

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2018.01.005

文章编号:2095-6002(2018)01-0035-10

引用格式:任为一,李婷,陈海燕,等.不同地域嗜热链球菌在发酵乳制作中产关键性风味物质研究[J].食品科学技术学报,2018,36(1):35-44.



REN Wei-yi, LI Ting, CHEN Haiyan, et al. Study on key flavor compounds in fermented milk production process of *Streptococcus thermophilus* isolated from different areas[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018,36(1):35-44.

不同地域嗜热链球菌在发酵乳制作中产关键性风味物质研究

任为一, 李 婷, 陈海燕, 丹 彤, 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘 要:以来自不同地域的6株嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)为实验菌株,采用固相微萃取与气相色谱-质谱联用技术(SPME-GC-MS)相结合的方法,并结合香气阈值和相对气味活度值(relative odor activity value, ROAV)探讨发酵牛乳中关键性风味物质。结果表明,6株嗜热链球菌发酵乳中共检测出63种挥发性风味物质,包括醛类、酮类、酸类、酯类、醇类、芳香族及烷烃化合物等。其中,双乙酰、乙偶姻、乙醛、2-壬酮等12种挥发性化合物的ROAV值较高($ROAV \geq 1$),对发酵乳总体风味贡献较大。主成分分析和相似度比较分析结果表明,来自同一地域的嗜热链球菌发酵乳中风味化合物之间具有较高的相似性,而不同地域的菌株发酵乳中风味化合物之间相似度较低,说明生长环境压力能够对菌株发酵乳的产香特性产生影响。

关键词:挥发性风味物质;嗜热链球菌;相对气味活度值;色谱指纹图谱;主成分分析

中图分类号:TS252.1; TS252.54

文献标志码:A

嗜热链球菌被公认为是安全的菌种,作为发酵剂菌种被广泛应用于乳制品行业^[1-4]。在发酵过程中,嗜热链球菌可产生胞外多糖、维生素和某些挥发性风味化合物^[5-6]。这些挥发性风味化合物包括酸类、醛类、酮类、醇类和酯类等^[7-9],能够带来良好的口感和风味,是决定乳制品质量的关键因素^[10-11]。虽然乳制品中可检测出多种挥发性化合物,但一些研究人员认为只有少数的挥发性化合物对乳制品的香气有显著影响,如乙酸等^[12-13]。

固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)是一种可以与气相色谱质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrum, GC-MS)连用的新型挥发性化合物萃取技术,具有操作方法简单、灵敏度高等优点,广泛应用在风味检测的各个领域。魏晋梅等^[14]

应用顶空固相微萃取-气相色谱质谱联用技术提取啤特果果肉的挥发性风味物质,并优化了萃取条件,发现啤特果中含量较高的风味物质有己烯酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸乙酯和己酸乙酯等。舒平等^[15]采用固相微萃取和气质联用技术,以1,2-二氯苯作为内标物,建立了乳制品中苯甲酸的检测方法。肖作兵等^[16]利用顶空固相微萃取技术对国产樱桃酒进行分析,发现国产樱桃酒的主要香气成分为乙酸乙酯、辛酸乙酯、苯甲酸乙酯、苯乙醇和DL-柠檬烯等。

目前,国内学者虽然对发酵乳中的风味物质进行了大量研究,但对不同地域分离菌株在发酵过程中产生的风味物质研究很少。本实验采用固相微萃取-气相色谱质谱联用技术对嗜热链球菌发酵乳中

收稿日期:2017-12-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31460446;31471711)。

作者简介:任为一,女,硕士研究生,研究方向为乳品生物技术与加工工程;

*张和平,男,教授,博士,主要从事乳品生物技术方面的研究,通信作者。

的风味物质进行分析,探讨来自不同地域嗜热链球菌在发酵过程中产生的风味物质的差异,同时结合 ROAV 值比较分析发酵乳中的关键风味物质,阐明发酵乳中风味物质的多样性,明确发酵乳的主体特征香气。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用的 6 株嗜热链球菌由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供,菌株来源信息如表 1。实验所用的脱脂乳粉和全脂乳粉由美国 Fonterra 公司生产,MRS 培养基购自英国 Oxoid 公司。

表 1 实验菌株采集地区及 GenBank 号

Tab.1 Collection area and GenBank number of strain

菌株	地区	GenBank 号
G80-5	甘肃省玛曲县阿尼玛乡	HM059003
G81-1	甘肃省玛曲县阿尼玛乡	HM059004
G81-3	甘肃省玛曲县阿尼玛乡	HM059006
MGA47-1	蒙古国肯特省巴音敖包苏木	HM057986
MGB79-3	蒙古国扎布汗省查干海尔汗苏木	HM058262
MGB80-2	蒙古国扎布汗省奥特跟苏木	HM058266

1.2 仪器与设备

气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890B GC system-5977A MSD);色谱柱(HP-5 毛细管柱,30 m×0.25 mm,0.25 μm);手动固相微萃取(SPME)进样手柄(USA,SUP-ELCO);固定搭载装置及 50/30 μm 二甲基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷(divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane,DVB/CAR/PDMS)萃取头;陶瓷加热磁力搅拌器(Corning)。

1.3 实验方法

1.3.1 全脂乳的制备

取适量蒸馏水加热至 50℃,加入 11.5% 全脂乳粉,当水温升至 60℃时加入 6.5% 的蔗糖。充分混合并在 60℃时水合 30 min,接着对全脂乳进行均质。均质压力为低压 15 MPa 和高压 35 MPa,均质 2 次。将均质好的全脂乳在 95℃条件下巴氏杀菌 5 min。巴氏杀菌后将全脂乳急冷,置于 4℃备用。

