

发酵剂对熏马肠脂肪氧化的影响*

王静云,卢士玲,王庆玲

(石河子大学 食品学院,新疆 石河子,832000)

摘 要 通过对熏马肠发酵成熟过程中的过氧化值、硫代巴比妥酸值、双烯值、脂肪氧合酶活力(LOX)、超氧化物歧化酶活力(SOD)和过氧化氢酶活力(CAT)等指标的测定,研究发酵剂对熏马肠发酵成熟过程中的脂质氧化、氧化酶和抗氧化酶活力的影响。结果表明:与对照组相比较,发酵剂可以显著抑制脂质氧化和 LOX 活力,且显著提高 SOD 和 CAT 活力。通过相关性分析表明,发酵剂组的 LOX 活力与过氧化值、硫代巴比妥酸值和双烯值这 3 个氧化指标呈不显著负相关,相关系数为 0.089~0.427。SOD 和 CAT 活力与 3 个氧化指标呈显著、极显著负相关,相关系数为 0.684~0.970。

关键词 熏马肠;发酵剂;脂肪

熏马肠是一种具有民族特色的食品,但在传统的加工过程中,大多采用高盐量来延长保质期。面对产品质量不稳定,微生物控制技术成为了现在的热点,通过添加发酵剂调控其发酵成熟过程,以此来提高熏马肠的质量安全^[1]。

在熏马肠的发酵成熟过程中脂质氧化是其主要的生化反应过程,对风味物质的产生具有特殊的贡献。脂质氧化除了直接产生风味化合物外,氧化产物还可以进一步参与美拉德反应,形成大量的风味物质^[2]。适度的氧化将会增加产品的风味,过度的氧化会导致产品的腐败,因此脂质氧化在熏马肠的风味形成和质量控制中具有重要作用。脂质氧化分为酶和非酶氧化 2 种机制,酶氧化指在脂肪氧合酶作用下的氧化^[3]。另外肌肉中还含有一些内源抗氧化酶,主要包括过氧化氢酶,超氧化物歧化酶。过氧化氢酶可以清除氧化过程中出现的 H_2O_2 ,超氧化物歧化酶可以清除氧化过程中产生的自由基,起到抑制脂质氧化的作用^[4]。本文主要将清酒乳杆菌和木糖葡萄糖球菌的混合商业发酵剂加入到熏马肠中,其中清酒乳杆菌和木糖葡萄糖球菌可以产生过氧化氢酶,分解熏马肠加工过程中产生的大量 H_2O_2 ,预防熏马肠的腐败变质并且保护其色泽。通过测定脂肪氧化指标,脂

肪氧合酶活力,过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的变化,探究发酵剂对熏马肠脂肪氧化过程的影响,对了解和掌握熏马肠发酵成熟过程中脂质氧化的特点和风味形成控制具有重要意义。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 原辅材料及菌株

原辅材料:马肉(瘦肥比例为 3:1)、食盐、白糖、亚硝酸盐、胡椒粉、花椒粉、姜粉、味精、五香粉、八角等。

发酵剂:清酒乳杆菌和木糖葡萄糖球菌的混合商业发酵剂(发酵剂 SM-194),购于丹麦科汉森有限公司。

1.1.2 实验试剂

氯仿、冰乙酸、KI、 $Na_2S_2O_3$ 、淀粉指示液、三氯乙酸、EDTA、硫代巴比妥酸、环己烷、磷酸缓冲液、DTT、亚油酸、吐温-20、NaOH、柠檬酸、 H_2O_2 、焦酚等,均为分析纯。

1.1.3 主要仪器

旋转蒸发仪、紫外分光光度计、高速匀浆机、冷冻离心机、快速恒温数显水箱等。

1.2 实验方法

1.2.1 熏马肠制作的主要工艺

原料肉处理 → $\left\{ \begin{array}{l} \text{肥肉 25\%} \rightarrow \text{切丁} \\ \text{瘦肉 75\%} \rightarrow \text{绞碎} \end{array} \right\} \xrightarrow{\text{配料、烟熏液}}$

腌制(4℃,1d) → 接种发酵剂 → 灌入肠衣 → 发酵

第一作者:硕士研究生(卢士玲副教授为通讯作者,E-mail:2907526950@qq.com)。

*熏马肠中生物胺产生和累积机理的研究(项目编号:31160329);产胺氧化酶发酵剂对新疆熏马肠中生物胺影响及其作用机制(项目编号:31360392)

