

人工贵腐葡萄酒的研制 (I)

——灰葡萄孢的分离方法

金其荣 张继民 朱宝镛

(发酵工程系)

摘要 本文详细地介绍了人工贵腐发酵菌——灰葡萄孢的分离和保藏方法,对该菌的培养方法、生长形态和部分生理生化特征作了详细描述。

主题词 葡萄酒; 葡萄孢; 分离/贵腐葡萄酒

0 前言

贵腐葡萄酒是世界上档次最高的一类葡萄酒^[1],它是由发生贵腐作用后的葡萄为原料生产的。这种贵腐作用是由于葡萄在接近成熟期感染了真菌灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 所致。灰葡萄孢是属于丛梗孢目、丛梗孢科的一种不完全菌^[2]。这种真菌在适宜条件下可以由葡萄果皮侵入,并生长繁殖。结果,果皮上的蜡质被分解,果内的水分蒸发而果汁浓缩。由于菌丝的代谢作用,果汁的成分发生了一系列变化,其中包括甘油、葡糖酸、半乳糖醛酸等物质的含量增加,酒石酸含量降低和贵腐香味的形成^[3,4]。

贵腐现象最早于16世纪发现于匈牙利的托卡伊(Tokay)地区,然后于17世纪发现于德国莱茵(Rheingau)地区及法国的所丹(Sauterne)地区^[5]。后来,在奥地利^[6]、美国^[6]和日本^[5]也相继发现了贵腐现象。

灰葡萄孢感染葡萄需要适宜的气候条件,即温度20℃左右,相对湿度75%以上。这种气候条件出现在5月末至6月的葡萄开花结果期(长江流域的梅雨期)和9月至10月初的葡萄成熟期(秋雨期)。灰葡萄孢感染对于葡萄来说,一般是有害的,称为“灰霉菌”。但是灰葡萄孢用于葡萄酒酿造可以产生高雅的贵腐香味。本文介绍了灰葡萄孢的高效分离方法,培养保藏方法及生长形态和部分生理生化特征。

1 材料与方法

1.1 分离源

葡萄园土壤,有病害的葡萄果、花穗、枝和叶,天竺葵花和叶等样品数十份。

1.2 培养基

1.2.1 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基 常法制备。

1.2.2 麦芽汁琼脂(MEA)培养基 常法制备。

本文1989年10月4日收到。

1.2.3 改进的Czepex-Dox培养基^[8], 即:

NaNO ₃	3g	KH ₂ PO ₄	1g
KCl	0.5g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.08g
葡萄糖	20g	去离子水	1l
琼脂	20g	HCl调至pH4	

1.2.4 酒石酸为唯一碳源的培养基 1.2.3的培养基中的葡萄糖改用8.5g酒石酸钾钠(C₄H₄O₆KNa·4H₂O)。

1.2.5 天竺葵叶浸汁琼脂 取20g天竺葵鲜叶加自来水300ml, 60℃浸1h, 滤去叶渣后加酒石酸调至pH4, 再加入琼脂6g。

1.2.6 葡萄汁琼脂 取巨峰葡萄原汁300ml, 加NaOH调至pH4, 再加琼脂6g。

1.2.7 BC培养基 1.2.1和1.2.2培养基等混合, pH4。

上述培养基均在121℃下灭菌20min。

1.3 分离方法

稀释分离法, 划线分离法。

1.4 培养条件

平皿培养在15~34℃, 3~10d等不同条件下进行, (见讨论部分)。

1.5 生理生化试验

考察各种碳源和氮源利用情况时, 在1.2.3的培养基中不加葡萄糖或硝酸钠, 分别制成无碳源或无氮源基础培养基平板, 涂上孢子悬浮液, 再用纸片法加入各种碳源或氮源, 在20℃培养10d, 观察其生长和利用情况。

