

# 赛里木酸乳原籍菌种发酵乳主体风味成分分析

雷华威, 陈晓红, 李 伟, 王 研, 彭 菁, 李 顺, 董明盛\*  
(南京农业大学食品科技学院 食品微生物研究室, 江苏 南京 210095)

**摘 要:** 利用分离自赛里木酸乳的乳酸菌单独及其与酵母菌组合发酵牛乳, 采用固相微萃取法(SPME)结合气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术检测其发酵产生的挥发性风味成分。结果表明, 瑞士乳杆菌MB 2-1(*Lactobacillus helveticus* MB 2-1)单独发酵主要产生挥发性脂肪酸, 其中乙酸相对含量最高; 瑞士乳杆菌与嗜热链球菌MB 5-1(*Streptococcus thermophilus* MB 5-1)混合发酵时酸类物质相对含量下降而酮类物质大幅提高, 其中3-羟基-2-丁酮是主体风味物质; 瑞士乳杆菌、嗜热链球菌和马克斯克鲁维酵母菌Y51-1(*Kluyveromyces marxianus* Y51-1)3菌共酵形成11种风味物质, 包括酸类、醇类、酯类和酮类化合物, 其中乙醇、乙酸乙酯和3-羟基-2-丁酮是主体风味物质; 而市售酸乳中检测出9种主要挥发性化合物, 其中双乙酰是主体风味物质。本研究结果说明赛里木酸乳作为我国本土发酵乳制品, 其发酵菌群、感官特征及主体风味物质与普通酸乳存在明显差异。

**关键词:** 赛里木酸乳; 瑞士乳杆菌; 嗜热链球菌; 马克斯克鲁维酵母菌; 风味成分; SPME-GC-MS

## Analysis of Main Flavor Components in Milk Fermented by Original Strains from Sayram Kettek

LEI Hua-wei, CHEN Xiao-hong, LI Wei, WANG Yan, PENG Jing, LI Shun, DONG Ming-sheng\*  
(Laboratory of Food Microbiology, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The major flavor components in milk fermented by lactic acid bacteria alone or together with yeast isolated from Sayram Kettek were analyzed by solid-phase micro-extraction (SPME)-gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results showed that volatile fatty acids were mainly produced in milk fermented by *Lactobacillus helveticus* MB 2-1 alone, of which acetic acid was the major component. In milk fermented by *Lactobacillus helveticus* MB 2-1 and *Streptococcus thermophilus* MB 5-1 together, the content of acids showed an obvious decrease while ketones indicated a significant increase; meanwhile, 3-hydroxy-2-butanone was the major flavor compound. Totally 11 kinds of volatile components were detected in milk fermented by *L. helveticus* MB 2-1, *S. thermophilus* MB 5-1 and *Kluyveromyces marxianus* Y51-1, including acids, alcohols, esters and ketones, of which the major flavor components were ethanol, acetic acid, ethyl ester and 3-hydroxy-2-butanone. Only 9 volatile components were detected in yogurt from the market, of which 2,3-butanedione was the major flavor compound. This study further illustrated that Sayram Kettek is a unique local fermented dairy product in China. There was a significant difference in fermentation microflora, sensory characteristics and major flavor components between Sayram Kettek and common yogurt.

**Key words:** Sayram Kettek; *Lactobacillus helveticus*; *Streptococcus thermophilus*; *Kluyveromyces marxianus*; flavor components; solid-phase micro-extraction (SPME)-gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

中图分类号: TS252.54

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)20-0127-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201320025

赛里木酸乳(Sayram Kettek)是一种源自新疆阿克苏市拜城县的传统发酵乳制品。高品质赛里木酸乳是采用本地黄牛乳经天然发酵制成, 其风味独特, 深受大众喜爱。由于赛里木酸乳是天然发酵饮品, 其微生物构成十分复杂。对赛里木酸乳原籍菌种进行的分离和鉴定的研究发现, 瑞士乳杆菌、嗜热链球菌以及酵母菌为其优势

原籍菌种<sup>[1]</sup>。但是, 这些原籍菌种的单独或混合发酵对赛里木酸乳特征风味形成的贡献还一无所知。

固相微萃取技术(solid-phase micro-extraction, SPME)是一项新型的试样分析前处理技术, 具有无需溶剂、取样灵活、灵敏度高、操作方便等特点, 可直接与气相色谱质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)等

