

乳酸菌於中式香腸中之抑菌及香味增強之探討

梁?雲、游銅錫；郭嘉信

E-mail: 9300017@mail.dyu.edu.tw

摘要

中文摘要 乳酸菌應用在食品產業已有多年記載，且其在安全性方面屬於GRAS(generally recognized as safe)，加上乳酸菌可以抑制病原菌及腐敗菌，與其各種營養保健機能陸續被認知，因此成為目前頗受重視的研究題目。本研究利用乳酸菌添加於中式香腸，探討其抑菌性及風味增強之效果。在歐美，利用乳酸菌改善香腸品質與賦予香腸特殊風味的研究，早已有不少的探討。在國內，由於中式香腸本身具獨特風味，再加上沒有利用菌?發酵的習慣，所以極少有研究者對此方面加以探討。由於中式香腸為國內肉製品銷售之大宗，而在香氣增強方面，主要以添加人工合成香料來吸引消費者，目前食品產業逐步邁向以健康食品為主流的時代，香料的添加，對於消費者來說，已經逐漸提昇其抗拒性。所以研究產生天然風味之生產菌，來取代人工合成之香料，增加消費者對香腸製品之嗜好性，是本研究之重點。本研究以進口之肉製品為篩選乳酸菌之目標，將篩選出之乳酸菌添加於中式香腸，經真空包裝後，貯存於4℃，並在貯存期間，分析乳酸菌數、好氣菌數、乳酸、醋酸及pH值含量之變化，並進行官能品評之探討與揮發性香氣成分的分析。研究結果顯示：貯存期間，乳酸菌數由最初接種的106 CFU/g增至107 CFU/g，隨著發酵時間增長，pH值快速下降，至第四週時，pH值降至4.8左右，而乳酸含量在第四週後，有不再增加的趨勢，此結果造成第四週時好氣菌增殖減緩，呈現被抑制的現象。官能品評方面，貯存到第四週，菌?組以添加菌?B2與B5之中式發酵香腸品評結果為最佳。而經由香氣的分析，其結果發現，香氣成分的?減並無規則性，但對油耗味來說，菌?組隨著貯存時間之增加有減少之趨勢。 關鍵詞：乳酸菌、中式香腸、香氣、健康食品

關鍵詞：乳酸菌；中式香腸；香氣；健康食品

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘要.....	iv
iv 英文摘要.....	vi	誌謝.....	viii
viii 目錄.....	ix	表目錄.....	xii
xii 圖目錄.....	xiv	第一章 緒論.....	1
1 第二章 文獻回顧 2.1 乳酸菌之簡介.....	7	2.2 乳酸菌在食品上的利用.....	10
10 2.4 發酵肉製品的歷史.....	15	2.5 菌?在發酵肉品上之利用.....	16
16 2.6 乳酸菌在肉製品上之功用.....	19	2.7 RAPD-PCR.....	21
21 2.8 肉類香味化學.....	23	第三章 乳酸菌?之篩選及生長性狀之探討 摘要.....	38
38 3.1 前言.....	40	3.2 實驗材料與設備.....	42
42 3.4 結果與討論.....	45	3.5 結論.....	52
52 第四章 乳酸菌抑菌性之測試 摘要.....	53	4.1 前言.....	54
54 4.2 實驗材料與設備.....	56	4.3 實驗方法.....	57
57 4.4 結果與討論.....	58	4.5 結論.....	65
65 第五章 利用逢機複製DNA片段多態型分析應用於乳酸菌分類 摘要.....	66	5.1 前言.....	69
69 5.3 實驗方法.....	70	5.4 結果與討論.....	72
72 5.5 結論.....	75	第六章 中式乳酸菌發酵香腸貯存期間微生物之變化 摘要.....	76
76 6.1 前言.....	77	6.2 實驗材料與設備.....	79
79 6.4 結果與討論.....	81	6.5 結論.....	90
90 第七章 中式發酵香腸風味嗜好性之探討與香氣成分分析 摘要.....	91	7.1 前言.....	92
92 7.2 實驗材料與設備.....	93	7.3 實驗方法.....	94
94 7.4 結果與討論.....	97	7.5 結論.....	110
110 第八章 篩選出之乳酸菌?之鑑定 摘要.....	111	7.1 前言.....	

