

Streptococcus thermophilus ND03 在牛乳发酵过程及贮藏期间挥发性风味物质分析

王丹^{1,2}, 周亭亭^{1,2}, 丹彤^{1,2}, 张和平^{1,2}, 孟和毕力格^{*1,2}

(1. 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; 2. 内蒙古农业大学 农业农村部奶制品加工重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 为揭示 *Streptococcus thermophilus* ND03 在牛乳发酵过程和 4 °C 贮藏期间产生的挥发性风味物质及其变化情况, 采用 3 种不同纤维涂层的萃取头, 运用固相微萃取-气相色谱-质谱联用 (SPME-GC-MS) 技术对各阶段发酵牛乳样品进行检测分析, 利用主成分分析法分析各阶段样品的特征性风味物质并对各阶段样品进行感官评定。结果表明: 利用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS、65 μm PDMS/DVB 和 100 μm PDMS 3 种萃取头分别检测出 86、66 和 62 种挥发性物质。在发酵及贮藏期间, 挥发性风味物质的数量与含量存在动态变化。由主成分分析结果可知, 样品的特征性风味物质在发酵期间为醛类、酮类及杂环化合物, 在贮藏 0 d (发酵终点) 为醇类及含氮化合物, 在贮藏 1、3 d 为酯类及芳香族化合物, 在贮藏 7、14 d 为烃类及酸类化合物。由感官评定结果可知, 贮藏 1 d 的样品在色泽、滋味、气味及组织状态方面具有良好表现。菌株 *Streptococcus thermophilus* ND03 作为发酵剂具有潜在的工业应用前景。

关键词: 发酵牛乳; 挥发性风味物质; 固相微萃取-气相色谱-质谱; 主成分分析

中图分类号: TS 252.54 文章编号: 1673-1689(2019)05-0015-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.05.003

Volatile Compounds Analysis of Fermented Cow Milk during Fermentation and Storage Using the Starter *Streptococcus thermophilus* ND03

WANG Dan^{1,2}, ZHOU Tingting^{1,2}, DAN Tong^{1,2}, ZHANG Heping^{1,2}, MENGHE Bilige^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The aim of the research was to study the volatile compounds of fermented cow milk during the fermentation and storage period at 4 °C using the starter strain named *Streptococcus thermophilus* ND03 with the method of solid phase microextraction and gas chromatography coupled with mass spectrometry (SPME-GC-MS) by three different extraction fibers. The numbers of extractions detected by different extraction fibers named 50/30 μm DVB/CAR/PDMS, 65 μm

收稿日期: 2016-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460446); 国家 863 计划项目(2011AA100902)。

* 通信作者: 孟和毕力格(1965—), 男, 蒙古族, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事乳品微生物与生物技术研究。

E-mail: mhblg@163.com

引用本文: 王丹, 周亭亭, 丹彤, 等. *Streptococcus thermophilus* ND03 在牛乳发酵过程及贮藏期间挥发性风味物质分析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(05): 15-22.

PDMS/DVB and 100 μm PDMS were 86,66 and 62, respectively. The amount and the content of volatile compounds showed significantly different between the process of fermentation and storage period. The principal component analysis results showed that aldehyde compounds, ketone compounds and heterocyclic compounds were the characteristic aroma species of samples during fermentation period. In the storage period, alcohols and nitrogen-containing compounds were the characteristic aroma species of samples named stored 0 d, namely end-point of fermentation; aromatic compounds and esters compounds were found to be the characteristic aroma species of samples named stored 1 d and 3 d; acid compounds and hydrocarbons were the characteristic aroma species of samples of stored 7 d and 14 d. The sensory evaluation results suggested that the samples named stored 1 d showed good performance in color, taste, flavor and texture. All in all, *Streptococcus thermophilus* ND03 as the starter culture has potential industrial application prospect.

Keywords: fermented cow milk, volatile compounds, SPME-GC-MS, principal component analysis

