

含发酵乳杆菌HY01牦牛酸奶工艺优化及主体风味成分动态解析

于素素, 杨佳杰, 马向阳, 贾新栋, 刘丽波, 杜 鹏*, 李艾黎*
(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 利用具有益生性能的发酵乳杆菌HY01生产牦牛酸奶, 首先通过单因素试验、响应面试验优化益生菌发酵条件, 观察贮藏期间产品的品质变化, 并且利用电子鼻解析不同后熟时间牦牛酸奶的香气成分变化。结果表明: 发酵乳杆菌HY01生产牦牛酸奶的优化工艺条件为接种量4%、40℃发酵6 h时感官评分89.72分, 益生菌数 8.90×10^8 CFU/mL。在28 d贮藏期内牦牛酸奶益生菌数高于 10^7 CFU/mL, 酸度低于118 °T。贮藏0~14 d时4项质构指标(黏性、硬度、稠度、黏聚性)、双乙酰和乙醛含量、感官评分基本保持不变, 14 d后下降。此外, 电子鼻传感器对香气响应值的主成分分析表明, 牦牛酸奶特征香气由氮氧化物、甲基类、硫化物和醇类组成, 与市售鲜牛乳制备酸奶的香气含量区别显著。可见, 含发酵乳杆菌HY01的牦牛酸奶不仅具有良好的性能及风味, 而且有望对肠道健康起到有益作用。

关键词: 发酵乳杆菌; 牦牛酸奶; 香气组分; 贮藏

Process Optimization for the Development of Fermented Yak Milk Containing *Lactobacillus fermentum* HY01 and Dynamic Analysis of Main Flavor Components

YU Susu, YANG Jiajie, MA Xiangyang, JIA Xindong, LIU Libo, DU Peng*, LI Aili*
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The probiotic strain *Lactobacillus fermentum* HY01 combined with the commercial starter culture MY105 of *Streptococcus thermophiles* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was used to produce fermented yak milk. The fermentation conditions were optimized through the combined use of one-factor-at-a-time method and response surface methodology, and the quality changes of the yogurt prepared under optimized conditions were observed during storage. The changes in aroma components at different post-ripening times were analyzed by electronic nose (EN). The results showed that the optimal process conditions were obtained as follows: HY01 inoculation amount 4%, fermentation temperature 40 °C, and time 6 h, and the viable count of probiotics in the prepared yogurt was 8.90×10^8 CFU/mL and it scored 89.72 points in sensory evaluation. During the storage period of 28 days, the number of probiotics was maintained higher than 10^7 CFU/mL and the acidity lower than 118 °T. Texture properties (viscosity, hardness, consistency and cohesiveness), the contents of diacetyl and acetaldehyde and sensory score remained basically unchanged from day 0 to 14 d during storage, but decreased then. In addition, principal component analysis performed on the EN data showed that the characteristic aroma of yak yogurt was composed of nitrogen oxides, methyl compounds, sulfides and alcohols, whose contents were significantly different from those of the yogurt. Therefore, yak yogurt containing *L. fermentum* HY01 not only has good performance and flavor, but also is expected to be beneficial for intestinal health.

Keywords: *Lactobacillus fermentum*; yak yogurt; flavor substances; storage

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191104-025

中图分类号: TS252.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2021)02-0105-09

收稿日期: 2019-11-04

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2018YFD0502404)

第一作者简介: 于素素(1994—)(ORCID: 0000-0001-9439-372X), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术。

E-mail: 1367916063@qq.com

*通信作者简介: 杜鹏(1978—)(ORCID: 0000-0003-0482-4480), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品工程。

E-mail: dupeng@neau.edu.cn

李艾黎(1978—)(ORCID: 0000-0002-2558-8475), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。

E-mail: ailimail@neau.edu.cn

引文格式:

于素素, 杨佳杰, 马向阳, 等. 含发酵乳杆菌HY01牦牛酸奶工艺优化及主体风味成分动态解析[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 105-113. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191104-025. <http://www.spkx.net.cn>

YU Susu, YANG Jiajie, MA Xiangyang, et al. Process optimization for the development of fermented yak milk containing *Lactobacillus fermentum* HY01 and dynamic analysis of main flavor components[J]. Food Science, 2021, 42(2): 105-113. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191104-025. <http://www.spkx.net.cn>

牦牛酸乳是我国西南地区(如青海、四川、甘肃、西藏等)的传统特色美食之一,其脂肪、蛋白质等营养成分的含量均高于普通市售酸奶^[1]。除了营养特性优良,近年来不断有新的研究证实牦牛酸乳还具有降低人体胆固醇、预防胃溃疡、抗动脉粥样硬化、提高骨密度、调节血糖、强化肌肉组织、增强免疫力、清除自由基等多种保健功能^[2-5],是纯天然的益生食品。但目前牦牛发酵乳制品多以家庭式手工作坊为主,工业化生产能力比较薄弱^[6],如何提高产品附加值,转变当前牧民主要销售初级畜产品的现状是亟待解决的问题。

以往研究多集中在优化传统生产工艺,如陈一萌等^[7]分析了不同稳定剂对凝固型牦牛酸奶在后酸化过程中品质及风味的影响;余闯闯等^[8]以藏灵菇作为发酵剂生产新型牦牛酸奶;李升升等^[9]结合标准化评估法研究了杀菌、接种量、发酵温度及后酸化过程对牦牛酸奶品质的影响;胡凯丽等^[10]比较了牦牛酸乳和市售酸乳发酵过程中酸度、质构和风味成分的变化规律。近年来,人们更加关注自然发酵牦牛酸乳中优势乳酸菌的多样性及其功能特性,如刘怡萱^[11]和孙思雨^[12]等运用高通量测序技术分析了西藏农牧区和川西地区牦牛酸乳中的细菌多样性,并探究环境因素对其差异形成的影响。张丽^[13]从青藏高原牦牛酸乳中筛选出具有免疫调节功能的*Lactobacillus casei* G12和*L. acidophilus* E2; Zhao Xin等^[14]从传统牦牛酸乳中筛选出具有缓解便秘作用的*L. plantarum* YS2, Ding Wurong^[15]和Yu Qian^[16]等从传统牦牛酸乳中筛选出具有降低胆固醇作用的*L. plantarum* Lp3和*L. casei* YBJ02。陈明等^[17]从青藏高原牦牛酸乳中筛选出的*L. plantarum* XM5可有效缓解D-半乳糖对大鼠脑组织的氧化损伤。因此,后续需进一步加强益生菌的生产特性研究,促进牦牛乳资源的合理利用。本课题组前期从四川省红原县牧民自制牦牛酸乳中筛选出发酵乳杆菌HY01,其对结肠炎和便秘具有良好的预防效果^[18-19]。以具有自主知识产权的益生菌为研究对象,首先利用单因素试验、响应面试验优化发酵含益生菌牦牛酸乳的工艺条件,进而利用电子鼻监控后熟过程中的挥发性风味物质变化,并观察含益生菌牦牛酸乳在贮藏期间的品质变化。以上研究对于开发可应用于发酵牦牛乳且具有益生特性的乳酸菌,以及改善牦牛酸乳的品质具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛鲜奶由甘南牧场提供;鲜牛乳由完达山牧场提供;普通酸奶由本实验室采用发酵剂MY105和发酵乳杆菌HY01对鲜牛乳进行发酵获得;MRS培养基 北京索莱宝科技有限公司;发酵乳杆菌HY01由西南大学课题组提供;发酵剂MY105(含嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌) 丹尼斯克公司。

