

微生物酶与肉组织酶对干发酵香肠中游离脂肪酸的影响\*

沈清武 李平兰

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要 以戊糖乳杆菌 31-1 和木糖葡萄球菌为发酵剂生产干发酵香肠,就发酵剂对干发酵香肠成熟过程中游离脂肪酸的影响进行了研究。研究表明,在灌肠后的 1 周内,脂肪的水解主要是由组织酶引起的,微生物对脂肪微弱的水解能力主要表现在干发酵香肠成熟的后期,并且发酵剂不能改变发酵香肠中游离脂肪酸的变化模式。  
关键词 干发酵香肠 组织酶 发酵剂 游离脂肪酸

脂肪和蛋白质的水解是发酵香肠在成熟过程中发生的主要化学变化,是产生风味物质和风味前体物质的重要生化反应。发酵香肠在成熟过程中,脂肪水解产生游离脂肪酸,游离脂肪酸又可被进一步氧化生成醛、酮、醇等风味物质<sup>[1-3]</sup>。据研究,脂肪是干发酵香肠在成熟过程中所产生的风味物质的主要来源<sup>[4-6]</sup>。因此,在发酵香肠中一定游离脂肪酸的存在有利于产品良好风味的形成。

传统观点认为,干发酵香肠在成熟过程中脂肪的水解主要是由微生物引起的<sup>[7]</sup>,而不饱和脂肪酸的氧化、脂过氧化物和羰基化合物的生成则被认为与化学反应,以及与微生物的代谢活动有关。因此,选择有脂肪酶活性的微生物菌种来保证发酵香肠的风味就成了人们关心的问题<sup>[8,9]</sup>。自 1990 年代以来,肉和脂肪组织中的酶在干发酵香肠成熟过程中的作用越来越受到人们的重视<sup>[10,11]</sup>。本研究的目的就在于探讨肉组织酶和微生物酶在脂肪水解过程中相对作用的大小,以及干发酵香肠在成熟过程中游离脂肪酸的变化。

1 材料和方法

研究分 4 个处理进行,分别用 C、L、S 和 L+S 表示。C:加入抗菌剂以抑制微生物的生长,抗菌剂的用量为氯霉素 200 mg/kg,青霉素

80 000 IU/kg,链霉素 200 mg/kg,山梨酸钾 2 g/kg。L:加入单一的戊糖乳杆菌。S:加入单一的木糖葡萄球菌。(L+S):加入混合发酵剂,即 L 和 S 处理所用的乳酸菌和葡萄球菌。然后对 4 个处理的发酵香肠(实际上 C 处理不能说是发酵香肠)在成熟过程中游离脂肪酸的变化进行分析。

1.1 发酵香肠的生产

研究中所用的发酵香肠在双汇集团中试车间生产。发酵剂的接入量为 10<sup>6</sup> cfu/g。

1.1.1 工艺流程

挑取猪后腿瘦肉、牛肉+脊膘→切丁→冷冻(-20℃,24 h)→斩拌,混合(加辅料,发酵剂)→灌肠(真空)→发酵→成熟、干燥→包装。

1.1.2 配方

猪瘦肉	60 kg	NaCl	2 600 g
牛肉	20 kg	硝酸盐	20 g
肥膘	20 kg	亚硝酸盐	10 g
葡萄糖	500 g	抗坏血酸钠	50 g
蔗糖	200 g	香辛料	适量
脱脂乳粉	2 800 g		

1.1.3 工艺条件

发酵条件:T:20℃;RH:95%;t:3 d。成熟干燥条件:第 1 阶段 T:20~16℃;RH:95%~85%;t:4 d;第 2 阶段 T:14℃;RH:78%;t:41 d。

第一作者:博士研究生(李平兰副教授为本文通讯作者)。  
\* 国家“十五”攻关资助项目(2001BA501A11)、国家“十五”传统肉制品加工专项资助项目(2001BA501A24)  
收稿时间:2004-09-02