收稿日期: 2012-09-14

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100903); 江苏省自然科学基金项目(BK2011651);

教育部博士点基金(新教师类)项目(20110097120028); 南京农业大学青年科技创新基金项目(KJ2010018)

作者简介: 雷华威(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物、食品科学。E-mail: leihuaweilq@sina.com

\*通信作者: 董明盛(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: dongms@njau.edu.cn

联用,对于小分子质量、高挥发性和大分子质量、高沸点的化合物具有较低的检出限<sup>[2-4]</sup>,非常适于在乳与乳制品风味研究中应用<sup>[5]</sup>。目前,国内外对发酵乳风味物质的研究主要集中在发酵菌种、添加大豆、储存期等条件下对风味物质的影响或变化<sup>[6-9]</sup>。有关本土赛里木酸乳风味物质分析的系统研究未见报道。

本研究利用分离自赛里木酸乳中的瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和马克思克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces marxianus*)组合发酵,以市售鲜牛乳为原料,按照最优酸乳生产工艺自制原味赛里木发酵乳,利用SPME技术对发酵乳进行挥发性风味物质富集,用GC-MS进行组分分析,旨在准确了解赛里木酸乳中各种菌种的作用,以及赛里木酸乳主要风味物质的组成与特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus* MB 2-1; 以下简称MB 2-1)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus* MB 5-1; 以下简称MB 5-1)和马克思克鲁维酵母菌(*Kluyveromyces marxianus* Y51-1; 以下简称Y51-1)均为本实验室保存菌种; 纯牛乳、酸乳 市购。

### 1.2 仪器与设备

SPME手动进样柄、75 $\mu$ m carboxen/polydimethylsiloxane(CAR/PDMS)萃取头 美国Supelco公司; 1200L型气相色谱-质谱联用仪、VF-5ms石英毛细管柱(30m $\times$ 0.25mm, 0.25 $\mu$ m) 美国瓦里安公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 赛里木酸乳制作工艺流程

加糖  
↓  
鲜牛乳→过滤→均质→灭菌→冷却→投入发酵剂→分装→发酵→后熟→成品

工艺中加糖量为6.7%时,赛里木酸乳感官品质最佳。灭菌方式采用巴氏杀菌,即75 $^{\circ}$ C, 60s。待牛乳冷却到40 $^{\circ}$ C,接入菌种,接种量为5%。在40 $^{\circ}$ C培养箱中发酵4~6h,发酵酸度达到80~90 $^{\circ}$ T, pH值至4.6,即为酸乳凝乳。在4 $^{\circ}$ C环境中冷藏后熟24h,即为成品凝固型赛里木酸乳。

#### 1.3.2 色谱条件

色谱柱: VF-5ms石英毛细管柱(30m $\times$ 0.25mm, 0.25 $\mu$ m); 升温程序: 40 $^{\circ}$ C保持3min,以6 $^{\circ}$ C/min升至120 $^{\circ}$ C,再以10 $^{\circ}$ C/min升至250 $^{\circ}$ C/min,保持10min; 汽化室温度250 $^{\circ}$ C; 载气为(He)流速1mL/min,恒压35kPa; 不分流进样。

#### 1.3.3 质谱条件

正离子电子轰击,发射电流200 $\mu$ A; 电子能量70eV; 进样温度250 $^{\circ}$ C; 源温度200 $^{\circ}$ C; 电子倍增器电压350V; 质量扫描范围33~450u。