.....112	7.2 實驗材料與設備.....	113	7.3 實驗方法.....
.....114	7.4 結果與討論.....	115	7.5 結論.....
.....118	第九章 總結論.....	119	參考文獻.....
.....120	表目錄 表2.1 乾燥香腸自然熟成之微生物.....	17	
.....26	表2.2 肉品中重要的菌?及使用的目的.....	18	表2.3 機酸之呈味性.....
.....46	表2.4 熱反應香味物質可能進行的化學反應及產物.....	37	表3.1 分離菌株之初步鑑定.....
.....49	表3.2 分離菌株之生理特性.....	47	表3.3 分離菌株之生化特性.....
.....60	表3.4 分離菌株之碳水化合物利用性.....	51	表4.1 分離菌株之發酵液對 <i>M. luteus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> 之抑制情形.....
.....61	表4.2 分離菌株發酵液不同處理方法對 <i>M. luteus</i> 之抑制情形.....	63	表4.3 分離菌株發酵液不同處理方法對 <i>M. luteus</i> 之抑制情形.....
.....64	表4.4 加熱處理之pH 2發酵液對 <i>M. luteus</i> 之抑制情形.....	64	表4.5 加熱處理之pH 4發酵液對 <i>M. luteus</i> 之抑制情形.....
.....80	表6.1 中式香腸配方.....	80	表7.1 中式乳酸菌發酵香腸4 貯存期間色澤喜好性官能評估結果.....
.....99	表7.2 中式乳酸菌發酵香腸4 貯存期間風味喜好性官能評估結果.....	100	表7.3 中式乳酸菌發酵香腸4 貯存期間尚嗜味喜好性官能評估結果.....
.....101	表7.4 中式乳酸菌發酵香腸4 貯存期間整體喜好性官能評估結果.....	102	表7.5 由香腸樣品中鑑定到的揮發性成分.....
.....103	表7.6 未發酵香腸與發酵香腸樣品中之總揮發性成分之含量比較.....	106	
.....8	圖目錄 圖2.1 同型發酵乳酸菌及異型發酵乳酸菌之代謝途徑.....	6	圖2.2 乳酸菌在食品類上之應用.....
.....24	圖2.3 有機酸抑菌之作用機制.....	12	圖2.4 肉類風味形成之因子.....
.....32	圖2.5 梅納反應的基本反應機制.....	31	圖2.6 梅納反應第一步，醱與胺基酸進行縮合.....
.....34	圖2.7 Amadori重組反應(路徑一).....	33	圖2.8 Amadori重組反應(路徑二).....
.....73	圖5.1 RAPD-PCR再現性之評估.....	73	圖5.2 RAPD-PCR再現性之評估.....
.....74	圖5.3 分離菌株之RAPD-PCR分析試驗.....	74	圖6.1 中式發酵香腸4 貯存期間pH之變化.....
.....82	圖6.2 中式發酵香腸4 貯存期間乳酸菌數之變化.....	83	圖6.2 中式發酵香腸4 貯存期間好氣菌數之變化.....
.....86	圖6.3 中式發酵香腸4 貯存期間醋酸含量之變化.....	88	圖6.4 中式發酵香腸4 貯存期間乳酸含量之變化.....
.....89	圖8.1 B2菌株經電腦鑑定之結果.....		圖8.1 B2菌株經電腦鑑定之結果.....
.....116	圖8.2 B5菌株經電腦鑑定之結果.....	117	

