



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20140141

## 发酵酶解法制备干腌火腿风味基料过程中酶解条件的优化

任利平, 汪建明

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 采用酶解和发酵相结合的方法制备干腌火腿风味基料,在单因素实验基础上采用响应面分析对其酶解条件进行了优化,得到适宜的酶解条件为:蛋白酶添加量1%,脂肪酶添加量0.75%,酶解时间2.5 h,酶解温度45℃;经过验证实验得到的综合评分为17.99,感官评分41.8,氨基态氮含量为2.25%,游离脂肪酸含量为1.99%。后酶解液使用植物乳杆菌和酿酒酵母在一定条件下发酵,经过氧化制得了风味评分较高的干腌火腿风味基料。

**关键词:** 中性蛋白酶; 中性脂肪酶; 干腌火腿; 风味基料; 发酵; 酶解

**中图分类号:** TS251      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-6510(2015)05-0026-06

## Optimizing the Preparation Process of Dry-cured Ham Flavor Base Though Fermentation Combined with Enzymolysis

REN Liping, WANG Jianming

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Enzymolysis and fermentation were used to prepare the dry-cured ham flavor base. Single factor experiments were used to get the best conditions of each factor. Then the process was optimized through Response Surface Experiment and the best enzymolysis conditions were obtained with 1% protease and 0.75% lipase, at 45 °C temperature. The colligation score of the verification test was 17.99, sensory score 41.8, amino nitrogen content 2.25%, and free fatty acid 1.99%. The product was fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in proper conditions, and then an ideal flavor base of dry-cured ham was got through oxidation.

**Key words:** neutral protease; neutral lipase; dry-cured ham; flavor base; fermentation; enzymolysis

干腌火腿独特的风味是由内源酶、外源酶和微生物的共同作用在火腿中产生了大量的游离脂肪酸、游离氨基酸<sup>[1]</sup>及一些微生物的次级代谢产物,经过复杂的变化而形成。酶解法具有水解率高、条件温和、营养物质损失较少、条件易于控制、得到的产品风味较好等优势而受到人们青睐,利用酶解液制备食品原料具有广阔的前景<sup>[2-3]</sup>。作为目前生产肉味香精的关键技术,酶解技术是通过水解动植物蛋白制备肉味香精的前提物质<sup>[4-6]</sup>。然而,单纯的酶解工艺得到的产物不仅风味单薄而且不能避免一些苦味肽的产生,从而影响产品风味<sup>[7]</sup>,但酶解产物经过发酵可以得到浓厚的风味。乳酸菌和酵母菌因为具有较好的耐盐性并具有较强的生理功能而常常作为肉品发酵剂使用<sup>[8]</sup>,在发酵火腿和发酵香肠的制作中使用较为广泛<sup>[9-10]</sup>,

尤其是混菌发酵的风味与口感比单一菌种发酵更好<sup>[11]</sup>。本研究对发酵酶解法制备金华火腿风味基料过程中的酶解条件进行优化,为后续研究提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验原料与设备

新鲜猪后腿肉肉糜购于天津人人乐超市。

中性蛋白酶、中性脂肪酶,DSM公司;植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由天津科技大学菌种保藏室提供。

数显pH计,上海精密科学仪器有限公司;电热恒温培养箱、电热鼓风干燥箱,天津天宇机电有限公

收稿日期:2014-11-03;修回日期:2015-04-13

作者简介:任利平(1989—),女,河南开封人,硕士研究生;通信作者:汪建明,教授,wangjianming@tust.edu.cn。

司;分析天平,湖北省黄石市医疗器械厂;电热恒温水浴锅,北京仪器设备厂;WFZ75型紫外-可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司。

## 1.2 工艺流程

肉糜→腌制(4℃腌制48h)→酶解→灭酶→接种发酵→灭菌→干腌火腿风味料。

## 1.3 蛋白酶和脂肪酶的耐盐与耐亚硝酸盐效果的测定

**耐盐性:**分别配制质量分数为2%、4%、6%、8%、10%的食盐溶液,分别保持蛋白酶和脂肪酶的温度为最适温度条件下测定两种酶的酶活。

**耐亚硝酸盐性:**分别配制质量分数为0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%的NaNO<sub>2</sub>溶液,分别保持蛋白酶和脂肪酶的温度为最适温度条件下测定两种酶的酶活。

