *Tetragenococcus*, *Virgibacillus* 等嗜盐乳酸菌在鱼露发酵过程中占优势地位并发挥重要作用, *Tetragenococcus halophilus* 可以在 25% 盐度的鱼露中生长,水解蛋白质产生大量氨基酸,并产生特征性气味成分^[4]。 *Acinetobacter* 是条件致病菌, *Shewanella* 和 *Pseudomonas* 一般导致食物腐败。在鱼露中发现的其他主要细菌还包括 *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 和 *Halobacterium* 等^[5,6,9]。本文在虾油中也发现了高丰度的 *Tetragenococcus* 和 *Virgibacillus*, 但未发现其他鱼露中常见的细菌。虾油与鱼露相比,除原料不同外,发酵中虾油偏碱性,而鱼露偏酸性,这些可能会造成菌相的差异;此外,发酵的温度、原料的初始菌相以及发酵过程中不断污染的环境细菌的差异等都可能造成发酵过程中菌相的不同。

从上述菌相分析结果看,在 45 °C 虾油中检出的

细菌中,均未报道可产生良好风味,且许多与腐败等有关;感官评定的结果也显示 45 °C 虾油风味最差,因此 45 °C 不适合发酵虾油。

2.3 温度对虾油蛋白酶活力的影响

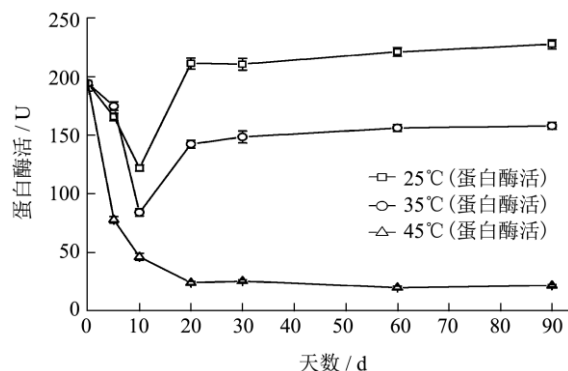


图 5. 不同发酵温度的虾油中的蛋白酶活力

Fig.5 Protease activity in shrimp sauce with different fermentation temperatures

图 5 知蛋白酶活力大小为 25 °C > 35 °C > 45 °C, 45 °C 的酶活力远低于 25 °C 和 35 °C。还可以发现,在发酵 10 d 内,所有温度的虾油蛋白酶活力显著下降,此后除 45 °C 的虾油外,25 °C 和 35 °C 的酶活力显著增加,20 d 以后大致保持稳定,而在 45 °C 虾油的酶活则一直很低。

不同温度发酵的虾油的蛋白酶电泳图谱如图 6 所示,虾油中共检出 4 种内源蛋白酶(1、2、3 和 4 号),这 4 种蛋白酶在发酵过程中一直存在;发酵第 5 d 时产生了新蛋白酶(5、6 号),第 20 d 出现了新蛋白酶(7 和 8 号),第 90 d 出现了新蛋白酶(9 和 10 号),说明发酵过程中逐渐产生了细菌蛋白酶。图 6 中各谱带亮度差异显示,蛋白酶活为 25 °C > 35 °C > 45 °C,且 45 °C 的蛋白酶活远远小于 25 °C 和 35 °C 的;此外,45 °C 虾油仅在 5 d 时出现了 2 条微弱的细菌蛋白酶带,此后再无检出,这些结果都与图 5 酶活力测定的结果一致。综上可知,发酵初期蛋白酶活力下降是因为在高盐条件下许多内源蛋白酶逐渐失活,此后耐盐及嗜盐细菌逐渐增殖并产生蛋白酶,所以蛋白酶活力重新升高;但 45 °C 不适于绝大多数细菌生长,基本无细菌蛋白酶,所以酶活力一直很低。这些结果与本课题组前期研究^[10]以及 Klomklao 等^[14]对鱼露的研究结果一致。

2.4 温度对虾油各质量指标的影响

由图 7 可知发酵 30 d 内, AAN 含量迅速从 0.621 g/100 mL 上升至 0.825 g/100 mL, 接近鱼露一级产品 AAN 标准 (0.90 g/100 mL), 此后基本恒定不变;且

不同温度虾油的 AAN 含量无显著差异 ($p>0.05$)。无盐可溶性固形物的变化与 AAN 变化相似。从上述菌相分析可以看出虾油与鱼露的菌相存在一定差异; 另外, 本文用虾头虾壳作原料发酵虾油, 而虾头虾壳中主要是对虾的各种内脏, 蛋白酶活性很高。