1.3.2 发酵乳的制备

将在-4℃中冷冻保藏的 6 株实验菌株接种于

脱脂乳培养基中,在 37℃培养 24 h,再接种于 MRS 液体培养基中,37℃培养 24 h,三代时菌株活力达到最大。在 50 mL 和 200 mL MRS 液体培养基中连续扩大培养,离心后收集菌体,加入 PBS 保护剂制成菌悬液。将发酵剂以 5×10⁷ CFU/mL 接种于制备好的全脂乳中,并分装于样品瓶中。将样品置于 42℃培养箱中培养,达到发酵终点(pH 值 4.5)时,停止发酵,在 4℃贮藏。

1.3.3 挥发性风味物质测定

1) 色谱条件。载气为 He,流速 1.0 mL/min;不分流进样,进样口温度 250℃。程序升温方式,起始温度为 35℃,保持 5 min 后以 5℃/min 的速率上升至 140℃,保持 2 min,再以 10℃/min 的速率上升至 250℃,保持 3 min;

2) 质谱条件。全扫描模式,EI 离子源,电子能量 70 eV,离子源温度为 230℃,质量扫描范围 m/z 35~500 U,无溶剂延迟。

3) SPME 萃取条件。萃取头老化:于 250℃进样口老化 30 min。固相微萃取条件:于 50℃磁力搅拌器上吸附 60 min。解吸附条件:250℃条件下解吸附 3 min。

1.3.4 定性与定量分析

1) 定性方法。利用随机携带 Masshunter 工作站 NIST 11 标准库进行自动比对,挑选匹配率≥85%的物质作为鉴定结果,同时依据 Vandendool^[17]的方法测定保留指数(retention indices, RI),再根据文献报道的 RI 值对发酵乳样品中的挥发性风味物质进行再次鉴定。

2) 定量方法。利用面积归一化法计算各组分峰面积百分比(相对含量)。

1.3.5 关键挥发性物质评价

参照刘登勇等^[18]的方法,采用 ROAV 法确定发酵牛乳中关键挥发性风味物质。首先定义对样品风味贡献最大的组分为 ROAV_{max}=100,对其他香气成分则有式(1)。

$$ROAV_i \approx 100 \times \frac{C_i}{C_{\max}} \frac{T_{\max}}{T_i}。$$

(1)

式(1)中:C_i和 T_i分别为各挥发性物质的相对含量,%和相对应的感觉阈值,μg/L;C_{max}和 T_{max}分别为对样品总体风味贡献最大组分的相对含量,%和相对应的感觉阈值,μg/L。

一般认为 ROAV 不小于 1 的组分为所测样品的关键风味化合物,0.1≤ROAV<1 的组分对所测

样品的总体风味具有重要修饰作用^[18]。

1.3.6 GC 指纹图谱相似度计算

采用夹角余弦法分析发酵乳样品 GC 指纹图谱间的相似性,该算法能够反映和识别风味复杂成分在化学组成与含量比例上的相似性。其计算公式如式(2)。

$$C_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^m X_{ik} \cdot X_{rk}}{\sqrt{\sum_{k=1}^m X_{ik}^2 \sum_{k=1}^m X_{rk}^2}}$$

(2)

1.4 数据处理

利用 Excel、SIMCA - P 进行数据处理及主成分

分析,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版,来计算和评价发酵乳样品的 GC 指纹图谱相似性。

2 结果与分析

2.1 GC - MS 结果分析

经 NIST 11 标准库检索各组分挥发性成分,利用面积归一化法计算各组分相对峰面积百分比,如表 2。为进一步确定发酵牛乳的关键性风味物质,结合表 2 所示物质的相对含量和感觉阈值,确定各组分的 ROAV,如表 3。

表 2 嗜热链球菌发酵乳中挥发性风味物质的 GC - MS 鉴定结果

Tab.2 Volatile compounds of *S. thermophiles* fermented milk by SPME - GC - MS

峰	中文名称	英文名称	分子式	RT	RI	参考 RI	菌名					
							G80-5	G81-1	G81-3	MGA47-1	MGB79-3	MGB80-2
醛类化合物												
1	乙醛	Acetaldehyde	C ₂ H ₄ O	1.12	STD	MS. STD	-	-	3.19	-	-	1.77
2	甲氧基乙醛	Acetaldehyde, methoxy-	C ₃ H ₆ O ₂	1.47	STD	MS. STD	-	-	12.83	-	-	-
3	庚醛	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	10.32	900.17	900.00	-	0.26	0.29	-	-	-
4	苯甲醛	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	12.58	960.98	961.00	-	0.49	0.56	0.44	0.43	-
酮类化合物												
1	双乙酰	2,3-Butanedione	C ₄ H ₆ O ₂	2.04	STD	MS. STD	6.30	8.59	10.66	15.05	11.92	5.96
2	2-戊酮	2-Pentanone	C ₅ H ₁₀ O	3.20	668.11	671.00	-	0.76	0.87	1.07	0.65	0.62
3	2,3-戊二酮	2,3-Pentanedione	C ₅ H ₈ O ₂	3.51	692.51	694.00	1.82	3.54	3.85	6.92	6.48	2.53
4	甲基异丁基甲酮	Methyl Isobutyl Ketone	C ₄ H ₈ O ₂	4.20	720.35	-	-	1.29	1.76	-	-	-
5	乙偶姻	Acetoin	C ₆ H ₁₂ O	4.73	738.58	733.00	1.91	5.35	0.28	0.44	14.15	17.38
6	2-庚酮	2-Heptanone	C ₇ H ₁₄ O	9.90	888.91	889.00	10.37	5.71	5.93	10.86	-	-
7	3,5-辛二烯酮	3,5-Octadien-2-one	C ₉ H ₁₈ O	17.02	1 090.14	1 090.00	-	0.66	0.94	-	-	-
8	2-壬酮	2-Nonanone	C ₈ H ₁₂ O	17.55	1 106.08	1 102.00	4.86	2.63	2.98	3.64	2.36	2.49
9	2-十一酮	2-Undecanone	C ₁₁ H ₂₂ O	23.01	1 291.89	1 292.00	0.83	0.38	0.45	0.63	0.35	0.60
10	6-庚基四氢-2H-吡喃-2-酮	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-pentyl-	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	28.83	1 500.68	1 500.00	-	-	-	-	0.23	0.35
酸类化合物												
1	羟基乙酸	Acetic acid, hydroxy-	C ₂ H ₄ O ₃	0.84	STD	MS. STD	3.57	-	-	-	-	-
2	乙酸	Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	2.61	623.24	622.00	0.43	1.02	-	20.96	13.73	6.88
4	丙酮酸	Propanoic acid, 2-oxo-	C ₃ H ₄ O ₃	5.41	761.92	1 249(Methyl Silicone)	-	-	-	-	0.24	-
5	2-甲基丙酸	Propanoic acid, 2-methyl-	C ₄ H ₈ O ₂	6.36	794.64	793.00	-	-	-	4.30	0.91	3.65
6	3-甲基丁酸	Butanoic acid, 3-methyl-	C ₅ H ₁₀ O ₂	9.47	877.70	878.00	-	-	-	3.94	14.60	18.18
7	2-甲基丁酸	Butanoic acid, 2-methyl-	C ₅ H ₁₀ O ₂	10.32	900.11	-	-	-	-	-	2.40	3.76
8	α-甲基巴豆酸	Tiglic acid	C ₇ H ₁₄ O ₂	12.02	945.86	946(OV-101)	-	-	-	-	0.23	-
9	己酸	Hexanoic acid	C ₅ H ₈ O ₂	13.44	984.21	984.00	-	-	-	0.57	-	-
10	庚酸	Heptanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	14.45	1 011.44	1 109.00	-	1.30	1.32	5.04	0.41	0.30
11	辛酸	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	19.76	1 179.13	1 179.00	1.18	0.59	1.16	1.95	1.48	1.10
12	正癸酸	n-Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	24.47	1 346.43	1 349.00	0.20	-	-	-	-	-

