

# 新疆传统奶酒专用酵母菌株筛选及其生物学特性与风味贡献分析

马琪<sup>1,2</sup>, 王嘉佑<sup>3</sup>, 曾军<sup>2</sup>, 霍向东<sup>2</sup>, 热孜古丽·库尔班<sup>2</sup>, 孙建<sup>2</sup>, 高雁<sup>1,2\*</sup>

1 新疆农业大学 食品科学与药学学院, 新疆 乌鲁木齐

2 新疆维吾尔自治区农业科学院微生物研究所, 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐

3 苏州科技大学 化学与生命科学学院, 江苏 苏州

马琪, 王嘉佑, 曾军, 霍向东, 热孜古丽·库尔班, 孙建, 高雁. 新疆传统奶酒专用酵母菌株筛选及其生物学特性与风味贡献分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(4): 1764-1784.

MA Qi, WANG Jiayou, ZENG Jun, HUO Xiangdong, Razigul-Kurban, SUN Jian, GAO Yan. Screening, biological characterization, and flavor contribution analysis of specialized yeast strains for Xinjiang traditional milk wine[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(4): 1764-1784.

**摘要:**【目的】挖掘新疆传统奶酒发酵体系中的优良酵母菌种资源, 筛选适配奶酒发酵的专用菌株, 为奶酒专用发酵剂的开发提供理论依据和菌种储备。【方法】以产醇、产酯能力、乳糖利用能力以及耐酸(pH)、耐糖、耐乙醇性能为筛选指标, 采用梯度稀释分离法结合选择性培养基分离酵母菌株。通过形态观察和分子生物学鉴定明确菌株的分类地位, 研究其生长特性、碳源利用能力及生物安全性, 结合感官评价和电子鼻技术评价菌株对发酵风味的贡献。【结果】从新疆传统奶酒引子及传统发酵乳制品中分离纯化获得 40 株酵母菌株, 经多轮筛选得到 2 株功能优良的菌株(J17 和 J23)。这 2 株菌可耐受 pH 2.5、350 g/L 葡萄糖及 47.34 g/L 乙醇的环境, 同时具备优良的产醇、产酯能力和乳糖利用能力, 鉴定为马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)和库德里阿兹威氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)。两菌株的生长曲线显示, 对数期始于 4 h, 稳定期分别始于 12 h 和 18 h; 对峙试验证实菌株之间无拮抗作用可共生; 碳源利用试验表明二者可利用葡萄糖、乳糖、蔗糖等 7 种碳源, 适应性强。生物安全性检测显示, 两菌株均无溶血性, 对康唑类抗真菌药物敏感, 符合食品发酵菌株的安全标准。电子鼻分析显示, 两菌株以 1:1 混菌(HJ)发酵奶酒基质的烷烃、硫化物、醇类、醛酮类等风味物质的响应值显著高于单菌发酵组及对照组, 主成分分析累计贡献率与线性判别分析累计判别率均达 99.97%。感官评价实验显示, 混菌(HJ)发酵的奶酒发酵彻底, 且在外观、香气、口感和风格 4 个维度的评分均高于其他组合。【结论】马克思克

资助项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划(2025B04032-002, 2025B02016-3); 新疆维吾尔自治区农业农村发展创新与服务项目(NTFW-2026-20)

This work was supported by This work was supported by the Xinjiang Uygur Autonomous Region Key Research and Development Program (2025B04032-002, 2025B02016-3) and the Xinjiang Uygur Autonomous Region Agricultural and Rural Development Innovation and Service Project (NTFW-2026-20).

\*Corresponding author. E-mail: xjnkygaoyan@163.com

Received: 2025-12-29; Accepted: 2026-02-03; Published online: 2026-02-11

鲁维酵母 J17 与库德里阿兹威氏毕赤酵母 J23 兼具高耐受性、广谱碳源利用能力、良好的生物安全性及协同增香能力, 具备奶酒专用发酵剂的开发潜力, 可为传统奶酒发酵提供优质菌种资源。

关键词: 奶酒; 酵母筛选; 耐受性; 生物学特性; 风味贡献

## Screening, biological characterization, and flavor contribution analysis of specialized yeast strains for Xinjiang traditional milk wine

MA Qi<sup>1,2</sup>, WANG Jiayou<sup>3</sup>, ZENG Jun<sup>2</sup>, HUO Xiangdong<sup>2</sup>, Razigul·Kurban<sup>2</sup>, SUN Jian<sup>2</sup>, GAO Yan<sup>1,2\*</sup>

1 College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang, China

2 Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang, China

3 School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, Jiangsu, China

**Abstract: [Objective]** To identify high-quality yeast strains in the Xinjiang traditional milk wine fermentation system and screen specialized strains suitable for the milk wine fermentation, thereby providing a theoretical basis and strain reserves for the development of dedicated fermentation agents. **[Methods]** With alcohol production, ester production, lactose utilization ability, as well as acid (pH), glucose, and ethanol tolerance as screening criteria, the gradient dilution separation method combined with selective media was employed to isolate yeast strains. Morphological observation and molecular biological identification were conducted to determine the taxonomic status of the strains. The growth characteristics, carbon source utilization ability, and biosafety of the strains were investigated. The fermentation flavor contributions of the strains were evaluated through sensory assessment and electronic nose technology. **[Results]** Forty yeast strains were isolated and purified from Xinjiang traditional milk wine starter and traditional fermented dairy products. After multiple rounds of screening, two strains (J17 and J23) with excellent functions were obtained, tolerating pH 2.5, 350 g/L glucose, and 47.34 g/L ethanol. They were identified as *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii*, respectively. The growth curves of the two strains showed that the logarithmic phase began at the time point of 4 h and the stationary phase started at 12 h and 18 h, respectively. The co-culture test confirmed no antagonistic effects and demonstrated symbiotic relationships between the two strains. Carbon source utilization tests indicated that both strains efficiently utilized seven carbon sources, including glucose, lactose, and sucrose, demonstrating strong metabolic adaptability. Biosafety testing revealed that neither strain exhibited hemolytic activity and was sensitive to antifungal drugs such as ketoconazole, meeting the safety standards for food fermentation strains. Electronic nose analysis revealed that the 1:1 mixed strain (HJ) fermentation of milk wine substrate exhibited significantly higher response values for flavor compounds such as alkanes, sulfides, alcohols, and aldehydes/ketones than the single-strain fermentation groups and controls. Both the cumulative contribution rate of PCA and

the cumulative discriminant rate of LDA reached 99.97%. Sensory assessment demonstrated that the HJ fermented milk wine scored higher than that of other strain combinations in four dimensions: appearance, aroma, taste, and style. **[Conclusion]** *K. marxianus* J17 and *P. kudriavzevii* J23 demonstrate high tolerance, broad-spectrum carbon source utilization ability, excellent biosafety, and synergistic aroma enhancement, showing the potential as specialized fermentation agents for milk wine production and providing high-quality microbial resources for the fermentation of traditional milk wine.

**Keywords:** milk wine; yeast screening; tolerance; biological characteristics; flavor contribution

新疆博尔塔拉蒙古自治州是中国西北部重要的蒙古族文化中心。目前,该地区仍保留着众多以牛奶为原料、采用传统手工酿造、依靠天然微生物群落协同发酵,从而形成独特风味与营养特性的乳制品,例如酸奶疙瘩、奶酪、奶酒、奶豆腐、奶皮子等。这些乳制品具有区别于其他地区的专属风味特征,其发酵体系中蕴含的微生物群落经过长期驯化现已成为我国西北地区珍贵的特色微生物资源库。其中,奶酒作为蒙古族传统佳节的必备饮品,通过自然发酵与蒸馏技艺酿制而成,兼具醇香与奶香,已成为蒙古族文化输出的名片<sup>[1-5]</sup>。

传统发酵食品是功能微生物的天然富集库,从中挖掘功能明确、性能优异的菌株,已成为食品微生物领域的核心研究方向之一<sup>[6-7]</sup>。非酿酒酵母作为传统发酵乳制品中的优势菌群,具有独特的应用价值<sup>[8]</sup>。乳基质中富含乳糖,需经微生物分泌的乳糖酶分解为葡萄糖与半乳糖后才能被进一步代谢,与非酿酒酵母相比,多数酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)因缺失乳糖酶编码基因,普遍难以利用乳糖进行发酵<sup>[9]</sup>。例如, Varela 等<sup>[10]</sup>的研究指出,相较于酿酒酵母,克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)在有氧与无氧条件下均能更高效地分解乳糖; Domingues 等<sup>[11]</sup>的研究也证实,克鲁维酵母可完全代谢乳糖,而酿酒酵母则无法实现这一代谢过程。此外,毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora*)以及马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)等非酿酒酵母,不仅具备酒精发酵能力,还能参

与复杂风味物质的生成,进而提升酒品的香气层次<sup>[12-17]</sup>。这些特性充分表明,传统发酵乳制品体系中的非酿酒酵母菌株具有成为奶酒专用发酵剂核心菌种的潜在价值。

本研究以新疆传统奶酒引子和发酵乳制品为研究对象,以乳糖利用能力、产醇产酯能力、环境耐受性及生物安全性为核心筛选指标,定向筛选非酿酒酵母菌株;通过分子生物学技术明确其分类地位,并系统性研究分离菌株的生物学特性,结合电子鼻技术与感官评价解析其风味贡献,旨在挖掘适配奶酒发酵的专用优良菌株,为奶酒专用发酵剂开发提供优质菌种资源与理论支撑,同时为民族特色食品的传承与创新提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品和菌株

传统酸奶与奶酒引子,分别采自新疆维吾尔自治区博尔塔拉蒙古自治州某奶酒生产合作社、传统奶制品加工厂及家庭作坊。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

硫酸铵、硫酸镁、磷酸二氢钠、氯化钙、磷酸氢二钾,天津市致远化学试剂有限公司;乙醇、盐酸,福晨(天津)化学试剂有限公司;葡萄糖,天津市盛奥化学试剂有限公司;蔗糖、

乳糖、可溶性淀粉, 天津市北联精细化学品开发有限公司; 果糖、木糖、麦芽糖、三丁酸甘油酯、氯化三苯基四氮唑, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 抗真菌药敏纸片, Liofilchem 公司; 哥伦比亚血平板、琼脂、酵母浸粉、蛋白胨, 青岛海博生物技术有限公司; 真菌基因组提取试剂盒, 简石生物技术(北京)有限公司。以上试剂均为分析纯或生化试剂。

双人净化工作台, 浙江孚夏医疗科技有限公司; pH 计, 上海雷磁仪器厂; 电热恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司; PCR 仪, Analytik Jena 公司; 高速冷冻离心机, 湖南恒诺仪器设备有限公司; 紫外/可见分光光度计, 上海美析仪器有限公司; 酒精计, 冀州市耀华器械仪表厂; 电子鼻, Airsense 公司。

### 1.1.3 培养基

酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YEPD)培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 酵母浸出粉 100.0。

酵母浸出粉葡萄糖氯霉素琼脂(yeast extract glucose chloramphenicol agar, YGC)培养基<sup>[18]</sup>(g/L): 酵母浸出粉 5.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 14.9, 氯霉素 0.1。

马铃薯葡萄糖氯霉素琼脂(potato dextrose chloramphenicol agar, PDAC)培养基(g/L): 马铃薯浸粉 6.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, 氯霉素 0.1。

氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)上层培养基<sup>[19]</sup>(g/L): 葡萄糖 50.0, TTC 0.5, 琼脂 200.0。

