

新疆地区酸马奶中酵母菌的鉴定及其生物多样性分析

倪慧娟,包秋华,孙天松,陈霞,张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

摘 要: 从新疆少数民族牧民家庭采集的 28 份传统工艺酿造酸马奶样品中分离出 87 株酵母菌,并对其进行了生理生化鉴定、分子生物学鉴定和生物多样性分析。生化试验结果表明,新疆地区酸马奶中的酵母菌为 *Saccharomyces unisporus* (占总分离株的 48.3%), *Kluyveromyces marxianus* (27.6%), *Pichia membranaefaciens* (15.0%) 和 *Saccharomyces cerevisiae* (9.2%)。选取其中的 6 株酵母菌和 1 株参考菌株,进行大亚基(26S)rDNA D1/D2 区域(600bp 左右)碱基序列分析,并通过 GenBank 进行同源序列搜索以确定各菌株的归属,进一步验证生理生化方法的正确性。从得到的结果中可以看出,*S. unisporus* 和 *K. marxianus* 为新疆地区酸马奶中的优势菌。

关键词: 酸马奶;酵母菌;生化鉴定;D1/D2;生物多样性

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)04-0578-05

酸马奶(Koumiss)是由鲜马奶经乳酸菌和酵母菌等微生物自然发酵制成的酸性低酒精含量乳饮品。在传统的蒙医学中,它可与蒙药结合用于结核病、胃肠道疾病以及心血管疾病的治疗,是具有蒙古族特色的保健饮品^[1,2]。现代医学也证实了酸马奶具有降血压、抑制结核菌生长^[3,4]的疗效。

酸马奶中的嗜热乳杆菌和酵母菌在其发酵过程中起着至关重要的作用,与它的许多生物活性和医疗保健作用密切相关。它们不仅能抵抗发酵过程中有害菌的污染,而且在代谢过程中能产生抗菌物质并促进维生素 B₁、B₂ 和 B₁₂ 的合成^[5]。目前对酸马奶中的乳酸菌已经有了广泛而深入的研究,其中也发现了一些具有益生潜质的优良菌株^[6,7]。但是对酸马奶中酵母菌的鉴定一直停留在属的水平上,缺乏更进一步的数据来支持对乳酸菌与酵母菌相互作用形成酸马奶过程的研究。由于所有酵母菌种的 26S rDNA D1/D2 区域序列均已公布,从理论上讲,根据其 D1/D2 区域序列就可以鉴定到种^[8]。本试验在进行了大量生理生化试验的基础上,选取代表菌株进行序列分析,试图通过两种方法的对比,摸索精确且快速的鉴定方法。新疆地区少数民族牧民制作酸马奶有悠久的历史和丰富的经验。酸马奶自然发酵过程中形成的微生物类群受多种因素影响,使用传统方法在长期自然选择中保留下来的发酵菌种,

利于进行微生物多样性分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 28 份样品均采自新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克族自治州、博尔塔拉蒙古自治州和巴音郭勒蒙古自治州不同地区用传统工艺酿造酸马奶的哈萨克族和蒙古族牧民家庭。

1.1.2 菌株来源 试验所用菌株为样品中分离出的 87 株酵母菌。参考菌株 *Kluyveromyces marxianus* AS2.1549、*Kluyveromyces lactis* AS2.1494、*Candida kefyr* AS2.68 购自中国科学院微生物研究所; *Saccharomyces cerevisiae* CICC1621、*Hansenula anomala* CICC1637 购自内蒙古轻工研究所。

1.1.3 试剂和仪器 梯度基因扩增仪 PTC-200 购自美国 MJ 公司,凝胶成像分析系统 CDS8000 购自美国 UVP 公司,引物 NL1 和 NL4 由北京奥科生物工程有限责任公司合成,质粒载体 pMD-19 购自 TaKaRa 公司。

1.2 培养基与培养条件

分离使用 PDA(Potato Dextrose Agar)合成培养基,常规培养使用 YPD(Yeast extract Peptone Dextrose)培养基,生理生化试验使用氮源基础培养基、碳源基础培养基、无维生素基础培养基、糖发酵基础培养

