

传统酸马奶优势菌群互作及与风味物质的关联性

孟岳成¹, 毕建喆¹, 孙哲航², 陈杰¹, 仝静雯¹, 李延华^{1,3*}

¹浙江工商大学食品与生物工程学院 杭州 310018

²养生堂天然药物研究所 杭州 310000

³浙江省微生物重点实验室 杭州 310018)

摘要 为研究酸马奶的优势菌群的互作以及菌群与特征风味的关系,对传统酸马奶中分离得到的 4 株乳酸菌和 2 株酵母菌进行单菌和混菌发酵,测定 14 组发酵组酸度、pH 值、乳酸菌、酵母菌菌量变化,采用 HS-SPME-GC-MS 技术分析不同发酵组的挥发性风味物质的差异,并利用 Lotka-Volterra 模型和偏最小二乘法回归(PLSR)分析酸马奶中乳酸菌和酵母菌的相互作用系数以及优势菌群与特征风味物质形成的关联性。乳酸菌中干酪乳杆菌产酸速率最快,在发酵后期 pH 值达到 3.89;酵母菌中,马克斯克鲁维酵母在发酵后期 pH 值降至 4.16,混菌发酵组的产酸优于单菌发酵组。乳酸菌和单孢酿酒酵母混菌发酵促进单孢酿酒酵母的生长,其中植物乳杆菌、副干酪乳杆菌分别与单孢酿酒酵母混合发酵 72 h 后,酵母菌菌落数达到 1.91×10^6 CFU/mL 和 1.66×10^6 CFU/mL;并能够促进辛酸、正癸酸等酸类风味物质的产生。而乳酸菌和马克斯克鲁维酵母混菌发酵形成竞争抑制,两者共发酵体系下对酯类物质辛酸乙酯、癸酸乙酯的产生有抑制作用,马克斯克鲁维酵母对产酸速率较快的干酪乳杆菌和副干酪乳杆菌的抑制作用强于瑞士乳杆菌和植物乳杆菌。

关键词 酸马奶;乳酸菌;酵母菌;风味物质;相互作用

文章编号 1009-7848(2024)09-0194-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.018

传统酸马奶也叫马奶酒、酸奶子或发酵马奶子,蒙语称为“策格”^[1],它的制作和饮用历史悠久,文化内涵丰富,是一种由乳酸菌、酵母菌等多种微生物共生发酵的酸性低酒精含量乳制品^[2-3],含有很多对人体有益的有效成分,在抗心血管疾病和治疗胃肠道疾病方面有很好的疗效^[4-6],并一直作为蒙医疗法的天然药物^[7],具有很高的营养及医疗保健价值^[2,8-9]。目前对传统酸马奶的微生物构成及优势菌群的解析已较为透彻,对风味物质的研究多集中于风味物质种类的鉴定和含量分析,然而,对其优势菌群间的相互作用以及微生物与风味物质形成的关系缺乏系统性研究^[10-11]。

从目前研究看,酸马奶的营养价值主要来自于其自身营养和微生物发酵所积累的有益代谢产物^[12-13]。传统酸马奶的风味主要取决于乳酸菌和酵母菌这两种不同类型微生物在混菌发酵体系下的相互作用^[14]。乳酸菌在发酵过程中扮演重要的角色,影响酸马奶的香气、质地和酸度,并且产生对

人体有益的健康因子^[15-17]。酵母菌将乳糖发酵成酒精,是形成传统酸马奶典型风味的重要因子^[18]。酸马奶中微生物的协同、拮抗作用等对其发酵最终风味的形成和新物质的生成有着深刻的影响^[13]。酸马奶的风味质地特性及安全性是消费者接受该产品时考虑的关键因素,因此阐明不同微生物产生的风味特征非常重要^[11,19-20]。开展传统酸马奶中优势菌群互作关系及与特征风味的相关性研究,对于提升传统酸马奶品质,缩短发酵周期,改善发酵风味具有重要意义,可为今后生产营养丰富、风味优良的酸马奶提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 新鲜马奶,内蒙古中蕴马产业发展有限公司;瑞士乳杆菌 (*Lactobacillus helveticus* NWAFU1450)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei* NWAFU1574)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* b-2)、副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei* EG9) 和单孢酿酒酵母 (*Kazachstania.unispora* isolate D1D2),均由本实验室从不同酸马奶中分离纯化所得;马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*

收稿日期: 2023-09-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31871830)

第一作者: 孟岳成,男,博士,教授

通信作者: 李延华 E-mail: liyanhua607@163.com

marxianus),北纳公司。

MRS 液体培养基、MRS 固体培养基、孟加拉红固体培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD),杭州微生物试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备 精密 pH 计,DELTA-320 Mettler (瑞士);气相色谱-质谱联用仪 7890A-5975C,美国安捷伦公司;SPME 萃取装置,美国 Sigma 公司;酶标仪 1200-6210,美国安捷伦公司;恒温恒湿培养箱 BSC-250,上海双旭电子有限公司;高速离心机 H1601R,湘仪离心机公司;摇床 SKY-200B,上海苏昆仪器仪表有限公司;洁净工作台 SW-CJ-2FD,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;数显恒温水浴锅 HH-4,国华电器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化 乳酸菌和酵母菌分别在 MRS 肉汤培养基与 YPD 液体培养基中传代 2 次,每次传代时间为 12 h,使菌株活力恢复。

1.2.2 样品的制备与收集 利用第三代菌株和酶标仪测定 OD 值和菌群密度的标准曲线,并计算 300 mL 发酵马奶体系中需要添加的菌液量,根据传统酸马奶菌群特性^[21],通过菌落数和 OD 值的线性关系控制乳酸菌初始菌密度为 10^7 CFU/mL,酵母菌初始菌密度为 10^6 CFU/mL。在 4 °C 条件下以 5 000 r/min 的转速离心菌悬液 15 min,离心所得菌泥在灭菌生理盐水中清洗 2 次后加入经巴氏杀菌的鲜马奶中。将不同的单菌和混菌发酵组编号,见表 1。