1.2 仪器与设备

SPL-150生化培养箱 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司;AlphaClean1300超净工作台 上海HealForce公司;YXQ-LS-70A立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司;电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;THZ-D台式恒温振荡器 苏州市培英实验设备有限公司;PB-10型pH计 北京杰诺康科技有限公司;HH-4型数显恒温水浴锅 国华电器有限公司;JJ0.3/25均质机 廊坊市汇通机械厂;PEN3便携式电子鼻(传感器阵列见表1) 德国Airsense公司;HC-3018R高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;Universal TA质构仪 上海腾拔仪器科技有限公司。

表1 电子鼻的传感器阵列

Table 1 Sensor arrays of electronic nose used in this study

传感器信号	传感器	敏感香气种类
1	W1C	苯类
2	W5S	氮氧化物
3	W3C	芳香胺类
4	W6S	氢化物
5	W5C	烷烃
6	W1S	甲基类
7	W1W	硫化物
8	W2S	醇类
9	W2W	硫化氢类
10	W3S	芳香烷烃

1.3 方法

1.3.1 菌种的活化与制备

将冷冻干燥保存的发酵乳杆菌HY01接种于MRS液体培养基中,37℃培养18 h后3 000 r/min离心10 min收集菌体,再将菌液稀释到10⁶ CFU/mL后接种于灭菌脱脂乳中37℃培养(10⁸ CFU/mL)至凝固,反复传代3次使菌种充分活化,即为工作发酵剂(10⁸ CFU/mL)使用。

1.3.2 牦牛酸奶制备工艺流程

牦牛乳（或鲜牛乳）→均质→杀菌→冷却→添加发酵剂MY105、发酵乳杆菌HY01→发酵→冷却→冷藏后熟→成品

1.3.3 酸奶制备工艺操作要点

均质：将牦牛乳（或鲜牛乳）用均质机在25 MPa的条件下均质1~2次；杀菌：均质后的物料立即加热至95℃，保温5 min；冷却：杀菌后的物料迅速冷却至44℃左右；接种：在无菌条件下，加入MY105（ 10^6 CFU/mL）复合既定比例的HY01；发酵：将接种好的物料混匀，于恒温培养箱中发酵至凝乳形成；冷藏后熟：发酵结束后将产品移入4℃冷藏16 h。

1.3.4 指标检测

酸度测定：参照GB 5009.239—2016《食品酸度的测定》^[20]采用滴定酸度法进行；双乙酰和乙醛测定：采用碘滴定法^[21]和邻苯二胺比色法^[22]进行；益生菌活菌数测定：采用平板计数法^[23]进行。

质构测定：用P/PE反挤压探头测定牦牛酸奶质构。测量条件^[24]如下：测前速率为1.0 mm/s，测试速率为1.0 mm/s，测后速率为2.0 mm/s，压缩距离20 mm，2次压缩间隔为5 s，进行3次重复实验，测定的质构指标为硬度、稠度、内聚性和黏度。

感官评定：以色泽、组织状态、滋味、气味为感官评价指标。邀请10名经过感官评价训练的人进行评价，满分为100分，感官评分标准^[25]见表2。

表2 牦牛酸奶感官评分标准
Table 2 Criteria for sensory evaluation of yak yogurt

项目	标准	分数
色泽 (15分)	色泽均匀，呈乳白色或微黄色	12~15
	色泽一致，呈白色或黄色	8~11
	色泽不均匀，呈黄白相间	4~7
	色泽差，有杂色	0~3
风味 (30分)	风味纯正、具有牦牛酸乳特有的风味	24~30
	风味均一，具有牦牛酸乳的风味	16~23
	具有牦牛酸乳的风味、稍有酒精发酵味	8~15
	有酒精发酵味、或其他不良气味	0~7
口感 (20分)	稠度适宜，酸甜适度	16~20
	稠度适宜，微酸或微甜	11~15
	偏稠或偏稀，酸甜适宜	6~10
	偏稠或偏稀，偏酸或偏甜	0~5
组织状态 (35分)	凝块均匀细腻，无乳清析出	27~35
	凝块均匀，无乳清析出	18~26
	凝块均匀，稍有乳清析出	9~17
	凝块不完整，乳清严重析出	0~8

1.3.5 牦牛酸奶发酵工艺单因素试验

在发酵剂MY105添加量固定的条件下（ 10^6 CFU/mL），依次改变发酵乳杆菌HY01接种量、发酵时间、发酵温度，以牦牛酸奶的滴定酸度、pH值、活菌数和感官评价为考察指标。

1.3.5.1 HY01接种量的影响

于40℃发酵6 h条件下，考察在牦牛乳中接种2%、3%、4%、5%、6%发酵乳杆菌HY01（*VIV*）对菌数、酸度及感官评分的影响。

1.3.5.2 发酵温度的影响

牦牛乳中接种3% HY01，在发酵6 h条件下，观测不同温度（34、36、38、40、42℃）对菌数、酸度及感官评分的影响。

1.3.5.3 发酵时间的影响

牦牛乳中接种3% HY01，在发酵温度为38℃，测定不同发酵时间（4、5、6、7、8 h）菌数、酸度及感官评分的变化。

1.3.6 牦牛酸奶发酵工艺的响应面优化

以单因素试验结果确定响应面试验3因素3水平参数见表3，根据感官评价以及活菌数指标进行响应面分析，2个指标各占权重50%^[26]。

表3 响应面试验因素与水平
Table 3 Level and code of independent variables used for response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A HY01接种量/%	3	4	5
B发酵时间/h	5	6	7
C发酵温度/℃	38	40	42