续表 2

峰	中文名称	英文名称	分子式	RT	RI	参考 RI	菌名					
							G80-5	G81-1	G81-3	MGA47-1	MGB79-3	MGB80-2
酯类化合物												
1	羧基乙酸乙酯	Acetic acid, hydroxy-, ethyl ester	C ₄ H ₈ O ₃	1.55	STD	MS. STD	2.82	-	-	-	-	-
2	1,2-环氧-3-乙酸丙酯	1,2-Epoxy-3-propyl acetate	C ₅ H ₈ O ₃	2.01	STD	MS. STD	1.82	-	-	-	-	-
3	乙酸乙酯	Ethyl Acetate	C ₄ H ₈ O ₂	2.05	STD	MS. STD	-	-	3.95	-	-	-
4	甲基二乙氧基甲酯	Diethoxymethyl acetate	C ₇ H ₁₄ O ₄	2.07	STD	MS. STD	-	-	3.54	-	-	-
5	丁酸乙酯	Butanoic acid, ethyl ester	C ₆ H ₁₂ O ₂	6.02	782.85	781.00	-	3.82	3.49	-	-	-
6	乙酸丁酯	Acetic acid, butyl ester	C ₆ H ₁₂ O ₂	6.53	800.47	800.00	-	0.47	-	-	-	-
7	乙二醇二甲酸酯	1,2-Propanediol diformate	C ₅ H ₈ O ₄	7.04	813.86	-	-	-	-	3.53	1.44	0.25
8	甲酸辛酯	Formic acid, octyl ester	C ₉ H ₁₈ O ₂	16.65	1 078.93	1 104 (DB-5)	-	-	-	0.90	0.28	-
9	辛酸乙酯	Octanoic acid, ethyl ester	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	19.87	1 182.56	1 191.00	-	-	0.47	-	-	-
醇类化合物												
1	乙醇	Ethanol	C ₂ H ₆ O	1.35	STD	MS. STD	13.50	23.93	21.93	-	-	-
2	异丙醇	Isopropyl Alcohol	C ₃ H ₈ O	1.39	STD	MS. STD	-	10.39	-	-	-	-
3	2-(己氧基)乙醇	Ethanol, 2-(hexyloxy)-	C ₈ H ₁₈ O ₂	1.99	STD	MS. STD	-	3.66	-	-	-	-
4	3-甲基-1-丁醇	1-Butanol, 3-methyl-	C ₅ H ₁₂ O	4.60	734.14	734.00	-	0.28	-	-	-	1.24
5	甲酸盐-3-甲基-1-丁醇	1-Butanol, 3-methyl-, formate	C ₆ H ₁₂ O ₂	6.30	792.44	789.00	-	-	-	1.06	0.77	-
6	正己醇	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	9.09	867.65	868.00	1.91	1.00	1.26	-	-	-
7	4-甲基-正戊醇	1-Pentanol, 4-methyl-	C ₆ H ₁₄ O	9.26	872.24	866.00	-	-	-	-	-	2.51
8	1-庚醇	1-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	12.95	971.01	971.00	2.34	1.20	1.59	0.49	0.31	3.03
9	2-乙基-1-己醇	1-Hexanol, 2-ethyl-	C ₈ H ₁₈ O	14.46	1 013.03	1 014.00	0.28	-	-	-	-	-
10	(E)-3-壬烯-1-醇	3-Nonen-1-ol, (E)-	C ₉ H ₁₈ O	16.11	1 062.75	1 143 (BPX-5)	0.93	-	-	-	-	2.08
11	3,4-二甲基环己醇	3,4-Dimethylcyclohexanol	C ₈ H ₁₆ O	16.93	1 087.36	1 126 (BPX-5)	0.14	-	-	-	-	-
12	1-癸醇	1-Decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	22.68	1 280.46	1 279.00	-	-	-	-	-	0.31
芳香族及烷烃化合物												
1	1-(1-甲基乙氧基)-丙烷	Propane, 1-(1-methylethoxy)-	C ₆ H ₁₄ O	3.57	696.49	708 (Carbowax 20M)	-	-	0.30	-	-	-
2	环庚三烯	1,3,5-Cycloheptatriene	C ₇ H ₈	4.71	737.73	-	5.16	2.58	2.36	-	-	-
3	甲苯	Toluene	C ₇ H ₈	4.99	747.30	757.00	-	4.66	5.22	-	-	-
4	四甲基环氧乙烷	Oxirane, tetramethyl-	C ₆ H ₁₂ O	6.69	804.53	686 (Methyl Silicone)	-	-	-	-	3.19	-
5	乙基苯	Ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	8.15	843.07	843.4 (HP-1)	0.27	0.26	0.48	-	-	-
6	对二甲苯	p-Xylene	C ₈ H ₁₀	8.67	856.56	862.00	0.61	0.60	0.67	-	-	-
7	十二烷	Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	19.83	1 181.41	-	0.42	0.24	-	-	-	-
8	2,3,5,8-四甲基癸烷	Decane, 2,3,5,8-tetramethyl-	C ₁₄ H ₃₀	22.09	1 259.55	1 318 (BPX-5)	0.19	-	-	-	-	-
9	十三烷	Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	22.66	1 279.79	-	0.55	-	0.33	-	-	-
10	2,6,11-三甲基十二烷	Dodecane, 2,6,11-trimethyl-	C ₁₅ H ₃₂	23.34	1 303.91	1 275 (DB-5 MS)	0.23	-	-	-	-	-
含氮及杂环化合物												
1	甲基胂	Hydrazine, methyl-	CH ₆ N ₂	1.00	STD	MS. STD	4.18	-	-	-	-	-
2	氨基脲	Hydrazinecarboxamide	CH ₅ N ₃ O	1.18	STD	MS. STD	5.93	6.59	-	-	-	-
3	甲氧基苯肼	Oxime-, methoxy-phenyl-	C ₈ H ₉ NO ₂	11.05	919.67	-	12.36	4.92	4.05	3.55	3.50	3.47
4	己内酰胺	Caprolactam	C ₆ H ₁₁ NO	21.59	1 242.04	1 244.00	0.48	-	-	-	-	-
其他化合物												
1	2-甲基-1-丁醇-甲醚	2-Ethyl-1-butanol, methyl ether	C ₇ H ₁₆ O	4.42	727.94	782 (VF-5MS)						0.66
2	1-甲基丁基氢过氧化物	Hydroperoxide, 1-methylbutyl	C ₅ H ₁₂ O ₂	5.71	860.35	855.00	0.17	-	-	-	-	-