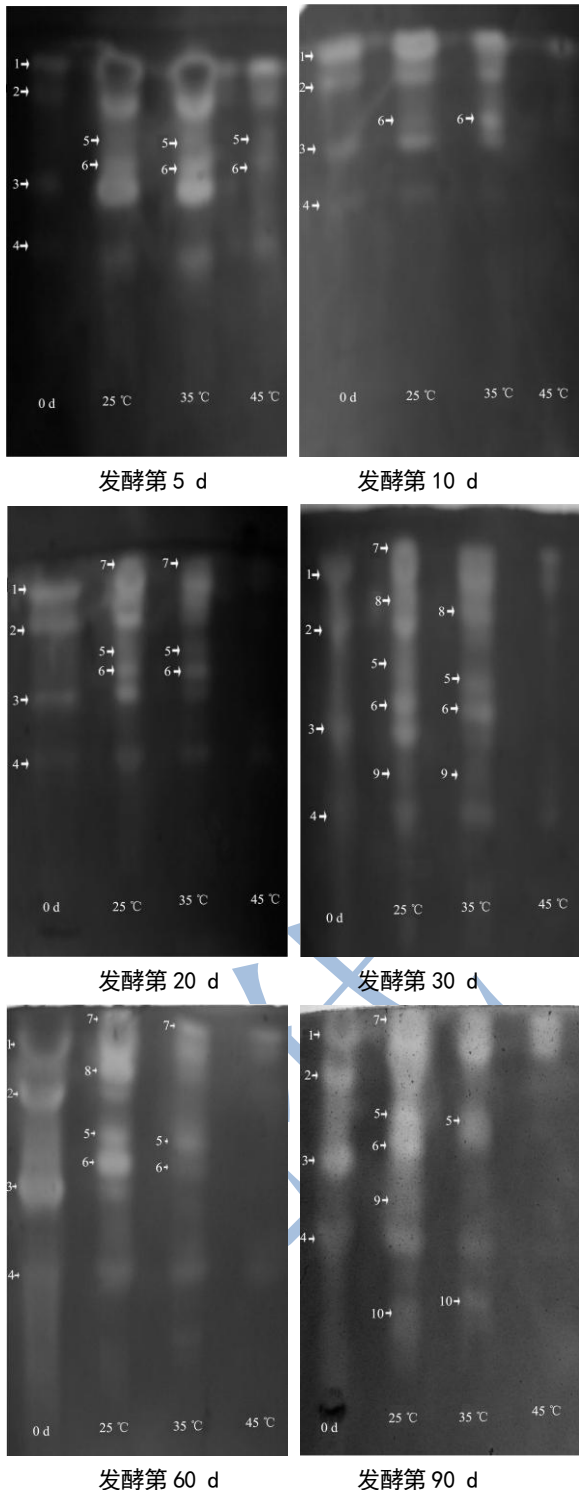


图 6 虾油发酵过程中蛋白酶组成变化

Fig.6 Changes in protease composition in shrimp sauce fermented at different temperatures

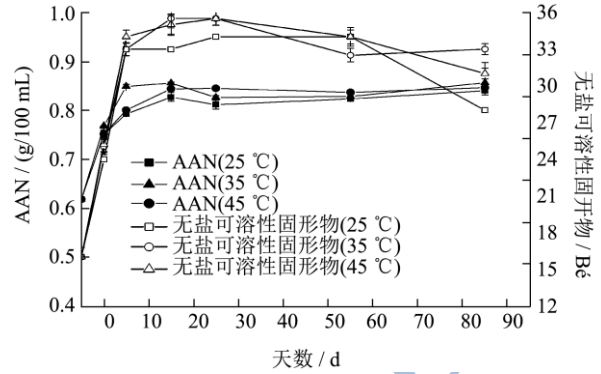


图 7 温度对虾油无盐可溶性固形物和 AAN 的影响

Fig.7 Influence of temperature on total saltless soluble solids and AAN during fermentation of shrimp sauce