基金项目 国家自然科学基金项目(30660135 30560097)教育部春晖计划(Z2004-2-15009)

* 通讯作者。Tel 86-471-4319940, Fax 86-471-4300122, E-mail: hepingdd@vip.sina.com

作者简介:倪慧娟(1980-),女,内蒙古呼和浩特人,博士研究生,主要从事微生物分子生物学方面的研究。E-mail: nini_2001.lucky@tom.com

其他作者:孟和毕力格,王俊国,于洁

收稿日期:2006-11-08;接受日期:2007-01-05;修回日期:2007-03-01

基、Gorodkova 培养基和脲酶培养基,培养基的配制参考文献[9,10]。接种后置于25℃温箱培养。

1.3 酵母菌的分离

将样品涂布于酸化 PDA 培养基,培养 2d 后选取单个菌落观察、编号、划线并保存。

1.4 酵母菌的生化鉴定

待测菌株活化 3 代后,制成 10^6 cfu/mL 左右的供试菌悬液,按文献[9,10]的方法进行生理生化试验。

1.5 26S rDNA D1/D2 区域 PCR 扩增

提取代表菌株 C6-3, C7-2, D3-1, D3-2, E6-4, E7-1 和参考菌株 AS2.1494 基因组,方法参照文献[11]。酵母菌 26S rDNA D1/D2 区域的扩增引物 NL1 和 NL4^[12]为 NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'。采用 25 μ L 反应体系进行 PCR 扩增,扩增条件:94℃ 1min, 53.5℃ 1min, 72℃ 2min, 36 个循环, 72℃ 延伸 10min。取 5 μ L 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 26S rDNA D1/D2 区域的克隆

将 PCR 产物与质粒载体 pMD-19 连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。使用快速提质粒法初步筛选重组子,PCR 检测重组子,将阳性克隆菌邮寄到上海生物工程公司测序。

2 结果和讨论

2.1 酵母菌的生理生化鉴定

表 1 为对 87 株酵母菌进行生理生化试验结果。参考文献[9,10] 87 株酵母菌经检索归为 4 个种,其中 *S. unisporus* 42 株、*K. marxianus* 24 株、*P. membranaefaciens* 13 株和 *S. cerevisiae* 8 株。

2.2 26S rDNA D1/D2 区域 PCR 检测

扩增产物经电泳检测出现 600bp 荧光条带,与预期结果一致(图 1)。

2.3 重组质粒的筛选

转化菌质粒大于 pUC19 的初步定为阳性克隆菌,它们的质粒经 PCR 扩增后,产物大约在 700bp 左右的进一步确定其为阳性克隆菌。

2.4 26S rDNA D1/D2 区域序列比较分析

将 26S rDNA D1/D2 区域序列在 GenBank 中进行同源序列搜索,结果发现:C6-3 与 *P. galeiformis* ESAB5(AJ749826)有 100% 的相似性;C7-2 与 *S. cerevisiae*(AJ746340)有 99.84% 的相似性;D3-1 与 *K. marxianus* UWFP-208(AF335978)有 100% 的相似性;D3-2 与 *S. unisporus* NRRL Y-1556(AY048158)有

100% 的相似性;E6-4 与 *P. membranaefaciens* (AJ511348)有 98.67% 的相似性;E7-1 与 *P. fermentans* VTT C-04567(DQ377652)有 99.67% 的相似性,参考菌株 AS2.1494 与 *K. lactis* NRRL Y-1140 (CR382124)有 100% 的相似性。

表 1 新疆酸马奶中分离的酵母菌的生理特性

Table 1 Physiological characteristics of the yeasts isolated from Koumiss collected in Xinjiang

