



中国食品学报

Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology

ISSN 1009-7848, CN 11-4528/TS

《中国食品学报》网络首发论文

题目： 基于电子鼻和电子舌技术评价乳酸乳球菌对发酵乳风味品质的影响
作者： 任敏，多拉娜，王帅，李敏，杨成聪，孙志宏，孙天松
网络首发日期： 2020-12-15
引用格式： 任敏，多拉娜，王帅，李敏，杨成聪，孙志宏，孙天松. 基于电子鼻和电子舌技术评价乳酸乳球菌对发酵乳风味品质的影响. 中国食品学报.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4528.TS.20201215.1656.004.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于电子鼻和电子舌技术评价乳酸乳球菌对发酵乳风味品质的影响

任敏, 多拉娜, 王帅, 李敏, 杨成聪, 孙志宏, 孙天松[✉]

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

*通信作者 孙天松 E-mail: sts9940@sina.com

摘要 目的: 探究不同发酵特性的乳酸乳球菌对发酵乳品质的影响。方法: 通过电子鼻与电子舌技术, 结合多元统计分析对 191 株乳酸乳球菌所制备的发酵乳进行风味与滋味品质评价。结果: 主成分分析表明, 具有不同产酸和蛋白水解特性的乳酸乳球菌所制备的发酵乳风味特征呈分离趋势。Mann-Whitney 分析结果表明, 慢速产酸组的发酵乳芳香成分显著低于中等及快速产酸组, 而甲烷、乙醇、有机硫化物则显著高于另外两组 ($P<0.01$)。在滋味方面, 慢速产酸组发酵乳的鲜味强烈, 而中等和快速产酸组酸味更强烈 ($P<0.01$)。相关性分析结果表明, 菌株的产酸速率与蛋白水解程度呈显著负相关 ($P<0.01$)。结论: 产酸速率快、蛋白水解能力弱的乳酸乳球菌可赋予发酵乳更多的芳香成分以及更强烈的酸味, 而产酸慢、蛋白水解能力强的菌株使得发酵乳具有更多的甲烷、乙醇、有机硫化物成分以及较强的鲜味。

关键词 乳酸乳球菌; 发酵乳; 电子鼻; 电子舌; 多元统计分析

Effect of *Lactococcus lactis* on Flavor Quality of Fermented Milk Based on Electronic Tongue and Electronic Nose

Ren Min, Duolana, Wang Shuai, Li Min, Yang Chengcong, Sun Zhihong, Sun Tiansong[✉]

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

Abstract Objective: The effect of different fermentation characteristics of *Lactococcus lactis* on the quality of fermented milk was explored. Methods: Fermented milk were made with 191 *Lactococcus lactis* strains that the flavor and taste of fermented milk were assessed by electronic nose, electronic tongue, and multivariate statistical analysis. Results: Principal component analysis (PCA) showed separation trends in the flavor and taste of the fermented milk samples by the strains that had different acid-producing rates and proteolytic activity. Mann-Whitney test showed that aromatic compounds of the fermented milk made by moderate and fast acid-producing strains more than fermented milk made by slow acid-producing strains, while opposite trends were observed in methane, ethanol and organic sulfur ($P<0.01$). In terms of taste, there is strong umami of the fermented milk made by slow acid-producing strains and the more sourness of fermented milk made by moderate and fast acid-producing strains ($P<0.01$). There was a significantly negative correlation between acid-producing capacity and proteolytic activity ($P<0.01$). Conclusion: The fermented milk produced by the fast acid-producing and low proteolytic activity *Lactococcus lactis* had more aromatic compounds, and were sourer, while fermented milk produced by the slow acid-producing and strong proteolytic activity strains had more methane, ethanol and organic sulfur, and stronger umami taste.

Key words *Lactococcus lactis*; fermented milk; electronic nose; electronic tongue; multivariate statistical analysis

发酵乳制品尤其是酸奶, 凭借其独特的风味和丰富的营养物质深受广大消费者的喜爱。风味作为评定酸奶感官品质重要的属性之一, 主要受到酸奶发酵剂菌种德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31622043); 内蒙古自然科学基金项目 (2016JQ04)

作者简介: 任敏 (1994—), 女, 硕士生

网络首发时间: 2020-12-15 16:58:34 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4528.TS.20201215.1656.004.html>

产生的乳酸以及各种挥发性有机芳香类化合物的影响^[1-2]。Çelik^[3]认为由发酵剂代谢产生的乙酸、丁二酮、乙偶姻、乳酸和挥发性脂肪酸这 5 种物质是影响酸奶风味的关键性物质^[4-5]。由此可见, 发酵剂菌株的发酵特性对生产高品质酸奶至关重要。

乳酸乳球菌是乳球菌属中最具代表性的菌种, 其两个亚种(乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种)凭借优良的产酸、产香等特性, 已经广泛应用于奶酪、发酵乳以及酸菜等产品的生产中^[6]。在产酸特性方面, 大量基因组研究结果证实乳酸乳球菌有着完整的乳糖代谢通路^[7-8], 它们通过磷酸转移酶系统或透性蛋白实现乳糖的降解并产生乳酸。自然发酵乳制品是乳酸乳球菌的良好来源, 然而, 许多研究发现从自然发酵乳制品中分离得到的乳酸乳球菌产酸能力存在显著差异^[9-10]。Gutiérrez-Méndez 等^[11]研究表明乳酸乳球菌的产酸能力与蛋白水解能力存在相关性。其它研究还发现发酵产生的乳酸能够调节酪蛋白水解, 进而影响产品风味^[12]。目前关于不同发酵特性, 包括产酸、蛋白水解能力的乳酸乳球菌与发酵乳滋气味关系的研究还鲜有报道。