1.6 形态观察与初步鉴定

先将孢子悬浮液涂在BC培养基平板上, 在20℃培养1d后, 将平板上长出的微小菌落移到BC培养基平板中央, 继续在20℃培养9d, 同时用载片法培养, 观察菌落的生长速度及各菌落、菌丝、孢子头、孢子梗等形态、大小和颜色等特征。

1.7 菌种保藏

BC培养基制成斜面, 接种后于20℃下培养7d, 转入4℃冰箱中保藏。

2 结果与讨论

2.1 关于灰葡萄孢的分离方法

灰葡萄孢虽然是灰霉病的病原菌, 能够感染多种植物, 如葡萄、天竺葵、紫露草、西红柿和草莓等。但是, 灰葡萄孢感染植物组织之后, 常伴随其它霉菌、细菌和酵母等腐生菌的感染。由于灰葡萄孢在一般条件下的生长速度要比曲霉、青霉和根霉等腐生真菌要慢得多, 并且受这些真菌的抑制。这就给分离工作带来了很大困难, 因此必须找出有效的分离方法。

2.1.1 分离源和分离方法

如果采用土壤等混杂性分离源, 由于灰葡萄孢比许多腐生菌生长慢而受抑制, 会严重干扰分离工作, 而用灰葡萄孢孢子已生长成熟但未腐烂(即未感染杂菌)的植物材料作分离源, 配合显微分离法, 就可以进行单纯分离, 因为这些材料表面着生的灰葡萄孢孢子头在显微镜

下清楚可见(图1)。这种孢子头有0.12mm大小,用肉眼也可见,因此更简单的方法是,用接种环蘸湿后小心地在孢子头处挑取孢子,再划线分离,这样也可以达到显微分离的效果,可以称为亚显微分离法。

2.1.2 温度 分离时的培养温度是分离成功的又一重要因素。灰葡萄孢在30℃以上不但生长慢,而且不产孢子。分离时采用20℃的温度培养最好,这与灰霉病在自然界的发生温度及文献报道的最适生长温度相符^[9]。

2.1.3 培养基 分离时用的培养基对灰葡萄孢的快速分离有着关键性的影响。培养基1.2.1~

1.2.4都是国外研究者用过的培养基,而1.2.5和1.2.6是作者设计的培养基,但在这些培养基上,灰葡萄孢生长并不快,也没有选择性。而在BC培养基(1.2.7)、20℃温度时,灰葡萄孢的生长速度比黑曲霉还要快,产孢子多,是所试培养基中效果最好的一种。从这个结果看,灰葡萄孢需要马铃薯汁和麦芽汁两者中的营养因子。

2.1.4 pH值 pH值对灰葡萄孢的生长有很大影响,从而也影响分离效果。从文献[10]和笔者的后续实验看,灰葡萄孢的最适生长pH为3.0~3.5。但在这样高的酸度下,灭菌时琼脂易于水解。从本试验看,分离培养时,pH4左右效果也很好。

利用上述方法,笔者分离出了3株灰葡萄孢,其来源与编号如表1所示。

表1 灰葡萄孢的编号与来源

编 号	分 离 源	来 源
BC 1	天竺葵叶	浙江农业大学花卉园
BC 2	葡 萄 粒	河北葡萄园
BC 3	葡 萄 粒	山东酿酒葡萄园

2.2 关于灰葡萄孢的生理生化试验与初步鉴定

2.2.1 碳源利用情况 3株灰葡萄孢利用碳源的情况有较大差别,其中BC2能够利用的碳源较多。从表2可知,这3株菌都能很好地利用葡萄糖、果糖、酒石酸、柠檬酸和苹果酸。这几种碳源的优劣次序大致为:酒石酸>苹果酸>柠檬酸>葡萄糖>果糖。灰葡萄孢利用这几种有机酸的能力大于利用糖类,这在葡萄酒酿造中有很重要的意义^[8]。

2.2.2 氮源利用情况 3株灰葡萄孢利用氮源的情况如表3所示。实验表明,灰葡萄孢不能利用亚硝酸钠,而且培养一定时间后,由其它氮源处长出的菌落受亚硝酸的抑制,可以见到明显的抑菌圈,这表明亚硝酸钠对灰葡萄孢有明显毒性。

