

文章编号:1673-1689(2007)03-0110-06

东北山葡萄酒自然发酵酵母菌群的研究

苏龙¹, 刘树文¹, 何玲², 于江深³, 梁新红¹, 徐艳文¹

(1. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; 3. 吉林省长白山酒业集团有限公司, 吉林蛟河 130000)

摘要:从东北山葡萄酒产区山葡萄酒自然发酵过程中共分离到132株葡萄酒相关酵母, 通过WL培养基(Wallerstein Laboratory Nutrient Agar)培养得到5种不同类型的菌落。对其中的44株进行5.8S-ITS rRNA基因的RFLP分析, 得到19种酶切图谱, 表现了东北山葡萄酒产区葡萄酒相关酵母的多样性。其中以酶切类型6为代表的菌株为 *Dekkera anomala*, 是山葡萄浆果表面的主要种, 以酶切类型19为代表的菌株为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。聚类分析共得到了5个遗传聚类群且与WL培养基初步分类有较高的相关性。

关键词: 山葡萄; 自然发酵; 葡萄酒酵母; WL培养基; RFLP

中图分类号: TS 261.1

文献标识码: A

Diversity of Wine Related Yeasts during Spontaneous Fermentation of *Vitis. amurensis* Rupr Wine Terrior in Northeastern Regions of China

SU Long¹, LIU Shu-wen¹, HE Ling²,

YU Jiang-shen³, LIANG Xin-hong¹, XU Yan-wen¹

(1. College of Enology, Northwest A&F University, YangLing 712100, China; 2. College of Horticulture, Northwest A&F University, YangLing 712100, China; 3. Changbaishan Winery Co., LTD, Jiaohe 130000, China)

Abstract: The aim of this work was to explore the diversity of wine related yeasts in *V. amurensis* Rupr wine terrior in Northeastern regions of China. 132 wine related yeasts were isolated from the Spontaneous fermentation of *V. amurensis* Rupr. Yeast species assessment was carried out by Wallerstein Laboratory Nutrient Agar (WL agar). 5 unique colony morphologies were identified. By analysis of the restriction pattern of amplified 5.8S-ITS rRNA gene (RFLP) with the enzyme Hinf, Hae and Hha, respectively, 19 different genotypes were existed in fermentation. Thereinto, pattern 6 was *Dekkera anomala* that was the main species on the surface of the *V. amurensis* Rupr berry and pattern 19 was *Saccharomyces cerevisiae*. Hierarchical cluster analysis pattern exhibited that 44 isolates could be divided into 5 distinct groups and had high relation with WL agar assessment.

Key words: *Vitis. amurensis* Rupr; spontaneous fermentation; wine yeast; wallerstein laboratory nutrient agar; RFLP

收稿日期: 2006-09-27.

作者简介: 苏龙(1981-), 男, 宁夏隆德人, 葡萄与葡萄酒学硕士研究生. Email: sulong73@126.com

通讯作者: 刘树文(1965-), 男, 河北藁县人, 副教授, 农学博士, 主要研究方向为葡萄酒工艺及酿酒微生物. E-mail: liushuwen@nwsuaf.edu.cn

葡萄汁的发酵是多个酵母菌种及菌株互作生长和发展变化的复杂体系。这些酵母菌的来源有:葡萄浆果表面的土著菌群,酿酒设备和酒厂环境中的土著菌群,接种的人工酵母等。一般情况下,在自然发酵过程中,有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)、克勒克酵母属(*Kloeckera*)、假丝酵母属(*Candida*)、梅奇酵母属(*Metschnikowia*)的酵母启动发酵,大部分来源于浆果,数量可达 $10^6 \sim 10^7$ cfu/g,发酵中期逐步死亡和减少。这个时候 *S. cerevisiae* 开始占据主导地位($10^7 \sim 10^8$ cfu/g),使发酵继续,直至完成^[1]。