Characteristic	1	2	3	4
Fermentation of :				
Glucose	42/42	24/24	6/13	8/8
Galactose	41/42	24/24	0/13	8/8
Lactose	0/42	24/24	0/13	0/8
Sucrose	0/42	24/24	0/13	2/8
Maltose	0/42	0/24	0/13	6/8
Assimilation of :				
Glucose	42/42	24/24	13/13	8/8
Maltose	1/42	1/24	0/13	5/8
Lactose	0/42	24/24	1/13	0/8
Galactose	42/42	24/24	0/13	7/8
Sucrose	0/42	24/24	1/13	3/8
D-Arabinose	0/42	0/24	0/13	0/8
Citric	0/42	1/24	0/13	0/8
Melibiose	0/42	0/24	0/13	0/8
Raffinose	3/42	22/24	1/13	2/8
Melezitose	1/42	0/24	2/13	2/8
Mannitol	0/42	7/24	0/13	0/8
Erythritol	0/42	0/24	1/13	0/8
Cellobiose	0/42	3/24	0/13	0/8
Succinic acid ;	10/42	17/24	3/13	1/8
Lactic acid	3/42	18/24	9/13	4/8
Alcohol ;	12/42	8/2	9/13	5/8
Ammonium sulfate	42/42	24/24	13/13	8/8
Nitrite	0/42	0/24	0/13	0/8
Nitricum	1/42	3/24	0/13	0/8
L-lysine	13/42	20/24	13/13	0/8
Cadaverine	41/42	19/24	13/13	0/8
Growth :				
Without vitamins	2/42	0/24	13/13	0/8
Without thiamin	8/42	20/24	13/13	1/8
Without pyridoxol	11/42	19/24	13/13	2/8
Without niacin	3/42	2/24	13/13	2/8
At 30℃	42/42	24/24	13/13	8/8
At 37℃	15/42	24/24	13/13	8/8
At 42℃	2/42	24/24	5/13	8/8
On 50% D-Glucose	0/42	0/24	0/13	0/8
On 60% D-Glucose	0/42	0/24	0/13	0/8
In 100ppm cycloheximide	37/42	24/24	0/13	0/8
In 1000ppm cycloheximide	13/42	10/24	0/13	0/8
Hydrolysis of urea	0/42	0/24	0/13	0/8

1. *Saccharomyces unisporus*; 2. *Kluyveromyces marxianus*; 3. *Pichia membranaefaciens*; 4. *Saccharomyces cerevisiae*; - / - implies positive strains/ negative strains.

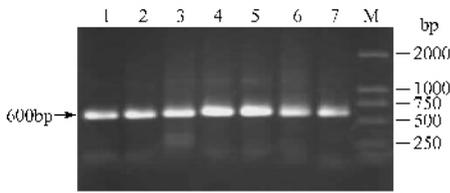


图1 26S rDNA D1/D2 区域的 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Amplification production of the D1/D2 domain sequences. 1. C6-3 2. C7-2 ;3. D3-1 ;4. D3-2 ;5. E6-4 ;6. E7-1 ;7. AS2.1494 ;M. DL2000 Markers.

为显示供试菌株与已知酵母菌株之间的亲缘关系及其系统地位,根据同源序列搜索结果下载相关菌种的 D1/D2 区域序列,用 Clustal X 软件进行校准,并用 Neighbor-Joining 分析方法进行分析。该系统发育树经过 1000 次 Bootstrap 检验,结果见图 2。

2.5 酸马奶中酵母菌的地区分布特点

从新疆 5 个采样区域分离到酵母菌的数量及其

表 2 新疆不同地区酸马奶中酵母菌分离株数量

Table 2 Numbers of the isolated strains in koumiss in different parts of Xinjiang

Name of the isolated strains	Locality of sampling					Σ_1	$\Sigma_1/87\%$
	B	C	D	E	F		
<i>Saccharomyces unisporus</i>	5	10	13	6	8	42	48.3%
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6	5	4	8	1	24	27.6%
<i>Pichia membranaefaciens</i>	-	2	3	6	2	13	15.0%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	6	-	-	1	8	9.2%
Σ_2	12	23	20	20	12	87	100%

B:Wusu of Yili hasaka Autonomous Prefecture ;C:Nileke of Yili hasaka Autonomous Prefecture ;D:Sailimu lake of Boetala Mongolia Autonomous Prefecture ;E:Xinyuan of Yili hasaka Autonomous Prefecture ;F:Babanrigaole Mongolia Autonomous Prefecture. Σ_1 is the number of isolated strains in different groups ; Σ_2 is the number of isolated strains in different places.

