

新疆传统发酵乳制品及酵头中酵母菌的分离鉴定

王冠群¹, 韩培杰², 杨文菊³, 王新宇¹, 许倩¹, 朱丽霞^{*1}

(1. 新疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 真菌学国家重点实验室, 北京 100101; 3. 新疆产品质量监督检验研究院, 新疆 乌鲁木齐 830004)

摘要: 研究了新疆传统发酵食品中的酵母菌菌群结构及其遗传多样性。采用 YPD 富集培养后稀释涂布的方法, 从 12 个地区 161 份样品中分离得到 472 株酵母菌, 通过 YPD 菌落形态、WL 营养培养基聚类分析为 16 类, 挑选不同表型的代表菌株 11 株进行 5.8S-ITS 区和 26S D1/D2 区测序, 通过国际核酸数据库分析鉴定菌种。从分离到的 472 株酵母菌中, 共鉴定出 6 个属 8 个种, 其中包括 263 株 *Saccharomyces cerevisiae*, 156 株 *Issatchenkia orientalis*, 10 株 *Torulaspora delbrueckii*, 9 株 *Pichia fermentans*, 21 株 *Saccharomyces unisporus*, 7 株 *Metschnikowia pulcherrima*, 4 株 *Pichia membranifaciens*, 2 株 *Clavispora lusitaniae*, 地区优势菌东方伊萨酵母和酿酒酵母。不同基物与不同地区的菌群结构明显不同。上述结果表明新疆的酵母资源具有丰富多样, 本研究初次全面地对新疆传统食品的酵母菌群落结构进行分析, 为新疆传统食品微生物资源的开发利用, 与传统食品的质量控制等奠定了基础。

关键词: 酵母菌; 5.8S-ITS; 26SrDNA; 分离鉴定

中图分类号: TS 261.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)07—0691—08

Isolation and Identification of Yeasts from the Traditional Fermented Dairy Products and Fermented Flour Starters in Xinjiang

WANG Guanqun¹, HAN Peiji², YANG Wenju³, WANG Xingyu¹, XU Qian¹, ZHU Lixia^{*1}

(1. Xinjiang Production & Construction Group Key Laboratory of Agricultural Products Processing in Xinjiang South, Alar 843300, China; 2. State Key Laboratory of Mycology, Beijing 100101, China; 3. Xinjiang Product Quality Supervision and Inspection Institute, Urumchi 830004, China)

Abstract: In the study, the local yeast community from the traditional fermented foods (Qiaotou and horse milk wine) in Xinjiang was analyzed. The total 472 yeast isolates of 161 samples were collected from 21 different regions using the methods of YPD enrichment culture, dilution and spread-culture, and were grouped into 16 different culture types by the WL colony morphology. Eleven strains representing different WL types were sequenced with 5.8S-ITS region and 26S D1/D2 region primers, and blasted in the International Nucleotide Sequence Database to identify them into 6 genus and 8 species. Results showed that among the 472 yeast isolates, there were 263

收稿日期: 2015-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260393; 13060023); 真菌学国家重点实验室开放课题(2014); 兵团工业科技攻关计划项目(2014BA026)。

* 通信作者: 朱丽霞(1975—), 女, 新疆昌吉人, 副教授, 主要从事食品微生物及传统发酵食品研究。E-mail: judyzhu1@sina.com

Saccharomyces cerevisiae strains, 156 *Issatchenkia orientalis*, 10 *Torulaspora delbrueckii*, 9 *Pichia fermentans*, 21 *Saccharomyces unisporus*, 7 *Metschnikowia pulcherrima*, 4 *Pichia membranifaciens* and 2 *Clavispora lusitaniae*. It was obvious that *Saccharomyces* sp. and *Issatchenkia* sp. were dominant in the traditional yeast community and rich diversities occurred in different regions and different isolated substances. This study was the first time to show the yeast community in the traditional foods from the extensive sampled regions and would encourage further utilization of the potential yeast strains and provide a good reference for the quality of traditional fermented foods in Xinjiang.

