

# 唾液链球菌嗜热亚种发酵乳风味成分分析

王伟军<sup>1</sup>, 李延华<sup>1,\*</sup>, 张兰威<sup>2</sup>, 于俊林<sup>1</sup>

(1. 通化师范学院制药与食品科学系, 吉林 通化 134002

2. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

**摘要:** 本实验使用同时蒸馏萃取-气谱-质谱(SDE-GC-MS)技术对5株唾液链球菌嗜热亚种 *S. t-9*、*S. t-17YA*、*S. t-1703CA*、*S. t-1703D* 和 *S. t-03* 发酵乳中风味物质进行了定性及定量分析, 分别鉴定出24种、20种、13种、20种、21种风味物质, 共涉及6大类: 酸类化合物、酯类化合物、醇类化合物、羰基化合物、芳环和杂环化合物, 35种物质。另外, 5株菌代谢主要风味物质2,3-丁二酮的能力大小为: *S. t-1703D* > *S. t-1703CA* > *S. t-17YA* > *S. t-03* > *S. t-9*, 除 *S. t-9* 菌代谢2,3-丁二酮量较低外, 其它4种菌代谢丁二酮的能力差异不大。

**关键词:** 发酵乳; 风味物质; 唾液链球菌嗜热亚种; SDE-GC-MS

## Study on Flavour Compounds Analysis in Milk by Coculturing with *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus

WANG Wei-jun<sup>1</sup>, LI Yan-hua<sup>1,\*</sup>, ZHANG Lan-wei<sup>2</sup>, YU Jun-lin<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China;

2. College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**Abstract** In this study, 5 milk samples fermented respectively with 5 strains of *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus 9, 17YA, 1703CA, 1703D and 03 were assayed with SDE-GC-MS to assess the difference of the flavour compounds among them. This study identified 24, 20, 13, 20, 21 flavour compounds respectively, including 35 compounds in 6 categories: acids, esters, alcohol, carbonyls, aromatic compounds and heterocyclic compounds. The capability to produce 2, 3-butanedione, the main flavor impact compound, was found in 5 strains: *S. t-1703D* > *S. t-1703CA* > *S. t-17YA* > *S. t-03* > *S. t-9*, but not much difference except the *S. t-9*.

**Key words:** fermented milk; flavor compounds; *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus; SDE-GC-MS (simultaneous distillation/extraction-gas chromatography-mass spectrometry)

中图分类号: 252.42

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0263-04

人类对食品的获取, 不仅是为了满足在生理上对营养物质的需要, 也是心理上的一种享受。消费者对食品的喜爱源自于各种方面, 主要是它的风味。因此, 食品的风味是食品生产者和消费者最为关注的一个问题, 目前国内有关发酵乳风味物质的研究较少, 主要集中在酸奶类产品<sup>[1-2]</sup>和几种风味成分方面<sup>[3-4]</sup>, 这种研究方式能够很好地集中分析酸奶产品中影响风味的物质, 但国内仍没有研究针对发酵乳单菌种风味物进行系统的研究分析。

唾液链球菌嗜热亚种, 原名嗜热链球菌, 是酸奶发酵的两个主要菌种之一, 也是其它发酵乳中的常用菌种, 在工业生产中, 不同的嗜热链球菌菌株有不同的

产香特性。本实验借鉴国内外研究食品风味物质的方法, 选用适当、简便的分离技术对牛奶中风味物质进行处理, 确立风味物质的分析方法, 并进行定性、定量分析, 从而确定不同唾液链球菌嗜热亚种发酵乳中风味物质的组成和含量, 比较出由于菌种不同而造成发酵乳中的风味物质的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

#### 1.1.1 菌种

所用5株唾液链球菌嗜热亚种 (*Streptococcus*

收稿日期: 2007-05-13

作者简介: 王伟军(1979-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为发酵食品与功能食品。E-mail: wangweijunid@sohu.com

\*通讯作者: 李延华(1979-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为发酵食品与乳制品工艺。E-mail: wangweijunid@sohu.com

*salivarius* subsp. *thermophilus*, *S. t*) 为本实验室保藏菌, 即 *S. t*-9、*S. t*-17YA、*S. t*-1703CA、*S. t*-1703D 和 *S. t*-03。

### 1.1.2 试剂

丁酸甲酯(标准品) Sigma公司; 乙醚(色谱纯) 天津市福晨化学试剂厂; 高纯氮气 哈尔滨黎明气体有限公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.1.3 仪器与设备

Agilent气相色谱(GC-6890)-质谱(MS-5973)联用仪 美国安捷伦公司; 同时蒸馏萃取装置 北京博美华龙玻璃仪器有限公司; Tu-1800型紫外、可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 嗜热链球菌发酵乳的制备