收稿日期:2014-11-01,改回日期:2014-12-02

((18 ± 0.5)℃, RH 85% ~ 90%, 1d) → 成熟
 { (12 ± 0.5)℃, RH 80% ~ 85%, 5d
 { (12 ± 0.5)℃, RH 75% ~ 80%, 7d
 { (12 ± 0.5)℃, RH 70% ~ 75%, 14d

1.2.1.1 工艺要点

选用新鲜的马肉,去除骨,筋,腱,用 40℃ 的水进行清洗,然后将瘦肉和肥肉分开,肥肉切成丁,瘦肉用绞肉机绞碎,且瘦肉与肥肉按 3:1 进行混合。配料中食盐的添加量为 2.5%,白糖的添加量为 2%,其他辅料有胡椒粉、花椒粉、姜粉、味精、五香粉和八角,添加量全为 0.1%。烟熏液的添加量为 0.5%。商业混合发酵剂提前用灭菌的生理盐水进行活化,发酵剂的接种量为 10⁶ CFU/g。

1.2.1.2 取样

本实验共分 2 组,第 1 组为空白组,不接种发酵剂。第 2 组为发酵剂组,接种了混合发酵剂。分别在第 0、2、7、14、21、28 天取样,在 -20℃ 下贮藏,进行各个指标的测定。

1.2.2 氧化指标的测定

1.2.2.1 总脂肪的提取

参考 Folch^[5] 等的测定方法。

1.2.2.2 过氧化值(POV)的测定^[6]

取上述抽提所得的脂肪按 GB/T5009.37 - 2003 测定。

1.2.2.3 硫代巴比妥酸(TBARS)的测定

参考 Mielche^[7]、salih^[8] 等的测定方法。

1.2.2.4 双烯值的测定

参考 Folch^[5] 等的测定方法。

1.2.3 酶活力的测定方法

参考 Gata^[9]、Hernández^[10]、Aebi^[11]、Gatellier^[12]

等方法。

1.2.3.1 粗酶的提取^[9]

1.2.3.2 脂肪氧合酶活力的测定^[10]

1.2.3.3 过氧化氢酶活力的测定^[11]

1.2.3.4 超氧化物歧化酶活力的测定^[12]

1.2.4 数据处理方法

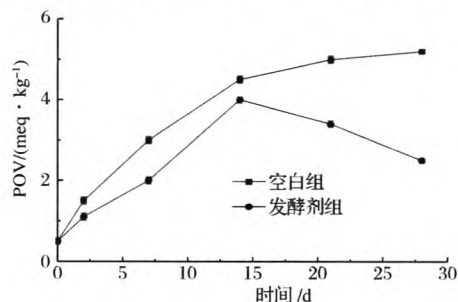
采用 SPSS 17.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 熏马肠发酵成熟过程中过氧化值(POV)的变化

POV 值主要是评价熏马肠发酵成熟过程中初级产物 H₂O₂ 的含量,用来表征熏马肠中脂质的一级氧

化程度,过氧化值高代表熏马肠脂质氧化的中间产物积累得多。如图 1 所示,两组熏马肠的过氧化值的含量差异性显著($P < 0.05$),且空白组熏马肠中的过氧化值的含量高于发酵剂组。首先就两组熏马肠的水分含量变化而言,因水分在不断地蒸发,导致水分含量一直处于下降的趋势,且两组熏马肠中水分含量变化差异性不显著($P > 0.05$),这说明除了水分浓缩效应外,发酵剂可以进一步促进熏马肠中脂质氢过氧化物的氧化分解,从而降低最终产品中的过氧化值。从一方面可以提高产品的安全性,在另一方面有利于风味化合物的形成,可以显著提高产品的风味^[13]。在空白组中 POV 值一直呈现上升的趋势,在 28d 时达到最高含量,这说明氢过氧化物的生成速度远远大于它的降解速率。而发酵剂组在 14d 时过氧化值达到最高,之后一直处于下降的趋势,这个可能因为在此阶段氢过氧化物大量分解成小分子的物质。发酵剂组的熏马肠中 POV 值的变化趋势与 Fanco^[14] 等研究的西班牙的传统香肠加工过程中变化趋势相似。