參考文獻

- 參考文獻 1. 仇志強、吳淳美(1983) 滷肉的揮發性成分，食品工業發展研究所，研究報告，No.285。 2. 何其黨(1991) 食品加工過程所生成的香味，香料資訊。 3. 李福臨(1989) 食品加工上乳酸菌之利用。食品工業，21(12):32-38。 4. 林松筠(1986) 菌?在發酵香腸扮演的角色。食品工業，18(4):37-41。 5. 林淑姿(1996) 天然殺菌劑NISIN的特性及於肉品中的應用。食品資訊，128:59-65。 6. 孫豫蘋(1996) 乳酸菌細菌素。德育學報，12:23-40。 7. 張平平(1979) 發酵香腸製造之微生物。食品工業，11(7):18-24。 8. 陳元宏、游若萩(1995) 乳酸鏈球菌素作為生物防腐劑之生產研究。食品科學，22(1):77-85。 9. 陳幸臣(1991) 水產微生物學實驗法。華香園出版社，台灣。 10. 陳俊成(1984) 乳酸菌之應用。食品工業，16(3):35-37。 11. 陳勁初(1991) 以乳酸菌保存食品之機制。科學與技術，23(9):17-21。 12. 彭秋妹、王家仁(1990) 食品官能檢查手冊。食品工業發展研究所，新竹、台灣，P10-13。 13. 彭瑞森(1994) 乳酸菌應用於冷藏食品腐敗之抑制。食品工業，26(12):46-52。 14. 程竹青(1987) 肉類香氣。食品香料化學與加工。115-131。 15. 黃加成(1991) 乳酸菌之特性與利用。雜糧與畜產，221:21-28。 16. 黃加成、蘇和平、林慶文(1998) 中式乳酸菌發酵香腸於乾燥及熟成期間之蛋白質分解性。中華農學會報，184:1-13。 17. 黃加成(1998) 乳酸菌於中式香腸應用性之探討。生命科學簡訊，12(11):5-8。 18. 黃加成、林慶文(1992) 乳酸菌發酵香腸肉發酵期間品質之變化。食品科學，19(3):417-425。 19. 黃加成(1993) 應用乳酸菌於中式香腸之研究。台灣大學畜產學研究所，博士論文。 20. 黃嘉源、康建智(1998) 食品生物防腐劑-細菌素。水產食品，P102-117。 21. 黃翠萍、邱再預、沈孜徽、陳炳宗、李樹其(1992) 市售肉製品中防腐劑及保色劑含量之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報，10:55-60。 22. 黃錦城(1999) 利用乳酸菌生產細菌素抑制冷藏即食食品病原菌之生長。科學與技術，31(2):27-32。 23. 郭秀蘭、陳明造、劉登城(1999) 微球菌元對香腸原料肉醃漬期間脂肪之影響。中華農學會報，188:60-69。 24. 施宗雄(1998) 台灣乳酸菌類研究之介紹及在飼料添加劑上之應用。生物產業，9(4):239-245。 25. 廖啟成(1998) 乳酸菌之分類及應用。食品工業，30(2):1-10。 26. 劉怡菁(2001) 不同保護劑的添加對乾燥 *Lactobacillus acidophilus* CCRC 10695 菌株在貯藏過程中的影響。中興大學食科所，碩士論文。 27. 劉登城、楊瑩蓉、陳明造、郭秀蘭(1997) 火腿及中式香腸膨包中異型發酵之乳酸菌屬的分離及鑑定。中華農學會報，179:44-57。 28. 劉瑞珍、陳若菁、黃祥吉、林德育、戴謙(1998) 利用逢機複製DNA片段多態型分析近親台灣土雞之遺傳相似性。中華農學會報，186:89-98。 29. 蔡英傑(1998) 乳酸菌與益生菌。生物產業，9(2):98-104。 30. Anu Tilsas-Timisjarvi and Tapani Alatossava (1998) Strain-Specific Identification of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with Randomly Amplified Polymorphic DNA-Derived PCR Primers. Applied and Environmental Microbiology. 64(12):4816-4819。 31. Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., and Lindgren, S. (1989) Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microb. Ecol. Health Dis. 2, 131-136。 32. Argenton, F., De Mas, S., Malocco, C., Dalla Valle, L., Giorgetti, G. and Colombo, L. (1996) Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for hybridization tests and PCR-based diagnosis of *Yersinia ruckeri*. Dis Aqu. Organism. 24:121-127。 33. Acyele Nigatu,

Siv Ahrne, Goran Molin (2000) Temperature- Dependent Variation in API 50 CH Fermentation Profiles of Lactobacillus Species. *Current Microbiology*. 41 :21-26.

34. Bacus, J. (1986) Utilization of Microorganisms in Meat Processing 2nd, ed. A Hand Book for Meat Plant Operator. Research Studies Press Ltd., John Wiley & Sons INC. New York.

35. Bacus, J., (1984) Meat fermentation. *Food Technol.* 38: 59-63.

36. Broughton, D. J. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food technol.* 1:100-117.

37. Baird-Parker, A. C. (1980) Organic acids. In: *Microbial Ecology of Food* (Silliker, J. H., Ed.) pp. 126-135. Academic Press, New York.