发酵乳的风味物质是由发酵产生的乳酸及种类繁多的挥发性风味物质所决定的。早在1982年, Marshall等人^[1]就对发酵乳中的风味物质进行了研究,并发现这些风味物质包括碳氢化合物、醇类、醛类、酮类、酸类、酯类、内酯类、含硫化合物、吡啉与呋喃衍生物。发酵剂是发酵乳产酸和产香的基础及原因,发酵剂菌株的质量与活力对发酵乳中风味物质的数量与含量起关键性的作用。*Streptococcus thermophilus* ND03是作者从青海的牦牛乳中分离鉴定出的一株在产酸、产黏、持水性等方面具有良好特性的菌株^[2-3]。2011年张兴昌^[4]等人对AST基础培养基进行优化以满足*S. thermophilus* ND03最适生长要求,并在5 L液体发酵罐上对高密度发酵工艺进行优化,使*S. thermophilus* ND03活菌数达到 1.8×10^{10} cfu/mL并使发酵时间缩短至6.0~6.5 h。2011年孙志宏等人利用454-焦磷酸测序技术和Solexa paired-end测序技术相结合的方法对*S. thermophilus* ND03进行全基因组测序,发现*S. thermophilus* ND03包含一个1 831 957 bp的环形染色体(GC含量为39.1%),并报道*S. thermophilus* ND03基因组中共有2 038个基因,其中包括1 919个编码基因,5个rRNA操纵子和56个tRNA^[5]。固相微萃取(SPME)技术具有分析时间短、检出限低、分析范围广、不使用有机溶剂和萃取条件温和等特点。近年来SPME技术在食品风味检测如发酵乳^[6]、红酒^[7]、发酵茶^[8]等中的应用越来越广泛。为进一步了解*S. thermophilus* ND03发酵牛乳中挥发性风味物质的组成及特性,作者采用SPME技术对发酵牛乳进行挥发性风味物质富集,利用气相色谱-质谱

联用(GC-MS)技术对*S. thermophilus* ND03在牛乳发酵过程和4 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏期间产生的挥发性风味物质进行检测分析,采用主成分分析法探知发酵及贮藏阶段的特征性风味物质并对发酵牛乳进行感官评定,为今后从全基因组角度研究风味物质相关功能基因及其代谢调控与相关物质合成提供表型数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验材料 发酵剂菌株*Streptococcus thermophilus* ND03(Genbank号NC017563):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。

1.1.2 实验仪器 气相色谱-质谱联用仪(7890B GC system-5977A MSD;Anilent公司产品);色谱柱(HP-5毛细管柱,30 m \times 0.25 mm,0.25 μm);手动SPME进样手柄(USA,SUPELCO),SPME萃取头(50/30 μm DVB/CAR/PDMS;65 μm PDMS / DVB;100 μm PDMS;SUPELCO公司产品)。

1.2 实验方法

1.2.1 *S. thermophilus* ND03发酵牛乳的制备 将在-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥保藏的*S. thermophilus* ND03菌株于脱脂乳培养基中活化,随后接种于M17液体培养基(CM0817,英国OXOID公司)中传3代,使菌株活力达到最大。将菌株于50 mL和500 mL M17液体培养基中连续扩大培养,离心收集菌体并制备菌悬液。将发酵剂以 5×10^7 cfu/mL接种于均质后的全脂乳(碳水化合物质量分数为11%,脂肪质量分数为3.1%,蛋白质质量分数为2.9%)中,并分装于样品

瓶中。将样品置于 42 ℃ 培养箱中培养并在发酵 2 h 和发酵 4 h 时取样,待样品达到发酵终点(即 pH=4.5)时,将样品转移至 4 ℃ 冰箱贮藏(此时定义为贮藏期 0 d),并分别于贮藏期 0、1、3、7、14 d 取样,随后进行 SPME-GC-MS 检测分析。

1.2.2 挥发性风味物质测定 SPME 萃取条件:将萃取头在气相色谱的进样口于 250 ℃ 老化 30 min。随后将老化好的萃取头插入到样品瓶中。平衡温度为 50 ℃,平衡时间为 60 min。

解吸附条件:将萃取头插入气相色谱的进样口,250 ℃ 条件下解吸附 3 min。

GC 参数条件:采用程序升温方式,起始温度为 35 ℃,保持 5 min。随后以 5 ℃/min 的升温速率上升至 140 ℃,保持 2 min;以 10 ℃/min 的升温速率上升至 250 ℃,保持 3 min。汽化室温度为 250 ℃;载气为 He,流量 1 mL/min;不分流进样。

MS 参数条件:全扫描模式,扫描质量范围为 m/z 33~450;电离方式为 EI 源,电子能量 70 eV;离子源温度 230 ℃;发射电流 100 μ A。

1.2.3 定性与定量分析 各组分质谱数据由随机携带 Masshunter 工作站 NIST 11 标准库自动检索,选择匹配度高的物质(匹配率 $\geq 85\%$) 作为鉴定结果。利用面积归一化法计算各组分相对峰面积百分比(即各组分相对质量分数)。

1.3 数据处理

利用 SPSS 19.0 作为数据分析工具进行主成分分析处理,具体步骤参照张文彤^[9]的方法。利用 Origin7.5 做主成分载荷图、3D plot 图、柱状图。

1.4 感官评定

由 12 名食品专业的感官评定员,依据中国乳制品行业规范 RHB 103—2004 中酸牛乳感官质量评鉴要求,分别对发酵及贮藏期间 7 个阶段的 *S. thermophilus* ND03 发酵牛乳在色泽、滋味和气味、组织状态方面进行感官评定。发酵牛乳感官评定标准见表 1。

