

# 新疆传统发酵酸奶中酵母菌的分子鉴定及 抗氧化活性研究

Molecular identification and antioxidant activity of yeasts isolated from  
traditional fermented milk in southern Xinjiang

古丽娜孜·卡哈尔 努尔古丽·热合曼 迪丽拜尔·玉山 麦克丽亚·亚力昆

GULNAZ Kahar

NURGUL Rahman

DILBAR Yusan

MAKLIYA Yalkun

(新疆师范大学, 新疆 乌鲁木齐 830054)

(Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

**摘要:**以开发新疆地区传统发酵乳中的酵母菌为研究目的,对分离的78株酵母菌利用26S rDNA D1/D2区和ITS转录区间分析以及抗氧化活性检测试剂盒进行分子鉴定和抗氧化活性检测。结果表明,78株酵母菌中具有抗氧化活性的菌株有42株,其中NG-40综合抗氧化能力突出,其抗氧化活性为 $(106.41 \pm 3.92)$  U/mL,抑制羟基自由基能力为 $(651.24 \pm 3.75)$  U/L,抗超氧阴离子能力为 $(104.11 \pm 3.25)$  U/mL,而脂质过氧化物含量仅为 $(1.99 \pm 0.65)$   $\mu\text{mol/L}$ ;分子鉴定结果表明,38株为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),36株为马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*),4株属于毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)。

**关键词:**发酵酸奶;酵母菌;分子鉴定;抗氧化活性

**Abstract:** On the purpose of explore the yeast resources in traditional fermented milk in Xinjiang, taking the traditional fermented milk produce in the small family workshop on south region of Xinjiang as raw materials, there were 78 strains which were isolated for molecular identification and antioxidant ability. The results showed that 42 of the 78 yeast strains had total antioxidant activity, and the antioxidant ability of NG-40 was prominent, with the total antioxidant activity of  $(106.41 \pm 3.92)$  U/mL, the ability of inhibiting hydroxyl radicals of  $(651.24 \pm 3.75)$  U/L, the ability of resisting superoxide anion of  $(104.11 \pm 3.25)$  U/mL, and the content of lipid peroxide of  $(1.99 \pm 0.65)$   $\mu\text{mol/L}$ . Molecular identification results showed 38 of the strains belonging to *Saccharomyces cerevisiae*, 36 of them belonging to *Kluyveromyces marxianus*, 4 strains belonging to *Pichia kudriavzevii*. Among them, strain NG-

40 was identified as *Kluyveromyces marxianus*. This experiment identified the yeast species of dairy products in Xinjiang area, and its antioxidant ability was preliminarily tested. Provides a theoretical basis and research basis for the development and utilization of yeast resources in southern Xinjiang.

**Keywords:** Traditional fermented milk; yeast; molecular identification; antioxidant activity

新疆地域辽阔,气候多样,向来就以其丰富的乳制品资源著称。当地的传统发酵酸奶更是历史悠久,味道可口<sup>[1]</sup>。传统发酵食品的微生物区系通常有细菌与酵母菌组成,少数情况下也有霉菌参与。这些微生物在发酵过程中,增添了独特的芳香物质与层次感<sup>[2]</sup>。酵母菌在真核微生物群体当中所占的数量庞大,分布广泛,而且在生物技术方面拥有多种用途<sup>[3-4]</sup>。在众多发酵食品当中酵母菌占有举足轻重的地位<sup>[5]</sup>。此外,酵母菌可以从外界环境中吸取酚类物质,具有提高自身抗氧化活性的能力<sup>[6]</sup>,含有丰富的维生素B<sub>6</sub>、B<sub>12</sub>以及可以与各种酶类有协同作用的诸多矿物质<sup>[7]</sup>。传统工业化生产的酸奶主要发酵菌是乳酸菌,很少会将酵母菌添加为发酵菌,酵母菌一直以来也被看做是引起产品腐坏的腐败菌。

在鉴定方面,随着科学技术水平的发展,26S rDNA及其转录间区ITS的序列分析等技术被越来越多地应用于酵母菌的分类与序列分析当中<sup>[8-9]</sup>。Kurtzman等<sup>[10]</sup>对大约500种子囊菌酵母和担子菌酵母26S rDNA中的D1/D2区域序列进行了研究,发现该方法可以将绝大部分分离开来。由于这些序列均已公布于GenBank/EM-BL/DDBJ等国际核酸数据库,为酵母菌的分子分类学、分子系统学和多样性的研究带来很大便利<sup>[11]</sup><sup>8-9</sup>。近年来,Lachance等<sup>[12]</sup>发现*Clavispora lusitanae*的26S rDNAD1/D2区具有显著的多