38. Brandt, M. E., Padhye, A. A., Mayer, L. W., and Hollo-way, B. P. (1998) Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 36:2057-2062.

39. Blickstad, E., Enfors, S. O., and Molin, G. (1981) Effect of hyperbaric carbon dioxide pressure on the microbial flora of pork stored at 4 or 14 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 50:493-504.

40. Chang, S. S. and Peterson, R. J. (1977) Symposium: the basis of quality in muscle foods: recent developments in the flavor of meat. *J. Food Sci.*, 42:298.

41. Caetano-Anolles, G., B. J. Bassam, and P. M. Gressof. (1991) DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:294-307.

42. Carol A. Van Reenen and Leon M. T. Dicks (1996) Evaluation of Numerical Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a Method to Differentiate *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *CURRENT MICROBIOLOGY*. 32:183-187.

43. Daba, H., S., Pandian, J. F., Gosselin, R. E., Simard, J., H., and Lacroix, C. (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12):3450-3455.

44. Demeyer, D. I., Verplacetese, A., and Gistelinck, M. (1987) Fermentation of meat ; an integrated process. *Process. Proc.* 33th Int. Congress Meat Sci, Technol. Helsinki, pp.241~247.

45. Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164- 167.

46. Davis, D. B., Dulbecco, R., Eisen, N. H., and Ginsberg, S. H. (1990) *Microbiology*. 4th (ed.) Lippincott Company, E. Washing- ton Squaren, Philadelphia, PA.

47. Fery, W. (1983) Starter cultures for raw sausage production. *Die Fleischerei* (translation) 2:5-6.

48. Farber, J. M. and Addison, C. J. (1994) RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* 77:242-250.

49. Fani, R., Damiani, G., Di Serio, C., Gallori, E., Grifoni, A. and Bazzicalupo, M. (1993) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for micro-organisms. *Mol. Eco.* 2:243-250.

50. Frank, J. F. and Marth, E. H. (1977) Inhibition of enteropatho- genic *Escherichia coli* by homo fermentative lactic acid bacteria in skim milk. *J. Food Prot.* 40: 749-753.

51. Geisen, R., Lucke, F. K. and Krokkel. L. (1992) Stater and protec- tive culture for meat and meat products. *Fleischwirtsch.* 72:894- 898.

52. Griffard, C. J., Dodd, H. M., Horn, N. S., Ladha, A. R., Mackie, A., Gasson, M. J. and Sanders, D. (1997) Structure-function relations of variant and fragment nisins studied with model membrane systems. *Biochem.* 36:3802-3810.

53. Gross, E. and Morell, J. (1971) The structure of nisin J. *Am. Chem. Soc.* 93:4643-4635.

54. Gilliland, S. E. and Speck, M. L. (1977) Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative culture. *J. Food Prot.* 40: 820-824.

55. Hammes, W. P. and Knauf. H. J. (1992). Starter in the processing of meat products. *Proceedings of 38th ICoMST*. 4:101-110. Clermont Ferrand France.

56. Hansen, J. N. (1993) Nisin as a model food preservative. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* 34:69-93.

57. Henning, S., Meta, R. and Hammes, W. P. (1986) Studies on the mode of nisin. *Inter. J. Food Microbiol.* 3:121-134.

58. Hoogenkamp, H. W. (1992) Sausage: past, present and future in vegetable protein (Technology Value in Meat Poultry and Vegetarian Foods). *Protein Technologies International Inc.* p.35-40.

59. Heath, H. (1970) Flavors: a brief consideration of chemistry and technology. *Flavor Ind.* 586.

60. Hornstein, I. and Crowe, P. F. (1960) Flavor studies on beef and pork, *J. Agric. Food Chem.*, 8: 494.

61. Hornstein, I., Crowe, P. F. and Sulzbacher, W. L. (1960) Constituents of meat flavor: beef. *J. Agric. Food Chem.*, 8: 65.

62. Incze, K. (1992) Raw fermented and dried meat products. *Fleisch- wirtsch.* 72:58-62.

63. Jeppesen, V. H. and Huss, H. H. (1993) Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5 °C. *Int ' J. Food Microbiol.* 19:179-186.