1.2 取样与样品处理

在灌肠后的第 0、7、14、28 和 48 d 分别取香肠 1 根, 去除肠衣, 用组织捣碎机粉碎、搅拌均匀, 然后进行游离脂肪酸的测定。

1.3 游离脂肪酸的测定

发酵香肠中游离脂肪酸的测定参照参考文献 [12] 根据实际情况稍加修改。具体方法如下:

1.3.1 香肠中脂肪的提取<sup>[13]</sup>

称取以上处理的样品 5 g→置于圆底烧瓶中, 加 60 mL V(三氯甲烷): V(甲醇)=2:1 混合液 (CM)→65℃ 抽提 30 min→过滤→回收溶剂→以氮气吹干脂肪。

1.3.2 阴离子交换树脂的处理

称取 Amberlyst-26(A-26) 10 g 于具塞三角瓶→加入 100~120 mL 0.5 mol/L NaOH 溶液, 振摇 30 min→倾去 NaOH→用去 CO<sub>2</sub> 的蒸馏水洗 3 次, 每次振摇 20 min→40 mL 甲醇洗 3 次, 每次振摇 20 min→重复处理 1 次→A-26 保存于甲醇中。

1.3.3 游离脂肪酸的分离及甲酯化

取 100 mg 脂肪于具塞三角瓶中→加入 15 mL V(丙酮): V(甲醇)=2:1 溶液→加入 200~250 mg A-26 及 0.2~0.5 mL 的 C<sub>15:0</sub> 内标甲醇溶液→120 r/min 振摇 30 min→静置倾去溶剂→丙酮-甲醇洗涤树脂 4 次→将树脂洗入干试管中(带橡胶塞和螺纹盖)→倾去丙酮-甲醇→以氮气吹干树脂→加入 3 mL 甲酯化试剂(盐酸甲醇溶液)和 2 mL 正己烷, 盖紧试管→沸水浴 60 min→冷却→加入 5%~6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 mL→振摇至 2 相清晰, 取己烷层上机。

1.3.4 气谱条件

进样口温度 250℃; 检测器温度 250℃; 载气 氮气; 载气流速 3 mL/min; 分流比 20:1; 氢气流速 45 mL/min; 空气流速 450 mL/min; 尾吹气 45 mL/min; 柱升温程序 200℃, 保持 15 min, 然后以 10℃/min 升到 220℃, 保持 8 min。

2 结果与讨论

2.1 总游离脂肪酸的变化

游离脂肪酸是干发酵香肠中的风味物质或风味物质的重要前体, 发酵香肠在成熟过程中一定程度脂肪的水解和一定量游离脂肪酸的释放对发酵香肠独特良好风味的形成具有非常重要的作用。从图 1 可以看出, 在新鲜肉馅中游离脂肪酸的含量非常低, 总量约 500 mg/100 g 油。随着发酵香肠成熟干燥的进行, 发酵香肠中游离脂肪酸不断增加, 到成熟结束, 各处理中游离脂肪酸的总量增加了 9 倍以上, 其中以处理 L+S 中游离脂肪酸的增加量最大, 达到了初始值的 12 倍, 为 6 061.20 mg/100 g(油)。

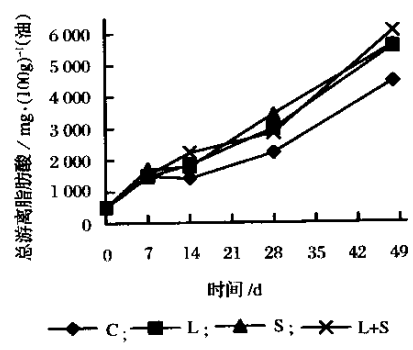


图 1 各处理在成熟过程中总游离脂肪酸的变化

从游离脂肪酸的变化过程来看, 游离脂肪酸的释放速度以灌肠后 7 d 内的释放速率最大, C、L、S 和 L+S 四个处理每天分别为 142.31、138.76、174.62 和 144.58 mg/100 g(油)。7 d 以后各处理游离脂肪酸的增加速度出现了大幅度的减缓, 28 d 以后, 又开始逐渐加快。尽管在灌肠后的 1 周内, 处理 L、S 和 L+S 中细菌总数、乳酸菌的数量都迅速增加到了 10<sup>8</sup> cfu/g 以上, 远高于对照 C<sup>[12]</sup>, 但他们之间游离脂肪酸的含量却非常接近, 说明在此期间组织酶对脂肪水解的重要性。随着时间的进行, 对照 C 与各处理游离脂肪酸含量的差值逐渐增大, 至第 48 天, 样品中其与处理 L、S 和 L+S 的差值分别为 1 106.10、1 158.76 和 1 590.48 mg/100 g(油), 说明微生物酶对干发酵香肠中脂肪的水解也主要表现在成熟干燥的后期。