**基金项目:**国家自然科学基金(编号:31460448)

**作者简介:**古丽娜孜·卡哈尔,女,新疆师范大学在读硕士研究生。

**通信作者:**努尔古丽·热合曼(1972—),女,新疆师范大学副教授,博士。E-mail:nurgulum@163.com

**收稿日期:**2017-11-25

态性。随着研究的深入,发现愈来愈多的酵母菌中存在个体基因组 ITS 和 26S rDNA 序列多态性,同一菌株基因组内不同类型的 ITS 序列差异也可能远远超过菌种间的差异范围<sup>[13]</sup>。因此,仅仅依靠单一序列的鉴定结果会有一定程度的不确定性。在抗氧化活性方面,中国已有利用抗氧化活性酵母在小鼠体内进行抗衰试验等方面的研究<sup>[14]</sup>。

本研究拟以新疆阿图什与乌什的 4 种酸奶中分离纯化得到的 78 株酵母菌为研究对象,采用 26S rDNA D1/D2 区域及 ITS 内转录序列扩增技术进行分子生物学鉴定,并对其总抗氧化能力,羟基自由基抑制能力、抗超氧阴离子自由基能力以及脂质过氧化物产量进行测定,筛选出具有优良抗氧化活性的菌株;通过双序列测序技术对分离得到的酵母菌进行鉴定,使用 MEGA 7.0 等生物学软件绘制系统发育进化树,并对南疆地区酸奶中的酵母菌抗氧化活性进行初筛,为酵母菌资源的开发提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 菌株及其来源

传统手工酸奶:阿图什与乌什地区农民家庭作坊生产,将样品装置于无菌容器,运至实验室后置于 4 °C 保藏,从中分离纯化得到 78 株酵母菌,标号,并用 20% 甘油于 -80 °C 超低温冰箱保种。

#### 1.1.2 仪器与试剂

立式压力蒸汽灭菌器:LZDZX-30KBS 型,上海申安医疗器械厂;

离心机:BLF6 型,上海一恒科技有限公司;

PCR 仪:LNB48+型,上海皓庄仪器有限公司;

分光光度计:722 型,上海菁华科技仪器有限公司;

酵母浸粉、蛋白胨:分析纯,北京澳博星生物技术有限责任公司;

葡萄糖、琼脂:分析纯,合肥志宏生物技术有限公司;

酵母菌基因组提取试剂盒:天根生化科技有限公司;

上游引物(NL1、ITS1)、下游引物(NL4、ITS4):上海生物工程股份有限公司;

总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒(货号 A015-1)、脂质过氧化(LPO)测试盒(货号 A106)、抗超氧阴离子自由基测试盒(货号 A052)、羟基自由基测定试剂盒(货号 A018):南京建成生物工程研究所。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株鉴定

(1) 菌种活化:在提取酵母菌基因组 DNA 之前先对其进行 2 次活化,将用甘油冻藏(-80 °C)的酵母菌菌株按照 1% 的接种量接种于新鲜配置的 YPD 培养基中(10 g/L 酵母浸粉, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖)<sup>[15]</sup>, 28 °C 培养 24 h。

(2) 总 DNA 的提取:DNA 的提取按照试剂盒说明书进行操作,第二步略有改动,水浴时间改为 40 min 对酵母菌进行破壁处理<sup>[16]</sup>。

(3) 基因组 DNA 电泳:提取的 DNA 采用 1.0% 的琼脂

糖凝胶进行电泳,电压 80 V,时长 40 min,在凝胶成像仪中观察凝胶。

(4) 26S rDNA D1/D2 区 PCR 扩增:酵母菌 PCR 扩增体系见表 1,引物为通用引物,正向引物 NL1:(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'),反向引物 NL4:(5'-GGTCCGTGTTTCA AGACGG-3')。

表 1 26S rDNA D1/D2 区 PCR 扩增体系<sup>[18]</sup>

Table 1 PCR amplification system of 26S rDNA D1/D2 gene sequence

试剂	50 $\mu$ L 反应体系中 加样体积/ $\mu$ L
引物 NL1	1.0
引物 NL4	1.0
Super Mix	10.0
基因组模板 DNA	2.0
ddH <sub>2</sub> O	补充至 50 $\mu$ L

扩增循环为 95 °C 5 min,预变性,94 °C 1 min、52 °C 1 min、72 °C 1 min,36 个循环,72 °C 延伸 8 min<sup>[17]</sup>。扩增结束后取 4  $\mu$ L PCR 扩增产物与 Golden viewer 核酸染料混合点样,用(1 $\times$ TAE)缓冲液制备 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,扩增成功在 600 bp 左右形成可见条带。PCR 产物被送到新疆昆泰锐生物技术有限公司进行测序。

(5) ITS 序列 PCR 扩增:ITS PCR 扩增体系见表 2,引物采用 ITS 通用扩增引物,正向引物 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3'),反向引物 ITS4(5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')。