Keywords: yeast community, 5.8S-ITS, 26SrDNA, identification

新疆地区具有许多传统发酵的食品例如馕、马奶酒、以及地区特色酒。这些食品具有非常古老的文化历史,随着文化交流的不断深入,新疆的传统发酵食品受到了内地以及国外的重视与欢迎。但是这些食品涉及的酵母菌的种类、群落结构尚缺乏总体分析,通过对这些发酵食品的酵母菌群落结构分析可以研究新疆发酵饮食文化的历史传播途径以及对新疆酵母菌的群落分布有系统的了解。

传统发酵食品中酵母菌资源的收集、分类鉴定和生物学特性的研究是其开发利用的基础。虽然我国保藏中心建立的比较早,但对传统发酵食品中酵母菌种的收集以及保存还不足,尤其随着活性干酵母的快速和广泛使用,地方特色发酵食品的传统技艺随之改变或消失,使得本土特色酵母资源保护和开发利用凸显其重要性和紧迫性。

酵母菌的分类比较复杂,虽然已知的酵母种属超过 1 000 种^[1],但普遍认为这些菌种只占了所有

酵母种属的 1%。在过去的研究中对酵母种属的区分,主要根据它们的形态学特征和生理生化特性进行区分。随着对酵母基因组的不断认识和深入,26S D1/D2、5.8S-ITS 等序列分析方法在酵母菌的鉴定方法中逐渐显示出了很大的优势^[2-3]。将酵母菌的表型特征与基因型特征结合起来对传统发酵食品中酵母菌的分离鉴定,对以后其他的传统发酵食品中酵母菌的分析具有重要的参考意义,同时这也有利于深入准确地了解酵母菌种资源在传统发酵食品中的分布并对此进行科学的有效利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

新疆各地区采集的酵头:面制品的酵头,且为土法制作,不添加活性干酵母;发酵型乳制品:包括马奶酒、酸奶、奶疙瘩等,样品共计 161 份,采自 21 个地区(见表 1)。

表 1 各地区采集样品

Table 1 Samples collected from different areas

地区-地点	样品数/个		地区-地点	样品数/个	
	乳制品	酵头		乳制品	酵头
伊犁-巧尔玛	11	0	伊犁-霍城	7	1
沙湾-博古通	6	0	伊犁-清河县	6	0
沙湾-安集海	0	4	且末-塔其让乡	0	4
伊犁-巴音沟	3	0	阿克苏-阿瓦提	0	2
巴里坤-石城子村	0	3	喀什-老城区	0	1
巴里坤-红山农场八连	1	7	阿克苏-轮台	0	3
巴里坤-海子沿村	4	10	阿克苏-柯坪	1	0
木垒-新户村	7	8	焉耆-七个里星阵	0	1
塔城-扎尔海	12	3	塔城-花园乡	4	14
塔城-布尔津	18	15	阿克陶	0	1
塔城市	2	2	总计	82	79

试剂:酵母膏,蛋白胨,WL 营养琼脂培养基;5.8S-ITS 引物 ITS1/ITS4、26S D1/D2 引物 NL1/NL4;上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 研究方法

1.2.1 培养基的配置 富集培养基:YPD 培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母膏 10 g,水 1000 mL,pH 自然,121 ℃ 15 min。分离及表型归类培养基:WL 营养琼脂培养基(青岛日水生物有限公司生产的商业培养基)80 g,加水定容至 1000 mL,pH 自然,121 ℃ 15 min。

1.2.2 样品富集培养 固体样品 1 g 左右,液体样品 200 μL 接种于 3 mL YPD 液体培养基(酵母膏,质量分数 1.0%;蛋白胨,质量分数 2.0%;葡萄糖,质量分数 2.0%)内置于 28 ℃恒温培养箱内富集培养 7 d。

1.2.3 酵母菌分离 富集的酵母菌液用无菌水稀释 10⁻⁴ 倍吸取 100 μL 接种于 WL 营养琼脂培养基,置于 28 ℃恒温培养箱内培养 3 d,进行菌落形态观察,并挑取单菌落进行纯化保藏,备用。

1.2.4 酵母菌的分子鉴定 DNA 的提取采用冻融法^[4],5.8S-ITS 区和 26S D1/D2 PCR 扩增条件及系统发育分析按照相关文献报道^[5-6],将 PCR 产物委托上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果构建系统发育树进行有效分析^[5-6]。

2 结果与讨论

2.1 利用 WL 营养琼脂培养基对实验材料的初步分类结果

实验分离株通过 WL 营养琼脂培养基菌落表型观察与 Cavazza et al 的描述^[7-9]对比分析(见表 2 和图 1),其中表型 1、2、4、6、7、10、11 只能确定为毕赤酵母,表型 3、8 为酿酒酵母,表型 5、9 为类酿酒酵母,表型 13 为梅奇酵母,表型 15 为膜璞毕赤酵母,表型 12、14、16 在文献中未提及。