从生长情况看,以硝酸钠、尿素、明胶、干酪素和磷酸氢二铵为氮源时,菌体形态正常。而用铵盐为氮源时,会显著改变灰葡萄孢的生长形态,使菌落小而致密,培养10d后的菌落直径也只有6~10mm,呈青霉似的深灰绿色,最后发黑,产孢子极少或不产孢子。但是用磷酸氢二铵时,菌落与正常情况相比虽然颜色偏绿,但生长旺盛,可以正常地产生孢子。



图1 葡萄粒表面的灰葡萄孢孢子头(80×)

表2 灰葡萄孢的碳源利用情况

碳源 \ 菌株 培养天数	BC 1			BC 2			BC 3		
	5	8	10	5	8	10	5	8	10
D-葡萄糖	+	++⊕	+++⊕	+	+++⊕	+++⊕	+	++	+++⊕
D-果糖	+	++⊕	+++⊕	+	+++⊕	+++⊕	+	++	+++⊕
可溶淀粉	-	+	+	-	+	+	-	+	+
乳糖	-	-	-	-	+	+	-	-	-
L-鼠李糖	-	-	-	-	+	+	-	-	+
L-山梨糖	-	-	-	-	+	+	-	-	+
D-甘露糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-半乳糖	-	-	-	-	+	+	-	-	+
D-棉子糖	-	-	-	-	+	+	-	-	+
D-木糖	-	-	-	-	+	+	-	-	-
纤维二糖	-	+	+	-	+	+	-	-	+
酒石酸	++	+++	+++⊕	++	+++⊕	+++⊕	+	++	+++⊕
柠檬酸	+	+++	+++⊕	+	+++⊕	+++⊕	+	+	+++⊕
苹果酸	++	+++	+++⊕	++	+++⊕	+++⊕	+	++	+++⊕

注：+稍有生长；++生长一般；+++生长良好；-未见生长；⊕产生孢子

表3 灰葡萄孢的氮源利用情况

氮源 \ 菌株	BC 1	BC 2	BC 3
硫酸铵	+	+	+
硝酸铵	+++*	+++*	+++*
硝酸钠	+++	+++	+++
亚硝酸钠	-	-	-
磷酸氢二铵	++++	++++	++++
尿素	++*	++	++
氯化铵	++	+++*	+++*
明胶	+	+	+
干酪素	+	+	(+)

注：+稍有生长；++生长一般；+++生长良好；++++生长旺盛；(+)生长很微弱；

-未见生长

* 菌落呈深灰绿色变态

2.2.3 生长形态 对于表1中所述的3株灰葡萄孢,虽然在碳源利用和生长速度方面有所差别,但菌体生长形态上却未见不同,所以形态描述以及BC2菌株为例:

菌落 孢子8d开始发芽,菌丝发达密集,分泌出无色液体聚集在菌丝上呈水珠状(图2)。5d后,由于产孢子菌落转淡灰绿色,并逐渐加深,7d后转灰褐色。孢子头密布,边缘处密度更大。



图2 菌丝分泌出的液体(80×)

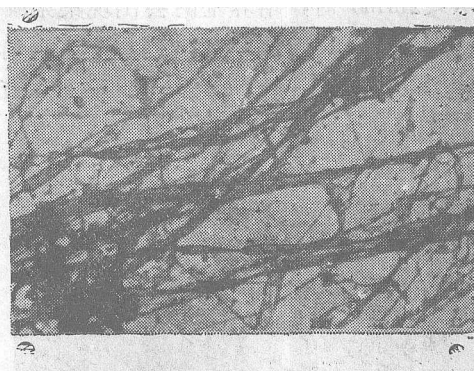


图3 老熟后的菌丝(200×)

菌丝 有隔分枝,开始粗细均匀(图2),老熟后呈粗细节相间的状态(图3),粗部直径10~15 μm 。



图4 新生的孢子头(200×)



