

乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种发酵乳风味物质研究

王伟军^{1,2}, 李延华^{1,2}, 张兰威², 马 微³

(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; 3 东宁出入境检验检疫局, 黑龙江 东宁 157200)

【摘 要】 【目的】研究发酵过程中乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种发酵乳双乙酰的变化规律, 并检测发酵乳样品中风味物质的种类和含量。【方法】采用邻苯二胺法, 分别测定 25, 30 ℃ 培养 4, 8, 12, 24, 36 和 48 h 发酵乳中双乙酰的含量, 用 GC-MS 方法测定了发酵乳中挥发性风味物质的组成。【结果】乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种发酵前期有大量双乙酰积累, 随着发酵时间的延长, 双乙酰含量逐步增加。通过 GC-MS 方法在发酵乳挥发性风味物质中共鉴定出 19 种成分, 其中酯类 4 种、醇类 1 种、杂环化合物 1 种、短链挥发性脂肪酸 5 种、羰基化合物 8 种。【结论】乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种发酵乳中, 有较高含量的双乙酰, 在发酵后期其含量更大, 乙醇、2, 3-丁二酮、2, 3-戊二酮含量也明显高于其他单菌种乳酸菌发酵乳中的相应含量。

【关键词】 发酵乳; 乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种; 双乙酰; 风味物质
【中图分类号】 TS252. 54; TS252. 1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)04-0179-05

Study on flavor compounds in milk fermented by
Lactococcus lactis ssp. *Lactis* biovar *diacetylactis*

WANG Wei-jun^{1,2}, LI Yan-hua^{1,2}, ZHANG Lan-wei², MA Wei³

(1 Department of Pharmacy and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002, China;
2 College of Food Science and Engineering, Harbin Industry University, Harbin, Heilongjiang 150090, China;
3 The Ex-im quarantine of the city of dongning, Dongning, Heilongjiang 157200, China)

Abstract: 【Objective】 The Changes of diacetyl in milk fermented by *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *diacetylactis* during fermentation were studied. Volatile flavour compounds in the fermented milk were separated and detected. 【Method】 The diaminobenzidine method was used to decide the concentration of diacetyl in fermented milk cultured in 25 or 30 ℃ for 4, 8, 12, 24, 36 and 48 hours respectively. GC-MS method was used to assess the identification and contents of volatile flavor compounds. 【Result】 There were plenty of metabolized diacetyls in early fermentation. Along with the prolonging of fermented time, the contents increased, and the rates of metabolizing diacetyl accelerated obviously. At the same time, the research identified 19 kinds of flavor compounds, including 4 kinds of esters, ethanol, α-furan formaldehyde, 5 kinds of short linked fatty acids, 8 kinds of carbonyls with GC-MS. 【Conclusion】 There were high level diacetyl contents, higher in the later stage of fermentation. Furthermore, the contents of ethanol, 2, 3-butanedione and 2, 3-pentanedione in the milk fermented by *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *diacetylactis* were higher than the contents in corresponding milk fermented by other single lactic acid bacteria.

Key words: fermented milk; *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *diacetylactis*; diacetyl; flavor compound

* [收稿日期] 2008-05-21
[基金项目] 农业科技成果转化项目(02EFN212301073)
[作者简介] 王伟军(1979—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 讲师, 硕士, 主要从事发酵食品与功能性食品研究。

发酵乳制品一直驱动着乳制品消费的快速发展,乳酸菌的发酵作用在发酵乳制品加工、风味形成及质地创新方面具有至关重要的工业意义^[1-2]。目前,用于发酵乳制品的微生物大体可分为乳酸产生菌、柠檬酸发酵香味产生菌及乳酸与香味产生菌 3 类^[3]。国内有关发酵乳风味物质的研究较少,仅有的研究也多集中在传统酸奶类产品的工艺研究^[4-5]及几种主要风味物质的成分检测方面^[6-7],这些研究很好地分析了酸奶产品中的主要风味影响物质,但尚未见针对发酵乳中单菌种产香特性的系统研究。乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种(*Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *diacetyl*, 本文简称 L. dia)能利用柠檬酸盐产生一些代谢产物,其中包括许多发酵乳制品中的重要风味物质——双乙酰类^[8-9]。为了明确乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种发酵过程中风味物质的组成及变化,本研究借鉴国内外研究食品风味物质的方法,对 L. dia 菌发酵乳中的风味成分进行了分析,以期确定 L. dia 菌在乳基质中的产香特性,并为其产业化开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