TTC 下层培养基(g/L): 蛋白胨 200.0, 葡萄糖 100.0, 酵母浸出粉 15.0, 硫酸镁 0.4, 磷酸二氢钾 1.0, 琼脂 20.0。

产酯固体培养基<sup>[20]</sup>(g/L): 蛋白胨 200.0, 葡萄糖 200.0, 酵母浸出粉 100.0, 琼脂 20.0, 三丁酸甘油酯 15.0 mL/L。

酵母浸出粉胨乳糖(yeast extract peptone lactose, YPL)培养基<sup>[21]</sup>(g/L): 蛋白胨 20.0, 乳糖 20.0, 酵母浸出粉 100.0, 琼脂 20.0。

碳源基础培养基(g/L): 硫酸铵 2.0, 硫酸镁 0.2, 磷酸二氢钠 0.5, 氯化钙 0.1, 磷酸氢二钾 0.5。

## 1.2 菌株分离纯化

采用梯度稀释涂布法进行酵母菌的分离纯化。在无菌条件下对样品进行系列倍比稀释, 最终选取稀释浓度为  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的菌液, 分别吸取各梯度菌液 100  $\mu$ L, 涂布于添加氯霉素的 PDAC、YGC 固体培养基中, 同时使用无菌生理盐水作为空白对照。将所有平板置于 28  $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 48 h, 挑取符合酵母菌菌落典型形态的单个菌落, 采用平板划线法进行纯化培养, 连续划线培养 3 次获得纯菌落, 并使用瓷珠保存管进行保存。采用《真菌鉴定手册》对菌落形态进行描述<sup>[22]</sup>。

## 1.3 初筛

以产醇、产酯能力及乳糖利用能力作为奶酒专用酵母菌株的初筛指标。

吸取 3  $\mu$ L 菌液点接于 TTC 下层培养基表面, 28  $^{\circ}$ C 培养 48 h 后覆盖 TTC 上层培养基, 继续在 28  $^{\circ}$ C 培养并连续观察 6 h, 记录菌落显色变化, 颜色深浅表征产醇能力强弱。

吸取 3  $\mu$ L 菌液点接于产酯培养基表面, 28  $^{\circ}$ C 培养 48 h, 测量菌落直径( $d$ )及周围透明圈直径( $D$ ), 以  $D/d$  值评价产酯能力。

吸取 3  $\mu$ L 菌液点接于 YPL 琼脂培养基表面, 28  $^{\circ}$ C 培养 48 h, 以生长圈直径为指标评价乳糖利用能力。

选择菌落呈现红色及以上显色强度、 $D/d$  值  $\geq 1.10$  和菌落生长圈直径  $\geq 3$  mm 菌株进行复筛。

## 1.4 复筛

以低 pH 的酸性环境、高糖与高乙醇环境的耐受性能作为奶酒专用酵母菌株的复筛指标。其耐酸、耐糖及耐乙醇性能均采用 YEPD 液体培养基胁迫培养法测定: 将浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 菌液按 2% 的接种量接至不同胁迫条件的 YEPD 液体培养基中, 于 28  $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下振荡

培养 16 h, 测定培养液在 600 nm 波长处的吸光度( $OD_{600}$ )和结束培养时的 pH 值、葡萄糖质量与乙醇质量浓度, 得到对低 pH、高糖和高乙醇环境耐受性好的菌株(相对存活率 $\geq 10\%$ )。其中耐糖性能测定设置的葡萄糖质量浓度梯度为 150、250、350 g/L, 以未添加葡萄糖的 YEPD 液体培养基为对照; 耐酸性能测定设置的培养基 pH 梯度为 2.5、3.5, 以未调节 pH 的 YEPD 液体培养基(pH 6.0)为对照; 耐乙醇性能测定设置的乙醇质量浓度梯度为 15.78、31.56、47.34、63.12、78.90 g/L, 以未添加乙醇的 YEPD 液体培养基为对照。相对存活率计算如公式(1)所示。

$$\text{相对存活率} = \frac{\text{实验组 } OD_{600}}{\text{对照组 } OD_{600}} \times 100\% \quad (1)$$

## 1.5 分子生物学鉴定

使用真菌基因组提取试剂盒提取培养至对数生长期的分离菌株的基因组 DNA 作为 PCR 扩增模板, 采用真菌分类鉴定通用引物 ITS1 (5'-GGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS4 (5'-AGCCTSCSCTTANTDATATGC-3')对核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)进行扩增。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ PCR *Bestag* MasterMix 25  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 正、反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2.5  $\mu\text{L}$ , 无菌超纯水 18  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后, 送至成都罗宁生物科技有限公司完成测序工作。测序结果提交至 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 BLAST 同源分析, 最后使用 MEGA 11 软件构建系统发育树。

## 1.6 菌株生长特性

将筛选得到的酵母菌以 3% ( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL) 的接种量接种于 YEPD 液体培养基中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 条件下振荡培养 48 h, 每间隔 2 h 进行 1 次取样, 使用紫外分光光度仪在波长 600 nm 处测定吸光度值, 以培养时间为横坐标,

$OD_{600}$  值为纵坐标绘制生长曲线。

## 1.7 菌株间拮抗性

采用平板对峙法, 观察菌株接触区域是否出现抑菌圈, 判断相容性<sup>[23]</sup>。

## 1.8 碳源利用试验

参考勉小娟等<sup>[24]</sup>的研究方法, 并稍作修改。选择果糖、木糖、乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉 7 种碳源, 配制成质量浓度为 20 g/L 的溶液, 将碳源溶液按比例添加至碳源基础培养基中, 将浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 菌液按 3% 的接种量接种, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 48 h, 培养结束后, 测定培养液在 600 nm 波长处的吸光度值( $OD_{600}$ ), 判断菌株利用碳源的能力。

## 1.9 生物安全性

### 1.9.1 抗生素耐药性

参照胡金丽等<sup>[25]</sup>的研究方法, 采用氟康唑、伏立康唑、两性霉素 B、伊曲康唑抗真菌药敏纸片进行敏感性试验。

### 1.9.2 菌株溶血活性

取对数生长期供试菌液 3  $\mu\text{L}$ , 点接于哥伦比亚血琼脂平板, 同时设置阳性对照, 接种等量金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 菌液。置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中倒置培养 24 h, 培养结束后观察菌落周边的溶血现象: 若菌落周围出现清晰的溶血圈, 则判定该菌株具有溶血活性; 未出现溶血圈则判定为无溶血活性。

## 1.10 电子鼻测定

将浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 菌液按 3% 的接种量接种至灭菌牛奶中, 28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 48 h。取 20 mL 发酵液至顶空样品瓶, 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴平衡 10 min, 采用电子鼻采集顶空气体, 参数设置: 清洗时间 120 s、归零时间 5 s、预进样时间 5 s、检测时间 100 s, 载气流速 300 mL/min。以未接种牛奶为对照(CK), 设置 J17 单菌发酵组、J23 单菌发酵组、J17 与 J23 以 1:1 混菌发酵组(HJ 组), 采集 85–89 s 特征响应值, 进行雷达图绘制、主成分分析(principal component analysis,

PCA) 及线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA)。不同传感器对各类风味成分的敏感性描述详见表 1。

### 1.11 感官评定

将浓度为  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL 菌液按 3% 的接种量接种至灭菌牛奶中, 28 °C 静置培养 48 h。以未接菌牛奶为对照(CK), 设置 J17 单菌发酵

组、J23 单菌发酵组、J17 与 J23 以 1:1 混菌发酵组(HJ 组)。邀请 10 名专家组成感官品鉴小组, 对样品进行感官评价, 评价结果取 10 名成员评分的平均值。评价指标涵盖外观、香气、口感和风格 4 个维度, 各评价指标细分为优秀、良好、合格、不合格 4 个等级, 满分 100 分。同时对各样品结束发酵时的发酵度、酒精度、残糖进行测定。传统奶酒感官评价标准见表 2。

表1 电子鼻传感器对应的敏感物质

Table 1 Sensory substances corresponding to the electronic nose sensors

Number	Sensor name	Sensor detection description
S1	W1C	Aromatic compound
S2	W5S	Oxynitride
S3	W3C	Ammonia, aromatic compound
S4	W6S	Hydride
S5	W5C	Alkane, aromatic compound
S6	W1S	Alkane compound
S7	W1W	Inorganic sulfide, terpene and sulfur-containing organic compound
S8	W2S	Alcohol, aldehyde and ketone
S9	W2W	Aromatic, organic sulfide
S10	W3S	Alkane, especially methane

表2 传统奶酒感官评价标准

Table 2 Traditional milk wine sensory evaluation criteria

Project	Grade	Criteria for evaluation	Score
Appearance: 20 points	Excellent v1	Opalescent or yellowish-green hue, with uniform and stable coloration	15–20
	Good v2	Opalescent or yellowish-green hue, with a relatively uniform and stable coloration	10–15
	Qualified v3	Opalescent or yellowish-green hue, unstable coloration	5–10
	Unqualified v4	Abnormal wine body color, turbid	0–5
Aroma: 30 points	Excellent v1	Mellow wine aroma, with intense elegant milky-wine aroma, well-coordinated overall	22–30
	Good v2	Favorable and well-coordinated wine aroma	15–22
	Qualified v3	Slightly faint wine aroma, with off-flavors	7–15
	Unqualified v4	No wine aroma, with putrid or other pungent off-flavors	0–7
Taste: 40 points	Excellent v1	Mellow wine body, well-balanced sour-sweet taste	28–40
	Good v2	Well-balanced sour-sweet taste, insufficient richness	15–28
	Qualified v3	Bland taste and insufficient richness	7–15
	Unqualified v4	Unbalanced taste with other undesirable off-flavors	0–7
Style: 10 points	Excellent v1	Distinct typicality with a unique stylistic feature	8–10
	Good v2	Typicality is exhibited, with indistinct stylistic features	5–8
	Qualified v3	Moderate typicality, indistinct stylistic features	3–5
	Unqualified v4	No typicality, undefined stylistic feature	0–3

## 1.12 数据处理

本研究中所有测试及分析指标均设置 3 次平行重复以保障数据可靠性。数据处理与显著性检验 ( $P < 0.05$ ) 采用 SPSS 27.0 统计软件完成; 试验相关图表通过 Origin 2022 软件绘制; 系统发育树通过 MEGA 11 软件构建; 电子鼻检测数据的处理与特征分析借助 WinMuster 软件实现。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离纯化及形态学观察

使用含氯霉素的 PDAC 和 YGC 选择培养基, 从蒙古族传统奶酒引子和发酵乳制品中分离纯化得到 40 株可培养真菌菌株。通过观察菌

落的形态、大小、颜色及质地等特征, 剔除重复菌株后, 筛选获得 26 株菌株(编号 J1-J26)。部分菌株菌落形态特征见表 3 和图 1。26 株菌株的菌落均呈圆形, 颜色为乳白色、米白色或淡黄色, 菌落凸起或微凸, 质地不透明; 多数菌株菌落大小适中、湿润黏稠、表面及边缘光滑整齐且易挑起, 部分菌株菌落体积较小、质地干燥, 上述特征均与酵母菌的典型菌落形态一致。同时, 以无菌生理盐水为空白对照进行平行培养, 未观察到任何菌落生长, 证实实验过程无杂菌污染, 保障了分离菌株的纯度。