表 2 ITS PCR 扩增体系<sup>[18]16</sup>

Table 2 PCR amplification system of ITS gene sequence

试剂	50 $\mu$ L 反应体系中 加样体积/ $\mu$ L
引物 ITS1	1.5
引物 ITS4	1.5
Super Mix	12.5
基因组模板 DNA	2.0
ddH <sub>2</sub> O	补充至 50 $\mu$ L

扩增循环为 95 °C 5 min 预变性,94 °C 1 min、55 °C 1 min、72 °C 1.5 min,30 个循环,72 °C 延伸 10 min<sup>[18]15-16</sup>。扩增结束后取 4  $\mu$ L PCR 扩增产物与 Golden viewer 核酸染料混合点样,用(1 $\times$ TAE)缓冲液制备 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,扩增成功在 400~700 bp 左右形成可见条带<sup>[19]</sup>。PCR 产物被送到新疆昆泰锐生物技术有限公司进行测序。

(6) 同源性分析:利用 MEGA7.0 软件,对被测酵母菌的 26S rDNA D1/D2 区域、ITS 序列以及 GenBank 中比对获得的参比菌株序列进行同源性分析,申请菌株登录号,构建系统发育进化树。

1.2.2 酵母菌抗氧化活性检测

(1) 酵母菌细胞的收集:将-80℃下甘油保藏的菌株进行活化,将活化好的酵母菌 10 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。

(2) 酵母细胞预处理:将离心收集的细胞用无菌水洗涤 3~5 次后进行冷冻干燥(-48℃,4 Pa),冻干细胞备用。利用反复冻融超声破碎法<sup>[20]</sup>提取粗酶液。

(3) 抗氧化能力检测:菌株总抗氧化能力(T-AOC)检测<sup>[21]</sup>、羟基自由基抑制能力检测、抗超氧阴离子自由基能力测试以及产生脂质过氧化物(LPO)含量测试均以南京建成测定试剂盒步骤进行,每个样品均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 26S rDNA 序列分析结果

分别采用 78 株菌的基因组序列为模板,采用引物 NL1、NL4 扩增出 26S rDNA D1/D2 序列,利用 2.0%浓度的琼脂糖凝胶对扩增产物进行电泳,大小约为 600 bp(图 1)。扩增序列片段经测序后,通过 BIOEDIT 生物软件整理数据并在 GenBank 中进行 BLAST 同源序列搜索,对同源性高的相似菌株序列进行下载。结果表明,78 株酵母菌的 26S rDNA

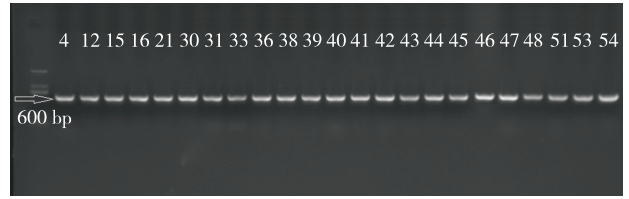


图 1 部分菌株 26S rDNA D1/D2 区域序列电泳图  
Figure 1 Part of the 26S rDNA D1/D2 Regional sequence electrophoresis

D1/D2 区域基因序列同源性均≥99%,菌株登录号及名称见表 3。

随后利用 MEGA7.0 对序列绘制系统发育进化树(图 2)。结果表明,阿图什与乌什县传统发酵乳当中的酵母菌共属于 3 个属 3 个种,其中 3 个属分别为酵母属(*Saccharomyces cerevisiae*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces marxianus*)、毕赤酵母属(*Pichia kudriavzevii*);3 个种为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)。

