

神索葡萄自然发酵酵母菌群研究*

宋育阳¹ 白稳红² 刘延琳^{1* *}

1. 西北农林科技大学葡萄酒学院/陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心, 杨凌 712100;

2. 宁夏御马葡萄酒有限公司, 青铜峡 751600

摘要 利用 WL 营养琼脂培养基, 对宁夏御马葡萄酒厂的神索葡萄自然发酵过程中不同阶段分离得到的 105 株葡萄酒相关酵母进行初步鉴定和聚类, 进而对代表性菌株进行 26S rDNA D1/D2 区的序列分析。结果表明: 供试酵母菌株经分类鉴定应归入 4 属 5 种, 分别是葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum*、毕赤克鲁维酵母 *Pichia kluyveri*、假丝酵母 *Candida zemplinin*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和巴氏酵母 *Saccharomyces pastorianus*, 分别占分离菌株总数的 3%、8%、1%、1% 和 87%; 非酿酒酵母 non-*Saccharomyces* 在前期、中期和后期的数量分别占各发酵阶段菌株总数的 24.7%、3.9% 和 0%, 呈动态减少趋势。

关键词 神索葡萄; 自然发酵; 酵母菌; WL 营养琼脂培养基; 序列分析

中图分类号 TS 262.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0513-05

宁夏贺兰山东麓地区是我国优质酿酒葡萄生态区之一, 该地区的葡萄酒被批准为原产地保护产品。研究该地区葡萄自然发酵过程中的酵母菌群, 可以为筛选适合该产区的优良酿酒酵母菌种及生产地域特色的葡萄酒奠定基础。传统的酵母菌鉴定主要依据其形态特征和生理特征, 但这些特征容易受到培养条件等因素的影响而出现不确定的结果, 工作量而且耗时^[1]。为快速简便地监测发酵过程中的微生物种类变化, Christina 等^[2]设计了一种观测酿造和工业发酵过程中微生物种群的非选择型培养基——WL 营养琼脂培养基(Wallerstein laboratory nutrient agar), 可用来区分和鉴定一些常见的葡萄酒相关酵母。研究表明, 葡萄酒自然发酵过程中出现的大多数典型的酵母菌都可以用 WL 培养基。根据菌落的颜色及形态对酵母菌株进行区分和归类^[2-4], 其鉴定结果与分子方法的鉴定结果基本一致。

在分子研究领域, 随着 DNA 序列分析技术的日趋成熟和简易化, rDNA 的序列分析被应用于酵母菌的分类学研究中。rRNA 结构具有保守性和高

变性, 保守性反映生物物种的亲缘关系, 而高变性则揭示生物物种的特征核酸序列。26S rRNA 是核糖体 RNA 的一个亚基, 而 26S rDNA 是编码该亚基的基因, 26S rDNA 的 D1/D2 区域位于大亚基的 5' 端, 序列长度在 600 bp 左右^[5], 目前这一区域序列在酵母菌分类研究中的应用最为广泛。

笔者利用 WL 营养琼脂培养基对宁夏御马葡萄酒厂的神索葡萄自然发酵过程中不同阶段分离的酵母进行分类, 并对不同阶段分离的酵母菌的动态变化进行分析; 在 WL 营养琼脂培养基聚类分析的基础上用 26S rDNA 的 D1/D2 区的序列分析法对所具有代表性的 7 株酵母菌进行测序鉴定, 确定其分类学地位, 揭示分离菌株的多样性, 为我国本土优良葡萄酒酵母的选育提供种质资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1) 菌株。宁夏御马葡萄酒厂神索葡萄品种自然发酵过程中分离的酵母菌株(共 105 株), 其中发酵