### 2.2 奶酒专用酵母菌株的初筛

26 株菌株在 TTC 培养基上的显色情况如表 4

表3 部分分离菌株的菌落形态特征

Table 3 Colony morphology characteristics of partially isolated strains

Number	Colony shape	Colony smoothness	Colony margin	Colony texture	Colony colour	Colony size
J1	Round	Smooth	Uniform	Moist	Light yellow	Medium
J4	Round	Relatively smooth	Uniform	Relatively drier	Light yellow	Large
J8	Round	Smooth	Uniform	Moist	Milky white	Small
J12	Round	Smooth	Uniform	Relatively moist	Light yellow	Medium
J17	Round	Smooth	Uniform	Moist	Light yellow	Medium
J18	Round	Smooth	Uniform	Moist	Light yellow	Medium
J19	Round	Smooth	Uniform	Moist	Milky white	Small
J23	Round	Relatively smooth	Uniform	Relatively moist	Light yellow	Medium

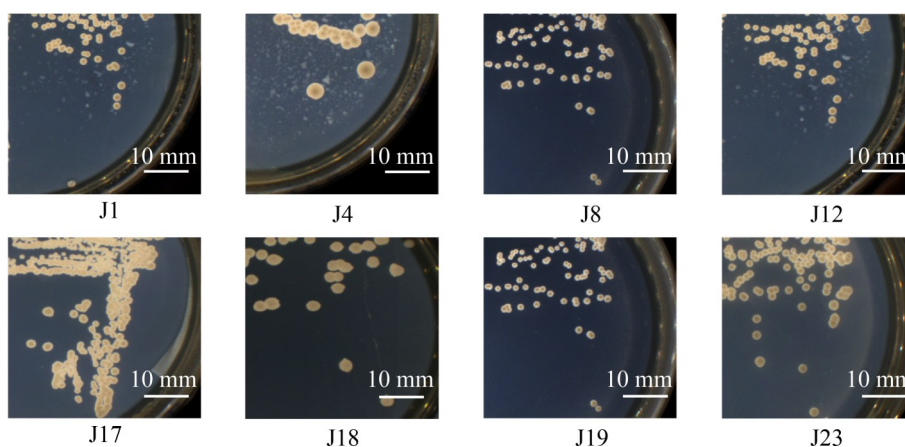


图1 部分菌株的菌落形态特征

Figure 1 Colony morphology characteristics of some strains.

表4 菌株产醇性能的测定结果

Table 4 Test results of alcohol production performance of strains

Number	Color reaction	Number	Color reaction	Number	Color reaction
J1	+	J10	++	J19	++
J2	++	J11	+++	J20	+
J3	++	J12	+++	J21	++
J4	++	J13	++	J22	+
J5	++	J14	++	J23	++
J6	++	J15	++	J24	+
J7	+++	J16	+++	J25	+
J8	+	J17	+++	J26	+
J9	++	J18	++		

+: Light red; ++: Red; +++: Dark red.

所示, 所有菌株均具有产醇能力。其中菌株 J1、J8、J20、J22、J24–J26 的菌落呈现浅红色, 表明这 7 株酵母菌的产醇能力较弱; 菌株 J2–J6、

J9、J10、J13–J15、J18、J19、J21、J23 的菌落呈现红色, 表明这 14 株酵母菌的产醇能力较好; 菌株 J7、J11、J12、J16 和 J17 的菌落呈现深红色, 表明这 5 株酵母菌的产醇能力强。

酯类化合物是构成酵母菌发酵液的主要风味物质, 所有菌株的产酯能力如表 5 所示。26 株酵母菌的透明圈直径(*D*)与菌落直径(*d*)的比值均大于 1.000, 表明所有菌株均具有产酯能力。J2、J4、J6、J13 和 J14 这 5 株菌的透明圈与菌落直径的比值小于 1.100, 表明其产酯性能较弱; 其余 21 株菌株透明圈与菌落直径的比值均大于 1.100, 其中菌株 J8、J10、J16、J17、J22、J23、J25 这 7 株菌的透明圈与菌落直径的比值大于 1.200, 显著高于其他 19 株菌株, 表明其具有较好的产酯性能, 有为奶酒富集香气物质、丰富

表5 菌株产酯性能的测定结果

Table 5 Test results of ester production performance of strains

Number	Average diameter of the colony ( <i>d</i> ) (mm)	Average diameter of the transparent ring ( <i>D</i> ) (mm)	<i>D/d</i>
J1	6.473±0.340g	7.280±0.296gklmnop	1.125±0.014lmnopqrst
J2	21.807±1.001bc	23.010±1.221abc	1.055±0.009z
J3	5.183±1.403ijkl	5.807±1.572ij	1.120±0.016mnopqrst
J4	13.440±0.547e	14.410±0.540e	1.072±0.008vwxyz
J5	7.343±0.721f	8.183±0.846f	1.114±0.025nopqrst
J6	15.017±0.581d	16.417±0.655d	1.087±0.009uvwxyz
J7	5.250±0.600ijkl	6.230±0.550hij	1.187±0.033ghijkl
J8	3.820±0.690l	4.610±0.646l	1.207±0.115defgh
J9	6.913±0.563g	7.867±0.709gklmnop	1.138±0.009opqrst
J10	5.707±0.345hijkl	7.267±0.350gklmnop	1.273±0.070bc
J11	5.103±0.381ijkl	6.077±0.265ij	1.191±0.041fghij
J12	5.003±0.405jkl	5.687±0.465ij	1.137±0.005opqrst
J13	22.270±4.573bc	23.520±4.606abc	1.056±0.012yz
J14	18.380±5.365c	19.323±5.515cde	1.051±0.005z
J15	23.130±5.071ab	25.453±5.571a	1.101±0.014pqrst
J16	5.660±0.269hijkl	7.613±0.270gklmnop	1.345±0.029a
J17	6.280±0.696g	7.937±0.547gklmnop	1.264±0.052bcd
J18	21.490±0.900bc	23.690±0.571abc	1.102±0.022pqrst
J19	17.043±1.641c	18.847±1.908cd	1.106±0.023nopqrst
J20	15.700±2.382d	17.477±3.065d	1.113±0.027nopqrst
J21	6.377±0.169g	7.603±0.165gklmnop	1.192±0.012fghij
J22	6.023±0.602g	7.473±0.661gklmnop	1.241±0.034cdefg
J23	15.093±3.104d	18.263±2.931cd	1.210±0.039defgh
J24	4.047±0.705l	4.793±0.460l	1.185±0.096ghijkl
J25	3.803±0.144l	4.580±0.270l	1.204±0.044defgh
J26	5.140±0.577jkl	6.073±0.561ij	1.182±0.037hijklm

Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

产品风味层次的潜力。其中, 菌株 J16 的  $D/d$  值最大, 为  $1.345 \pm 0.029$ , 表明其产酯能力最强。

用于奶酒酿造的酵母菌需要具备利用乳糖进行发酵的能力, 所有菌株对乳糖的利用能力如表 6 所示。26 株酵母菌均能在 YPL 培养基上生长, 表明所有菌株均能利用乳糖。其中菌株 J3、J7、J8、J10–J12、J16、J21、J22 生长圈直径  $< 3$  mm, 表明这 9 株酵母菌对乳糖的利用能力较弱; J1、J5、J9、J24–J26 生长圈直径介于 3–5 mm 之间, 表明这 6 株酵母菌对乳糖的利用能力较好; J2、J4、J6、J13–J15、J17–J20、J23 生长圈直径  $> 5$  mm, 表明这 11 株酵母菌对乳糖的利用能力强, 具有以牛奶为底物进行发酵的潜力。综上所述, 确定产醇能力、产酯能力以及乳糖利用能力均好的 8 株菌株 J1、J5、J9、J15、J17–J19、J23 进行复筛。

### 2.3 奶酒专用酵母菌株的复筛

酵母最适生长 pH 为 3.8–6.0, 但极少数用于酿酒发酵的酵母菌可以耐受 pH 3.0 以下的环境条件<sup>[26]</sup>。不同初始 pH 下 8 株菌株的相对存活率和结束培养时不同菌株培养液的 pH 值如图 2–3 所示。在 pH 为 3.5 的环境下, 8 株酵母菌的相对存活率大于 75%, 且菌株 J5 和 J9 的相对存活率大于 100%。该条件下结束培养时不同菌株培养液的 pH 值介于 2.8–3.3 之间, 菌株间差

表6 菌株对乳糖利用能力的测定结果

Table 6 Test results of lactose utilization by strains

Number	Lactose utilization	Number	Lactose utilization	Number	Lactose utilization
J1	++	J10	+	J19	+++
J2	+++	J11	+	J20	+++
J3	+	J12	+	J21	+
J4	+++	J13	+++	J22	+
J5	++	J14	+++	J23	+++
J6	+++	J15	+++	J24	++
J7	+	J16	+	J25	++
J8	+	J17	+++	J26	++
J9	++	J18	+++		

+: Growth circle diameter  $< 3$  mm; ++: Growth circle diameter of 3–5 mm; +++: Growth circle diameter  $> 5$  mm.

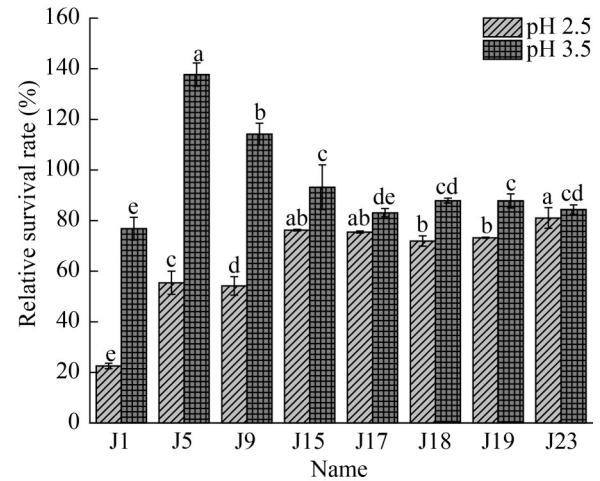
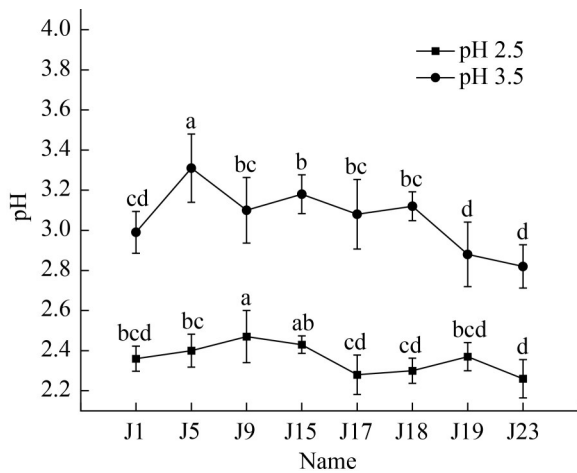


图2 不同初始pH下8株菌株的相对存活率

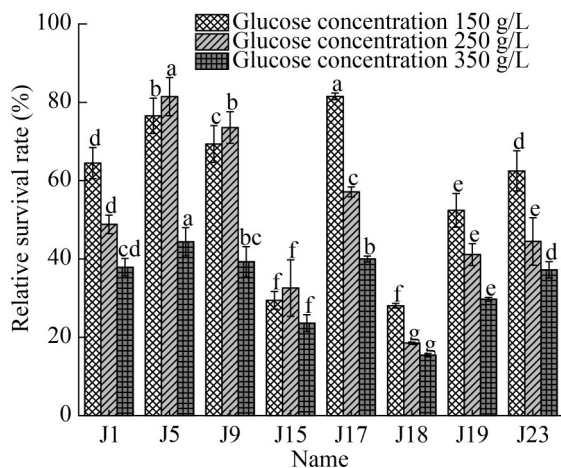
Figure 2 Relative survival rates of eight bacterial strains at different initial pH levels. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