乳酸乳球菌乳亚种丁二酮变种(*Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar *diacetyl*),由东北农业大学畜产品加工实验室保藏。丁酸甲酯(标准品),购于 Sigma 公司;乙醚(色谱纯),购于天津市福晨化学试剂厂;高纯氮气,购于哈尔滨黎明气体有限公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 主要试验仪器与设备

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

1.3 试验方法

1.3.1 发酵乳的制备与样品处理 配制体积分数为 12%的全脂乳粉水溶液(根据试验需要决定溶液配制的体积和数量),经 115 ℃、15 min 杀菌后冷却至 30 ℃左右,按 2%的体积分数接种发酵剂,然后进行以下试验:(1)分别于 25,30 ℃发酵 4,8,12,24,36 和 48 h,取样品 100 mL 用 100 mL 水分 3 次洗溶于 1 000 mL 圆底烧瓶中,随后进行水蒸气蒸馏,冰盐浴冷却收集,直到所收集馏出液接近 100 mL,转入 100 mL 容量瓶中用水定容,用于测定发

酵乳中的双乙酰含量;(2)30 ℃发酵凝乳后,取发酵后样品 300 mL,用 300 mL 水分 3 次洗溶于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 15 μ L 含有体积分数 0.1%丁酸甲酯的乙醚溶液(内标),接入同时蒸馏萃取装置的一端,用磁力加热搅拌器加热并搅拌(中速,(95 $\pm$ 3) ℃);用 100 mL 磨口三角瓶取色谱纯乙醚 40 mL,接入同时蒸馏萃取装置的另一端,用(40 $\pm$ 1) ℃水浴加热;接通循环冷却水。蒸馏萃取 4 h,取下醚瓶,冷却,加入体积分数约为 10%的无水 Na_2SO_4 ,4 ℃静置 4~7 h,滤纸过滤除去 Na_2SO_4 ,用低速高纯氮气吹扫至 500 μ L 左右,于小型样品瓶中保存,用于气谱-质谱进样分析。

1.3.2 双乙酰含量的测定 由于发酵乳中的双乙酰类和邻苯二胺反应可以生成 2,3-二甲基吡嗪,生成物的盐酸盐在 335 nm 波长下有 1 个最大吸收峰,据此可对双乙酰类物质进行定量测定^[10-11]。具体操作步骤如下:吸取水蒸气蒸馏的馏出液各 10 mL,加入到 2 支试管中,另外在第 1 管加入 0.5 mL 邻苯二胺溶液,充分振荡 2 支试管后,置于暗处反应 20~30 min,取出后向第 1 管加入 4 mol/L 盐酸溶液 2.0 mL,向第 2 管加入 4 mol/L 盐酸溶液 2.5 mL。用紫外分光光度计于波长 335 nm 处,以第 2 管作为空白对照测定第 1 管(即样品)的吸光度,重复 3 次。

发酵乳中双乙酰含量按下式计算:

$$c=4\times(1.2E-0.01)。$$

式中: c 为发酵乳中的双乙酰的含量, $\mu\text{g/mL}$; E 为对应的吸光度;1.2 为吸光度和双乙酰的换算系数;0.01 为校正系数^[10]。

1.3.3 挥发性风味物质的分离和测定 采用 GC/MS 联用仪和 Agilent 气相色谱(GC-6890)-质谱(MS-5973N)联用仪进行色谱测定。色谱条件:色谱柱为 HP-INNOWax 毛细管柱;柱温.起始温度 60 ℃,保持 2 min,然后以 10 ℃/min 的速度升温到 200 ℃;载气.氦气,氦气流速 1.5 mL/min;进样口温度.250 ℃;进样量.1 mL;进样方式.手动;分流比.50:1。质谱条件:电离方式. EI;电子能量.70 eV;接口温度.280 ℃;离子源温度.200 ℃;工作站. Agilent ChemStation;质谱库. Agilent NIST 2005 MS 谱库。

