

内源性发酵剂 *Macrococcus caseolyticus* 发酵广式腊肠的风味物质成分分析

吴燕涛^{1,2}, 赵谋明^{1,*}, 孙为正¹, 曹宝森²

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640;

2. 国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

摘要: 采用固相微萃取方法结合气质联用仪, 对内源性发酵剂 *Macrococcus caseolyticus* 发酵广式腊肠中风味物质成分进行测定, 分析发酵广式腊肠风味物质成分, 同时与对照组腊肠的风味物质成分进行比较, 分析 *Macrococcus caseolyticus* 对广式腊肠风味物质成分的影响。其中, 对照组分离出 22 种风味物质, 接种组 (MC) 分离出 25 种风味物质成分, 主要为醇类、醛类、酮类和酯类物质, 还有部分烃类和环类化合物。研究表明, *Macrococcus caseolyticus* 作为发酵剂, 可以加速脂肪和蛋白质的降解与氧化, 有助于广式腊肠风味的改善。

关键词: 广式腊肠, 巨球菌, 溶酪大球菌, 风味

Analysis of volatile compounds of cantonese sausage fermented by *Macrococcus caseolyticus* separated from cantonese sausage

WU Yan-tao^{1,2}, ZHAO Mou-ming^{1,*}, SUN Wei-zheng¹, CAO Bao-sen²

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. China National Food Quality Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: The volatile compounds of cantonese sausage fermented by *Macrococcus caseolyticus* (*M. caseolyticus*) were investigated. Two cantonese sausage samples were prepared: control, sausage inoculated with *M. caseolyticus* (MC). The volatile compounds were extracted by a headspace solid-phase micro-extraction (SPME) method, quantified and identified by a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A total of 22 and 25 volatile compounds were identified from the two samples respectively. Larger amount of volatile compounds (alcohols, aldehydes, ketones and esters) were detected in the sausage, in addition, amount of hydrocarbons and heterocyclic were detected. The results showed that *M. caseolyticus* could accelerate the degradation and oxidation of lipids and proteins, and improve the flavor characteristics of cantonese sausage.

Key words: cantonese sausage; *Macrococcus*; *Macrococcus caseolyticus*; volatile

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)07-0207-04

溶酪大球菌 *Macrococcus caseolyticus* (*M. caseolyticus*) 属巨球菌属, 最初由牛乳中分离得到, 牛乳、鲸和生牛肉中都有该菌生长。由于早期多从鲸表皮中分离得到, 被认为是罕见菌, 由于它与葡萄球菌很相似, 一直都归为葡萄球菌属, 但又区别于其他葡萄球菌, 在 1988 年与其它几个菌种被划分为一个新的属 *Macrococcus*, *M. caseolyticus* 是该种属中最典型的菌种^[1]。目前市售该发酵剂的分离基物主要为国外火腿。本项目组首次从我国传统肉制品广式腊肠中分

离得到 *M. caseolyticus*, 并对其发酵特性进行了详细研究, 发现该菌种具有脂肪分解活性与蛋白分解活性, 并可以耐受一定浓度的食盐, 具有亚硝酸盐分解能力, 与文献报道结果一致。本研究将分离自广式腊肠的内源性 *M. caseolyticus* 用于广式腊肠的发酵生产, 接种量为 1%, 浓度为 10⁶ CFU/g。采用固相微萃取与气质联机的方法对腊肠中的风味物质成分进行测定, 以分析 *M. caseolyticus* 对广式腊肠风味的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 *Macrococcus caseolyticus* (*M. caseolyticus*) 本课题组自行分离; 瘦肉、肥肉、白砂糖、味精、曲酒 均购自当地超市; 实验中所用试剂 均为国产分析纯。

MM12 型绞肉机 广东省韶关市食品机械厂; DS-1 高速组织捣碎机 上海标本模型厂; 101-3A 型数显电热鼓风干燥箱 上海浦东跃欣科学仪器

收稿日期: 2010-04-19 * 通讯联系人

作者简介: 吴燕涛 (1981-), 女, 博士, 工程师, 研究方向: 食品生物技术。

基金项目: 粤港关键领域突破项目 (2005A20303002); 2006 年省部产学研、研结合专项资金项目 (2006D90202001); 广东省食品工业公共实验室开放课题 (FIPL05001)。