表 1 酸马奶发酵样品组别

Table 1 Sample group of Koumiss fermentation

酸马奶发酵编号	发酵菌种
L1	瑞士乳杆菌 (<i>Lactobacillus helveticus</i> NWAUFU1450)
L2	干酪乳杆菌 (<i>Lactobacillus casei</i> NWAUFU1574)
L3	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i> b-2)
L4	副干酪乳杆菌 (<i>Lactobacillus paracasei</i> EG9)
Y1	单孢酿酒酵母 (<i>Kazachstania unispora isolate</i> D1D2)
Y2	马克斯克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
M1	瑞士乳杆菌+单孢酿酒酵母 (<i>Lactobacillus helveticus</i> NWAUFU1450 + <i>Kazachstania unispora isolate</i> D1D2)
M2	瑞士乳杆菌+马克斯克鲁维酵母 (<i>Lactobacillus helveticus</i> NWAUFU1450 + <i>Kluyveromyces marxianus</i>)
M3	干酪乳杆菌+单孢酿酒酵母 (<i>Lactobacillus casei</i> NWAUFU1574 + <i>Kazachstania unispora isolate</i> D1D2)
M4	干酪乳杆菌+马克斯克鲁维酵母 (<i>Lactobacillus casei</i> NWAUFU1574 + <i>Kluyveromyces marxianus</i>)
M5	植物乳杆菌+单孢酿酒酵母 (<i>Lactobacillus plantarum</i> b-2 + <i>Kazachstania unispora isolate</i> D1D2)
M6	植物乳杆菌+马克斯克鲁维酵母 (<i>Lactobacillus plantarum</i> b-2 + <i>Kluyveromyces marxianus</i>)
M7	副干酪乳杆菌+单孢酿酒酵母 (<i>Lactobacillus paracasei</i> EG9 + <i>Kazachstania unispora isolate</i> D1D2)
M8	副干酪乳杆菌+马克斯克鲁维酵母 (<i>Lactobacillus paracasei</i> EG9 + <i>Kluyveromyces marxianus</i>)

结合传统酸马奶的酿造工艺(图 1a),在实验室进行酸马奶的小批量发酵试验(图 1b)。将 300 mL 新鲜马奶称重加入发酵锥形瓶中,经过巴氏杀菌(68 °C,30 min)后加入准备好的发酵剂。马奶与发酵剂充分混合后,用 8 层纱布密封发酵罐(保持空气流通,避免微生物感染),转移到 23 °C,40% RH 恒温恒湿培养箱发酵。随后,用磁力搅拌器(500 r/min)在白天每 2.5 h 搅拌一次发酵液,每天 5 次,连续一周(0~5 d 为发酵阶段,6~7 d 为冷藏成熟阶段),进行了 3 次独立发酵。用无菌离心管

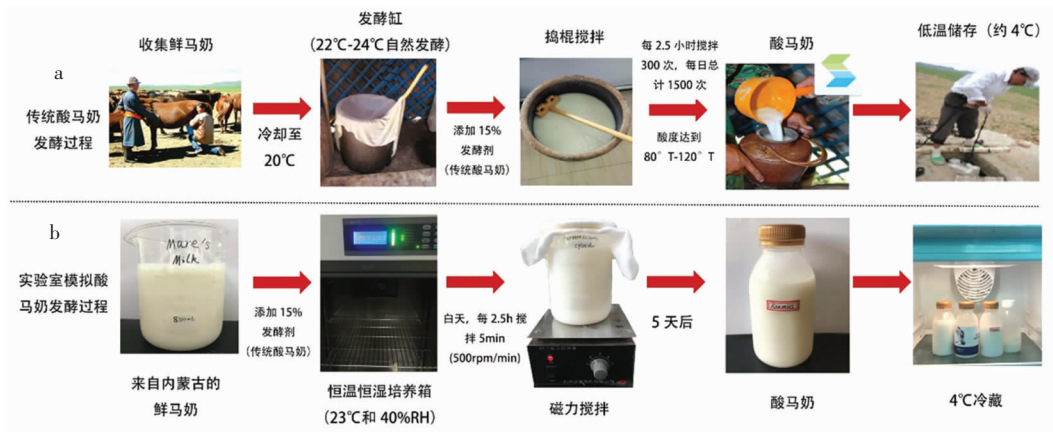
分别收集酸马奶发酵的第 0,24,48,72,96 h 及 120 h 的样品^[21-22]。

1.2.3 pH 值测定 采用精密 pH 计(DELTA 320)直接测定。

1.2.4 可滴定酸度测定 参照 GB 5009.239-2016《食品酸度的测定》中酚酞指示剂法测定^[23]。

1.2.5 乳酸菌的测定 按 GB/T 4789.35-2010《食品微生物学检验 乳酸菌检验》方法进行测定^[24]。

1.2.6 酵母菌的测定 按 GB 4789.15-2010《食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》方法进行测定^[25]。



注:a代表中国内蒙古传统牧民的发酵过程;b代表实验室中模拟的传统酸马奶发酵过程。

图1 酸马奶发酵过程的示意图

Fig.1 Schematic diagram of the fermentation process of Koumiss

1.2.7 Lotka-Volterra 模型预测菌群间相互关系

$$\frac{dL}{dt} = \mu_{\max} L \left(\frac{Q_1}{1+Q_1} \right) \left(1 - \frac{L-aP}{L_{\max}} \right) \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_{\max} P \left(\frac{Q_2}{1+Q_2} \right) \left(1 - \frac{P-bL}{P_{\max}} \right) \quad (2)$$

假定两种微生物都自然生长而不受自身的任何抑制。式中: L 和 P 分别为在时间 t 乳酸菌和酵母菌的CFU。 Q_1 和 Q_2 分别为两种微生物的生理状态。 $\mu_{\max}L$ 和 $\mu_{\max}P$ 分别为最大的物种增长率。 L_{\max} 和 P_{\max} 分别为发酵过程中的最大CFU。 a 和 b 的系数表示乳酸菌对酵母菌的种间竞争参数,反之亦然。