称取 40.90g 全脂乳粉溶于 300ml 双蒸水中, 搅拌溶解, 复原乳经 115℃ (0.7MPa) 15min 杀菌后冷却至 44~46℃ 后按 2% 接种发酵剂于 500ml 三角瓶中, 37℃ 发酵凝乳后, 备用。

### 1.2.2 发酵乳中挥发性风味物质的分离

取样品 300ml 用 300ml 水分 3 次洗溶于 1000ml 圆底烧瓶中, 加入 15μl 0.1% 的丁酸甲酯的乙醚溶液(内标), 接入 SDE 装置的一端, 用磁力加热搅拌器加热并搅拌(中速, 95±3℃); 用 100ml 磨口三角瓶取色谱纯乙醚 40ml 接入 SDE 装置的另一端, 用 40±1℃ 水浴加热; 接通循环冷却水。蒸馏萃取 4h, 取下醚瓶, 冷却, 加入 10% 左右的无水硫酸钠, 4℃ 静止 4~7h, 滤纸过滤除去硫酸钠, 用低速高纯氮气吹扫至 500μl 左右, 保存于小型样品瓶中, 气相色谱进样分析。

### 1.2.3 色谱条件

GC-MS 联用仪: Agilent 气相色谱(GC-6890)-质谱(MS-5973N) 联用仪; 色谱柱: HP-INNOWax 毛细管柱; 柱温: 起始温度 60℃, 保持 2min, 然后以 10℃/min 的升温至 200℃.; 载气: 氦气; 氦气流速: 1.5ml/min; 进样口温度: 250℃ 进样量: 1μl; 进样方式: 手动分流比: 50:1; 电离方式: EI 电子能量: 70eV; 接口温度: 280℃ 离子源温度: 200℃。

## 2 结果与分析

灭菌原料乳分别接种 5 株嗜热链球菌发酵后, 经 SDE 分离收集到 500μl 左右的乙醚溶液, 使用 Agilent 气相色谱(GC-6890)-质谱(MS-5973N) 联用仪测定其中的风味物质, 并进行定性和定量分析, 以检测 5 株 *S. t* 菌代谢风味物质的情况。

### 2.1 GC-MS 总离子流图和质谱图的定性分析

风味物质的化学组成根据各自质谱峰在质谱库(NIST)中检索进行定性; 在色谱条件一致的情况下, 对组分质谱图相似度较小的情况下, 比较不同样品间保留时间( $t_R$ )定性。

*S. t*-03 菌发酵乳样品的总离子流图中有 31 个主要峰, 如图 1 所示(其它样品的离子流图略), 经分析其中有 21 种成分属于该发酵乳中的风味物质, 如表 1 所示。

*S. t*-17YA 菌发酵乳样品的总离子流图中出现 28 个主要峰, 分析认为有 20 种成分属于该发酵乳中的风味物质; *S. t*-1703CA 菌发酵乳的总离子流图中出现 21 个主要峰, 分析认为其中有 13 种成分属于该发酵乳中的风味物质; *S. t*-1703D 菌发酵乳的总离子流图中出现 31 个主要峰, 分析认为其中有 20 种成分属于该发酵乳中的风味物质; *S. t*-9 菌发酵乳的总离子流图中出现 41 个主要峰, 分析认为其中有 24 种成分属于该发酵乳中的风味物质。

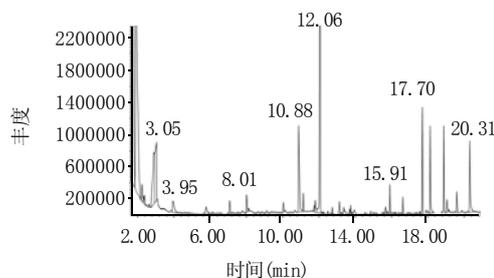


图 1 *S. t*-03 菌发酵乳样 GC-MS 分析的总离子流图  
Fig.1 Total ion current (TIC) of milk fermented by *S.t*-03

从表 1 可知, *S. t* 菌种中共鉴定出 35 种与风味有关的成分, 其中酯类 9 种, 醇类和含羟基(非羧基)化合物 7 种, 芳环 1 种; 杂环化合物 5 种, 均为呋喃环类化合物; 短链挥发性脂肪酸 7 种, 为乙酸、丁酸、戊酸、己酸、辛酸、癸酸和一种羟基酸, 羰基化合物 12 种, 除了  $\alpha$ -酮类、含环醛类和长链脂肪醛类外, 是对发酵乳风味贡献较大的双乙酰类, 即 2,3-丁二酮(双乙酰)、2,3-戊二酮、3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)。

### 2.2 风味物质的定量分析

本实验使用峰面积-内标法对所鉴定出的风味物质进行定量, 依据原理: 选择合适物质作为欲测组分的参比物质, 定量加至样品中, 依据欲测组分和参比组分的质量比等于它们相应的峰面积比。本方法克服了标准曲线法中每次样品分析时色谱条件很难一致而引起的定量误差, 且内标法受回收率的影响不大。