1.3.7 电子鼻测定不同后熟时间牦牛酸奶的香气组分

按照最优工艺发酵牦牛酸奶和普通酸奶，并按照不同时间（8、12、16、20、24 h）进行后熟。取20 mL样品，注入到30 mL的上样瓶中，瓶盖封住瓶口在室温下富集15 min后，采用顶空上样法对样品进行电子鼻检测^[27-28]。每组设置10个平行。

1.3.8 牦牛酸奶贮存期理化指标测定

测定于4℃条件下贮藏28 d的牦牛酸奶的酸度、pH值、益生菌活菌数、质构特征（硬度、稠度、黏聚性、黏性指数）、双乙酰和乙醛含量及感官评分，分析在整个贮藏期内上述指标的动态变化。每7 d测一次，每组设置3个平行。

1.4 数据分析

采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析与显著性差异分析，运用Origin 8.0软件作图，响应面结果用Design-Expert 8.0.5进行Box-Behnken分析。

2 结果与分析

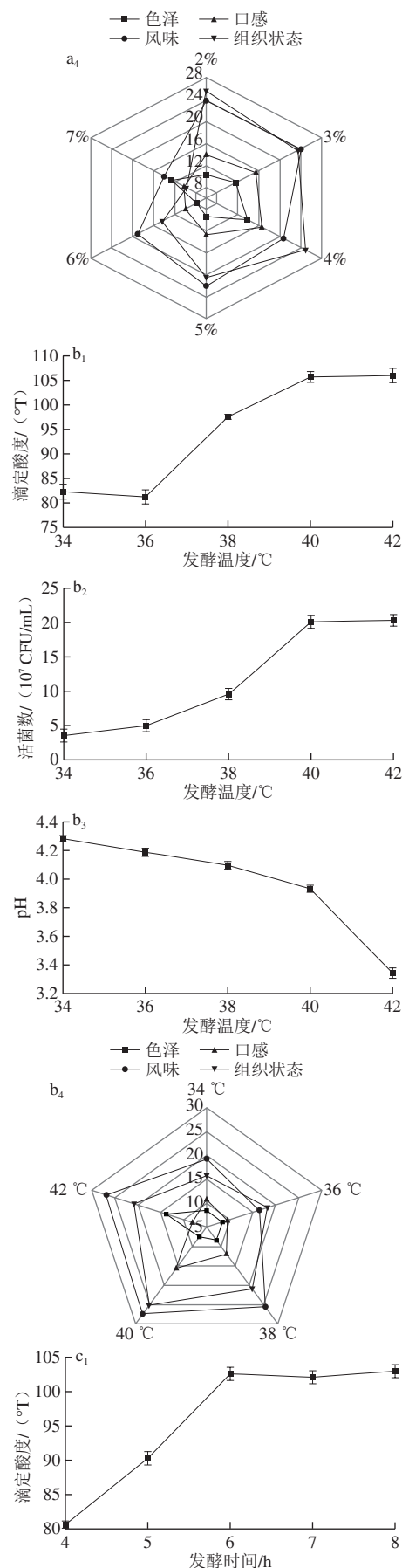
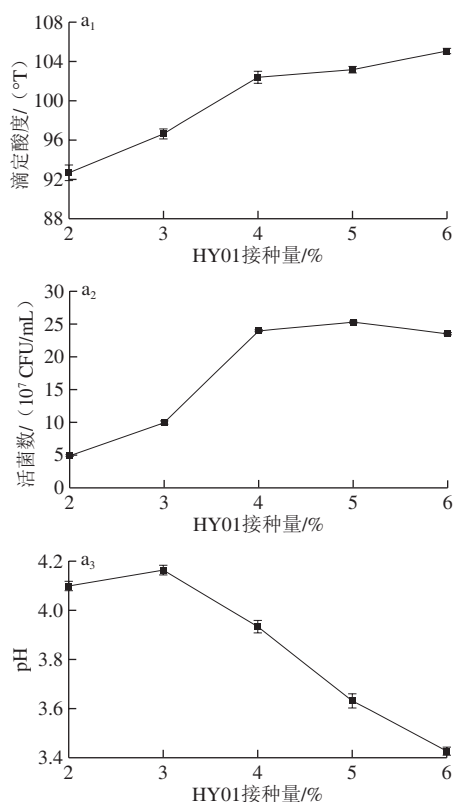
2.1 益生菌牦牛酸奶发酵条件的单因素结果

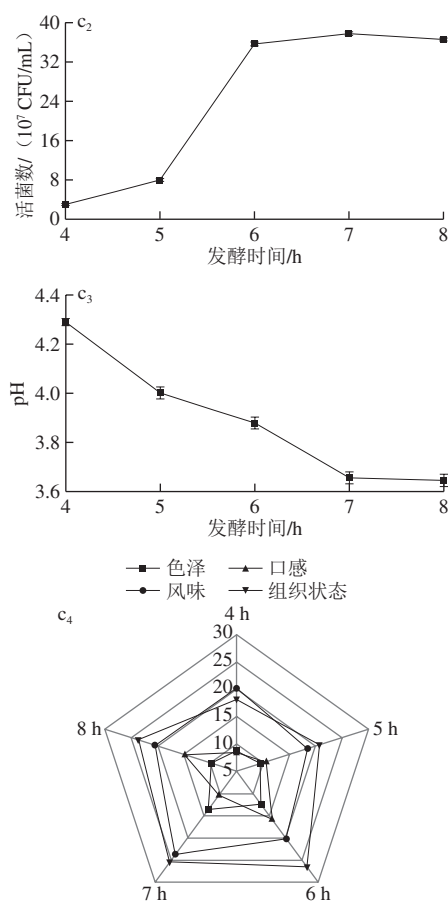
发酵条件对益生菌生长及酸奶品质有较大影响。由图1a可知，随着HY01接种量增加，牦牛酸奶酸度逐渐增大，感官评分先增大后减小，益生菌数逐渐增多。当HY01接种量大于4%时，牦牛酸奶乳清析出较多，有