将 169 份样品富集培养后,利用 WL 营养琼脂培养基进行分离,共得到 472 个菌种,根据各地区分离出的酵母菌在 WL 营养琼脂培养基上的菌落表型进行分类发现可将菌种分为 16 种表型,其中表型 1、表型 3 以及表型 8 广泛存在于 21 个地区内(见图 2)塔城-布尔津地区中的酵母菌菌落形态最多,有 12 种;阿瓦提和喀什地区的酵母菌菌落形态最少仅有一种(见图 2)。

2.2 分子系统学分析和分类

2.2.1 5.8S-ITS 区序列分析结果 对在新疆传统发酵食品中分离出的 472 株酵母菌,挑选出的 16 株不同表型菌株的 ITSrDNA 区进行序列测定分析,结果得到:表型 1、7、10、11 的菌鉴定为 *I.orientalis*;表型 2、4、6 的菌鉴定为 *P.fermentans*,但与模式菌的

表 2 WL 营养琼脂培养基培养类型及其描述

Table 2 Types and description of yeast growing on the WL agar

类型	WL 形态描述	与文献对应的菌种	类型	WL 形态描述	与文献对应的菌种
1	白色、圆形突起、表面粗糙、奶油状	毕赤酵母	9	绿色、边缘为白色、表面光滑、有光泽、突起	类酿酒酵母
2	淡绿色、圆形突起、表面褶皱、边缘不整齐、奶油状	毕赤酵母	10	绿色、边缘为白色、表面粗糙、突起、面粉状	毕赤酵母
3	淡绿色、圆形突起、表面光滑有光泽、边缘整齐、奶油状	酿酒酵母	11	淡绿色、边缘为白色、面粉状、突起、表面粗糙	毕赤酵母
4	淡绿色、突起、边缘不规则、表面粗糙、奶油状	毕赤酵母	12	白色、小菌落	无对应种
5	白色、中部为绿色小点、菌落较小	类酿酒酵母	13	灰绿色、边缘为红色、突起、表面光滑、有光泽、奶油状	梅奇酵母
6	淡绿色、突起、边缘不规则、表面粗糙	毕赤酵母	14	白色、平坦、小菌落	无对应种
7	白色、面粉状、表面粗糙。	毕赤酵母	15	白色、表面粗糙、面粉状、背部中间为绿色、边缘为白色	膜璞毕赤酵母
8	白色、圆形突起、表面光滑、有光泽、边缘整齐、奶油状	酿酒酵母	16	圆形、中间灰绿色、有绿色线分层、外边为白色、表面光滑、有光泽、突起	无对应种