5 种 *S. t* 菌发酵乳中共有的风味物质为: 乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙醇、2,3-丁二酮、2,3-戊二酮、2-庚酮、3-羟基-2-丁酮、2-庚酮、乙酸、2-十一酮、己酸、丁二酸二(2-甲基)丙酯、2-十一酮、戊二酸二丁酯、辛

表1 *S.t*菌各菌株之间风味成分及含量比较(μg/ml)  
Table 1 Flavor compounds and their comparison between the *S.t* (μg/ml)

风味成分	<i>S.t</i> -03	<i>S.t</i> -1703CA	<i>S.t</i> -1703D	<i>S.t</i> -9	<i>S.t</i> -17YA
乙酸甲酯	—	—	—	1.540	0.319
乙酸乙酯	7.531	22.198	14.889	—	3.001
乙醇	6.087	9.700	3.675	0.520	0.574
2,3-丁二酮	0.208	0.241	0.243	0.131	0.234
甲苯	—	—	—	—	0.090
2,3-戊二酮	—	0.223	0.085	0.069	0.109
2-庚酮	0.095	—	0.059	0.012	0.090
2,3-二氢吡喃	—	—	—	0.008	—
乙醛	—	—	—	0.012	0.039
3-甲基-3-烯丁醇	—	—	—	0.006	—
3-羟基-2-丁酮	0.165	—	0.051	0.041	0.056
乙氧基乙酸乙酯	—	—	—	0.017	0.462
2-甲基-2-羟基丙酸	—	0.177	0.193	—	—
2-壬酮	0.097	—	0.069	0.007	0.071
乙酸	1.081	1.687	2.152	0.043	0.137
α-呋喃甲醛	0.126	—	0.067	0.034	—
2-丙基戊醇	—	—	—	0.008	—
α-呋喃乙酮	0.039	—	—	0.011	0.409
α-呋喃丙酮	0.044	—	0.027	0.012	—
2-十一酮	0.107	—	0.032	0.005	0.057
丁酸	0.012	—	—	—	—
α-呋喃甲醇	0.043	—	—	—	—
戊酸	—	—	—	0.007	—
2-羟基-2-环戊烯酮	—	—	—	0.006	—
1-十六烯炔	—	0.190	—	—	—
2-十三酮	0.063	—	—	—	—
己酸	0.158	—	0.069	0.022	0.055
丁二酸二-(2-甲基)丙酯	0.102	0.155	0.079	0.079	0.283
2-甲基-丁二酸二-(2'-甲基)丙酯	0.724	1.249	0.742	—	—
戊二酸二丁酯	—	—	—	0.317	1.245
辛酸	0.572	0.224	0.273	0.037	0.194
己二酸二-(2-甲基)丙酯	0.604	1.450	0.832	0.136	0.485
十六醛	0.122	0.555	0.099	—	—
十六酸甲酯	—	—	0.112	—	—
癸酸	0.700	0.431	0.229	—	0.129

酸、己二酸二(2-甲基)丙酯、癸酸(表1)。

*S.t*-03、*S.t*-1703CA、*S.t*-1703D三菌株产乙醇含量明显高出另外两株菌；5株*S.t*菌代谢乙酸的差异较明显，含量从0.043μg/ml到2.152μg/ml不等，离散度较大；在几种*S.t*菌发酵乳都检测出双乙酰类化合物：2,3-丁二酮、2,3-戊二酮、3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)，且除*S.t*-9菌外双乙酰类化合物的代谢情况相近，2,3-戊二酮和3-羟基-2-丁酮在各菌种间的差异也很小；发酵乳中还检出种类较多的呋喃杂环化合物，如：α-呋喃甲醛、α-呋喃乙酮、α-呋喃丙酮、α-呋喃甲醇，它们在不同菌之间的差异较大，因此，有些菌种未检出可能是因为含量较少；此外*S.t*菌发酵乳中，检测出的

短链挥发性脂肪酸种类也较多：共6种，即C<sub>2</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>10</sub>，但丁酸和戊酸含量非常低，略超出检测限。

### 2.3 嗜热链球菌的产香特性

发酵乳风味物质为数不多的研究中，有关酸奶的报道最为详细，普遍认为给予酸奶典型风味的成分是*S.t*菌和*L.b*菌产生的乳酸和各种挥发性有机香气成分<sup>[5-6]</sup>。虽已鉴定出酸奶中大量的挥发性有机成分，但只有少数几个被证明对整体香气起确定性影响，因为它们有相对较高的含量，且在研究酸奶和相似产品时恰好也有这些成分，如挥发性酸类和羰基化合物(乙醛和双乙酰)。