表 3 嗜热链球菌发酵乳中关键性风味物质及对应 ROAV 值
Tab.3 ROAVs and key flavor of *S. thermophilus* milk fermented

峰	中文名称	英文名称	分子式	感觉阈值	菌名					
					G80-5	G81-1	G81-3	MGA47-1	MGB79-3	MGB80-2
1	乙醛	Acetaldehyde	C ₂ H ₄ O	8.7	-	-	1.218 0	-	-	0.877 0
2	庚醛	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	3	-	0.538 9	0.316 2	-	-	-
3	苯甲醛	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	350	-	0.008 6	0.005 3	0.045 1	0.006 6	-
4	双乙酰	2,3-Butanedione	C ₄ H ₆ O ₂	5.4	6.977 7	9.749 3	6.5490	100	11.694 0	4.759 9
5	2-戊酮	2-Pentanone	C ₅ H ₁₀ O	2150	-	0.002 2	0.001 3	0.017 8	0.001 6	0.001 2
6	甲基异丁基甲酮	Methyl Isobutyl Ketone	C ₄ H ₈ O ₂	800	-	0.009 9	0.0073	-	-	-
7	乙偶姻	Acetoin	C ₆ H ₁₂ O	0.75	15.222 5	43.750 3	1.238 8	21.163 3	100	100
8	2-庚酮	2-Heptanone	C ₇ H ₁₄ O	140	0.442 8	0.250 0	0.140 6	2.784 9	-	-
9	2-壬酮	2-Nonanone	C ₈ H ₁₂ O	5	5.814 0	3.224 1	1.980 7	26.126 1	2.501 8	2.151 3
10	2-十一酮	2-Undecanone	C ₁₁ H ₂₂ O	5.5	0.897 7	0.420 5	0.271 3	4.089 6	0.340 6	0.470 1
11	乙酸	Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	22 000	0.000 1	0.000 3	-	0.034 2	0.003 3	0.001 3
12	2-甲基丙酸	Propanoic acid, 2-methyl-	C ₄ H ₈ O ₂	3	-	-	-	51.436 8	1.611 0	5.253 3
13	3-甲基丁酸	Butanoic acid, 3-methyl-	C ₅ H ₁₀ O ₂	180	-	-	-	0.785 8	0.429 9	0.435 7
14	2-甲基丁酸	Butanoic acid, 2-methyl-	C ₅ H ₁₀ O ₂	2	-	-	-	-	6.350 9	8.108 6
15	己酸	Hexanoic acid	C ₅ H ₈ O ₂	3 000	-	-	-	0.006 8	-	-
16	庚酸	Heptanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂	3 000	-	0.002 7	0.001 5	0.060 3	0.000 7	0.000 4
17	辛酸	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	3 000	0.002 3	0.001 2	0.001 3	0.023 3	0.002 6	0.001 6
18	正癸酸	n-Decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	3 000	0.000 4	-	-	-	-	-
19	乙酸乙酯	Ethyl Acetate	C ₄ H ₈ O ₂	5	-	-	2.621 6	-	-	-
20	丁酸乙酯	Butanoic acid,ethyl ester	C ₆ H ₁₂ O ₂	1	-	23.386 0	11.577 4	-	-	-
21	乙酸丁酯	Acetic acid, butyl ester	C ₆ H ₁₂ O ₂	50 000	-	0.000 1	-	-	-	-
22	乙醇	Ethanol	C ₂ H ₆ O	100 000	0.000 8	0.001 5	0.000 7	-	-	-
23	异丙醇	Isopropyl Alcohol	C ₃ H ₈ O	0.9	-	70.756 3	-	-	-	-
24	3-甲基-1-丁醇	1-Butanol, 3-methyl-	C ₅ H ₁₂ O	320	-	0.005 4	-	-	-	0.016 7
25	正己醇	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	250	0.045 7	0.024 5	0.016 7	-	-	-
26	1-庚醇	1-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	330	0.042 4	0.022 3	0.016 0	0.053 0	0.005 0	0.039 6
27	2-乙基-1-己醇	1-Hexanol, 2-ethyl-	C ₈ H ₁₈ O	270 000	0.000 0	-	-	-	-	-
28	甲苯	Toluene	C ₇ H ₈	200	-	0.142 7	0.086 6	-	-	-
29	乙基苯	Ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	0.016	100	100	100	-	-	-
30	对二甲苯	p-Xylene	C ₈ H ₁₀	68.6	0.052 9	0.053 9	0.032 3	-	-	-
31	己内酰胺	Caprolactam	C ₆ H ₁₁ NO	70	0.041 0	-	-	-	-	-

