不同菌种发酵酸奶过程中产生的苯系物的安全性分析

王俊平，郭楠，王硕

（天津科技大学食品工程与生物技术学院，天津 300457）

摘要：酸奶在发酵过程中会产生苯及苯的同系物，但是对于其产生规律和产生量一直缺乏研究。通过对比保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌单独发酵和双菌种混合发酵，对酸奶中苯系物的产生规律和含量进行了研究，结果发现嗜热链球菌单菌种发酵比保加利亚乳杆菌单菌种发酵时苯系物的产生含量较高，苯系物产生最大值为后熟大约 24 h 左右，苯系物中苯乙酮最高，分别可以达到 2.64±0.34 μg/L 和 1.95±0.22 μg/L。当使用两种菌种混合发酵时，苯及苯系物的产量高于单菌种发酵，通过比较不同配比的两种菌种的发酵结果发现嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌=1:1 时，苯系物产生量较低，其中产生量最高的甲苯为 3.68±0.15 μg/L。参考饮用水的限量标准，不论是单菌种发酵还是混合发酵，酸奶中苯及苯系物的含量均低于饮用水的限量标准，因此酸奶中的苯及苯系物理论上不会对人体健康造成影响。

关键词：酸奶；保加利亚乳杆菌；嗜热链球菌；苯及苯系物

文章篇号：1673-9078(2017)4-278-282 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.042

Safety Assessment of Benzenes Produced during the Yogurt Fermentation Process by Different Yogurt Strains

WANG Jun-ping, GUO Nan, WANG Shuo

(Food Engineering and Biotechnology Faculty, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: During fermentation, benzene and benzene derivatives can be produced in yogurt, but there is a lack of studies on the pattern of production and the amount produced. In this study, single-strain fermentation and mixed-strain fermentation using *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* were compared, and the pattern of production of benzene compounds and their contents in yogurt were studied. The results showed that the amount of benzene compounds produced in the single-strain fermentation with *Streptococcus thermophilus* was higher than that produced in the single-strain fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*; the peak production of benzene compounds occurred after about 24 h of ripening, and acetophenone showed the highest content (*Streptococcus thermophilus*: 2.64±0.34 μg/L; *Lactobacillus bulgaricus:* 1.95±0.22 μg/L) among all the benzene compounds. When mixed-strain fermentation was performed with both strains, the contents of benzene and benzene derivatives in yogurt were higher than those of the single-strain fermentations. The results of mixed-strain fermentations with different ratios of the two strains were compared. The relatively lowcontents of benzene and benzene derivatives in yogurt were presented with a 1:1 ratio of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, and the content of methylbenzene was the highest amongst produced benzene compounds at 3.68±0.15 μg/L. According to the requirements for drinking water, the contents of benzene and benzene derivatives in yogurt for both single-strain and mixed-strain fermentation were lower than the maximum levels allowed for drinking water; hence, the benzene and benzene derivatives in yogurt, in theory, will not have an impact on human health.

Key words: yogurt; *Lactobacillus bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus;* benzene and benzene derivatives

乳制品的安全一直受到广大消费者和我国政府的高度关注。目前国内对乳制品安全问题的关注点主要集中于非法添加、兽药残留、生物毒素残留、重金属残留及食源性致病微生物污染等问题，对于乳品生产过程中可能产生的一些内源危害物缺乏研究，一些内源危害物在乳制品中出现后难以进行合理的技术解释，引发消费者不必要的恐慌，如曾经发生的酸奶中苯甲酸问题，因此深入研究乳制品加工过程中一些内源有害物的产生机理和控制模式对于保障乳品产业的健康发展具有重要意义。酸奶的发酵是一个非常复杂的生物反应过程，发酵后产生的物质种类繁多，在前

收稿日期：2015-12-19

基金项目：国家“863”计划项目（2012AA101604）

作者简介：王俊平（1969-），男，博士，教授，从事食品安全研究

期研究发现酸奶发酵过程中的产物中含有苯及其同系物。国内外除对水中的苯系物研究的较多外，对其他食品中的研究较少。世界卫生组织和中国饮用水标准都要求水中苯的含量在 0.01 μg/mL 以下，因此各国对水体中苯系物的研究及控制都比较关注与重视，但对其他食品中的苯系物都没有足够的重视与研究。英国食品标准局(FSA)在对英国和法国流通中的 230 种不含酒精的软饮料检测后发现，一些饮料中居然含有超过饮用水的 8 倍的苯，苯的含量之高令人吃惊。一些食品科学家指出，饮料中之所以出现高含量的苯，原因在于来自饮料中的防腐剂苯甲酸钠和抗坏血酸即维生素 C 在一定的条件下反应生成了致癌物苯[1]，但对其产生原因机理以及产生水平都不清楚。本文主要针对酸奶中苯及苯系物的产生规律及含量水平进行了初步研究，为合理评估此类物质的安全风险、避免引发不必要的食品安全问题提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 苯系物标准品