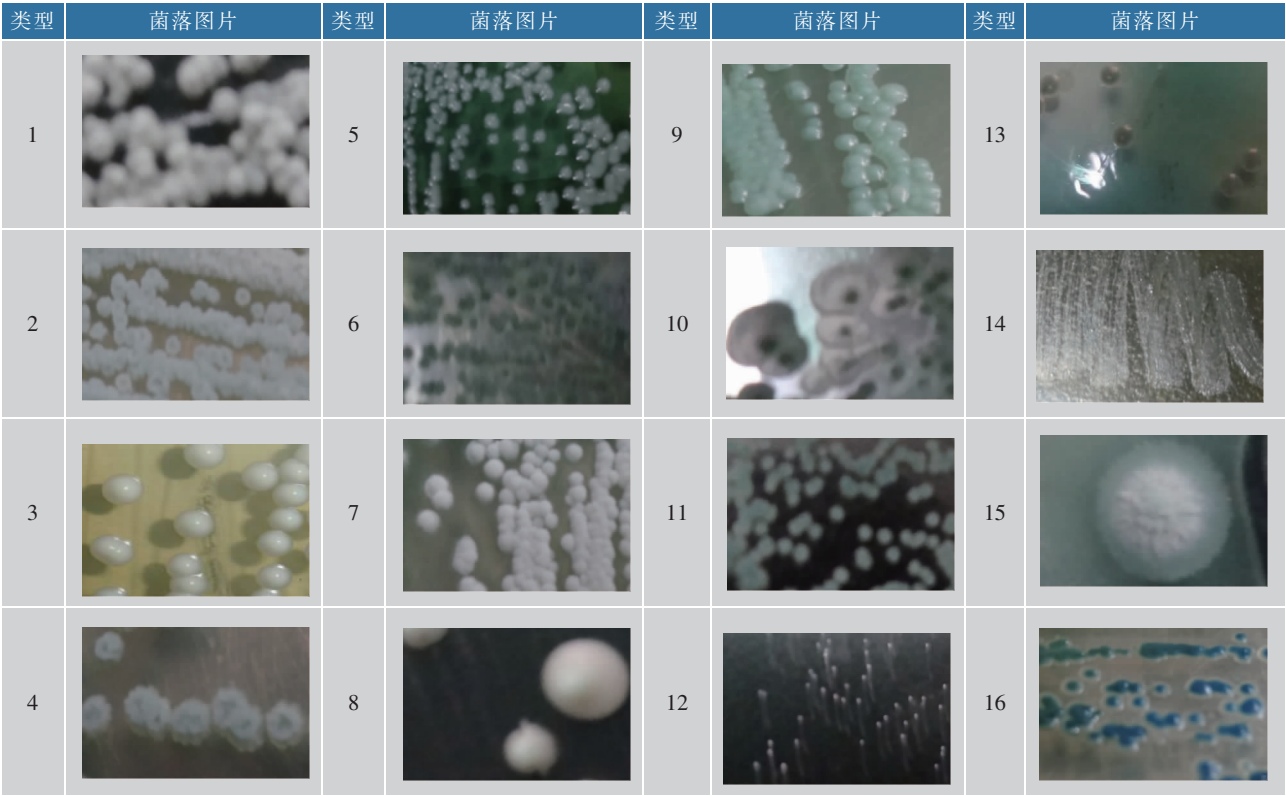


图 1 不同表型在 WL 培养基上的形态图片

Fig. 1 Pictures of different phenotypes on WL medium

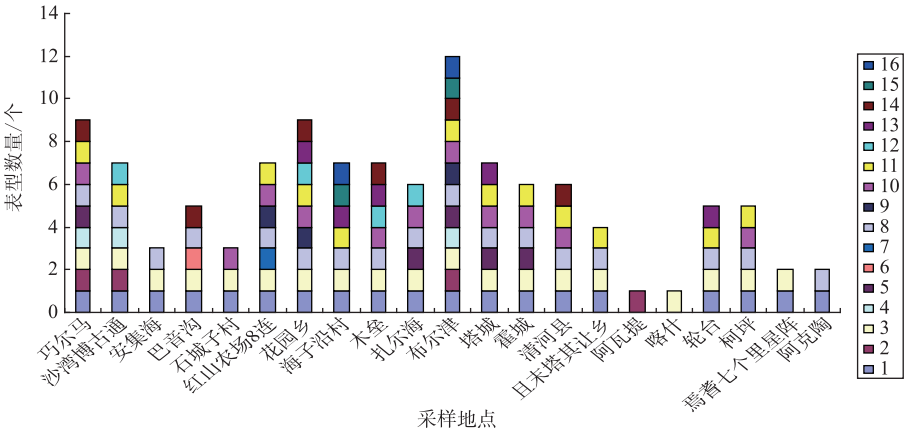


图 2 不同表型酵母菌在各地区的分布

Fig. 2 Distribution of different yeast phenotypes in various regions

相似度不等,种间可能存有较大的差异;表型 3、8、9 鉴定为 *S.cerevisiae*,但表型 3 和表型 8 与模式株的相似度为 98%,说明这两类型与表型 8(或模式株)在遗传基因上可能有较大的变异;表型 5 鉴定为 *T.delbrueckii*;表型 12、14 鉴定为 *K.aerobia*,但与模式菌比对,相似性仅为 93%,需要进一步利用其他方法进行鉴定;表型 13 鉴定为 *M.Chrysoperlae*,与模

式菌相似度小于 99%;表型 15 鉴定为 *P.membranifaciens*;表型 16 鉴定为 *C.lusitaniae*。16 中有 4 株 *L.orientalis*,3 株 *P.fermentans*,3 株 *S.cerevisiae*,1 株 *T. delbrueckii*,2 株 *K.aerobia*,1 株 *M.Chrysoperlae*,1 株 *P.membranifaciens*,1 株 *C.lusitaniae*,共 7 个属 8 个种(见图 3)。