尖酸味。当HY01接种量为4%时, 益生菌活菌数达到 2.4×10^8 CFU/mL, 滴定酸度102.40 °T, 牦牛酸奶外观光滑, 气味浓郁。同样, 秦楠等^[29]发现益生菌接种量对酸奶的酸度, 蛋白质质量分数以及抗氧化活性影响较大。曾丽萍等^[30]发现当接种量为3%~4%时, 成品酸奶中益生菌菌数可达到 10^8 CFU/mL, 既具有良好的益生性能, 产品感官评分也较高。

由图1b可知, 随着发酵温度升高, 牦牛酸奶酸度逐渐增大, 感官评分先增大后减小, 活菌数逐渐增多。 $34 \sim 38$ °C低温发酵使得乳酸菌的生长速率偏低, 益生菌菌数较少(约 10^7 CFU/mL), 牦牛酸奶发酵不完全, 产品口感滋味和组织状态较差。贾凌云^[31]和马昱阳^[32]等研究也证实低温不利于酸奶中的乳酸菌生长, 导致感官品质较低。而 $40 \sim 42$ °C发酵时活菌数可达到 2.08×10^8 CFU/mL, 滴定酸度105.70 °T, 且酸乳的凝乳状态、口感以及香气均较好。

由图1c可知, 随着发酵时间延长, 牦牛酸奶酸度逐渐增大, 感官评分先增大后减小, 活菌数逐渐增多。发酵时间过短, 发酵乳杆菌没有充分发挥作用而导致牦牛酸奶感官评分较低。发酵至第6小时, 牦牛酸奶感官评分较佳, 滴定酸度达到102.6 °T, 活菌数达 3.56×10^8 CFU/mL。若发酵时间过长则会影响产品品质及风味。同样, 冶成君等^[33]发现发酵时间长短对凝固型酸奶的生产有影响, 凝固型酸奶在第6小时活菌数达到 9.6×10^8 CFU/mL, 此时酸奶的品质风味最佳。





a. HY01接种量; b. 发酵温度; c. 发酵时间。1. 滴定酸度; 2. 活菌数; 3. pH值; 4. 口感滋味和组织状态。

图1 发酵条件对牦牛酸奶品质的影响

Fig. 1 Effect of fermentation conditions on the quality of yak yogurt

2.2 响应面试验结果和方差分析

以发酵乳杆菌HY01接种量(A)、发酵时间(B)和发酵温度(C)为自变因素,感官评分和活菌数为因变量,采用Design-Expert软件对牦牛酸奶的发酵工艺参数进行优化(表4)。对实验数据进行分析,得到二次多项回归方程为: $R_1=89.75+1.60A+0.74B+0.40C-0.83AB+0.29AC+0.70BC-2.87A^2-1.87B^2-2.21C^2$; $R_2=87.98+2.09A+5.85B-1.46C+0.35AB-3.74AC+5.84BC-5.61A^2-5.13B^2-10.99C^2$ 。

由表5、6可知,2个模型均达到极显著水平($P<0.0001$),且失拟项不显著($P>0.05$),说明两模型拟合程度均较好,适用于牦牛酸奶工艺参数优化。 A 、 B 及 AB 、 BC 的交互作用及 A^2 、 B^2 、 C^2 对牦牛酸奶感官评分的影响显著($P<0.05$), C 、 AC 则影响不显著。 A 、 B 、 C 及 AC 、 BC 的交互作用及 A^2 、 B^2 、 C^2 对益生菌活菌数有显著影响($P<0.05$), AB 则影响不显著。根据 F 值大小,各因素对牦牛酸奶感官评分影响顺序为接种量>时间>温度,对益生菌活菌数影响顺序为时间>接种量>温度。

表4 响应面试验设计与结果

Table 4 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A HY01 接种量	B 发酵 时间	C 发酵 温度	R_1 感官 评分	R_2 益生菌活菌数/ (10^6 CFU/mL)
1	0	-1	1	84.40	58.58
2	1	0	1	87.49	69.30
3	1	1	0	86.35	84.03
4	-1	0	-1	82.44	66.00
5	-1	1	0	85.29	81.52
6	1	-1	0	86.40	72.26
7	0	0	0	89.12	86.91
8	0	1	-1	85.56	73.46
9	0	0	0	90.12	89.29
10	0	-1	-1	85.60	72.81
11	0	0	0	89.77	88.75
12	-1	0	1	83.24	70.20
13	0	0	0	90.06	87.59
14	-1	-1	0	82.02	71.15
15	0	1	1	87.15	82.59
16	0	0	0	89.70	87.34
17	1	0	-1	85.52	80.04

表5 感官评分响应面拟合回归方程的方差分析结果

Table 5 Analysis of variance of quadratic polynomial model for sensory evaluation score

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值
回归模型	108.90	9	12.10	46.54	<0.0001**
A HY01接种量	20.38	1	20.38	78.41	<0.0001**
B 发酵时间	4.40	1	4.40	16.91	0.0045**
C 发酵温度	1.25	1	1.25	4.80	0.0646
AB	2.76	1	2.76	10.60	0.0139*
AC	0.34	1	0.34	1.32	0.2889
BC	1.95	1	1.95	7.49	0.0291*
A^2	34.73	1	34.73	133.59	<0.0001**
B^2	14.68	1	14.68	56.45	0.0001**
C^2	20.56	1	20.56	79.07	<0.0001**
残差	1.82	7	0.26		
失拟项	1.19	3	0.40	2.50	0.1984
纯误差	0.63	4	0.16		
合计	110.72	16			

注:**. $P<0.01$, 差异极显著;*. $P<0.05$, 差异显著。表6同。

表6 益生菌活菌数响应面拟合回归方程的方差分析结果

Table 6 Analysis of variance of quadratic polynomial model for viable probiotic count

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值
回归模型	1343.26	9	149.25	63.72	<0.0001**
A HY01接种量	35.11	1	35.11	14.99	0.0061**
B 发酵时间	273.78	1	273.78	116.88	<0.0001**
C 发酵温度	16.94	1	16.94	7.23	0.0311*
AB	0.49	1	0.49	0.21	0.6613
AC	55.80	1	55.80	23.82	0.0018*
BC	136.42	1	136.42	58.24	0.0001**
A^2	132.30	1	132.30	56.48	0.0001**
B^2	110.83	1	110.83	47.31	0.0002**
C^2	508.13	1	508.13	216.92	<0.0001**
残差	16.40	7	2.34		
失拟项	12.38	3	4.13	4.11	0.1028
纯误差	4.02	4	1.00		
合计	1359.66	16			

