

三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳的特性分析

许双双¹, 吕嘉桡^{1*}, 巨瑞¹, 康婕²

(1. 陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710021) (2. 陕西省产品质量监督检验研究院, 陕西西安 710048)

摘要: 该研究分别以嗜热链球菌与5株乳杆菌组合(SN₄)、嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌组合(SN₂)、5株乳杆菌组合(SN₃)三组益生菌组合对羊乳进行发酵, 对发酵过程中(0~12 h)活菌数、pH值、酸度、持水力及凝乳点的质构特性、流变特性、菌群结构、功能性差异代谢物等进行分析研究。结果显示, SN₄、SN₂、SN₃的凝乳时间依次为4.70、5.60、10.60 h; 活菌数均可达到10⁹ CFU/mL以上; 发酵至凝乳点, 链球菌属和乳杆菌属均被检出; SN₄组合发酵酸乳的持水力、质构特性和流变特性等均表现最优, SN₂次之; 在P<0.05水平上, SN₄与SN₂相比, 18种肽类、2种糖类、7种有机酸差异代谢物中分别有13种、2种和2种上调; SN₄与SN₃相比, 18种肽类、7种糖类、6种有机酸差异代谢物中分别有5种、4种和6种上调; SN₃ VS SN₂、SN₄ VS SN₂、SN₄ VS SN₃差异代谢物通路分别涉及7条、5条、4条。研究结果表明, SN₄发酵酸乳特性均优于SN₂、SN₃。研究结果可为进一步研制感官优良、功能性强的多菌群发酵酸乳提供理论依据与技术支持。

关键词: 羊乳; 多菌群; 发酵; 酸乳; 理化特性; 代谢组学

文章编号: 1673-9078(2024)06-104-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0663

Characteristics Analysis of Goat Yogurt Fermented by Three Groups of Multi-strain Probiotics

XU Shuangshuang¹, LYU Jiali^{1*}, JU Rui¹, KANG Jie²

(1. School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

(2. Shaanxi Testing Institute of Product Quality Supervision, Xi'an 710048, China)

Abstract: In this study, three groups of probiotic combinations, *Streptococcus thermophilus* combined with 5 strains of *Lactobacillus* (SN₄), *Streptococcus thermophilus* combined with *Lactobacillus bulgaricus* (SN₂), and 5 strains of *Lactobacillus* combination (SN₃), were used to ferment goat milk. The number of viable bacteria, pH value, acidity, water-holding capacity during fermentation (0~12 h) and the texture properties, rheological characteristics, microbial community structure and functional differential metabolites at the curdling point were analyzed. The results showed that the curdling times of the SN₄, SN₂ and SN₃ yoghurts were 4.70 h, 5.60 h and 10.60 h, respectively, with the viable microbial number all reaching 10⁹ CFU/mL or above. When fermentation reached the curdling point, both *Streptococcus* and *Lactobacillus* were detected. The water-holding capacity, textural characteristics and rheological properties of the goat yogurt fermented with SN₄ were the best, followed by the SN₂ yogurt. At the P level <0.05, the comparison of the SN₄ yoghurt with the SN₂

引文格式:

许双双, 吕嘉桡, 巨瑞, 等. 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳的特性分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(6): 104-113.

XU Shuangshuang, LYU Jiali, JU Rui, et al. Characteristics analysis of goat yogurt fermented by three groups of multi-strain probiotics [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 104-113.

收稿日期: 2023-06-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272401)

作者简介: 许双双(1989-), 女, 在读硕士, 助理工程师, 研究方向: 食品工程, E-mail: 664271636@qq.com

通讯作者: 吕嘉桡(1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 益生菌研究与应用, E-mail: luji@sust.edu.cn

yoghurt revealed that 13 out of the 18 peptide differential metabolites, both the two carbohydrate differential metabolites, and 2 out of the 7 organic acid differential metabolites, were up-regulated. The comparison of the SN_4 yoghurt with the SN_3 yoghurt revealed that 5 out of the 18 peptide differential metabolites, 4 out of the 7 carbohydrate differential metabolites, and all the 6 organic acid differential metabolites, were up-regulated. There were 7, 5 and 4 differential metabolite pathways involved in SN_3 VS SN_2, SN_4 VS SN_2, SN_4 VS SN_3, respectively. The results showed that the properties of the goat yogurt fermented with SN_4 were better than those of the SN_2 and SN_3 yoghurts. The research results provide a theoretical basis and technical support for further research and development of multi-strain fermented yogurt with excellent sensory and functional properties.

Key words: goat milk; multi-bacteria; ferment; yogurt; physicochemical properties; metabolomics

酸乳 (Yogurt) 是生牛 (羊) 乳或乳粉为原料, 经杀菌、接种 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 和 *Streptococcus thermophilus* 发酵制成的发酵乳^[1]。这种传统的发酵乳经过长期的研究与实践, 其营养与功能已被证实和消费者认可, 但随着诸多益生菌群功能性的不断开发与研究, 多菌群益生菌发酵乳越来越受到关注, 它不仅具有多菌群各自的益生功能, 而且在乳发酵的过程中还可以产生多种后生元 (Postbiotic), 健康功效更好。目前, 有关多菌群益生菌发酵乳方面的研究有少许报道。印伯星等^[2]以发酵时间、黏度、游离氨基酸以及活菌数为指标探究了鼠李糖乳杆菌 LV108、干酪乳杆菌 grx12 及发酵乳杆菌 grx08 三株混合发酵的最佳比例, 以期得到口感良好和营养性强的发酵酸乳。韩之皓等^[3]采用干酪乳杆菌 Zhang、乳双歧杆菌 V9、乳双歧杆菌 M8、短双歧杆菌 BB-X、植物乳杆菌 P-8、植物乳杆菌 P9、瑞士乳杆菌 H9 和鼠李糖乳杆菌 M9 这 8 菌株混合发酵脱脂乳粉、大豆分离蛋白粉和乳清蛋白粉, 以探究八种益生菌复合发酵不同基料后发酵乳酸菌饮料的功能性的差异。唐维媛等^[4]除了用常见菌种嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌外, 还加入了嗜酸乳杆菌和双歧杆菌混菌发酵脱脂乳粉, 以期通过调整比例获得符合国家标准的乳酸菌饮料, 最终活菌数达 3.20×10^9 CFU/mL。Li 等^[5]用嗜热链球菌、动物双歧杆菌和植物乳杆菌共培养菌种发酵牛乳, 结果表明嗜热链球菌单菌发酵牛奶 (265 min) 比嗜热链球菌、动物双歧杆菌和植物乳杆菌共培养发酵 (240~255 min) 需要更长的时间才能凝乳, 说明多菌群发酵可缩短发酵时间, 同时发酵牛乳时氨基酸含量增多。Li 等^[6]研究嗜热链球菌与不同比例的植物乳杆菌和动物双歧杆菌共发酵牛奶, 结果显示发酵乳产酸量、产多肽量等均比单菌强, 而且感官更好。Oliveira 等^[7]研究除用常见菌种嗜热链球菌和保