图5 老熟的孢子头(200×)

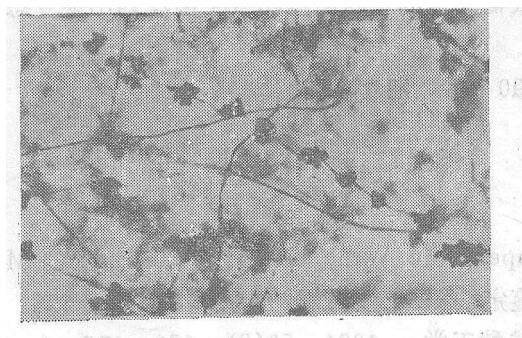


图6 长期培养后形成的成串孢子头(80X)

孢子头 由气生菌丝尖端不对称分枝形成,在两分叉的顶端着生膨大的顶囊,顶囊上遍生孢子(图4),灰绿至灰褐色,老熟后的状态如图5所示,类似成串的葡萄。菌丝可以自孢子头处延续生长,长期培养可以形成成串的孢子头(图6)。

孢子 椭圆形或卵形, $5 \times 8 \mu\text{m}$, 稍如刺状突起, 色如菌落。

在薄层培养基上的变态 本实验中分离的灰葡萄孢还有一个显著特征,即如果培养基很薄($<2\text{mm}$)时,培养基内会出现集结成团的菌丝体,图7清楚地显示了这种生长过程。基内菌丝先增粗,分枝增多,先呈图右上角所示的形态,再逐步发育成图左方和右下方的形态。在这种情况下,气生菌丝也不能发育成正常的孢子头和孢子,而是长出如图8所示的菊花状菌丝体,呈墨绿色。



图7 培养基很薄时,基内菌丝的聚结($200\times$)



图8 培养基很薄时,气生菌丝发育状态($80\times$)

综上所述,本实验分离出的霉菌符合文献[2]和[10]的描述,可初步鉴定为灰葡萄孢。

3 结论

能导致贵腐作用的灰葡萄孢是多种植物灰霉菌的病原菌,它的有效分离方法是:以长有成熟孢子的植物材料为分离源,采用亚显微分离法划线分离,用BC培养基在 20°C 培养,挑取有该菌特征的菌落。灰葡萄孢的保藏也用BC培养基为好。

灰葡萄孢能够利用多种碳源和氮源。其中利用酒石酸、苹果酸和柠檬酸的能力较强,这对于葡萄酒酿造具有重要意义。用铵盐为氮源时,灰葡萄孢生长形态异常。

培养基很薄时,灰葡萄孢的基内菌丝和气生菌丝均出现变态。

[本文(II)将于1990年第2期发表]。

参 考 文 献

- 1 Rosalind Cooper. The Wine Almanac. London: Michael Joseph, 1986; 56
- 2 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海科技出版社, 1979; 259
- 3 汤目英郎等. 发酵工学. 1981; 59(2): 169~175
- 4 汤目英郎等. 发酵工学. 1981; 59(2): 177~184

- 5 大塚谦一. 酿造学. 養賢堂发行, 1985, 140~141
- 6 Sutcliffe S. The Wine Handbook, 1987, 40
- 7 上野雄靖等. 日酿协, 1979, 74(4): 264~268
- 8 Shimazu Y et al. Agric Biol Chem, 1984, 48(6): 1565~1573
- 9 俊藤昭二. 日酿协, 1985, 80(2): 856~861
- 10 Barnett H L, Hunter B B. 半知菌属图解(中译本). 1972

Studies on Making of Artificial Noble Wine (I)

--the Isolating Method of Botrytis Cinerea

Jin Qirong Zhang Jimin Zhu Baoyong

(Dep. of Fermentation Eng)

Abstract This paper discussed the isolating and storing methods of the artificial noble starter-botrytis cinerea in detail. The culture, morphology and some physical and biochemical characteristics of the fungus were also described in detail.

Subjectwords Wine, Botrytis, isolation/Noble wien