2 结果与分析

2.1 L. dia 菌中双乙酰含量随发酵时间的变化

L. dia 菌发酵乳在 25,30 ℃分别培养 0~48 h,其中的双乙酰含量随时间的变化情况如图 1 所示。

由图 1 可知, *L. dia* 菌代谢前期其发酵乳中未发现大量的双乙酰积累,但随着发酵时间的延长,双乙酰含量逐步增加,在两种温度条件下,发酵进行 24 h 后,双乙酰的生成速度明显加快并持续升高,于发酵 48 h 时达到最高。其原因可能是因为柠檬酸是双乙酰代谢的主要初始物质,在发酵初期产生的柠檬酸中只有很少一部分被用来积累 α -乙酸乳酸进而积累丁二酮,而大部分柠檬酸用于进行三羧酸循环,因而双乙酰的积累较慢。

发酵前期(<12 h),发酵温度为 30 ℃ 时, *L. dia* 菌的双乙酰代谢能力较强;发酵时间超过 12 h 后, *L. dia* 菌在 25 ℃ 时条件下代谢的双乙酰量较大。造成不同温度下双乙酰变化差异的主要原因,是发酵温度与菌种最适生长、代谢温度的不同所致,高温发酵(30 ℃)能够加速 *L. dia* 菌的生长,并提前达到一定的丁二酮产量。而低温发酵(25 ℃)是 *L. dia* 菌生产丁二酮的最适代谢温度,这与 Monnet 等^[12]的研究结论相同。