加利亚乳杆菌外, 还加入了鼠李糖乳杆菌、乳酸双歧杆菌和嗜酸乳杆菌发酵牛奶, 结果发现, 多菌群发酵可缩短酸奶发酵时间, 乳酸及蛋白质含量增加, 并且可提高酸乳中的共轭亚油酸含量。Pereira 等^[8]用嗜热链球菌与干酪乳杆菌共培养发酵山羊乳清粉, 研究发现, ACE 活性以及蛋白质水解能力高于嗜热链球菌单菌发酵。Li 等^[9]用嗜热链球菌与植物乳杆菌或动物双歧杆菌乳亚种共培养发酵牛乳, 结果表明共培养发酵乳与单菌发酵乳相比有较高的游离氨基和中性蛋白酶活性, 其中植物乳杆菌对蛋白有很强水解活性。Senaka 等^[10]研究嗜酸乳杆菌、动物双歧杆菌乳杆菌亚种和新型益生菌詹氏丙酸杆菌发酵羊乳, 结果表明, 3 种益生菌在发酵过程中均能保持较高的活力, 且无主要拮抗作用, 还有助于控制后酸化。Ma 等^[11]利用干酪乳杆菌和嗜热链球菌发酵牛乳, 研究发现, 两株菌可互相促进生长, 互利共生。总之, 目前有关传统酸乳以外的菌群组合发酵酸乳的研究尚处于初步阶段, 大多以表观指标居多。

羊乳是最接近于人乳的乳品^[12], 陕西拥有全国最大的奶山羊存栏数和产奶量^[13], 目前羊乳产品主要为奶粉, 品种单一, 限制了其产业的发展。为此, 试验以陕西省特色乳羊乳为原料, 以 6 株益生菌组合为试验菌株, 与传统发酵酸乳和 5 株杆菌组合发酵酸乳的感官特性、菌群结构分析及功能性差异代谢物等进行综合分析比较, 探究多菌群发酵羊乳酸乳的特性, 为进一步研制感官良好、风味优良、功能性强的多菌群发酵羊乳酸乳提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种

Lactobacillus bulgaricus G2 (G2)、*Lactobacillus*

casei G3 (G3)、*Lactobacillus plantarum* G4 (G4)、*Lactobacillus paracasei* G5 (G5)、*Lactobacillus rhamnosus* G6 (G6) 和 *Streptococcus thermophilus* Q5 (Q5)。6 株菌是课题组从 12 株益生菌代谢组学分析及其对羊乳的发酵作用等试验研究中选出的较优菌种。

1.1.2 供试原材料

全脂羊奶粉, 陕西省跳跳羊乳业有限公司。

1.1.3 试剂药品

MRS 肉汤、琼脂粉, 北京奥博星生物技术有限公司; 氯化钠为分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸、水、异丙醇均为色谱纯, Fisher 公司; E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA 抽提试剂盒, Omega Bio-Tek 公司。

1.2 试验仪器与设备

SW-CJ-2D 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; PHS-3C pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; HC-3018R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳仪器有限公司; HHW21-600 电热恒温水箱, 天津泰斯特仪器有限公司; DSX-280A 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂有限公司; TA.XTPLUS 物性分析仪, 厦门超技仪器设备有限公司; DHR-1 旋转流变仪, 德国 Thermo scientific; QL-901 旋涡混合器, 海门其林贝尔仪器制造有限公司; ABI GeneAmp® PCR 仪, 美国 ABI 公司; Illumina Miseq 测序仪, Illumina; New ClassicMF MS105DU 电子天平, 瑞士梅特勒公司; Centrifuge 5430R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; UHPLC-Q Exactive HF-X 系统, 赛默飞公司。

1.3 试验方案与方法

设立三组进行羊乳酸乳发酵试验, 即 SN_4 (G2+G3+G4+G5+G6+Q5)、SN_2 (G2+Q5)、SN_3 (G2+G3+G4+G5+G6)。将在 MRS 培养液中活化的试验菌株按照 1% 的接种量接种于羊乳中, 在 37 °C 培养 16 h 进行活化, 在羊乳中活化两次后, 将活化后的单菌液分别按照羊乳体积的 1% 组合后接种于羊乳中, 于 42 °C 恒温水浴锅中发酵, 分别于 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 h 取样, 测定活菌数、pH 值和酸度、持水力; 发酵至凝乳点时取样分析测定凝乳点的硬度、黏聚性、黏度指数及表观粘度, 并进行细菌菌群结构分析和非靶向代谢

组学分析等。

1.4 分析检测方法

1.4.1 活菌数

参考 GB 4789.35-2016, 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》^[14]。

1.4.2 pH值

参考 GB 5009.237-2016, 《食品安全国家标准 食品 pH 值的测定》^[15]。

1.4.3 酸度

参考 GB 5009.239-2016, 《食品安全国家标准 食品酸度的测定》^[16]。

1.4.4 持水特性

参考文献报道实验方法^[17,18]进行, 发酵乳置于离心管中离心, 倒去上清液后称重, 计算持水力。

1.4.5 质构特性

通过物性分析仪对发酵至凝乳点的羊乳酸乳的硬度、黏聚性和黏度指数进行测试, 探头型号 A/BE-45, 速度为 1 mm/s, 感受力为 5 g, 穿透深度一般为 30 mm, 返回距离 50 mm^[19,20]。