2.2.2 26S 区序列分析结果 对在新疆传统发酵食

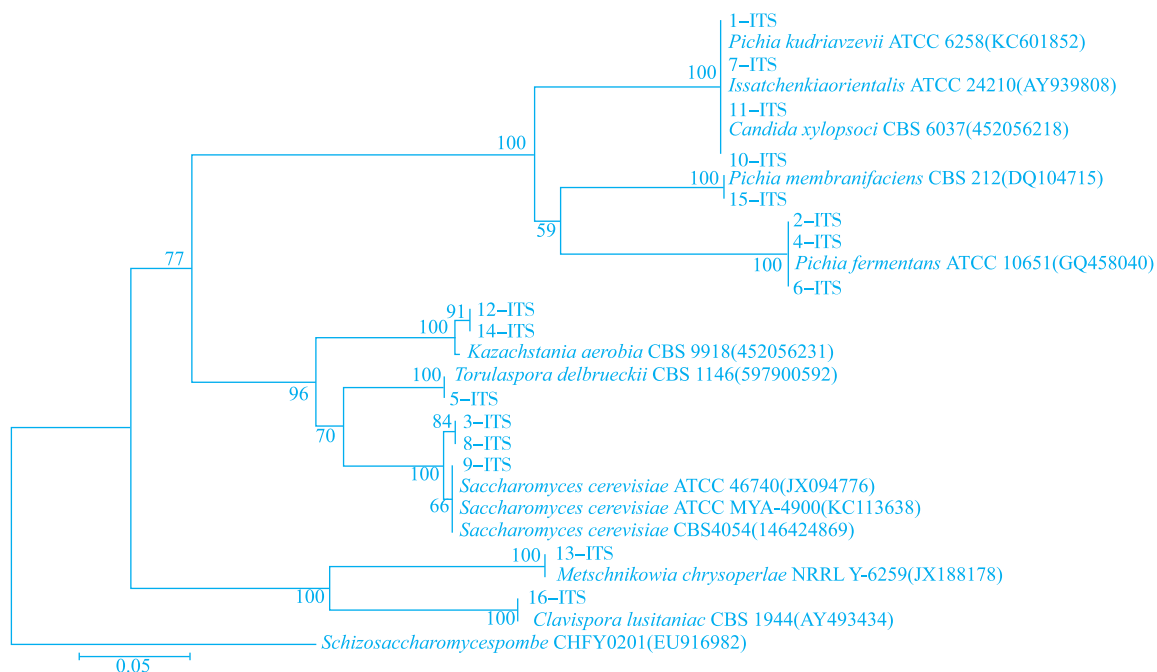


图3 基于5.8S-ITS rDNA区域序列和NJ法不同表型酵母菌和相关酵母模式菌株系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of different phenotypes isolates and related model strains based on 5.8S-ITS rDNA region sequences and the NJ method

品中挑选出的16株不同表型菌株的26SrDNA D1/D2区进行序列测定(1-26S~16-26S编号,与上述1-ITS~2-ITS一一对应),根据测序结果分析,得到:表型1、7、10、11的菌鉴定为*P.kudriavzevii*;表型2、4、6鉴定为*P.fermentans*;表型3、8、9鉴定为*S.cerevisiae*;表型5鉴定为*T.delbrueckii*;表型12、14鉴定为*S.unisporus*;表型13鉴定为*M.pulcherrima*;表型15鉴定为*P.membranifaciens*、表型16鉴定为*C.lusitanae*。在16株代表菌种中有4株*P.kudriavzevii*,3株*P.fermentans*,3株*S.cerevisiae*,1株*T.delbrueckii*,2株*S.unisporus*,1株*M.pulcherrima*,1株*P.membranifaciens*,1株*C.lusitanae*,共6个属8个种。所有的分离菌株与对应的模式菌株的同源性均在99%以上,并与之聚在一起,这证明酵母菌26S rDNA D1/D2区域序列分析结果的准确性(见图4)。26S rDNA D1/D2区域与5.8 S-ITS区域测序的结果对比分析都能很好的鉴定出种,但5.8 S-ITS区域对种内差异性更为敏感。

2.3 各地方菌种分布分析

在所有的分离菌株结果统计后发现,所有鉴定种在酵头和发酵乳制品中均发现(见表3),但分离于酵头的*S.cerevisiae*株数明显多于乳制品中,说

明酵头更容易保存酿酒酵母;除去*M.pulcherrima*和*C.lusitanae*,其余非酿酒酵母的分离株数来自乳制品中的明显多于来自酵头的,其中东方伊萨酵母在非酿酒酵母中所占比例最高,分别在酵头和乳制品中分别占76.34%、73.27%;葡萄牙棒孢酵母在非酿酒酵母中所占比例最低,分别在酵头和乳制品中分别占1.08%、0.86%,上述说明非酿酒酵母在乳制品更容易滋生与繁殖(见表4)。

*I.orientalis*和*S.cerevisiae*广泛分布在各地区的乳制品及酵头中;*T.delbrueckii*仅分布在伊犁和塔城地区的乳制品及酵头中;*S.unisporus*分布在伊犁和沙湾地区的乳制品中、塔城和木垒地区的乳制品及酵头中;*P.fermentans*分布在伊犁和沙湾地区的乳制品中,塔城地区的乳制品及酵头中,阿克苏地区酵头中;*M.pulcherrima*分布在塔城地区的乳制品及酵头中,木垒地区的乳制品中、巴里坤和阿克苏地区的酵头中;*P.membranifaciens*和*C.lusitanae*分布在塔城地区的乳制品中和巴里坤地区地区的酵头中。8种酵母菌在发酵型乳制品和酵头中均有分布,但在乳制品中的各种非酿酒酵母菌占非酿酒酵母的比例高于酵头。这说明乳制品可以比酵头提供非酿酒酵母菌的生长环境。上述表明不同基物和