64. Jay, J. M. (1982) Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:525-532.

65. Johanna Bjorkroth, Jouko Ridell and Hannu Korkeala (1996) Characterization of *Lactobacillus sake* strains associating with production of rosy slime by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electro- phoresis (PFGE) patterns. *International Journal of Food Microbiology*. 31: 59-68.

66. Kato, T., Tahara, T., Sugimoto, M., and Sato, Y. (1990) Proteo- lysis in semi-dry fermented sausage. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37(9):715-721.

67. Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T. and Katsuya, N. (1969) The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 17:689.

68. Klaenhammer, T. R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337-349.

69. Liestner, L. (1990) Fermentation and Intermediate moisture products. *Proceedings of 36th ICoMST*; 3:842-855.

70. Lucke, F. K. (1985) The microbiology of fermented meat. *J. Sci. Food Agric.* 36:1342-1343.

71. Lucke, F. K. (1986) Microbiological processes in the manufac- ture of dry sausage and raw ham. *Fleischwirtsch.* 66:1505- 1509.

72. Liebich, H. M. Douglas, D. R. Zlatkis, A. Muggler_ Chavan, F. and Donzel, A. (1972) Volatile components in roast beef. *J. Agric. Food Chem.* 20: 96.

73. Marangkey, A. E., Kataok, E., Miyamoto, T. and Nakae, T. (1989) Influence of starter culture on bacterial flora in meat patty prepare from ground beef. *Jap. J. Zotech. Sci.* 60(3): 292-299.

74. Martin, D. R. and Gilliland, S. E. (1980) Inhibition of psy- chrotrophic bacteria in refrigerated milk by lactobacilli isolated from yogurt. *J. Food prot.* 43(9): 675-678.

75. Min, D. B. S., Ina, K., Peterson, R. J. and Chang, S. S. (1977) The alkylbenzene in roast beef. *J. Food Sci.* 42:503.

76. Mandigo, R. (1991) History of meat fermentation. *Meat & Poultry*. 9:12.

77. Montville, J. T. and Kaiser, A. L. (1993) Antimicrobial prote- ins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. In: D. G. Hoover and L. R. Steenson (ed).

78. MacLeod, G. (1986) The scientific and technological basis of meat flavors. In *Developments in Food Flavours*, ed. Brich, G. G. ; Lindley, M. G, Elsevier, London. p191-223.

79. Montville, T. J. and Bruno, E. C. (1993) Common action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3003-3010.

80. Mazurier, S. I., Van de Giessen, A., Heuvelmen, K. and Wernars, K. (1992) RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the needs to purify DNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 14:260-262.

81. Miyamoto, T., Tian, H. Z., Okabe, T., Trevanich, S., Asoh, K., Tomoda, S., Honjoh, K. I. and Hatano, S.

(1998) Application of random amplified polymorphic DNA analysis for detection of Salmonella spp. In foods. J. Food Prot. 61:785-791. 82.

Niinivaara, F. P. (1991) Starter culture in the processing of meat by fermentation and dehydration. Proceedings 44th Annual Reciprocal meat conference. P.59-63. 83. Quere, F., Deschamps, A. and Urdaci, M. C. (1997) DNA probe and PCR-specific reaction for Lactobacillus plantarum. J. Appl. Microbiol. 82:783-790. 84. Stephen, R. (1996) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genomic fingerprinting of Bacillus cereus. Int. J. Food Microbiol. 31:311-316. 85. Shahidi, F. (1989) Flavor of cook meats: in Flavor chemistry. Trend and developments. P.188-201. American Chemical Society. 86. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria bacteriological Reviews. 40 (3):722-756. 87. T. Komprda, J. Neznalova, S. Standara, S. Bover-Cid. (2001) Effect of culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage polican. Meat Science. 59: 267-276. 88. Whitaker, J. R. (1978) Biochemical changes occurring during the fermentation of high-protein food. Food Technol. 32(3):175- 180. 89. Wasserman, A.E.(1979) Symposium on flavor chemical basis for meat flavor:a review. J. Food.Sci , 44: 6. 90. Williams, J. G. K. , A. R. Kubelik, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531- 6535. 91. Welsh, J., and M. McClelland. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213 -7218.