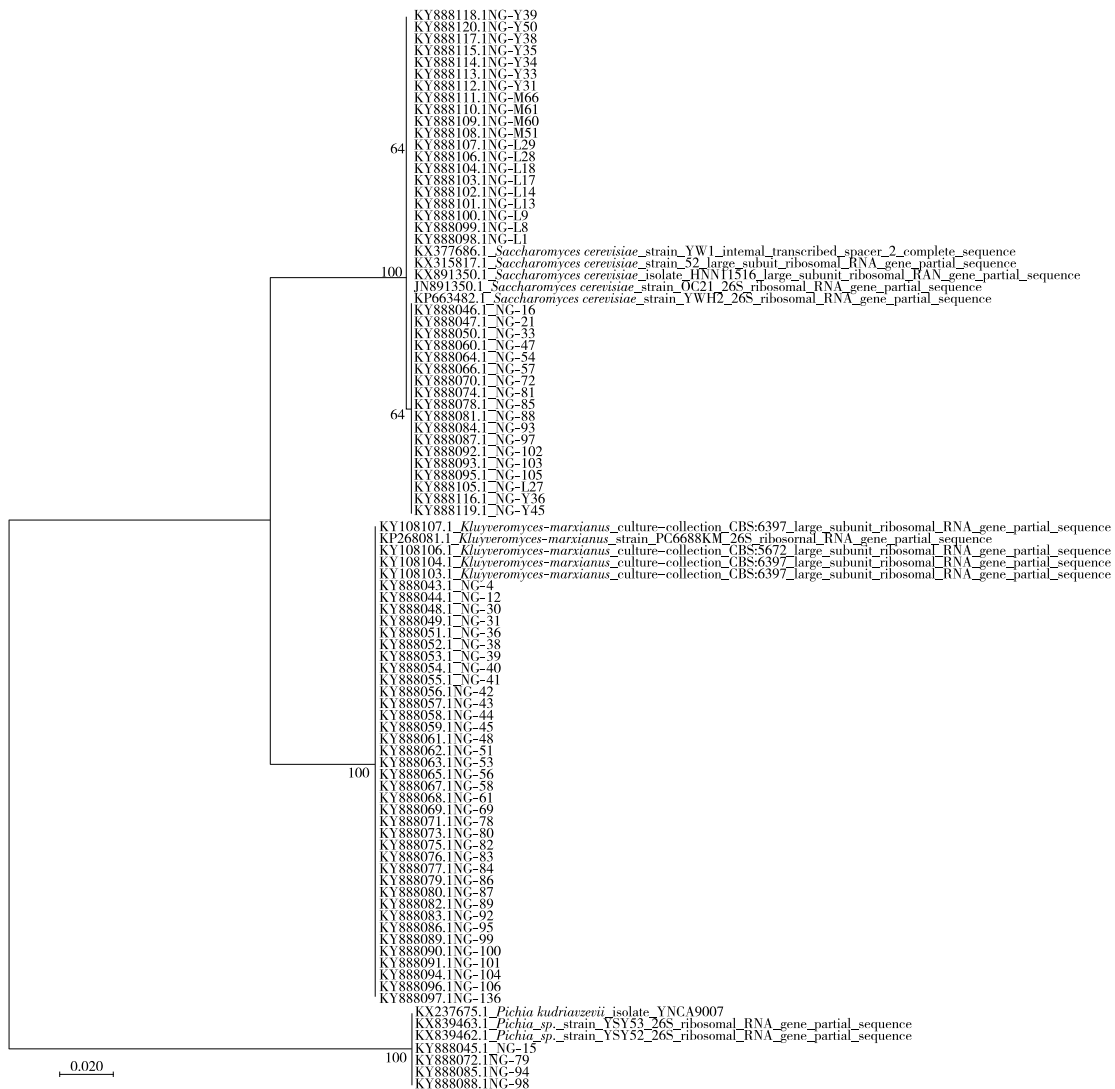


图 2 78 菌株 26S rDNA D1/D2 区域 rDNA 序列系统发育进化树  
Figure 2 26S rDNA D1/D2 sequences phylogenetic tree

2.2 ITS序列分析结果

同样采用78株酵母菌基因序列为模板,利用ITS1与ITS4引物对ITS序列进行扩增,将产物用浓度2.0%的琼脂糖凝胶进行电泳,发现在400~700 bp处出现条带(图3),对扩增产物进行测序后,通过BIOEDIT生物软件整理数据并在GenBank中进行BLAST同源序列搜索,对同源性高的相

似菌株序列进行下载。结果表明,78株酵母菌的ITS区域基因序列同源性均 $\geq 98\%$ ,与26S rDNA结果一致,菌株相似性比较结果见表4。

同样利用MEGA7.0软件绘制菌株系统发育进化树(图4),结果表明,78株菌分属于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、