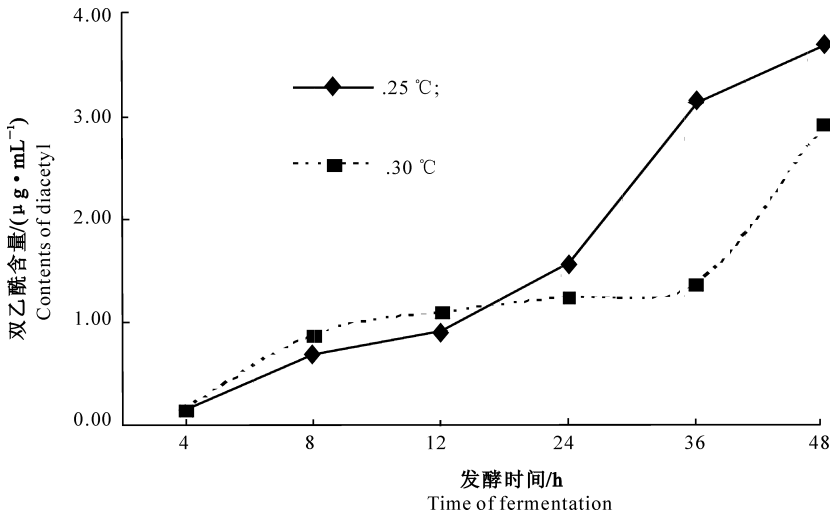


图 1 *L. dia* 菌发酵乳发酵过程中双乙酰含量随发酵时间的变化

Fig. 1 Changes of diacetyl during fermentation by *L. dia*

2.2 *L. dia* 菌发酵乳中风味物质的鉴定

得到的总离子流图如图 2 所示。

L. dia 菌发酵乳经前处理后进行 GC-MS 分析,

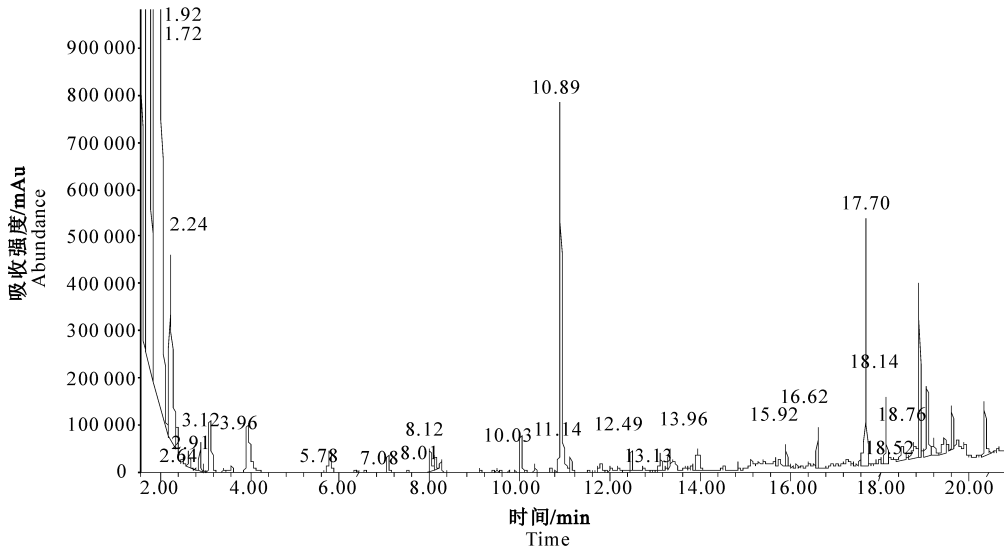


图 2 *L. dia* 菌发酵乳 GC-MS 分析的总离子流图

Fig. 2 Total ion current (TIC) of milk fermented by *L. dia*

总离子流图中各峰的详细信息及鉴定结果如表 1 所示。

表 1 L. dia 菌发酵乳样品总离子流图中各峰的详细信息及其鉴定结果
Table 1 Information and results of the TIC of milk fermented by L. dia

保留时间/min Retention time	总面积比/% Rate of total area	鉴定结果 Result	保留时间/min Retention time	总面积比/% Rate of total area	鉴定结果 Result
1.72	41.54	乙酸乙酯 Ethyl acetate	13.13	0.23	2-十一酮 2-undecanone
1.92	36.86	乙醇 Ethyl alcohol	13.33	0.14	未检出 Not detected
2.24	3.20	2,3-丁二酮 2,3-butanedione	13.96	0.46	1-十六烯烃 1-hexadecylene
2.32	0.11	丁酸甲酯 Methyl butyrate	15.92	0.17	己酸 Caproic acid
2.64	0.19	未检出 Not detected	16.62	0.31	丁二酸二-(2-甲基)丙酯 Succinate-(2'-methyl-)dipropyl ester
2.91	0.29	未检出 Not detected	17.70	2.18	2-甲基-丁二酸二-(2'-甲基)丙酯 2-methyl-succinate-(2'-methyl-)dipropyl ester
3.12	0.89	2,3-戊二酮 2,3-pentanedione	18.14	0.58	辛酸 Octanoic acid
3.96	1.32	未检出 Not detected	18.51	0.38	未检出 Not detected
5.78	0.45	2-庚酮 2-heptanone	18.76	0.43	未检出 Not detected
7.08	0.21	未检出 Not detected	18.88	1.46	己二酸二-(2-甲基)丙酯 Adipate-(2-methyl-)dipropyl ester
8.01	0.29	3-羟基-2-丁酮 3-hydroxy-2-Butanone	19.06	0.98	十六醛 Hexadecanal
8.12	0.21	2-甲基-2-羟基丙酸 2-methyl-3-hydroxypropionic acid	19.21	0.28	未检出 Not detected
10.03	0.41	2-壬酮 2-Nonanone	19.44	0.33	未检出 Not detected
10.89	4.71	乙酸 Acetic acid	19.60	0.49	污染成分 Pollutants
11.14	0.13	2-呋喃甲醛 2-furancarboxaldehyd	20.33	0.61	癸酸 Decanoic acid
12.48	0.14	未检出 Not detected			