3 讨论

由于同一菌种内不同菌株间碱基差异不大于 1% 根据比对结果可以鉴定 C6-3 为 *P. galeiformis* (生化结果为 *P. membranaefaciens*) ;C7-2 为 *S. cerevisiae* (生化结果为 *S. cerevisiae*) ;D3-1 为 *K. marxianus* (生化结果为 *K. marxianus*) ;D3-2 为 *S. unisporus* (生化结果为 *S. unisporus*) ;E7-1 为 *P. fermentans* (生化结果为 *P. membranaefaciens*)。由于 E6-4 与 *P. membranaefaciens* (生化结果为 *P. membranaefaciens*) 的碱基差异大于 1%,故仅根据 D1/D2 同源序列比对无法确定其归属。对比两种鉴定方法可发现,生化实验结果与分子试验结果基本一致。区别在对毕赤氏酵母的分类,同源序列比对可得到更加精确的结果。但同时也可看到,这种方法对数据库的依赖性较强,有时还需要其他的方法作为补充。本文是国内首次对马奶酒这种传统发酵饮料中的酵母菌分类进行系统的研究,为以后的进一步深入研究奠定了良好的基础。

鉴定结果见表 2。由表 2 可知,尽管从菌株总数上来看 *S. unisporus* (占总分离株的 48.3%) 具有绝对优势,但当不同采样区域的自然环境、制作方法、采样时间存在差异时,这种优势并不明显。在伊犁哈萨克族自治州乌苏市巴音沟卡(B)采集的 4 份样品中,共分离出 6 株 *K. marxianus*、5 株 *S. unisporus* 和 1 株 *S. cerevisiae*,优势菌株为 *K. marxianus*。在从伊犁哈萨克族自治州新源县那拉提高山草原(E)采集的 7 份样品中,共分离出 8 株 *K. marxianus*、6 株 *S. unisporus* 和 6 株 *P. membranaefaciens* (*P. membranaefaciens* 集中出现在 2 个样品中),优势菌株仍为 *K. marxianus*。只有在伊犁哈萨克族自治州尼勒克县唐布拉牧场(C)、博尔塔拉蒙古自治州赛里木湖牧场(D)和巴半日高勒蒙古自治州巴音布鲁克(F)这 3 个区域优势菌株为 *S. unisporus*。

Khrianfova^[13]在对酸马奶的研究中发现其微生物群包括乳糖发酵酵母、非乳糖发酵酵母和非糖发酵酵母 3 种主要型。有报道^[14]称,在传统酸马奶中 *Saccharomyces*、*Kluyveromyces* 和 *Candida* 在其发酵过程中起着特殊的作用,与它特有的营养价值和医疗保健功能有关。Montanari^[15]在对来自不同地区的 94 份酸马奶样品进行了酵母菌分离鉴定后,发现多数样品中含有 *S. unisporus*,并且它的数量随海拔位置的提高而增加,是传统酸马奶酒精发酵的主要微生物之一。还有日本学者 Ishii 等^[16]报道,他们从中国内蒙古的酸马奶样品中分离到 *K. marxianus* 和 *C. kefir* 等 20 株乳糖发酵酵母。

本研究从新疆 5 个地区共采集到 28 份酸马奶样品,从中分离出 87 株酵母菌。这些菌株经鉴定分别归为 4 个种,其中 *S. unisporus* 42 株, *K. marxianus* 24 株, *P. membranaefaciens* 13 株, *S. cerevisiae* 8 株。我们的试验表明,新疆地区酸马奶中酵母菌的优势菌为 *S. unisporus* (48.3%) 和 *K.*