## 1.4 酶解条件的优化

### 1.4.1 蛋白酶和脂肪酶添加量的确定

蛋白酶和脂肪酶添加量分为两组进行测定,每组称取5份经过预处理的样品25g置于250mL三角瓶中,分别加入脂肪酶0.75%,45℃酶解3h。第1组蛋白酶添加量分别为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%,第2组其他条件不变,脂肪酶添加量分别为0.25%、0.50%、0.75%、1.00%、1.25%。

### 1.4.2 酶解时间的确定

酶解时间分为两组进行测定,每组称取5份经过预处理的样品25g置于250mL三角瓶中,添加最佳添加量的脂肪酶和蛋白酶,酶解温度为45℃,酶解时间分别为2.0、2.5、3.0、3.5、4.0h。

### 1.4.3 酶解温度的确定

酶解温度分为两组进行测定,每组称取5份经过预处理的样品25g置于250mL三角瓶中,添加最佳添加量的脂肪酶和蛋白酶,酶解温度分别为35、40、45、50、55℃,酶解时间为最佳酶解时间。

### 1.4.4 响应面优化

根据单因素实验结果进行响应面优化实验,并对优化实验结果进行方差分析,确定最佳酶解条件,并在最佳酶解条件下进行验证实验。

## 1.5 感官评价方法

选择10名事先经过培训的食品专业研究生作为感官评价员进行产品的感官评价,具体评价内容从气味和滋味两个方面进行,酶解液的感官评价标准见表1。

表1 酶解液感官评价表

Tab. 1 Sensory evaluation of enzymatic hydrolysate

评价标准	分值
生肉味,并无香味	0~10
轻微肉香,香味较温和	10~20
浓郁香味,略有苦味或哈喇等异味	20~30
香味适度,并无异味	30~40
浓郁香味,并略有干腌火腿风味	40~50

## 1.6 理化指标的测定

脂肪酶酶活的测定参考文献[12],蛋白酶酶活和氨基态氮分别采用福林试剂法<sup>[13]</sup>和甲醛电位滴定法<sup>[14]</sup>进行测定,游离脂肪酸含量和蛋白质含量分别参照GB/T 5009.37—2003《食用植物油卫生标准的分析方法》<sup>[15]</sup>和GB/T 5009.5—2010《食品安全国家标准·食品中蛋白质的测定》<sup>[16]</sup>的方法测定,脂肪含量采用索氏提取法<sup>[17]</sup>进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶和脂肪酶的耐盐性和耐亚硝酸盐性

腌制作为常用的食品保藏方法常用于肉类和蔬菜的保藏中,但是食盐和亚硝酸盐的存在会对酶活产生相应的影响。因此,首先对酶制剂的耐盐性和耐亚硝酸盐性进行测定,结果如图1和图2所示。

