

如皋火腿复合发酵剂的构建*

蒋云升¹, 汪志君¹, 潘明¹, 薛党辰¹, 席军², 丁勇²

1(扬州大学旅游烹饪学院, 江苏扬州, 225001) 2(江苏长寿集团, 江苏如皋, 226500)

摘要 在单菌发酵试验基础上, 选择耳式葡萄球菌 C131、德巴利汉逊酵母 Y163、芽孢杆菌 R132 构建如皋火腿复合发酵剂, 采用四因素三水平正交试验, 以游离氨基酸(FAA)、三甲胺-氮(TMA-N)含量和 pH 值为测定指标, 建立发酵菌株的优组合。结果表明, 在发酵温度为 28~34℃, 接种量为 3×10^7 cfu/g、 3×10^7 cfu/g、 2×10^7 cfu/g 时, 火腿中的 FAA 最高, TMA-N 含量最低, 发酵效果好。

关键词 如皋火腿, 复合发酵剂, 游离氨基酸, 三甲胺-氮, 发酵特性

“如皋火腿”系中国“三大名腿”之一, 享有“北腿”美誉, 其风味独特, 深受人们喜爱。该产品已有 200 多年历史, 积累了丰富的生产经验, 但迄今为止基本沿用传统的生产方式, 生产周期长达 10 个月, 生产效益低下。在发酵剂利用上, 依靠天然微生物作用, 经过几个月的发酵才能成熟, 产品风味较难控制^[1]。专用发酵剂的构建, 对如皋火腿产业的发展显得尤为迫切, 相关研究工作在国内外尚属刚刚起步^[2]。

对如皋火腿菌群分析的研究表明, 火腿中心部位发酵前期的菌系构成为嗜盐性球菌、杆菌和酵母, 中期以球菌和酵母为主, 后期只有球菌和少量酵母分布, 发酵全过程中表面有多种霉菌生长^[3]。对其微生物生境与菌群关系的研究表明, 发酵过程中, 肉的 NaCl 含量未有变化, pH 值略有上升, A_w 渐趋下降, NaNO_2 含量略有增加^[3]。通过对如皋火腿中的产香、产鲜菌进一步进行食盐、亚硝酸盐耐受性, 蛋白酶与脂肪酶活性等系统筛选, 确定了发酵剂起始菌为耳式葡萄球菌、德巴利汉逊酵母、芽孢杆菌(未定型)^[5]。笔者的研究以这些发酵剂对腌腿肉实施人工接种、控制发酵条件, 在比较发酵特性的基础上, 拟定菌种配比, 对专用复合发酵剂进行了初步构建。

1 材料与与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 受试菌株

耳式葡萄球菌 (*S. auricularis*) C131、德巴利汉逊酵母 (*Dabaryomyces hansenii*) Y163、芽孢杆菌 (*Bacillus*) R132, 都有较好的耐盐性、耐亚硝酸盐

性, 具有蛋白酶或脂肪酶活性强, 安全无致病性特点, 由本课题组筛选保存。

1.1.2 培养基

模拟肉汤培养基: NaCl 30 g, 牛肉膏 20 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 1 g, pH 6.5, 115℃ 20 min, 供制备菌悬液与多菌复合培养试验用。

YPD 培养基: 酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 5.0~5.5, 121℃ 15 min, 供制备酵母菌注射液用。

MSA 培养基: 蛋白胨 10 g, 甘露醇 10 g, NaCl 25 g, 牛肉膏 1 g, 1 g/L 酚红溶液 25 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4, 121℃ 15 min, 供制备葡萄球菌注射液用。

5%NaCl 培养基: NaCl 50 g, 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 10 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2, 121℃ 15 min, 供制备芽孢杆菌注射液用。

1.1.3 火腿肉

参照如皋火腿配方腌制, 其流程为:

鲜腿 → 腌制 → 洗晒 → 接种发酵剂 → 发酵 → 成品。

将腌腿肉切成 1 kg 大小肉块, 供注射发酵剂用。

1.1.4 设备

PYX-DHX 型循环水式恒温培养箱, 山东潍坊医疗器械厂; 755S 型紫外可见分光光度计, 上海棱光仪器有限公司; DGF30 型电热鼓风干燥箱, 南京实验仪器厂; YXQ.SGH280 型手提式高压蒸汽灭菌锅, 上海医用核子仪器厂; SW-CJ-1F 型超净工作台, 苏州净化设备有限公司; BS2000S 型电子天平, 北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 方法

1.2.1 单菌发酵温度的选择

将 C131、Y163、R132 分别接种于 MSA、5%

第一作者: 学士, 副教授。

* 江苏省“十五”科技攻关项目(BE2005331), 扬州大学基金项目(2006XJJ17)

收稿日期: 2007-08-13

NaCl、YPD 培养基,置于 22~40℃ 不同温度下培养 48 h,于 600 nm 处测定 OD 值,设空白对照,以确定适宜的发酵温度。

1.2.2 单菌发酵试验

将受试菌株接种于模拟肉汤培养基中,在适宜温度下经活化培养,制成菌悬液,使含菌量为 1×10^7 cfu/mL 以上。采用注射法,以 1×10^7 cfu/g 接种量注入腌腿肉中^[6]。试验设 3 重复。发酵期 4 个月。发酵产物 FAA 测定,茚三酮比色法;TMA-N 测定,分光光度法;pH 值测定,酸度计-电极电位法^[7]。

1.2.3 多菌复合培养试验

将各菌株在相应液体培养基中活化 2 代,在模拟肉汤培养基中混合培养,菌种接入量均为 1×10^7 cfu/mL。以稀释平板法测定菌落数^[8],建立无拮抗关系的复配方案,供进一步做多菌发酵试验。

1.2.4 多菌复合发酵剂的构建

以 3 株菌株和空列为 4 个因素,每个因素设 3 个水平,用 $L_9(3)^4$ 正交表设计发酵试验(见表 1),发酵期 4 个月,试验设 3 重复,发酵产物测定同单菌发酵试验。在复合发酵试验基础上,确定菌株的优组合,形成复合发酵剂。

表 1 $L_9(3)^4$ 正交试验方案

试验号	因素			D 空列
	A (C131) /cfu · mL ⁻¹	B Y(163) /cfu · mL ⁻¹	C R(132) /cfu · mL ⁻¹	
1	1(0)	1(0)	1(0)	1
2	1(0)	2(1×10^7)	2(1×10^7)	2
3	1(0)	3(2×10^7)	3(2×10^7)	3
4	2(1×10^7)	1(0)	2(1×10^7)	3
5	2(1×10^7)	2(1×10^7)	3(2×10^7)	2
6	2(1×10^7)	3(2×10^7)	1(0)	1
7	3(2×10^7)	1(0)	3(2×10^7)	2
8	3(2×10^7)	2(1×10^7)	1(0)	3
9	3(2×10^7)	3(2×10^7)	2(1×10^7)	1

2 结果与分析

2.1 单菌发酵温度的确定

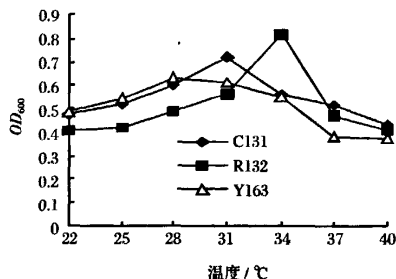


图 1 不同菌株的最适生长温度

从图 1 看出,C131 的最适生长温度为 31℃,R132 的最适生长温度为 34℃,Y163 的最适生长温度为 28℃,因此在火腿控温发酵中,选择 28~34℃ 范围较为合适。