本研究采用电子鼻和电子舌技术对 191 株分离自传统发酵乳制品中的乳酸乳球菌所制备的发酵乳进行滋气味评价, 旨在获得不同发酵特性菌株与发酵乳滋气味之间的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

191 株乳酸乳球菌均由内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库提供, 详细信息见表 1。

表1 191株乳酸乳球菌菌株信息
Table 1 Information of 191 *Lactococcus lactis*

分离地	分离源	菌株编号		
内蒙古巴彦淖尔市	酸驼奶	IMAU10056, IMAU10086, IMAU10068, IMAU10065, IMAU10066		
	鲜奶	IMAU11497, IMAU11520, IMAU11546		
	酸牛奶	IMAU11505, IMAU1153, IMAU11547		
	奶油	IMAU11493, IMAU11534, IMAU11513		
	奶酪	IMAU11558		
	酸粥	IMAU70097		
内蒙古呼伦贝尔盟	酸牛奶	IMAU10407, IMAU10400, IMAU10449, IMAU10484, IMAU10422		
	酸马奶	IMAU11183		
	鲜牛奶	IMAU11207		
内蒙古赤峰市	酸牛奶	IMAU10842, IMAU10852, IMAU10856, IMAU10860, IMAU10862, IMAU10876, IMAU10880, IMAU10887, IMAU10937, IMAU10940, IMAU10944, IMAU10945, IMAU10844, IMAU10848, IMAU10850, IMAU10855, IMAU10877, IMAU10897, IMAU10854, IMAU10941 IMAU10943, IMAU10946, IMAU10950, IMAU10982, IMAU10859, IMAU10869, IMAU10872, IMAU10881, IMAU11039, IMAU11040, IMAU11043, IMAU11049, IMAU10888, IMAU10889, IMAU10892, IMAU10893, IMAU10894, IMAU10951, IMAU10987, IMAU10994		
		IMAU11058, IMAU11062, IMAU11064, IMAU11076, IMAU11079, IMAU11067, IMAU11060, IMAU11069, IMAU11070, IMAU11077, IMAU11081, IMAU11083, IMAU11085, IMAU11087, IMAU11089, IMAU11118		
		IMAU11809, IMAU11810, IMAU11815, IMAU11817, IMAU11819, IMAU11820, IMAU11818, IMAU11866, IMAU11875, IMAU11878, IMAU11971, IMAU11821, IMAU11822, IMAU11823, IMAU11816, IMAU11824, IMAU11827, IMAU11836, IMAU11838, IMAU11843		
		IMAU11845, IMAU11855, IMAU11863, IMAU11879, IMAU11882, IMAU11885, IMAU11886, IMAU11887, IMAU11888, IMAU11889, IMAU11905, IMAU11906, IMAU11919, IMAU11920, IMAU11926, IMAU11934, IMAU11936, IMAU11943, IMAU11947, IMAU11951 IMAU11981		
		IMAU11161, IMAU11169		
		IMAU11157		
		IMAU11411, IMAU11489, IMAU11490		
		IMAU11440, IMAU11463, IMAU11471, IMAU11485		
		IMAU11476		
		IMAU11468		
		内蒙古包头市	酸马奶	IMAU11161, IMAU11169
			奶豆腐	IMAU11157
			奶油	IMAU11411, IMAU11489, IMAU11490
			鲜奶	IMAU11440, IMAU11463, IMAU11471, IMAU11485
内蒙古包头市	酸牛奶	IMAU11476		
	奶酪	IMAU11468		

内蒙古鄂尔多斯市	酸牛奶	IMAU11239, IMAU11258
	鲜奶	MAU11262
	绵羊酸奶	IMAU11225, IMAU11272, IMAU11276
	绵羊鲜奶	IMAU11299
	绵羊奶油	IMAU11309
	酸奶酪	IMAU11387
	山羊鲜奶	IMAU11235
内蒙古蓝旗	酸牛奶	IMAU11119
	酸黄牛奶	IMAU60037, IMAU60040
青海省	牦牛奶	IMAU40066
云南省	乳饼	IMAU50095, IMAU50152, IMAU50101, IMAU50106
		IMAU50107, IMAU50117, IMAU50126, IMAU50153
		IMAU50156, IMAU50159, IMAU50163, IMAU50166
		IMAU50105, IMAU50170, IMAU50112, IMAU50110
		IMAU50108, IMAU50113, IMAU50119, IMAU50121
		IMAU50141, IMAU50130, IMAU50104
	IMAU50049	
	乳扇酸乳清	IMAU50049
新疆伊犁	酸驼奶	IMAU32258, IMAU20099, IMAU20105
	酸牛奶	IMAU32070, IMAU32103, IMAU32156, IMAU32611
巴拉圭		IMAU32676, IMAU20795
	酸牛奶	IMAU96004, IMAU96006
俄罗斯卡尔梅克	酸奶油	IMAU90064, IMAU90221
俄罗斯布里亚特	酸牛奶	IMAU90200
	酸牛奶	IMAU92089, IMAU92113, IMAU92143, IMAU94238
俄罗斯图瓦	酸牛奶	IMAU95017, IMAU95085

