

内蒙古西部区酸粥中酵母菌的分离鉴定及 优势菌分析

白梅 王娟 卿蔓君 包秋华 孙天松 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 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 从内蒙古地区采集 28 份酸粥样品, 从中分离出 40 株酵母菌, 并对其进行了分子生物学鉴定和生物多样性分析。26S rDNA D1/D2 区域 (600 bp 左右) 碱基序列分析结果表明, 酸粥中的酵母菌有 *Issatchenkia orientalis*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Geotrichum* sp.、*Candida pararugosa*、*Candida parapsilosis*、*Trichosporon asahii*、*Trichosporon coremiiforme*、*Clavispora lusitaniae* 和 *Candida tropicalis*。经过分析, *Issatchenkia orientalis* (75%, Frequency percentage) 为酸粥中的优势菌。

关键词: 酸粥, 酵母菌, 鉴定, 26S rDNA D1/D2 区域

Occurrence and Dominance of Yeast in Naturally Fermented Congee in Inner Mongolia of China

BAI Mei WANG Juan QING Man-Jun BAO Qiu-Hua SUN Tian-Song
ZHANG He-Ping*

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

Abstract: A total of 40 yeast strains were isolated from 28 traditional fermented congee samples in Inner Mongolia of China. The isolates were identified by analysis of the large 26 subunit (26S) rDNA gene D1/D2 domain sequences. The dominant species was *Issatchenkia orientalis* (75%, Frequency percentage), followed by *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp., *Candida pararugosa*, *Candida parapsilosis*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon coremiiforme*, *Candida tropicalis* and *Clavispora lusitaniae*.

Keywords: Naturally fermented congee, Yeast, Identification, 26S rDNA D1/D2 domain region

生米发酵食品是一种重要的米制品种类, 在我国具有悠久的发展历史, 如传统的米粉、米果、糍粑等都是将大米经过浸泡发酵后制成的。在世界的其他地区也有用谷物发酵食品的习惯, 如 Sekete、

Kwass、Pozol、Boza 和 Champùs 等^[1-4]。基于不同的发酵原料, 这些传统的发酵生米食品具有其独特的营养价值和口感、风味特点, 但其生产多局限于家庭和一些小工厂。

基金项目: 现代农业技术体系项目

* 通讯作者: Tel: 86-471-4319940; Fax: 86-471-4307205; 信箱: hepingdd@vip.sina.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>
收稿日期: 2010-03-09; 接受日期: 2010-06-08

酸粥是一种酸甜可口,含有少量酒精的生米发酵食品,在我国的内蒙西部地区广为流行。原料以糜米、江米、大米为主,不同地区还会加一些玉米渣、高粱、南瓜、红薯等。各个地区的制作方法略有不同,有自然发酵的,也有加卤水、起面(发酵面团)或传统酿制的酸奶作为“引子”的。发酵周期24 h到48 h不等,与环境温度有关。在此期间,发酵会产生一定量的酒精,pH值会降到3.5–4.0。发酵后淀粉的含量有所增加,脂肪、蛋白质和灰分的含量逐渐减少,但游离脂肪酸的含量增加^[5],形成了酸粥特有的风味。将发酵好的米加一定量水煮熟即可食用。

酵母和人类生活关系密切。目前,随着人们对酵母菌认识的增加和酵母菌新种的不断发现,其应用也不再局限于用酿酒酵母(*S. cerevisiae*)来生产面包、啤酒和各种发酵酒。丰富的酵母菌菌种与细菌、丝状真菌等共同作用,衍生出了许多种类的发酵食品。许多有价值的食品成分和操作助剂(Processing aids)是由酵母菌制得的。一些酵母菌具有较强的抗真菌性,有着很好的开发前景,可以作为一种新型的生物制剂用于食品防腐。另外,酵母菌的益生活性也越来越受到人们的关注。然而,在酵母菌益生活性方面的研究还是空缺。另一方面,一些食品企业由于酵母菌污染会造成食品和饮料产品的腐败变质,造成巨大的经济损失。酵母菌在食品中的重要性已成为新的关注点^[6]。