根据假设,将 $Q_i/(1+Q_i)$ 设置为1。方程的积分是从 t_{i-1} 到 t_i ,不能手动求解微分方程。因此,引入了最小二乘法以使用Matlab估算 a 和 b 的系数^[26]。

1.2.8 风味指标分析 通过顶空固相微萃取技术结合气相色谱与质谱联用(HS-SPME-GC-MS)技术测定14组发酵组单发酵与共发酵酸马奶样品^[27-28]。GC条件:色谱柱:DB-WAX,60 mm×0.25 mm×0.5 μm(柱长×内径×膜厚)。进样口温度:240℃;进样量1 μL;脉冲不分流;柱流速1 mL/min;载气(He)流速20 mL/min;柱温升温程序:35℃,保持3 min,以3℃/min升到220℃,保持10 min。MS测定:离子源:EI,离子源温度:230℃,四级杆温度:150℃,质量数扫描范围:33~500 amu,发射电流100 μA^[29]。挥发性物质的检测通过NIST 1.1谱库检索,选择匹配度Qual大于80%的鉴定结果,对风味物质进行积分,获得相应的峰面积,用面积

归一化法计算各组分的相对含量。

1.3 数据统计分析

理化指标所得数据采用Microsoft Excel 2016统计和计算,处理结果表示为“平均值±标准偏差”后用Origin制图。Lotka-Volterra模型拟合采用Matlab完成。通过热图和聚类分析对风味物质进行筛选提取,而后在Simca-14.1软件中进行偏最小二乘法回归(PLSR)模型探讨优势菌种与特征风味之间的相关性^[30]。

2 结果与分析

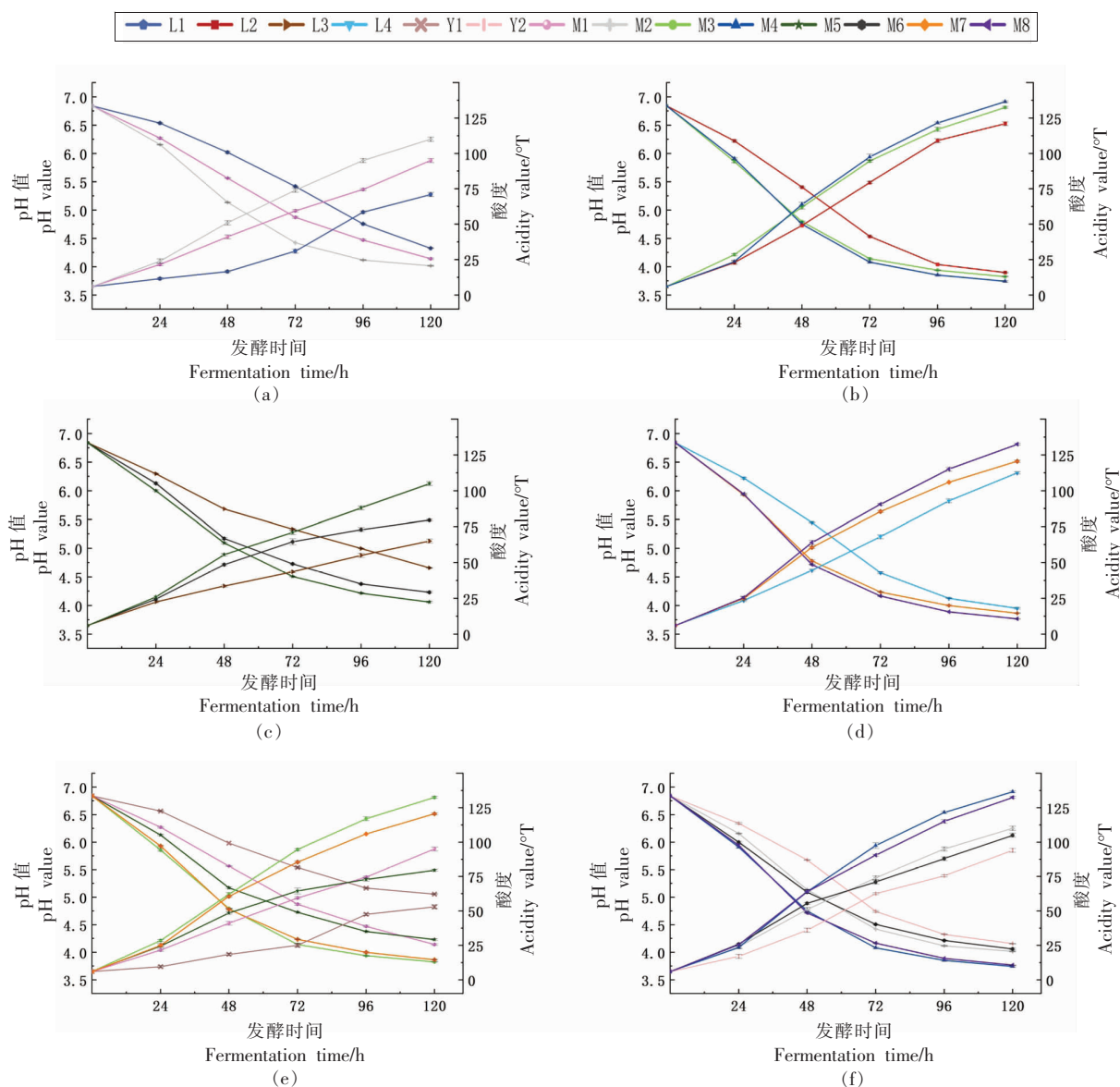
2.1 传统酸马奶优势菌种互作关系的研究

2.1.1 不同酸马奶发酵组pH值和酸度分析 图2表明随着酸马奶的发酵进行,所有发酵组的pH值逐渐下降,酸度则逐渐增加,其中乳酸菌的产酸速率均优于酵母菌。图2a、2b、2c、2d显示在4种乳杆菌中,干酪乳杆菌产酸速率最快,在发酵后期pH值达到3.89,其次为副干酪乳杆菌,瑞士乳杆菌和植物乳杆菌产酸速率相对较慢。乳酸菌与马克斯克鲁维酵母的混合发酵其产酸能力优于与单孢酿酒酵母的混合发酵。