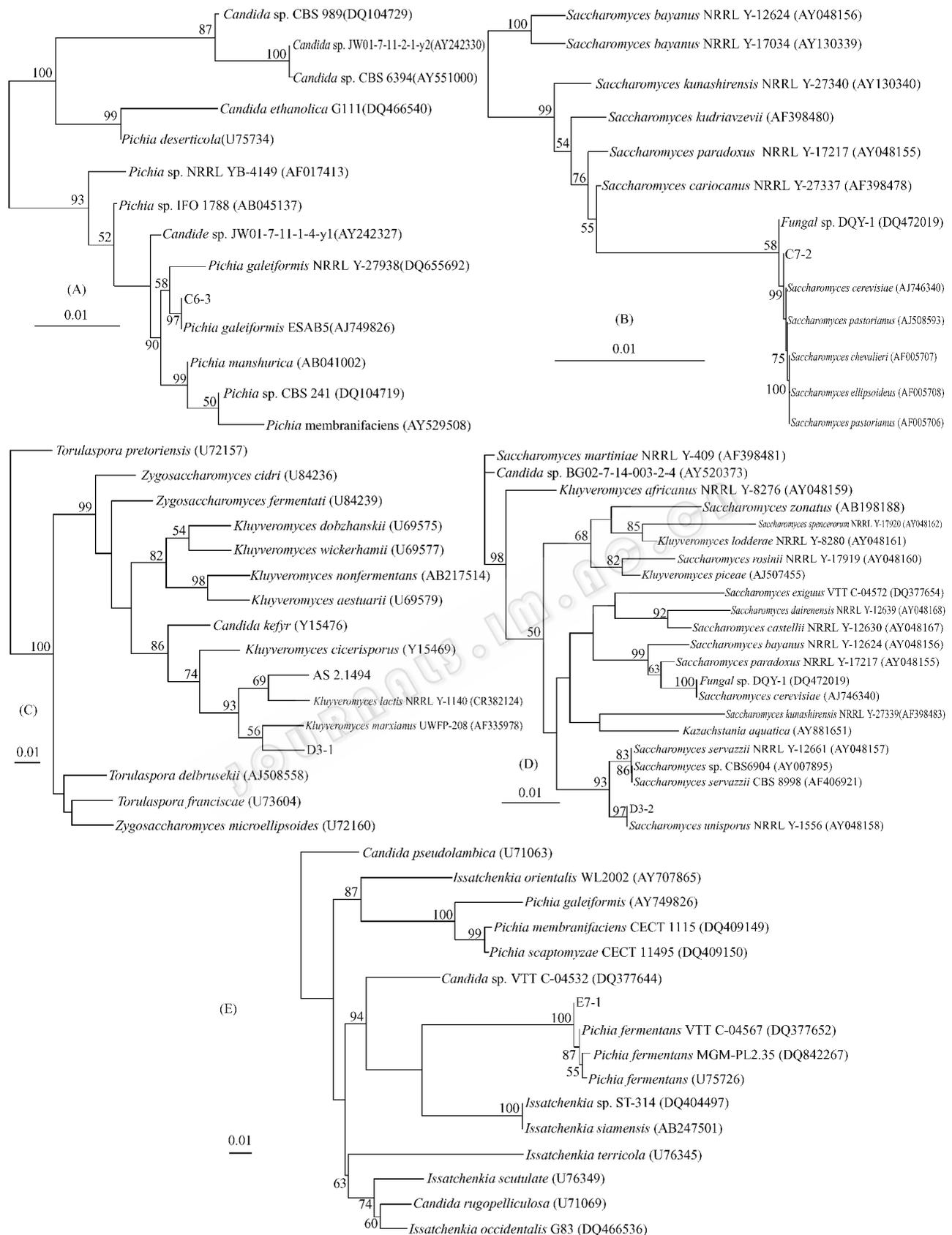


图2 根据26S rDNA D1/D2区域序列绘制系统树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequence alignment. A :C6-3 ;B :C7-2 ;C :D3-1 ;AS2.1494 ;D :D3-2 ;E :E7-1 .