6 株嗜热链球菌发酵乳中共鉴定出 63 种化合物(表 2),主要包括醛类、酮类、酸类、酯类、醇类以及芳香族及烷烃类等化合物。这些化合物种类繁多,并非每种风味化合物都对发酵乳的风味起决定性作用,这主要是因为各成分的含量不同,只有在其浓度超过阈值时才能被察觉。因此,本实验将 GC-MS 结果与 ROAV 结果相结合,分析嗜热链球菌发

酵乳中的特征性风味化合物。

G80-5 发酵乳中共检测到 30 种挥发性风味物质,主要包括酮类、酸类、酯类、醇类以及芳香族及烷烃类等化合物。其中,双乙酰、乙偶姻、2-壬酮和乙基苯的 ROAV 值大于 1,是 G80-5 发酵乳中的关键风味物质。柠檬酸盐经过发酵形成双乙酰,赋予发酵乳奶油香味^[19],2-壬酮赋予发酵乳果香、清香及

奶油的气息^[20],乙基苯具有芳香气味,这些化合物形成发酵乳的特征风味。除这些关键风味物质外,2-庚酮和2-十一酮的 ROAV 值在 0.1~1,对发酵乳的总体风味起修饰作用。例如,2-庚酮能够赋予发酵乳水果味^[21],2-十一酮具有果香、脂肪香,并带有奶油、乳酪的味道^[22]。本实验中除 G80-5 外,其他 5 株嗜热链球菌发酵乳中均检测到双乙酰,说明发酵乳中的双乙酰主要由嗜热链球菌发酵产生,这与丹彤等^[23]的报道结果较一致。

在 G81-1 发酵乳中共检测到 29 种风味物质,其中有 6 种挥发性化合物 ROAV 不小于 1,分别为双乙酰、乙偶姻、2-壬酮、丁酸乙酯、异丙醇和乙基苯。丁酸乙酯有强烈的果香^[24],异丙醇有类似乙醇的药味酒精味。此外,庚醛、2-庚酮、2-十一酮及甲苯等 4 种风味物质($0.1 \leq \text{ROAV} < 1$)对发酵乳的总体风味起修饰作用。其中,庚醛能赋予发酵乳蜡香及脂肪香^[2],甲苯具有水果甜味^[25]。在 G81-1 发酵乳中检测到的乙醇和异丙醇的相对含量分别达到 23.93% 和 10.39%,明显高于其他菌株发酵乳中乙醇含量。这些醇类的化合物的风味阈值普遍较高,对发酵乳的整体风味贡献较小^[26]。

在 G81-3 发酵乳中共检测到 28 种挥发性风味物质,其中,双乙酰、乙偶姻、2-壬酮、丁酸乙酯、乙酸乙酯和乙醛的 ROAV 值不小于 1,是 G81-3 发酵乳中的关键挥发性化合物。乙酸乙酯是由乙醇与酸类物质发生酯化反应或经化学酯化反应产生的^[27],具有水果香气和白兰地酒样的味道。乙醛作为酸奶的特征性风味物质,能够赋予酸奶清爽的芳香味^[28-29]。在 6 株嗜热链球菌发酵乳中只有 G81-3 和 MGB80-2 发酵乳中检测到乙醛,且相对含量较低,这和王杰等^[30]报道的通常酸奶中的乙醛主要由保加利亚发酵产生的结果较为一致。除这些关键风味化合物外,庚醛、2-庚酮和 2-十一酮的 ROAV 值在 0.1~1,对发酵乳的总体风味起重要修饰作用。

MGA47-1 发酵乳中共检测到 19 种挥发性风味物质,其中,双乙酰、乙偶姻、2-庚酮、2-壬酮、2-十一酮和 2-甲基丙酸的 ROAV 值都不小于 1,是该菌株发酵乳的关键挥发性化合物。2-甲基丙酸具有酸味和奶香气味^[25],能赋予发酵乳独有的特征风味。此外,3-甲基丁酸的 ROAV 值在 0.1~1,对发酵乳的风味起到修饰作用。

MGB79-3 发酵乳中共检测到 22 种挥发性风味物质,其中,双乙酰、乙偶姻、2-壬酮、2-甲基丙酸

和 2-甲基丁酸的 ROAV 值不小于 1,是发酵乳的关键挥发性化合物。和其他 5 株嗜热链球菌发酵乳相比,MGB79-3 发酵乳中双乙酰、乙偶姻的相对含量较高,分别达到 11.92% 和 14.15%。MGB79-3 发酵乳中共检测到 8 种酸类化合物,其中乙酸、3-甲基丁酸的含量达到 10% 以上。研究表明,低浓度的酸类化合物呈现清淡的、令人愉快的香味,但浓度过高时会对整体香气品质产生负面影响^[31]。除这些关键化合物外,2-十一酮、3-甲基丁酸的 ROAV 值在 0.1~1,对发酵乳的总体风味起修饰作用。