2 结果与讨论

2.1 *S. thermophilus* ND03 牛乳发酵过程及贮藏阶段挥发性成分的检测分析

作者采用的萃取头分别为 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS、65 μ m PDMS/DVB 和 100 μ m PDMS,不同规格的萃取头表面膜性质不同,导致其吸附的

表 1 发酵牛乳感官评定标准

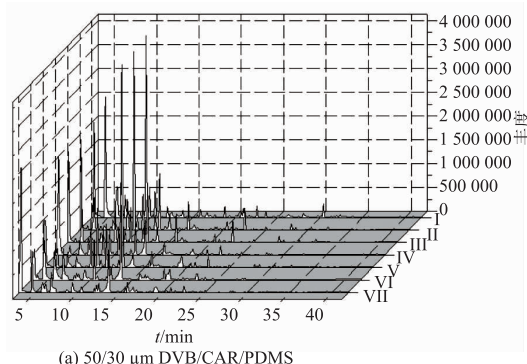
Table 1 Sensory evaluation standards of fermented cow milk

项目	特征	得分
色泽 (10 分)	呈均匀乳白色	10~8
	淡黄色	8~6
	浅灰色或灰白色	6~4
	绿色、黑色斑点或有霉菌生长、异常颜色	4~0
滋味和 气味 (40 分)	具有酸牛乳固有滋味和气味;酸味、甜味比例适当	40~35
	过酸或过甜	35~20
	有涩味	20~10
	有苦味	10~5
	异常滋味或气味	5~0
组织 状态 (50 分)	组织细腻、均匀、表面光滑、无裂纹、无气泡、无乳清析出	50~40
	组织细腻、均匀、表面光滑、无气泡、有少量乳清析出	40~30
	组织粗糙、有裂纹、无气泡、有少量乳清析出	30~20
	组织粗糙、有裂纹、有气泡、乳清析出	20~10
	组织粗糙、有裂纹、有大量气泡、乳清析出严重、有颗粒	10~0

物质不同。50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 萃取头可以大范围吸附 C_3 - C_{20} 的挥发性物质,65 μ m PDMS/DVB 萃取头可以吸附极性挥发性物质,100 μ m PDMS 萃取头可以吸附非极性小分子挥发性物质。3 种萃取头得到的数据与信息相互补充。

利用 3 种萃取头对发酵 2 h(I)、4 h(II) 及贮藏 0 d(III)、1 d(IV)、3 d(V)、7 d(VI)、14 d(VII) 的发酵牛乳样品进行风味物质富集,结合 GC-MS 技术对各阶段的挥发性风味物质进行检测分析,*S. thermophilus* ND03 在发酵过程及贮藏阶段产生挥发性成分的 GC-MS 总离子流图如图 1 所示。

除去少量萃取头带来的硅氧烷类杂质峰,作者共检测出 136 种挥发性物质,其中 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 萃取头检测出 86 种挥发性物质,65 μ m