在传统谷物发酵中的微生物有乳酸菌、酵母菌、霉菌和芽孢杆菌等。在发酵过程中,微生物的数量和菌相发生了很大的变化。对于发酵米制品,发酵是由这些菌群共同作用的,对产品的风味和品质起着很重要的作用^[5]。陈忠军等^[7–9]对采自内蒙古河套地区的12份酸粥中分离出的12株乳酸菌和3株酵母菌进行了研究,鉴定采用的是传统的方法,且进行了所分离乳杆菌作为潜在功能性益生菌的体外测试,说明酸粥中可能存在功能性益生菌。但有关酵母菌的信息较少。

随着近年来分子技术的不断发展改进,现在可以更全面地了解酸粥中微生物的组成。本文以采自内蒙古西部区的传统制作的酸粥为对象,研究其中的酵母菌数量,并以26S rDNA D1/D2区域的碱基序列分析为依据,对分离酵母菌株进行分子鉴定,

了解生米发酵过程中存在的酵母菌种类及存在情况,同时有利于酵母菌菌种的保藏,丰富了我国的微生物资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 试验所用28份酸粥样品于2008年8月采自内蒙古西部地区,包括巴彦淖尔市、包头、鄂尔多斯市、呼和浩特市。采样温度在20°C–30°C之间,pH值3.5–4.5。样品存放在4°C恒温箱中保存。采样后一周内对样品中酵母菌进行分离。

1.1.2 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由上海桑尼生物科技有限公司合成。

裂解缓冲液A: 100 mmol/L Tris HCl, pH 9.0; 40 mmol/L EDTA, pH 8.0; 2% SDS。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离、计数: 采用稀释平板法,涂布于酸化PDA(Potato dextrose agar)合成培养基(用10%酒石酸调pH至3.5),于25°C培养。72 h后计数,在最大稀释梯度随机挑取菌落进行观察、编号、划线纯化并保存。

1.2.2 菌株DNA提取: 菌株DNA的提取采用氯化苜法^[10],做适当修改。具体步骤是:将活化3代的菌株1800 × g离心5 min收集菌体,用1 mL生理盐水洗2次。将收集的菌泥悬浮于0.5 mL提取液A,用长嘴吸管吸打数次,充分混匀;依次加入0.2 mL 10% SDS和0.3 mL氯化苜,漩涡高速振荡5 min;50°C保温1 h,间隔5–10 min振混一次;加0.3 mL 3 mol/L醋酸钠(pH 5.2)冰浴30 min;6000 × g离心10 min,取上清,加入2 μL 0.01 g/L RNase溶液,37°C温育1 h;加等体积氯仿:异戊醇,颠倒混匀,6000 × g离心10 min;取上清,加0.8倍体积异丙醇,室温沉淀1 h。6000 × g离心15 min,弃上清液,底部DNA沉淀用70%乙醇洗2次,自然干燥,用50 μL TE回溶。

1.2.3 26S rDNA D1/D2区域PCR扩增和测序: 酵母菌26S rDNA D1/D2区域的通用扩增引物NL1和NL4^[11]。NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'; NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'。扩

增条件: 94°C 1 min, 53.5°C 1 min, 72°C 2 min, 36 个循环; 72°C 10 min。取 5 μ L 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测合格后交由上海桑尼生物技术有限公司进行测序。

1.2.4 系统发育树的构建: 用 DNASTar 软件将测序结果序列进行校对, 校正后的序列在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索(BLAST)。将相关模式菌种的 D1/D2 区域序列和供试菌株的序列一起用 Clustal X 软件进行序列校准排齐, 用 MEGA 4.0 软件的 Neighbor-joining 方法, 进行 1000 次 Bootstrap 检验后构建系统发育树。

1.2.5 NCBI 登录号: 研究中所得到的 40 个菌的 26S rDNA D1/D2 区域序列在 GenBank 数据库中的登录号为 GU904168–GU904207。

1.2.6 优势菌株分析: 依据 Pulvirenti^[12]报道, 在最大稀释梯度平板上挑去菌落会更有可能会找到优势菌种。为了研究各菌种在酸粥中的作用, 采用 Solieri^[13]的方法分析各菌种出现的频率, 找到优势菌种。此法不考虑一种菌在同一样品中出现的数量, 只看同一种菌在所有样品中出现的次数。表达为每一种菌在样品中出现的次数与总样品数的百分比(Frequency percentage)。