由图2e、2f可知,两种酵母菌中,马克斯克鲁维酵母在发酵后期pH值降至4.16,而单孢酿酒酵母在发酵后期pH值降至5.06,其原因是马克斯克鲁维酵母含有乳糖酶,能利用乳糖作为自身生长代谢的营养物质^[31],而单孢酿酒酵母为非乳糖利用型酵母,在原马奶这一以乳糖为主要糖原

的体系中，马克斯克鲁维酵母具有更好的利用乳糖的能力，产生酸性代谢产物，从而降低酸马奶 pH 值。对比单菌发酵组与对应的混菌发酵组，可以发现，乳酸菌和酵母菌的共发酵组相对于单纯

的乳酸菌或酵母菌发酵 pH 值降低更快，酸度增加更快。因此，酵母菌和乳酸菌的共发酵对于酸马奶发酵产酸速率具有促进作用。



注：a、b、c、d、e、f 分别代表含有瑞士乳杆菌(a)、干酪乳杆菌(b)、植物乳杆菌(c)、副干酪乳杆菌(d)、单孢酿酒酵母(e)和马克斯克鲁维酵母(f)的发酵组。

图 2 单菌发酵和混菌发酵酸马奶样品中 pH 值和酸度变化

Fig.2 pH and acidity of mono or co-cultures fermented Koumiss samples

2.1.2 不同酸马奶发酵组发酵过程中菌量变化分析 图 3 表明，乳酸菌在酸马奶发酵过程中呈现先增长后减小的趋势。由图 3a、3b、3c、3d 可以看出，每一组乳酸菌在发酵前期菌量均高于单菌发

酵，至发酵后期，瑞士乳杆菌和副干酪乳杆菌单菌发酵菌量逐渐超过混菌发酵组，而干酪乳杆菌和植物乳杆菌菌量也呈现逐渐追平的趋势，该结果产生是由于混菌发酵体系前期乳酸菌利用原马奶

里乳糖,代谢产生乳酸,使 pH 值降低至酵母菌增值的酸性条件,酵母菌开始酒精发酵,其代谢产物又促进乳酸菌的大量生长,乳酸等酸类物质大量积累,使得酸度增加,pH 值降低更快,从而导致后期抑制了菌的生长^[32-33]。马克斯克鲁维酵母对乳酸菌生长促进作用强于单孢酿酒酵母,其原因可能是马克斯克鲁维酵母可以利用乳糖,可以较快的

产生促进乳酸菌生长的物质^[34]。

图 3e、3f 显示,单菌发酵的单孢酿酒酵母因无法利用优势糖原乳糖而呈现增长滞缓的趋势,而马克斯克鲁维酵母能良好生长。在混菌发酵体系中,因为乳酸菌具有分解乳糖的作用产生能被单孢酿酒酵母利用的糖类物质,从而导致单孢酿酒酵母在前期正常生长^[35],后期随着乳酸菌代谢