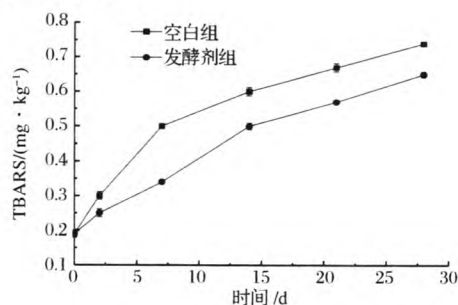
横坐标的 0~30 表示:加工第 0、2、7、14、21、28 天
 图 1 熏马肠发酵成熟过程中过氧化值含量的变化

Fig. 1 Changes of peroxide value during the ripening of smoked horse sausages

2.2 熏马肠发酵成熟过程中硫代巴比妥酸值(TBARS)的变化

TBARS 值指熏马肠发酵成熟过程中丙二醛的含量,它是不饱和脂肪酸被氧化所产生的,可以通过与硫代巴比妥酸在一定条件下反应从而进行定量。TBARS 值代表熏马肠脂质二级氧化产物的含量。如图 2 所示,两组差异性显著($P < 0.05$),两组的 TBARS 值都呈上升的趋势,且空白组熏马肠中的 TBARS 值含量显著高于发酵剂组($P < 0.05$)。而两组熏马肠中水分含量的变化差异性不显著($P > 0.05$),表明除了水分浓缩效应外,发酵剂组的脂质二次氧化程度显著低于空白组,发酵剂在一定程度上可以抑制脂质二次氧化。徐为民^[15]等研究南京板鸭

生产过程中的 TBARS 值呈总体上升的变化趋势与本实验结果相似。



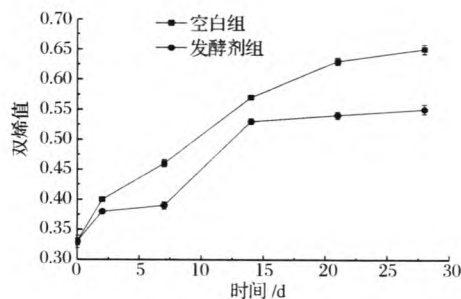
横坐标的 0~30 表示同图 1

图 2 熏马肠发酵成熟过程中 TBARS 含量的变化

Fig. 2 Changes of TBARS value during the ripening of smoked horse sausages

2.3 熏马肠发酵成熟过程中双烯值的变化

双烯值反映不饱和脂肪酸氧化初始形成的共轭双键的个数。如图 3 所知,两组呈现显著性差异 ($P < 0.05$),双烯值在熏马肠发酵成熟过程中总体呈上升的趋势,空白组熏马肠中的双烯值含量高于发酵剂组。而两组熏马肠中水分含量的变化差异性不显著 ($P > 0.05$),说明除了水分浓缩效应以外,发酵剂在一定程度上抑制了不饱和脂肪酸的初始氧化。空白组的双烯值在成熟阶段 (2~28d) 呈显著增大趋势 ($P < 0.05$),这可能是因为双烯值作为氧化产物的中间体,在原料和发酵阶段 (0~2d) 与氧气接触较少,在成熟阶段 (2~28d) 与氧气大量接触发生氧化作用,生成更多更加稳定的醛和酮。而发酵剂组的双烯值含量在成熟后期的 14~28d 时基本保持不变,表明在此阶段中间产物的生成速率基本接近于它的分解速率。



横坐标的 0~30 表示同图 1

图 3 熏马肠发酵成熟过程中双烯值含量的变化

Fig. 3 Changes of dienes value during the ripening of smoked horse sausages

2.4 熏马肠发酵成熟过程中脂肪氧化酶 (LOX) 活

力的变化

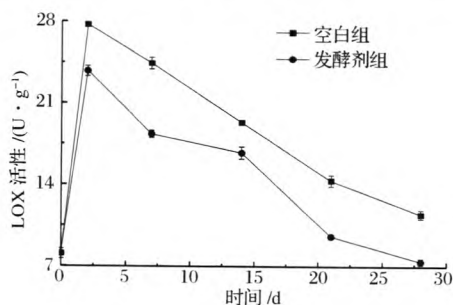
两组熏马肠发酵成熟过程中脂肪氧化酶的活力变化如图 4 所示,发酵剂组和空白组的脂肪氧化酶的活力具有显著性差异 ($P < 0.05$),发酵剂组的脂肪氧化酶的活力显著低于空白组,说明发酵剂可以抑制脂肪氧化酶的活力。