1.2 主要试剂与设备

全脂乳粉, 新西兰恒天然; M17 液体培养基、M17 固体培养基, 英国 Oxoid 公司; PBS 缓冲液, 天津市大茂化学试剂厂; 电子舌所需内部溶液、参比溶液、阴离子溶液、阳离子溶液和味觉标准溶液, 日本 Insent 公司。

PEN3 电子鼻: 配备 10 个金属氧化传感器, 德国 Aairsense 公司; SA 402B 电子舌: 配备 5 个味觉传感器和 2 个参比电极, 日本 Insent 公司; Eppendorf Centrifuge 5810 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; LRH-250 恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; ZHJH-C1214C 无菌工作台, 上海智城分析仪器制造有限公司; Vortex-genie 2 漩涡振荡器, 美国 Scientific Industries 公司; TW-PB3X5L 水浴槽, 上海沃迪自动化装备股份有限公司; SRH 60-70 高压均质机, 上海申鹿均质机有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵乳的制备

将 191 株乳酸乳球菌活化至第 3 代, 其培养液采用梯度稀释法进行活菌计数。全脂复原乳经均质、杀菌后, 按 10^6 CFU/mL 的接种量接入菌体, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 发酵至 pH 4.6, 将发酵乳置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后熟 24 h 后用于滋气味的测定。同时, 记录发酵时间, 测定 0 h 及发酵终点的滴定酸度以及游离氨基氮 (FAN, mmol/L) 含量, 计算产酸速率 ($\Delta^{\circ}\text{T/h}$) 以及蛋白水解度。

1.3.1.1 产酸速率的测定

pH 值的测定使用精密 pH 计。滴定酸度的测定方法依据国标 GB5009.239-2016^[13]。

产酸速率 ($\Delta^{\circ}\text{T/h}$) = (发酵终点滴定酸度-发酵起点滴定酸度) / 发酵时间^[14]

1.3.1.2 蛋白水解度的测定

本研究采用邻苯二甲醛法 (OPA) 测定发酵乳 0 h 以及发酵终点的 FAN 含量, 通过其变化值来衡量菌株的蛋白水解程度^[15]。

蛋白水解度 (ΔFAN , mmol/L) = (发酵终点 FAN 含量-发酵起点 FAN 含量)

1.3.2 电子鼻对发酵乳的测定

取发酵乳样品 10 mL 两倍稀释后置于 120 mL 样品瓶中使用电子鼻进行气味检测, 采用 10 个金属氧化传感器测定不同敏感物质类型。每隔 1 s 测定一个响应值, 共测定 60 s。响应值在 45 s 后达到稳定, 选择 49, 50, 51 s 时的响应值为测试原始数据^[16-17]。

1.3.3 电子舌对发酵乳的测定

取发酵乳 50 g，按照 1:3 加水稀释， $10000\times g$ 离心 10 min 后取上清液抽滤备用。将 100 mL 发酵乳上清液均匀的倒在品杯中进行样品测定^[18]。每个样品测定 4 个平行值，选取后 3 次测定值作为原始数据，以减少系统误差^[19]。

1.4 统计分析

使用主成分分析法 (Principal component analysis, PCA) 对发酵乳整体滋气味品质进行分析；使用 Mann-Whitney 分析确定与发酵乳滋味品质差异显著相关的指标，通过 Spearman 相关性分析确定各指标之间的相关关系。使用 R 语言进行 Mann-Whitney 以及 Spearman 相关性分析，使用 SAS 9.0 进行主成分分析，使用 Origin 8.6 以及 GraphPad prism 6 软件进行数据可视化。

2 结果与分析

2.1 菌株的产酸速率以及蛋白水解程度分析

乳酸乳球菌能发酵牛奶中的乳糖等碳水化合物生成乳酸和一些有机酸，在降低发酵乳 pH 值的同时赋予发酵乳良好的滋气味。而产酸能力不同的菌株对发酵乳最终的品质有重要影响。刘文俊^[5]认为酸奶发酵是一个动态的过程，产酸速率可以反映整个发酵过程中菌株的产酸特性，宋宇琴^[14]也将产酸速率的快慢作为衡量保加利亚乳杆菌产酸能力的指标之一。本研究团队先前已测定了供试菌株的产酸能力 (图 1A)，191 株乳酸乳球菌的产酸速率范围在 $1.70\sim 6.88 \Delta^\circ\text{T/h}$ ^[20]。参考刘文俊^[5]、宋宇琴^[14]的方法将 191 株乳酸乳球菌分为 3 组，分别为慢速产酸菌株 72 株 (S 组，产酸速率 $< 3.5 \Delta^\circ\text{T/h}$)、中等产酸菌株 71 株 (M 组， $3.5 \Delta^\circ\text{T/h} \leq \text{产酸速率} \leq 4.5 \Delta^\circ\text{T/h}$) 和快速产酸菌株 48 株 (F 组，产酸速率 $\geq 4.5 \Delta^\circ\text{T/h}$)，方差分析结果表明 3 组菌株之间的产酸速率存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