厂; SPME 手动进样手柄 美国 Supelco 公司; DVB/CAR/PDMS。

1.2 实验方法

1.2.1 腊肠的制作

接种



选料修正→切膘丁→漂洗→绞肉→拌料→灌肠→扎孔→扎草、束绳→烘焙→成品整理→包装

1.2.2 风味物质成分的分析

1.2.2.1 风味物质成分的提取 风味物质的提取采用顶空固相微萃取的方法。其中顶空物质的提取利用美国 Supelco 公司的固相微萃取装置,萃取头为 50 μ m 的 DVB/CAR/PDMS。萃取头在使用前要老化,以确保脱去其可能吸附的挥发性成分。老化后的萃取头在 GC-MS 上检测略有极少量的萃取头固有杂质峰出现,在样品质谱库检索的时候去除,不计入最终结果。

1.2.2.2 固相微萃取的操作步骤 称取绞碎的腊肠样品 5g 于 50mL 密封的顶空瓶中,30 $^{\circ}$ C 平衡 1h,再将固相微萃取头插入顶空瓶中吸附 60min,然后用气相色谱来分析纤维头上的化合物。

1.2.2.3 色谱条件 将吸附化合物的纤维头在进样口 230 $^{\circ}$ C 脱附 3min 分流进样,分流比为 10。挥发性成分用 DB-1 分离柱(30m \times 0.25mm i.d) 进行分离,液膜厚度为 1 μ m。以氦气做载气,流速为 1mL/min。气相色谱程序升温条件如下:炉温在 50 $^{\circ}$ C 保持 3min,以 5 $^{\circ}$ C/min 的升温速率升至 120 $^{\circ}$ C,保持 2min,再以 10 $^{\circ}$ C/min 的升温速率升至 220 $^{\circ}$ C,保持 10min。GC/MS 接口处温度保持 230 $^{\circ}$ C。

1.2.2.4 质谱条件 采用电子轰击模式,电子能量为 70eV,放大电压为 350V,以 35~395amu 的扫描范围进行数据收集。

1.2.2.5 风味物质成分的鉴定 将挥发性成分的质谱数据与系统自备的 NIST 数据库中的数据对比,相似度高于 80% 的物质被定性,并对鉴定出的各物质进行峰面积归一化定量分析。

2 结果与讨论

接种 *M.caseolyticus* 对广式腊肠风味物质成分影响测定结果见表 1。从表中可以看到,接种组(MC 组)鉴定出 25 种风味物质,对照组鉴定出 22 种风味物质。其中从 MC 组鉴定出 1 种烃(0.15%) 4 种醇(54.82%) 6 种醛(13.1%) 3 种酮(3.65%) 8 种酯类物质(17.43%) 和 3 种含环类化合物(3.69%);对照组中鉴定出 4 种烃(11.25%) 2 种醇(48.89%) 5 种醛(7.75%) 1 种酮(1.66%) 8 种酯(12.62%) 和 2 种含环类化合物(10.91%)。结果表明,接种 *M.caseolyticus* 可以产生更多的醇、醛、酮和酯类物质,烃类和环类化合物含量会有所减少。

2.1 广式腊肠中烃类物质含量分析

MC 组腊肠中烃类物质含量仅为 0.15%,而对对照组含量为 11.25%,远高于 MC 组,表明接种 *M.caseolyticus* 利于脂肪和蛋白质的水解及氧化,使烃类物质转化为更多的醇、醛、酮和酯类等风味物质成

分。从表 1 中还可以看到,不同于对照组的是,从 MC 组腊肠中分离出 L-柠檬烯。L-柠檬烯的生成可能是接种 *M.caseolyticus* 后腊肠成熟过程中的深度脂肪降解产生。