2.2 游离脂肪酸组成的变化(表 1~表 4)

从脂肪酸的组成来看, 新鲜肉馅中含量最

高的游离脂肪酸为棕榈酸 ,占了游离脂肪酸总量的 38% ~ 40% ,其次为硬脂酸和油酸 ,都为 23% ~ 24% 。成熟结束后 ,样品中的主要游离脂肪酸则变为油酸、棕榈酸和亚油酸 ,分别占了总游离脂肪酸的 41% ~ 46%、20% ~ 21% 和 15% ~ 18% 。在这一过程中 ,油酸和亚油酸的质量百分含量出现了大幅度上升 ,而硬脂酸和棕榈酸含量则出现了下降 ,说明在成熟过程中油酸和亚油酸的解离速度大于硬脂酸和棕榈酸。

图 2~图 4 显示了干发酵香肠在成熟过程中饱和游离脂肪酸( BFFA )、单不饱和游离脂肪酸( MFFA )和多不饱和脂肪酸( PFFA )占总游离脂肪酸( TFFA )质量百分数的变化情况。从图 2~图 4 可以看出 ,存在于新鲜肉馅中的游离脂肪酸主要为饱和脂肪酸 ,占了总量的 60% 以上 ,而多不饱和脂肪酸的含量却非常低 ,只占总量的 10% 以下。随着发酵香肠成熟干燥的进行 ,饱和脂肪酸的相对含量逐渐下降 ,不饱和脂肪酸的相对含量逐渐上升。在 48 d 的样品中 ,单不饱和脂肪酸的相对含量超过了饱和脂肪酸而成为了主要的游离脂肪酸种类。多不饱和脂肪酸的相对含量也上升了 10% 以上。这说明干发酵香肠在成熟过程中不饱和脂肪酸的解离速率大于饱和脂肪酸。表 5 列出了干发酵香肠在成熟过程中游离脂肪酸的解离程度 ,即 48 d 样品中游离脂肪酸含量与新鲜肉馅中游离脂肪酸含量的比值 ,从中可以更进一步看出游离脂肪酸的相对解离速度为多不饱和脂肪酸 > 单饱和脂肪酸 > 饱和脂肪酸。

从图 2~图 4 还可以看出 ,除第 7 天对照 C 与其他 3 个处理在饱和脂肪酸的相对含量上存在一定的差异外 ,在整个成熟过程中 4 个处理游离脂肪酸相对含量的变化非常相似 ,即游离脂肪酸具有相同的变化模式 ,这也说明了肉和脂肪组织酶可能在脂肪的水解过程中起着主要的作用。

值得指出的是 ,无论是从绝对增加量( 表 1 ~ 表 4 ) 还是相对增加倍数( 表 5 ) ,油酸在干发酵香肠成熟过程中的增加量都非常大 ,在 C、L、

表 1 处理 C 中游离脂肪酸的变化 mg/100 g ( 油 )

	0 d	7 d	14 d	28 d	48 d
C <sub>14:0</sub>	11.31	24.47	22.94	36.28	73.31
C <sub>14:1</sub>	5.14	4.64	2.52	7.56	7.90
C <sub>16:0</sub>	192.35	396.38	280.15	414.84	881.08
C <sub>16:1</sub>	8.70	32.36	37.47	64.01	124.71
C <sub>18:0</sub>	119.40	304.35	175.79	245.70	462.52
C <sub>18:1</sub>	116.10	478.52	593.64	924.50	1818.26
C <sub>18:2</sub>	34.58	174.85	233.07	379.05	796.02
C <sub>18:3</sub>	3.56	18.11	21.76	34.12	72.33
C <sub>20:0</sub>	0.00	4.08	2.56	3.23	5.68
C <sub>20:1</sub>	2.26	13.13	18.33	28.78	56.41
C <sub>20:2</sub>	0.71	12.34	1.33	24.02	50.03
C <sub>20:3</sub>	1.19	25.06	30.24	53.26	105.09
C <sub>20:4</sub>	3.92	7.11	2.66	9.32	17.39
Tot	499.22	1495.39	1422.46	2224.68	4470.72