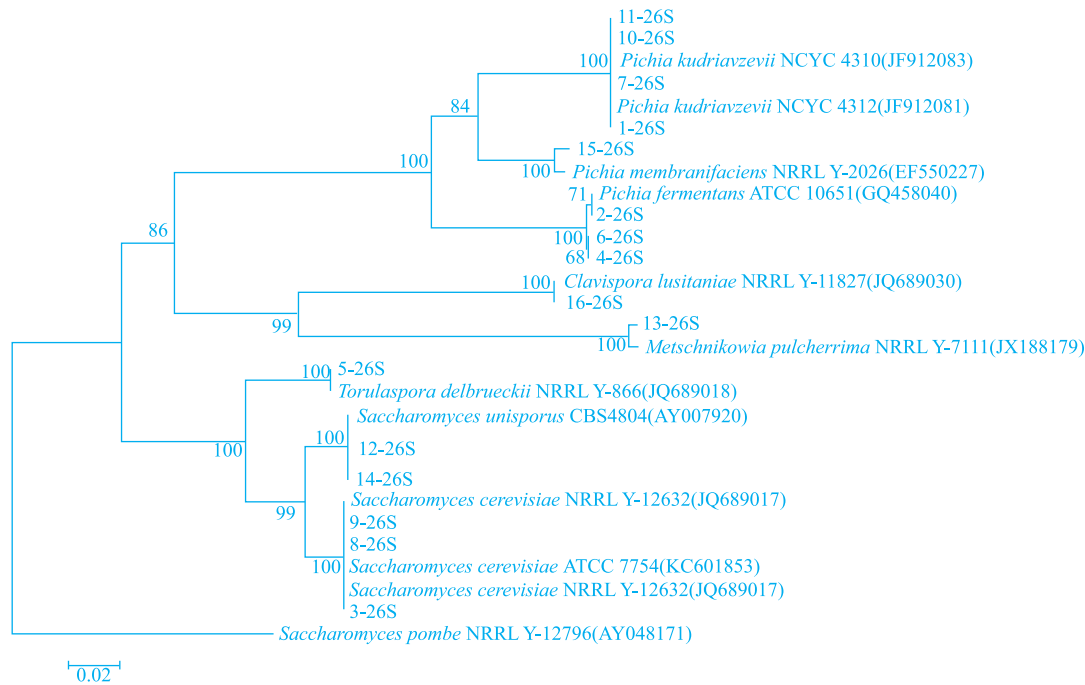


图 4 不同表型的酵母菌26SrDNA D1/D2 区域序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of different phenotypes isolates and related model strains based on 26SrDNA D1/D2 region sequences and the NJ method

表 3 不同酵母菌在不同基物中的分布

Table 3 Distribution of isolates in different isolated substances

鉴定菌种	分离株数(株)		非酿酒酵母比例/%	
	乳制品	酵头	乳制品	酵头
<i>S. cerevisiae</i>	96	167	—	—
<i>L.orientalis</i>	85	71	73.27	76.34
<i>T. delbrueckii</i>	8	2	6.90	2.15
<i>P. fermentans</i>	6	3	5.17	3.22
<i>S.unisporus</i>	11	10	9.48	10.75
<i>M. pulcherrima</i>	2	5	1.72	5.38
<i>P. membranifaciens</i>	3	1	2.59	1.08
<i>C. lusitaniae</i>	1	1	0.86	1.08

表 4 不同菌种在各地区的分离菌株中的分布

Table 4 Distribution of different yeast species in each region

地区-地点	菌种	分离株数(株)		地区-地点	菌种	分离株数(株)	
		乳品	酵头			乳品	酵头
伊犁-巧尔玛	<i>L.orientalis</i>	8	0	塔城-布尔津	<i>S. cerevisiae</i>	14	26
	<i>P. fermentans</i>	2	0		<i>L.orientalis</i>	27	20
	<i>S.cerevisiae</i>	14	0		<i>T. delbrueckii</i>	3	0
	<i>T. delbrueckii</i>	1	0		<i>P. fermentans</i>	1	2
	<i>S.unisporus</i>	2	0		<i>S. unisporus</i>	3	2
塔城-花园乡	<i>L.orientalis</i>	5	7		<i>P.membranifaciens</i>	3	0
	<i>S.cerevisiae</i>	3	39		<i>C. lusitaniae</i>	1	0