表 1 酸粥样品中的酵母菌计数
Table 1 Counts of the yeasts in acidic-gruel samples

样品 Samples	酵母计数 Yeasts ^A						
BM1	5.56	BM8	6.03	YM5	6.1	BT6	5.18
BM2	2.11	BM9	6.44	YM6	5.63	BT7	5.36
BM3	6.94	BM10	5.19	BT1	5.01	HS1	5.92
BM4	4.31	YM1	5.27	BT2	6.53	HS2	4.35
BM5	6.34	YM2	5.86	BT3	5.27	HS3	5.34

Note: ^A: Concentrations of yeasts are expressed as means CFU of log₁₀ per mL of sample; BM1–10: Samples from Bayan Nur; YM1–6: Samples from Erdos; BT1–7: Samples from Baotou; HS1–5: Samples from Huhhot.

表 2 26S rDNA D1/D2 区域序列相似性分析
Table 2 Analysis of 26S rDNA gene D1/D2 fragment sequences

菌株编号 Strains No.	长度 Length (bp)	登录号 Accession No.	相近模式株 The closest type strain	相似性 Identities (%)
IMAU7Y001 (BM1-1)	617	GU904168	<i>Issatchenkia orientalis</i> EF550222.1 ^T	99.82
IMAU7Y006 (BM4-2)	612	GU904173	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12632 ^T	99.82
IMAU7Y034 (YM1-2)	595	GU904201	<i>Candida pararugosa</i> NRRL Y-17089 ^T	100
IMAU7Y003 (BM2-1)	631	GU904170	<i>Candida parapsilosis</i> AY497686 ^T	100
IMAU7Y016 (BM10-2)	646	GU904183	<i>Trichosporon asahii</i> AF105393 ^T	100
IMAU7Y022 (BT5-1)	649	GU904189	<i>Trichosporon coremiiforme</i> AF139983 ^T	99.84
IMAU7Y009 (BM6-2)	602	GU904176	<i>Candida tropicalis</i> NRRL Y-12968 ^T	100
IMAU7Y008 (BM6-1)	546	GU904175	<i>Clavispora lusitaniae</i> AJ508571 ^T	99.54
IMAU7Y002 (BM1-2)	589	GU904169	<i>Geotrichum</i> sp. DQ640273.1	99.24

Note: ^T: Type strain.

2 结果与讨论

2.1 酵母菌的计数、分离

28 份酸粥样品中的酵母菌计数结果见表 1。可以看出: 酸粥中的酵母菌总数在 (2.11–6.94) log₁₀ CFU/mL。样品中酵母菌的数量可能与发酵时间、温度等有关, 但和采样的地区没有

关系。从 28 份酸粥样品中共分离获得菌株 116 株, 根据其形态和培养特征淘汰同一样品中重复菌株后, 最终获得 40 株纯培养菌株, 具体编号见表 2。

2.2 酵母菌的鉴定

用改良氯化苜法提取了 40 株酵母菌的总基因组, 片段较为完整。以 NL1 和 NL4 为引物通过特异性 PCR 反应扩增得到 26S rDNA 中 D1/D2 区域序列,

扩增产生的DNA片段大小长度约为600 bp, 扩增产物无明显非特异扩增现象, 结果见图1。测定菌26S rDNA D1/D2区域5'端约600 bp的序列, 获得的序列通过BLAST在GenBank核酸序列数据库中进行同源序列搜索及相关信息检索, 同一菌种用一菌株作为代表与相近菌种的标准菌的相似度见表2。结果表明, 37株酵母菌与GenBank数据库中酵母菌的26S rDNA D1/D2区域序列具有较高的相似性($\geq 99\%$), 而IMAU7Y002 (BM1-2)、IMAU7Y018 (BT2-2)、IMAU7Y023 (BT5-3)与*Geotrichum* sp. (DQ640273.1¹)的相似度只有97.24%, 与其相近菌种的模式株的差异 $\geq 1\%$ 。Peterson和Kurtzman^[14]认为, 同一种菌菌株间26S rDNA D1/D2区域序列的差异不大于1%, 近年来以此为判断依据发现了许多新种, 如甲虫体表^[15]和鼠类肠道^[16]中新种的发现。用分子生物学的方法对酸粥酵母菌进行分子鉴定, 是一种快速、简便和有效的方法。