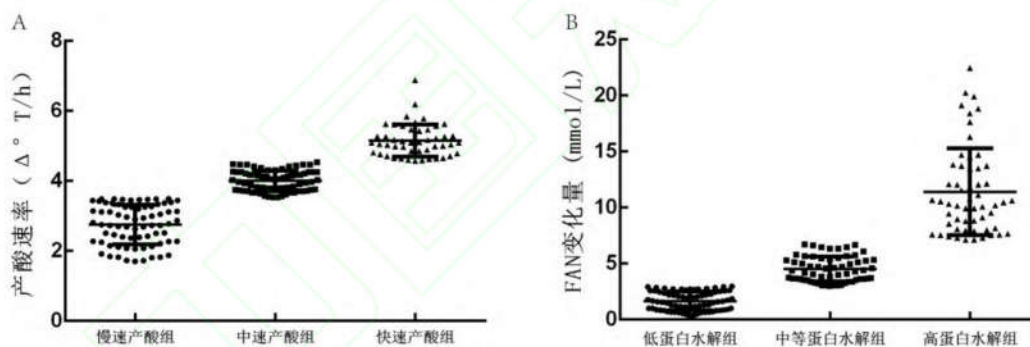
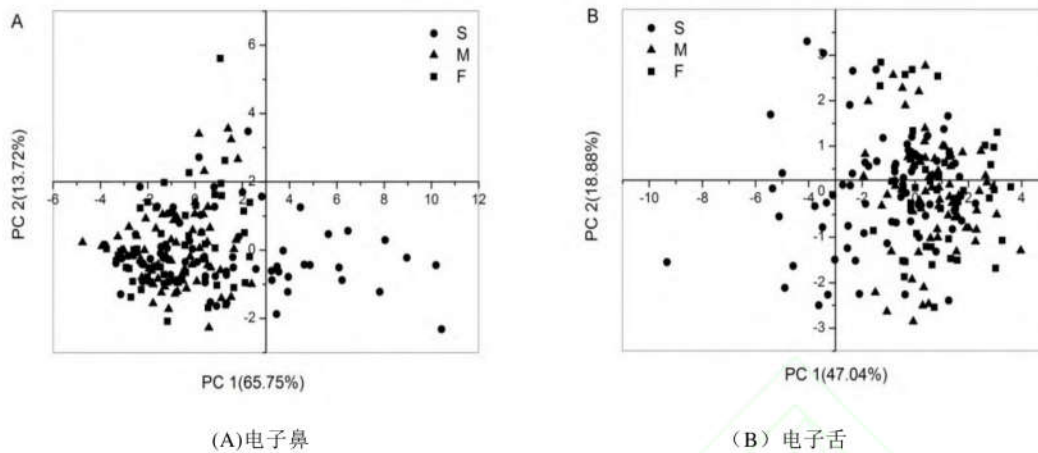


图 1 乳酸乳球菌的产酸速率以及 FAN 的变化量
Fig.1 The acid producing rate and FAN value of *Lactococcus lactis*

发酵乳样品中的蛋白质主要是酪蛋白和乳清蛋白，乳清蛋白中含有非蛋白氮，即可溶解于三氯乙酸 (TCA) 的部分含氮化合物，因此采用 OPA 法测定 191 株菌在发酵期间 FAN 含量的变化，进而评估乳酸乳球菌的蛋白水解能力^[21]。同样的，本研究团队在之前已测定了供试菌株的蛋白水解能力 (图 1B)，191 株乳酸乳球菌 ΔFAN 范围为 $0.28\sim 22.47 \text{ mmol/L}$ ^[20]。依据 ΔFAN 不同将全部菌株分为 3 组做后续分析，分别为低蛋白水解菌株 73 株 (L 组， $\Delta\text{FAN} < 3 \text{ mmol/L}$)、中等蛋白水解菌株 62 株 (M 组， $3 \text{ mmol/L} \leq \Delta\text{FAN} \leq 7 \text{ mmol/L}$)，高蛋白水解菌株 56 株 (H 组， $\Delta\text{FAN} > 7 \text{ mmol/L}$)，3 组之间也存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.2 不同产酸速率菌株制备发酵乳滋气味品质的差异性分析



注：S. 慢速产酸菌株；M. 中等产酸菌株；F. 快速产酸菌株。

图2 不同产酸速率乳酸乳球菌制备酸乳的滋气味品质 PC1 与 PC2 因子得分图

Fig.2 Graphical representation of the principal component analysis of the taste and odor profile of milk fermented by different acidogenic rate *Lactococcus lactis*

采用主成分分析法（PCA）对不同产酸速率的乳酸乳球菌制备发酵乳的滋气味进行分析，结果如图2所示。电子鼻和电子舌的结果均显示出S组发酵乳与M组以及F组有轻微的重叠，然而整体上呈分离趋势，这表明慢速产酸菌株所制备发酵乳的滋气味与快速和中等产酸菌株存在一定差异。表2为电子鼻的主成分特征向量值，PC1中甲烷、乙醇以及有机硫化物具有最高的正系数，芳香成分具有极高的负系数，PC2中氮氧化合物和硫化物的特征向量值较高。结合图2A可知，位于右半图的S组发酵乳，即慢速产酸菌株制备的发酵乳中，甲烷、乙醇以及有机硫化物响应值较高，而芳香成分响应值较低。

表2 电子鼻主成分特征向量值

Table 2 Eigenvector value of principal component of electronic nose

传感器名称	W1C	W5S	W3C	W6S	W5C	W1S	W1W	W2S	W2W	W3S
性能描述	芳香成分	氮氧化合物	芳香成分	氢气	芳香成分	甲烷	硫化物	乙醇	有机硫化物	烷烃
PC1	-0.37	0.28	-0.37	0.06	-0.37	0.37	0.29	0.37	0.36	0.15
PC2	0.18	0.58	0.18	-0.17	0.18	-0.22	0.55	-0.24	0.26	-0.25