异显著; 此条件下各组培养液整体 pH 值下降幅度大于 pH 2.5 组, 表明菌株在 pH 为 3.5 的环境中仍能维持稳定的代谢活动, 具有较好的适应能力。在 pH 为 2.5 的酸环境下, 各菌株的生长均受到不同程度的抑制作用, 且耐受性能呈现明显分化, 其中菌株 J1、J5 及 J9 的生长受到显著抑制, 其相对存活率小于 60%, 表现出较强的环境敏感性; 而菌株 J15、J17–J19 和 J23 的相对存活率高于 70%。该条件下结束培养时不同菌株培养液的 pH 值介于 2.2–2.4 之间, 菌株间差异较小; 各组整体 pH 值下降幅度显著低于 pH 3.5 组, 表明在低 pH 环境的胁迫下菌株的代谢活动受到抑制。其中, 菌株 J9 在结束培养时培养液 pH 值最高(2.4), J23 最低(2.2)。综上所述, 菌株 J15、J17–J19 和 J23 在 pH 为 2.5 的酸环境下具有较好的耐受性能。

细胞在高渗透压环境中会出现脱水的情况, 影响其功能的正常运转, 过高的葡萄糖质量浓度会导致环境中的渗透压升高, 从而影响菌株发酵能力<sup>[27]</sup>。不同初始葡萄糖质量浓度下 8 株菌株的相对存活率如图 4 所示。菌株 J1、J17、



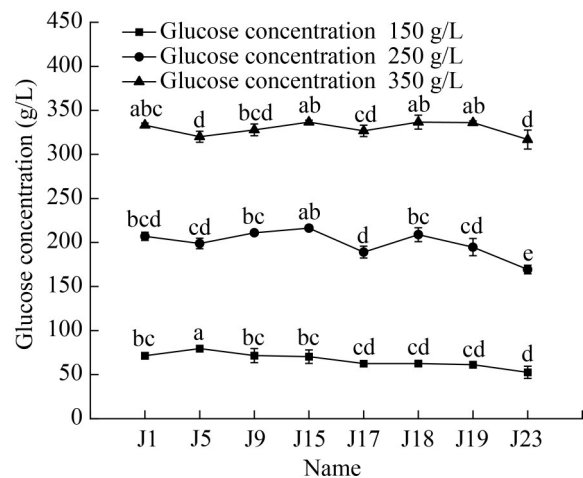
**图3** 结束培养时不同菌株培养液的pH值  
 Figure 3 pH values in the culture medium of different strains at the end of cultivation. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).



**图4** 不同初始葡萄糖质量浓度下8株菌株的相对存活率  
 Figure 4 Relative survival rates of eight strains at different initial glucose concentrations. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

J18、J19 和 J23 在初始葡萄糖质量浓度为 150 g/L 时的相对存活率达到最大，其中菌株 J17 相对存活率最大(81.51%)。随着初始葡萄糖质量浓度的递增，酵母菌的生长受到了明显的抑制，其相对存活率呈现下降趋势。当葡萄糖质量浓度为 250 g/L 时菌株 J1、J17、J19 及 J23 的相对存

活率高于 40.00%；当葡萄糖质量浓度提升至 350 g/L 时菌株 J1、J17 和 J23 的相对存活率仍可维持在 35.00% 以上。菌株 J5、J9 和 J15 在葡萄糖质量浓度为 250 g/L 时相对存活率达到最大，在葡萄糖质量浓度为 150–350 g/L 的范围内其相对存活率呈现先上升后下降的趋势，在 250 g/L 葡萄糖质量浓度时菌株 J5 相对存活率最大(81.45%)。当葡萄糖质量浓度为 350 g/L 时菌株 J5、J9 的相对存活率大于 30.00%。结束培养时不同菌株培养液的葡萄糖质量浓度如图 5 所示。结果表明，结束培养时不同菌株培养液的葡萄糖质量浓度随初始葡萄糖浓度的升高均呈上升趋势，各组培养液整体葡萄糖质量浓度下降幅度随初始浓度升高而逐渐变小，这一结果侧面印证了高糖环境下渗透压升高不仅抑制菌株生长繁殖，同时显著降低了菌株的发酵能力。其中，当葡萄糖质量浓度为 350 g/L 时菌株 J18 结束培养时培养液的葡萄糖含量最高(336.63 g/L)，菌株 J23 最低(316.89 g/L)。综上所述，菌株 J1、J5、J9、J17、J19 和 J23 在 150–350 g/L 葡萄糖质量浓度的范围内对高糖环境的耐受能力较好，



**图5** 结束培养时不同菌株培养液的葡萄糖质量浓度  
 Figure 5 The glucose concentration in the culture medium of different strains at the end of cultivation. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

表现出优良的耐糖性能。

不同初始乙醇质量浓度下 8 株菌株的相对存活率如图 6 所示。在乙醇质量浓度为 15.78 g/L 时所有菌株的相对存活率均最大。随着乙醇质量浓度的升高，酵母菌细胞的生长和发育受到抑制。当乙醇质量浓度升高至 31.56 g/L 时菌株 J1、J5、J9、J15、J17、J19 和 J23 的相对存活率大于 20.00%；当乙醇质量浓度升高至 47.34 g/L 时仅 J17 和 J23 的相对存活率大于 10.00%，J18、J19 生长几乎被完全抑制；当乙醇质量浓度升高至 63.12 g/L 及以上时所有菌株生长均被完全抑制。这表明 J17、J23 可耐受 47.34 g/L 的乙醇浓度，J1、J5、J9、J15 和 J19 的耐受上限为 31.56 g/L，其中 J17、J23 表现出优异的乙醇耐受性能。结束培养时不同菌株培养液的乙醇质量浓度如图 7 所示。结果表明，在结束培养时不同菌株培养液的乙醇质量浓度随初始乙醇质量浓度的梯度提升呈同步上升趋势，且菌株间的乙醇代谢利用差异在不同浓度梯度下表现出明显分化。其中 15.78、31.56、47.34 g/L 浓度

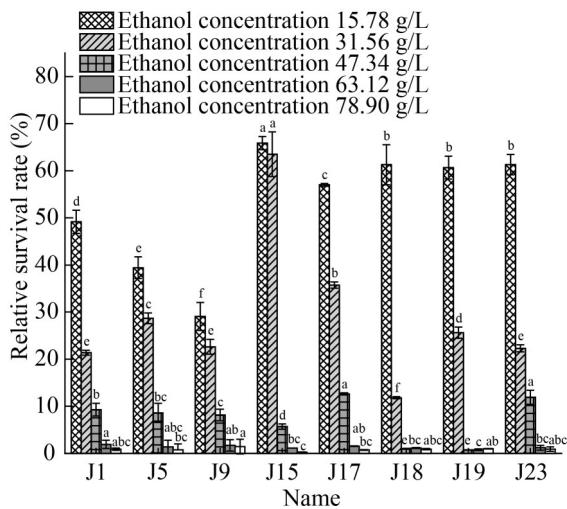


图6 不同初始乙醇质量浓度下8株菌株的相对存活率

Figure 6 Relative survival rate of eight strains at different initial ethanol concentrations. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

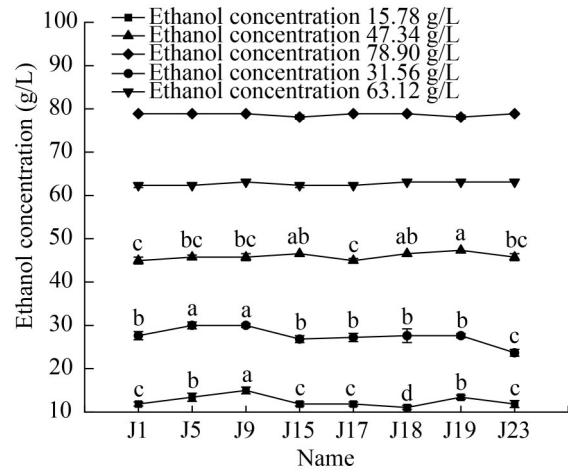


图7 结束培养时不同菌株培养液的乙醇质量浓度  
Figure 7 Ethanol concentration in culture media of different strains at the end of cultivation. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

组在结束培养时不同菌株培养液间的乙醇质量浓度存在显著性差异，而 63.12 g/L、78.90 g/L 浓度组在结束培养时不同菌株培养液间的乙醇质量浓度差异则大幅缩小且无显著性差异。这是由于在高乙醇胁迫环境中，菌株通过调整代谢策略来缓解胁迫压力，即减少内源乙醇的生成，同时利用外源乙醇作为碳源与能源，导致体系乙醇浓度下降。培养结束后，不同菌株培养液的乙醇质量浓度普遍低于初始值，J17、J23 等耐受菌株的乙醇消耗更为明显，证实其可通过代谢利用外源乙醇的方式增强其耐受能力。综上所述，菌株 J17、J23 的乙醇耐受上限可达 47.34 g/L，J1、J5、J9、J15 和 J19 的乙醇耐受上限为 31.56 g/L，其中 J17 和 J23 表现出更为优异的乙醇耐受性能。

综上所述，菌株 J15、J17、J18、J19 和 J23 对酸性环境具有较好的耐受性能；菌株 J1、J5、J9、J17 和 J23 对高糖环境具有较好的耐受性能；菌株 J17 和 J23 具有较好的耐乙醇性能。因此最终得到 2 株对酸、糖以及乙醇耐受性均良好的菌株 J17 和 J23。

### 2.4 菌株鉴定

基于发酵菌株的 ITS 序列进行同源比对分析<sup>[28]</sup>, 结果如表 7 所示。发现菌株 J17 与马克思克鲁维酵母(OM570589.1)相似性最高, 相似性 $\geq 99\%$ ; 菌株 J23 与库德里阿兹威氏毕赤酵母(KX376253.1)亲缘关系最近, 相似性 $\geq 99\%$ 。使用 MEGA 11 软件构建系统发育树(图 8), 结合菌株形态学特征, 最终将菌株 J17 鉴定为马克思克鲁维酵母, 菌株 J23 则鉴定为库德里阿兹威氏毕赤酵母。

### 2.5 生长曲线

为了解各菌株的生长特性, 进行了生长曲线的测定<sup>[29]</sup>。如图 9 所示, 在 20 h 内 2 株菌的  $OD_{600}$  值随着培养时间的延长而不断升高, 并逐

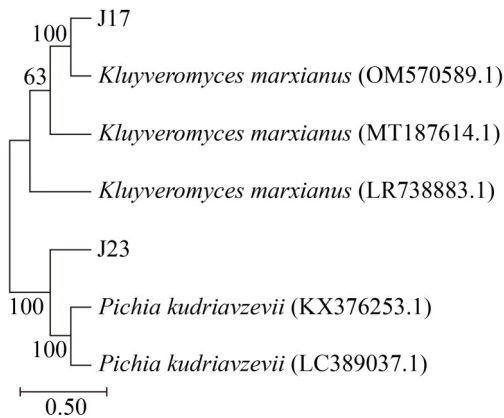


图8 系统发育树

Figure 8 Phylogenetic tree. The phylogenetic tree was constructed using the adjacency method. The numbers on the branches represent bootstrap support values, and the scale bar (0.50) indicates evolutionary distance. The numbers in parentheses are gene accession numbers.