2.3 各因素间相互作用

图2所选范围内的极值既是响应面的最高点,同时也是等高线最小椭圆的中心点。由结果可知HY01接种量和发酵时间、发酵时间和发酵温度对感官评分以及活菌数交互作用较强,说明该因素对益生菌耗牛酸奶品质影响较大。

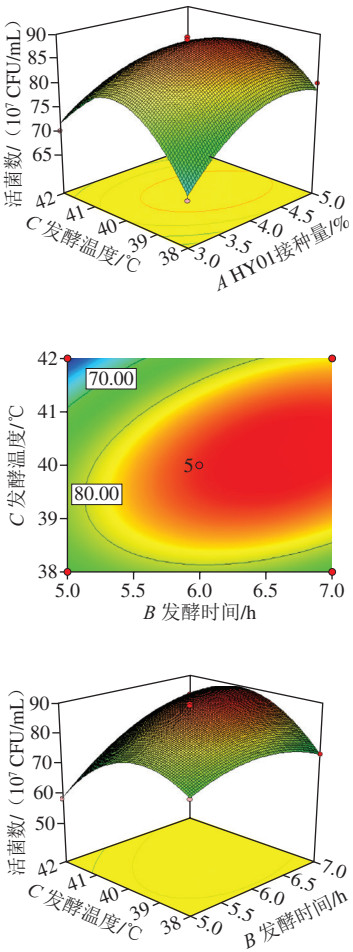
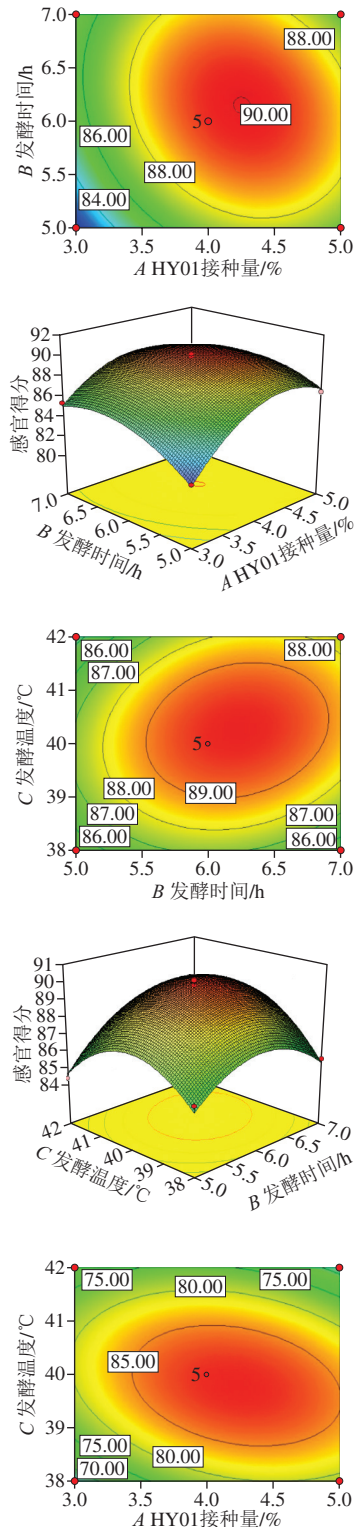


图2 不同因素交互作用对耗牛酸奶感官评分和活菌数的影响
Fig. 2 Response surface and contour plots showing interactive effects of variables on sensory score and viable probiotic number in yak yogurt

2.4 最优工艺条件的预测及验证

利用Design-Expert 8.0.5预测益生菌耗牛酸奶发酵最佳工艺条件为发酵温度40.16℃、发酵时间6.28 h、HY01接种量4.23%,预测感官评分为90.02,活菌数为 8.93×10^8 CFU/mL。为便于实验操作,对优化条件取整后得到发酵温度为40℃,发酵时间为6 h, HY01接种量为4%。进一步的验证实验表明,响应面法优化耗牛酸奶的工艺参数可靠(表7)。

表7 最优水平条件下的预测值及实验值
Table 7 Predicted and experimental values under optimal fermentation conditions

项目	A HY01 接种量/%	B发酵 时间/h	C发酵 温度/℃	感官评分	活菌数/ (CFU/mL)
模型	4.23	6.28	40.16	90.02	8.93×10^8
实验	4	6	40	89.72 ± 0.21	$8.90 \times 10^8 \pm 0.18$

2.5 含益生菌耗牛酸奶在贮藏期间品质变化

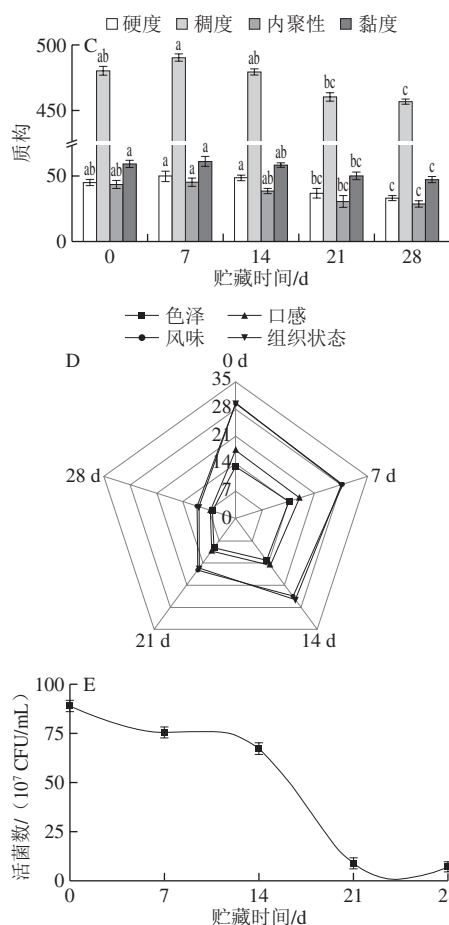
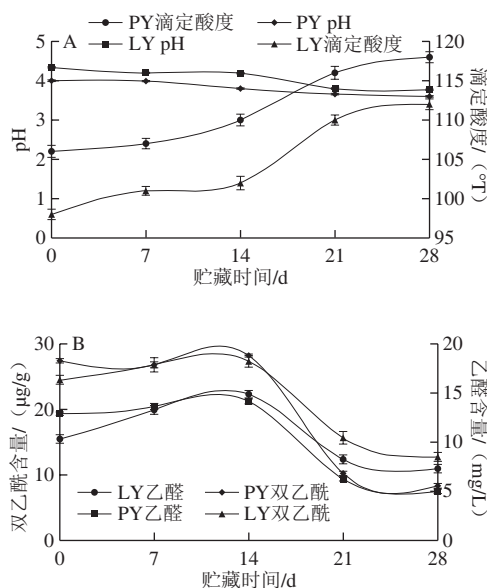
如图3所示,贮藏期间酸奶酸度的变化较大,1~7 d存贮期,益生菌耗牛酸奶的酸度变化较小,14 d后出现