注：W1C的敏感物质为芳香成分；W3C的敏感物质为氨水、芳香成分；W5C的敏感物质为烷烃（丙烷等）、芳香成分

同样的，电子舌的主成分特征向量值（表3）显示，PC1中酸味具有最大的正系数，而鲜味具有最大的负系数，PC2中涩味的回味和鲜味的回味特征向量值分别为0.66和0.46。结合图2B可知，位于左侧的S组发酵乳具有强烈的鲜味以及较弱的酸味。

表3 电子舌主成分特征向量值
Table 3 Eigenvector value of principal component of electronic tongue

项目	酸味	苦味	涩味	苦味回味	涩味回味	鲜味	鲜味回味	咸味
PC1	0.44	0.32	0.36	0.23	-0.09	-0.46	-0.37	-0.40
PC2	0.10	0.09	0.34	0.32	0.66	0.27	0.46	-0.20

使用 Mann-Whiney 分析确定与发酵乳滋味品质差异显著相关的指标 (图 3 和图 5)。由图 3 可知, 3 组不同产酸速率菌株制备的发酵乳在氢气和烷烃以及涩味的回味上没有显著差异。在芳香成分上, S 组显著低于 M 组和 F 组, 而在甲烷、乙醇以及有机硫化物上却显著高于 M 组和 F 组 ($P<0.001$)。在滋味方面, S 组发酵乳在酸味和涩味方面显著低于 M 组和 F 组, 而在鲜味、鲜味的回味、咸味方面显著高于其余 2 组 ($P<0.001$)。因此可知, 中等和快速产酸菌株所制备的发酵乳与慢速产酸菌株相比芳香成分含量更高, 并且具备较强的酸味和较弱的鲜味。

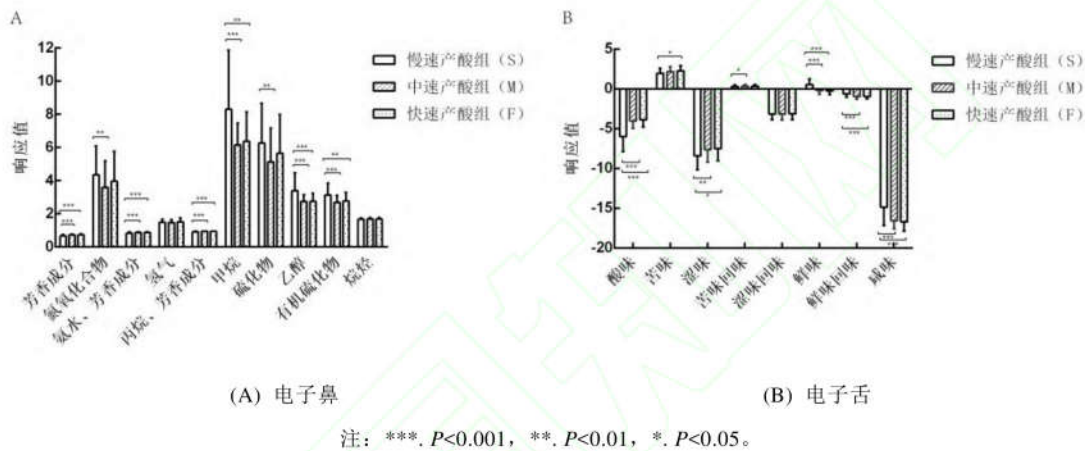


图 3 不同产酸速率乳酸乳球菌制备发酵乳滋气味品质的差异性分析
Fig.3 Difference analysis of the taste and odor profile of milk fermented by different acidogenic rate *Lactococcus lactis*

2.3 不同蛋白水解能力菌株制备发酵乳滋气味品质的差异性分析

按照 2.2 中的方法对具有不同蛋白水解程度的乳酸乳球菌所制备发酵乳的气味和滋味进行分析。结果表明, 高蛋白水解组 (H 组) 与其它 2 组的滋气味存在一定的分离趋势 (图 4)。结合表 2 和表 3 可知, 高蛋白水解组的菌株比其它 2 组有较高的甲烷、乙醇以及有机硫化物和较低的芳香成分; 在滋味方面, H 组具有较强烈的鲜味, 而 M 组和 L 组酸味较强。

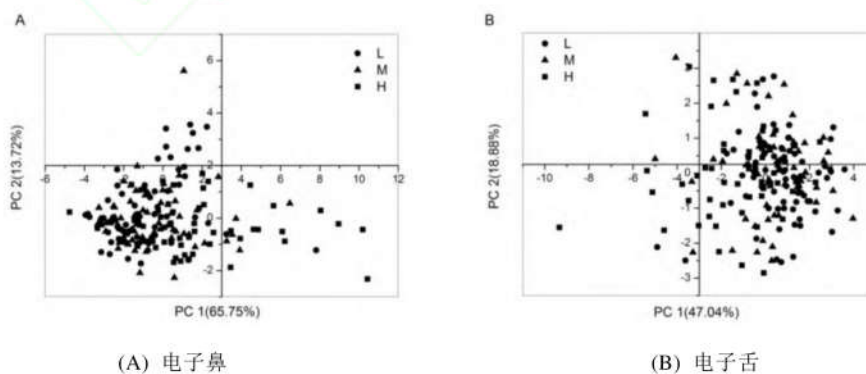


图 4 不同蛋白水解程度乳酸乳球菌制备发酵乳的滋气味品质 PC1 与 PC2 因子得分图
Fig.4 Graphical representation of the principal component analysis of the taste and odor profile of milk fermented by different proteolytic activity *Lactococcus lactis*