收稿日期: 2009-10-13; 修回日期: 2010-03-26

* 国家葡萄产业技术体系专项经费(nycytx-30)资助

* * 通讯作者. E-mail: lylsun@yahoo.com.cn

宋育阳, 女, 1983 年生, 博士研究生. 研究方向: 酿酒微生物. E-mail: songyuyang1208@126.com

初期 49 株, 发酵中期 26 株, 发酵后期 30 株。

2) YPD 培养基。葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸粉 1%, pH 值自然, 121 °C 灭菌 20 min, 添加 100 mg/L 的氯霉素以排除细菌的干扰, 固体培养基可加入 2% 琼脂。酵母菌株的初步形态分类用 WL 营养琼脂培养基^[2], 调 pH 值至 6.5, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1) 菌株分离。将成熟果粒破碎、带皮进行自然发酵, 分别在葡萄酒发酵的初期、中期、后期等 3 个时期取样, 初期为发酵启动期, 中期为发酵旺盛期, 后期为发酵消退期。样品用稀释梯度涂布法接种于固体 YPD 培养基, 在 28 °C 下培养 3 d, 然后根据菌落颜色及形态, 每平板选择 15~20 个单菌落在 YPD 液体培养基中培养 1 d, 活化的菌液与 30% 的无菌甘油以体积比为 1:1 混合于 1.5 mL 离心管中, -70 °C 下保藏。

2) 菌株的 WL 营养琼脂培养基聚类分析。将保藏的酵母菌株用液体 YPD 培养基活化后, 划线接种于 WL 培养基上, 28 °C 培养 5~7 d 后, 观察记录菌落的颜色和形态, 并根据菌落的颜色和形态进行聚类。

3) PCR 反应模板 DNA 的制备。用移液枪蘸取生长于平板或斜面上的新鲜菌体(不能使用保存于冰箱内的菌体)至 30 μ L 的 0.2% 十二烷基磺酸钠(SDS)中, 缓慢抽吸几次; 漩涡混匀器上混匀 15 s; 90 °C 热激 4 min; 4 °C 13 000 r/min, 取上清液 20 μ L 至 0.5 mL 离心管^[6]。

4) 26S rDNA D1/D2 区扩增。26S rDNA D1/D2 区的扩增引物为: NL1 (5'-GCATATCAATA-AGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGT-GTTTCAAGACGG-3')^[7-8]。PCR 反应液的组成(50 μ L 体系): 每管中含 PCR 缓冲液(10 \times) 5.0 μ L; 25 mmol/L MgCl₂ 23.0 μ L; 10 mmol/L dNTP 1.0 μ L; 10 μ mol/L NL1 和 NL4 各 1 μ L; 0.5 U/ μ L DNA 聚合酶 3 μ L; 10 ng/ μ L~1 μ g/ μ L 模板 DNA 1.0 μ L; 最后补加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 52 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 80 s; 循环 36 次; 再 72 °C 延伸 8 min。

5) PCR 反应产物的电泳检测。取 5 μ L PCR 扩

增原液点样于 1% 的琼脂糖凝胶(1 \times TAE 缓冲液)电泳, 溴化乙锭(EB)染色后在紫外灯下观察是否扩增出目标片段。PCR 产物送北京三博远志生物技术有限责任公司进行纯化和测序, 得到菌株 PCR 扩增片段的原始序列。

6) 同源序列搜索。根据测序结果, 利用 BLAST 软件从 GenBank 核酸序列数据库中进行相似序列搜索(BLAST search), 比较供试菌株与已知酵母菌相应序列的相似程度。序列的搜索, 可以得到该酵母菌株在这段序列上与其亲缘关系相近的已知酵母菌的相关信息, 因为绝大多数已发表的种的 26S rDNA 的 D1/D2 区序列已经在 GenBank 中; 因此, 可以根据同源搜索的结果初步确定测序菌株的分类地位。

2 结果与分析

2.1 菌株的初步形态分类

WL 营养琼脂培养基可用来监测饮料发酵过程中的微生物类群。Cavazza 等^[9]研究表明, 在葡萄酒自然发酵过程中出现的大多数典型的酵母菌种都可以用 WL 营养琼脂培养基, 根据其上菌落的颜色及形态进行区分。