苯、甲苯和邻二甲苯标准品浓度均为 200 μg/mL，对二甲苯、间二甲苯和苯乙酮标准品的浓度均为 5000 μg/mL，均购自 Sigma-Aldrich。

1.1.2 其他试剂

甲醇、氯苯和氯化钠均为色谱纯，购自天津市康科德科技有限公司。

1.1.3 实验仪器

气相色谱质谱联用仪（GC/MS），日本岛津公司，石英毛细管色谱柱（30 m×0.32 mm×20 μm）美国 Agilent 公司，RCT-basic 加热恒温磁力搅拌器，德国 IKA 公司，BL 610 称量天平，美国 Sartotius 公司，75 μm PDMS/DVB 萃取头和固相微萃取手柄，美国 SUPELCO 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 萃取条件

顶空固相微萃取条件为样品装液量 10 mL，NaCl 添加量 2.0 g，萃取时间 20 min，萃取温度 60 ℃。

1.2.2 气相色谱-质谱连用仪器参数

色谱柱：VF-5，载气：氦气，扫描方式：选择离子扫描，进样口温度：250 ℃，色谱柱升温程序：40 ℃保持 6 min，以 5 ℃/min 的速度升至 100 ℃，之后以 10 ℃/min 的速度升至 250 ℃保持 10 min，检测器温度：300 ℃

1.2.3 实验设计

1.2.3.1 实验菌种

嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌和双歧杆菌

1.2.3.2 菌种活化培养基

12%脱脂乳培养基。12 g 脱脂乳粉加入到 88 mL 超纯水中，搅拌溶解，放入烧杯中保鲜膜封口，开水中煮沸 30 min，冷却至室温，在超净工作台中分装 25 mL 到各个已灭菌的锥形瓶中。

1.2.3.3 菌种活化

分别将嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌、川秀酸奶发酵菌粉和佰生优酸奶发酵剂接种一定量于脱脂乳培养基中分别培养，于 37 ℃培养箱中过夜进行活化，反复活化三代。

1.2.3.4 单菌种发酵

将纯牛奶分装入 100 mL 到锥形瓶中，将嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌分别以 3%的接种量接种到纯牛奶中，摇晃锥形瓶使其菌种分布均匀。然后再分别分装 10 mL 于顶空瓶中，加盖，用注射器吸取顶空瓶上方空气，于 42 ℃培养 6~8 h 至凝乳，保存于 4 ℃冰箱中进行后熟。每个菌种重复 3 次。期间每隔一定时间取一个顶空瓶测定一次苯系物含量。在顶空瓶中加入 2 g 氯化钠、2 mL 超纯水以及 5 μg/L 的内标物氯苯，按上文优化好的萃取方法进行萃取定量。

1.2.3.5 双菌种发酵

将保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌以 1:2、2:1 和 1:1 的比例分别接种于 100 mL 纯牛奶中，摇晃锥形瓶使菌种分布均匀。然后再分别分装 10 mL 于顶空瓶中，加盖，用注射器吸取顶空瓶上方空气，于 42 ℃培养 4~5 h 至凝乳，保存于 4 ℃冰箱中进行后熟。每个比例重复 3 次。

1.2.4 取样与测定

在发酵开始两小时后开始取样，取样时间为发酵后 2 h、4 h、6 h、8 h、14 h、22 h、30 h、42 h、52 h 和 72 h。每次取样取一个顶空瓶测定一次苯系物含量，重复三次。测定方法为在顶空瓶中加入 2 g 氯化钠、2 mL 超纯水以及 5 μg/L 的内标物氯苯，按上文的萃取方法进行萃取方法和仪器条件进行测定。