(a) 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS

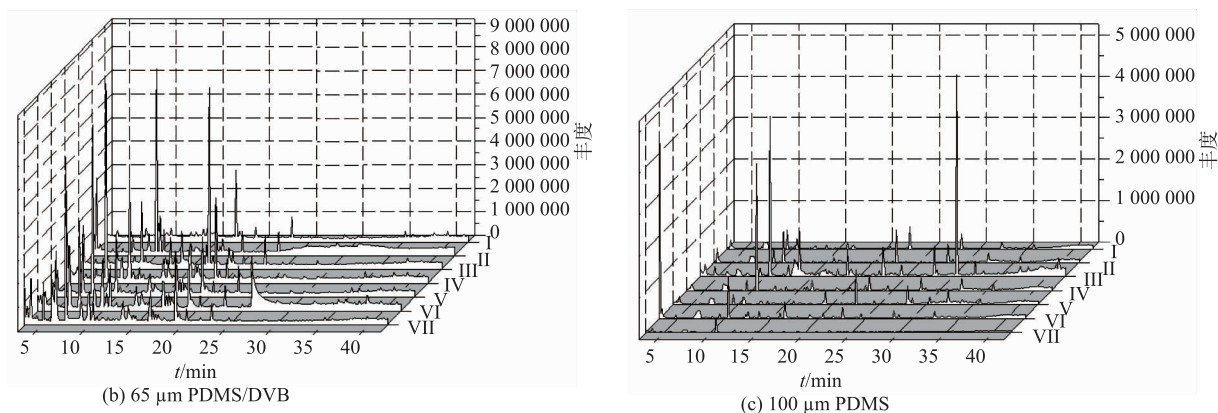


图 1 采用不同规格萃取头萃取 *S. thermophilus* ND03 牛乳发酵过程及贮藏阶段样品中挥发性成分总离子流图

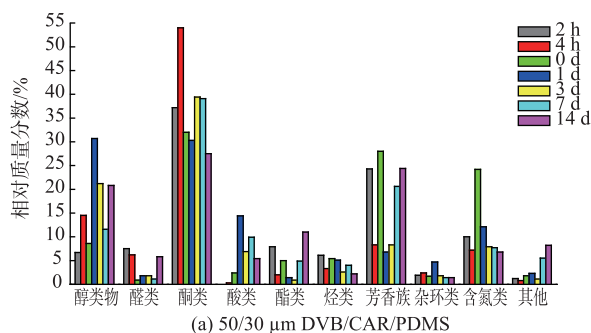
Fig. 1 TIC of volatiles extracted from fermented cow milk with the starter *S. thermophilus* ND03 by SPME-GC-MS using three different extraction fibers

PDMS/DVB 萃取头检测出 66 种挥发性物质, 100 μm PDMS 萃取头检测出 62 种挥发性物质。在此将其归纳为醇类、醛类、酮类、酸类、酯类、烃类、芳香族类、杂环类、含氮类和其他类共 10 大类挥发性物质。

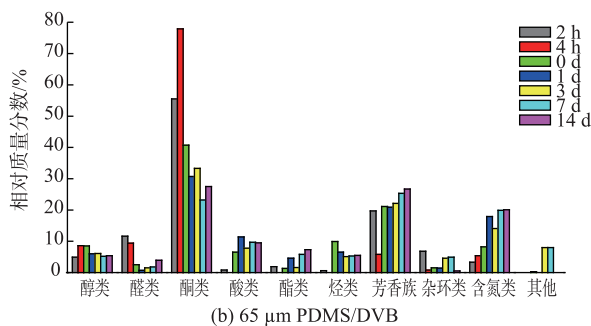
发酵乳中风味物质的形成主要有 3 种途径^[10]: (1)原料乳成分。已确定的成分有丙酮、乙醛、油酸及游离脂肪酸等。(2)加工过程中标准化、均质、杀菌等引起的乳制品风味变化。如美拉德反应可生成味喃、吡咯、吡喃、吡嗪等含 S、N、O 的杂环化合物, 加热还可引起含硫组分浓度的增加。(3)微生物的代谢。据报道对发酵乳风味有决定性影响的物质有 2-丁酮、双乙酰、乙醇、乙醛、丙酮、二乙酰、乙偶姻、乙酸乙酯、乙酸等^[1]。

由图 2 可以清楚看到各阶段的酮类化合物、芳香族化合物及含氮化合物的相对质量分数明显高于其他类的挥发性物质。3 种不同萃取头萃取得到的酮类物质其相对质量分数在贮藏阶段 (即 0~14 d) 都呈下降趋势, 如 2-庚酮、2-壬酮、3,5-辛二烯-2-酮。而由 65 μm PDMS/DVB 萃取得到的乙偶姻在发酵 2 h 时其相对质量分数为 0.5%, 随着发酵的进行其相对含量不断上升, 到达发酵终点时 (即贮藏 0 d) 其相对质量分数为 5.8%, 随着样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏时间的延长, 样品中乙偶姻的相对含量也不断增加, 在贮藏 14 d 时达到 10.8%, 说明乙偶姻是在发酵及贮藏期间逐渐产生的。Ott 等人报道乙偶姻是在发酵过程产生的对发酵乳风味有重要影响的羰基化合物之一, 乙偶姻具有甜香、奶制品香并带有

脂肪的油腻气息^[11]。由 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取得到的芳香族化合物, 如苯甲醛、2,4,5-三甲基苯甲醛、2,4-二甲基苯甲醛、乙酰苯等在发酵期间其相对质量分数均呈上升趋势, 而随着贮藏时间的延长其相对含量呈逐渐下降趋势。在发酵期间没有检测到苯甲酸 (又名安息香酸), 随着贮藏时间的延长, 苯甲酸的相对质量分数由 0.8% (贮藏 1 d) 上升至 3.6% (贮藏 14 d), 这说明苯甲酸是随着贮藏时间的延长而逐渐产生的。