表3 菌株名称及登录号  
Table 3 Strain name and accession number

分离菌株	登录号	菌株名称	分离菌株	登录号	菌株名称
NG-4	KY888043	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-89	KY888082	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-12	KY888044	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-92	KY888083	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-15	KY888045	<i>Pichia kudriavzevii</i>	NG-93	KY888084	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-16	KY888046	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-94	KY888085	<i>Pichia kudriavzevi</i>
NG-21	KY888047	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-95	KY888086	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-30	KY888048	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-97	KY888087	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-31	KY888049	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-98	KY888088	<i>Pichia kudriavzevii</i>
NG-33	KY888050	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-99	KY888089	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-36	KY888051	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-100	KY888090	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-38	KY888052	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-101	KY888091	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-39	KY888053	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-102	KY888092	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-40	KY888054	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-103	KY888093	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-41	KY888055	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-104	KY888094	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-42	KY888056	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-105	KY888095	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-43	KY888057	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-106	KY888096	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-44	KY888058	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-136	KY888097	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-45	KY888059	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L1	KY888098	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-47	KY888060	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-L8	KY888099	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-48	KY888061	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L9	KY888100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-51	KY888062	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L13	KY888101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-53	KY888063	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L14	KY888102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-54	KY888064	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-L17	KY888103	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-56	KY888065	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L18	KY888104	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-57	KY888066	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-L27	KY888105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-58	KY888067	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L28	KY888106	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-61	KY888068	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L29	KY888107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-69	KY888069	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-M51	KY888108	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-72	KY888070	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-M60	KY888109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-78	KY888071	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-M61	KY888110	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-79	KY888072	<i>Pichia kudriavzevii</i>	NG-M66	KY888111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-80	KY888073	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y31	KY888112	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-81	KY888074	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-Y33	KY888113	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-82	KY888075	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y34	KY888114	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-83	KY888076	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y35	KY888115	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-84	KY888077	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y36	KY888116	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-85	KY888078	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-Y38	KY888117	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-86	KY888079	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y39	KY888118	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-87	KY888080	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y45	KY888119	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-88	KY888081	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-Y50	KY888120	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*)。其中 NG-98、NG-M66、NG-Y36 3 株酵母菌 ITS 序列相似性只有 98%，需通过 TA 克隆进行进一步研究。

2.3 抗氧化能力筛选

2.3.1 总抗氧化能力(T-AOC) 本试验通过总抗氧化能力试剂盒,最终测定出 78 株菌株中 42 株具有抗氧化活性,见图 5。

通过图 5 可以看出,42 株酵母中 NG-Y50 号菌抗氧化活性最高,为(107.33±2.97) U/mL;NG-L18号菌株抗氧化活

菌株号 4 12 15 16 21 30 31 33 36 38 39 40

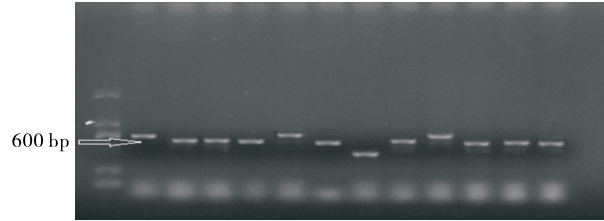


图 3 部分菌株 ITS 序列 PCR 产物电泳图

Figure 3 Part of the ITS regional sequence electrophoresis

表 4 菌株序列相似性比较结果

Table 4 Comparison results of strain sequence similarity

分离菌株	登录号	相似菌株	分离菌株	登录号	相似菌株
NG-4	KY888043	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-89	KY888082	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-12	KY888044	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-92	KY888083	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-15	KY888045	<i>Pichia kudriavzevii</i>	NG-93	KY888084	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-16	KY888046	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-94	KY888085	<i>Pichia kudriavzevi</i>
NG-21	KY888047	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-95	KY888086	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-30	KY888048	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-97	KY888087	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-31	KY888049	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-98	KY888088	<i>Pichia kudriavzevii</i>
NG-33	KY888050	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-99	KY888089	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-36	KY888051	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-100	KY888090	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-38	KY888052	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-101	KY888091	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-39	KY888053	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-102	KY888092	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-40	KY888054	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-103	KY888093	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-41	KY888055	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-104	KY888094	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-42	KY888056	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-105	KY888095	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-43	KY888057	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-106	KY888096	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-44	KY888058	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-136	KY888097	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
NG-45	KY888059	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L1	KY888098	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-47	KY888060	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-L8	KY888099	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-48	KY888061	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L9	KY888100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-51	KY888062	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L13	KY888101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-53	KY888063	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L14	KY888102	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-54	KY888064	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-L17	KY888103	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-56	KY888065	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L18	KY888104	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-57	KY888066	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-L27	KY888105	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-58	KY888067	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L28	KY888106	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-61	KY888068	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-L29	KY888107	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-69	KY888069	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-M51	KY888108	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-72	KY888070	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-M60	KY888109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-78	KY888071	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-M61	KY888110	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-79	KY888072	<i>Pichia kudriavzevii</i>	NG-M66	KY888111	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-80	KY888073	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y31	KY888112	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-81	KY888074	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-Y33	KY888113	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-82	KY888075	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y34	KY888114	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-83	KY888076	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y35	KY888115	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-84	KY888077	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y36	KY888116	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-85	KY888078	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-Y38	KY888117	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-86	KY888079	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y39	KY888118	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-87	KY888080	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NG-Y45	KY888119	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NG-88	KY888081	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NG-Y50	KY888120	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

性最低,仅为(4.29±2.84) U/mL。高于平均值的菌株有 NG-40、NG-41、NG-54、NG-56、NG-57、NG-58、NG-87、NG-105、NG-L1、NG-Y50、NG-M60、NG-M66。