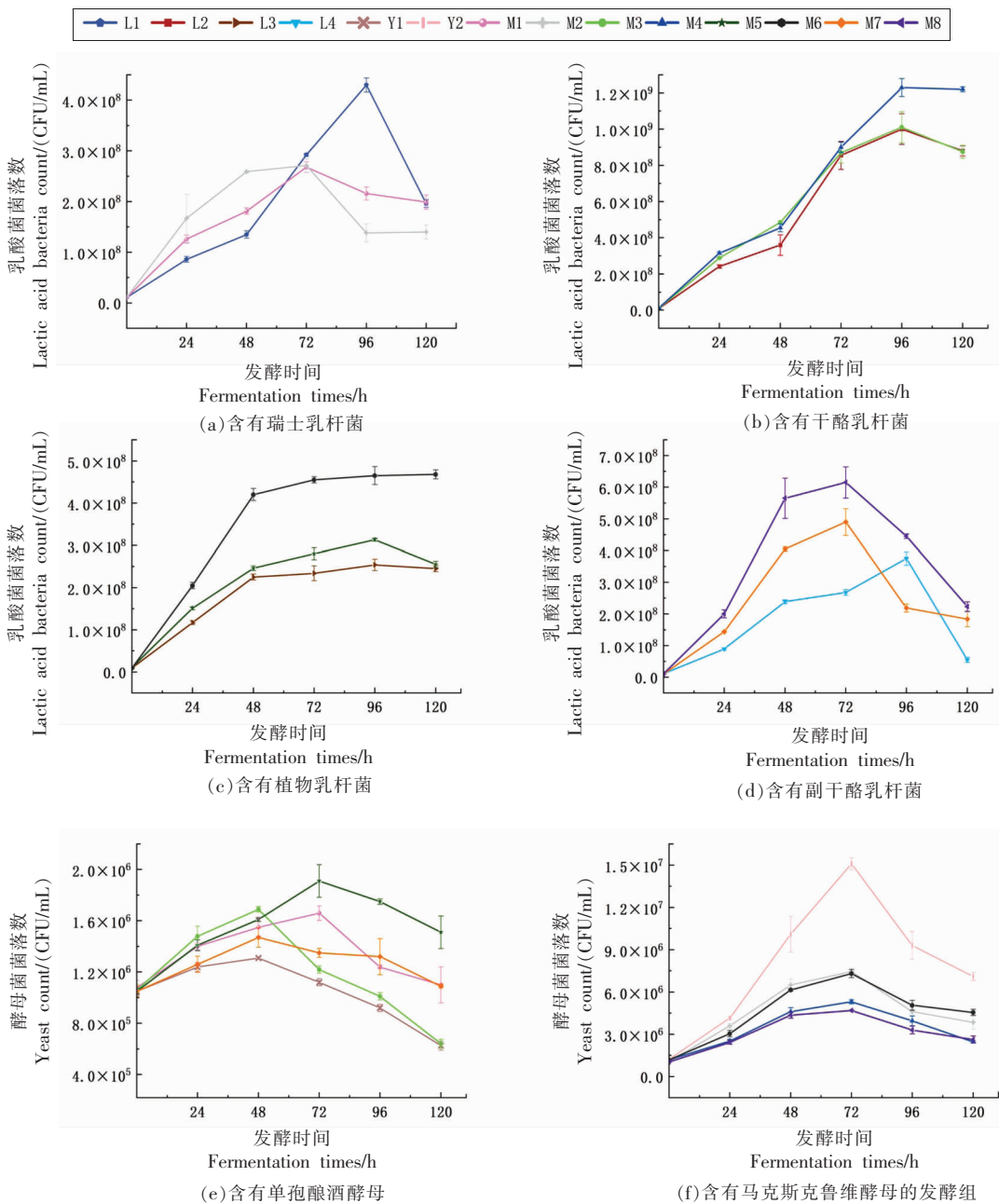


图 3 单菌发酵和混菌发酵酸马奶样品中乳酸菌和酵母菌菌量变化

Fig.3 The count of lactic acid bacteria and yeast of mono or co-cultures fermented Koumiss samples

的进行,乳酸等酸类物质堆积使得酵母菌的生长受到抑制呈衰退趋势,但始终高于单菌发酵组。马克斯克鲁维酵母是乳糖利用型酵母,因此其单菌发酵组菌量增加较快,相对于混菌发酵组,乳酸菌的加入两者对糖原的利用形成竞争抑制,从而抑制了马克斯克鲁维酵母的生长^[10]。

Lotka-Volterra 种间竞争模型利用混菌发酵体系中两种菌群菌落数随发酵时间变化以数学模型的形式表征化菌群间相互作用,并且已有报道用于此类研究^[36]。相互作用系数结果(表 2)进一步佐证了上述分析并且发现产酸能力较强的干酪乳杆菌与副干酪乳杆菌对单孢酿酒酵母对空间的竞争极强,而马克斯克鲁维酵母可以压制乳酸菌对发酵空间竞争的强势甚至对瑞士乳杆菌和植物乳杆菌这两种产酸较弱的乳杆菌表现出更强的竞争。

表 2 Lotka-Volterra 模型菌群相互作用参数

Table 2 Lotka-Volterra model interaction parameters

组别	相互作用系数	
	a	b
M1	13.18 ± 2.43	-8.16 ± 1.23
M2	-3.13 ± 0.42	-1.13 ± 0.12
M3	282.97 ± 4.86	-15.81 ± 2.73
M4	11.02 ± 0.87	14.54 ± 2.43
M5	-2.02 ± 0.23	-17.92 ± 1.46
M6	-2.01 ± 1.74	-0.93 ± 0.93
M7	121.53 ± 2.12	-21.31 ± 0.49
M8	-14.79 ± 1.13	-60.68 ± 2.89

2.2 传统酸马奶优势菌群与特征风味的形成的相关性分析

2.2.1 不同组别酸马奶样品风味物质的分析 图 4 为 14 组单菌/混菌发酵酸马奶挥发性风味物质热图,可以看出,通过 SPME-GC-MS 技术对巴氏杀菌鲜马奶及 14 组单菌,混菌发酵酸马奶进行风味物质分析,经 NIST 1.1 谱库检索及化合物匹配度分析后使用热图进行数据可视化后可以观察到(图 4)从样品中共测定出 65 种化合物。

从单菌发酵来看,乳酸菌单菌发酵酸马奶样品(L1,L2,L3,L4)中以酸类物质为主,包括辛酸(octanoic acid),正癸酸(n-decanoic acid),月桂酸

(dodecanoic acid),乙酸(acetic acid),己酸(hexanoic acid)等酸类风味物质,其相对质量分数分别高达 59.17%,24.86%,4.82%,5.76%,8.63%,由此可得乳酸菌在发酵酸马奶的过程中主要产生酸类物质,酸类物质中主要产生辛酸和正癸酸,且有少量醇类酯类物质。

在酵母菌单菌发酵酸马奶样品中,两种优势菌呈现不同的状态。单孢酿酒酵母由于可利用糖原的缺失,菌种生长缓慢,其风味物质组成和乳酸菌相似,以酸类为主,且含有少量醇类、酯类。而马克斯克鲁维酵母可以在酸马奶体系中良好地生长,其酸类风味物质仅占 18.07%,且相较于其余单菌发酵组,辛酸与正癸酸仅 9.88%和 6.63%。酯类物质在该发酵组中占据绝对的优势,其质量分数为 74.64%,其中辛酸乙酯(ethyl octanoate)和癸酸乙酯(ethyl caprate)成为最重要的两种酯类物质,质量分数分别为 36.45%和 21.73%。乙醇作为最重要的醇类物质,质量分数为 6.10%。

从混菌发酵组来看,单孢酿酒酵母加入 4 种优势乳酸菌后发酵酸马奶对风味物质构成的影响较小,酸类物质仍是 M1,M3,M5,M7 发酵组中的绝对优势风味物质。单孢酿酒酵母的加入对乳酸菌产生酸类物质具有促进作用,混菌发酵组的辛酸,正癸酸等酸类风味物质含量均高于单菌发酵组。而 4 种优势乳酸菌加入马克斯克鲁维酵母后发酵酸马奶,作为主要酸类物质的辛酸和正癸酸的质量分数明显降低,M2,M4,M6,M8 中的辛酸质量分数分别为 21.20%,23.82%,21.03%,27.14%,正癸酸质量分数分别为 12.11%,13.39%,12.48%,9.81%。同理,马克斯克鲁维酵母发酵主要产物辛酸乙酯和癸酸乙酯的质量分数也受到了乳酸菌的抑制,M2,M4,M6,M8 中辛酸乙酯质量分数分别为 26.94%,23.05%,26.45%,22.89%,癸酸乙酯的质量分数分别为 10.67%,9.6%,10.29%,4.38%。乙醇作为酸马奶中重要的醇类物质在马克斯克鲁维酵母参与的单菌混菌发酵体系中含量较高。

综上所述,单孢酿酒酵母对于 4 种乳酸菌的作用主要是促进辛酸,正癸酸等酸类物质的生成,但因其本身生长环境不适,导致在混合发酵中对酸马奶风味改变不明显,仅在一定程度上增加了