(a) 50/30 μm DVB/CAR/PDMS



(b) 65 μm PDMS/DVB

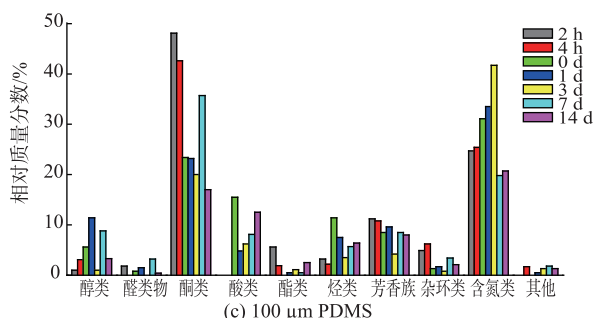


图 2 采用不同规格萃取头萃取 *S. thermophilus* ND03 发酵牛乳所得各类挥发性物质相对质量分数

Fig. 2 Categories and relative contents of the major volatiles in the fermented cow milk with the starter *S. thermophilus* ND03 using SPME-GC-MS by three different extraction fibers

Hols 等^[12]发现发酵乳中蛋白质、肽和氨基酸的分解代谢与其关键挥发性风味物质的形成有关。由 100 μm PDMS 萃取得到的甲氧基苯基肟在发酵 2 h 时其相对质量分数为 24.7%，随着发酵时间的延长在发酵终点时其相对质量分数为 29.3%，随后在贮藏期间其相对含量呈先上升再下降的趋势，在贮藏 3 d 时达到最大值(39.4%)。由 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取得到的挥发性物质除了酮类化合物、芳香族化合物及含氮化合物所占的相对质量分数较高外，醇类化合物所占的相对质量分数也较高。从发酵 2 h 至发酵终点，部分醇类物质的相对质量分数先上升后下降。而 2-乙基-1-己醇、4-乙基-1-辛基-3-醇、1-戊醇、2-甲基-3-戊醇等是发酵 2 h 后新产生的物质。由 3 种萃取头萃取得到的结果可知，随着贮藏期的延长 C₇~C₁₀ 醇的数量及其相对质量分数呈上升趋势，如 1-庚醇、2-乙基-1-己醇、1-壬醇、1-辛醇、3-甲基-2-庚醇、2-甲基-3-戊醇，说明这些物质是在贮藏期间逐渐产生的。由于醇类化合物的风味阈值较高，一般认为对乳制品的整体风味贡献不大。

经自动氧化后的游离脂肪酸会产生一系列结构相似的醛类物质，而醛类化合物的阈值较低，对发酵乳风味构成有重要影响。由 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 和 65 μm PDMS/DVB 萃取得到的醛类化合物其相对质量在发酵期间呈下降趋势，而在贮藏期间呈上升趋势。作者检测到的醛类物质包括直链醛，如庚醛、己醛、壬醛、戊醛；支链醛，如 3-甲基己醛、2-甲基戊醛；烯醛，如 (E,E)-2,4-二烯醛、

(E)-2-己烯醛等 3 大类。不饱和脂肪酸如亮氨酸、亚麻酸和亚油酸等的氧化分解会产生庚醛、己醛、壬醛等物质^[13]。支链醛可能来源于氨基酸 Strecker 降解过程^[1]。己醛具有鲜草的清香味，壬醛具有水果香味，庚醛具有强烈的油脂味，3-甲基己醛具有奶酪味^[14]。Condursoa 等人报道醛类物质在发酵乳这种酸类介质中是不稳定的，在贮藏期间醛类物质的含量会发生变化^[15]，这与作者实验结果较一致。

Cheng 等人^[1]报道在发酵期间产生的 C₂~C₄ 的酸类化合物是由微生物发酵产生的，C₄~C₂₀ 的酸类化合物是脂肪分解过程产生的。由 3 种萃取头的结果可知，在发酵 2、4 h 时几乎没有检测到酸类物质，在发酵终点(贮藏 0 d)时酸类化合物的平均相对质量分数为 8.47%，随着贮藏时间的延长，酸类物质的相对质量分数呈缓慢增长的趋势。发酵过程中，微生物将牛乳中质量分数 20%~40% 的乳糖转化成乳酸，而酸类物质在发酵乳中扮演着重要的角色，能带给发酵乳特有的风味^[1]。作者检测到的短链脂肪酸有乙酸、丁酸、3-羟基丁酸；C₆~C₁₂ 的中链脂肪酸有己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、3-羟基十二酸等。Condurso 等^[15]利用 SPME-GC-MS 技术检测乳制品在货架期期间的挥发性风味物质，其中测得的酸类化合物包含乙酸、丁酸、己酸、辛酸、壬酸、癸酸等，这与作者测得的结果较一致。

在贮藏过程中，酸和醇的酯化反应是产生酯类物质的主要反应之一，从而赋予发酵乳酯香。由低级饱和单羧酸或多数不饱和单羧酸与低级饱和醇或不饱和醇所形成的酯类，都具有愉快的水果香气^[16]，如由 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 和 65 μm PDMS/DVB 萃取得到的乙酸丁酯、丁酸乙酯、2-丙烯酸丁酯和己酸乙酯等。内酯与酯一样有特殊水果香气^[16]，如本实验检测出的 δ-壬内酯。