较大幅度上升,这与李兴等^[34]观察低聚乳糖酸奶和市售酸奶贮藏期间酸度升高的结果一致。活菌数目与贮藏温度、酸度、营养物浓度等密切相关^[35]。牦牛酸奶中的益生菌数在前14 d维持 10^8 CFU/mL, 14 d后降低到 10^7 CFU/mL,但也达到益生菌数要求^[36]。这与贾凌云等^[31]观察普通酸奶在1~21 d贮存期中活菌数的变化结果相似。可能的原因是,有机酸的增加抑制了菌的增长。

在0~14 d内,牦牛酸奶的硬度、稠度、黏聚性几乎无变化、黏性增加,在14~28 d期间,牦牛酸奶的4项质构指标逐渐下降。Feng Cuijiao等^[37]发现山羊酸奶在贮藏14 d后,酸奶的4项质构指标下降。Zhou等^[38]表明,贮存期间酸奶黏性的增加可能与细菌分泌胞外多糖有关。刘宁宁等^[39]发现在28 d贮藏期酸奶硬度下降,这可能与酸奶稳定性减弱,酪蛋白凝胶聚集结构不稳定,乳清析出有关。

本研究发现含益生菌牦牛酸奶的乙醛和双乙酰含量远高于以往文献中市售酸奶香气成分的平均值(双乙酰约21 mg/L,乙醛约8.5 mg/L)^[40],且在第7天时达到峰值(双乙酰28.23 mg/L,乙醛18.23 mg/L)。同样,马永哲等^[40]发现绿豆皮酸奶的双乙酰和乙醛含量在贮藏第7天时达到最大值,之后含量逐渐下降。推测其可能原因为,嗜热链球菌产生的乙醇脱氢酶将乙醛还原成乙醇^[34]。而双乙酰含量下降,可能是其极不稳定,易在双乙酰还原酶的作用下被还原为乙偶姻^[42]。

此外,贮存1~14 d时牦牛酸奶感官评分无明显变化,14 d后风味、口感、色泽和组织状态都出现下降的趋势。同样,Alirezalu等^[41]发现伊朗传统酸奶在第28天贮藏期口感和组织状态评分下降,Şenel等^[42]发现酸奶的香气和风味评分在第15天时下降较大。Hanif^[43]和Tarakçi^[44]等发现牛奶酸奶和水牛奶酸奶贮藏期间的风味评分降低,这可能与蛋白质水解增加和酸度较高乳清析出有关。



PY:含发酵乳杆菌HY01牦牛酸奶; LY:不含发酵乳杆菌HY01牦牛酸奶。
A~E分别代表基本指标、双乙酰和乙醛、质构、感官品质、益生菌活菌数。

图3 贮藏期间牦牛酸奶品质的变化

Fig. 3 Quality changes of yak yogurt during storage

2.6 后熟期间牦牛酸奶香气成分变化解析

2.6.1 电子鼻传感器响应值的变化

电子鼻具有客观、准确、快捷、重复性好及不损伤样品的优点,现多用于乳制品中挥发性物质的分析^[45]。电子鼻传感器信号强度可以反映出乳制品中各种挥发性成分浓度的差异。本研究结果显示(图4),益生菌牦牛酸奶中挥发性成分主要为氮氧化物(W5S)、甲基类(W1S)、硫化物(W1W)和醇类(W2S)。与白丽娟等^[46]应用电子鼻检测羊酸奶中主要挥发性物质为氮氧化合物、硫化氢和有机芳香硫化物的结果一致。此外,陈娟等^[47]通过顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术发现川西高原牧区传统发酵牦牛酸奶的主体挥发性风味物质为丰富的醇类物质,包括乙醇、3-甲基-1-丁醇和2-甲基-1-丁醇。张晓梅等^[48]指出牦牛鲜乳中含有2-乙酰基噻唑、2-庚酮、3-辛酮、2-十一酮等甲基酮类物质。马瑞娟等^[49]指出牦牛乳中含量丰富甘油三酯更易被降解为游离脂肪酸,进而在发酵作用下转化为甲基酮、醇、酯、内酯和醛等风味物质。这些独特的风味化合物使得牦牛酸乳风味纯香浓厚。

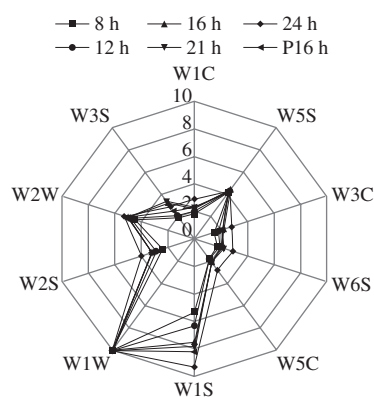


图4 牦牛酸奶香气物质雷达图

Fig. 4 Radar map of aroma substances of yak yogurt

2.6.2 牦牛酸奶香气主成分分析 (principal component analysis, PCA)

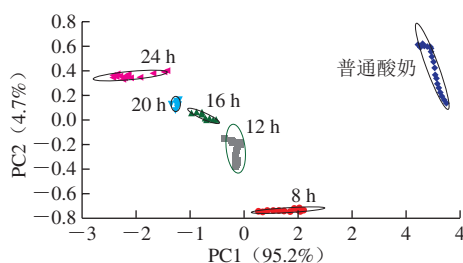


图5 不同后熟时间牦牛酸奶香气的PCA图

Fig. 5 PCA plot of main aroma components of yak yogurt at different post-ripening times