1.2.5 数据统计分析

每一个实验处理的 3 个平行样分别进行测定，3 个平行样的测定值取平均值为每个样品中待测物的含量，并计算 SD 值。

$$\mathrm{SD}\sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2}$$

2 结果与讨论

2.1 嗜热链球菌单菌种发酵酸奶中苯系物产生规律

嗜热链球菌单菌种发酵酸奶中苯及笨的同系物测定结果如表 1 所示。

由表 1 可知，在发酵前期，各待测苯系物还没有产生。随着发酵的进行，甲苯先出现，随后二甲苯和苯乙酮也慢慢产生。几种待测物质都是在发酵后 30 h 即后熟大约 24 h 时产生最大值。随后逐渐减少。其中，三种二甲苯的含量变化并不太明显，对（间）二甲苯的含量一直在 0.09 μg/L 左右徘徊，邻二甲苯的含量变化也不大，最小为 0.12±0.09 μg/L，最大为 0.17±0.11 μg/L，而甲苯和苯乙酮含量变化较明显。甲苯含量最小值为 0.26±0.02 μg/L，最大值为 1.36±0.14 μg/L，苯乙酮含量最小值为 0.35±0.08 μg/L，最大值为 2.64±0.34 μg/L，苯没有检出。

表 1 嗜热链球菌发酵酸奶中苯系物含量变化

Table 1 Change of BTEX contents in yogurt fermented by *Streptococcus thermophilus*

时间/h	甲苯±SD/(μg/L)	对(间)二甲苯±SD/(μg/L)	邻二甲苯±SD/(μg/L)	苯乙酮±SD/(μg/L)
2	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
6	0.26±0.02	ND	ND	ND
8	0.38±0.04	ND	0.12±0.09	0.35±0.08
14	0.4±0.02	ND	0.14±0.10	0.89±0.19
22	0.57±0.12	0.09±0.02	0.15±0.12	1.95±0.29
30	1.36±0.14	0.1±0.04	0.17±0.11	2.64±0.34
42	0.65±0.04	0.09±0.05	0.14±0.13	1.76±0.02
52	0.43±0.06	0.08±0.04	0.14±0.04	1.42±1.22
72	0.45±0.07	0.08±0.04	0.13±0.05	1.39±0.78

总体来说，随着发酵及后熟的进行，甲苯和苯乙酮产生均是呈现先增加后减少的趋势。而三种二甲苯的含量变化不太明显。通常酸奶的发酵是一个比较短暂的过程，一般为 4~12 h，在这期间菌种将乳酸分解为乳糖和其他物质，进行各种物质的代谢，是酸奶能够形成的主要原因。但是酸奶的冷藏后熟同样必不可少，在后熟过程中，会形成各种风味物质，使酸奶具有更好的质地和更成熟的风味。同样在这个过程中，酸奶中的各种物质也在进行着变化。因此苯系物的产生最活跃的时候是在后熟的过程中，且是动态变化的。

2.2 保加利亚乳杆菌单菌种发酵酸奶中苯系物产生规律

保加利亚乳杆菌单菌种发酵酸奶中苯及笨的同系物测定结果如表 2 所示。

表 2 保加利亚乳杆菌发酵酸奶中苯系物含量变化

Table 2 Change of BTEX contents in yogurt fermented by *Lactobacillus bulgaricus*

时间/h	甲苯±SD/(μg/L)	对(间)二甲苯±SD/(μg/L)	邻二甲苯±SD/(μg/L)	苯乙酮±SD/(μg/L)
2	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND
8	0.19±0.09	ND	0.09±0.05	0.21±0.11
14	0.28±0.11	ND	0.1±0.03	0.36±0.13
22	0.34±0.04	ND	0.1±0.04	1.68±0.46
30	1.02±0.12	0.1±0.06	0.15±0.07	1.95±0.22
42	0.78±0.04	0.08±0.06	0.14±0.08	1.37±0.05
52	0.24±0.02	0.07±0.07	0.13±0.08	1.46±0.08
72	0.22±0.07	0.07±0.09	0.13±0.10	1.12±0.47

由上表可知，在发酵前期，各待测苯系物还没有产生。随着发酵的进行，各待测物质逐渐产生。几种待测物质都是在发酵后30 h即后熟大约24 h时产生最大值，随后逐渐减少。其中，三种二甲苯的含量变化并不太明显，对（间）二甲苯的含量一直在0.08 μg/L左右徘徊，邻二甲苯的含量变化也不大，最小为0.09±0.05 μg/L，最大为0.15±0.07 μg/L，而甲苯和苯乙酮含量变化较明显。甲苯含量最小值为 0.19±0.09 μg/L，最大值为1.02±0.12 μg/L，苯乙酮含量最小值为0.21±0.11 μg/L，最大值为1.95±0.22 μg/L，苯没有检出。