醇类物质的生成^[13]。而马克斯克鲁维酵母作为乳糖利用型酵母菌,与4种乳酸菌在混菌发酵体系中从风味物质生成的角度看存在着明显的拮抗抑制关系^[31],马克斯克鲁维酵母菌抑制了辛酸,正癸

酸等酸类发酵产物的合成,而乳酸菌同时抑制了辛酸乙酯,癸酸乙酯等酯类化合物的大量生成,并且对产酸性能更佳的干酪乳杆菌和副干酪乳杆菌抑制效果更明显。

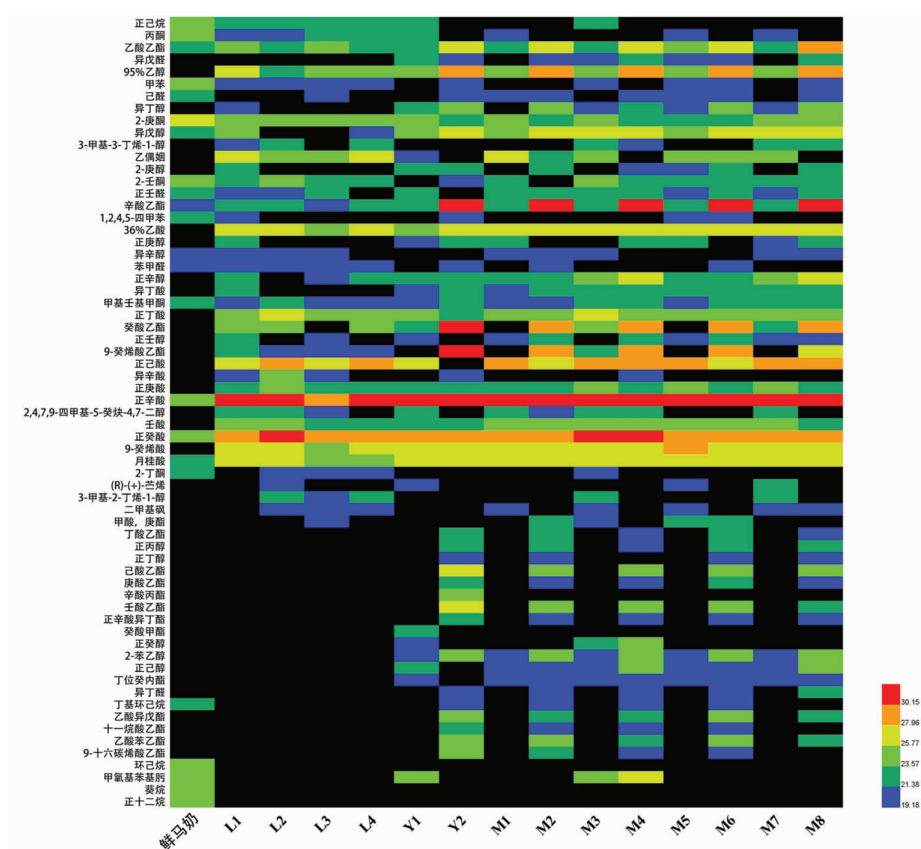


图4 14组单菌/混菌发酵酸马奶挥发性风味物质热图

Fig.4 Heat map of volatile flavor substances in 14 groups of mono or co-cultures fermented Koumiss

2.2.2 微生物与特征风味相关性分析 如图5所示,为了更直观的了解微生物与风味物质之间的关系,利用PLSR模型对多元数据进行分析,从65种化合物种选取12种主要的风味物质,分析4种乳酸菌和2种酵母菌与12种风味物质之间的联系^[37]。可以看出,瑞士乳杆菌(L1)、植物乳杆菌(L3)、副干酪乳杆菌(L4)相较于干酪乳杆菌(L2)对风味物质辛酸(V9)和9-癸烯酸(V11)关联性较弱,而对乙酸(V5)的关联性较强。干酪乳杆菌(L2)与重要风味物质正癸酸(V10)表现出了最佳的相关性,月桂酸(V12)与4种乳酸菌相关性均一般。

单孢酿酒酵母(Y1)对辛酸(V9)、己酸(V8)和9-癸烯酸(V11)体现出了极高的相关性,在酸马

奶发酵过程中促进酸类物质的生成发挥了重要作用,大部分酯类、醇类特征风味物质均与马克斯克鲁维酵母(Y2)表现出了较强的相关性,包括辛酸乙酯(V4),乙醇(V2)以及9-癸烯酸乙酯(V7),癸酸乙酯(V6)和异戊醇(V3)。由此可见,马克斯克鲁维酵母(Y2)可能控制着酸马奶中酯类醇类物质的生成。在所有特征风味物质中,乙酸乙酯(V1)与这六种优势菌群均没有展现出较强相关性,其原因可能是该特征风味物质主要是由传统酸马奶发酵后期醋酸菌产生^[20]。