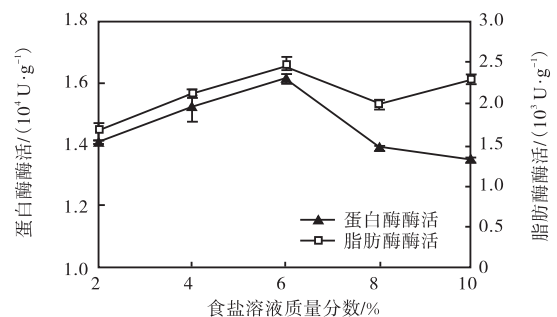


图1 蛋白酶和脂肪酶的耐盐性

Fig. 1 Salt tolerance of neutral protease and neutral lipase

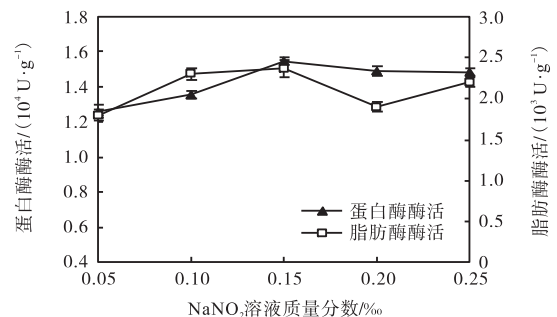


图2 蛋白酶和脂肪酶的耐亚硝酸盐性

Fig. 2 Nitrite tolerance of neutral protease and neutral lipase

由图 1 可知:蛋白酶和脂肪酶的活力随着食盐含量的增加都呈现出先增大后减小的趋势,这与已有研究<sup>[18]</sup>结论一致.在食盐含量为 6% 时酶活最高,因此,从防腐和对人体健康的影响及酶活三方面考虑,选择食盐含量为 6% 进行腌制.由图 2 可知,亚硝酸盐含量对脂肪酶和蛋白酶活的影响呈不规则的变化,因此,按照亚硝酸盐含量的限量标准,选择 0.15% 亚硝酸盐含量进行腌制.

## 2.2 酶解条件的优化

### 2.2.1 蛋白酶和脂肪酶添加量对双酶水解的影响

蛋白酶和脂肪酶添加量对双酶水解的影响如图 3、图 4 所示.由图 3 可知:单独加入蛋白酶时,酶解产物的含量低于双酶同时加入时酶解产物的含量,这可能是由于脂肪酶的存在水解了包裹在蛋白质周围及其他部分的脂肪,使蛋白酶更容易与底物蛋白质接触,从而促进了蛋白质的水解.随着蛋白酶添加量的增加氨基态氮含量呈增加趋势,到蛋白酶添加量为 2% 后增加缓慢,结合感官评价与水解程度,蛋白酶添加量选取 1.5%.由图 4 可知,双酶同时添加的水解产物含量低于单独加入脂肪酶时的含量,这可能是由于蛋白酶水解了部分脂肪酶所致.结合感官评价结果,脂肪酶添加量选取 0.75%.

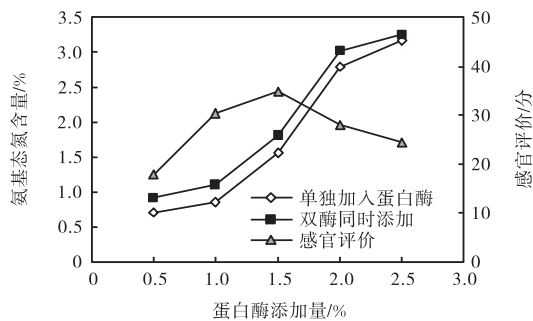


图 3 蛋白酶添加量对双酶水解的影响

Fig. 3 Influence of additive amount on enzymolysis product content on hydrolysis

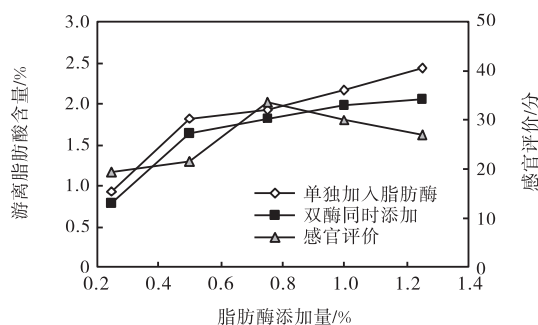


图 4 脂肪酶添加量对双酶水解的影响

Fig. 4 Influence of lipase additive amount on enzymolysis product content on hydrolysis

### 2.2.2 酶解时间对双酶水解的影响

酶解时间对双酶水解的影响如图 5 所示.随着酶解时间的增加,水解产物的含量逐渐增加,而当酶解时间超过 3.5 h 后,酶解的速度明显减慢,这可能是随着底物的分解,底物浓度逐渐降低造成的.在酶解时间为 3 h 时获得较高的感官评价结果,综合考虑,酶解时间选择 3 h.