由图 5 可知,不同蛋白水解程度的 3 组菌株制备的发酵乳在氢气、烷烃成分以及涩味的回味上没有显著差异。而芳香成分、乙醇指标的响应值 3 组间均具有极显著差异 ($P<0.001$),这表明蛋白水解程度的差异对于芳香成分以及乙醇含量的影响较大。H 组的芳香成分显著低于其余 2 组,而甲烷、乙醇、有机硫化物显著高于其余 2 组 ($P<0.001$)。在滋味方面,H 组在咸味、鲜味和鲜味的回味上比其它 2 组更为强烈,而在酸味和涩味方面弱于其它 2 组。

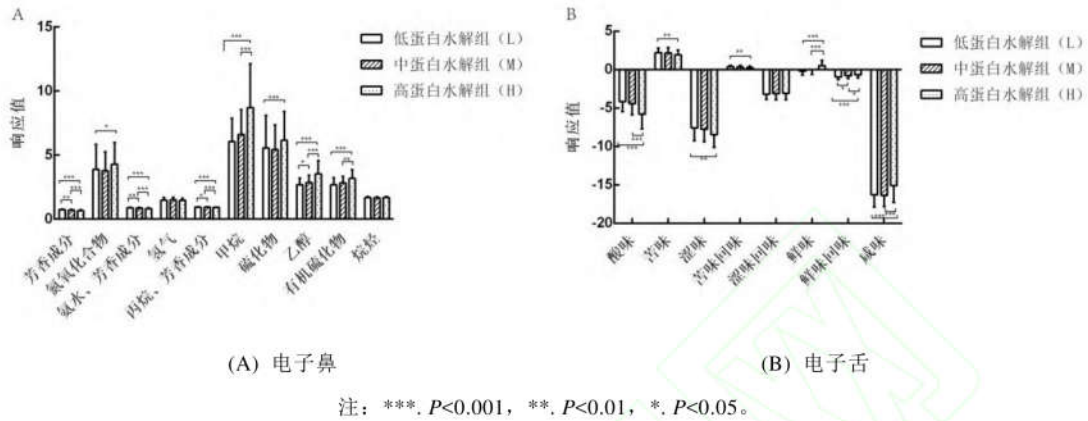


图 5 不同蛋白水解程度乳酸乳球菌制备发酵乳滋味品质差异性分析
Fig.5 Difference analysis of the taste and odor profile of milk fermented by different proteolytic activity *Lactococcus lactis*

2.4 发酵乳滋味品质与发酵特性的相关性分析

为探究发酵乳滋味指标以及菌株产酸和蛋白水解程度之间的相关性,依据电子鼻和电子舌的响应值以及产酸速率、 ΔFAN 值计算相关性指标,结果见图 6。菌株的产酸速率与芳香类风味物质呈显著正相关,与甲烷类和乙醇呈显著负相关(图 6A)。在滋味方面,菌株的产酸速率与酸味呈显著正相关,而与鲜味、鲜味的回味、咸味之间呈显著负相关(图 6B)。菌株的产酸速率与蛋白水解程度呈显著负相关,因此蛋白水解程度与各滋味的相关关系与产酸速率及各滋味之间的关系正好相反。此外,各滋味之间也存在相关性,例如:芳香成分与甲烷类和乙醇、酸味和鲜味存在显著负相关。