2.2 广式腊肠中醇类物质含量分析

广式腊肠中醇类物质是含量最高的挥发性物质,其中乙醇含量最高,这一结论与 Du 和 Ahn 在 2001 年的报道相吻合,他们在研究中也指出腊肠中最主要的风味物质成分是乙醇,认为酒对腊肠风味的形成具有重要贡献^[2];国内俞浩龙和南庆贤也认为酒是腊肠风味的主要来源^[3]。MC 组和对照组中乙醇含量分别为 46.16% 和 47.99%。从表中还可以看到,MC 组腊肠中醇含量及种类均高于对照组,MC 组腊肠中除乙醇和 1-辛烯-3-醇检出外,还鉴定出 2-戊醇和 2-丁氧基-乙醇两种醇存在,这两种物质应是接种 *M.caseolyticus* 后的发酵作用和脂肪氧化作用生成。通过分析我们认为,导致广式腊肠中醇类物质含量高的原因是由于腊肠在加工初始就会有大量的白酒加入,在成熟过程中又会因为发酵作用而生成一定量的醇类物质。

2.3 广式腊肠中醛类物质含量分析

关于发酵剂产生醛类物质方面的研究是现今的一个重要方向。鉴定结果表明,MC 组醛类物质的含量高于对照组。鉴定出的醛类物质主要是直链的 5~9 个碳原子的醛类物质,Berdagué 等人曾报道 4~10 个碳原子的直链醛是肉制品中对风味有着重要贡献的醛^[4],这表明接种 *M.caseolyticus* 利于广式腊肠风味物质的形成。两组中都是己醛和壬醛的含量最高,MC 组含量更高。这些醛类物质都来自于脂肪的降解和不饱和脂肪酸的氧化,其中己醛是亚油酸氧化的产物,一定程度上代表着脂肪氧化的程度^[2]。MC 组醛类物质含量的升高主要是由于分离菌株 *M.caseolyticus* 具有脂肪分解活性,可以加速不饱和脂肪酸的降解和氧化。除了醛类物质之外,烃、醇和酮等挥发性物质也来自于脂肪氧化,与醛类物质相比,它们所占的比例较少。

总体看来,来自于脂肪氧化作用的风味物质成分在对照组和 MC 组中的含量分别为 10.31%、23.85%。该研究结果与分离菌株具有脂肪分解活性、氧化脱氨基作用和转氨基作用^[1] 的生化性质是一致的。

2.4 广式腊肠中酯类物质含量分析

腊肠成熟过程中糖发酵、脂肪水解和氨基酸的氧化作用产生的酸与醇之间会发生酯化生成酯类物质。该类物质是另一类在不同处理组间有较大差异的风味物质成分,由于具有较低的阈值,对腊肠风味的形成有着非常重要的贡献,它们常可以提供水果香并掩饰酸味^[5]。研究中从对照组和 MC 组均鉴定出 8 种酯类物质,含量分别为 12.62% 和 17.43%。这表明分离菌株 *M.caseolyticus* 可以提高腊肠中酯类物质含量。所鉴定出的酯类挥发性成分主要是乙基酯类化合物,它们主要是来自于微生物的酯化作用。MC 组腊肠中会有更多的 3-甲基丁酸乙酯、2-甲基