L. dia 菌发酵乳样品经过气相色谱分离后可得到 31 个主要峰,共鉴定出 20 种(其中丁酸甲脂为内标)风味成分,其余 11 种物质因在质谱图库中未找到相应特征的质谱图,故未能鉴定出其种类。保留时间在 19.60 min 的峰为污染峰,非发酵乳中风味物质。综上分析,共有 19 种成分与 L. dia 菌发酵乳

的风味有关;其中酯类 4 种,醇类 1 种,杂环化合物 1 种,短链挥发性脂肪酸 5 种(即乙酸、己酸、辛酸、癸酸和 1 种羟基酸),羰基化合物 8 种。另外,除 3 种 α -酮类、1 种呋喃醛类和 1 种十六碳醛外,还鉴定出 3 种双乙酰类物质。19 种风味物质的含量如表 2 所示。

表 2 L. dia 菌发酵乳中的风味成分及其含量
Table 2 Flavor compounds and their contents in the L. dia

风味成分 Flavour compound	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration	风味成分 Flavour compound	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration
乙酸乙酯 Ethyl acetate	18.479	2-十一酮 2-undecanone	0.102
乙醇 Ethyl alcohol	16.397	1-十六烯烃 1-hexadecylene	0.204
2,3-丁二酮 2,3-butanedione	1.425	己酸 Caproic acid	0.077
2,3-戊二酮 2,3-pentanedione	0.398	丁二酸二-(2-甲基)丙酯 Succinate-(2'-methyl-)dipropyl ester	0.140
2-庚酮 2-heptanone	0.199	2-甲基-丁二酸二-(2'-甲基)丙酯 2-methyl-succinate-(2'-methyl-)dipropyl ester	0.968
3-羟基-2-丁酮 3-hydroxy-2-Butanone	0.130	辛酸 Octanoic acid	0.260
2-甲基-2-羟基丙酸 2-methyl-3-hydroxypropionic acid	0.092	己二酸二-(2-甲基)丙酯 Adipate -(2-methyl-)dipropyl ester	0.649
2-壬酮 2-nonanone	0.181	十六醛 Hexadecanal	0.436
乙酸 Acetic acid	2.095	癸酸 Decanoic acid	0.273
2-呋喃甲醛 2-furancarboxaldehyd	0.058		

L. dia 菌能利用柠檬酸产生双乙酰,对发酵乳风味的贡献很大。双乙酰代谢的主导途径为:活性乙醛与丙酮酸在 α -乙酰乳酸合成酶作用下合成 α -乙酰乳酸,通过化学氧化脱羧作用生成双乙酰,其中乙偶姻(3-羟基-2-丁酮)是一个重要的中间物质,这种

途径已为相关研究者广泛接受^[12-16]。本试验检测到的 3-羟基-2-丁酮,证明 L. dia 菌种存在这种代谢途径。

由表 2 可以看出,L. dia 菌代谢的主要风味影响物质是羰基化合物,如 2,3-丁二酮、2,3-戊二酮的

生成能力要强于唾液链球菌嗜热亚种,在相同的发酵、检测条件下,唾液链球菌嗜热亚种发酵乳中的 2,3-丁二酮、2,3-戊二酮含量分别为 0.131~0.243 和 0.069~0.223 $\mu\text{g/mL}$ ^[17]。由于 3-羟基-2-丁酮可以自然转化成 2,3-丁二酮,所以在 L. dia 及唾液链球菌嗜热亚种 2 种菌中,未发现 3-羟基-2-丁酮含量的显著差异,二者发酵乳中 3-羟基-2-丁酮的含量依次为 0.130 和 0.041~0.165 $\mu\text{g/mL}$ ^[17]。

3 结 论

1)L. dia 菌代谢前期有一定量的双乙酰积累,随着发酵时间的延长,双乙酰含量增加,且在 25 ℃ 较低浊度条件下积累更快,表明发酵乳中的双乙酰主要产自发酵后期,提示在实际生产中,于低温条件下进行后发酵,能够增加产品的香味。

2)在发酵乳中共鉴定出 19 种风味成分,其中酯类 4 种,醇类 1 种,杂环化合物 1 种,短链挥发性脂肪酸 5 种,羰基化合物 8 种。L. dia 菌代谢产生的主要风味影响物质中,2,3-丁二酮和 2,3-戊二酮的含量明显高于唾液链球菌嗜热亚种发酵乳中的相应含量。在风味特性方面,其生产优势明显,可独立或者与其他乳酸菌菌种配合应用于产香发酵乳制品的生产。

[参考文献]

[1] Cogan T M, Beresford T P. Invited review: advances in starter cultures and cultured foods [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(11): 4005-4021.