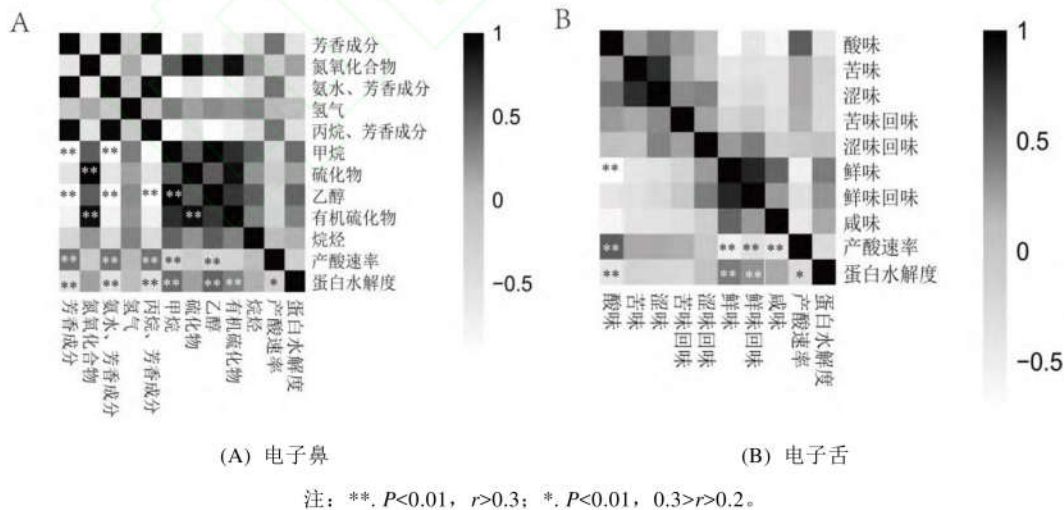


图 6 相关性分析图
Fig.6 Correlation analysis chart

3 讨论与结论

电子鼻和电子舌技术所产生的复杂数据集与多元统计分析相结合,非常有助于乳制品的滋味和气

味指标的数字化评价,从而快速高效的分类、识别和鉴定样品^[22]。O'Riordan 等^[23]研究发现基于电子鼻技术可以区分不同发酵剂在同一标准化方法下制造的干酪。白雪等^[24]采用电子鼻检测后进行主成分分析可以很好的区分奶贝和酸奶中挥发性风味物质,且与 GC-MS 分析后得到的结果一致。刘永吉等^[25]研究表明电子舌结合 PCA 分析以及判别因子分析(DFA)在区分岗稔酸乳品质方面效果良好,表明电子鼻与电子舌技术结合多元方差分析对于区分发酵乳制品品质具有较高的准确性。因此,本研究以 191 株产酸和蛋白水解特性存在差异的乳酸乳球菌所制备的发酵乳为研究对象,通过电子鼻和电子舌技术,结合多元统计分析,探究不同发酵特性的乳酸乳球菌对发酵乳滋气味品质的影响。

本研究结果表明,中等和快速产酸菌株制备的发酵乳中芳香成分的响应值显著高于慢速产酸菌株所制备的发酵乳,而在甲烷、乙醇、有机硫化物等气味指标上显著低于慢速产酸组($P<0.01$)。中等以及快速产酸菌株产生的较强烈芳香类物质,可能是由于菌株快速代谢的糖类而产生的酸类、酮类以及蛋白质水解产生的一些胺类。丁海兵^[26]研究表明,乳酸乳球菌在合成双乙酰时涉及到的酶类受 pH 值的影响,当 pH 值在 5 左右时,乙酰乳酸脱羧酶的活性低于乙酰乳酸合成酶的活性时,发酵乳中的丁二酮才能得到有效积累。García-Cayueta 等^[27]研究表明,乳酸乳球菌产生的芳香物质还涉及氨基酸的分解代谢,而 pH 值变化会对对相关酶的表达产生差异。倪春梅^[28]在干酪成熟的研究中表明,发酵剂菌株代谢产生的乳酸使乳发生酸化,能够提高蛋白酶类活性,使得蛋白质进一步降解为小分子多肽。因此,快速产酸菌株能够使原料乳的 pH 值快速降低,从而提高了某些酶类的活性进而产生了较高的芳香成分。电子舌结果表明,快速和中等产酸组的发酵乳酸味强于慢速产酸组,而鲜味较弱($P<0.01$)。这可能是由于产酸能力强的菌株快速分解乳糖产生乳酸,赋予了发酵乳明显的酸味;鲜味的主要来源为蛋白质分解所产生的一些氨基酸和简单的肽类^[29]。慢速产酸菌株随着发酵时间的逐渐延长,底物消耗殆尽,菌株生长进入衰亡期。有研究表明,菌体死亡后释放的蛋白分解酶会逐渐分解蛋白质,产生一些碱性物质,如游离氨基酸和小肽等,从而导致一些呈鲜味氨基酸发挥作用^[30]。

依据蛋白水解程度将菌株进行分组,并对其制备的发酵乳做滋气味的差异性分析,结果表明,高蛋白水解菌株所制备的发酵乳芳香成分响应值较低,而甲烷、乙醇、有机硫化物的响应值较高。值得注意的是,这一结果与产酸速率分组后得到的结果正好相反,进一步的 Spearman 相关性分析结果表明,菌株的产酸速率与蛋白水解程度呈明显的负相关,与上述结果吻合。郇金龙等^[31]认为不同微生物所能产生的酶系不同,导致对碳源的利用能力产生差异,从而影响菌株的产酸能力。关于菌株不同的蛋白水解能力,Neviani 等^[32]研究表明,不同的嗜热链球菌显示了不同的氨基酸需求,一些氨基酸为基本需求,一些则为一般要求,而另一些则不需要。因此,菌株的蛋白水解能力与产酸能力的差异主要取决于菌株的自身特性。此外,Liu 等^[33]表明与乳酸乳球菌蛋白水解相关的蛋白酶、肽酶以及肽转运蛋白通常与菌株中特定质粒的存在相关,从而导致乳酸乳球菌蛋白水解能力存在差异。结合本研究结论初步认为,产酸速率慢的菌株对于碳水化合物的利用能力差,然而其对氨基酸的要求较高,或具有较高的蛋白酶类活性来供给菌株生长,在这个过程中产生了不同于快速产酸菌的风味物质从而影响了发酵乳的滋气味。

本研究采用电子鼻和电子舌技术,研究了 191 株具有不同发酵特性的乳酸乳球菌所制备的发酵乳,在气味和滋味方面的差异和联系。结果表明,产酸较快而蛋白水解程度较低的菌株,能够使得发酵乳具有更多的芳香成分以及更强烈的酸味;产酸慢而具有较高蛋白水解能力的菌株,则使得发酵乳有更多的甲烷、乙醇、有机硫化物成分以及较强的鲜味。相关性分析验证后发现乳酸乳球菌的产酸能力与蛋白水解程度呈显著负相关($P<0.01$)。综上所述,本研究从发酵乳滋气味的角度出发,探究了不同发酵特性的乳酸乳球菌对发酵乳滋气味所做的贡献,为今后研究具体的差异风味物质奠定了基础,也为探究乳酸乳球菌发酵特性的差异与联系提供了新思路。

参考文献

- [1] 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.
- [2] LIU W, YU J, SUN Z, et al. Relationships between functional genes in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* isolates and phenotypic characteristics associated with fermentation time and flavor production in yogurt elucidated using multilocus sequence typing[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(1): 89-103.