MGB80-2 发酵乳中共检测到 22 种挥发性风味物质,其中,双乙酰、乙偶姻、2-壬酮、2-甲基丙酸、2-甲基丁酸的 ROAV 值不小于 1,是关键挥发性化合物。乙偶姻是发酵乳中普遍存在的一种对风味有重要影响的酮类化合物,它由双乙酰降解或是由 α -乙酰乳酸在乙酰乳酸脱羧酶作用下形成,呈刺激性的奶油香味^[20,32],在这些关键化合物中,乙偶姻相对含量较高,达到 17.38%,对 MGB80-2 发酵乳风味的形成起关键作用。此外,乙醛、2-十一酮、3-甲基丁酸的 ROAV 值在 0.1~1,对发酵乳的总体风味起修饰作用。

2.2 指纹图谱分析

指纹图谱最常用于中药的分析检测,适合于分析复杂化学物质组成的研究。利用 GC 指纹图谱相似度评价系统绘制不同发酵乳样品的重叠色谱图(图 1),采用夹角余弦法评价来自不同地区发酵乳样品 GC 指纹图谱间的相似度(表 4)。

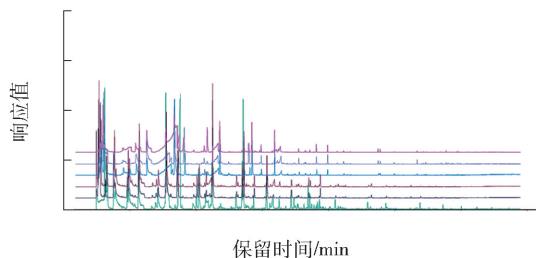


图 1 嗜热链球菌发酵乳中风味物质的重叠色谱图

Fig. 1 Overlapping chromatogram of *S. thermophilus* fermented milk

在本实验中,每组发酵乳样品进行至少 3 次重复测定,得到平行样 GC 指纹图谱间的相似性在 0.93~0.96,说明利用此方法测定发酵乳样品的重复性较好,为后续分析不同发酵乳各样品 GC 指纹图谱间的差异提供数据基础。

从图 1 可以看出,来自蒙古国和甘肃地区的嗜

表4 嗜热链球菌发酵乳 GC 指纹图谱的相似度比较

Tab.4 Comparison with similarity of gas chromatographic fingerprints of <i>S. thermophilus</i> fermented milk							
菌株	G80-5	G81-1	G81-3	MGA47-1	MGB79-3	MGB80-2	对照指纹图谱
G80-5	1	0.306	0.274	0.157	0.047	0.173	0.69
G81-1	0.306	1	0.719	0.114	0.162	0.211	0.687
G81-3	0.274	0.719	1	0.175	0.085	0.186	0.677
MGA47-1	0.157	0.114	0.175	1	0.356	0.384	0.526
MGB79-3	0.047	0.162	0.085	0.356	1	0.575	0.471
MGB80-2	0.173	0.211	0.186	0.384	0.575	1	0.575
对照指纹图谱	0.69	0.687	0.677	0.526	0.471	0.575	1

热链球菌发酵乳的色谱峰有明显的区别。从表3发现,6株菌与对照指纹图谱间的相似度在0.471~0.69,相似性较低,说明菌株在发酵过程中产生的风味物质差异明显。G80-5与G81-1和G81-3间的相似度分别为0.306和0.274,G81-1与G81-3间的相似度可达到0.719;MGA47-1与MGB79-3和MGB80-2的相似度分别为0.356和0.384,MGB79-3与MGB80-2的相似度可达到0.575;甘肃地区菌株发酵乳与蒙古国菌株发酵乳指纹图谱之间的相似度在0.047~0.211,说明来自同一地域的嗜热链球菌发酵乳中风味化合物之间具有较高的相似性,而不同地域的菌株发酵乳中风味化合物之间相似度较低。

2.3 主成分分析结果

在样品得分图中,样品点越接近,说明其香气组成及含量的相似度越高。图2为菌株得分图,由图2可以看出,来自甘肃的菌株在得分图的右边,来自蒙古国的菌株在得分图的左边,说明来自不同地域的菌株在发酵过程中产生的香气组成及含量差异较大,这和指纹图谱的分析结果是一致的。

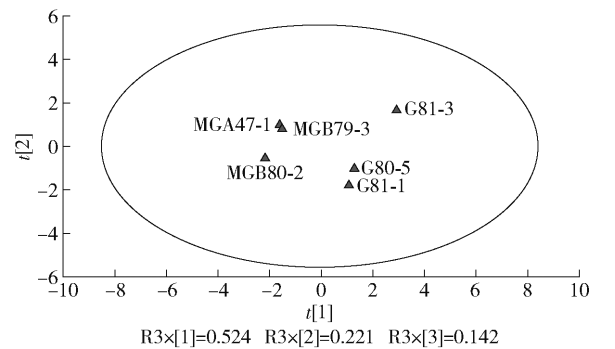


图2 菌株得分图
Fig.2 Score scatter plot of fermented milk

上越接近,说明有较高的相关性。图3为风味物质载荷图,由图2(菌株得分图)和图3(风味物质载荷图)可知,G80-5与芳香族及烷烃化合物,含氮及杂环化合物之间有较强的正相关;G81-1与醇类化合物,芳香族及烷烃化合物之间有较强的正相关;G81-3与醛类化合物、酯类化合物和芳香族化合物之间有较强的正相关;MGA47-1和MGB79-3均与酮类化合物及酸类化合物之间有较强的正相关;MGB80-2与酸类化合物和其他类化合物之间有较强的正相关。因此,来自甘肃的菌株在发酵过程中产生的主要风味物质较丰富,和醇类化合物、醛类化合物、酯类化合物、芳香族及烷烃化合物、含氮及杂环化合物呈正相关,而来自蒙古国的菌株仅和酮类及酸类化合物呈正相关。