图5中每个椭圆代表牦牛酸奶后熟不同时间的数据采集点,几个样品分布在图中的不同位置,通过PCA得出,PC1的方差贡献率为95.2%,PC2的方差贡献率为4.7%,累计贡献率达到99.9%,大于90%,已经基本代表样品的主要信息特征。首先,从主成分PC1和PC2两个主轴上看,能明显区分后熟时间不同的牦牛酸奶,说明后熟时间对牦牛酸奶的香气影响较大。同样,陈一萌等^[7]发现随着后熟时间延长,酸奶中挥发性风味物由33种降至24种。黄强等^[50]发现后熟时间不同,酸奶中双乙酰等挥发性风味物质的含量也不同。本研究还发现,后熟时间相同的牦牛酸奶与普通酸奶分属不同区域且界线清晰,说明牦牛酸奶与普通酸奶的香气物质有明显差异。需利用线性判别分析 (linear discrimination analysis, LDA) 方法进一步确定。

2.6.3 牦牛酸奶香气成分的LDA

由图6可知,LD1和LD2贡献率分别为94.8%和4.6%,两判别式的累计贡献率为99.4%,可以很好地识别不同后熟时间的牦牛酸奶和普通酸奶。首先,后熟时间不同的牦牛酸奶,LD1变化不大,LD2变化较大,说明牦牛酸奶风味的前体物质(乳糖、蛋白质、脂肪)随时间延长而逐渐减少,挥发性成分增加,而风味的变化主要是由于新的挥发性成分间的相互作用引起的^[51]。此外,

后熟时间相同的牦牛酸奶与普通酸奶相比较,LD1相差较大,表明香气的产生与原料乳有关^[52]。胡凯丽等^[10]也发现牦牛酸奶中的双乙酰含量高于普通酸奶,贾凌云等^[31]发现无乳糖酸奶中2,3-丁二酮、3-羟基-2-丁酮的含量与普通酸奶中的含量存在显著性差异。

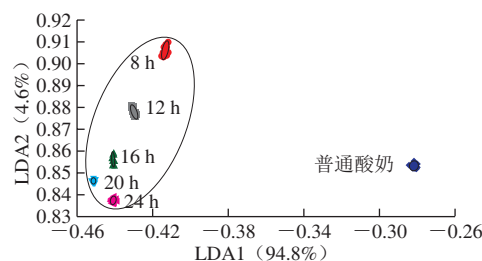


图6 不同后熟时间牦牛酸奶香气的LDA图

Fig. 6 Linear discrimination analysis of the aroma of yak yogurt at different post-ripening times

3 结论

通过响应面分析法得到牦牛酸奶最佳发酵工艺条件为HY01接种量4%、发酵时间6 h、发酵温度40℃。PCA和LDA法能够较好地识别不同后熟时间的牦牛酸奶以及区分牦牛酸奶与普通酸奶香气成分的不同。后熟时间是影响牦牛酸奶风味的重要因素,牦牛酸奶的香气物质主要来自牦牛奶本身、发酵剂以及发酵乳杆菌的代谢物,在香气成分相互作用下形成不同于普通酸奶的独特风味。贮藏期间的益生菌牦牛酸奶表现出较好的品质特性。

参考文献:

- [1] 周小玲,郝力壮.青藏高原牦牛乳产业的发展基础和前景[J].中国奶业,2012(20): 41-44. DOI:10.3969/j.issn.1004-4264.2012.20.012.
- [2] 焦月华,张兰威,易华西,等.酸耗牛乳中乳酸菌降胆固醇作用及胆盐耐受性研究[J].东北农业大学学报,2012,43(2): 6-12. DOI:10.3969/j.issn.1005-9369.2012.02.002.
- [3] 赵欣,蹇宇.牦牛酸乳分离发酵乳杆菌发酵豆浆的胃溃疡预防效果研究[J].食品科学,2014,35(17): 236-240. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201417045.
- [4] 吴春生,舒畅,李健,等.牦牛酸乳中乳酸菌的研究进展及前景展望[J].食品工业,2012,33(9): 129-133.
- [5] 李银聪.自然发酵酸耗牛乳的微生物区系及其抗氧化活性研究[D].重庆:西南大学,2011: 5-56.
- [6] 索化夷.青藏高原牦牛酸乳品质特征评价与益生菌筛选[D].北京:中国农业科学院,2016: 1-65.
- [7] 陈一萌,李思宁,唐善虎,等.不同稳定剂对凝固型牦牛酸奶在冷藏后熟过程中品质及风味的影响[J].食品工业科技,2018,39(4): 188-196.
- [8] 余闰闰,薛蓓.藏灵菇发酵酸奶的制备及工艺条件优化[J].轻工科技,2016(12): 20-22.
- [9] 李升升,靳义超.基于标准化法评估的牦牛酸奶加工工艺[J].食品与生物技术学报,2018,37(3): 297-302.
- [10] 胡凯丽,唐俊妮,龙虎,等.牦牛、牛酸乳发酵过程中品质特性的变化规律[J].食品工业科技,2018,39(3): 17-21. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.004.