2.3.2 羟基自由基抑制能力 通过羟基自由基测定试剂盒对具有抗氧化活性的 42 株酵母菌进行测定,结果见图 6。

由图 6 可知,在测试的这 42 株菌株中 NG-M61 号菌株抑制羟基自由基能力最高,为(755.80±3.63) U/mL;NG-M60 号

菌株抑制羟基自由基能力最低,仅为(60.46±4.66) U/mL。其中抑制羟基自由基能力高于平均值的菌株有 NG-15、NG-30、NG-33、NG-40、NG-41、NG-45、NG-53、NG-57、NG-58、NG-72、NG-84、NG-92、NG-93、NG-105、NG-106、NG-L1、NG-L13、NG-Y39、NG-Y50、NG-M51、NG-M61。对筛选抗氧化能力以及抑制羟基自由基能力均高于平均值的 7 株酵母菌进行抗超氧阴离子自由基测定以及脂质过氧化物(LPO)含量测试。



图 4 部分菌株 ITS 序列系统发育进化树

Figure 4 ITS sequences phylogenetic tree

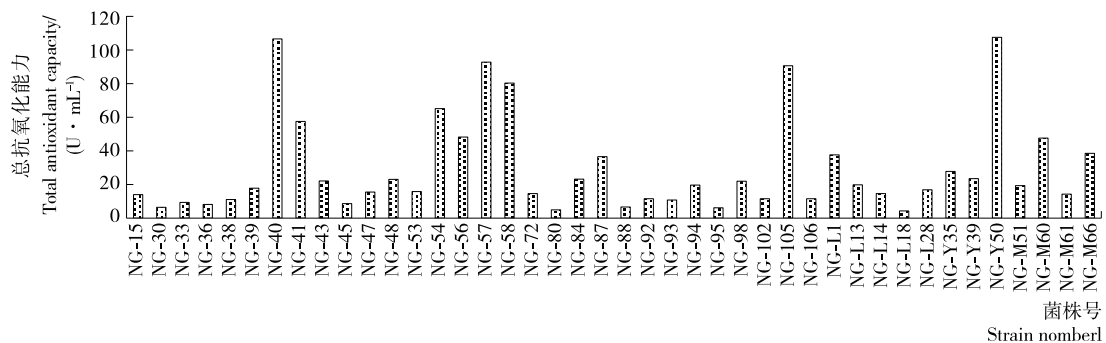


图 5 具有抗氧化活性的菌株及其抗氧化能力

Figure 5 Strains with antioxidant activity and their total antioxidant capacity



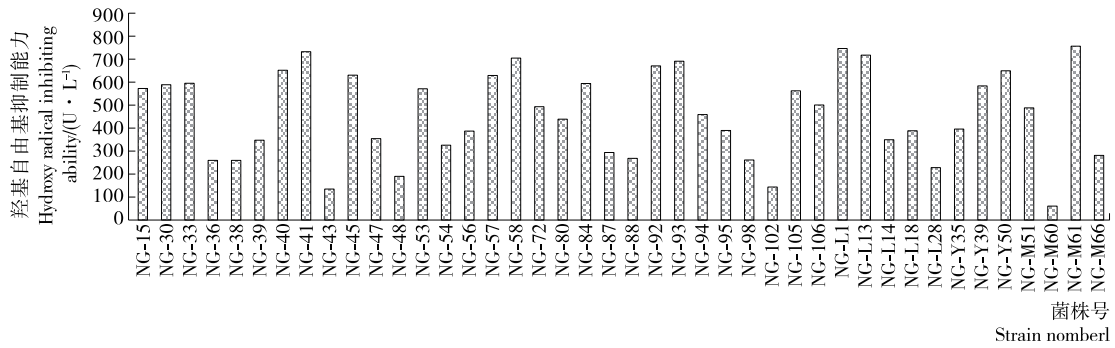


图 6 42 株酵母菌羟基自由基抑制能力

Figure 6 Hydroxy radical inhibiting ability of 42 yeast strains

2.3.3 抗超氧阴离子自由基能力 抗超氧阴离子自由基能力见图 7。

由图 7 可以看出,7 株酵母菌中 NG-105 号菌株的抗超氧阴离子自由基能力最强 $[(134.29 \pm 1.72) \text{ U/mL}]$ ,NG-58 号菌株最弱 $[(35.53 \pm 4.66) \text{ U/mL}]$ 。

2.3.4 脂质过氧化物含量 脂质过氧化物含量测定结果见图 8。

由图 8 可知,本研究所测试的 7 株酵母菌,产生脂质过氧化物的含量偏低,脂质过氧化物含量最高的菌株 NG-Y57 所产生的 LPO 值也仅为 $(4.97 \pm 0.11) \mu\text{mol/L}$ ,而含量最低的菌株 NG-105 产生的 LPO 值只有 $(0.32 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$ 。