本研究利用 WL 营养琼脂培养基对自然发酵过程初期、中期、后期分离的 105 株酵母菌的培养形态进行观察, 参照 Christina 等^[2]实验结果与杨莹等^[3]对 WL 营养琼脂培养基类型的描述, 将分离获得的菌株分为 5 种不同的培养类型(表 1), 分别是葡萄汁有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum*、毕赤克鲁维酵母 *Pichia kluyveri*、假丝酵母 *Candida zemplinina*、巴氏酵母 *Saccharomyces pastorianus* 和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 所占比例分别为 3%、8%、1%、1% 和 87%, 其中分离获得非酿酒酵母 non-*Saccharomyces* 13 株(12.4%), 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 92 株(87.6%)。发酵初期 *P. kluyveri* 占分离的非酿酒酵母 non-*Saccharomyces* 的 61.5%; 自然发酵中期出现的类型有 *H. uvarum* 和 *S. cerevisiae*, 分别占该时期的 3.9% 和 96.1%; 发酵后期分离得到 *S. cerevisiae*, 达到 100% (表 2)。

2.2 26S rDNA D1/D2 区基因序列分析

从上述 5 种不同的培养类型的菌株中各选取 1~2 株进行 26S rDNA D1/D2 区的序列分析。使

表 1 神索葡萄自然发酵分离菌株 WL 形态描述鉴定¹⁾

Table 1 Descriptions of yeast colonies on WL medium separating from Cinsault

菌落颜色 Colony color	WL 形态描述 Colony on WL	菌种名称 Name of species	菌株 Strain
深绿色 Intense green	扁平, 表面光滑, 不透明, 黄油状 Flat surface, smooth, opaque, consistency of butter	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>Hanseniaspora uvarum</i>	G2-10, GS1-14, GS1-20
白色带淡绿色 White with pale green	扁平, 表面褶皱, 粗糙 Flat wrinkle surface, roughness	毕赤克鲁维酵母 <i>Pichia kluyveri</i>	GS1-1, GS1-2, GS1-15~GS1-17, GS1-29~GS1-31
蓝色 Blue	扁平, 表面光滑, 四周透明 Flat, smooth, transparent around	巴氏酵母 <i>Saccharomyces pastorianus</i>	G1-19
中央奶油色, 边缘绿色 Cream in middle, green frink	扁平, 光滑, 不透明 Flat surface, smooth, opaque	假丝酵母 <i>Candida zemplinina</i>	GS1-18
奶油色带绿色 Cream to green	球形突起, 表面光滑, 不透明, 奶油状 Knobike surface, smooth, opaque, consistency of cream	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G1-1~G1-18, G1-20~G1-22, G2-1~G2-9, G2-11~G2-14, G3-1~G3-15, GS1-3~GS1-12, GS1-19, GS1-23~GS1-27, GS2-1~GS2-12, GS3-1~GS3-15

1)GS. 自然发酵时添加 SO₂ (50 mg/L) Spontaneous fermentation, add SO₂ (50 mg/L); G. 自然发酵未添加 SO₂ Spontaneous fermentation, not add SO₂; 1, 2, 3 为发酵的初期、中期、后期 The beginning stage, middle stage, final stage of the fermentation.

表 2 发酵各阶段酵母菌种类、数量和比例¹⁾

Table 2 Species and proportion of yeast in different stage of must fermentation

菌种名称 Name of species	酵母数量和百分比 Yeast strain number and proportion/%		
	初期 Beginning stage	中期 Middle stage	后期 Final stage
葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>Hanseniaspora uvarum</i>	2/(4. 1)	1/(3. 9)	—
毕赤克鲁维酵母 <i>Pichia kluyveri</i>	8/(16. 4)	—	—
假丝酵母 <i>Candida zemplinina</i>	1/(2. 1)	—	—
巴氏酵母 <i>Saccharomyces pastorianus</i>	1/(2. 1)	—	—
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37/(75. 3)	25/(96. 1)	30/(100)

1)“—”未检出 No detected.