发酵剂组的熏马肠中脂肪氧化酶的活力在原料到发酵结束 (第 2 天) 时,显著地升高 ($P < 0.05$),且在第 2 天时达到最大值。造成这种现象的原因首先是因为 LOX 是非血红素铁蛋白,它的活性与铁离子的存在形式有着密切的关系,铁离子只有表现为三价,该酶才能被激活表现出活性。由于原料中的铁离子由二价状态存在,导致 LOX 处在非激活的状态,此时表现的活性很低。Stanffer^[16] 和 Kühn^[17] 认为铁离子的转变需要在少量氢过氧化物的作用下进行,而腌制发酵 (0~2 d) 时熏马肠中的过氧化值含量开始上升,促进了铁离子的转变。其次,动物体内的酶最适温度一般在 35~45℃,而熏马肠的发酵温度 18℃ 大于成熟阶段 (2~28d) 的温度,当温度低于最适温度时,温度升高可以提高酶的活力。最后因为 Gata^[9] 等对 Iberian 火腿原料股二头肌中的 LOX 进行研究,得出其最适 pH 为 5.5。熏马肠在 0~2d 时的 pH 与此最接近,在此过程中 pH 由 5.61 降到了 5.02,在随后的加工过程中,pH 值一直低于 5。综上所述该酶活力在熏马肠的发酵成熟过程中表现出了一定的滞后性。随后在 2~28d 时脂肪氧化酶活力开始呈显著下降的趋势 ($P < 0.05$),这个可能因为在熏马肠的成熟过程中,细胞逐渐遭到了破坏,释放出了蛋白酶,它对于 LOX 起到了破坏的作用。另外随着熏马肠成熟的进行,水分含量在不断减少带来的盐浓缩效应也会破坏 LOX。发酵剂组中 LOX 活力的变化趋势与靳国峰^[18] 等研究培根加工过程中变化趋势相类似。

2.5 熏马肠发酵成熟过程中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的变化

发酵剂组和空白组的熏马肠发酵成熟过程中超氧化物歧化酶的活力变化如图 5 所示,两组的差异性显著 ($P < 0.05$)。且发酵剂组熏马肠中的 SOD 活力高于空白组,这说明发酵剂可以提高 SOD 活力。对发酵剂组的酶活进行差异性分析,发现在 0~14 d 时酶活显著下降 ($P < 0.05$),14~28 d 时酶活无显著性差异 ($P > 0.05$)。

两组中该酶活的变化趋势相似,都是在原料中活力最高,随着发酵成熟的进行,该酶活一直处于下降

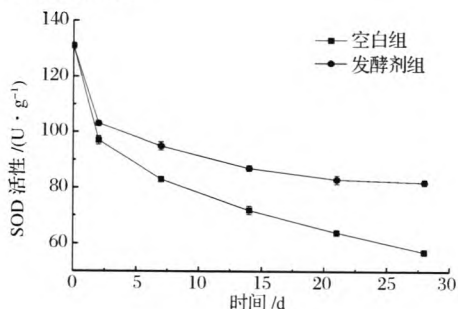


横坐标的 0~30 表示同图 1

图 4 熏马肠发酵成熟过程中 LOX 活性的变化

Fig. 4 Changes of LOX activity value during the ripening of smoked horse sausages

的趋势。尽管 SOD 活力随发酵成熟过程在降低,但是在成熟结束时该酶仍然保持一定的活力,所以该酶在整个发酵成熟过程中均起作用。就发酵组而言,熏马肠成熟结束时,SOD 活性下降了 37.4%。该实验结果与孙为正^[2]等研究广式腊肠加工生产过程中 SOD 活性变化相比较,得知在该实验中酶活下降幅度较大,可能是因为所用原料不同和熏马肠的成熟周期较长所造成的。