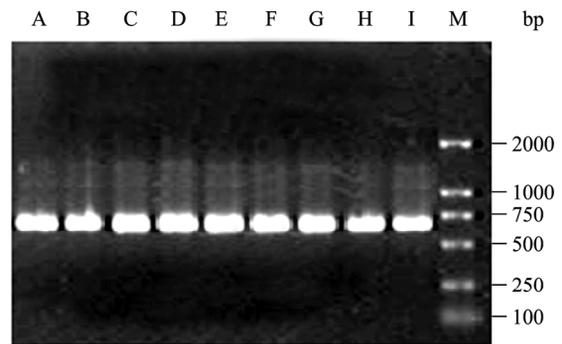


图1 部分分离菌株PCR产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of 26S rDNA of partly isolates

Note: A: IMAU7Y001 (BM1-1); B: IMAU7Y006 (BM4-2); C: IMAU7Y002 (BM1-2); D: IMAU7Y034 (YM1-2); E: IMAU7Y003 (BM2-1); F: IMAU7Y016 (BM10-2); G: IMAU7Y022 (BT6-2); H: IMAU7Y009 (BM6-2); I: IMAU7Y008 (BM6-1); M: DL2000 marker.

40株酵母菌的26S rDNA D1/D2区域序列与GenBank中的序列进行比较, 选取相近菌种的标准菌26S rDNA D1/D2区域序列, 构建系统发育树见图2。

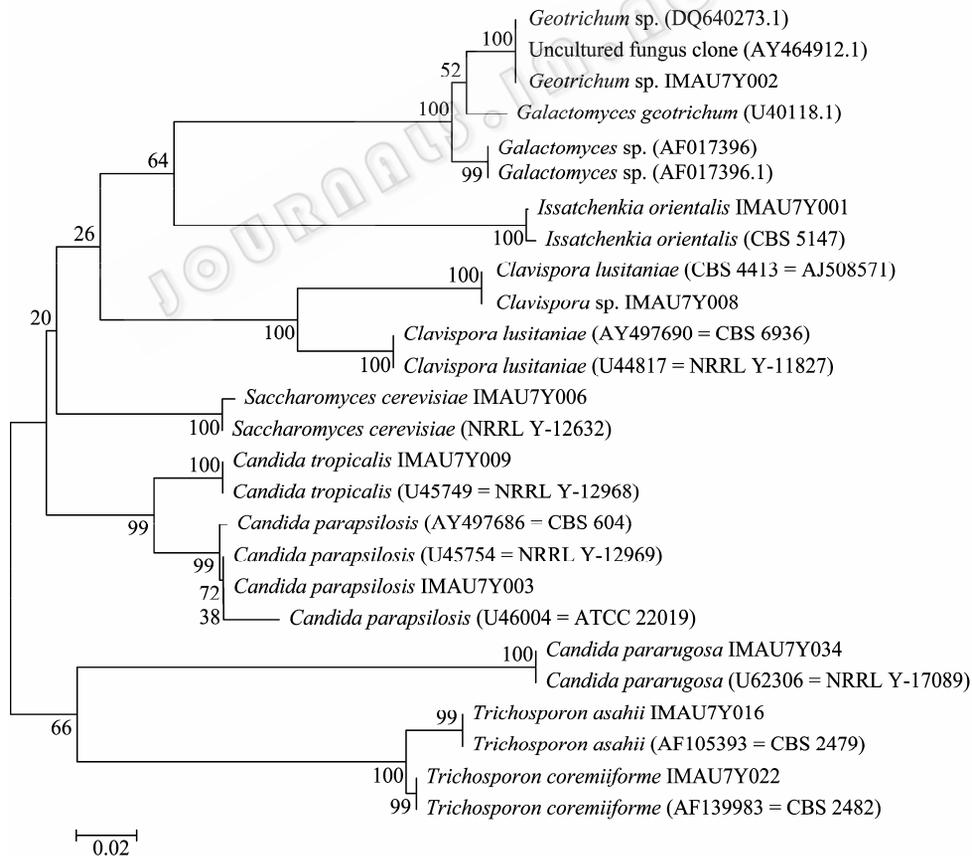


图2 代表菌株26S rDNA D1/D2区域序列系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic trees of sequences of D1/D2 loop of 26S rDNA gene from yeasts isolated from the naturally Fermented Congee

Note: In bracket: the accession numbers of type strains showed in the tree. All of the bootstrap percentages are shown. Bar: 0.02 sequence divergence. Accession numbers of sequences deposited in the GenBank are shown.