作者检测到的烃类化合物有 2,4-二甲基己烷、2,4-二甲基庚烷、甘菊环烃、2,6-二甲基壬烷、2,4-二甲基-癸烷、3,7-二甲基十一烷、十四烷等。由 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取得到的十二烷在发酵 2 和 4 h 时没有检出，在发酵终点时的相对质量分数为 1.2%，其相对质量分数随着贮藏时间的延长呈逐渐下降趋势，在贮藏 14 d 时相对质量分数为 0.5%，这可能说明十二烷在贮藏期间作为中间产物转化分解成了其他物质。由 100 μm PDMS 萃取得到的 2,6,10-三甲基-十二烷在发酵 2 h 时的相对

质量分数为 1.4%,随着发酵的进行其相对含量逐渐下降,在贮藏期间 2,6,10-三甲基-十二烷的相对质量分数持续缓慢下降,至贮藏 14 d 时没有检测出该物质,说明该物质在发酵及贮藏期间可能转化分解成其他物质。周晓媛等人^[17]报道饱和烃的香气阈值较高,对产品风味贡献较低。

牛乳经标准化、均质、杀菌等加工处理过程会生成呋喃或吡喃类化合物^[18]。由 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 和 65 μm PDMS/DVB 萃取得到的呋喃及其衍生物有 6-庚基四氢呋喃-2H-吡喃-2-酮、四氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮、2,3-二氢-3,5-二羧基-6-甲基-4H-吡喃。由 100 μm PDMS 萃取头萃取得到的杂环化合物有苯并噻唑。含硫化合物主要由含硫氨基酸如胱氨酸、蛋氨酸等经 Stretcher 降解氧化产生,含硫物质通常阈值很低,因此在较低浓度时就能对产品风味产生强烈影响^[1]。由 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取得到的含硫化合物有 [(1-甲基丙基)-硫]-环己烷、二-n-癸硫、十二烷-2-丙酯-亚硫酸等。

综合实验数据可知,发酵牛乳的风味物质种类复杂,是多种不同组分在数量及含量上平衡的综合结果。

2.2 *S. thermophilus* ND03 发酵牛乳过程及贮藏期间挥发性风味物质主成分分析

2.2.1 主成分分析

对发酵及贮藏期间 7 个阶段产生的 10 类挥发性风味物质进行主成分分析。由表 2 可知,只有前 3 个主成分特征根大于 1,因此 SPSS 只提取了前 3 个主成分。第一主成分的方差占所有主成分方差的 48.89%,接近一半,前 3 个主成分的方差贡献率达到 86.633%,因此选前 3 个主成分已足够描述 ND03 发酵乳各阶段特征性风味物质。

由表 2 和表 3 可以看出,第一主成分贡献率占总变异信息的 48.89%,主要反映醇类、醛类、酮类、酸类、烃类、杂环类及含氮类化合物的变异信息;第二主成分贡献率占总变异信息的 22.89%,主要反映酯类及芳香族类化合物的变异信息;第三主成分贡献率占总变异信息的 14.86%,主要反映其他类,如含硫化合物、含氯化合物等挥发性物质的变异信息。载荷值本质上是各变量与主成分之间的相关系数,“+”符号表示变量与主成分呈正相关性,而“-”符号表示变量与主成分呈负相关性^[19]。

表 2 主成分的特征根及方差贡献率

Table 2 Eigenvalues of principal components and their variance contributions

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
1	4.889	48.892	48.892
2	2.289	22.887	71.778
3	1.485	14.855	86.633
4	0.690	6.903	93.537
5	0.462	4.625	98.162
6	0.184	1.838	100.000

表 3 主成分的载荷矩阵

Table 3 Loading matrix of principal components

化合物类型	主成份		
	1	2	3
醇类化合物	0.570	-0.516	0.237
醛类化合物	-0.891	0.291	-0.271
酮类化合物	-0.838	-0.296	-0.386
酸类化合物	0.890	0.107	0.408
酯类化合物	-0.150	0.871	0.268
烃类化合物	0.868	0.262	-0.334
芳香族化合物	0.256	0.953	-0.007
杂环化合物	-0.768	-0.049	-0.089
含氮化合物	0.905	-0.289	-0.062
其他	0.154	0.124	0.919