横坐标的 0~30 表示同图 1

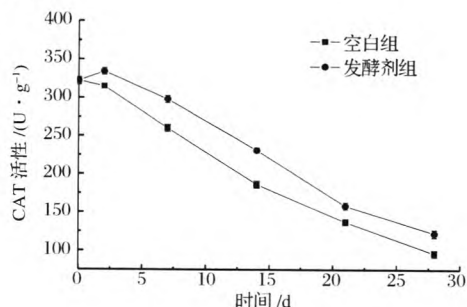
图 5 熏马肠发酵成熟过程中 SOD 活性的变化

Fig. 5 Changes of SOD activity during the ripening of smoked horse sausages

2.6 熏马肠发酵成熟过程中过氧化氢酶 (CAT) 活力的变化

图 6 显示了两组熏马肠发酵成熟过程中过氧化氢酶活力的变化情况。两组之间的酶活差异显著 ($P < 0.05$), 且发酵剂组高于空白组, 说明发酵剂可以提高过氧化氢酶的活力。就发酵剂组而言, 从原料到发酵结束 (0~2d) 时过氧化氢酶活力有上升的趋势, 造成这种现象的主要原因是在此阶段加入了发酵剂, 发酵剂可以产生过氧化氢酶。另外发酵温度 (18℃) 相比成熟阶段 2~28d 的温度 (12℃) 要高, 温度对 CAT 具有一定的促进作用。在 2~28d 时该酶活一直

呈现下降的趋势, 主要是因为熏马肠在发酵成熟过程中水分在不断地散失, 从而引发盐分含量的升高, 靳国峰^[19]等研究结果表明盐量升高对抗氧化酶具有抑制的作用。



横坐标的 0~30 表示同图 1

图 6 熏马肠发酵成熟过程中 CAT 活性的变化

Fig. 6 Changes of CAT activity during the ripening of smoked horse sausages

2.7 发酵剂组熏马肠发酵成熟过程中各酶活力与氧化指标之间相关性分析

熏马肠中氧化酶和抗氧化酶与主要氧化指标之间的相关性分析如表 1 所示, LOX 活力与 POV 值, TBARS 值和双烯值呈不显著负相关性, 相关系数为 0.089~0.427。相关系数很低, 可以认为熏马肠成熟过程中氧化作用更主要受自动氧化的影响, 酶氧化并不占主导作用。脂肪氧合酶顾名思义是要促进脂肪氧化, 应该与氧化指标呈正相关性, 本实验结果与理论相反, 主要是因为熏马肠脂质氧化过程中会产生大量的氢过氧化物, 它会和脂肪酸底物对活性的 LOX 进行竞争性结合, 当氢过氧化物与之结合后会抑制其活力, 另外它可以促使硫基氧化, 而硫基对 LOX 活力具有很重要的作用。其次, Kuninori^[19]等研究发现, 氢过氧化物还能够进一步氧化分解, 生成直链醇类化合物, 它也是通过竞争性来抑制 LOX 活力。SOD 活力和 CAT 活力与 POV 值, TBARS 值和双烯值呈显著、极显著负相关性, 与 Lee^[20]和 Hernández^[10]的研究结果相类似。这 2 种抗氧化酶活力与 3 种氧化指标相关系数为 0.684~0.970, 且这 2 种抗氧化酶活力与 TBARS 值的相关性系数大于其与 POV 值的相关性, 这一结果表明熏马肠发酵成熟过程中抗氧化酶对抑制脂质二次氧化起到了非常重要的作用, 可以在一定程度上控制抗氧化酶的活力从而对脂质的二次氧化进行调控。

表1 发酵剂组熏马肠发酵成熟过程中各种指标的相关性

Table1 Relativity analyzing indexes of starter culture group during the ripening of smoked horse sausages

	POV 值	TBARS 值	双烯值	LOX 活力	SOD 活力	CAT 活力
POV 值	1					
TBARS 值	0.804 *	1				
双烯值	0.885 **	0.973 **	1			
LOX 活力	-0.089	-0.427	-0.333	1		
SOD 活力	-0.836 *	-0.880 *	-0.880 *	-0.029	1	
CAT 活力	-0.684 **	-0.970 **	-0.922 **	0.611	0.758 *	1

注: ** 表示相关性分析 $P < 0.01$, * 表示相关性分析 $P < 0.05$ 。

3 结论

(1) 在熏马肠的发酵成熟过程中, 对照组过氧化值, 硫代巴比妥酸值, 双烯值呈上升的趋势, 发酵剂组中的氧化指标有升有降, 但总体上含量都显著低于空白组 ($P < 0.05$), 说明发酵剂可以抑制脂质氧化。

(2) 在熏马肠的发酵成熟过程中, 脂肪氧合酶活力呈先上升再下降的趋势, 且发酵剂组中的脂肪氧合酶活力显著低于空白组 ($P < 0.05$)。说明发酵剂可以抑制脂肪氧合酶的活力。通过相关性分析, 发酵剂组的脂肪氧合酶活力与过氧化值, 硫代巴比妥酸值, 双烯值呈不显著负相关, 相关系数为 $0.089 \sim 0.427$, 相关系数很低, 表明酶氧化在熏马肠发酵成熟过程中不占主导作用。