由表 5 可以看出,NG-Y50 号菌株抗氧化活性最高,抑制羟基自由基能力为 $(648.73 \pm 4.81) \text{ U/L}$ ,但是其抗超氧阴

离子能力 $[(40.36 \pm 4.56) \text{ U/mL}]$ 不及 NG-40,而且 NG-40 号菌株抗氧化活性为 $(106.41 \pm 3.92) \text{ U/mL}$ ,抑制羟基自由基能力为 $(651.24 \pm 3.75) \text{ U/L}$ ,抗超氧阴离子能力为 $(104.11 \pm 3.25) \text{ U/mL}$ ,而其所含有的脂质过氧化物含量仅有 $(1.99 \pm 0.65) \mu\text{mol/L}$ 。综上所述,NG-40 具有较强的抑制自由基能力,可被开发为新型抗氧化活剂。这株菌被鉴定为马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)。

### 3 结论

(1) 本研究对酸奶中的酵母菌进行分子鉴定,结果表明,38 株属于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),36 株属于马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*),4 株属于毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)。Gabriela Diosma 等<sup>[22]</sup>对开菲尔样品中分离出的酵母菌进行鉴定,发现它们属于

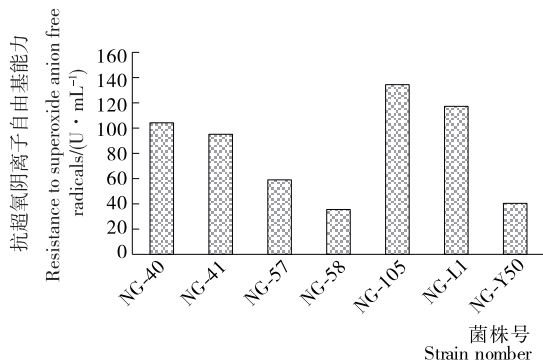


图 7 抗超氧阴离子自由基能力

Figure 7 Resistance to superoxide anion free radicals

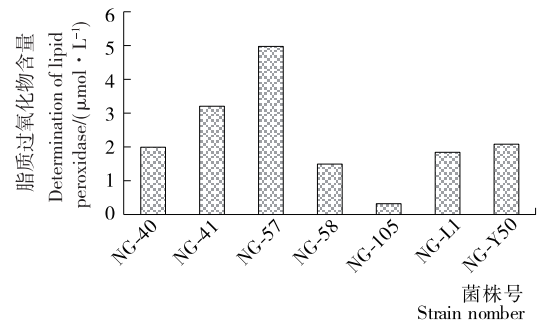


图 8 菌株脂质过氧化物(LPO)含量测定

Figure 8 Determination of lipid peroxidase (LPO) content in strains

表 5 7 株酵母菌的抗氧化活性比较

Table 5 Comparison of antioxidant activities of 7 yeast strains

菌株号	总抗氧化活性/ ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	抑制羟基自由基能力/ ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	抗超氧阴离子自由基 能力/( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	脂质过氧化物含量/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
NG-40	$106.41 \pm 3.92$	$651.24 \pm 3.75$	$104.11 \pm 3.25$	$1.99 \pm 0.65$
NG-41	$57.41 \pm 0.98$	$731.86 \pm 1.27$	$95.00 \pm 1.87$	$3.20 \pm 0.80$
NG-57	$92.61 \pm 3.74$	$628.57 \pm 4.98$	$58.93 \pm 3.44$	$4.97 \pm 0.11$
NG-58	$80.19 \pm 2.57$	$704.16 \pm 3.88$	$35.53 \pm 4.66$	$1.49 \pm 0.56$
NG-105	$90.47 \pm 4.35$	$561.78 \pm 4.65$	$134.29 \pm 1.72$	$0.32 \pm 0.14$
NG-L1	$37.57 \pm 4.09$	$745.72 \pm 4.00$	$117.14 \pm 4.63$	$1.84 \pm 0.91$
NG-Y50	$107.33 \pm 2.97$	$648.73 \pm 4.81$	$40.36 \pm 4.56$	$2.08 \pm 0.31$

*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kluyveromyces marxianus* 4种酵母。但本试验的样品中并没有发现 *Saccharomyces unisporus* 以及 *Issatchenkia occidentalis* 等酵母菌种,这与样品的地域性以及种类有关。Yang等<sup>[23]</sup>以西藏牦牛酸奶为对象,对其中的酵母菌进行研究,发现它们同样属于酿酒酵母,马克思克鲁维酵母与毕赤酵母。李静等<sup>[24]</sup>对新疆酸驼乳进行研究时也分离出这3种酵母。由此可见马克思克鲁维酵母与酿酒酵母在传统发酵乳制品中很常见。