总体来说，随着发酵及后熟的进行，甲苯和苯乙酮产生均是呈现先增加后减少的趋势。而三种二甲苯的含量变化不太明显。

比较两菌种单菌种发酵发现，两菌种对二甲苯的产生含量几乎是相同的，并没有太大的区别。而对于甲苯和苯乙酮来说，嗜热链球菌发酵酸奶中产生的相对多一些，最大值分别相差 0.34±0.02 μg/L 和0.69±0.12 μg/L。两种酸奶产生含量最大值的时间大致相同。两菌种均没有检出苯。

2.3 嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌不同接种比例对苯系物含量的影响

嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌混合发酵苯及苯同系物的测定结果如表3、表4和表5所示。将酸奶发酵中产生的最大值做成柱形图来比较（图1）。

由下表和图1数据可知，两菌混合发酵酸奶中苯系物含量的最大值时间同单菌种发酵时产生的时间大致相同，都为后熟约24 h左右。且两菌混合发酵时苯系物的含量均比单菌种发酵时多。说明两者对苯系物的影响之间并无互相抑制作用。随着嗜热链球菌比例的降低，甲苯、二甲苯和苯乙酮的含量均随着降低。同上文得出的结论嗜热链球菌发酵比保加利亚乳杆菌发酵产生的苯系物稍多一些相一致。说明嗜热链球菌确实对苯系物的影响比较大。若单单从苯系物的含量的角度来考虑选择两菌比例，保加利亚乳杆菌:嗜热链球菌的比例为 1:2 时较为合适。但据研究显示，保加利亚乳杆菌对酸奶的后酸化影响很大，会降低酸奶的品质，而且两菌比例接近时，发酵中共生作用明显，发酵时间短，产酸快，各风味物质达到最佳，并且酸奶中产生的苯系物的量也是相对较少的，最大值分别为甲苯3.68±0.15 μg/L，对(间)二甲苯0.69±0.11 μg/L，邻二甲苯0.44±0.06 μg/L，苯乙酮2.93±0.06 μg/L，就含量来说也是处于较低水平，对人体并无危害。故综合考虑选择最佳比例为嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌=1:1。

表3 不同比例菌种对酸奶中苯系物含量的影响

Table 3 Effects of different ratios of two strains on BTEX contents (*St*:*Lb*=2:1)

时间/h	甲苯±SD/(μg/L)	对(间)二甲苯±SD/(μg/L)	邻二甲苯±SD/(μg/L)	苯乙酮±SD/(μg/L)
2	1.70±0.12	0.12±0.01	0.26±0.07	1.23±0.27
4	1.76±0.08	0.14±0.03	0.28±0.10	1.35±0.16
6	2.03±0.04	0.27±0.16	0.33±0.09	1.48±0.09
8	2.98±0.06	0.46±0.04	0.41±0.06	2.18±0.08
14	3.26±0.11	0.49±0.07	0.45±0.05	3.58±0.37
22	3.96±0.16	0.58±0.14	0.49±0.08	3.95±0.08
30	4.62±0.21	0.87±0.11	0.68±0.06	4.23±0.03
42	4.22±0.31	0.61±0.11	0.54±0.23	3.58±0.02
52	3.04±0.06	0.55±0.07	0.36±0.11	3.52±0.29
72	2.69±0.17	0.52±0.12	0.33±0.09	3.44±0.28

表4 不同比例菌种对酸奶中苯系物含量的影响

Table 4 Effects of different ratios of two strains on BTEX contents (*St*:*Lb*=1:1)

时间/h	甲苯±SD/(μg/L)	对(间)二甲苯±SD/(μg/L)	邻二甲苯±SD/(μg/L)	苯乙酮±SD/(μg/L)
2	ND	ND	ND	ND
4	1.22±0.04	0.18±0.07	0.17±0.11	ND
6	1.93±0.12	0.21±0.08	0.23±0.08	1.23±0.16
8	2.33±0.17	0.36±1.02	0.31±0.06	1.44±0.13