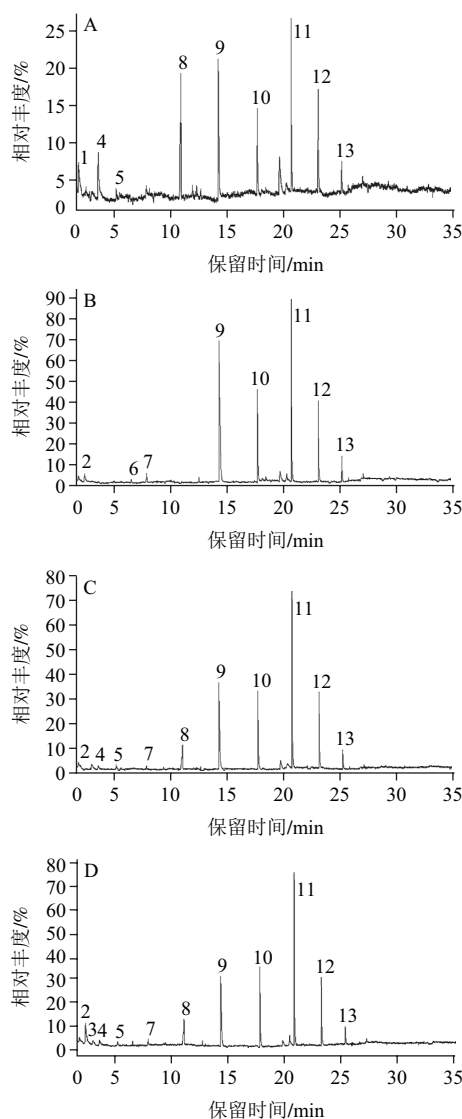
### 1.3.4 数据处理

样品经GC-MS石英毛细管柱程序升温分离,采集到总离子流图,各谱峰相应的质谱图由Xcalibur软件系统完成,未知化合物经计算机检索的同时与NIST 谱库和Wiley 谱库相匹配,当正反匹配度均大于800(最大值1000)时参考文献[10]及标准图谱<sup>[11]</sup>确认鉴定结果,按照各组分峰面积归一化法计算各组分相对含量(每种风味物质组分峰面积占离子色谱图中所有风味物质总峰面积的百分比)。

## 2 结果与分析

### 2.1 总离子流色谱图

采用SPME-GC-MS分离鉴定鲜牛乳、光明酸牛乳和赛里木酸乳3种实验样品风味成分的总离子流色谱图见图1。



A.市售原味酸乳; B. MB 2-1发酵乳; C. MB 2-1+MB 5-1混合发酵乳; D. MB 2-1+MB 5-1+Y51-1混合发酵乳。

图1 不同样品的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of different fermented milk samples

由图1可知, 3种不同菌种制作的赛里木酸乳和市售原味酸乳试样的总离子流图基本相同, 风味物质种类均较为丰富。

## 2.2 不同菌种发酵制作的赛里木酸乳中主体挥发性成分分析

经GC-MS检测, 在3种不同菌种及其菌种组合发酵制作的赛里木酸乳以及市售酸乳样品中共检测出13种主要挥发性化合物, 其中醇类物质1种、酯类化合物2种、酮类物质5种、酸类物质5种。4份样品中各种化合物的种类及其相对含量见表1。

表1 不同样品GC-MS分析结果

Table 1 Results of GC-MS analysis for different fermented milk samples

编号	化合物名称	分子式	保留时间/min	相对含量/%			
				市售酸乳	赛里木酸乳(MB 2-1)	赛里木酸乳(MB 2-1+MB 5-1)	赛里木酸乳(MB 2-1+MB 5-1+Y51-1)
1	2-丙酮	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	1.800	8.30	—	—	—
2	乙酸乙酯	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	2.421	—	2.36	2.33	8.37
3	乙醇	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	3.071	—	—	—	2.15
4	2,3-丁二酮(双乙酰)	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	3.664	9.19	—	0.97	2.85
5	2,3-戊二酮	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	5.277	1.19	—	1.49	1.43
6	乙酸异戊酯	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	6.641	—	0.59	—	—
7	2-庚酮	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	7.974	—	1.19	0.56	0.75
8	3-羟基-2-丁酮	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	11.092	19.31	—	8.76	8.43
9	乙酸	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	14.680	17.76	44.89	31.59	23.69
10	丁酸	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	17.946	7.70	10.94	13.10	12.53
11	己酸	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	20.996	13.27	20.99	21.54	22.42
12	辛酸	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	23.417	9.65	10.00	12.09	11.19
13	正癸酸(十碳酸)	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	25.538	2.964	3.33	3.85	3.60