All of the bootstrap percentages over 50% are shown. Bar 0.01 sequence divergence.

参 考 文 献

- [1] 哈斯苏荣. 酸马奶及其医学价值. 中国中药杂志, 2003, 28 (1): 11 - 14.
- [2] 关加怀. 马奶及马奶酒的医疗作用. 中国畜牧与食品, 1998, 5(2): 87 - 88.
- [3] 乌·扎木苏. 酸马奶疗法. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1986.
- [4] 孙惠平, 彭恭嘉. 马奶脂抑制结核分支杆菌生长的体外试验观察. 实用医技杂志, 2003, 10(10): 1123 - 1124.
- [5] Jakobsen M. Yeasts and their beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 1996, 6(8): 755 - 768.
- [6] 张和平, 孟和毕力格, 王俊国, 等. 分离自内蒙古传统发酵酸马奶中 *L. casei* Zhang 潜在益生特性的研究. 中国乳品工业, 2006, 34(4): 4 - 10.
- [7] 托娅, 苏雅勒玛, 张和平. 乳杆菌 *Lcasei* Zhang 对小鼠血清中细胞因子水平的影响. 食品科学, 2006, 27(11): 488 - 491.
- [8] 毛志群, 张伟, 马雯. 分子生物学技术在酵母菌分类中的应用与发展. 河北农大学学报, 2002, 25(5): 230 - 233.
- [9] Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. 酵母菌的特征与鉴定手册. 胡瑞卿译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [10] Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4th eds. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- [11] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类意义. 菌物系统, 2002, 21(1): 27 - 32.
- [12] 陆惠中, 王起明, 贾建华, 等. 秦岭地区子囊菌酵母物种多样性研究. 菌物学报, 2004, 23(2): 183 - 187.
- [13] Khrisanfova LP. Antimicrobial properties of Koumiss from cow and mare milk. *Moloch Prom*, 1969, 30(10): 16 - 19.
- [14] Quan S, Burentegusi, Yu B. Microflora in traditional starter cultures for fermented milk, hurunge, from Inner Mongolia, China. *Animal Science Journal*, 2006, 77(2): 235 - 241.
- [15] Montanari G, Zambonellil C, Grazia L, et al. *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganism of traditional koumiss. *Journal of Dairy Research*, 1996, 63(2): 327 - 331.
- [16] Ishii S, Kikuchi M, Takao S. Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts from "Chigo" in Inner Mongolia, China. *China Animal Science and Technology*, 1997, 68(3): 325 - 329.

Identification and biodiversity of yeasts isolated from Koumiss in Xinjiang of China

NI Hui-juan, BAO Qiu-hua, SUN Tian-song, CHEN Xia, ZHANG He-ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract : A total of 87 yeast strains were isolated from 28 home-made koumiss samples, a traditional fermented mare milk product in Xinjiang of China. The isolates were identified by standard physiological and biochemical tests and analysis of the large-subunit (26S) rDNA gene D1/D2 domain sequences. They are proved to be *Saccharomyces unisporus* (48.3% of the isolates), *Kluyveromyces marxianus* (27.6%) and *Pichia membranaefaciens* (15.0%), *Saccharomyces cerevisiae* (9.2%). Among them, six isolates and a standard yeast strain were selected for analysis of D1/D2 domain sequences. They are indicated as *S. unisporus*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *P. fermentans*, *P. galeiformis* and the standard yeast strain is indicated as *K. lactis* (100%). The results obtained demonstrate the value of using analysis of D1/D2 domain sequences methods, in conjunction with the traditional taxonomic methods based on phenotypic characteristics. This study forms an essential step towards the preservation and exploitation of the hidden oenological potential of the wealth of yeast biodiversity of the koumiss in Xinjiang Province. The result obtained shown that *S. unisporus* and *K. marxianus* were the predominant strains of koumiss in Xinjiang of China.

Keywords : Koumiss ; yeast ; traditional taxonomic methods ; D1/D2 ; biodiversity