(3) 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力在熏马肠发酵成熟过程中总体呈下降趋势, 且发酵剂组的这 2 种抗氧化酶活力显著高于空白组 ($P < 0.05$), 说明发酵剂可以提高超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活力。通过相关性分析, 这 2 种酶活力都与 POV 值, TBARS 值, 双烯值呈显著、极显著负相关, 相关系数为 $0.684 \sim 0.970$ 。

参 考 文 献

- [1] 韩鲜娜, 卢士玲, 李开雄. 发酵剂对熏马肠成熟过程中蛋白质降解的影响[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 215-219.
- [2] 孙为正. 广式腊肠加工过程中脂质水解、蛋白降解及风味成分变化研究[D]. 广东: 华南理工大学, 2011: 45-76.
- [3] Fennema O R 著. 食品化学[M]. 王璋, 许时婴译. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 302-346.
- [4] 靳国锋. 干腌培根加工过程中脂质氧化调控机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 36-42.
- [5] Folch J, Lees M, Stanley G H S. A sample method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue [J]. Journal of Biological Chemistry, 1957, 226(1): 497-509.
- [6] GB/T 5009.37-2003. 食用植物油卫生标准的分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [7] Mielche M B, Aaby K. Quality of comminuted sausage formulated from mechanically deboned poultry meat [J]. Meat Science, 2002, 61(1): 73-84.
- [8] Salih A M, Smith D W, Price J F, et al. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry [J]. Poultry Science, 1987, 66(9): 1483-1488.
- [9] Gata J, Pinto M, Macias P. Lipoygenase activity in pig muscle: Purification and partial characterization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(9): 2573-2577.
- [10] Hernández P, Zomeño L, Ariño B, et al. Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes [J]. Meat Science, 2004, 66(3): 525-529.
- [11] Aebi H E. Methods of enzymatic analysis [M]. Weinheim: Verlag chemie, 1983: 273-286.
- [12] Gatellier P, Mercier Y, Renner M. Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of charolais bovine meat [J]. Meat Science, 2004, 67(3): 385-394.
- [13] Girotti A W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems [J]. Journal of Lipid Research, 1998, 39(8): 1529-1542.
- [14] Fanco I, Prieto B, Cruz J, et al. Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry-cured pork sausage [J]. Food Chemistry, 2002, 78(3): 339-345.
- [15] 徐为民, 徐幸莲, 周光宏, 等. 南京板鸭加工过程中脂肪氧化的研究[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(4): 452-455.
- [16] Stanffer C E. Enzyme assays for food scientists [M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989: 187-207.

- [17] Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, 33(2): 154 – 172.
- [18] 靳国锋. 干腌培根加工过程中脂质氧化调控机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 36 – 42.
- [19] Kuninori T, Nishiyama J, Shirakawa M, et al. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by n-alcohols and n-alkylthiols [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipid and Lipid Metabolism*, 1992, 1125(1): 49 – 55.
- [20] Lee s k, Mei L, Decker E A. Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork[J]. *Meat Science*, 1997, 46(4): 349 – 355.

The effect of starter on lipid oxidation of smoked horse sausages

WANG Jing-yun, LU Shi-ling, WANG Qing-ling

(Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT A series of indexes including peroxide value, TBARS value, dienes value, lipoxygenase activity (LOX), superoxide dismutase activity (SOD) and catalase activity (CAT) were determined to elucidate the effect of starter on lipid oxidation, oxidase activity and antioxidant enzyme activity during the ripening of smoked horse sausages. The results indicated that starter could not only inhibit lipid oxidation and lipoxygenase activity significantly but also improve the activities of these two antioxidant enzymes (SOD and CAT) greatly. The correlation analysis showed that peroxide value, TBARS value and dienes value were not significantly negatively correlated with lipoxygenase activity in starter group ($r = 0.089 \sim 0.427$), and were significantly or very significantly negatively correlated with the activities of SOD ($r = 0.836 \sim 0.880, P < 0.05$) and CAT ($r = 0.684 \sim 0.970, P < 0.01$).

Key words smoked horse sausages; starter cultures; lipid