2.2 单菌发酵试验

将受试菌株接种到腌腿中,进行单菌发酵试验,同时设空白对照,结果见表 2。

表 2 单菌发酵产品的特性

处理	FAA	TMA-N	pH 值
	/mg · (100g) ⁻¹	/mg · (100g) ⁻¹	
对照	340.2 ± 5.312d	1.25 ± 0.11b	5.91 ± 0.208c
C131	473.6 ± 7.027a	1.12 ± 0.16c	5.91 ± 0.120c
Y163	470.5 ± 4.057a	1.23 ± 0.11b	5.80 ± 0.029d
R132	377.8 ± 5.529c	1.14 ± 0.18c	6.02 ± 0.202b

注:FAA—游离氨基酸;TMA-N—三甲胺-氮。

游离氨基酸(FAA)含量的高低与产品的鲜味及营养价值有关,含量高则产品的鲜味好^[9]。由表 2 看出,菌株 C131、Y163、R132 组可以使产品中的游离氨基酸含量升高。

三甲胺-氮(TMA-N)含量的高低与产品的新鲜度有关,含量高则新鲜度低^[10]。由表 2 看出,不同菌株对 TMA-N 影响大小不同,菌株 C131、R132 组能使产品的 TMA-N 含量降低,Y163 组与对照组间无显著差异。

发酵过程中形成的有机酸类使 pH 降低及具有防腐作用,但如 pH 过低会影响口感,而当 $\text{pH} \geq 6.0$ 则较快变黏,优质火腿的 pH 为 5.8~6.2^[3]。由表 2 看出,菌株 C131 使产品 pH 值升高,菌株 Y163 使 pH 值降低,菌株 R132 组与对照组无显著差异。

综合单菌发酵特性试验结果表明,单菌发酵法不能同时满足火腿在风味、卫生、口感诸方面要求。

2.3 多菌复合培养试验

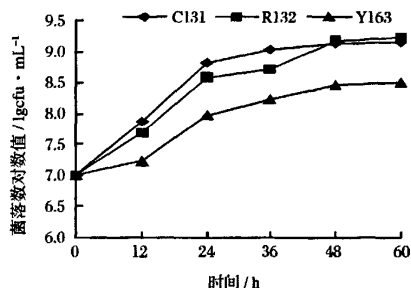


图 2 模拟肉汤培养基中不同菌株复合培养的相互关系

由图 2 看出,随着培养时间的延长,各菌株的数量都在增加,并未出现数量减少现象,表明菌株间无拮抗性,可作为复合发酵剂使用。

2.4 多菌复合发酵剂的构建

2.4.1 多菌复合发酵火腿中 FAA 含量的检测结果

表 3 多菌复合发酵火腿中 FAA 含量正交分析表

试验号	因 素				FAA 含量 /mg · (100g) ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	236
2	1	2	2	2	429
3	1	3	3	3	217.6
4	2	1	2	3	233
5	2	2	3	1	602.3
6	2	3	1	2	600.8
7	3	1	3	2	533.9
8	3	2	1	3	225.3
9	3	3	2	1	711.1
k ₁	882.6	1002.9	1062.1	1549.4	
k ₂	1436.1	1256.6	1373.1	1563.7	
k ₃	1470.3	1529.5	1353.8	1161.7	
K ₁	294.2	334.3	354.0	516.5	
K ₂	478.7	418.9	457.7	521.2	
K ₃	490.1	509.8	451.3	387.2	
R	195.9	175.8	103.7	134.0	
因素主次	A	B	D	C	
最优水平	A ₃	B ₃	—	—	

由表 3 比较 A、B、C、D 四因素 R 值的大小,可以看出 A 因素即 C131 对火腿中 FAA 含量的影响最大,其次为 B 因素即 Y163,4 因素的主次关系由小到大依次为:C→D→B→A。C 因素的 R 值小于 D 因素的 R 值,说明 C 因素对试验结果的影响不显著,故在选择最优组合时可认为 C 因素对试验结果不产生影响,所以当菌株组合为 A₃B₃ 时火腿中的游离氨基酸含量最高。这表明 C131、Y163 对火腿发酵的产香产鲜起主导作用。