[2] Drake M A. Invited review: sensory analysis of dairy foods [J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(11): 4925-4937.

[3] Wood B J B. 发酵食品微生物学 [M]. 2 版. 徐岩, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 232-255.

Wood B J B. Fermented food microbiology [M]. 2nd Ed. Xu Y, Translated. Beijing: China Light Industry Press, 2001: 232-255. (in Chinese)

[4] 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.

Yu H. Controlling and formation of the flavour of yoghurt [J]. Journal of Chengdu University: Natural Science, 1999, 18(4): 19-21. (in Chinese)

[5] 张兰威. 乳与乳制品工艺学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 205, 216.

Zhang L W. Dairy science and technology [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press. 2006: 205, 216. (in Chinese)

[6] 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.

Lv J P, Luo C X. Dynamics analysis of volatile flavor com-

pounds in lactic acid bacteria fermented milk [J]. Food Science, 1998, 19(10): 13-16. (in Chinese)

[7] 华朝丽, 赵 征. 瑞士乳杆菌、丁二酮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.

Hua Z L, Zhao Z. Studies on a new ketone flavor yogurt co-fermented by *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus diacetil-lus* [J]. China Dairy Industry, 2004, 32(2): 17-20. (in Chinese)

[8] 王伟军, 李延华, 张兰威, 等. 发酵乳中羰基化合物和有机酸含量的研究 [J]. 中国酿造, 2007(5): 41-44.

Wang W J, Li Y H, Zhang L W, et al. Study on concentration variety of carbonyl compounds and organic acids in fermented milk [J]. China Brewing, 2007(5): 41-44. (in Chinese)

[9] 韩希妍, 孙大庆, 霍贵成. 乳酸菌风味代谢物质的基因调控 [J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 1105-1109.

Han X Y, Sun D Q, Huo G C. Gene regulation to lactic acid bacteria for increasing production of flavor metabolite [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(6): 1105-1109. (in Chinese)

[10] 黄伟坤. 食品检验与分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989: 657-658.

Huang W K. Food testing and analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1989: 657-658. (in Chinese)

[11] 王 丹, 刘 鹏. 酸奶中联乙酰含量测定方法的初步探讨 [J]. 中国乳品工业, 1992, 20(2): 14-18.

Wang D, Liu P. Preliminary study on the detecting method of biacetyl in yogurt [J]. China Dairy Industry, 1992, 20(2): 14-18. (in Chinese)

[12] Monnet C, Schmilt P. Diacetyl production in milk by an α -Acetolactic acid accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* [J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77: 29.

[13] 王伟军. 不同乳酸菌单菌种发酵乳风味成分研究 [D]. 黑龙江: 东北农业大学, 2006.

Wang W J. Study on flavor compounds of fermented milk with different single lactic acid bacteria [D]. Heilongjiang: North-east Agriculture University, 2006. (in Chinese)

[14] Shiratsuchi H, Shimoda M, Imayoshi K, et al. Volatile flavor compounds in spray-dried skim milk powder [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1994, 2: 984-988.

[15] Ott A, Laurent B, Chaintreau A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1997, 45: 850-858.

[16] Coqan T M, Jordan K N. Metabolism of leuconostoc bacteria [J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77(9): 2704-2717.

[17] 王伟军, 李延华, 张兰威, 等. 唾液链球菌嗜热亚种发酵乳风味成分分析 [J]. 食品科学, 2008, 29(4): 263-266.

Wang W J, Li Y H, Zhang L W, et al. Flavour compound production in milk by culturing with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* [J]. Food Science, 2008, 29(4): 263-266. (in Chinese)