1.4.6 流变特性

用旋转流变仪检测发酵至凝乳点的羊乳酸乳的表观粘度随时间的变化情况。选用直径为 35 mm 的探头, 在 25 °C、剪切速率从 0.1 逐步升到 100 s⁻¹, 剪切过程持续 3 min, 检测发酵乳的表观粘度随时间改变^[21,22]。

1.4.7 细菌菌群结构分析

1.4.7.1 样品采集

用移液枪取 500 mg 凝乳状态混匀的发酵羊乳酸乳, 取样后液氮速冻, 然后 -80 °C 保存。

1.4.7.2 总DNA提取和检测

采用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA 提取试剂盒, 具体实验操作见说明书, 提取发酵乳的总 DNA, 然后进行 DNA 检测。

1.4.7.3 PCR扩增

引物对应区域: 16S V3-V4 区

上游引物 338F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG

下游引物 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT

1.4.7.4 Illumina测序

Illumina Miseq PE300/NovaSeq PE250 高通量测序分析。

1.4.7.5 生物信息学统计分析

原始测序序列质控分析采用 fastp^[23] 软件 (<https://github.com/OpenGene/fastp>), 序列拼接采用 FLASH^[24] 软件 (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>), OTU 聚类采用 UPARSE 软件^[25] (<http://drive5.com/uparse/>), 物种分类注释采用 RDP classifier^[26] 软件 (<http://rdp.cme.msu.edu/version>)。

1.4.8 代谢组学分析

1.4.8.1 样本制备

精确移取 200 μL 发酵羊乳酸乳样本至 1.5 mL 离心管中; 加入 800 μL 提取液: 甲醇: 乙腈=1:1 (V/V); 涡旋混匀 30 s 后, 低温超声提取 30 min (5 $^{\circ}\text{C}$, 40 kHz); 将样品静置于 -20 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 离心 15 min (13 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$), 移取上清液, 氮气吹干; 加入 120 μL 复溶液 (乙腈: 水=1:1) 复溶; 涡旋混匀 30 s, 低温超声萃取 5 min (5 $^{\circ}\text{C}$, 40 kHz); 离心 10 min (13 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$), 移取上清液至带内插管的进样小瓶中上机分析。

1.4.8.2 QC样本

质控样本 (Quality Control, QC) 是从每个样本中分别移取 20 μL 上清液混合后所得, 在仪器分析过程中, 每 10 个样本中插入一个 QC 样本, 以考察整个分析过程的稳定性。

1.4.8.3 LC-MS检测

LC-MS 分析的仪器平台为赛默飞公司的超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统。

(1) 色谱条件: 3 μL 样本经 HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm i.d., 1.8 μm) 分离后进入质谱检测。流动相 A 为 95% 水+5% 乙腈 (含 ϕ =0.1% 甲酸), 流动相 B 为 47.5% 乙腈+47.5% 异丙醇+5% 水 (含 0.1% 甲酸)。流速为 0.40 mL/min, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 质谱条件: 样品经电喷雾电离, 质谱信号采集采用正负离子扫描模式, 质谱扫描范围 70~1 050 m/z 。鞘气流速为 50 arb, 辅助气流速为 13 arb, 辅助气加热温度为 425 $^{\circ}\text{C}$, 正离子模式喷雾电压设置为 3 500 V, 负离子模式喷雾电压设置为 -3 500 V, S-Lens 电压为 50 V, 离子传输管温度为 325 $^{\circ}\text{C}$, 归一化的碰撞能为 20-40-60 V 循环碰撞能。

1.4.8.4 数据处理

将原始数据导入代谢组学处理软件 Progenesis QI (Waters Corporation) 进行基线过滤、峰识别、

积分、保留时间校正、峰对齐, 最终得到一个含保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵。其后采用该软件进行特征峰搜库鉴定, 将 MS 和 MS/MS 质谱信息与主流公共代谢数据库 HMDB 和 Metlin 以及美吉自建数据库进行匹配, MS 质量误差设置为小于 1.0×10^{-7} , 同时根据二级质谱匹配得分鉴定代谢物。预处理后的数据上传美吉生物云平台上 (<https://cloud.majorbio.com>) 进行数据分析, 使用 R 软件包 ropls (Version 1.6.2) 进行主成分分析 (PCA 分析)。此外, 进行 Student's t 检验和差异倍数分析。根据 OPLS-DA 模型得到的变量权重值 (VIP) 和 Student's t 检验 P 值来确定显著差异代谢物, VIP>1, $P<0.05$ 的代谢物为显著差异代谢物。通过 KEGG 数据库进行差异代谢物代谢通路注释, 获得差异代谢物参与的通路等信息。

2 结果与讨论

2.1 羊乳发酵过程中活菌数的变化

三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳过程中的活菌数变化, 如图 1 所示。

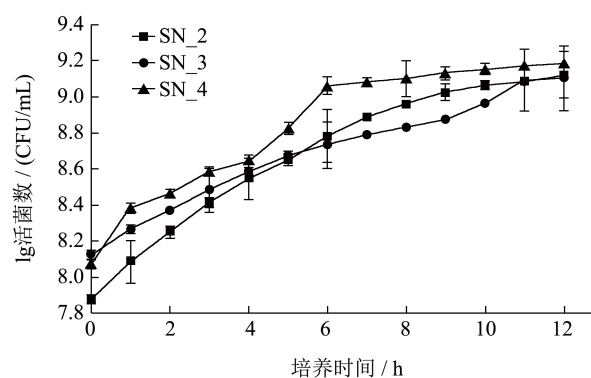


图 1 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳过程中的活菌数变化

Fig.1 Changes of viable bacteria count of goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