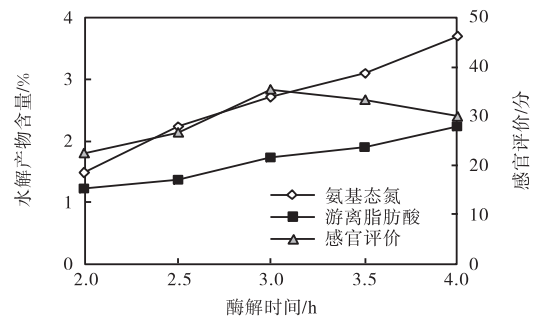


图 5 酶解时间对双酶水解的影响

Fig. 5 Influence of time on enzymolysis

### 2.2.3 酶解温度对双酶水解的影响

酶解温度对双酶水解的影响如图 6 所示.由图 6 可知,在小于 45 °C 范围内,随着酶解温度的升高酶解产物的含量增加,这可能是由于在 45 °C 时达到了或者最接近酶的最适温度,因而水解速度较快.结合感官评价结果,选择 45 °C 作为最佳酶解温度.

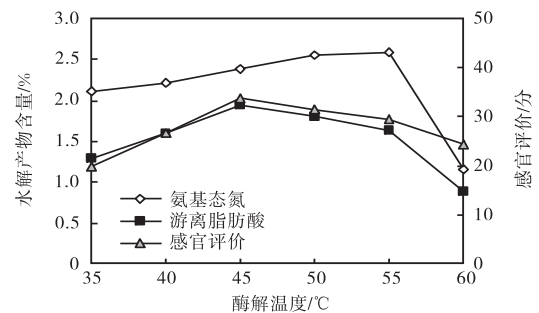


图 6 酶解温度对双酶水解的影响

Fig. 6 Influence of temperature on enzymolysis

### 2.2.4 响应面实验

在前期单因素实验的基础上对酶解条件进行了响应面优化实验,实验因素水平设计见表 2.

表 2 响应面实验因素水平表

Tab. 2 Box-Behnken factor level table

因素	编号	水平		
		-1	0	1
脂肪酶添加量/%	X <sub>1</sub>	0.50	0.75	1.00
蛋白酶添加量/%	X <sub>2</sub>	1.0	1.5	2.0
酶解时间/h	X <sub>3</sub>	2.5	3.0	3.5
酶解温度/°C	X <sub>4</sub>	40	45	50

使用发酵酶解法制备干腌火腿风味基料, 首先利用蛋白酶和脂肪酶酶解分别产生游离氨基酸和游离脂肪酸, 经过植物乳杆菌和酿酒酵母混合发酵后再经过氧化发生复杂的变化, 从而产生干腌火腿的风味. 因此, 首先对酶解条件进行优化, 结果见表 3.  $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$ 、 $Y$  分别表示感官评价(分)、游离氨基酸含量(%)、游离脂肪酸含量(%)和综合评价(分).

表 3 响应面实验结果表

Tab. 3 Result of RSM design experiment

实验	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y$
1	1	0	0	1	31.2	2.95	1.97	13.96
2	0	0	-1	-1	21.3	2.23	1.26	9.57
3	1	0	-1	0	33.2	2.54	1.54	14.50
4	1	0	0	-1	30.2	2.56	1.33	13.25
5	0	-1	0	-1	28.2	2.18	1.15	12.28
6	0	1	1	0	30.6	2.68	2.01	13.65
7	0	0	0	0	42.3	2.35	1.89	18.19
8	0	0	0	0	38.2	2.37	1.90	16.56
9	0	-1	1	0	37.1	2.54	1.79	16.14
10	0	-1	0	1	36.9	2.46	1.68	16.00
11	0	0	0	0	40.4	2.35	1.88	17.43
12	0	0	1	1	35.7	2.48	2.03	15.63
13	0	0	0	0	41.2	2.33	1.89	17.75
14	0	0	-1	1	28.7	2.18	1.76	12.36
15	-1	0	0	1	36.2	1.95	1.98	15.66
16	-1	-1	0	0	21.2	2.11	1.69	9.62
17	0	0	0	0	41.3	2.35	1.87	17.79
18	1	-1	0	0	32.4	2.85	1.64	14.31
19	-1	0	0	-1	23.5	2.05	1.59	10.49
20	0	1	0	1	31.5	2.48	2.03	13.95
21	1	1	0	0	28.8	2.87	1.86	12.94
22	-1	0	-1	0	22.3	1.92	1.65	9.99
23	1	0	1	0	26.1	3.01	1.59	11.82
24	-1	0	1	0	30.5	2.14	1.54	13.30
25	0	-1	-1	0	28.4	2.09	1.32	12.38
26	0	1	-1	0	25.3	2.13	1.55	11.22
27	0	1	0	-1	25.5	2.10	1.21	11.19
28	0	0	1	-1	39.2	2.15	1.35	16.73
29	-1	1	0	0	30.1	1.98	1.67	13.13

$Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$  分别赋予权重 0.4、0.3、0.3,  $Y = 0.4 \frac{Y_1}{2} + 0.3 Y_2 + 0.3 Y_3$ , 利用 Design Expert 8.0 软件对数据进行分析得到回归方程:

$$Y = -17.70 + 0.72X_1 - 0.39X_2 + 1.44X_3 + 1.77X_4 - 1.22X_1X_2 - 1.50X_1X_3 - 1.11X_1X_4 - 0.33X_2X_3 - 0.24X_2X_4 - 0.97X_3X_4 - 2.81X_1^2 - 2.33X_2^2 - 2.27X_3^2 - 1.80X_4^2$$

由回归方程方差分析(表 4)可以看出: 模型的  $F$

检验结果  $P = 0.0005 < 0.01$ , 表明模型极显著; 失拟项  $P = 0.4416 > 0.05$ , 不显著; 模型的决定系数  $R^2 = 0.8698$ , 校正决定系数  $Adj.R^2 = 0.7395$ . 这说明该模型具有良好的拟合度和较小的实验误差, 实验设计合理, 该实验可以用于对实验数据的分析及对理论数值进行实验预测.

表 4 响应面方差分析结果

Tab. 4 Analysis of variance for regression model

方差来源	自由度	偏差平方和	平均偏差平方和	$F$ 值	$P$ 值
$X_1$	1	6.15	6.15	3.47	0.0835*
$X_2$	1	1.80	1.80	1.02	0.3303
$X_3$	1	24.80	24.80	14.00	0.0022**
$X_4$	1	16.45	16.45	9.29	0.0087**
$X_1X_2$	1	5.95	5.95	3.36	0.0881**
$X_1X_3$	1	8.97	8.97	5.06	0.0410*
$X_1X_4$	1	4.97	4.97	2.81	0.1160
$X_2X_3$	1	0.44	0.44	0.25	0.6251
$X_2X_4$	1	0.23	0.23	0.13	0.7237
$X_3X_4$	1	3.78	3.78	2.14	0.1660
$X_1^2$	1	51.33	51.33	28.98	<0.0001**
$X_2^2$	1	35.31	35.31	19.93	0.0005**
$X_3^2$	1	33.51	33.51	18.92	0.0007**
$X_4^2$	1	21.03	21.03	3.47	0.0039**
模型	14	165.60	11.83	6.68	0.0005**
残差	14	24.80	1.77		
失拟项	10	23.01	2.30	5.14	0.0643
纯误差	4	1.79	0.45		
所有项	28	190.39			

注:  $R^2 = 0.8698$ ,  $Adj.R^2 = 0.7395$ , \*表示显著( $P < 0.05$ ), \*\*表示极显著( $P < 0.01$ ).

由表 4 可知, 酶解时间和酶解温度为极显著影响因素, 另外脂肪酶含量为显著影响因素. 蛋白酶对综合指标无显著影响.

响应面图如图 7—图 12 所示. 由图 7 和图 8 可以看出, 随着脂肪酶和蛋白酶及酶解时间的增加, 综合指标呈先增大后减小的趋势, 这与单因素实验结果一致, 蛋白酶添加量为 1%, 脂肪酶添加量为 0.75%, 最佳酶解时间为 2.5 h 得到了较高的感官评分. 由图 9—图 12 可知, 在酶解时间、酶解温度、酶添加量在一定范围内变化时均呈现出综合指标先增大后减小的趋势, 这与单因素实验结果一致. 通过软件 Box-Behnken 求解回归方程, 得到最佳酶解条件为: 蛋白酶添加量 1%, 脂肪酶添加量 0.75%, 酶解时间 2.5 h, 酶解温度 45 °C; 经过验证实验得到综合评分 17.99 与测值 18.19 相近, 此时, 感官评分 41.8, 氨基态氮含量为 2.25%, 游离脂肪酸含量为 1.99%.