2.4.2 多菌复合发酵火腿中 TMA-N 含量的检测结果

表 4 多菌复合发酵火腿中 TMA-N 含量正交分析表

试验号	因 素				TMA-N 含量 /mg · (100g) ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.29
2	1	2	2	2	1.22
3	1	3	3	3	1.38
4	2	1	2	3	1.12
5	2	2	3	1	1.23
6	2	3	1	2	1.15
7	3	1	3	2	1.35
8	3	2	1	3	1.17
9	3	3	2	1	0.86
k ₁	3.89	3.76	3.61	3.38	
k ₂	3.50	3.62	3.20	3.72	
k ₃	3.38	3.39	3.96	3.67	
K ₁	1.30	1.25	1.20	1.13	
K ₂	1.17	1.21	1.07	1.24	
K ₃	1.13	1.13	1.32	1.22	
R	0.17	0.12	0.25	0.11	
因素主次	C	A	B	D	
最优水平	A ₃	B ₃	C ₂	—	

由表 4 比较 A、B、C、D 4 因素 R 值的大小,可以看出 C 因素即 R132 对火腿 TMA-N 含量的影响最大,其次为 A 因素即 C131,4 因素的主次关系由小到大依次是:D→B→A→C。当组合菌株的配比为 A₃B₃C₂ 时,火腿中的 TMA-N 含量最低,即火腿的新鲜度最高。

三甲胺-氮是评价肉制品新鲜度的指标,我国食品卫生标准规定火腿三甲胺-氮指标值为:一级鲜度 ≤1.3 mg/100 g,二级鲜度 ≤2.5 mg/100 g。三甲胺-氮的形成与污染菌的作用等因素有关。接种经人工筛选的发酵剂,一方面使发酵菌株之间拥有良好的共生关系,另一方面通过发酵菌株的耐盐性、耐亚硝酸盐性、初始接种量等栅栏因子的作用,对外界污染菌入侵及生存产生拮抗,从而起到防腐保鲜作用。

2.4.3 多菌复合发酵火腿中 pH 值检测的结果

表 5 多菌复合发酵火腿 pH 值正交分析表

试验号	因 素				pH 值
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	5.85
2	1	2	2	2	6.03
3	1	3	3	3	6.2
4	2	1	2	3	5.81
5	2	2	3	1	6.21
6	2	3	1	2	5.82
7	3	1	3	2	5.84
8	3	2	1	3	6.07
9	3	3	2	1	5.81
K ₁	18.08	17.8	17.74	17.87	
K ₂	17.84	18.31	17.65	17.69	
K ₃	17.72	17.53	18.25	18.08	
K ₁	6.03	5.93	5.91	5.96	
K ₂	5.95	6.1	5.88	5.9	
K ₃	5.91	5.84	6.08	6.03	
R	0.12	0.26	0.2	0.13	
因素主次	B	C	D	A	
最优水平	—	B ₃	C ₂	—	

由表 5 比较 A、B、C、D 4 因素 R 值的大小,可以看出 B 因素即 Y163 对火腿 pH 的影响最大,其次为 C 因素即 R132,4 因素的主次关系由小到大依次为:A→D→C→B。A 因素的 R 值小于 D 因素的 R 值,说明 A 因素对试验结果影响不显著,故在选择最优组合时,可认为 A 因素对试验结果不产生影响,所以当菌株组合为 B₃C₂ 时,火腿 pH 值最为适宜。

2.4.4 多菌复合发酵剂的构成

综合多菌复合发酵试验与发酵特性研究结果,使用耳式葡萄球菌 C131、德巴利汉逊酵母 Y163、芽孢杆菌 R132 组成的多菌复合发酵剂,当注入量分别为

3×10^7 cfu/g、 3×10^7 cfu/g、 2×10^7 cfu/g 时,也即 3 种菌以 3:3:2 之比混合注射,在 28~34℃ 下发酵 4 个月时,形成的发酵火腿品质最好。与传统自然发酵相比,使用这种多菌复合发酵剂制成的如皋火腿具有游离氨基酸含量高,三甲胺-氮含量低,产品口感好,新鲜度高,有火腿固有的香鲜风味,且发酵周期只有自然发酵周期的 1/2 等多方面优点。