表1 广式腊肠中风味物质成分及其来源

序号	鉴定依据*	对照组			MC组		
		成分	含量	来源	成分	含量	来源
醇							
1	RT/MS	乙醇	47.99	酒	乙醇	46.16	酒
2	RT/MS	1-辛烯-3-醇	0.90	脂肪氧化	1-辛烯-3-醇	1.56	脂肪氧化
3	RT/MS				2-戊醇	3.47	发酵作用
4	RT/MS				2-丁氧基-乙醇	3.63	发酵作用
			48.89			54.82	
醛							
5	RT/MS	戊醛	0.74	脂肪氧化	戊醛	1.08	脂肪氧化
6	RT/MS	己醛	5.15	脂肪氧化	己醛	8.53	脂肪氧化
7	RT/MS	庚醛	0.35	脂肪氧化	庚醛	0.42	脂肪氧化
8	RT/MS	2-辛醛	0.23	脂肪氧化	2-辛醛	0.51	脂肪氧化
9	RT/MS	壬醛	1.28	脂肪氧化	壬醛	1.82	脂肪氧化
10	RT/MS				2-壬醛	0.15	脂肪氧化
			7.75			13.1	
酮							
11	RT/MS	2,3-辛二酮	1.66	脂肪氧化	2,3-辛二酮	2.73	脂肪氧化
12	RT/MS				6-氢-苯甲基-2,2-二甲基-环己酮	0.78	脂肪氧化
13	RT/MS				1-辛烯-3-酮	0.14	脂肪氧化
			1.66			3.65	
酯							
14	RT/MS	丙酸乙酯	0.49	微生物作用	乙酸乙酯	2.75	发酵作用
15	RT/MS	1-丁醇-3-甲基-甲酸酯	2.83	微生物作用	丁酸乙酯	2.23	微生物作用
16	RT/MS	丁酸乙酯	1.45	微生物作用	2-羟基丙酸乙酯	2.57	发酵作用
17	RT/MS	2-羟基丙酸乙酯(乳酸)	1.75	微生物作用	2-甲基丁酸乙酯	0.21	微生物作用
18	RT/MS	3-甲基丁酸乙酯	0.46	微生物作用	3-甲基丁酸乙酯	0.54	微生物作用
19	RT/MS	戊酸乙酯	0.23	微生物作用	戊酸乙酯	0.33	微生物作用
20	RT/MS	己酸乙酯	4.36	微生物作用	己酸乙酯	6.60	微生物作用
21	RT/MS	辛酸乙酯	1.05	微生物作用	辛酸乙酯	2.20	微生物作用
			12.62			17.43	
烃							
22	RT/MS	二氯甲烷	5.52	未知	L-柠檬烯	0.15	发酵作用
23	RT/MS	己烷	5.49	脂肪			
24	RT/MS	氮-乙基-1,3-二甲基硫代异氮杂茛菪烷	0.14				
未知							
25	RT/MS	n-ethyl-1,3-dithioisindoline	0.10	未知			
			11.25			0.15	
含环化合物							
26	RT/MS	苯	10.70	污染物	苯	3.33	未知
27	RT/MS	甲苯	0.21	污染物	甲苯	0.18	未知
28	RT/MS				2-苯基-咪喃	0.18	未知
			10.91			3.69	

注: * RT/MS: 保留时间/质谱库。

丁酸乙酯和乙酸乙酯生成。这是由于接种 *M.caseolyticu* 后,腊肠成熟过程中支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)在 *M.caseolyticu* 作用下通过非酶作用 Strecker 反应和微生物代谢作用,转化生成 3-甲基丁醛和 2-甲基丁醛,然后在还原作用下生成相应的醇,或氧化生成相应的酸,再通过葡萄球菌的酯化作用与乙醇反应生成 3-甲基丁酸乙酯和 2-甲基丁酸乙酯^[5-9],这与 Stahnke 对干香肠的研究结果相一致^[10]。Montel 等人在 1996 年也发现,葡萄球菌 *S.xylosus* 和 *S.carnosus* 可以产生大量的乙酯类物质,

使得香肠具有更好的风味^[11]。

2.5 广式腊肠中含环类化合物含量分析

研究结果表明,除醇类、醛类、酮类、酯类和烃类等风味物质成分之外,在两组腊肠中还检出了苯和甲苯等环类化合物。同样的结果 Du 和 Ahn 也报道过,他们从广式腊肠中鉴定出苯、甲苯和氯仿,他们认为这些挥发性成分来自腊肠的包装袋^[2]。分析认为这些物质并不是来自于肉制品本身,有可能来自于包装及贮藏过程中腊肠包装中高分子物质的迁

(下转第 213 页)

的调味品的用量、存放条件等,同一味型不同原料实验表明各种原料起始细菌数各不相同,而且由于品种不同,同种原料起始细菌数也各有差异。这与原料本身的结构、酸度、含糖量及水分有很大关系。萝卜中水分、糖含量较高,而黄瓜中酸度略高,故而萝卜起始细菌数较黄瓜高。