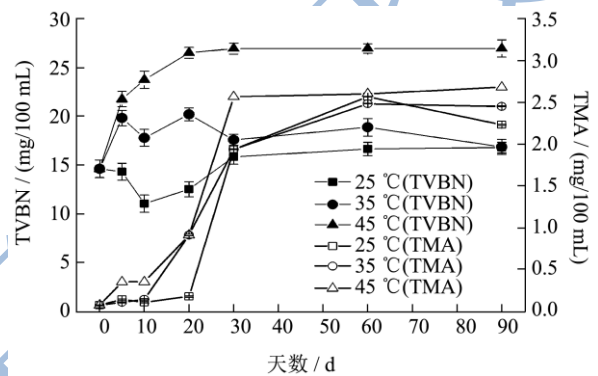


图 8 不同发酵温度下虾油中 TVB-N 和 TMA 含量的变化

Fig.8 Changes in the TVB-N and TMA content of shrimp sauce at different fermentation temperatures

图 8 知, 在发酵 30 d 内, TVB-N 和 TMA 均快速上升, 30 d 以后基本不变。45 °C 虾油的 TVB-N 和 TMA 均显著高于 35 °C 和 25 °C ($p<0.01$ 和 $p<0.05$) 虾油, 但 35 °C 与 25 °C 虾油没有显著性差异 ($p>0.05$)。

上述各质量指标虽然在 30 d 时已达到峰值, 但感官评定结果显示, 30 d 后随着发酵时间延长, 虾油的风味仍不断增强, 说明风味成分仍在不断形成。

从表 2 可以看出, 虾油游离氨基酸种类丰富, 尤其富含天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸等鲜味和甜味氨基酸。虾油的鲜味氨基酸比例为 25 °C>35 °C 和 45 °C; 苦味氨基酸比例为 45 °C>35 °C 和 25 °C; 甜味氨基酸比例均很接近; 其他氨基酸则为 25 °C>35 °C>45 °C。蛋白酶活力测定结果为 25 °C>35 °C>45 °C, 且 45 °C 的酶活力远低于 25 °C 和 35 °C 的, 但表 2 显示游离氨基酸总量为 45 °C 和 25 °C>35 °C, 这似乎与酶活力测定的结果矛盾, 推测造成此现象的原因是, 由于测定酶活力时条件一致, 测出的酶活力只能反映虾油中酶浓度, 而酶在不同条件下实际表现的活力是不同的, 可能某些蛋白酶在 45 °C 时活力显著提高。

表 2 不同温度下发酵 90 d 的虾油的游离氨基酸组成

Table 2 Composition of free amino acids in shrimp sauce fermented at different temperatures for 90 d

名称	25℃		35℃		45℃	
	含量/(mg/100 mL)	比例/%	含量/(mg/100 mL)	比例/%	含量/(mg/100 mL)	比例/%
天冬氨酸	229.52	4.73	224.16	5.02	249.09	5.08
天冬酰胺	174.69	3.60	139.06	3.12	136.26	2.78
谷氨酸	396.99	8.19	350.32	7.85	360.20	7.35
鲜味氨基酸总和	801.19	16.52	713.53	15.99	745.55	15.21
苏氨酸	209.44	4.32	193.83	4.34	211.40	4.31
丝氨酸	205.97	4.25	185.67	4.16	201.67	4.12
赖氨酸	381.91	7.88	366.56	8.22	403.94	8.24
组氨酸	111.31	2.30	87.38	1.96	87.25	1.78
3-甲基组氨酸	2.74	0.06	1.56	0.04	10.83	0.22
羟脯氨酸	9.95	0.21	7.06	0.16	2.19	0.04
脯氨酸	143.15	2.95	144.55	3.24	166.17	3.39
甘氨酸	334.81	6.91	315.42	7.07	338.50	6.91
丙氨酸	442.53	9.13	411.09	9.21	461.53	9.42
β-丙氨酸	3.55	0.07	3.42	0.08	3.60	0.07
磷-丝氨酸	9.76	0.20	9.40	0.21	8.46	0.17
甜味氨基酸总和	1855.12	38.26	1725.94	38.68	1895.56	38.68
缬氨酸	329.72	6.80	317.73	7.12	356.16	7.27
蛋氨酸	98.63	2.03	76.56	1.72	103.08	2.10
异亮氨酸	248.05	5.12	241.29	5.41	267.70	5.46
亮氨酸	377.59	7.79	367.76	8.24	411.56	8.40
酪氨酸	123.91	2.56	188.03	4.21	209.50	4.28
苯丙氨酸	240.21	4.95	234.02	5.24	263.12	5.37
精氨酸	173.67	3.58	69.21	1.55	231.62	4.73
色氨酸	61.12	1.26	56.10	1.26	60.31	1.23
苦味氨基酸总和	1652.90	34.09	1550.69	34.75	1903.04	38.84
氨	37.36	0.77	65.63	1.47	20.07	0.41
氨基丁酸	1.83	0.04	1.47	0.03	1.71	0.03
β-氨基异丁酸	0.34	0.01	0.26	0.01	-	-
胱硫醚	2.49	0.05	2.65	0.06	3.03	0.06
鸟氨酸	320.42	6.61	224.31	5.03	150.43	3.07
尿素	5.73	0.12	7.96	0.18	4.31	0.09
牛磺酸	109.10	2.25	100.19	2.25	109.34	2.23
氨基乙醇	9.56	0.20	8.58	0.19	8.86	0.18
半胱氨酸	2.23	0.05	-	-	-	-
氨基肥酸	25.52	0.53	17.41	0.39	13.40	0.27
瓜氨酸	-	-	8.31	0.19	-	-
其他氨基酸总和	514.58	10.61	436.77	9.79	311.14	6.35
所有氨基酸总和	4823.79	100	4426.94	100	4855.29	100