3 结论

通过对传统酸马奶中分离得到的4株乳酸

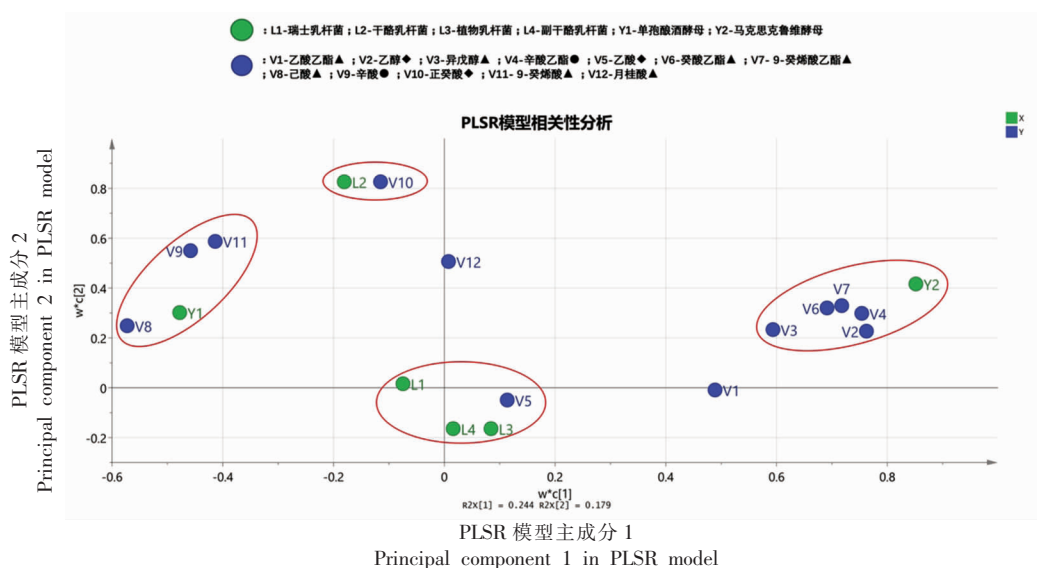


图 5 传统酸马奶优势菌群及挥发性特征风味相关性

Fig.5 Flavor correlation of dominant bacteria and volatile characteristics in traditional Koumiss

菌,2株酵母菌的单菌及混菌共发酵酸马奶结果分析可知,乳酸菌和酵母菌的共发酵对于酸马奶发酵产酸能力具有促进作用,其原因在于酵母菌的加入促进了乳酸菌在发酵前中期的生长^[38]。而乳酸菌的加入促进了单孢酿酒酵母的增长,却抑制了马克斯克鲁维酵母的增长,其原因在于乳酸菌利用乳糖产生的代谢物能促进单孢酿酒酵母的生长,但马克斯克鲁维酵母是乳糖利用型酵母,与乳酸菌形成竞争抑制关系,从而抑制了马克斯克鲁维酵母的生长^[39]。Lotka-Volterra模型拟合每组混菌发酵之间相互作用参数结果与前者结论一致。

从风味物质的角度来讲,单孢酿酒酵母主要促进4种乳酸菌产生辛酸、正癸酸等酸类物质,而马克斯克鲁维酵母作为乳糖利用型酵母菌,与4种乳酸菌在混菌发酵体系存在着明显的拮抗关系,从而抑制了辛酸、正癸酸等酸类发酵产物的合成。基于PLSR模型相关性分析优势菌群与特征风味的关联性结果于前者结论具有一致性,单孢酿酒酵母对辛酸、己酸和9-癸烯酸关系紧密,大部分酯类、醇类特征风味物质均与马克斯克鲁维酵母表现出较强的相关性,其中干酪乳杆菌与正癸酸的关联性最强。

参 考 文 献

- [1] GUO L, XU W L, LI C D, et al. Comparative study of physicochemical composition and microbial community of Khoormog, Chigee, and Airag, traditionally fermented dairy products from Xilin Gol in China[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(3): 1564-1573.
- [2] ZHANG M, DANG N, REN D Y, et al. Comparison of bacterial microbiota in raw mare's milk and koumiss using PacBio single molecule real-time sequencing technology[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11(10): 581610.
- [3] MU Z S, YANG X J, YUAN H L. Detection and identification of wild yeast in Koumiss[J]. Food Microbiology, 2012, 31(2): 301-308.
- [4] HOU Q C, LI C K, LIU Y H, et al. Koumiss consumption modulates gut microbiota, increases plasma high density cholesterol, decreases immunoglobulin G and albumin[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52(11): 469-478.
- [5] LI Q Y, ZHANG C J, XILIN T, et al. Effects of koumiss on intestinal immune modulation in immunosuppressed rats[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9(2): 765499.
- [6] LI C K, LIU X F, WANG H Q, et al. Koumiss consumption induced changes in the fecal

- metabolomes of chronic atrophic gastritis patients[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 62(11): 103522.
- [7] GUO L, YA M, GUO Y S, et al. Study of bacterial and fungal community structures in traditional koumiss from Inner Mongolia[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(3): 1972–1984.
- [8] AFZAAL M, SAEED F, ANJUM F, et al. Nutritional and ethnomedicinal scenario of koumiss: A concurrent review[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(11): 6421–6428.
- [9] GUO L, XU W L, LI C D, et al. Production technology, nutritional, and microbiological investigation of traditionally fermented mare milk (Chigee) from Xilin Gol in China[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(1): 257–264.
- [10] WU Y, LI Y, GESUDU Q, et al. Bacterial composition and function during fermentation of Mongolia koumiss[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(8): 1–10.
- [11] RAKHMANOVA A, WANG T, XING G, et al. Isolation and identification of microorganisms in Kazakhstan koumiss and their application in preparing cow-milk koumiss[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(1): 151–166.
- [12] XIA Y N, OYUNSUREN E, YANG Y, et al. Comparative metabolomics and microbial communities associated network analysis of black and white horse-sourced koumiss[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370(15): 130996.
- [13] WURIHAN, BAO L S, HASIGAOWA, et al. Bacterial community succession and metabolite changes during the fermentation of koumiss, a traditional Mongolian fermented beverage[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 98(1): 1–8.
- [14] AN Y, ADACHI Y, OGAWA Y. Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia[J]. *Animal Science Journal*, 2004, 75(3): 245–252.
- [15] GESUDU Q, ZHENG Y, XI X X, et al. Investigating bacterial population structure and dynamics in traditional koumiss from Inner Mongolia using single molecule real-time sequencing[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(10): 7852–7863.
- [16] HOLLAND R, LIU S Q, CROW V L, et al. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification[J]. *International Dairy Journal*, 2005, 15(6/7/8/9): 711–718.
- [17] GUO C F, ZHANG S, YUAN Y H, et al. Comparison of *Lactobacilli* isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 12(1): 294–302.
- [18] ROOSTITA R, FLEET G H. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 31(1/2/3): 205–219.
- [19] XIA Y N, YU J Q, MIAO W G, et al. A UPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics approach for the evaluation of fermented mare's milk to koumiss[J]. *Food Chemistry*, 2020, 320(1): 126619.
- [20] TANG H, MA H M, HOU Q C, et al. Profiling of koumiss microbiota and organic acids and their effects on koumiss taste[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 85(4): 1–11.
- [21] MO L, YU J, JIN H, et al. Investigating the bacterial microbiota of traditional fermented dairy products using propidium monoazide with single-molecule real-time sequencing[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(5): 3912–3923.
- [22] MENG Y C, CHEN X L, SUN Z H, et al. Exploring core microbiota responsible for the production of volatile flavor compounds during the traditional fermentation of Koumiss[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2021, 135(1): 110049.
- [23] 中华人民共和国卫生部. 食品酸度的测定: GB 5009.239–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. Ministry of Health, PRC. Determination of acidity of food: GB 5009.239–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [24] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 乳酸菌检验: GB 4789.35–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. Ministry of Health, PRC. Food microbiology test, lactic acid bacteria test: GB 4789.35–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [25] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 霉菌和酵母菌计数: GB 4789.15–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. Ministry of Health, PRC. Count of mold and yeast in food microbiology: GB 4789.15–2016[S]. Beijing:

- Standards Press of China, 2016.
- [26] DIMAS MARTINS A, GJINI E. Modeling competitive mixtures with the Lotka–Volterra framework for more complex fitness assessment between strains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11(9): 572487.
- [27] XIA Y N, YU J Q, LIU H, et al. Novel insight into physicochemical and flavor formation in koumiss based on microbial metabolic network[J]. *Food Research International*, 2021, 149(11): 110659.
- [28] DAN T, WANG D, JIN R L, et al. Characterization of volatile compounds in fermented milk using solid–phase microextraction methods coupled with gas chromatography–mass spectrometry[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(4): 2488–2500.
- [29] CHEN Y, LI P, LIAO L Y, et al. Characteristic fingerprints and volatile flavor compound variations in Liuyang Douchi during fermentation via HS–GC–IMS and HS–SPME–GC–MS[J]. *Food Chemistry*, 2021, 361(11): 130055.
- [30] ZHAO M, NIAN Y Q, ALLEN P, et al. Performances of full cross–validation partial least squares regression models developed using Raman spectral data for the prediction of bull beef sensory attributes [J]. *Data in Brief*, 2018, 19(8): 1355–1360.
- [31] WANG L, GAO E Y, HU M, et al. Comparative analysis of the fermentation performance of high–quality milk beer strains (*Kluyveromyces marxianus*) and optimisation of medium formula for high–density fermentation[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2020, 73(3): 552–562.
- [32] SUDUN, WULJIDELIGEN, ARAKAWA K, et al. Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, an alcoholic fermented milk[J]. *Animal Science Journal*, 2013, 84(1): 66–74.
- [33] GOBBETTI M, CORSETTI A, ROSSI J. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41(4): 456–460.
- [34] VILJOEN B C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 69(1/2): 37–44.
- [35] VENTURI M, GUERRINI S, VINCENZINI M. Stable and non–competitive association of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida milleri* and *Lactobacillus sanfranciscensis* during manufacture of two traditional sourdough baked goods[J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(1): 107–115.
- [36] SHI L H, XU Y Y, ZHAN L S, et al. Enhancing vitamin B12 content in co–fermented soy–milk via a Lotka–Volterra model[J]. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2018, 43(6): 671–678.
- [37] HAN P P, YUAN Y J. Metabolic profiling as a tool for understanding defense response of *Taxus cuspidata* cells to shear stress[J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(5): 1244–1253.
- [38] MINNAAR P P, DU PLESSIS H W, JOLLY N P, et al. Non–*Saccharomyces* yeast and lactic acid bacteria in Co–inoculated fermentations with two *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: A strategy to improve the phenolic content of Syrah wine[J]. *Food Chemistry X*, 2019, 4(12): 100070.
- [39] LIU S Q, TSAO M. Enhancement of survival of probiotic and non–probiotic lactic acid bacteria by yeasts in fermented milk under non–refrigerated conditions[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 135(1): 34–38.

Interaction between Dominant Microflora and Correlation with Flavor Substance in Traditional Koumiss

Meng Yuecheng¹, Bi Jianzhe¹, Sun Zhehang², Chen Jie¹, Tong Jingwen¹, Li Yanhua^{1,3*}

¹School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018

²Natural Medicine Institute of YST, Hangzhou 310000

³Key Laboratory for Food Microbial Technology of Zhejiang Province, Hangzhou 310018)

Abstract In order to study the interaction between the dominant bacterial community of Koumiss and the relationship between the bacterial community and characteristic flavor, this experiment conducted mono– or co–cultures fermentation of 4 strains of lactic acid bacteria (LAB) and 2 strains of yeast isolated from traditional Koumiss, and measured the acidi-

ty, pH, changes in the amount of LAB and yeast in 14 groups of fermentation group. HS-SPME-GC-MS was used to study the differences of volatile flavor compounds in different fermentation groups. Lotka-Volterra model and partial least square regression (PLSR) were used to analyze the interaction coefficient between LAB and yeast and the correlation between dominant bacteria and the formation of characteristic flavor compounds in Koumiss. *Lactobacillus casei* (*L. casei*) had the fastest acid production rate among LAB, with pH value of 3.89 in the late stage of fermentation. For yeast, pH value of *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*) dropped to 4.16. The acid production of co-culture fermentation group was better than that of mono-culture fermentation group. The fermentation of LAB and *Kazachstania unispora* (*K. unispora*) can promote the growth of *K. unispora*. After 72 h of mixed fermentation with *K. unispora*, the bacterial colonies of *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) and *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) reached 1.91×10^6 CFU/mL and 1.66×10^6 CFU/mL, respectively. Also, it promoted the production of caprylic acid and n-decanoic acid. While the mixed fermentation of LAB and *K. marxianus* can form competitive inhibition. Also, the production of ethyl octanoate and ethyl caprate was inhibited in the co-fermentation system. The inhibitory effect on *L. casei* and *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*), which produce acid rate faster, was stronger than the *L. helveticus* and *L. plantarum*.

Keywords koumiss; lactic acid bacteria; yeast; flavor substances; interaction relationship