表 3 菌种在各样品中出现频率(Frequency percentage)
Table 3 Number of positive samples for each yeasts species

酵母菌菌种 Phylotypes (S = 9)	分离出的样品数 Positive samples No.	出现频率 Frequency percentage (%) ^a
<i>Issatchenkia orientalis</i>	21	75.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	14.29
<i>Geotrichum sp.</i>	3	10.71
<i>Candida pararugosa</i>	2	7.14
<i>Candida parapsilosis</i>	2	7.14
<i>Trichosporon asahii</i>	2	7.14
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1	3.57
<i>Candida tropicalis</i>	1	3.57
<i>Clavispora lusitaniae</i>	1	3.57

Note: ^a: The total number of samples; S: Number of phylotypes.

2.3 酸粥样品中的优势菌种

每一种菌种在各样品中的出现频率见表 3。其中 *I. orientalis* 是最普遍的菌种, 在 75% 的样品中存在, 在少数样品中分离到 *S. cerevisiae*、*Geotrichum sp.*、*C. pararugosa*、*C. parapsilosis*、*T. asahii*, 而 *T. coremiiforme*、*C. tropicalis* 和 *Cla. lusitaniae* 只在一个样品中分离到。

3 结论

世界各地用以做酸粥或类似食品的原料十分丰富, 制作出了各种各样的谷物发酵食品, 为人们所喜爱。根据李玉珍^[17]等的报道, 发酵的酸粥中存在着多种功能性成分, 如功能性低聚糖、多肽与氨基酸、抗氧化活性物质和降低胆固醇及血压的物质, 这些物质的产生和其中的潜在益生微生物是分不开的。

在采自内蒙古西部区 28 份酸粥样品中分离出的酵母经鉴定归为 6 个属 9 个种。从对 28 份样品的分析看出发酵型酵母 *I. orientalis* (75.00%) 是绝对优势菌种, *S. cerevisiae* (14.29%)、*Geotrichum sp.* (10.71%)、*C. pararugosa* (7.14%)、*C. parapsilosis* (7.14%) 和 *T. asahii* (7.14%) 在样品中存在相对较少, 而 *T. coremiiforme*、*C. tropicalis* 和 *Cla. lusitaniae* 仅在个别样品中分离到。之前陈忠军^[8]从酸粥样品中分离出的 3 株酵母菌分别鉴定为裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces sp.* Lindner)、小椭圆酵母 (*Saccharomyces microellipsoides* Osterwalder 1924a,

现归属于小椭圆接合酵母 (*Zygosaccharomyces microellipsoides*) 和意大利酵母 (*Saccharomyces italicus* Castelli, 现归属于酿酒酵母 *S. cerevisiae*)。从分离出的酵母菌种类而言, 除 *S. cerevisiae* 一样外, 其他两种都未分离到。排除生理生化鉴定时误差造成的错判, 这样的菌种差异可能与采样的时间及样品的制作方法有关, 不同时期、不同方法发酵而成的酸粥中微生物不同, 口感和风味也有差异。

显然, *I. orientalis* 是所有采自内蒙古西部地区的酸粥样品中出现频率最高的。此结果与 Mugula 对谷物发酵食品 *togwa*^[18] 中存在的酵母菌研究结果一致。Halm 对发酵玉米面团进行研究, 发现其主要优势酵母菌是 *Candida spp.*, 其次是 *Saccharomyces spp.*^[19]。*Issatchenkia spp.* 和 *Saccharomyces spp.* 是以植物为底物进行酸发酵时较为常见的菌^[20-22]。有研究表明, 在发酵过程中乳酸菌和酵母菌存在着一种共代谢关系, 乳酸菌生长造成的酸性环境会影响其中酵母菌的种类, 而经筛选的酵母菌又会为乳酸菌提供维生素和其他生长因子^[20]。*I. orientalis* 在酸粥发酵中起的具体作用还不清楚, 但可以确定存在的这些酵母菌代谢产生的酒精、酯类、酸等对改善发酵谷物食品的风味、口感有着重要的作用^[5]。