注: —, 未检测到挥发性化合物。下同。

### 2.2.1 瑞士乳杆菌MB 2-1发酵酸乳主体风味物质分析

从图1、表1可以看出, MB 2-1发酵乳含有8种挥发性化合物, 其中酸类物质占该样品风味物质总含量的90.15%, 这主要是由于MB 2-1是一株产酸能力强的菌株。但是有研究报道短链低分子质量脂肪酸与乙酸、双乙酰、3-羟基-2-丁酮相比, 挥发性低, 气味不明显, 所以不被视为酸乳的主要风味物质<sup>[12]</sup>, 因此市售原味酸乳酸味物质含量相对较高但并非主要风味影响物质。但它们却是赛里木酸乳的主要风味物质, 使其具有浓厚的特征乳酸味。研究认为, 挥发性脂肪酸可以来自于中性脂肪和磷脂的降解和氨基酸脱氨反应, 或来自于微生物的生长繁殖, 而一些低分子质量的挥发性脂肪酸则更有可能来自于微生物的作用<sup>[13]</sup>。在酸乳中, 乳糖的转化和一定程度的脂肪分解及氨基酸的转化, 可能是生成挥发性脂肪酸的来源<sup>[13]</sup>。挥发性脂肪酸大量地生成乙酸, 其次生成己酸、癸酸、丁酸等。在短链脂肪酸中, 乙酸是MB 2-1发酵乳中含量最多的风味物质, 占该样品风味物质总含量的44.89%。乙酸有强烈刺激性气味, 这与赛里木酸乳的感官评定味感偏酸是一致的<sup>[12]</sup>。

### 2.2.2 瑞士乳杆菌MB 2-1和嗜热链球菌MB 5-1混合发酵乳主体风味物质分析

由图1、表1可知, MB 2-1和MB 5-1混合发酵乳含有

10种挥发性化合物。与MB 2-1单独发酵乳相比, MB 2-1和MB 5-1混合发酵乳中酸类化合物相对含量明显下降, 酮类化合物相对含量大幅上升, 并且检测到3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)和2,3-丁二酮(双乙酰)化合物, 其中3-羟基-2-丁酮含量较高, 占该样品风味物质总含量的8.76%。双乙酰是大多数混合发酵的特征效应化合物<sup>[13-14]</sup>, 3-羟基-2-丁酮是嗜热链球菌发酵糖类时产生的特征风味化合物<sup>[15-16]</sup>, 其中3-羟基-2-丁酮具有强烈的奶油香气<sup>[17-18]</sup>, 对增加酸乳的奶香味发挥了重要作用。

### 2.2.3 瑞士MB 2-1、嗜热链球菌MB 5-1及和马克斯克鲁维酵母菌Y51-1混合发酵乳主体风味物质分析

从表1可知, MB 2-1+MB 5-1+Y51-1混合发酵乳中乙酸乙酯、双乙酰相对含量有了大幅提高, 分别为该样品风味物质总含量的8.37%和2.85%, 并且产生了乙醇风味化合物。由于MB 2-1和MB 5-1均属于同型发酵, 在发酵过程中不会产生乙醇。因此, MB 2-1+MB 5-1+Y51-1混合发酵乳的乙醇主要来源于Y51-1对乳糖或是氨基酸和脂肪的发酵代谢作用<sup>[19]</sup>。乙醇具有特殊的、令人愉快的香味, 使得赛里木酸乳有一种清爽、刹口性。

## 2.3 不同菌种发酵制作的赛里木酸乳中挥发性成分构成比较

3种不同菌种及其菌种组合发酵制作的赛里木酸乳以及市售酸乳样品中检测出的风味化合物相对含量见表2。

表2 不同酸乳样品中风味化合物种类的相对含量

Table 2 The contents of different flavor components in different fermented milk samples

化合物	相对含量/%			
	市售酸乳	赛里木酸乳(MB 2-1)	赛里木酸乳(MB 2-1+MB 5-1)	赛里木酸乳(MB 2-1+MB 5-1+Y51-1)
醇类	—	—	—	2.15
酯类	—	2.95	2.33	8.37
酮类	37.99	1.19	11.78	13.46
酸类	51.34	90.15	82.17	73.43
各种物质种类总数	9	8	10	11

由表2可知, 不同菌种单独以及组合发酵的赛里木酸乳中主要风味成分包括酯类、酸类及酮类化合物, 而醇类化合物只存在于MB 2-1+MB 5-1+Y51-1混合发酵乳中。风味物质最丰富的是由MB 2-1+MB 5-1+Y51-1混合发酵制作的赛里木酸乳, 含有11种。市售酸乳主要风味化合物是酮类和酸类, 不含有酯类和醇类化合物。

在赛里木酸乳中, 由于MB 2-1是一株产酸能力较强的菌株, 所以有MB 2-1参与发酵的酸乳中挥发性脂肪酸含量都较多。酯类则是赛里木酸乳的特征性风味物质, 未在市售酸乳中检出。MB 2-1+MB 5-1+Y51-1混合发酵乳中酯类物质含量最高, 达该样品风味物质总含量的8.37%。酯类是构成赛里木酸乳风味的必要成分, 其适中的含量会增添酸乳香味, 使酸乳丰满协调。由于传统酸乳一般都是多菌种混合发酵的天然发酵产品, 因此MB