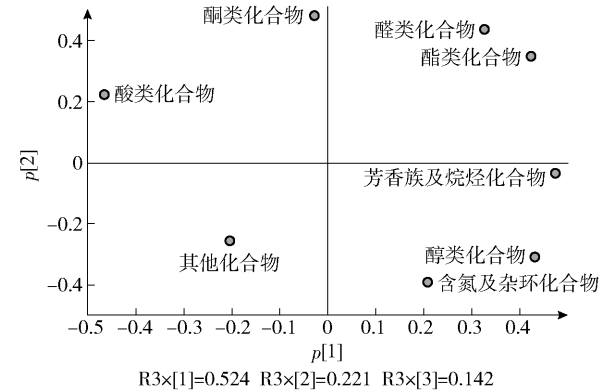


图3 风味物质载荷图
Fig.3 Loading scatter plot of volatile components

3 结论

本实验采用SPME-GC-MS分析6株嗜热链球菌发酵乳中的挥发性风味物质,共检测出63种挥发性风味物质,包括醛类化合物(4种)、酮类化合物(10种)、酸类化合物(12种)、酯类化合物(9种)、

样品点与不同种类风味物质在得分图与载荷图

醇类化合物(12种)、芳香族及烷烃化合物(10种)、含氮及杂环化合物(4种)、其他化合物(2种)。ROAV值的分析结果表明,双乙酰、乙偶姻、乙醛、2-壬酮、2-庚酮、2-十一酮、2-甲基丙酸、2-甲基丁酸、丁酸乙酯、乙酸乙酯、异丙醇和乙基苯等12种挥发性化合物作为关键风味化合物,对发酵乳总体风味贡献较大。而ROAV值($1 > \text{ROAV} > 0.1$)较低的风味化合物如乙醛、庚醛、2-庚酮、2-十一酮、3-甲基丁酸和甲苯等,在评价发酵乳时可与其他风味化合物共同作用,影响发酵乳的总体风味。主成分分析和相似度比较分析的结果表明,来自同一地域的嗜热链球菌发酵乳中风味化合物之间具有较高的相似性,而不同地域的菌株发酵乳中风味化合物之间相似度较低,说明生长环境压力能够对菌株发酵乳的产香特性产生影响。

参考文献:

- [1] DEL R B, LINARES D M, LADERO V, et al. Putrescine production via the agmatinedeiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(2):897–905.
- [2] ROURAY W, MISHRA H N. Scientific and technical aspects of yogurt aroma and taste: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 2011, 10(4):208–220.
- [3] 李慧. 用于酸乳发酵剂的嗜热链球菌的筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [4] 李晓敏. 嗜热链球菌耐酸机制的初步研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.
- [5] LEROY F, LDE V. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 15(2):67–78.
- [6] CHEN W, TIAN F, HUANG W, et al. *Lactobacillus rhamnosus* capable of relieving alcoholic chronic liver injury and application thereof: WO/2013/127148[P]. 2013.
- [7] PAN D D, WU Z, PENG T, et al. Volatile organic compounds profile during milk fermentation by *Lactobacillus pentosus*, and correlations between volatiles flavor and carbohydrate metabolism [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(2):624–631.
- [8] SETTACHAIMONGKON S, NOUT M J, ANTUNESFER-NANDES E C, et al. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 177(5):29–36.
- [9] ZIADI M, WATHELET J P, MARLIER M, et al. Analysis of volatile compounds produced by 2 strains of *Lactococcus lactis* isolated from leben (Tunisian fermented milk) using solid-phase microextraction-gas chromatography [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(6):247–252.
- [10] LINARES D M, O'CALLAGHAN T F, O'CONNOR P M, et al. *Streptococcus thermophilus* APC151 strain is suitable for the manufacture of naturally GABA-enriched bioactive yogurt [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(12885):1876.
- [11] RABHA B, NADRA R S, AHMED B. Effect of threonine on growth and acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus* [J]. *World Applied Sciences Journal*, 2013, 15(2):160–163.
- [12] BESHKOVA D, SIMOVA E, FRENGOVA G, et al. Production of flavour compounds by yogurt starter cultures [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, 20(3/4):180–186.
- [13] 郭婷, 郝一江, 张健, 等. 传统藏灵菇发酵乳挥发性风味特征研究 [J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(1):8–11.
- GUO T, HAO Y J, ZHANG J, et al. Research on volatile flavor characteristics of yogurt fermented by traditional Kefir [J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(1):8–11.
- [14] 魏晋梅, 刘彩云, 张丽, 等. 顶空-固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析啤特果挥发性风味物质 [J]. *食品工业科技*, 2017, 38(20):266–270.
- WEI J M, LIU C Y, ZHANG L, et al. Analysis of volatile compounds in piteguo by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(20):266–270.
- [15] 舒平, 赵浩军, 徐幸. 固相微萃取气质联用法测定原料乳中的苯甲酸 [J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(9):57–59.
- SHU P, ZHAO H J, XU X, et al. Determination of benzoic acid in raw milk by SPME-GC/MS [J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(9):57–59.
- [16] 肖作兵, 周璇, 牛云蔚, 等. GC-O 结合 OAV 分析樱桃酒的特征香气成分 [J]. *中国食品学报*, 2017, 17(8):246–254.
- XIAO Z B, ZHOU X, NIU Y W, et al. GC-O combined