3 结论

本论文研究表明, 虾油发酵过程中细菌数量远高

于真菌数量, 且有多种细菌蛋白酶出现, 说明细菌对虾油发酵有重要贡献。25℃和35℃条件下, 虾油中蛋白酶失活较少, 且存在大量产生良好风味的细菌;

而 45 °C 时蛋白酶失活严重, 且检出的细菌与产生良好风味无关, 因此, 45 °C 不适合发酵虾油。

参考文献

- [1] Kim J S, Shahidi F, Heu M S. Characteristics of salt-fermented sauces from shrimp processing byproducts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (3): 784-792
- [2] 冯滢滢,段杉,李远志.温度对虾油风味成分形成的影响研究[J].现代食品科技,2013, 29(2):269-273
FENG Ying-ying, DUAN Shan, Li Yuan-zhi. Influence of salt concentration on formation of flavour ingredients in fermentation of shrimp sauce [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 269-273
- [3] Berna Kilinc, Sukran Cakli, Sebnem Tolasa, et al. Chemical, microbiological and sensory changes associated with fish sauce processing [J]. Eur. Food Res. Technol., 2006, 222: 604-613
- [4] Natteewan Udomsil, Sureelak Rodtong, Yeung Joon Choi, et al. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation [J]. Agric. Food Chem., 2011, 59: 8401-8408
- [5] K Lopetchart, J W Park. Characteristics of fish sauce made from pacific whiting and surimi by-products during fermentation stage [J]. Journal of Food Science, 2002, 67: 511-516
- [6] Frans Gruber Ijong, Yoshiyuki Ohta. Physicochemical and microbiological changes associated with bakasang processing-a traditional Indonesian fermented fish sauce [J]. J. Sci. Food Agric., 1996, 71: 69-74
- [7] Natteewan Udomsil, Sureelak Rodtong, Yeung Joon Choi, et al. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation [J]. Agric. Food Chem., 2011, 59: 8401-8408
- [8] Yun-Zhu Xiao, Si-Yang Zhao, Duan-Kai Wu, et al. Real-Time PCR Quantification of Protease-Producing Bacteria in Traditional Chinese Fish Sauce [J]. Food Anal. Methods, 2014, 7: 1634-1642
- [9] A V Akolkar, D Durai, A J Desai. *Halobacterium* sp. SP1(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109: 44-53
- [10] 段杉,胡小喜,廖光强,等.盐度对虾油中蛋白酶系、微生物和质量指标的影响研究[J].现代食品科技,2014,30(7):38-43
DUAN Shan, HU Xiao-xi, LIAO Guang-qiang, et al. Effects of salinity on proteases composition, bacterial population and quality of shrimp sauce during fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 38-43
- [11] Conway E J. Microdiffusion analysis and volumetric error, Cosby Lochwood: London, UK, 1950
- [12] Harikedua S D, Wijaya C H, Adawiyah D R. Relationship between sensory attributes of bakasang (a traditional Indonesian fermented fish product) and its physicochemical properties [J]. Fisheries Science, 2012, 78(1): 187-195
- [13] Aungkawipa Montriwong, Sasitorn Kaewphuak, Sureelak Rodtong, et al. Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation [J]. Process Biochemistry, 2012, 47: 2379-2387
- [14] 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