2-1+MB 5-1+Y51-1混合发酵乳的风味理论上最接近于赛里木酸乳原始风味<sup>[20]</sup>。

### 3 结 论

本实验通过对赛里木酸乳的风味物质成分分析,研究了不同菌种发酵对酸乳风味的影响,并确定了酸乳的主体风味物质,包括醇类、酸类、酯类、酮类化合物。醇类化合物是赛里木酸乳的特有物质,醇类物质比较柔和<sup>[21]</sup>,使酸乳口感更加清爽。此外,除了双乙酰、3-羟基-2-丁酮等特征性风味物质,酯类化合物也是赛里木酸乳特征风味的特有组成成分。部分特殊独有且高含量的酯类使得酸乳闻起来更加柔和清香,去除了原有的草腥味,风味明显优于市售酸乳。另外,赛里木酸乳中酸类物质含量最高,可提高产品的风味组杂性,促进酸乳特有感官风味的形成。本研究为传统乳制品的现代化工艺改造以及赛里木酸乳的工业化生产提供了理论和现实依据。

### 参考文献:

- [1] 玛依诺·木图拉. 赛里木酸奶中产粘乳酸菌的分离筛选及发酵工艺的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 25-41.
- [2] STEFFEN A, PAW L. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase micro-extraction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(8): 2187-2193.
- [3] 代敏, 霍贵成. 固相微萃取在乳制品风味分析中的应用[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(3): 39-42.
- [4] van AARDT A M, DUNCAN S E, BOURNE D, et al. Flavor threshold for acetaldehyde in milk, chocolate milk, and spring water using solid-phase micro extraction gas chromatography quantification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3): 1377-1381.
- [5] 刘源, 周光宏, 徐幸莲. 固相微萃取及其在食品分析中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(7): 83-87.
- [6] IMHOF R, GLATTLI H, BOSSET J O. Volatile organic aroma compounds produced by thermophilic and mesophilic mixed strain dairy starter cultures[J]. LWT-Food Science and Technology, 1994, 27(5): 442-449.
- [7] 李锋, 华欲飞. 大豆酸奶的风味物质研究[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(12): 19-21.
- [8] 张佳, 马永昆, 崔凤杰, 等. 乳酸菌发酵酸豆乳香气成分分析及评价[J]. 食品科学, 2010, 31(20): 298-302.
- [9] 刘景, 王荫榆, 郭本恒, 等. 发酵乳储存期内风味模型的建立与检验[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 296-300.
- [10] 张国农, 顾敏锋, 李彦荣, 等. SPME-GC/MS测定再制奶酪中的风味物质[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(9): 52-56.
- [11] 施钧慧, 汪聪慧. 香料质谱图集[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 12-45.
- [12] 葛武鹏, 李元瑞, 陈瑛, 等. 牛奶奶酸乳挥发性风味物质固相微萃取GC/MS分析[J]. 农业机械学报, 2008, 39(11): 64-69; 75.
- [13] FUNEBO T, OHLSSON T. Microwave-assisted air dehydration of apple and mushroom[J]. Journal of Food Engineering, 1998, 38(3): 353-367.
- [14] WANG Jun, SHENG Kuichuan. Far-infrared and microwave drying of peach[J]. LWT-Food Science and Technology, 2006, 39(3): 247-255.
- [15] 陈历俊, 乔为仓. 酸乳加工与质量控制[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2010: 238.
- [16] 韩建春, 邵美丽, 郭鸽, 等. 酸奶加工技术[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2011: 50.
- [17] 王文平, 梁海玲, 姚元华. 木瓜提取物中总黄酮含量的测定[J]. 贵州医药, 2005, 29(6): 546-548.
- [18] 泰米迈, 罗宾. 酸乳科学与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 405-407.
- [19] HAUCK T, BRUHLMANN F, SCHWAB W. Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*: identification of an inter-mediate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3911-3918.
- [20] 丹彤, 包秋华, 孟和毕力格, 等. 发酵乳风味物质乙醛、双乙酰的合成途径及其调控机制[J]. 食品科技, 2012, 37(7): 75-79.
- [21] 章献, 赵勇, 刘源, 等. 2种韩国泡菜挥发性风味物质分析研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 150-156.