图 1 显示, SN_2、SN_3 和 SN_4 发酵乳中的活菌数在 0~6 h 快速增长, 活菌数分别达到 8.80×10^8 、 8.70×10^8 、 9.06×10^9 CFU/mL; 6~12 h 活菌数变化差异缩小, 分别达到 9.12×10^9 、 9.10×10^9 和 9.18×10^9 CFU/mL。唐维媛等^[4]在利用多种益生菌发酵脱脂乳粉时, 最终活菌数达 3.20×10^9 CFU/mL。通常, 嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌组合发酵酸乳的活菌数在 10^8 CFU/mL 以上, 国标对发酵乳中的乳酸菌数限量要求在 10^6 CFU/mL 以上^[1]。因此, 多菌群发酵羊乳酸乳中的活菌数均能达到国标要求。

表 1 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳凝乳点的特征

Table 1 Characteristics of curd points in goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

菌种组合	凝乳时间/h	滴定酸度/°T	pH 值	凝乳状态
SN_2	5.60	74	4.59	色泽均匀, 呈乳白色, 组织细腻均匀, 具有发酵乳特有的气味。
SN_3	10.60	73	4.59	色泽呈乳白色, 组织细腻均匀, 有少量乳清析出, 具有发酵乳特有的气味。
SN_4	4.70	73	4.58	色泽均匀一致, 呈乳白色, 组织细腻均匀, 具有发酵乳特有的气味。

2.2 羊乳发酵过程中pH值和酸度的变化

三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳过程中 pH 值和酸度的变化, 如图 2 所示。三组多菌群益生菌在发酵羊乳过程中, 随时间增加发酵乳酸度升高、pH 值降低, 这可能与发酵过程中产生的有机酸有关, 使得 pH 值不断减小, 酸度不断增大。SN_2、SN_3 和 SN_4 在发酵凝乳点的酸度分别为为 74、73 和 73 °T, 发酵 12 h 后酸度大小分别是 81.86、76.20、93.46 °T, 其中 SN_2 和 SN_4 酸度较大, 可能是因为嗜热链球菌产酸能力比乳杆菌强^[20], 也可能是嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌存在共生关系, 在发酵过程中保加利亚乳杆菌产生的活性物质能促使嗜热链球菌的生长和产酸^[21]。

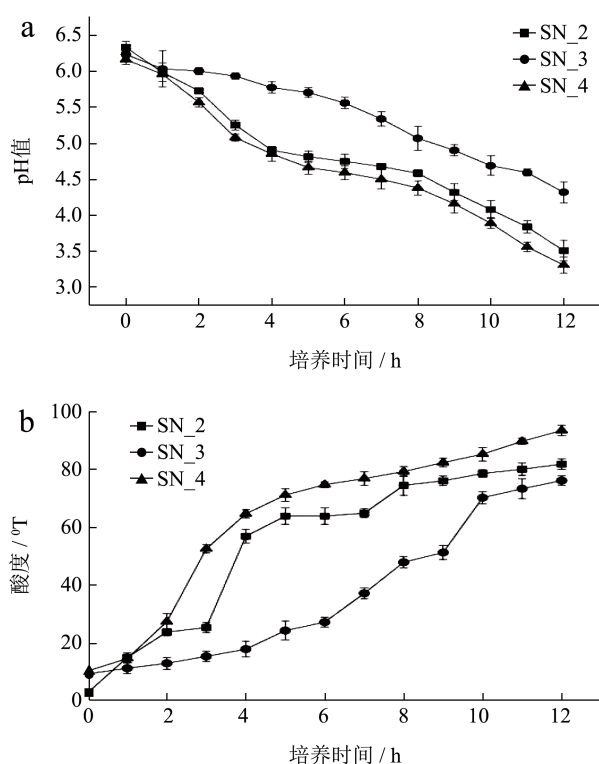


图 2 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳过程中的 pH 值和酸度的变化

Fig.2 Changes of pH level and acidity of goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

发酵至凝乳点的凝乳时间、酸度和 pH 值如表 1 所示。结果表明, SN_2、SN_3 和 SN_4 的凝乳时间分别为 5.60 h、10.60 h 和 4.70 h, 有嗜热链球菌加入的 SN_2 和 SN_4 凝乳时间明显缩短, pH 值分别为 4.59、4.59 和 4.58, 酸度分别为 74、73 和 73 °T, 酸度适中, 符合消费者的需求。并且 SN_2、SN_3 和 SN_4 的凝乳状态均符合国标对发酵乳的感官要求^[1]。SN_3 组合的凝乳时间较长, 而 SN_4 组合的凝乳时间比嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌组合的缩短。Li 等^[5]以嗜热链球菌、动物双歧杆菌和植物乳杆菌共培养发酵牛乳时, 其凝乳时间为 240~255 min。可见, 多菌群发酵酸乳的凝乳时间可以接近甚至低于传统发酵酸乳的凝乳时间。

2.3 羊乳发酵过程中持水力的变化

三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳持水性的变化见图 3。随着发酵时间的增长, 持水力是逐渐增大的。发酵 12 h 时, 其持水力大小为 SN_4 > SN_2 > SN_3, SN_4 表现最优, SN_2 次之, 主要原因可能是 SN_4 和 SN_2 中含有嗜热链球菌, 有研究表明嗜热链球菌可分泌胞外多糖, 利于发酵乳形成网络结构, 其结构有利于增强发酵乳的持水性, 阻止乳清析出, 能防止发酵乳在流通过程中其结构遭到破坏, 并提高发酵乳本身的稳定性^[27]。

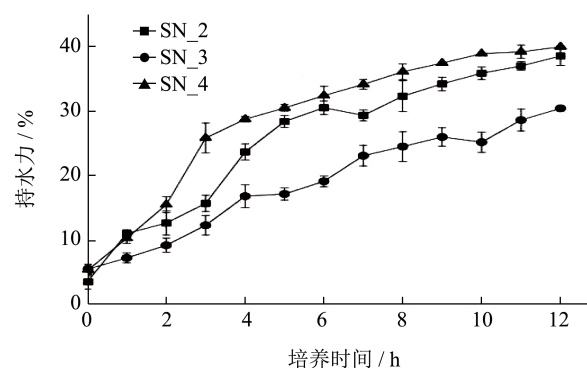


图 3 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳过程中的持水力变化

Fig.3 Changes of water holding capacity of goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