表 3 被测序菌株 26S rDNA D1/D2 片段大小和与相关菌株的序列相似性¹⁾

Table 3 26S rDNA D1/D2 fragment size of the sequenced strains and the identity with related yeast

菌株 Strain	长度/bp Size	相关模式菌株 Related members of the family yeast	模式菌株编号 Type strain	相似度 Identity/%	基因库登录号 GeneBank accession number
G1-22	595	<i>S. cerevisiae</i> AY130346	NRRL Y-12649	100	FJ912836
G1-19	596	<i>S. pastorianus</i> AJ508593	RH 6136	100	FJ912837
GS1-20	595	<i>H. uvarum</i> U84229	NRRL Y-1614 ^T	100	FJ912838
GS1-3	575	<i>S. cerevisiae</i> AY130346	NRRL Y-12649	100	FJ912839
GS1-1	564	<i>P. kluyveri</i> DQ104733	CBS 1367	99	FJ912840
GS1-18	486	<i>C. zemplinina</i> EU386702	M2	99	FJ912841
G3-8	575	<i>S. cerevisiae</i> AY130346	NRRL Y-12649	100	FJ912842

1)T. 模式菌株 Type strain; CBS: 霉菌中心保藏所, 荷兰 Centraalbureau voor schimmelcultures, Delft/Baarn, the Netherlands; NR-RL: 美国农业研究菌种保藏中心, 美国 Agricultural research service culture collection, national center for agricultural utilization research, Peoria, Illinois, USA.

用引物 NL1/NL4 对这些选取的代表菌株 G1-22, GS1-3, GS1-20, GS1-3, GS1-1, GS1-18, G3-8 的 26S rDNA D1/D2 区序列进行扩增, 测定其片段大小在 486~595 bp 之间, 共获得 7 个序列。经 BLAST 分析及 26S rDNA 序列相似性计算, 代表性的酵母菌

株 26S rDNA D1/D2 区的基因序列及其相关菌种模式菌株的相关信息见表 3。

供试菌株与模式菌株的 26S rDNA D1/D2 区基因序列相似性介于 99%~100%, 符合 Kurtzman 等^[10]所确定的同种内不同菌株间差异不超过 1%的

标准^[10]。

3 讨论

葡萄酒的品质很大程度上取决于酵母菌的酿酒特性,优良的葡萄酒酵母可以从自然界中分离筛选获得。凡是酵母栖息的地方都是分离筛选酵母的取样地,如葡萄园的土壤、成熟的葡萄浆果、葡萄酒厂区的土壤、发酵醪、葡萄皮渣、酒脚和沉淀物等,而最好的葡萄酒酵母是从酒厂未添加工业酵母的自然发酵过程中所获得的,因为环境本身就已对酵母群进行了目的性强的初筛。有研究认为发酵过程中菌群的组成及消长,受葡萄产地的气候、葡萄浆果的成熟度、葡萄园的管理情况和发酵工艺的影响^[11]。

表 1 的聚类结果与表 3 的测序结果表明,供试菌株的测序结果与 WL 营养琼脂培养基的鉴定结果完全相符。本研究显示 *S. cerevisiae* 是发酵初期的主要菌群,但是在发酵初期的主要菌群通常是非酿酒酵母,其可能原因是所选取的样品中有破损的葡萄浆果。据 Mortimer 等^[12]和 Polsinelli 等^[13]的研究,破损的葡萄浆果会为 *S. cerevisiae* 在葡萄园中栖息提供良好的条件。成熟的葡萄浆果常出现细小的裂纹,果汁由此流出,使酵母得以繁殖;葡萄的梗和托上由于有果汁黏附,利于酵母繁殖。在有些葡萄酒产区,葡萄酒生产者习惯于将发酵结束后压榨的葡萄皮渣作为葡萄肥料,而这些皮渣中富含酵母生长必需的糖分和微量元素,将这些皮渣返回葡萄园,使葡萄园土壤成为最适合酵母生长的野外环境。

在酵母菌的属、种级分类鉴定中,26S rDNA D1/D2 区的序列分析成为酵母菌鉴定的常规指标和必要指标^[14],它可以有效地将大多数未知菌株鉴定到种。Kurtzman 等^[15]和 Fell 等^[8]的研究表明,酵母菌种的大亚基 rDNA (26S rDNA) 中的 D1/D2 区域具有菌种的特异性,能将绝大部分分子囊菌纲酵母和担子菌纲酵母区分鉴定到种。种内不同菌株间 D1/D2 区域序列差异一般在 1% 以内,而不同种的菌株其核苷酸替换率一般较大,因此碱基差异在 1% 以上的菌株分属于不同的种。根据这一标准,26S rDNA D1/D2 区序列分析可以将绝大部分不同的种区分开来,从而确定各个菌株的归属^[16]。Gutell 等^[17]研究表明这段序列具有较高的变异率,可以用于亲缘关系较近的菌株之间的分类研究。本研究通