- [11] 刘怡萱, 许国琪, 曹鹏熙, 等. 基于16S rRNA高通量测序的西藏农牧区牦牛酸奶菌群多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 92-97. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190714-180.
- [12] 孙思雨, 陈炼红, 王琳琳. 应用IlluminaMiseq测序分析川西高原传统牦牛发酵酸奶中细菌多样性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 98-103. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2019.23.017.
- [13] 张丽. 传统发酵牦牛奶中益生乳杆菌筛选及其免疫调节功能研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011: 1-91.
- [14] ZHAO X, QIAN Y, LI G J, et al. *Lactobacillus plantarum* YS2 (yak yogurt *Lactobacillus*) exhibited an activity to attenuate activated carbon-induced constipation in male Kunming mice[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(1): 26-36. DOI:10.3168/jds.2018-15206.
- [15] DING W R, SHI C, CHEN M, et al. Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 324-332. DOI:10.1016/j.jff.2017.03.021.
- [16] YU Q, LI M Y, WANG W, et al. Effects of *Lactobacillus Casei* YBJ02 on lipid metabolism in hyperlipidemic mice[J]. Journal of Food Science, 2019, 28: 281-292. DOI:10.1111/1750-3841.14787.
- [17] 陈明, 柯文灿, 保安安, 等. 青藏高原牦牛酸奶中具高抗氧化能力乳酸菌的筛选[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 201-205. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.08.033.
- [18] 陈孝勇. 传统发酵牦牛乳中改善肠道功能乳酸菌的筛选与评价[D]. 重庆: 西南大学, 2017: 1-62.
- [19] CHEN X Y, ZHAO X, WANG H W, et al. Prevent effects of *Lactobacillus Fermentum* HY01 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. Nutrients, 2017, 9(6): 545. DOI:10.3390/nu9060545.
- [20] 卫生部. 食品酸度的测定: GB 5009.239—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3.
- [21] 邵亚东. 传统发酵乳制品中乳酸菌产双乙酰特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007: 1-36.
- [22] 康欢. 酸奶中风味物质与酶活及感官特性关系的初探[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 1-44.
- [23] 李勇超, 刘瑞雪, 李亚琦, 等. 添加魔芋低聚糖对益生菌增殖和酸奶品质的影响[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(5): 62-64.
- [24] 赫君菲. 建立凝固型酸奶质构参数对感官性质的预测模型[D]. 扬州: 扬州大学, 2013: 1-38.
- [25] 廖钰婷, 吴均, 龙谋, 等. 西藏牧区自然发酵牦牛酸奶的乳酸菌种筛选及工艺优化[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 140-144. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201511027.
- [26] 罗心欣, 成雨阳, 王周利. 益生菌发酵猕猴桃汁工艺优化及香气成分动态解析[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 168-175. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180704-056.
- [27] 张虹艳, 丁武. 电子鼻对不同温度下生鲜羊奶贮藏时间的判定[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 257-260. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201116055.
- [28] MORTAZAVIAN A M, REZAEI K, SOHRABVANDI S. Application of advanced instrumental methods for yogurt analysis[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 49(2): 153-163. DOI:10.1080/10408390701764807.
- [29] 秦楠, 金婕好, 张芹仙, 等. 益生菌复合发酵酸奶的工艺优化及其抗氧化性研究[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(1): 62-66.
- [30] 曾丽萍, 李启明, 朱雅丽, 等. 一种高活性益生菌饮用型酸奶的工艺优化[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(5): 60-64.
- [31] 贾凌云, 胡志和, 薛璐, 等. 无乳糖酸奶与普通酸奶差异性比较[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 79-90. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190515-167.
- [32] 马昱阳, 王文亮, 王月明, 等. 毛木耳多糖益生型酸奶工艺的优化及质构特性[J]. 食品工业, 2019, 40(7): 179-182.
- [33] 冶成君. 凝固型普通酸奶与牦牛乳酸奶的发酵特性[J]. 食品与发酵工业, 2014(12): 110-114. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201412021.
- [34] 李兴, 牟德华, 陈臣, 等. 低乳糖酸奶与普通酸奶的发酵特性研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(10): 57-59; 5.
- [35] DAVE R, SHAH N. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures[J]. International Dairy Journal, 1997, 7(1): 31-41. DOI:10.1016/S0958-6946(96)00046-5.
- [36] TAMIME A Y, SAARELA M, SØNDERGAARD A K, et al. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products[J]. Archives of Gynecology & Obstetrics, 2015, 292(3): 1-2. DOI:10.1002/9780470995785.ch3.
- [37] FENG C J, WANG B N, ZHAO A Q, et al. Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp[J]. Food Chemistry, 2019, 277: 238-245. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.10.104.
- [38] ZHOU T T, HUO R, KWOK L Y, et al. Effects of applying *Lactobacillus helveticus* H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(1): 223-235. DOI:10.3168/jds.2018-14602.
- [39] 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.
- [40] 马永哲, 罗磊, 曹伟民, 等. 绿豆皮酸奶功能特性和贮藏期间的变化[J]. 农产品加工, 2017(13): 11-14. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2017.07.003.
- [41] ALIREZALU K, INACIO R S, HESARI J, et al. Nutritional, chemical, syneresis, sensory properties, and shelf life of Iranian traditional yoghurts during storage[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 114: 108417. DOI:10.1016/j.lwt.2019.108417.
- [42] ŞENEL E, ATAMER M, GÜRSOY A, et al. Changes in some properties of strained (Süzme) goat's yoghurt during storage[J]. Small Ruminant Research, 2011, 99(2/3): 171-177. DOI:10.1016/j.smallrumres.2011.03.042.
- [43] HANIF M S, ZAHOOOR T, IQBAL Z, et al. Effect of storage on rheological and sensory characteristics of cow and buffalo milk yogurt[J]. Pakistan Journal of Food Sciences, 2012, 22(2): 61-70.
- [44] TARAKÇI Z, TEMİZ H, UĞUR A. The effect of adding herbs to labneh on physicochemical and organoleptic quality during storage[J]. International Journal of Dairy Technology, 2011, 64(1): 108-116. DOI:10.1111/j.1471-0307.2010.00636.x.
- [45] 兰会会, 胡志和. 电子鼻技术在乳品生产与质量控制中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 467-471. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201017103.
- [46] 白丽娟, 张猛, 金嫫. 基于电子鼻技术监测羊奶发酵前后不同阶段风味的变化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 294-297. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.053.
- [47] 陈娟, 李键, 唐俊妮, 等. 川西高原牧区传统发酵牦牛酸奶挥发性风味成分的分析[J]. 食品工业科技, 2016, 37(14): 59-62. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.14.003.
- [48] 张晓梅, 仝令君, 迟雪露, 等. 奶牛乳、水牛乳与牦牛乳的挥发性风味物质分析[J]. 食品研究与开发, 2017(18): 136-141.
- [49] 马瑞娟, 许英瑞, 薛元泰, 等. 牦牛乳风味物质及影响因素研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 363-368.
- [50] 黄强, 俞琳, 赵广生, 等. 发酵条件对凝固型酸奶质地影响的研究[J]. 浙江科技学院学报, 2013, 25(6): 441-446. DOI:10.3969/j.issn.1671-8798.2013.06.008.
- [51] 李琴, 朱科学, 周惠明. 利用电子鼻分析熬制时间对3种食用菌汤风味的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 151-155. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201016031.
- [52] 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.