表7 BLAST同源比对分析

Table 7 Homology comparison of BLAST

Number	Similarity	Name of the most similar strain	The gene accession number of the most similar strain
J17	$\geq 99\%$	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	OM570589.1
J23	$\geq 99\%$	<i>Pichia kudriavzevii</i>	KX376253.1

渐趋于平稳。马克思克鲁维酵母 J17 在 0–4 h 为延滞期, 4 h 后进入对数生长期, 随后在第 12 h 进入稳定期。库德里阿兹威氏毕赤酵母 J23 在 0–4 h 为延滞期, 同样在 4 h 后进入对数生长期, 但在第 18 h 时才进入稳定期, 表明 2 株酵母菌的生长特性之间存在差异。

### 2.6 菌株间拮抗性

平板对峙试验通常用于研究菌株间相互作用, 可了解菌株间是否发生拮抗、共生等相互作用<sup>[30-31]</sup>。通过平板对峙试验对 2 株酵母菌 J17 和 J23 的菌株间相互作用进行了观察, 结果如图 10 所示。马克思克鲁维酵母 J17 与库德里阿兹威氏毕赤酵母 J23 接触处无清晰可见抑菌圈, 交界处无覆盖, 表明菌株 J17 和 J23 之间可以共同利用空间和营养成分, 未发生生长空间挤占和营养争夺, 体现出 2 株菌株之间可以共存, 相容性良好。

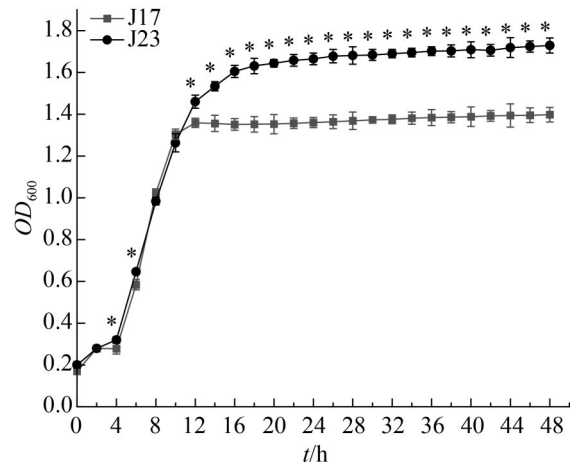


图9 两株菌的生长曲线

Figure 9 Growth curves of two strains. \*:  $P < 0.05$ .



图10 平板对峙结果

Figure 10 Plate stand-off results.

## 2.7 碳源利用能力

碳源可以为酵母菌提供能量，因酵母菌种类不同而最适利用的碳源也不同<sup>[32-33]</sup>。2株酵母对不同碳源的利用能力如图11所示。结果表明，2株菌株均可利用包括果糖、木糖、乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和可溶性淀粉在内的7种测试碳源，能较好地适应不同环境，碳源利用范围广。2株菌在葡萄糖培养基中的 $OD_{600}$ 值均为所有碳源中最高，表明葡萄糖是其最优碳源；且J23的 $OD_{600}$ 值最高(1.6)，表明J23对葡萄糖的利用效率较高，相比J17具有较强的葡萄糖发酵能力。当碳源为乳糖时，菌株J17和J23在乳糖培养基中的 $OD_{600}$ 值仅次于其在葡萄糖培养基中的数值，表明2株菌具有较强的乳糖发酵能力。当碳源为果糖、木糖、麦芽糖、蔗糖及可溶性淀粉时，2株菌在相应的碳源培养基中的 $OD_{600}$ 值小于0.8，表明2株菌对这些碳源的利用能力较弱。

表8 两株酵母菌对4种抗生素的敏感性检测结果

Table 8 Susceptibility test results of two yeast strains to four antibiotics

Number	Fluconazole (25 µg/tablet)	Voriconazole (1 µg/tablet)	Amphotericin B (10 µg/tablet)	Itraconazole (50 µg/tablet)
J17	33.720±0.953 (S)	33.597±0.422 (S)	7.983±0.189 (R)	20.803±0.095 (S)
J23	12.410±0.819 (I)	15.977±0.818 (S)	10.177±0.936 (I)	19.023±0.808 (S)

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant.

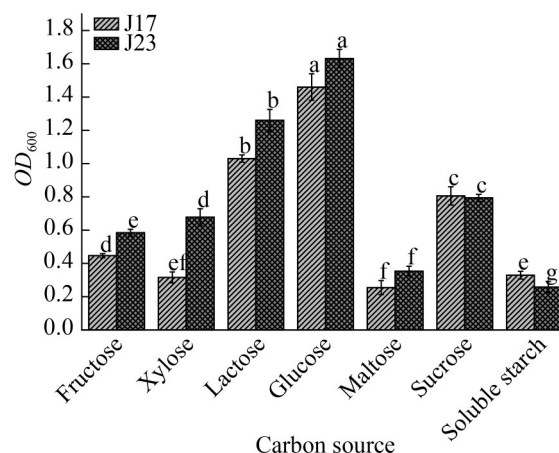


图11 碳源利用能力

Figure 11 Carbon source utilization capacity. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

## 2.8 生物安全性

抗生素敏感性试验结果如表8所示。菌株J17对两性霉素B表现耐药，对氟康唑、伏立康唑和伊曲康唑均表现敏感。菌株J23对于氟康唑和两性霉素B表现中介，对伏立康唑和伊曲康唑均表现出敏感性。菌株J17和J23的抗生素敏感性存在差异，这可能是由于不同酵母菌对各类抗生素的敏感性存在种间差别所导致。

根据溶血圈颜色可将溶血性分为 $\alpha$ 溶血和 $\beta$ 溶血，其特点是前者菌落周围有草绿色溶血圈，对人体致病力弱；后者菌落周围出现透明溶血圈，对人体致病力强；若无溶血圈出现则无溶血性，为 $\gamma$ 溶血，对人体无致病力<sup>[34-35]</sup>。菌株溶血性检测结果见表9。以金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)为阳性对照，该菌株菌落周围出现透明溶血圈，

表9 两株酵母菌的溶血活性

Table 9 Hemolytic activity of two yeast strains

Number	$\alpha$ hemolysis	$\beta$ hemolysis	$\gamma$ hemolysis
ATCC 25923	-	+	-
J17	-	-	+
J23	-	-	+

-: Negative; +: Positive.

属于  $\beta$  型溶血；筛选获得的 2 株酵母菌株的菌落周围均未出现溶血圈，无溶血性表现。溶血性是病原菌的重要致病特征，上述结果表明筛选得到的 2 株酵母菌不具备溶血相关的致病特性，提示其对人体无致病力，具备作为食品发酵菌株的安全性基础。

## 2.9 电子鼻分析

为更好地分析不同发酵菌株在发酵时的风味贡献，以未接菌的牛奶为对照(CK)，设置 J17 单菌发酵组(J17)、J23 单菌发酵组(J23)、J17 与 J23 以 1:1 混菌发酵组(HJ 组)，采集了 4 组样品第 85-89 s 的特征响应值并绘制雷达图。如图 12 所示，电子鼻响应雷达图直观地表征了不同样品之间的风味轮廓差异。4 组样品风味物质在电子鼻 10 个传感器上响应值各不相同，总体而言，电子鼻数据在 W1S (S6)、W1W (S7)、W2S (S8)、W2W (S9)、W5S (S2) 这 5 种传感器的响应值高于其他 5 种传感器，且 W1S (S6) 传感器响应值最高，表明 CK 组与不同实验组所发酵的样品所含的风味物质在烷烃类化合物、硫化物、

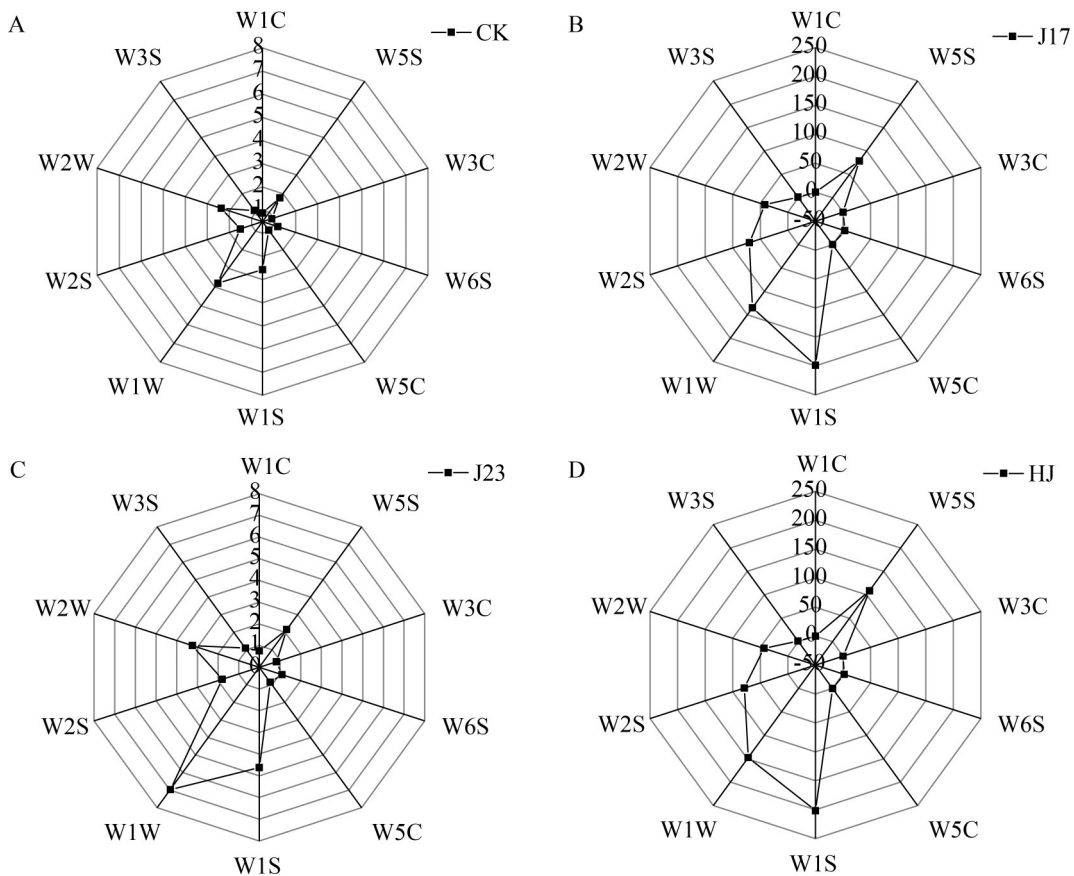


图12 电子鼻响应雷达图

Figure 12 Electronic nose response radar chart. A, B, C and D represent the electronic nose response radar charts of the CK, J17, J23, and HJ experimental groups, respectively.