2.4 发酵羊乳酸乳质构特性

三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳凝乳点的质构特性分析结果如表 2 所示。

表 2 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳的质构特性

Table 2 Texture characteristics of goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

菌种组合	硬度/g	黏聚性/g	黏度指数/(g.s)
SN_2	2.32 ± 0.06	2.13 ± 0.83	-19.14 ± 0.02
SN_3	2.18 ± 0.23	1.95 ± 0.04	-11.75 ± 0.60
SN_4	2.48 ± 0.06	2.44 ± 0.02	-19.40 ± 0.37

从表 2 中可以看出，其凝乳点硬度大小顺序为 SN_4 > SN_2 > SN_3，有嗜热链球菌参与发酵的发酵酸乳硬度均较高；黏聚性大小顺序为 SN_4 > SN_2 > SN_3；黏度指数大小是按照测定数值的绝对值大小判断，三组发酵酸乳的黏度指数大小为 SN_4 > SN_2 > SN_3。其中 SN_4 的硬度、黏聚性和黏度指数都比较高，说明发酵的酸乳质地比较好。

2.5 发酵羊乳酸乳流变特性

三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳流变特性，如图 4 所示。从图 4 可以看出，三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳的表观粘度都随着剪切速率的增加而减少，最后趋于平稳。SN_2、SN_3、SN_4 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳的表观粘度从 0.39、0.43 和 0.32 开始下降到 0.04、0.07 和 0.02，说明 SN_4 的体系比较稳定，凝乳状态最好。

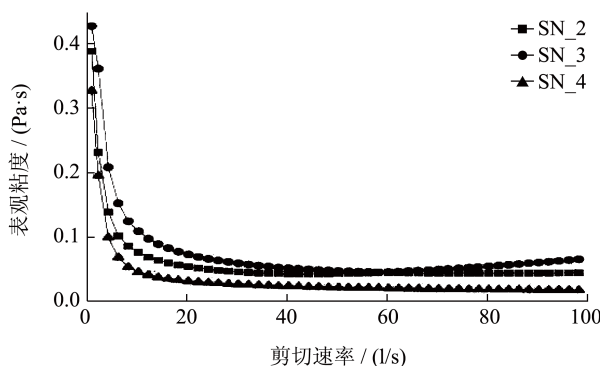


图 4 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳流变特性

Fig.4 Rheological properties of goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

2.6 发酵羊乳酸乳细菌菌群结构分析

对三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳进行细菌菌群多样性分析，在属（Genus）水平上的菌群结构组成如图 5 所示。SN_2 中加入了一株乳杆菌和一株嗜热链球菌，其优势菌群链球菌属相对丰度

为 89.15%，乳杆菌属相对丰度为 10.83%；SN_3 加入了五株乳杆菌，其优势菌群乳杆菌属相对丰度为 99.97%；SN_4 加入了五株乳杆菌和一株嗜热链球菌，其优势菌群链球菌属相对丰度为 77.21%，乳杆菌属相对丰度为 22.78%。细菌菌群多样性分析结果表明三个组合最初接入的链球菌和乳杆菌在发酵羊乳酸乳后均被检出，且相对丰度与最初接入的菌属一致，说明三种益生菌组合在羊乳发酵过程中均能良好生长。

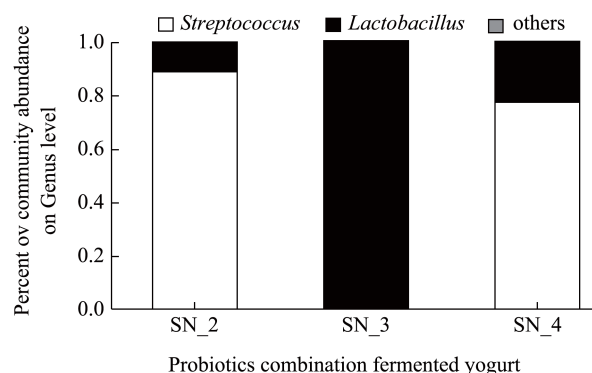


图 5 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳在属水平上的菌群结构组成

Fig.5 The bacterial community structure composition of goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics at the genus level

2.7 发酵羊乳酸乳代谢组学分析

2.7.1 PCA分析

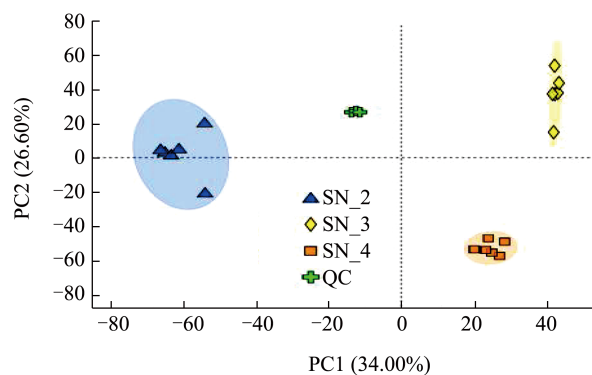


图 6 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳 PCA 得分图

Fig.6 PCA score plot of goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

对三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳进行代谢组学分析，其中，主成分分析（PCA 分析）结果如图 6 所示，可以看出，所有 QC 样本聚集紧密，说明数据采集过程中设备及试验条件稳定，所得数据准确可靠。三种样本组内距离相对较近，说明每

种样本的平行样之间重复性较好；三种样本组间距离较远，说明三种样本之间差异显著。

根据 KEGG 数据库对三个样本产生的代谢物进行生物学功能分类，结果如图 7 所示，共检测出 883 种化合物。其代谢物按一级分类可分为维生素和辅因子、类固醇类、肽类、核酸类、激素和递质类、有机酸类、脂类、碳水化合物类以及抗生素类化合物。