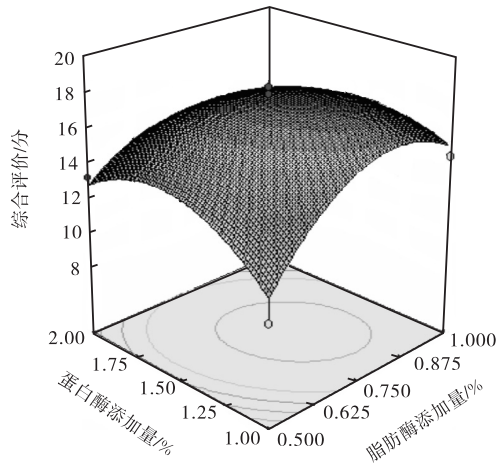


图7 脂肪酶添加量和蛋白酶添加量的响应面图  
Fig. 7 Response surface of lipase and protease content

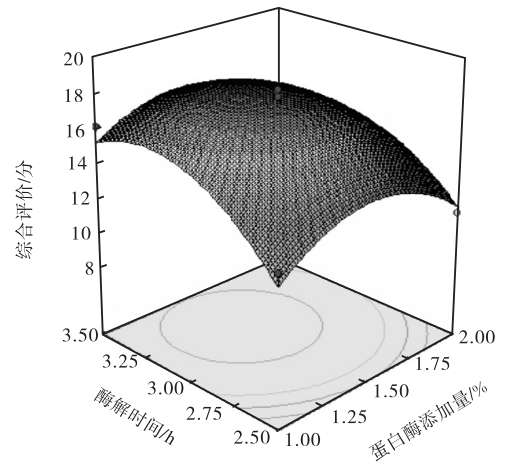


图10 蛋白酶添加量和酶解时间响应面图  
Fig. 10 Response surface of protease content and enzyme digestion time

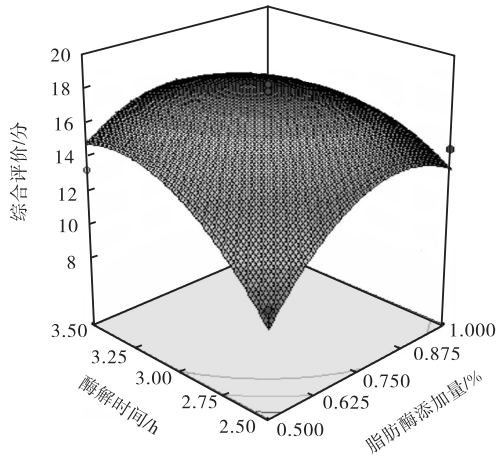


图8 脂肪酶添加量和酶解时间响应面图  
Fig. 8 Response surface of lipase content and enzyme digestion time

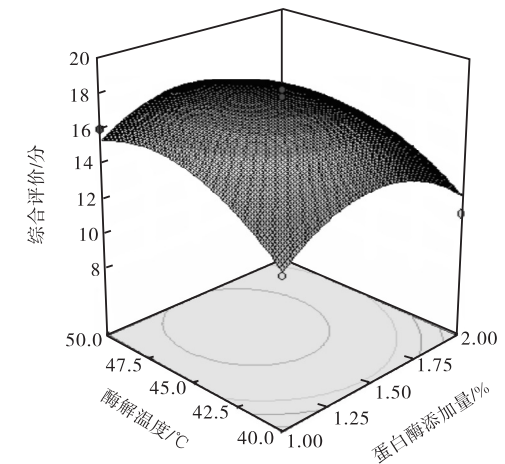


图11 蛋白酶添加量和酶解温度响应面图  
Fig. 11 Response surface of enzymolysis temperature and protease additive content