醇类、醛酮类、芳香类物质以及氮氧化合物上含量丰富。进一步分析可知,混菌(HJ)组样品在上述 5 种高响应传感器上的响应值均高于其他 4 组,表明其烷烃类化合物、无机硫化物、醇类、芳香类物质、有机硫化物、氮氧化合物、萜烯类化合物含量较高, J17 组在 5 种传感器上的响应值仅次于混菌(HJ)组,提示其醇类物质、烷烃类化合物、有机硫化物等物质含量也较为丰富。同时也提示,与单菌发酵相比,混菌发酵可以生成更多的风味物质。CK 组在 10 个传感器上响应值显著低于 J17、J23 与混菌(HJ) 3 组样品,揭示了通过菌株筛选可以有效提升底物所蕴含的风味物质。

为进一步确定发酵菌株之间风味的差异,通过主成分分析(PCA)对电子鼻数据进行统计分析,其区分结果如图 13A 所示。前 2 个主成分(PC1-PC2)累计贡献率为 99.97%,其中第一主成分 PC1 贡献率 98.95% 和第二主成分 PC2 贡献率 1.02%,代表电子鼻所采集到的关于 CK 组和不同菌株发酵样品的信息几乎能反映其全部挥发性信息。由图 13A 可知,在第一主成分上 J17 和混菌(HJ)发酵的样品与 CK 样品之间的差异明显, J17 与混菌(HJ)样品在 PC1 右侧部分重叠,说明其风味相似且化合物浓度较高,与雷达图中对应传感器上的响应值较高的趋势一致。

J23 发酵的样品与 CK 样品之间的重叠面积较大,且均分布在 PC1 左侧,说明其风味相似且化合物浓度较低。

同时基于主成分分析(PCA)框架开展传感器载荷分析,量化各传感器对样品风味区分的贡献权重,载荷值绝对值越高的传感器所对应敏感物质对样品风味的驱动作用越显著。如图 13B 所示,不同菌株发酵产生气味上的差异主要集中在 W1S (S6)、W1W (S7)、W5S (S2)、W2S (S8)和 W2W (S9)这些传感器所对应的风味成分上,即烷烃类化合物、硫化物、醇类、醛酮类、芳香类物质以及氮氧化合物,该特征与电子鼻传感器阵列的多目标检测特性一致

LDA 分析更注重样品在空间中的分布状态及样品之间的距离分析。4 组样品的电子鼻响应值线性判别分析(LDA)结果如图 14 所示。判别式 LDA1 和 LDA2 的贡献率分别为 99.84% 和 0.13%,总贡献率为 99.97%。随着第一主成分的逐渐增加,第二主成分变化规律为上下波动,各组样品位置之间有一定距离,没有相互重叠交叉,可以明显分辨不同发酵菌株所发酵的样品以及对对照组之间的差异性。与 PCA 分析相比,使用 LDA 线性判断分析能够有效区分出所有样品,为了解不同发酵菌株风味物质之间的差异提供了另一种视角。

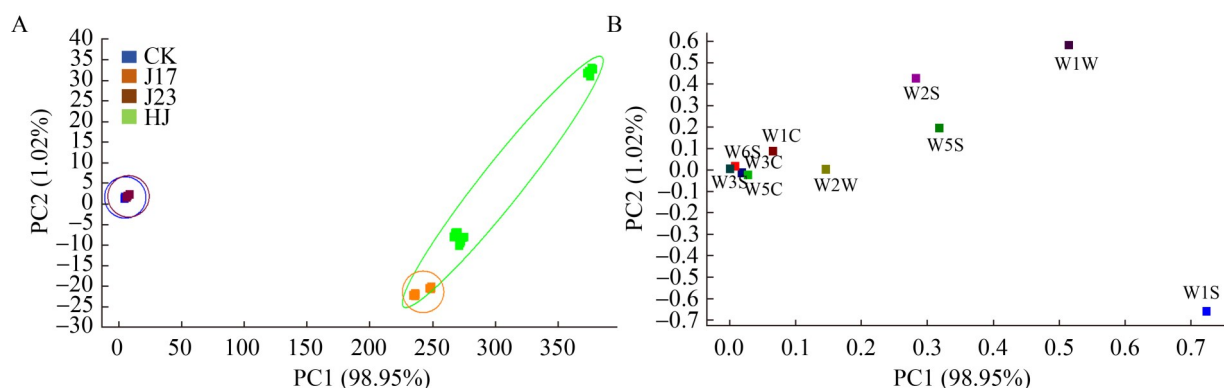
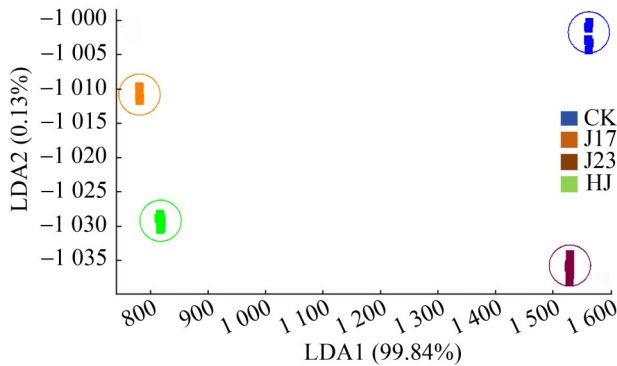


图13 风味物质主成分分析(PCA)和传感器载荷分析图

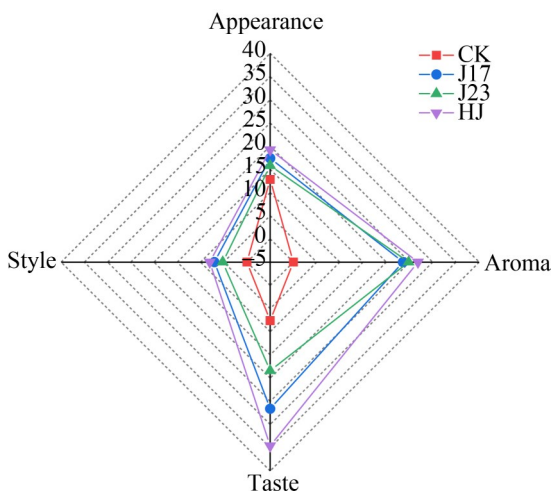
Figure 13 Principal component analysis (PCA) and sensor load analysis of flavor compounds. A: PCA; B: Load analysis diagram.



**图14 风味物质线性判别分析(LDA)图**  
Figure 14 Linear discriminant analysis (LDA) of flavor compounds.

### 2.10 感官评价实验

以未接菌的牛奶为对照(CK), 设置 J17 单菌发酵组(J17)、J23 单菌发酵组(J23)、J17 与 J23 以 1:1 混菌发酵组(HJ), 各组样品的感官评价投票结果如图 15 所示。感官评价结果显示, J17、J23 单菌组与混菌(HJ)组样品在外观、香气、口感和风格 4 个维度的评分均显著高于 CK 组, 其中混菌(HJ)发酵的样品在所有评价维度的投票结果均为最优, 表明菌株的添加可有效改善发酵底物的感官品质, 且混菌发酵对奶酒感官品质

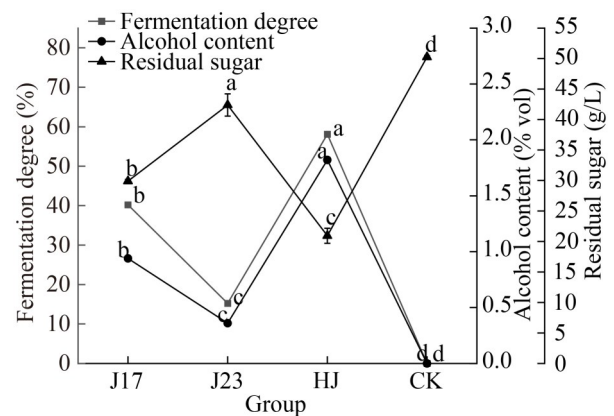


**图15 不同样品的感官评价投票结果**  
Figure 15 Results of sensory evaluation voting for different samples.

的提升效果优于单菌发酵。

为进一步了解发酵菌株之间的代谢差异对奶酒品质的影响, 测定了不同样品结束发酵时的发酵度、酒精度和残糖如图 16 所示。结果表明, CK 组因无有效代谢转化, 其发酵度与酒精度近乎为 0, 残糖含量为所有组别中最高 (50.25 g/L), 与初始乳糖含量无显著差异; 而 J17、J23 单菌与混菌(HJ)发酵的样品则均表现出显著的发酵活性, 其中混菌(HJ)组呈现最高的酒精度与发酵度, 且残糖水平最低, J17、J23 单菌组的各项发酵参数则处于中间水平。这一结果说明, J17、J23 单菌发酵与二者混菌发酵均能利用底物糖分生成乙醇, 且混菌发酵通过菌株间的协同代谢, 进一步提高糖代谢效率与乙醇生成能力。

综上所述, CK 组因无发酵代谢过程, 感官品质最差; 单菌和混菌发酵组通过有效的发酵代谢, 感官评分较 CK 组显著提升; 其中混菌(HJ)发酵组具备的发酵代谢优势与 4 个评价维度的投票结果相对应, 进一步验证了混菌发酵对奶酒感官品质的提升效果显著优于单菌发酵。



**图16 不同样品结束发酵时的发酵度、酒精度和残糖**

Figure 16 Fermentation degree, alcohol content, and residual sugar at the end of fermentation for different samples. Different lowercase letters indicate significant differences between experimental groups ( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

### 3.1 发酵菌株筛选与生物学特性

已有研究显示, TTC 能与酵母菌代谢产生的乙醇脱氢酶生成红色甲臍物质, 产醇能力与菌落红色深浅呈正相关<sup>[36]</sup>; 酯酶可催化三丁酸甘油酯水解为甘油和丁酸, 使菌落周围形成透明圈, 透明圈与菌落直径比值越大, 产酯性能越强<sup>[37-38]</sup>。同时碳源作为酵母代谢的能量来源与物质骨架, 其利用能力的大小直接决定风味前体物质的种类与丰度。Hoffmann 等<sup>[39]</sup>报道, 乳糖作为乳基质的主要碳源, 经马克思克鲁维酵母分泌的乳糖酶分解为葡萄糖与半乳糖后, 不仅可通过糖酵解途径生成乙醇, 还能转化为丙酮酸、乙酰辅酶 A 等中间产物, 为酯类(如乙酸乙酯、乳酸乙酯)的合成提供酰基供体。因此, 针对奶酒发酵的原料特性与风味形成需求, 本研究聚焦于具有优良产醇、产酯能力及乳糖利用能力的菌株, 并将其作为后续筛选的菌株基础。

咎立峰等<sup>[40]</sup>研究指出, 葡萄糖等碳源经有氧与无氧呼吸代谢产生乳酸、柠檬酸等有机酸, 致使培养体系 pH 下降, 从而影响酵母菌存活; Kieliszek 等<sup>[41]</sup>与 Wang 等<sup>[42]</sup>证实, 高糖高渗环境可通过渗透压差导致酵母细胞脱水, 进而引发细胞体积缩小与膜结构损伤, 干扰其正常功能; Abdulkadir 等<sup>[43]</sup>和 Li 等<sup>[44]</sup>报道, 乙醇作为酵母菌发酵主要副产物, 高浓度乙醇会抑制菌株活力, 降低发酵效果, 而耐乙醇能力强的菌株可使底物发酵更完全, 产物酒精度更高。因此, 这些菌株在奶酒发酵前后形成的低 pH 酸性环境、高渗透压及高乙醇胁迫条件下的耐受性能与发酵表现仍需进一步探究。据 de Moura 等<sup>[45]</sup>、Frousnoon 等<sup>[46]</sup>与 Mukherjee 等<sup>[47]</sup>研究, 大部分非酿酒酵母(如克鲁维酵母与毕赤酵母)不能耐受强酸、高渗透压以及高乙醇环境, 其生长通常会被极端环境强烈抑制。本研究所得的马克思克鲁维酵母 J17 与库德里阿兹威氏毕赤酵

母 J23 可耐受 pH 2.5、葡萄糖质量浓度 350 g/L 与乙醇质量浓度 47.34 g/L 的极端环境, 并在此条件下具有一定的发酵代谢活力, 展现出对极端环境的优良适应性。