- [3] ÇELİK E S. Determination of aroma compounds and exopolysaccharides formation by lactic acid bacteria isolated from traditional yogurts[D]. Izmir: Izmir Institute of Technology, 2007.
- [4] MARILLEY L, CASEY M G. Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(2): 139-159.
- [5] 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, 2014.
- [6] SONG A L, IN L L A, LIM S H E, et al. A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 55.
- [7] BOLOTIN A, WINCKER P, MAUGER S, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403[J]. Genome Res, 2001, 11(5): 731-753.
- [8] YANG X, WANG Y, HUO G. Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KLD54.0325[J]. Genome Announcements, 2013, 1(6): e00962-13-e00962-13.
- [9] ÖZKALP B, ÖZDEN B, TUNCER Y, et al. Technological characterization of wild-type *Lactococcus lactis* strains isolated from raw milk and traditional starter milk products in Turkey[J]. Le Lait, 2007, 87(6): 521-534.
- [10] ALONSO-CALLEJA C, CARBALLO J, CAPITA R, et al. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis*, strains isolated from goat's milk and Valdeleja cheese[J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 34(2): 134-138.
- [11] GUTIÉRREZ-MÉNDEZ N, VALLEJO-CORDOBA B, GONZÁLEZ-CÓRDOVA A F, et al. Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis*, with an electronic nose and sensory analysis[J]. Journal of Dairy Science, 2008, 91(1): 49-57.
- [12] SHAH N P. Functional cultures and health benefits[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(11): 1262-1277.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品酸度的测定: GB 5009. 239-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3-8.
- [14] 宋宇琴. 德氏乳杆菌保加利亚亚种的群体遗传学和功能基因组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [15] CHURCH F C, SWAISGOOD H E, PORTER D H, et al. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins I[J]. Journal of Dairy Science, 1983, 66(6): 1219-1227.
- [16] 卢嘉, 林菲, 卢晓明, 等. 全蛋液脱腥工艺及其效果评价[J]. 中国食品学报, 2017, 17(3): 171-176.
- [17] 杨成聪, 舒娜, 张亦舒, 等. 基于电子鼻和 GC-MS 技术对市售酱油风味品质的评价[J]. 中国调味品, 2018, 43(10): 151-155.
- [18] YOSHIKAZU K, MASAOKI H, HIDEKAZU I, et al. Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores[J]. Sensors, 2010, 10(4): 3411-3443.
- [19] 王玉荣, 张俊英, 胡欣洁, 等. 湖北孝感和四川成都地区来源的酒曲对米酒滋味品质影响的评价[J]. 食品科学, 2015, 36(16): 207-210.
- [20] 任敏. 具有优良发酵特性乳酸乳球菌乳酸亚种的筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [21] 曾凤泽. 具有优良发酵特性的德氏乳杆菌保加利亚亚种的筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- [22] KALIT M T, MARKOVIC' K, KALIT S, et al. Application of electronic nose and electronic tongue in the dairy industry[J]. Mljekarstvo, 2014, 64(4): 228-244.
- [23] O'RIORDAN P J, DELAHUNTY C M. Characterisation of commercial Cheddar cheese flavour. 1: Traditional and electronic nose approach to quality assessment and market classification[J]. International Dairy Journal, 2003, 13(5): 355-370.
- [24] 白雪, 杨爽, 孟鑫. GC-MS 结合电子鼻检测微生物脂肪酶对乳品风味的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(14): 209-212, 218.
- [25] 刘永吉, 刘国凌, 郭红辉, 等. 嗜热链球菌、乳酸菌和双歧杆菌对岗稔酸乳发酵品质的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(9): 35-40.
- [26] 丁海兵. 高产丁二酮乳酸乳球菌的筛选发酵条件优化及关联酶研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2012.
- [27] GARCÍA-CAYUELA T, GÓMEZ DE CADIANOS L P, PELÁEZ C, et al. Expression in *Lactococcus lactis* of functional genes related to amino acid catabolism and cheese aroma formation is influenced by branched chain amino acids[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(3): 207-213.
- [28] 倪春梅. 乳酸菌分离筛选及其对新型半硬质干酪品质特性影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- [29] 何香婷, 梁雅洁, 牟光庆, 等. 电子鼻技术建立酵母菌发酵乳风味指纹图谱的研究[J]. 食品科技, 2014, 39(7): 293-299.
- [30] MASTRIGT O V, TEJEDA D G, KRISTENSEN M N, et al. Aroma formation during cheese ripening is best resembled by *Lactococcus lactis* retentostat cultures[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 104.
- [31] 酈金龙, 师雨梦, 滕超, 等. 老面中乳酸菌产酸性能优化及对馒头品质的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 106-114.
- [32] NEVIANI E, GIRAFFA G, BRIZZI A, et al. Amino acid requirements and peptidase activities of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*[J]. Journal of Applied Bacteriology, 2010, 79(3): 302-307.
- [33] LIU M, BAYJANOV J R, RENCKENS B, et al. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison[J]. Bmc Genomics, 2010, 11(1): 36.