续表 4

地区-地点	菌种	分离株数(株)		地区-地点	菌种	分离株数(株)	
		乳品	酵头			乳品	酵头
沙湾-博古通	<i>S. unisporus</i>	0	3	塔城市	<i>I. orientalis</i>	1	2
	<i>M. pulcherrima</i>	0	1		<i>S.cerevisiae</i>	7	2
	<i>I.orientalis</i>	6	0		<i>T. delbrueckii</i>	1	1
	<i>P. fermentans</i>	2	0		<i>M.pulcherrima</i>	1	1
	<i>S.cerevisiae</i>	8	0	伊犁-霍城	<i>I.orientalis</i>	5	3
	<i>S.unisporus</i>	1	0		<i>S.cerevisiae</i>	1	18
沙湾-安集海	<i>I. orientalis</i>	0	3		<i>T. delbrueckii</i>	1	1
	<i>S. cerevisiae</i>	0	7	伊犁-清河县	<i>I.orientalis</i>	4	0
伊犁-巴音沟	<i>I.orientalis</i>	1	0		<i>S. cerevisiae</i>	14	0
	<i>P.fermentans</i>	1	0		<i>S. unisporus</i>	1	0
	<i>S. cerevisiae</i>	9	0		<i>I.orientalis</i>	0	5
	<i>S.unisporus</i>	1	0		<i>S. cerevisiae</i>	0	3
巴里坤-石城子村	<i>I.orientalis</i>	0	4	阿克苏-阿瓦提	<i>P.fermentans</i>	0	1
	<i>S. cerevisiae</i>	0	7	阿克陶	<i>I.orientalis</i>	0	1
巴里坤-红山农场八连	<i>I. orientalis</i>	0	5		<i>S. cerevisiae</i>	0	2
	<i>S.cerevisiae</i>	2	16	喀什-旧城	<i>S.cerevisiae</i>	0	4
巴里坤-海子沿村	<i>I. orientalis</i>	2	6	阿克苏-轮台	<i>I.orientalis</i>	0	6
	<i>S.cerevisiae</i>	5	19		<i>S.cerevisiae</i>	0	4
	<i>M. pulcherrima</i>	0	2		<i>M.pulcherrima</i>	0	1
	<i>P.membranifaciens</i>	0	1	阿克苏-柯坪	<i>I. orientalis</i>	3	0
	<i>C. lusitaniae</i>	0	1		<i>S. cerevisiae</i>	2	0
木垒-新户村	<i>I.orientalis</i>	8	6	焉耆-七个里星镇	<i>I. orientalis</i>	0	2
	<i>S.cerevisiae</i>	3	16		<i>S.cerevisiae</i>	0	3
	<i>S.unisporus</i>	4	2				
	<i>M. pulcherrima</i>	1	0				
塔城-扎尔海	<i>I.orientalis</i>	13	3				
	<i>S.cerevisiae</i>	14	1				
	<i>S.unisporus</i>	0	2				
	<i>T.delbrueckii</i>	2	0				

不同地点的酵母菌群落结构具有明显的差异。

3 讨论

新疆为多民族聚集地,连接西欧与东亚的特殊地理位置,使其食俗文化具有明显的地域性、多元性、随着各类文明的传播而表现出强的融合性。最能体现这些新疆地域食俗文化特征的为新疆酵面食品及发酵乳制品。例如,馕作为适应自然条件和人类社会需要的“生态食物”,起源于新疆南部地区,是新疆绿洲农耕土著民族发明创造并适应当地干旱少雨气候条件的产物,在新疆南部回鹘化、伊斯兰化的过程中以及维吾尔族的演变过程中,馕形

成地方特色食俗文化的核心^[9],馕亦为伊朗、巴基斯坦、印度、伊拉克、埃及等阿拉伯国家的主食之一,其形成过程是否也是自适应性产物,未有具体的文献参考,但随着丝路文明的传播,馕在上述地域和国家之间进行传播。在中国,酵面食品在商周已经存在,随着小麦粉工艺的成熟,尤其绢筛的发明,在西汉时期,类似馒头一类的食品也已经具备条件,随着丝路文明的传播而不断发扬光大^[10]。新疆传统自然发酵乳制品当地饮食民俗的主要组成部分,沿袭着边疆游牧民族地区乳制品发酵技术脉络,同时对中原地区乳制品发酵技术具有重要的影响^[11]。