2.2.2 基于主成分分析确定 *S. thermophilus* ND03 牛乳发酵过程及贮藏期间各阶段特征性风味物质

主成分分析是基于通过少数几个主分量解释多个变量间的内部结构,使得物质的数量及含量有较客观的反映。由图 3 可知,主成分载荷图的左、右半区域对 *S. thermophilus* ND03 牛乳发酵过程样品点和贮藏期间样品点有较好的区分。发酵期间(2,4 h)样品的特征性风味物质为醛类、酮类及杂环化合物。贮藏 0 d(即发酵终点)样品的特征性风味物质为醇类及含氮化合物;酯类及芳香族化合物为贮藏 1、3 d 样品的特征性风味物质;贮藏 7、14 d 的特征性风味物质为烃类及酸类化合物,这可能是由于随着贮藏时间的延长微生物发酵产生的酸类物质不断积累,使酸类化合物成为其特征性风味物质。各阶段样品的特征性风味物质在发酵及贮藏期间逐渐发生改变,体现了风味物质的动态变化过程。

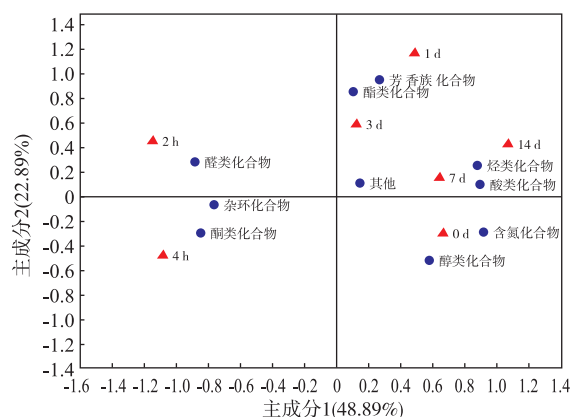


图3 主成分载荷图

Fig. 3 Biplot of principal component analysis(PCA)

图3中红色三角代表 *S. thermophilus* ND03 牛乳发酵过程及贮藏期间各样品点总体香气,蓝色圆点代表10类香气成分。样品点与香气成分在主成分载荷图上越接近,两者的相关性越高(首先判断样品点与香气成分是否处于同一象限,再看两者与坐标轴的夹角是否接近),由此可以判断不同阶段发酵样品的特征性香气成分^[9]。

2.3 *S. thermophilus* ND03 牛乳发酵过程及贮藏期间各阶段样品感官评定

由表4可知,贮藏1 d样品的感官评分最高,其色泽为乳白色偏微黄色,具有酸牛乳固有滋味和气味,并伴有适宜的奶香味,酸甜比例适当,发酵牛乳的组织细腻、均匀,无气泡,无乳清析出。表征贮藏1 d样品的特征性风味物质是酯类化合物,此时相对质量分数较高的物质为丁酸乙酯、己酸乙酯、 δ -

表4 *S. thermophilus* ND03 发酵牛乳感官评定结果

Table 4 Sensory evaluation of fermented cow milk with the starter *S. thermophilus* ND03

样品	色泽	滋味和气味	组织状态	总分
发酵 2 h	8.4±0.9 ^a	33.8±1.9 ^a	42.4±1.7 ^a	84.9±3.0 ^a
发酵 4 h	7.9±0.5 ^a	31.3±1.1 ^a	41.2±1.7 ^{ab}	80.8±2.5 ^a
贮藏 0 d	8.1±0.8 ^{ab}	35.3±1.5 ^a	43.3±1.8 ^{ab}	86.7±2.6 ^a
贮藏 1 d	8.0±0.8 ^{ab}	35.7±1.4 ^b	43.5±1.6 ^b	87.1±2.4 ^b
贮藏 3 d	7.8±0.6 ^{ab}	29.0±1.6 ^c	35.4±1.6 ^c	72.2±1.5 ^c
贮藏 7 d	7.5±0.8 ^{ab}	25.3±1.7 ^d	26.3±2.7 ^d	59.1±3.8 ^d
贮藏 14 d	7.1±0.8 ^b	22.2±1.9 ^c	18.5±1.5 ^c	47.8±1.9 ^c

注: $p < 0.05$ 为差异性显著

壬内酯等,酯类物质的阈值较低,能够赋予发酵乳酯香与愉快的水果香气^[20]。随着4℃贮藏时间的延长,发酵牛乳的颜色逐渐变微黄,滋气味逐渐变酸涩,当贮藏7 d时出现少量的乳清析出,当贮藏14 d时发酵牛乳的组织状态变粗糙并伴有乳清析出。表征贮藏14 d样品的特征性物质是酸类化合物,此时相对质量分数较高的物质为己酸、庚酸、辛酸、*n*-癸酸等,酸类物质含量的增多破坏了原有的发酵乳胶体结构,使其容纳的水分游离造成乳清析出,使得发酵牛乳的组织状态变粗糙。