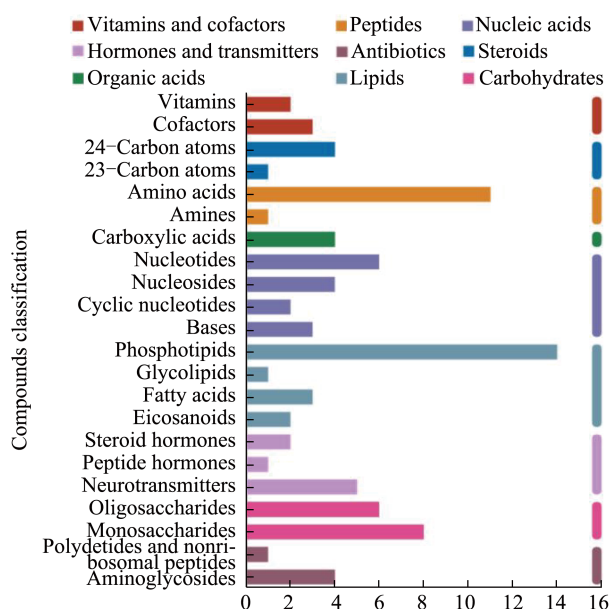


图 7 三组多菌群益生菌发酵羊乳酸乳代谢化合物分类

Fig.7 Classification of metabolic compounds in goat yogurt fermented by three groups multi-bacteria probiotics

2.7.2 功能性差异代谢物分析

采用 Student's *t* 检验对两两样本差异代谢物进行分析，根据 OPLS-DA 模型的加权系数，依据变量权重值 (VIP) 筛选出对模型贡献较大的变量，在正负离子模式下得到组间差异代谢物。基于 $P < 0.05$, VIP 值 > 1 和差异倍数 ≥ 1 确定标准，得出 SN_3 VS SN_2、SN_4 VS SN_2 和 SN_4 VS SN_3 之间的基本差异代谢物，然后将差异代谢物中的氨基酸类、肽类、有机酸类及相关代谢物、糖类化合物、核苷类代谢物和维生素类的功能性代谢物进行比较分析。

(1) SN_3 VS SN_2

通过分析 SN_3 VS SN_2，共鉴定出 292 种代谢物，其中氨基酸类、肽类、糖类、有机酸类、脂肪酸类、核苷酸类以及维生素类功能性差异代谢物如图 8 所示。其中氨基酸类 7 种，肽类 22 种，糖类 7 种，有机酸类 11 种，核苷类 4 种，维生素类 1 种。

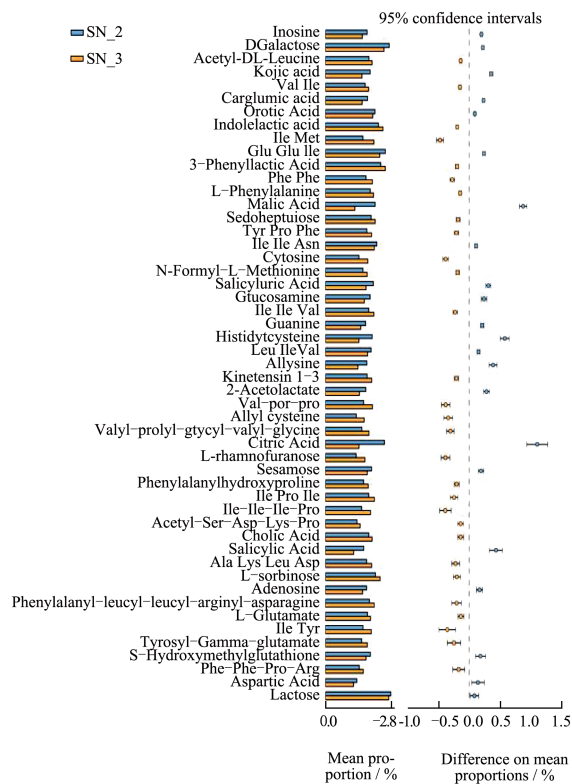


图 8 SN_3 VS SN_2 功能差异代谢物柱形图

Fig.8 SN_3 and SN_2 functional differential metabolites column chart

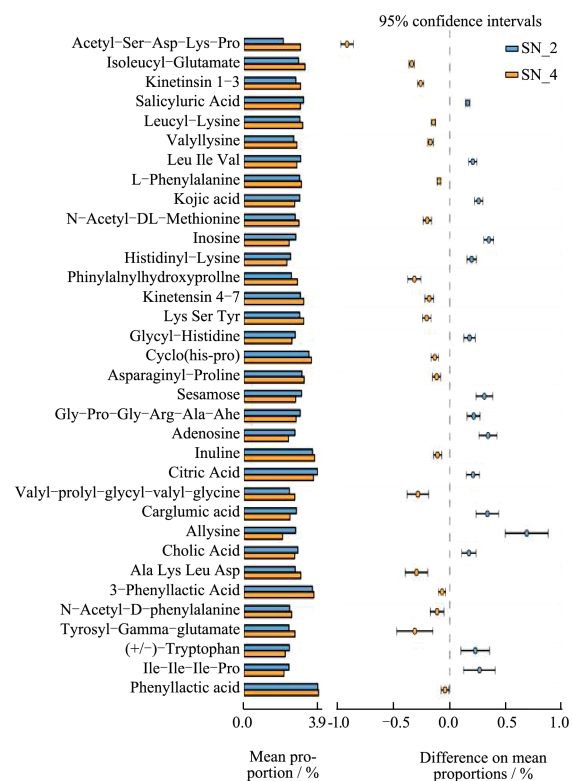


图 9 SN_4 VS SN_2 功能差异代谢物柱形图

Fig.9 SN_4 and SN_2 functional differential metabolites column chart

(2) SN_4 VS SN_2

通过分析 SN_4 VS SN_2 共鉴定出 284 种代谢物，其中氨基酸类、肽类、糖类、有机酸类、脂肪酸类、核苷酸类以及维生素类功能性差异代谢物如图 9 所示。其中有氨基酸类 5 种（3 种上调），肽类 18 种（13 种上调），糖类 2 种（均上调），有机酸类 7 种（2 种上调），核苷类 3 种。