上述依托于馕、馒头、传统发酵乳制品的食俗

文化的起源与传播,主要籍于相关古文籍或出土文物的考究,但缺乏自然科学的支撑。作者以分离自传统制作酸奶、马奶酒、奶疙瘩及制馕酵头中的酵母菌为研究对象,并对这些发酵食品的酵母菌群落结构分析,对于研究新疆发酵饮食文化的历史传播途径以及进行科学的有效利用奠定基础,为新疆传统发酵食品的研究和发展提供一定的依据。

4 结 语

作者在新疆省内的 21 个地区采集的 161 个样本中共分离得到 472 株酵母菌,通过 WL 营养琼脂培养基的初步鉴定、26SrDNAD1/D2 区域序列鉴定、5.8S-ITS 区域序列鉴定以及代表菌株系统发育分析,对所分离到的菌株进行了较系统的分类鉴定研究和多样性分析。结论如下:所有菌株经鉴定为 6 个属 8 个种。分别为 *I.orientalis* (东方伊萨酵母),*P. fermentans* (毕赤发酵酵母),*S. cerevisiae* (酿酒酵母),*T. delbrueckii* (戴尔凯氏有孢圆酵母),*S.*

unisporus (单孢酵母),*M. pulcherrima* (美极梅奇酵母),*P. membranifaciens* (膜醭毕赤酵母),*C. lusitaniae* (葡萄牙棒孢酵母)。优势种为东方伊萨酵母、毕赤发酵酵母、酿酒酵母。

WL 营养琼脂培养基表型归类针对酵母菌分类只能进行较为简单的分类为酿酒酵母、梅奇酵母、毕赤酵母。其他类型酵母都不能进行鉴定。对酿酒酵母和戴尔凯氏有孢圆酵母不能进行分辨。同时对于毕赤酵母属中的东方伊萨酵母、毕赤发酵酵母以及膜醭毕赤酵母也不能进行分别。26S rDNA D1/D2 区域与 5.8 S-ITS 区域测序的结果对比分析都能很好的鉴定出种,但 5.8 S-ITS 区域对种内差异性更为敏感。

16 种中 8 种酵母菌在发酵型乳制品和酵头中均有分布,在乳制品中的占非酿酒酵母的比例高于酵头。不同基物 and 不同地点的酵母菌群落结构具有明显的差异。

参考文献:

- [1] 孙万儒. 酵母菌[J]. 生物学通报, 2008, 42(11): 5-10.
SUN Wanru. Yeast[J]. *Bulletin of Biology*, 2008, 42(11): 5-10. (in Chinese)
- [2] Vasdinyei R, Deak T. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 86(1): 123-130.
- [3] Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(1): 329-337.
- [4] 冯姝, 朱丽霞, 侯旭杰, 等. 慕萨莱思酵母菌 YPD 表型多样性及其酿酒酵母 δ 序列遗传多样性分析[J]. 中国酿造, 2012, 31(2): 165-170.
FENG Shu, ZHU Lixia, HOU Xujie, et al. Phenotypic diversity of yeast based on YPD colony and genotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* associated with Musalais based on the δ sequence [J]. *China Brewing*, 2012, 31(2): 165-170. (in Chinese)
- [5] 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学意义[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32.
BAI Fengyan, JIA Jianhua, LIANG Huiyan. Molecular taxonomic study on the problematic candida strains based on 26S rDNA D1/D2 domain sequence comparison[J]. *Mycosystema*, 2002, 21(1): 27-32. (in Chinese)
- [6] 倪慧娟. 新疆地区和青海地区传统发酵乳制品中酵母菌的生物多样性[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [7] 徐艳文. 甘肃地区葡萄酒相关酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [8] 刘爱国. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [9] 李正元. 馕的起源[J]. 中国边疆史地研究, 2012, 1: 12.
LI Zhengyuan. On the origin of Nang cake[J]. *China's Borderland History and Geography Studies*, 2012, 1: 12. (in Chinese)
- [10] 陈绍军. 馒头及酵面食品起源问题的再认识[J]. 农业考古, 1995, 3: 218-220.
CHEN Shaojun. Recognition of leavened bread and pasta origin issues [J]. *Agricultural Archaeology*, 1995, 3: 218-220. (in Chinese)
- [11] 董杰, 张和平. 中国传统发酵乳制品发展脉络分析[J]. 中国乳品工业, 2014, 11: 26-30.
Dong jIE, ZHANG Heping. Development venation of Chinese traditional fermented dairy products [J]. *China Dairy industry*, 2014, 11: 26-30. (in Chinese)