表 2 处理 L 中游离脂肪酸的变化 mg/100 g ( 油 )

	0 d	7 d	14 d	28 d	48 d
C <sub>14:0</sub>	11.53	25.11	3.16	2.82	42.56
C <sub>14:1</sub>	5.05	5.62	4.53	4.00	5.00
C <sub>16:0</sub>	199.05	297.93	374.15	578.23	1127.39
C <sub>16:1</sub>	7.90	37.90	46.03	75.65	143.41
C <sub>18:0</sub>	118.53	205.57	243.02	336.02	513.00
C <sub>18:1</sub>	120.08	597.24	775.03	1308.90	2546.87
C <sub>18:2</sub>	31.37	229.60	305.25	516.73	908.09
C <sub>18:3</sub>	3.86	17.93	23.46	34.96	62.36
C <sub>20:0</sub>	1.22	3.53	4.61	3.43	7.79
C <sub>20:1</sub>	2.05	17.91	24.63	43.15	72.28
C <sub>20:2</sub>	0.73	5.99	10.73	27.89	46.83
C <sub>20:3</sub>	0.54	26.73	33.35	48.59	88.84
C <sub>20:4</sub>	3.89	6.08	4.87	7.37	12.41
Tot	505.82	1477.14	1852.85	2987.74	5576.82

表 3 处理 S 中游离脂肪酸的变化 mg/100 g ( 油 )

	0 d	7 d	14 d	28 d	48 d
C <sub>14:0</sub>	11.01	29.21	29.18	51.91	87.06
C <sub>14:1</sub>	3.98	6.97	4.13	5.83	6.32
C <sub>16:0</sub>	191.66	370.90	346.41	650.77	1100.68
C <sub>16:1</sub>	8.74	41.74	46.18	85.46	147.13
C <sub>18:0</sub>	119.80	247.50	214.49	403.21	534.29
C <sub>18:1</sub>	118.56	637.76	743.73	1440.98	2505.96
C <sub>18:2</sub>	35.71	262.13	297.71	587.56	954.57
C <sub>18:3</sub>	3.10	23.36	22.90	39.30	59.64
C <sub>20:0</sub>	0.00	2.32	3.41	6.27	6.09
C <sub>20:1</sub>	1.15	19.36	22.99	47.41	54.26
C <sub>20:2</sub>	0.77	16.79	16.36	33.47	51.07
C <sub>20:3</sub>	1.17	55.63	41.11	81.34	110.17
C <sub>20:4</sub>	3.98	8.31	7.10	9.19	12.22
Tot	499.64	1721.97	1795.70	3442.70	5629.48

表 4 处理 L+S 中游离脂肪酸的变化 mg/100 g (油)

	0 d	7 d	14 d	28 d	48 d
C <sub>14:0</sub>	10.87	23.20	34.23	41.03	92.57
C <sub>14:1</sub>	3.46	6.77	5.43	4.67	5.64
C <sub>16:0</sub>	199.52	331.74	456.53	551.58	1278.48
C <sub>16:1</sub>	8.93	37.30	55.65	72.43	167.19
C <sub>18:0</sub>	118.80	225.62	300.22	321.51	575.47
C <sub>18:1</sub>	118.80	554.96	909.94	1236.26	2724.65
C <sub>18:2</sub>	35.44	216.10	345.09	464.10	927.67
C <sub>18:3</sub>	3.21	12.88	20.54	25.24	49.47
C <sub>20:0</sub>	0.00	5.30	5.10	4.90	7.52
C <sub>20:1</sub>	1.99	17.95	28.35	39.97	75.17
C <sub>20:2</sub>	0.67	16.71	22.67	28.10	49.42
C <sub>20:3</sub>	1.21	64.51	41.58	52.38	95.77
C <sub>20:4</sub>	3.89	5.81	8.19	8.44	12.16
Tot	506.78	1518.86	2233.51	2850.60	6061.20