各样品中酵母菌种类的分布有一定差异, 但是优势菌一样的, 这可能与酸粥的制作原料和方法有关, 采用不同的温度、谷物种类会为酵母提供不一样的生长环境, 生长的酵母也就较为多样。另外, 还可能与当地居民的饮食习惯有关, 如酸感和刹口感, 这都与酵母的生长有关。

26S rDNA D1/D2 区域序列分析显示酵母分离株 IMAU7Y002 (BM1-2)、IMAU7Y018 (BT2-2)、IMAU7Y023 (BT5-3) 与最相近的 *Geotrichum sp.* (DQ640273.1) 和 Uncultured fungus clone (AY464912.1) 相似度均 $\geq 99\%$, 这 3 株菌是属于 *Geotrichum* 属, 但种不确定, 需要进一步鉴定。在传统制作的酸粥中可能仍存在着未知的生物型, 这有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Pederson, CS. Microbiology of Food Fermentations, 2nd ed. Westport, USA: AVI Publishing Co. Inc., 1979: 1-24.
- [2] Wachter C, Canàs A, Bárzana E, et al. Microbiology of

- Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiol*, 2000, **17**(3): 251–256.
- [3] Gotcheva V, Pandiella SS, Angelov A, *et al.* Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage Boza. *Process Biochem*, 2000, **36**(4): 127–130.
- [4] Esteban OC, Clemencia CL, Rosanna T. Detection and identification of wild yeasts in Champùs, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiol*, 2008, **25**(6): 771–777.
- [5] 刘小翠, 李云波, 赵思明. 生米发酵食品的研究进展. *食品科学*, 2006, **26**(10): 616–619.
- [6] Querol A, Fleet G. *Yeasts in Food and Beverages*. Berlin: Springer, 2006: 1–2.
- [7] 陈忠军, 杨晓清, 乌尼. 内蒙古河套地区酸粥中乳酸菌的分离及其生物学特性的研究. *内蒙古农业大学学报*, 2002, **23**(3): 62–65.
- [8] 陈忠军. 内蒙古河套地区酸粥中发酵菌生物学特性研究. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2001.
- [9] 王湘竹, 陈忠军, 李春罡. 内蒙古传统谷物发酵食品—酸粥中益生乳杆菌的体外筛选. *华北农学报*, 2009, **24**(1): 207–211.
- [10] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苜蓿提取适于分子生物学分析的真菌 DNA. *真菌学报*, 1994, **13**(1): 34–40.
- [11] Roostita R, Fleet GH. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, **28**(3): 393–404.
- [12] Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, *et al.* Occurrence and dominance of yeast species in sour dough. *Lett Appl Microbiol*, 2004, **38**(2): 113–117.
- [13] Solieri L, Landi S, De Vero L, *et al.* Molecular assessment of yeast population from traditional balsamic vinegar. *J Appl Microbiol*, 2006, **101**(1): 63–71.
- [14] Kurtzman CP. DNA relatedness among saturn-spored yeasts assigned to the genera *Williopsis* and *Pichia*. *Antonie Leeuwenhoek*, 1991, **60**(1): 13–19.
- [15] Suh SO, McHugh JV, Pollock DD, *et al.* The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycol Res*, 2005, **109**(3): 261–265.
- [16] Scupham AJ, Presley LL, Wei B, *et al.* Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(1): 793–801.
- [17] 李玉珍, 肖怀秋, 兰立新. 我国大米发酵食品研究进展. *江苏调味副食品*, 2008, **25**(6): 33–37.
- [18] Mugula JK, Nnko SAM, Narvhus JA. Microbiological and fermentation characteristics of *togwa*, a Tanzanian fermented food. *Int J Food Microbiol*, 2003, **80**(3): 187–199.
- [19] Halm M, Lillie A, Sorensen AK, *et al.* Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for kenkey production in Ghana. *Int J Food Microbiol*, 1993, **19**(2): 135–143.
- [20] Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J. The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **41**(4): 456–460.
- [21] Nago CM, Hounhouigan DJ, Akissoe N, *et al.* Characterization of the Beninese traditional ogi, a fermented maize slurry: physiological and microbiological aspects. *Int J Food Sci Technol*, 1998, **60**(3): 307–315.
- [22] Giraud E, Champailier A, Rimbault M. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(12): 4319–4323.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名，造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱，这大大影响了本刊在国际上的传播，也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论，以及主办单位批准，本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”，请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25