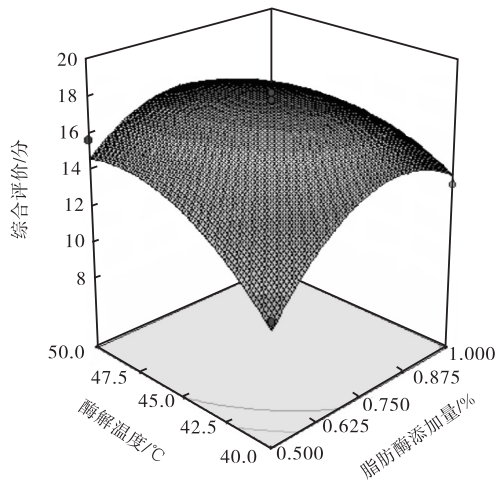


图9 脂肪酶添加量和酶解温度响应面图  
Fig. 9 Response surface of lipase content and enzymolysis temperature

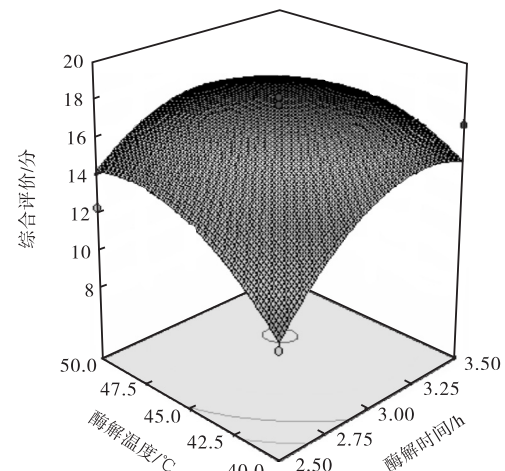


图12 酶解温度和酶解时间响应面图  
Fig. 12 Response surface of enzymolysis temperature and enzyme digestion time

### 3 结 论

通过单因素实验和响应面分析对酶解条件进行优化,得到最佳酶解条件为:蛋白酶添加量 1%,脂肪酶添加量 0.75%,酶解时间 2.5 h,酶解温度 45 ℃;经过验证实验得到综合评分 17.99,感官评分 41.8,氨基态氮含量为 2.25%,游离脂肪酸含量为 1.99%。得到的酶解液进行发酵得到了风味较好的干腌火腿风味基料,补充了单纯发酵、酶解的不足,为以后风味料制备工艺的发展提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 郇延军,周光宏,徐幸莲. 中西方干腌火腿风味成分比较及形成机理分析[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(11):81-87.
- [2] 王三丽. 外源酶调控生产火腿风味调味料的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [3] 裘迪红. 鲑鱼蛋白酶酶解与脱腥方法工艺的研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2002.
- [4] 刘通讯,吴肖,林勉. 花生粕蛋白酶解液 Maillard 反应合成肉类香味料的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(4): 25-27.
- [5] Imm J Y, Lee C M. Production of seafood flavor from red hake urophycis chuss by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(6): 2360-2366.
- [6] 曾晓房. 鸡骨架酶解及其产物制备鸡肉香精研究[D]. 广州:华南理工大学,2007.
- [7] 任仙娥,杨锋,张水华,等. 瑞士乳杆菌发酵对猪肉酶解液风味和品质的影响[J]. 中国调味品, 2006(12): 40-43.
- [8] 史崇颖,黄爱祥,田洋. 传统火腿微生物发酵作用的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2007, 128(7): 165-168.
- [9] 于立梅. 发酵里脊火腿的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2003.
- [10] 郭荣荣. 植物乳杆菌在发酵牛肉香肠中的应用[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.
- [11] 刘晓强,刘金玉,逯家富. 单一菌种和混合菌种发酵对发酵火腿品质的影响[J]. 食品工业, 2012, 33(9): 64-66.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 23535—2009 脂肪酶制剂[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 23527—2009 蛋白酶制剂[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [14] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.39—2003 酱油卫生标准的分析方法[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [15] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 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.
- [16] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.5—2010 食品安全国家标准·食品中蛋白质的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [17] 中华人民共和国卫生部,GB/T 5009.6—2003 食品中脂肪的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [18] 王璋. 食品酶学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.

责任编辑:郎婧