表 5 干发酵香肠在成熟过程中游离脂肪酸的解离程度(倍)

	C	L	S	L+S
C <sub>14:0</sub>	6.48	3.69	7.91	8.52
C <sub>14:1</sub>	1.54	0.99	1.59	1.63
C <sub>16:0</sub>	4.58	5.66	5.74	6.41
C <sub>16:1</sub>	14.33	18.15	16.83	18.72
C <sub>18:0</sub>	3.87	4.33	4.46	4.84
C <sub>18:1</sub>	15.66	21.21	21.14	22.93
C <sub>18:2</sub>	23.02	28.95	26.73	26.18
C <sub>18:3</sub>	20.32	16.16	19.24	15.41
C <sub>20:0</sub>	-	6.39	-	-
C <sub>20:1</sub>	24.96	35.26	47.18	37.77
C <sub>20:2</sub>	70.46	64.15	66.32	73.76
C <sub>20:3</sub>	88.31	164.52	94.16	79.15
C <sub>20:4</sub>	4.44	3.19	3.07	3.13
SFFA	4.40	5.12	5.36	5.94
MFFA	15.18	20.49	20.49	22.32
PFFA	23.68	27.69	26.55	25.54
Tot	8.96	11.03	11.27	11.96

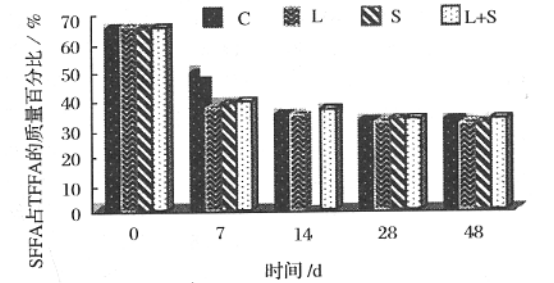


图 2 各处理在成熟过程中饱和脂肪酸质量百分含量的变化

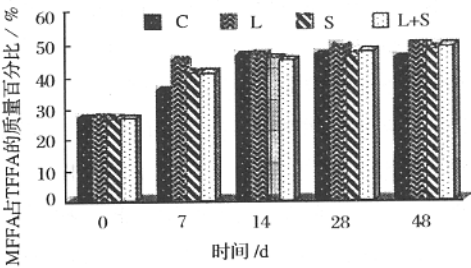


图 3 各处理在成熟过程中单不饱和脂肪酸质量百分含量的变化

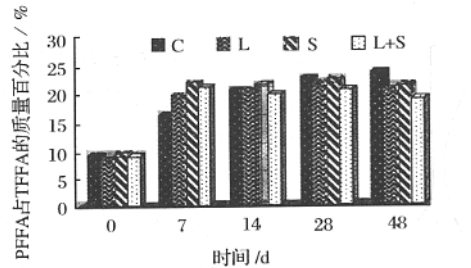


图 4 各处理在成熟过程中多不饱和脂肪酸质量百分含量的变化

S 和 L + S 四个处理中分别为 1 702.16、2 426.79、2 387.4、2 605.85 mg/100 g 油和 14.66、20.21、20.14、21.93 倍。游离棕榈酸虽然在新鲜肉馅中含量很高,但它增加的倍数却低。这是因为油酸主要位于甘油三酯的 sn-1 和 sn-3 位置,而棕榈酸则主要位于甘油三酯的 sn-2 位置,由于空间的阻碍作用,脂肪酶更易于攻击 sn-1 和 sn-3 位置的油酸,而相对要难于作用 sn-2 位置的棕榈酸,因此,使得油酸更易于从甘油三酯上水解下来<sup>[14,15]</sup>。

3 结 论

(1)在发酵香肠原料肉中,游离脂肪酸主要为饱和脂肪酸,而在成熟的发酵香肠中则主要为不饱和脂肪酸。发酵香肠在成熟过程中游离脂肪酸的相对释放速率为:多不饱和脂肪酸>单饱和脂肪酸>饱和脂肪酸。