转下页

接上页

14	2.96±0.42	0.42±0.13	0.36±0.09	1.65±0.27
22	3.22±0.09	0.47±0.02	0.40±0.15	2.23±0.17
30	3.68±0.15	0.69±0.11	0.44±0.06	2.93±0.06
42	3.21±0.27	0.54±0.07	0.42±0.03	2.54±0.28
52	2.74±1.03	0.51±0.06	0.39±0.11	2.47±0.21
72	2.66±1.06	0.48±0.12	0.38±0.15	2.22±0.02

表 5 不同比例菌种对酸奶中苯系物含量的影响

Table 5 Effects of different ratios of two strains on BTEX contents (*St*:*Lb*=1:2)

时间/h	甲苯±SD/(μg/L)	对(间)二甲苯±SD/(μg/L)	邻二甲苯±SD/(μg/L)	苯乙酮±SD/(μg/L)
2	ND	ND	ND	ND
4	ND	0.16±0.06	ND	ND
6	ND	0.21±0.08	ND	ND
8	1.68±0.14	0.29±0.17	0.14±0.09	0.33±0.12
14	2.12±0.05	0.35±0.08	0.15±0.12	0.70±0.08
22	2.26±0.24	0.42±0.01	0.18±0.05	1.24±0.08
30	2.46±0.09	0.48±0.12	0.23±0.06	2.02±0.07
42	2.14±0.16	0.44±0.13	0.18±0.06	1.53±0.07
52	2.13±0.12	0.35±0.02	0.15±0.09	1.49±0.21
72	2.02±0.03	0.33±0.09	0.14±0.10	1.33±0.58

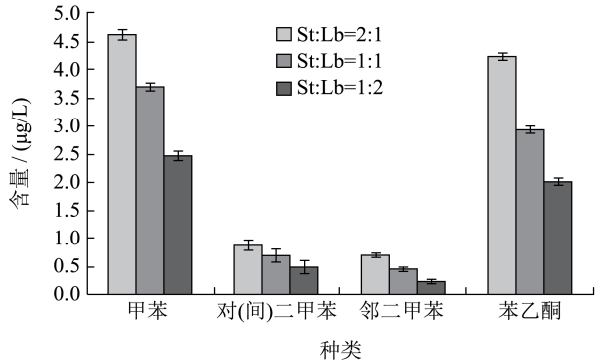


图 1 不同比例菌种发酵酸奶对苯系物含量的影响

Fig.1 Effects of different ratios of two strains on BTEX contents

3 结论

使用酸奶常用菌种保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌进行发酵，对酸奶中苯系物的产生规律和含量进行了研究，结果发现嗜热链球菌单菌种发酵比保加利亚乳杆菌单菌种发酵时苯系物的产生含量较高，苯系物产生最大值为后熟大约 24 h 左右。当使用两种菌种混合发酵时，苯及苯系物的产量高于单菌种发酵，通过比较不同配比的两种菌种的发酵结果发现嗜热链球菌:保加利亚乳杆菌=1:1 时，苯系物含量较低。目前我国没有酸奶及其他食品中苯及苯系物的限量标准，参考饮用水的限量标准，不论是单菌种发酵还是混合发酵，酸奶中苯及苯系物的含量均低于饮用水的限量标准，而且人的酸奶摄入量小于饮用水的摄入量，因此酸奶中的苯及苯系物理论上不会对人体健康造成影响。

参考文献

[1] 金世梅,朱慧.顶空气相色谱发测定软饮料中苯[J].中国食品添加剂,2008,1:289-291
JIN Shi-mei, ZHU Hui. Determination of benzene in soft drink by headspace gas chromatography [J]. China Food Additvies, 2008, 1: 289-291

[2] 卢声宇,蓝锦昌,杨方,等.气相色谱－质谱法检测饮料中苯残留[J].中国卫生检验杂质,2008,18(4):585-586
LU Sheng-yu, LAN Jin-chang, YANG Fang, et al. Determination of benzene residue in beverage by GC-MS [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(4): 585-586

[3] B L Wittkamp. Determination of BTEX compounds in water by solid-phase microextraction and saman spectroscopy [J]. Anal. Chem., 1995, 67(3): 600-605

[4] Chiarotti M, R Marsili, A Moreda-Piñeiro. Gas chromatographic mass mpectrometric analysis of residual solvent trapped into illictcocaine exhibits using head-space solid-phase microextraction [J]. Journal of Chromatography Analytical Technologies Biomedical and Life Science, 2002, 772(2): 249-256