- with OAV analysis cherry wine characteristic aroma components[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(8):246–254.
- [17] VANDENDOOLOO H, KRATZ P D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1963, 11:463.
- [18] 刘登勇, 周光宏, 徐幸莲. 确定食品关键风味化合物的一种新方法:“ROAV”法[J]. *食品科学*, 2008, 29(7):370–374.
- LIU D Y, ZHOU G H, XU X L. “ROAV” method: a new method for determining key odor compounds of Rugao ham[J]. *Food Science*, 2008, 29(7):370–374.
- [19] 刘宁宁, 郭红敏, 葛春美, 等. 酸奶中乙醛和双乙酰含量对其风味的影响[J]. *中国食品添加剂*, 2012(s1):269–273.
- LIU N N, GUO H M, GE C M, et al. Effect of content of acetaldehyde and diacetyl on the flavor of yogurt[J]. *China Food Additives*, 2012(s1):269–273.
- [20] CHENG H F. Volatile flavor compounds in yogurt: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2010, 50(10):938.
- [21] FRIEDRICH J E, ACREE T E. Gas chromatography olfactometry (GC/O) of dairy products[J]. *International Dairy Journal*, 1998, 8(3):235–241.
- [22] 刘南南, 郑福平, 张玉玉, 等. SAFE-GC-MS分析酸牛奶挥发性成分[J]. *食品科学*, 2014, 35(22):150–153.
- LIU N N, ZHENG F P, ZHANG Y Y, et al. Analysis of volatiles in yogurt by solvent-assisted flavor evaporation and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2014, 35(22):150–153.
- [23] 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(7):75–79.
- DAN T, BAO Q H, MENG H E B, et al. Gene regulation to increase acetaldehyde and diacetyl production by lactic acid bacteria[J]. *Food Science and Technology*, 2012(7):75–79.
- [24] 刘树文. 合成香料技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2000:400.
- [25] 刘笑生, 杨政茂, 杜闪, 等. 金华火腿皮下脂肪中气味活性化合物研究[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(9):239–246.
- LIU X S, YANG Z M, YANG S, et al. Study on smell active compounds in Jinhua ham subcutaneous fat[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(9):239–246.
- [26] CADWALLADER K R, TAN Q, CHEN F, et al. Evaluation of the aroma of cooked spiny lobster tail meat by aroma extract dilution analysis[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1995, 43(9):2432–2437.
- [27] MOHEDANO A F, NUNEZ M, MARIACA R G, et al. Volatile fraction of ewe’s milk semi-hard cheese manufactured with and without the addition of a cysteine proteinase[J]. *Food Science & Technology International*, 2001, 7(2):131–139.
- [28] PETTE J W, LOLKEMA H. Yoghurt III acid production and aroma formation in yoghurt[J]. *Nederlandsch Melken Zuiveltijdschrift*, 1950, 24(4):261–273.
- [29] 林翔云. 香料香精辞典[M]. 北京:化学工业出版社, 2007:15.
- [30] 王杰, 余碧玉. 酸奶中主要挥发性风味成分的分析[J]. *食品科学*, 1989, 10(11):51–53.
- WANG J, YU B Y. Analysis of the main volatile components in yogurt [J]. *Food Science*, 1989, 10(11):51–53.
- [31] 郝红梅, 张生万, 郭彩霞, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法分析山楂果醋易挥发成分[J]. *食品科学*, 2016, 37(2):138–141.
- HAO H M, ZHANG S W, GUO C X, et al. Analysis of volatile components in hawthorn vinegar by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) [J]. *Food Science*, 2016, 37(2):138–141.
- [32] OTT A, GERMOND J E, BAUMGARTNER M, et al. Aroma comparisons of traditional and mild yogurts: headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of alpha-diketones [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1999, 47(6):2379–2385.

Study on Key Flavor Compounds in Fermented Milk Production of *Streptococcus thermophilus* Isolated from Different Areas

REN Weiyi, LI Ting, CHEN Haiyan, DAN Tong, ZHANG Heping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The key flavor compounds of fermented milk produced by six strains of *S. thermophilus* isolated from different regions were analyzed by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPME - GC - MS) technology, combined with aroma threshold and relative odor activity value (ROAV). The results showed that the total of 63 volatile compounds were finally detected in these fermented milk, including aldehydes, ketones, acids, esters, alcohols, aromatics, and hydrocarbon compounds. Among them, 12 kinds of volatile compounds, such as diacetyl, acetoin, acetaldehyde, and 2-nonanone had higher ROAV ($\text{ROAV} \geq 1$), which contributed greatly to the overall flavor of fermented milk. Principal component analysis and comparative analysis of similarity demonstrated that there was a high similarity among the flavor compounds of *S. thermophilus* fermented milk from the same area while that from different regions was lower. The results indicated that the pressure of growth environment can exert an influence on the aroma-producing characteristics of the fermented milk of the strain.

Keywords: volatile flavor compounds; *S. thermophilus*; relative odor activity value; chromatographic fingerprinting; principal component analysis

(责任编辑:叶红波)

(上接第 17 页)

Review on Physiological Function of Alkylamide Compounds from *Zanthoxylum bungeanum*

KAN Jianquan^{1,2,3}, CHEN Kewei^{1,2,3}, REN Tingyuan¹, SHI Hui^{1,2,3}, CHEN Guangjing¹

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products on Storage and Preservation (Chongqing), Ministry of Agriculture, Chongqing 400715, China;

3. Chinese-Hungarian Cooperative Research Centre for Food Science, Chongqing 400715, China)

Abstract: *Zanthoxylum bungeanum*, belonging to *Rutaceae* family and *Zanthoxylum* L. genus, is one of the traditional “eight major condiments” in China, which is an important ingredient in many kinds of traditional Chinese medicines due to the functional activities of cold-dispelling, dehumidification, anaesthesia, and acesodyne. China has the highest planting area and yield of *Zanthoxylum bungeanum*. As the economic tree plants, *Zanthoxylum bungeanum* has the ecological, social, and economical benefites. Recently, the planting area of *Zanthoxylum bungeanum* has been increasing at the speed of 20% ~ 30%. It has been widely accepted that *Zanthoxylum bungeanum* has diversely medical functions, such as antioxidant activities, insecticidal activities, anaesthesia, anti-inflammatory and analgesic, hypolipidemic, removing wrinkles, anticancer, and so on. As the special functional ingredients, alkylamide compounds (or hemp flavor substance) possess many biological properties. However, the mechanism of these biological properties were not fully understood. Therefore, *Zanthoxylum bungeanum* has not been fully applied in medicines and daily chemical products. This review summarizes updated researches on the main species of alkylamide compounds in *Zanthoxylum bungeanum* and their respective physiological functions in order to provide necessary reference for the further systematic study.

Keywords: *Zanthoxylum bungeanum*; alkylamide compounds; physiological function; types

(责任编辑:李 宁)