火腿在自然发酵过程中,一方面由于蛋白质、脂肪酵解或酶解产生一定量氨基酸、有机酸及其氧化分解的衍生物醇、醛、酯等,构成发酵肉制品的独特风味^[9],另一方面也会同时产生一些有害物质如胺等,影响产品的安全质量^[10]。构建复合微生物发酵剂的目的,在于通过筛选自然存在的菌株,控制菌群比例,起始菌数量,发酵条件,对自然存在的一群混杂菌群进行重新整合,既缩短火腿的生产周期,又提高其营养价值、卫生安全质量和风味品质,起到扬长避短的作用。

本文拟定的多菌复合发酵剂能否在抑制肉毒梭菌生长与减少亚硝酸盐用量方面发挥作用,有待进一步研究。

3 结 论

如皋火腿使用 C131、Y163、R132 组成的多菌复合发酵剂,当接种量之比为 3:3:2,在 28~34℃ 下进行发酵时,发酵火腿中游离氨基酸含量升高,三甲

胺-氮含量降低,产品新鲜度高,口感好,具有火腿应有的香鲜风味,且发酵周期只有自然发酵周期的 1/2,具有应用前景。

参 考 文 献

- 1 邱洪冰,张文红. 正宗中华“北腿”——如皋火腿的加工工艺[J]. 肉类研究,2007,20(2):14~16
- 2 蒋云升,潘明,汪志君,等. 如皋火腿用霉菌性表面涂膜发酵剂的应用研究[J]. 食品与发酵工业,2007,33(7):91~94
- 3 蒋云升,郭本功,席军,等. 如皋火腿微生物菌群分析[J]. 扬州大学烹饪学报,2004,21(3):10~12
- 4 蒋云升,潘明,汪志君. 火腿中葡萄球菌的分离、鉴定及其生物学特性的研究[J]. 食品研究与开发 2007,28(1):12~15
- 5 马晓燕. 牛肉发酵过程中优势微生物的分离鉴定及应用研究[D]. 河北农业大学,2004. 17~18
- 6 王秉栋. 动物性食品卫生理化检验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989. 299~301
- 7 蒋云升. 烹饪微生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007. 85~86
- 8 Lars L Hinrichsen, Susanne B Pedersen. Relationship among flavor, volatile compounds, chemical changes, and micro flora in Italian-Type dry-cured ham during processing[J]. J Agric Food Chem,1995,43(11):2 932~2 940
- 9 Bower Cids, Lzquienlo Pulido M. Mixed starter culture to control biogenic amine production in dry fermented sausages[J]. Food Prot, 2000,63(11): 1 556~1 562.

The Construction of Starter Cultures for Rugao Ham

Jiang Yunsheng¹, Wang Zhijun¹, Pan Ming¹,

Xue Dangchen¹, Xi, Jun², Ding Yong²

1(Tourism Cuisine Institute Yangzhou University Yangzhou 225001, China)

2(Jiangsu Longlife Group, Rugao 226500, China)

ABSTRACT Based on fermentation experiment of the single strain, optimum proportion of *S. auricularis*, *Dabaryomyces hansenii* and bacillus II were gained by orthogonal test $L_9(3^4)$. The result showed that the quality of ham reached its best when free amino acid was at the highest concentration and trimethylamine-N was the lowest, under the condition of the proportion of *S. auricularis*, *Dabaryomyces hansenii* and bacillus II 3:3:2, temperature between 28 and 34 °C.

Key words Rugao ham, starter culture, FAA, TMA-N, pH, fermental characteristic