作者以 *S. thermophilus* ND03 为发酵剂进行牛乳发酵,达到发酵终点(即 $\text{pH}=4.5$)所需时间为5.8 h,与刘文俊等人^[21]所测的34株 *S. thermophilus* 发酵时间相比,所用时间较短。作者共筛选出136种挥发性风味物质,与Ott^[11]、王丹等人^[22]测得的发酵牛乳中风味物质种类与数量相比更为丰富,而多出的这些挥发性风味物质是否是构成发酵乳的关键性风味物质,还需与其相对应的阈值结合分析讨论。作者以 *S. thermophilus* ND03 为发酵剂使发酵乳能够在较短时间内产生丰富的风味物质,在贮藏1 d时能达到良好的感官评鉴要求,具有一定的工业应用前景。

3 结语

采用50/30 μm DVB/CAR/PDMS、65 μm PDMS/DVB、100 μm PDMS 3种不同纤维涂层的萃取头,运用SPME-GC-MS技术检测 *S. thermophilus* ND03 牛乳发酵及贮藏期间的挥发性物质及其变化情况,共鉴定出136种挥发性成分,主要有醇类、醛类、酮类、酸类、酯类、烃类、芳香族类、杂环类、含氮类和其他类共10大类。由主成分分析结果可知,样品的特征性风味物质在发酵期间为醛类、酮类及杂环化合物,在贮藏0 d(发酵终点)为醇类及含氮化合物,在贮藏1、3 d为酯类及芳香族化合物,在贮藏7、14 d为烃类及酸类化合物。由感官评定结果可知,贮藏1 d的样品在色泽、滋味、气味及组织状态方面具有良好表现。未来可进一步考虑与风味阈值、电子鼻等相结合的方法,全面评估发酵乳中的挥发性风味物质。

参考文献

- [1] CHENG H. Volatile flavor compounds in yogurt;a review[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2010,50(10): 938-950.
- [2] 徐杰. 青海部分地区自然发酵牦牛奶的化学与微生物组成分析及乳酸菌的分离鉴定[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2006.
- [3] SUN Z,LIU W,GAO W,et al. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut;the naturally fermented yak milk in Qinghai, China[J]. **Journal of General and Applied Microbiology**, 2010,56(1):1-10.
- [4] 张兴昌. 嗜热链球菌高密度培养及冷冻保护的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.
- [5] SUN Zhihong,CHEN Xia,WANG Jicheng,et al. Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03[J]. **Journal of Bacteriology**,2011,193(3):793-794.
- [6] 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.
- [7] AZZI-ACHKOUTY S,ESTEPHAN N,OUAINI N,et al. Headspace solid-phase microextraction for wine volatile analysis[J]. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,2015,57(10):1-56.
- [8] PRIPDEEVECH P,POPLUECHAI S,MOONGGOOT S,et al. Analysis of volatile constituents of fermented tea with bacillus subtilis by SPME-GC-MS[J]. **Chiang Mai Journal of Science**,2014,41(2):395-402.
- [9] 张文彤. SPSS 统计分析高级教程[M]. 北京:高等教育出版社,2011.
- [10] 郭文奎. 优质酸奶风味图谱的建立[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [11] 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 and Food Chemistry**, 1999,47(6):2379-2385.
- [12] HOLS P,HANCY F,FONTAINE L,et al. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics[J]. **Fems Microbiology Reviews**,2005,29(3):435-463.
- [13] 代敏. 保鲜乳挥发性风味物质的分析与调控[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2006.
- [14] 林翔云. 香料香精辞典[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [15] CONDURSO C,VERZERA A,ROMEO V,et al. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life[J]. **International Dairy Journal**,2008,18(8):819-825.
- [16] 夏延斌. 食品风味化学[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [17] ZHOU Xiaoyuan,DEN Jing,LI Fuzhi,et al. Studies on the volatile components in fermented chili products [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2007(1):54-59.(in Chinese)
- [18] GE Wupeng,LI Yuanrui,CHEN Ying,et al. Analysis of volatile aromatic compounds from cow's and goat's milk yoghurt by SPME-GC/MS[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2008,11:64-69+75.(in Chinese)
- [19] GU Saiqi,WANG Xichang,TAO Ningping,et al. Evaluation on aroma-quality of meat of Chinese mitten handed crab (*Eriocheir sinensis*) by principal component analysis and cluster analysis [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2012,24:23.(in Chinese)
- [20] XU Yixiu,ZHANG Min,SUN Jincai,et al. Analysis of distasteful substance in bayberry juice by solid phase microextraction combined with GC-MS[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,10:1057-1061.(in Chinese)
- [21] 刘文俊. 嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌产酸、风味特性及其功能基因分型和表达研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2011,
- [22] WANG Dan,DAN Tong,SUN Tiansong,et al. SPME-GC-MS analysis of volatile flavor compounds in fermented cow milk during storage using the starter *Streptococcus thermophilus* IMAU10638[J]. **China Dairy Industry**,2015(10):13-17.(in Chinese)