(2) 通过抗氧化活性试剂盒从78株酵母中筛选出7株高抗氧活性酵母,其中NG-40、NG-41、NG-58为马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*), NG-57、NG-105、NG-L1、NG-Y50为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。戴玥等<sup>[25]</sup>通过超氧阴离子清除率等试验选出具有高抗氧化能力的假丝酵母Y1,其羟基自由基清除能力超过40%。韦琰琰<sup>[26]</sup>从食品中筛选到1株具有高抗氧化活性的酵母菌Y11,并将其鉴定为 *Aureobasidium pullulans*。这些研究结果与本研究结果相一致,说明酵母菌具有抑制和清除某些自由基的能力。在发酵食品中,酿酒酵母与马克思克鲁维酵母对食物风味做出的贡献较大<sup>[11]37-39[18]47-48</sup>,而毕赤酵母一般因其产气效应被视为污染菌<sup>[15]</sup>,本试验中筛选出抗氧化活性较高的7株酵母中也未发现毕赤酵母。

(3) 关于这78株酵母菌的生理生化特性以及对新疆传统发酵乳制品风味方面的作用有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 秦艳婷. 新疆地区传统发酵乳制品中乳酸菌的分离鉴定及生物多样性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014: 1-15.
- [2] BUCHL N R, SEILER H. Yeasts and molds-yeasts in milk and dairy products[M]. Technische Universitat, Munchen, Germany, 2011: 2 761-2 769.
- [3] GARCIA Hernandez, RODRIGUEZ Y, BRANDAO Z, et al. Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic[J]. Research In Veterinary Science, 2012(93): 798-802.
- [4] LABRIE H R, FLISS S. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2012(3): 416-421.
- [5] ARROYO Lopez, ROMERO F N, et al. Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing [J]. Frontiers in Microbiology, 2012(5): 34-38.
- [6] VENTRICE R M, VARONE D, SIDARI M A, et al. HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. [J]. Pharm Biomed Anal, 2006, 42(1): 46-55.
- [7] CAMARGO G L, GIANETI F, CAMPOS M. Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(11): 3 493-3 500.
- [8] RAWAT S. Food spoilage: microorganisms and their prevention[J]. Asian Journal of Plant Science and Research, 2015, 5(4): 47-56.
- [9] ANTUNES J, AGUIAR C. Search for killer phenotypes with potential for biological control [J]. Annals of Microbiology, 2012, 62: 427-433.
- [10] KURTZMAN C P, ROBNEI C J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73: 331-371.
- [11] 吴阳. 赛里木酸奶中酵母菌筛选鉴定及发酵特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [12] LACHANCE M A, DANIEL H M. The D1/D2 domain of the large\_subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitanae* is unusually polymorphic[J]. FEMS Yeast Research, 2003, 4: 253-258.
- [13] 王庆国, 刘天明. 酵母菌分类学方法研究进展[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 96-100.
- [14] 陈君, 刘红芳, 徐靓, 等. 抗氧化酵母菌对小鼠的抗衰老作用初探[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(6): 1 284-1 289.
- [15] CAURE Portugal, PINTO L. Potential spoilage yeasts in winery environments: Characterization and proteomic analysis of *Trigonopsis cantarellii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015: 113-12.
- [16] 李绍兰, 周斌, 等. 真菌 DNA 提取方法的改良[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2002, 24(6): 471-472.
- [17] 谢婕, 赵欣, 等. 传统发酵牦牛酸乳中酵母菌的分子生物学鉴定[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 114-118.
- [18] 吐汗姑丽·托合提. 拜城赛里木拉丝酸奶微生物多样性分子解析及其益生特性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2015: 1-39.
- [19] KURTZMAN C P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 325-332.
- [20] 尹亚辉, 安文涛, 董亮, 等. 不同世代酿酒酵母胞内抗氧化酶活性变化[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 38-41.
- [21] 曾文. 疏花水柏枝内生真菌抗氧化能力分析及应用[D]. 宜昌: 三峡大学, 2015: 1-15.
- [22] GABRIELA Diosma. DAVID E Romanin. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30: 43-53.
- [23] YANG Jun-jun, GUO Chun-feng. Isolation and identification of yeast in yak milk dreg of Tibet in China[J]. Dairy Sci. & Technol, 2014(94): 455-467.
- [24] 李静, 石静. 新疆酸驼乳中酵母菌的生理生化鉴定及初步应用[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(1): 22-27.
- [25] 戴玥, 余晓斌. 抗氧化菌的筛选及混菌发酵红景天条件优化[J]. 日用化学工业, 2017, 47(7): 408-413.
- [26] 韦琰琰. 食品中具有抗氧化活性的酵母菌的筛选及其特性的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 1-28.