(2)发酵剂具有微弱水解脂肪的能力,能提高发酵香肠中游离脂肪酸的含量。但微生物对脂肪的水解主要在发酵香肠成熟干燥的后期,在灌肠后的 1 周内,脂肪的水解主要是组织酶引起的。微生物对脂肪的水解能力相对肉和脂

肪组织酶来说要小得多。

### 参 考 文 献

- Berger R ,Macku C ,Geerman G et al. Isolation and identification of dry salami volatiles[ J ]. Journal of Food Science ,1990 ,55 :1239~1242
- Garcia C ,Berdague J J ,Antequera T et al. Volatile compounds of dry cured Iberian ham[ J ]. Food Chemistry ,1991 ,41 :23~32
- Lopez M O , de la Hoz I ,Cambero M I et al. Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs[ J ]. Meat Science ,1992 ,31 :267~277
- Meynier , Novelli E ,Chizzolini R et al. Volatile compounds of commercial Milano salami[ J ]. Meat Science ,1999 ,51 :175~183
- Berdague J L ,Monteil P , Montel M C et al. Effects of starter culture on the formation of flavour compounds in dry sausage[ J ]. Meat Science ,1993 ,35 :275~287
- Viallon C ,Berdague J L ,Montel M C et al. The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage[ J ]. Food Research International ,1996 ,29 :667~674
- Demeyer D ,Hoozee J ,Mesdom H. Specificity of lipolysis during dry sausage ripening[ J ]. Journal of Food Science ,1974 ,39 :293~296
- Hammes W P ,Rolz I ,Bantleon A. Mikrobiologische Untersuchung der auf dem deutschen Markt vorhandenen Starterkulturpräparate für die Rohwurstreifung[ J ]. Fleischwirtschaft ,1985 ,65 :729~734
- Comi G ,Citterio B ,Manzano M et al. Evaluation and characterization of Micrococcaceae strains in Italian dry fermented sausages[ J ]. Fleischwirtschaft ,1992 ,72 :1679~1683
- Talon R ,Montel M C ,Cantonnet M. Lipolysis activity of Micrococcaceae. In :Proceeding of the 38th International conference of Meat Science and Technology[ M ]. France :Clermont – Ferrand ,1992 ,4 :843~846
- Garcia M L ,Selgas M D ,Fernandez M et al. Microorganisms and lipolysis in the ripening of dry fermented sausages[ J ]. International Journal of Food Science and Technology ,1992 ,27 :675~682
- 傅樱花 ,马长伟. 阴离子交换树脂及气相色谱法测定腊肉中的游离脂肪酸[ J ]. 食品科技 ,2003( 3 ) :26~29
- 日本食品工业学会. 食品分析方法[ M ]. 成都 :四川科技出版社,1986
- 蔡华珍 ,马长伟 ,闫红 ,刘明省. 广式香肠烘烤过程中游离脂肪酸的变化研究[ J ]. 食品与发酵工业 ,2001( 6 ) :25~30.
- Emanuela Zanardi , Sergio Ghidini , Alessandra Battaglia et al. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants[ J ]. Meat Science ,2004 ,66 :415~423

## The Effect of Starter Culture and Meat Endogenous Enzyme on the Free Fatty Acids

Shen Qingwu    Li Pinglan

( College of Food Science & Nutritional Engineering ,China Agricultural University ,Beijing ,100083 )

**ABSTRACT** The role of the starter culture and meat endogenous enzyme on the free fatty acids was studied. Four batches of dry fermented sausages were prepared. The control batch was manufactured with antimicrobial and without microbial inoculation. The other three batches were manufactured with *P. pentosaceus* or *S. xylosus* or *P. pentosaceus* and *S. xylosus*. The results indicate that the lipolysis in dry fermented sausages during ripening was mainly brought about by meat endogenous lipase especially in the first week after formulation. Increment of free fatty acids can be solely attributed to endogenous lipase. The addition of starter culture can not change the pattern of free fatty acids too.

**Key words** dry fermented sausages , meat endogenous lipase , starter culture , free fatty acids