生长曲线是探究酵母菌生长特性的核心方法, 通过记录细胞浓度随培养时间的变化, 可直观、量化地呈现其生长规律<sup>[48]</sup>。Tufariello 等<sup>[49]</sup>发现较短的延滞期能让菌株快速适应发酵基质; 迅速进入对数期则可快速启动代谢活动, 并将发酵基质转化为乙醇、乳酸、乙酸等基础风味物质; 随后在稳定期持续进行酶促反应生产次级风味物质(如酯类、萜烯类、呋喃类等)。平板对峙试验通过观察共培养时菌株生长状态差异, 可明确微生物菌株间的兼容性; 碳源利用试验则能系统明确菌株的碳源利用能力及适配范围, 为混菌体系中碳源的转化及代谢产物是否互补提供关键依据<sup>[50]</sup>。此外, 葛旭萌<sup>[51]</sup>研究指出克鲁维酵母作为公认的乳源性发酵酵母可以利用乳糖进行发酵, 但其产乙醇能力通常较低。王德培等<sup>[52]</sup>则发现毕赤酵母多集中于谷物和水果基质的功能食品开发, 具备较好的产香产醇能力, 但对乳糖、阿拉伯糖等其他碳源的利用能力较低。本研究所得的 2 株酵母菌(马克思克鲁维酵母 J17 与库德里阿兹威氏毕赤酵母 J23), 其生长速率适中; 菌株间未表现出拮抗效应, 相容性良好, 可以进行协同发酵。2 株菌株均可利用所有供试碳源, 其中乳糖为二者共有的优势碳源, 表明其具有以牛奶为基质进行混菌发酵并产香产醇的潜力。

### 3.2 发酵菌株风味贡献评价

在发酵微生物领域中, 研究菌株代谢合成的酯类、醇类等挥发性风味物质对发酵产品风味品质的调控始终是该领域的重点关注内容。近年来, 随着非酿酒酵母研究的不断深入, 其通过合成酯类、醇类等香气物质赋予酒体独特风味轮廓的功能被广泛证实<sup>[53]</sup>。例如, 黄远航等<sup>[54]</sup>发现, 季也蒙迈耶氏酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*)、美极梅奇酵母 (*Metshnikowia*

*pulcherrima*)与耐热拉钱斯氏酵母(*Lachancea waltii*)等非酿酒酵母菌株不仅具备酒精发酵能力, 还可通过参与复杂风味物质的生物合成过程显著提升酒体香气品质。此外, 不同种属的酵母之间进行混合发酵也已成为提升酒体香气复杂度与丰富度的研究热点。Duarte 等<sup>[55]</sup>研究证实, 毕赤酵母与酿酒酵母进行混合发酵可显著增加甘蔗酒中风味物质的种类与含量, 同时改善其感官品质。同样地, Liu 等<sup>[56]</sup>也发现, 在酒精发酵过程中同步接种戴尔有孢圆酵母(*Torulasporea delbrueckii*), 可有效提高发酵产物中酯类、醇类及萜类等挥发性化合物的积累量。本研究中, 对照(CK)组在电子鼻 10 个传感器上的响应值均低于 J17、J23 及混菌(HJ)组, 表明菌株筛选可有效提升底物中的风味物质; 其中混菌(HJ)组在 W1S (S6)、W1W (S7)、W2S (S8)、W2W (S9)、W5S (S2)等传感器上响应值最高, 提示混菌发酵可合成更丰富的风味物质, 且主要涉及烷烃类、醇类、芳香类、有机硫化物、氮氧化合物及萜烯类等挥发性成分。进一步分析表明, 混菌发酵体系(HJ 组)可通过马克思克鲁维酵母 J17 与库德里阿兹威氏毕赤酵母 J23 形成代谢互补效应, 实现了风味品质的协同提升。其中, 马克思克鲁维酵母 J17 可将原料中的乳糖降解为葡萄糖, 而库德里阿兹威氏毕赤酵母 J23 能够同时利用葡萄糖与乳糖进行发酵代谢, 不仅显著提高了原料中碳源的利用率, 还优化了发酵产物中乙醇与挥发性风味物质的组成比例及含量丰度, 最终实现奶酒感官品质的定向改善。该结果与 Assad 等<sup>[57]</sup>的研究结论一致, 即酵母混菌发酵可拓展挥发性化合物的谱图范围, 进而改善食品的感官特性。

## 4 结论

本研究以菌株的乳糖利用能力、产醇产酯能力、环境耐受性及生物安全性为核心筛选指标, 从新疆自然发酵的蒙古族传统奶酒酿造所用引子及传统酸奶中分离纯化得到 2 株

酵母菌。其菌落呈乳白色、圆形且表面湿润, 具有典型酵母形态。经分子生物学鉴定, 这 2 株菌分别为马克思克鲁维酵母和库德里阿兹威氏毕赤酵母。2 株菌均表现出良好的生长性能, 菌株间相容性佳; 可利用包括葡萄糖、乳糖、蔗糖在内的 7 种测试碳源, 碳源利用范围广泛; 且均通过生物安全性测试, 安全性良好。通过电子鼻分析与感官评价实验, 结果显示 J17 单菌、J23 单菌及 1:1 混菌(HJ)发酵奶酒的风味均显著优于未接菌对照(CK), 其中混菌(HJ)组对烷烃、硫化物、醇类及醛酮类物质的传感器响应值最高; PCA 累计贡献率与 LDA 累计判别率均达 99.97%; 在外观、香气、口感和风格 4 个维度的评分均高于其他组合, 表明通过菌株筛选与混菌协同发酵可丰富底物中的风味物质种类与含量。本研究筛选所得的 2 株发酵菌株具有生长速率适中、安全性高、极端环境耐受性强及风味贡献显著等优良特性, 通过进一步驯化并对奶酒发酵工艺进行优化, 有望成为优质的奶酒酿造菌种资源。

## 作者贡献声明

马琪: 样品采集, 实验设计与操作, 数据收集和处理, 论文撰写; 王嘉佑: 数据收集和处理; 曾军: 实验设计和指导; 霍向东: 参与实验设计; 热孜古丽·库尔班: 实验设计与操作; 孙建: 参与实验指导; 高雁: 论文写作指导与修改, 实验设计和指导。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 塔鸽塔. 察哈尔奶酒习俗探析[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2013.  
Ta GT. Analysis of Chahar wine custom[D]. Hohhot: Inner Mongolia Normal University, 2013 (in Chinese).
- [2] 孙金旭. 蒸馏型乳酒的研究[J]. 衡水学院学报, 2008,

- 10(1): 81-83.  
Sun JX. A study of distillation of koumiss[J]. Journal of Hengshui University, 2008, 10(1): 81-83 (in Chinese).
- [3] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 奶酒: GB/T 23546—2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, standardization administration of the people's republic of China. Milk wine: GB/T 23546—2009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [4] 翟燕, 陈有君. 奶酒的类型生产工艺及其营养价值[J]. 农产品加工·学刊, 2007(7): 68-70.  
Zhai Y, Chen YJ. Production craft and nutritional value milk wine type[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2007(7): 68-70 (in Chinese).
- [5] 申慧杰, 辛博, 罗红霞, 贾红亮, 林少华. 奶酒功效探究与展望[J]. 中国乳业, 2018(8): 76-78.
- [6] Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 377.
- [7] 张巧云. 豆酱中微生物多样性及人工接种多菌种发酵豆酱的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.  
Zhang QY. Microbial diversity analysis on soybean paste and research on fermentation using multi-strains via artificial inoculation[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [8] 如意. 酸马奶发酵剂菌株筛选及其发酵特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.  
Ru Y. Screening of starter culture for koumiss processing and study on its fermentation characteristics[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [9] 齐英杰, 郑楠, 王加启, 张养东. 乳糖在生乳中的降解机制及其降解产物对生乳品质的影响研究进展[J]. 动物营养学报, 2024, 36(6): 3491-3499.  
Qi YJ, Zheng N, Wang JQ, Zhang YD. Research progress on degradation mechanism of lactose in raw milk and effects of its degradation products on raw milk quality[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(6): 3491-3499 (in Chinese).
- [10] Varela JA, Puricelli M, Ortiz-Merino RA, Giacomobono R, Braun-Galleani S, Wolfe KH, Morrissey JP. Origin of lactose fermentation in *Kluyveromyces lactis* by interspecies transfer of a neo-functionalized gene cluster during domestication[J]. Current Biology, 2019, 29(24): 4284-4290.e2.
- [11] Domingues L, Guimarães PMR, Oliveira C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation[J]. Bioengineered Bugs, 2010, 1(3): 164-171.
- [12] 王飞, 王晓宇, 赵擎豪, 赵超凡, 刘炎, 杜国荣, 赵鹏涛. 果酒增香酿造技术研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(13): 244-252.  
Wang F, Wang XY, Zhao QH, Zhao YF, Liu Y, Du GR, Zhao PT. Research progress on aroma-enhancing techniques for fruit wine brewing: a review[J]. Food Science, 2023, 44(13): 244-252 (in Chinese).
- [13] Ruiz J, Kiene F, Belda I, Fracassetti D, Marquina D, Navascués E, Calderón F, Benito A, Rauhut D, Santos A, Benito S. Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(18): 7425-7450.
- [14] 李旋, 亓桂梅, 王超萍. 非酿酒酵母在葡萄酒生产中的作用及研究进展[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2019(1): 52-56.  
Li X, Qi GM, Wang CP. Research progresses and function of non-*Saccharomyces cerevisiae* in wine production[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2019(1): 52-56 (in Chinese).
- [15] 沈贺彬, 张春, 荀雯, 黄鹭强. 发酵果蔬汁挥发性风味物质影响因素研究[J]. 中国果菜, 2023, 43(11): 10-15, 24.  
Shen HB, Zhang C, Xun W, Huang LQ. Research on influence factors of volatile flavor substance from fermented fruit-vegetable juice[J]. China Fruit & Vegetable, 2023, 43(11): 10-15, 24 (in Chinese).
- [16] Yang B, Liu SJ, Zang HW, Dai YW, Zhang SF, Lin XP, Liang HP, Chen YX. Flavor profile and quality of strawberry wine are improved through sequential fermentation with indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Bioscience, 2024, 59: 104021.
- [17] 王春晓, 俞俊竹, 周文亚, 许引虎. 非酿酒酵母属酵母的葡萄酒发酵应用研究进展[J]. 中国农业科学, 2023, 56(3): 529-548.  
Wang CX, Yu JZ, Zhou WY, Xu YH. Research progress on the application of non-*Saccharomyces* during wine fermentation[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(3): 529-548 (in Chinese).
- [18] 胡曼. 优质奶啤乳源酵母菌的筛选及其活性干粉制备的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.  
Hu M. Screening of high quality dairy yeast for milk beer producing and studies on active dry yeast preparation[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017 (in Chinese).
- [19] 唐睿, 吴涛, 王贵芳, 张雨, 程玉成, 江晓, 布海丽且姆·阿卜杜热合曼. 慕萨莱思发酵过程中真菌菌群多样性分析及优良酿酒酵母的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2025, 44(4): 120-126.  
Tang R, Wu T, Wang GF, Zhang Y, Cheng YC, Jiang X, Buhailiqiem A. Analysis of fungal community diversity during the fermentation process of Musalesi and screening and identification of superior *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Brewing, 2025, 44(4): 120-126 (in Chinese).
- [20] 赵雪平, 温雅娇, 李正英, 郑海武, 黄海英, 李晓娟. 内蒙古乌海地区沙漠葡萄发酵醪液中酿酒酵母菌的筛选与鉴定[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(5): 164-170.  
Zhao XP, Wen YJ, Li ZY, Zheng HW, Huang HY, Li XJ. Screening and identification of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation mash of desert grape in Wuhai area of Inner Mongolia[J]. Food Research and Development, 2020, 41(5): 164-170 (in Chinese).
- [21] 高茜. 传统酸马奶中乳酸菌与酵母的共生关系及其在马乳发酵中的应用[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2021.  
Gao Q. The symbiotic relationship between lactic acid bacteria and yeast in traditional horse milk and its application in horse milk fermentation[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2021 (in