过 WL 营养琼脂培养基和 26S rDNA D1/D2 区的序列分析,将分离自宁夏御马葡萄酒厂神索葡萄自然发酵过程的酵母鉴定为 4 属 5 种,为所获酵母菌资源的利用评价和生产地域特色葡萄酒而筛选优良酵母的工作奠定了基础,但不同种类酵母菌在发酵过程中的作用及对葡萄酒品质的影响还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王慧,张立强,刘天明. 产地葡萄酒优良酵母菌株的筛选及鉴定[J]. 酿酒科技,2007(9):29-34.
- [2] CHRISTINA L P, JAMES A B, TAMMI L O. Use of WL medium to profile native flora fermentations[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52(3):198-203.
- [3] 杨莹,徐艳文,薛军侠,等. WL 营养琼脂对葡萄酒相关酵母的鉴定效果验证[J]. 微生物学杂志,2007,27(5):75-78.
- [4] 王泽举,刘延琳,刘爱国,等. 新疆葡萄酒自然发酵过程酵母菌的种类和动态变化[J]. 华中农业大学学报,2008,27(5):664-667.
- [5] 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):97-98.
- [6] 徐艳文,杨莹,薛军侠,等. 26S rDNA-RFLP 分析在非酿酒酵母菌分类研究中的应用[J]. 微生物学杂志,2007,27(4):23-27.
- [7] O'DONNELL K. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum*[J]. Current Genetics, 1992, 22:213-220.
- [8] FELL J W, BOEKHOUT T, FONSECA A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(3):1351-1371.
- [9] CAVAZZA A, GRANDO M S, ZINI C. Rilevazione della flora microbica dimosti evini[J]. Vignevini, 1992(9):17-20.
- [10] KURTZMAN C P, ROBNETT C J. Identification and ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit(26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73:331-371.
- [11] GUILLAMO J M, SABATE J, BARRET E. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer(ITS) region[J]. Archmicrobial, 1998, 169:387-392.
- [12] POLSINELLI M, ROMANO P, SUZZI G, et al. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 23(2):110-114.
- [13] MORTIMER R, POLSINELLI M. On the origins of wine yeast

- [J]. *Research in Microbiology*, 1999, 150(3): 199-204.
- [14] 陆惠中, 王启明, 贾建华. 秦岭地区子囊酵母物种多样性研究 [J]. *菌物学报*, 2004, 23(2): 183-187.
- [15] KURTZMAN C P, ROHNETT C J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35: 1216-1223.
- [16] 许超德, 李绍兰. 核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用 [J]. *微生物学通报*, 2004, 31(3): 126-129.
- [17] GUTELL R R, FOX G E. Compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 175-269.

Diversity of Wine Related Yeasts during Spontaneous Fermentation of *Cinsault*

SONG Yu-yang¹ BAI Wen-hong² LIU Yan-lin¹

1. *College of Enology, Northwest Agriculture and Forestry University/Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, China;*

2. *Emperor Horse Winer Co. LTD, Qingtongxia 751600, China*

Abstract One hundred and five yeasts isolated from spontaneous fermentation of *Cinsault* were identified primarily on Wallerstein laboratory nutrient agar medium and classified by analyzing 26S rDNA D1/D2 domain sequence. Results showed that 105 yeasts were found to be 5 species belonging to 4 genera including *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Candida zemplinin*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* with proportion of 3%, 8%, 1%, 1% and 87%, respectively. The number of the non-*Saccharomyces* was gradually reducing from 24.7% to 3.9% and 0% during the early, immediate and late stage of spontaneous fermentation.

Key words *Cinsault*; spontaneous fermentation; yeast; WL nutrient agar medium; sequence analysis

(责任编辑:陆文昌)