(3) SN_4 VS SN_3

通过分析 SN_4 VS SN_3 共鉴定出 291 种代谢物，其中氨基酸类、肽类、糖类、有机酸类、脂肪酸类、核苷酸类以及维生素类功能性差异代谢物如图 10 所示。其中有氨基酸类 5 种（1 种上调），肽类 18 种（5 种上调），糖类 7 种（4 种上调），有机酸类 6 种（均上调），核苷类 2 种（1 种上调）。

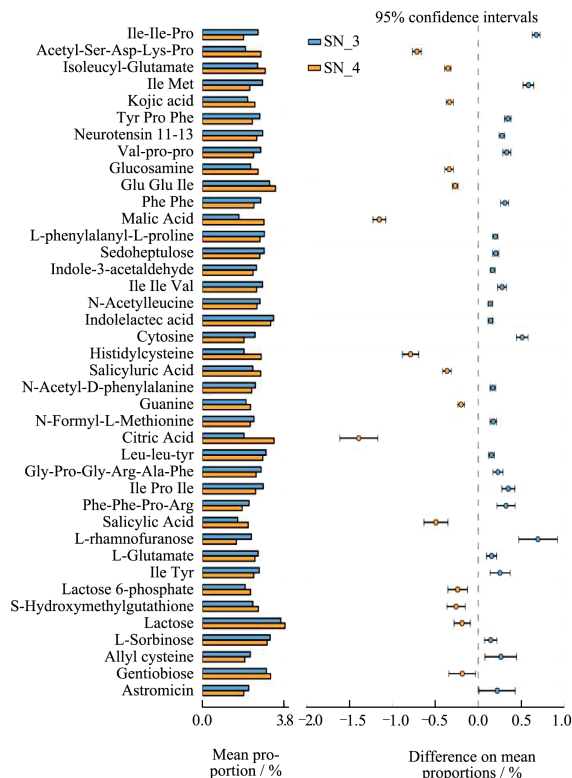


图 10 SN_4 与 SN_3 功能差异代谢物柱形图

Fig.10 SN_4 and SN_3 functional differential metabolites column chart

2.7.3 代谢通路分析

根据 KEGG 数据库，通过 SN_3 VS SN_2、SN_4 VS SN_2、SN_4 VS SN_3 两两差异代谢物通路分析，结果如图 11 所示。

图 11 表明，SN_3 VS SN_2 的功能性差异代谢物主要的代谢途径有 Purine metabolism（嘌呤代谢），Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid（鸟氨酸、赖氨酸和烟酸衍

生物碱的生物合成），Phenylalanine metabolism（苯丙氨酸代谢），Glycerophospholipid metabolism（甘油磷脂代谢），Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis（茄、哌啶和吡啶类生物碱的生物合成），Galactose metabolism（半乳糖代谢），Carbohydrate digestion and absorption（碳水化合物的消化和吸收）。

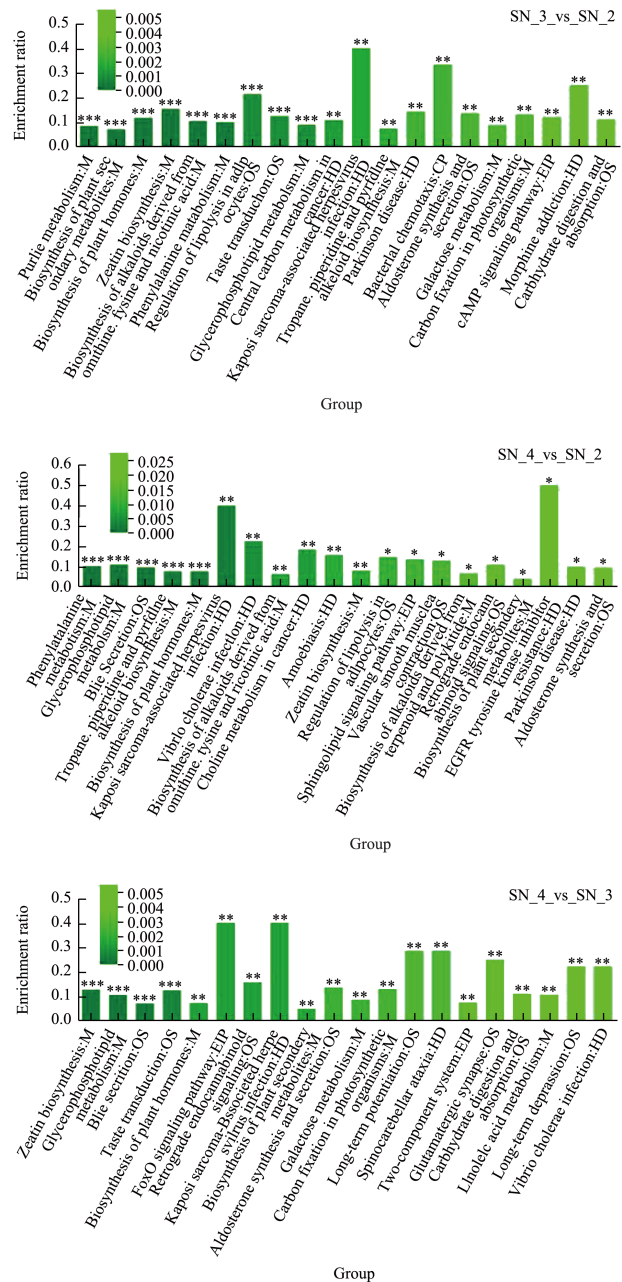


图 11 KEGG 通路富集柱形图

Fig.11 Histogram of KEGG pathway enrichment

SN_4 VS SN_2 的功能性差异代谢物主要的代谢途径有 Phenylalanine metabolism（苯丙氨酸代谢），Glycerophospholipid metabolism（甘油磷脂代谢），Tropane, piperidine and pyridine alkaloid

biosynthesis (萜、哌啶和吡啶类生物碱的生物合成), Biosynthesis of alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid (鸟氨酸、赖氨酸和烟酸衍生生物碱的生物合成), Biosynthesis of alkaloids derived from terpenoid and polyketide (萜类和聚酮类生物碱的生物合成)。