大多数研究认为乙醛的最主要来源是保加利亚亚种分泌的苏氨酸醛缩酶(threonine aldolase)—催化苏氨酸合成乙醛<sup>[7-8]</sup>。嗜酸乳杆菌产生的乙醇脱氢酶能将乙醛转化成乙醇<sup>[9]</sup>，因此由嗜酸乳杆菌生产的酸奶不会有典型的酸奶味。也有研究者发现*S.t*和*L.b*这两种菌都会产生这种酶<sup>[10]</sup>。山羊奶酸奶中乙醛含量较低，这是因为牛奶中富含甘氨酸，而甘氨酸能抑制苏氨酸醛缩酶的活性<sup>[11]</sup>。在本实验中没有检测到乙醛，经分析得出两个可能原因：一种可能是嗜热链球菌发酵乳中乙醛含量没有达到检测限，另一种可能是由于同时蒸馏萃取时温度(40±1℃)高于乙醛的挥发温度(28℃)，在长时间萃取时乙醛损失。

另一类重要的羰基化合物为双乙酰类物质，在酸奶风味形成中，人们对双乙酰作用持不同观点：有研究者认为只有乙醛含量很低时，双乙酰才被看作是主要的风味成分<sup>[12]</sup>；然而也有人认为它是风味形成的最主要成分<sup>[13]</sup>。嗜热链球菌发酵乳中2,3-丁二酮和2,3-戊二酮含量范围分别为0.131~0.243μg/ml和0.069~0.223μg/ml，与文献资料结果相近。Beshkova D在研究嗜热链球菌发酵乳和普通酸奶发酵中双乙酰含量的变化范围分别是21.0~33.0μg/100g和68.0~165.0μg/100g，原因为嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌共生促进双乙酰的合成<sup>[14]</sup>。

### 3 结论

3.1 由于牛奶中的物质呈多种分散状态，分离难度很大，使用同时蒸馏萃取装置解决了气谱分析前挥发性风味物质的分离问题。

3.2 本实验确定了气谱-质谱联机技术在发酵乳风味物质检测中的操作条件。

3.3 使用SDE-GC-MS法测定出5株嗜热链球菌发酵乳中风味物质，从风味物质数量及主要风味物质含量两个方面考虑，*S.t*-9、*S.t*-17YA、*S.t*-1703D菌发酵乳的产香特性较*S.t*-1703CA和*S.t*-03菌发酵乳好。

### 参考文献：

- [1] 余华. 酸奶风味的形成及控制[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 1999, 18(4): 19-21.
- [2] 华朝丽, 赵征. 瑞士乳杆菌、丁二酮乳链球菌混合培养制作酮香型酸奶的研究[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(2): 17-20.
- [3] 吕加平, 骆承库. 乳酸菌发酵乳中挥发性风味物质的动力学分析[J]. 食品科学, 1998, 19(10): 13-16.
- [4] 宋焕禄. 乳酸菌发酵产生丁二酮的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(3): 47-50.
- [5] BESHKOVA D, SIMOVA E. Production of flavour compounds by yogurt starter cultures[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1998, 20: 180-186.
- [6] POLLIEN P, OTT A, MONTIGON F. Hyphenated headspace-GC-Sniffing technique: screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 441-450.
- [7] RAYA R, MANCA D, NADRA M. Acetaldehyde metabolism in lactic acidbacteria[J]. Milchwissenschaft, 1986, 41: 397-399.
- [8] LO C G, LEE K D, RICHTER L, et al. Influence of guar gum on the distribution of some flavor compounds in acidified milk products[J]. J Dairy Sci, 1996, 79: 2081-2090.
- [9] MARCH E H. Applied dairy microbiology[M]. Marcel Dekker, INC, 1998: 131-133.
- [10] MARRANZINI R, SCHMIDT R. Effect of threonine and glycine concentrations on threonine aldolase activity of yogurt microorganisms during growth in modified milk prepared by ultrafiltration[J]. J Dairy Sci, 1989, 72: 1142-1148.
- [11] RYSSTAD G, KNUTSEN W, ABRAHAMSEN R. Effect of threonine and glycine on acetaldehyde formation in goats' milk yogurt[J]. J Dairy Res, 1990, 57: 401-411.
- [12] RYSSTAD G, ABRAHAMSEN R. Formation of volatile aroma compounds and carbon dioxide in yogurt starter grown in cows' and goats' milk [J]. J Dairy Res, 1987, 54: 257-266.
- [13] KNEIFEL W, ULBERTH F. Aroma profiles and sensory properties of yogurt and yogurt-related products. I. screening of commercially available starter cultures[J]. Milchwissenschaft, 1992, 47: 362-365.
- [14] BESHKOVA D, SIMOVA E, FFENGOVA G. Production of flavour compounds by yogurt. starter cultures[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1998, 20: 180-186.