- Chinese).
- [22] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 101-103.  
Wei JC. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 101-103 (in Chinese).
- [23] 杨奕凡, 高雁, 刘亚男, 霍向东, 娄恺, 关波, 陈开旭, 曾军. 甘草渣发酵产非淀粉多糖酶菌株筛选及产酶的动态变化[J]. 新疆农业科学, 2024, 61(11): 2733-2741.  
Yang YF, Gao Y, Liu YN, Huo XD, Lou K, Guan B, Chen KX, Zeng J. Screening of strains producing non-starch polysaccharide enzyme by fermentation of licorice residue and its dynamic changes[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2024, 61(11): 2733-2741 (in Chinese).
- [24] 勉小娟, 任怡卓, 杜雪倩, 王国琴, 郑蕊, 余君伟, 岳思君. 宁夏枸杞鲜果内生酵母菌的筛选及其发酵性能[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(23): 186-193.  
Mian XJ, Ren YZ, Du XQ, Wang GQ, Zheng R, Yu JW, Yue SJ. Screening and fermentation performance of endophytic yeasts from fresh *Lycium barbarum* fruit in Ningxia[J]. Food Research and Development, 2024, 45(23): 186-193 (in Chinese).
- [25] 胡金丽, 高庆超, 扎西巴藏, 曹效海, 王树林. 黑果枸杞酵素中乳酸菌和酵母菌的分离鉴定和安全性评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8207-8213.  
Hu JL, Gao QC, Zhaxiba Z, Cao XH, Wang SL. Identification and safety evaluation of lactic acid bacteria and yeast in *Lycium ruthenicum* Murr. jiaosu[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(20): 8207-8213 (in Chinese).
- [26] Dzialo MC, Park R, Steensels J, Lievens B, Verstrepen KJ. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(Supp\_1): S95-S128.
- [27] 冯文倩, 王倩, 刘延琳, 宋育阳, 姜娇, 伍新宇, 秦义. 低产乙醇本土有孢汉逊酵母的筛选及酿造特性[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(21): 9-17.  
Feng WQ, Wang Q, Liu YL, Song YY, Jiang J, Wu XY, Qin Y. Screening and oenological properties of *Hanseniaspora* strains with low ethanol yield[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(21): 9-17 (in Chinese).
- [28] 丁长河, 万浩威, 魏书音, 樊星, 樊朵朵. 中高温大曲产酯香酵母的筛选及产香特性分析[J]. 中国酿造, 2025, 44(4): 33-40.  
Ding CH, Wan HW, Wei SY, Fan X, Fan DD. Screening and aroma-producing characteristics of ester aroma-producing yeast from medium-and high-temperature Daqu[J]. China Brewing, 2025, 44(4): 33-40 (in Chinese).
- [29] 张杰, 党斌, 杨希娟. 西藏灵菇中2株产胞外多糖单胞酿酒酵母菌发酵性能及其发酵乳的流变学特性[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 87-91.  
Zhang J, Dang B, Yang XJ. Comparative analysis of fermentability and rheological properties of two strains of exopolysaccharide-producing *Kazachstania unispora* from Xizang kefir[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(1): 87-91 (in Chinese).
- [30] 汤华成. 开菲尔中半乳糖霉菌的分离鉴定及其与开菲尔杆菌相互作用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.  
Tang HC. Research on kefir galactose in mold isolation and identification and open field *Lactobacillus* interaction[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [31] Stubbusch AKM, Peaudecerf FJ, Lee KS, Paoli L, Schwartzman J, Stocker R, Basler M, Schubert OT, Ackermann M, Magnabosco C, D'Souza GG. Antagonism as a foraging strategy in microbial communities[J]. Science, 2025, 388(6752): 1214-1217.
- [32] 巩丽莉, 周迪, 卢玲, 张众, 张军翔, 王岚. 贺兰山东麓优良本土酿酒酵母筛选及发酵特性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 4021-4044.  
Gong LL, Zhou D, Lu L, Zhang Z, Zhang JX, Wang L. Screening and fermentation of excellent indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from eastern foothills of Helan Mountains[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 4021-4044 (in Chinese).
- [33] 秦立芹, 殷欢, 成柳洁, 龚艺, 丁泽, 李秀婷, 范光森. 一株高产己酸乙酯酵母菌株的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(1): 55-61.  
Qin LQ, Yin H, Cheng LJ, Gong Y, Ding Z, Li XT, Fan GS. A yeast isolate with high yield of ethyl caproate: Screening, identification and fermentation optimization[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(1): 55-61 (in Chinese).
- [34] 王靓贤, 贾邬, 李科先, 冉苒, 康燕山, 高林瑞. 酿酒酵母及马克斯克鲁维酵母生理特性及应用研究[J]. 云南农业科技, 2023(3): 11-16.  
Wang JX, Jia M, Li KX, Ran R, Kang YS, Gao LR. Study on physiological characteristics and application of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*[J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2023(3): 11-16 (in Chinese).
- [35] 张金萍. 西藏传统发酵食品微生物资源调查、筛选及其在青稞酒中的应用[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2024.  
Zhang JP. Investigation and screening of microbial resources of traditional fermented food in Xizang and its application in highland barley wine[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2024 (in Chinese).
- [36] 王犁辉, 陈新军, 卢丕超, 刘维兵, 高飞, 马珊, 张颖, 武运. 紫外诱变选育高产乙醇及酸的酿酒酵母[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 104-108.  
Wang LY, Chen XJ, Lu PC, Liu WB, Gao F, Ma S, Zhang Y, Wu Y. Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* with high-yield alcohol and acid by ultraviolet mutation[J]. China Brewing, 2019, 38(1): 104-108 (in Chinese).
- [37] 唐雨杰, 王祖文, 赵品瑶, 赵位, 柳佳芸, 袁华伟. 青脆李野生酵母菌的筛选鉴定与耐受性研究[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(13): 117-125.  
Tang YJ, Wang ZW, Zhao PY, Zhao W, Liu JY, Yuan HW. Screening, identification, and tolerance of wild yeast strains isolated from green crisp plum[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(13): 117-125 (in Chinese).
- [38] 彭东, 蒋雪薇, 陈幽, 陈进, 张伟, 周慧, 吴灿, 方勤军. 高盐稀态酱醪中耐盐生香酵母的筛选及生香特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(13): 76-84.  
Peng D, Jiang XW, Chen Y, Chen J, Zhang W, Zhou H, Wu C, Fang QJ. Screening and aroma-producing

- characteristics of salt-tolerant aroma-producing yeasts from high-salt liquid-state Moromi[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(13): 76-84 (in Chinese).
- [39] Hoffmann A, Franz A, Walther T, Löser C. Utilization of delactosed whey permeate for the synthesis of ethyl acetate with *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(5/6): 1635-1648.
- [40] 咎立峰, 杨香瑜, 陈江魁, 殷春燕. 黑枣果酒发酵过程主要成分变化规律及香气成分分析[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(2): 12-17.  
Zan LF, Yang XY, Chen JK, Yin CY. Analysis of chemical ingredients changes and aroma components in fermentation process of date plum fruit wine[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(2): 12-17 (in Chinese).
- [41] Kieliszek M. The phenomenon of anhydrobiosis: structural and functional changes in yeast cells[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2025, 109: 152.
- [42] Wang HX, Tang JQ, Lv JY, Wang XZ, Sun HM. Physiological and transcriptomic insights into sugar stress resistance in osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. *Food Microbiology*, 2024, 117: 104395.
- [43] Abdulkadir M, Dabai AI, Rabah AB, Fardami AY, Charles AO. Isolation and screening of ethanol-tolerant yeast from palm wine for potential use as a starter culture in ethanol production[J]. *Asian Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2025, 10(1): 106-114.
- [44] Li YF, Ding PP, Tang XY, Zhu WL, Huang MZ, Kang M, Liu XZ. Screening and oenological property analysis of ethanol-tolerant non-*Saccharomyces* yeasts isolated from *Rosa roxburghii* Tratt. [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1202440.
- [45] De Moura Ferreira MA, da Silveira FA, da Silveira WB. Ethanol stress responses in *Kluyveromyces marxianus*: current knowledge and perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(4): 1341-1353.
- [46] Frousnoon TB, Pham NN, Wu ZY, Hsieh PH, Yoshikuni Y. Comparison of stress tolerance mechanisms between *Saccharomyces cerevisiae* and the multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2025, 25: foaf024.
- [47] Mukherjee V, Radecka D, Aerts G, Verstrepen KJ, Lievens B, Thevelein JM. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 216.
- [48] Wahid E, Ocheja OB, Guaragnella N, Guaragnella C. A matlab-based application for quantification of yeast cell growth on solid media[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2024, 21(212): 20230695.
- [49] Tufariello M, Fragasso M, Pico J, Panighel A, Castellari SD, Flamini R, Grieco F. Influence of non-*Saccharomyces* on wine chemistry: a focus on aroma-related compounds[J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 644.
- [50] Shemesh P, Fishman A. Optimal fermentation conditions for growth and recombinant protein production in *Pichia pastoris*: strain selection, ploidy level and carbon source[J]. *Current Research in Food Science*, 2024, 9: 100840.
- [51] 葛旭萌. 自絮凝酵母颗粒在线表征与发酵过程动力学[D]. 大连: 大连理工大学, 2005.  
Ge XM. On-line characterization of self-flocculating yeast cell flocs and ethanol fermentation kinetics[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2005 (in Chinese).
- [52] 王德培, 胡阳, 焦富. 库德里阿兹威氏毕赤酵母在发酵工业中的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2021(6): 95-101.  
Wang DP, Hu Y, Jiao F. Research progress in the application of *Pichia kudriavzevii* in industrial fermentation[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2021(6): 95-101 (in Chinese).
- [53] Muñoz-Castells R, Modesti M, Moreno-García J, Catini A, Capuano R, Di Natale C, Bellincontro A, Moreno J. Application of an electronic nose to the prediction of odorant series in wines obtained with *Saccharomyces* or non-*Saccharomyces* yeast strains[J]. *Molecules*, 2025, 30(7): 1584.
- [54] 黄远航, 张秋月, 熊智, 沈欣, 罗太美, 韩龙. 酸木瓜果酒用非酿酒酵母筛选、鉴定及发酵特性研究[J]. *中国酿造*, 2026, 45(1): 196-203.  
Huang YH, Zhang QY, Xiong Z, Shen X, Luo TM, Han L. Screening, identification and fermentation characteristics of non-*Saccharomyces cerevisiae* for *Chaenomeles sinensis* fruit wine[J]. *China Brewing*, 2026, 45(1): 196-203 (in Chinese).
- [55] Duarte WF, Amorim JC, Schwan RF. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(1): 175-194.
- [56] Liu JJ, Wan Y, Chen YR, Fan HW, Li MX, Jiang QH, Fu GM. Evaluation of the effect of *Torulaspota delbrueckii* on important volatile compounds in navel orange original brandy using E-nose combined with HS-SPME-GC-MS[J]. *Food Chemistry*, 2024, 453: 139625.
- [57] Assad M, Ashaolu TJ, Khalifa I, Baky MH, Farag MA. Dissecting the role of microorganisms in tea production of different fermentation levels: a multifaceted review of their action mechanisms, quality attributes and future perspectives[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(10): 265.