参考文献

- [1] 张志华,于峻.生食食谱[M].上海:上海远东出版社,1994:3-5.
- [2] 田惠光.食品安全控制关键技术[M].北京:科学出版社,2004:65-72.
- [3] Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, et al. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997 [J]. J Food Prot 2004 67(10): 2342-2353.
- [4] 严纪文,朱海明,王海燕,等.2000~2005年广东省食品中食源性致病菌的监测与分析[J].中国食品卫生杂志 2006,18(6):528-531.
- [5] 方敏,郑华英,郭爱玲,等.自市售生食蔬菜胡萝卜中检出沙门菌报告[J].中国卫生检验杂志 2006,16(12):1537.
- [6] 卫生部.食品卫生检验方法(微生物学部分)[M].北京:中国标准出版社 2005:65-67.
- [7] 彭景.烹饪营养学[M].中国轻工业出版社,2000:214-217.
- [8] 葛可佑.中国营养师培训教材[M].北京:人民卫生出版社 2005:342-344.
- [9] 蒋云升.烹饪卫生与安全学[M].北京:中国轻工业出版社 2008:204-206.
- [10] 老茶.脍炙人口生鱼片[J].中国保健营养,1997(8):38.
- [11] Adams A M, Leja L L, Jinneman K, et al. Anisakid parasites *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in sushi and sashimi from Seattle area restaurants [J]. Journal of Food Protection, 1994, 57(4):311-317.

(上接第209页)

移,其具体的来源仍需进一步的研究。另外,我们从MC组腊肠中还分离得到2-苯基咪喃,该物质的生成与接种菌株 *M.caseolyticu* 后脂肪的自动氧化有关。

3 结论

结果表明,接种分离菌株 *M.caseolyticu* 利于广式腊肠中脂肪和蛋白质的降解和氧化,进而生成更多的风味物质成分,改善广式腊肠的风味。此外,研究还发现,与其他发酵肉制品相关报道不同的是,从广式腊肠中鉴定出的风味物质成分里并没有支链醛,这可能与广式腊肠的加工工艺有关,由于广式腊肠烘烤温度较高,烘烤时间较长,使得支链醛在转氨基作用、氧化脱氨基作用和微生物酯化作用下进一步转化生成了相应的酸或酯,但其具体作用机理有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kloos W E, Ballard D N, George C G, et al. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrocooccus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrocooccus equipercicus* sp. nov., *Macrocooccus bovicus* sp. nov. and *Macrocooccus carouselicus* sp. Nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1998(8):859-877.
- [2] M Du, D U Ahn. Volatile Substances of Chinese Traditional Jinhua Ham and Cantonese Sausage [J]. Journal of Food Science, 2001 66(6):821-831.
- [3] 俞龙浩,南庆贤.广式香肠挥发性风味成分的研究[J].延边农学院学报,1993(3):170-173.
- [4] Berdagué J L, Monteil P, Montel M C, et al. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage [J]. Meat Science, 1993 35:275-287.
- [5] Hérnanz B, Delahoz L, Hierro E, et al. Improvement of the sensory properties of dry-fermented sausages by the addition of free amino acids [J]. Food Chemistry, 2005 91:673-682.
- [6] Stahnke L H. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* [J]. Meat Science, 1994, 38:39-53.
- [7] Kloos W E, Ballard D N, George C G, et al. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrocooccus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrocooccus equipercicus* sp. nov., *Macrocooccus bovicus* sp. nov. and *Macrocooccus carouselicus* sp. Nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1998 48:859-877.
- [8] Barbieri G, Bolzoni L, Parolai G, et al. Flavor compounds of dry-cured ham [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1992 40:2389-2394.
- [9] Meynier A, Novelli E, Chizzolini R, et al. Volatile compounds of commercial Milano salami [J]. Meat Science, 1999, 51:175-183.
- [10] Stahnke L H. Volatiles produced by *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* during growth in Sausage minces Part I. collection and identification [J]. Lebensmittel- u- Technol, 1999 32:357-364.
- [11] Montel M C, Retiz J, Talon R, et al. Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model [J]. Food Microbiology, 1996, 13:489-499.