SN_4 VS SN_3 的功能性差异代谢物主要的代谢途径有 Glycerophospholipid metabolism (甘油磷脂代谢), Galactose metabolism (半乳糖代谢), Linoleic acid metabolism (亚油酸代谢), Carbohydrate digestion and absorption (碳水化合物的消化和吸收)。

3 结论

通过嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌 5 株乳杆菌组合 (SN_4) 和嗜热链球菌与保加利亚乳杆菌组合 (SN_2) 以及保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌 5 株乳杆菌组合 (SN_3) 对羊乳的发酵作用研究, 结果表明 SN_4 组合的凝乳时间 (4.70 h) 比传统的酸乳发酵菌种组合 SN_2 的凝乳时间 (5.60 h) 缩短, 5 株乳杆菌组合 (SN_3) 的凝乳时间最长 (10.60 h), 但三个组合的活菌数均可达到 10^9 CFU/mL 以上; 发酵至凝乳时, 接入菌株所属的链球菌属和乳杆菌属均被检出, 说明嗜热链球菌和多菌群乳杆菌在发酵羊乳过程中始终存在; SN_4 组合发酵酸乳的持水力、硬度、黏聚性、黏度指数等质构特性和流变特性均表现最优, SN_2 次之; 在 $P < 0.05$ 水平上, SN_4 与 SN_2 相比, 18 种肽类、2 种糖类、7 种有机酸差异代谢物中分别有 13 种、2 种和 2 种上调; SN_4 与 SN_3 相比, 18 种肽类、7 种糖类、6 种有机酸差异代谢物中分别有 5 种、4 种和 6 种上调; 在肽类、糖类、有机酸类等功能性差异代谢物的种类和上调数量等方面 SN_4 表现较优; SN_3 VS SN_2、SN_4 VS SN_2、SN_4 VS SN_3 差异代谢物通路分别涉及 7 条、5 条、4 条。可见, 多菌群发酵酸乳具有良好的发酵特性, 在酸乳品质提升上有重要作用。研究结果对于进一步研究开发感官风味优良、功能性强的多菌群发酵酸乳奠定了基础, 对打破目前凝固型酸乳菌群受限的瓶颈, 调整酸乳产品结构, 推动羊乳产业发展具有重要的理论与实际意义。

参考文献

[1] GB 19302-2010, 食品安全国家标准 发酵乳[S].

- [2] 印伯星,瓦云超,黄玉军,等.人源多菌株益生菌发酵条件的研究[J].中国乳品工业,2019,47(3):4-7,16.
- [3] 韩之皓,郭帅,黄天,等.复合益生菌发酵不同基料乳酸菌饮料中挥发性代谢物差异分析[J].中国食品学报,2021,3:10-12.
- [4] 唐维媛,张义明,王文平,等.复合益生菌发酵剂制备乳酸菌饮料的研究[J].中国酿造,2010,11:53-55.
- [5] LI S N, TANG S H, REN R, et al. Metabolomic profile of milk fermented with *Streptococcus thermophilus* cocultured with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, or both during storage [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 8: 104.
- [6] LI S N, TANG S H, HE Q, et al. Changes in proteolysis in fermented milk produced by *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus plantarum* or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* during refrigerated storage [J]. Molecules, 2019, 24: 3699.
- [7] RICARDO P S O, ANA C R F, ROBERTA C S, et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 128: 467-472.
- [8] PEREIRA Á M S, FARIAS D R B, QUEIROZ B B, et al. Influence of a co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* on the proteolysis ACE-inhibitory activity of a beverage based on reconstituted goat whey powder [J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(1): 273-282.
- [9] LI S N, TANG S H, HE Q, et al. Physicochemical, textural and volatile characteristics of fermented milk co-cultured with *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* or *Lactobacillus plantarum* [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2019, 28: 14279.
- [10] RANADHEERA C S, EVANS C A, ADAMS M, et al. Co-culturing of probiotics influences the microbial and physicochemical properties but not sensory quality of fermented dairy drink made from goats' milk [J]. Small Ruminant Research, 2016, 12: 1-22.
- [11] MA C J, MA A M, GONG G Y, et al. Cracking *Streptococcus thermophilus* to stimulate the growth of the probiotic *Lactobacillus casei* in co-culture [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 210(1): 42-46.
- [12] 高婧昕,毛学英.羊乳组成及功能特性研究进展[J].中国乳业, 2019,11(8):160-164.
- [13] 王缠石,王韵,张立刚,等.陕西省奶山羊生产现状、问题及发展建议[J].中国乳业,2021,21(5):14-20.
- [14] GB 4789.35-2016,食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].
- [15] GB 5009.237-2016,食品安全国家标准 食品pH值的测定[S].
- [16] GB 5009.239-2016,食品安全国家标准 食品酸度的测定

- [S].
- [17] SAHAN N, YASAR K, HAYALOGLU A A. Physical, chemical and flavour quality of non-fat yogurt as affected by a β -glucan hydrocolloidal composite during storage [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(7): 1291-1297.
- [18] 白梅,黄天,郭帅,等.益生菌干酪乳杆菌Zhang和乳双歧杆菌V9发酵乳胞外多糖含量对流变学特性、质构和稳定性的影响[J].中国食品学报, 2021,21(4):193-202.
- [19] 曾丽萍,王欣璐,李启明,等.鼠李糖乳杆菌与嗜热链球菌复配发酵乳的工艺优化[J].中国乳品工业,2017,45(2): 47-50,60.
- [20] 张媛,潘潇,刘文君.植物乳杆菌P9接种量对凝固型发酵乳贮藏特性的影响[J].中国乳品工业,2022(2):21-24.
- [21] 田芬,粘靖祺,霍贵成.嗜酸乳杆菌和双歧杆菌发酵乳的流变特性研究[J].食品科学,2012,33(5):155-159.
- [22] 白英,刘乃齐.*Enterococcus faecium* AS8及其胞外多糖对发酵乳流变学特性的影响[J].食品科学,2019,40(10):70-76.
- [23] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): 1884-1890.
- [24] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [25] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [26] WANG Q, GEORGE G M, TIEDJE J M, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [27] RAMYA I, TOMAR S K, MAHESWARI T U, et al. *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2010, 20: 133-141.