我国气候多样化的特点造就了非常丰富的葡萄酒酵母资源。东北山葡萄酒产区的长白山葡萄酒厂、通化葡萄酒厂、一面坡葡萄酒厂等从20世纪的30年代就开始利用 *V. amurensis* Rupr 酿酒,生产了在国内负有盛名的国家级名优产品,并出口国外,年出口量最高达2100 t。本研究的目的是借助中国东北产区的独特酿酒葡萄生态条件,开发中国东北山葡萄酒产区的酿酒酵母资源。研究了山葡萄酒自然发酵过程中的酵母菌群,为筛选适合该产区的优良酿酒酵母菌种奠定了基础,以解决经常出现的发酵中止,发酵周期太长等问题,保持山葡萄酒典型的产区特色。首先,利用WL培养基对所筛选到的菌种进行初步的分类,然后对rDNA包含的5.8S-ITS序列进行RFLP分析,与已建立的标准图谱对照鉴定自然发酵过程中出现的酵母菌群。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 自然发酵和菌种分离 2005年10月从东北山葡萄酒产区传统的长白山酒厂及通化地区的山葡萄栽培基地采集浆果。在车间进行除梗、破碎,葡萄醪转入50 L的发酵罐,加入40 mg/L的 SO_2 于室温进行自然发酵,发酵过程用比重计进行监测。分别在发酵的前期、中期、后期取汁,分离各个时期葡萄酒自然发酵出现的野生酵母菌。

1.1.2 菌种分离培养基 采用YPD培养基。每升含酵母浸粉10.0 g,蛋白胨20.0 g,葡萄糖20.0 g,琼脂20.0 g。为了在筛选过程中排除细菌的干扰,在YPD培养基中添加100 mg/L的氯霉素。

1.1.3 主要试剂和酶 各种DNA限制性内切酶, *Taq* DNA聚合酶均购自MBI。100 bp Maker购自广东东胜生物科技有限公司。

1.2 菌种的初步分类

用YPD液体培养基活化分离到的野生酵母菌

划线接种于WL培养基,5 d后记录其菌落颜色与形态,并进行分析和初步的归类。WL培养基组分:酵母浸粉4.0 g/L,胰蛋白胨5.0 g/L,葡萄糖50.0 g/L,磷酸二氢钾0.55 g/L,氯化钾0.425 g/L,氯化钙0.125 g/L,硫酸镁0.125 g/L,氯化铁0.0025 g/L,硫酸锰0.0025 g/L,琼脂20.0 g/L,溴甲酚绿22.0 mg/L。

1.3 5.8S-ITS rRNA 基因的扩增及PCR产物的RFLP分析

1.3.1 酵母菌基因组DNA的提取 参照周小玲^[2]等方法进行。提取的DNA取1 μL 作PCR模板。

1.3.2 5.8S-ITS rRNA 基因的扩增 引物为ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR扩增条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55.5 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.3.3 PCR产物的限制性内切酶酶切 酶切反应体系为30 μL ,其中10 $\times$ 缓冲液2 μL ,限制性内切酶(*Hinf* I, *Hae* III, *Hha* I)10 U, PCR产物10 μL , ddH₂O补充体系为30 μL ,混匀后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切2 h。取酶切产物10 μL 于3.0 g/dL琼脂糖凝胶,90 V电压下电泳1 h后进行凝胶照相并进行酶切图谱的分析。

1.3.4 聚类分析 将菌株对应的限制性核酸内切酶酶切谱带有无按“1”和“0”进行统计,建立数据矩阵,应用DPS7.55版软件(杭州睿丰信息技术有限公司)进行聚类分析。聚类距离为欧式距离,聚类方法为类平均法(UPGA)。

2 实验结果

2.1 WL培养基初步分类分析

WL培养基常用于监测饮料发酵过程中的酵母菌群^[3]。最近,Cavazza等的研究表明,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基于其在WL培养基上生长所形成的菌落颜色及形态进行归类和区别^[4],而且描述了主要的葡萄酒相关酵母菌在WL培养基上的培养表现。本次试验从山葡萄酒自然发酵的前、中、后期总共筛选得到132株葡萄酒相关酵母菌,其中前期44株,中期44株,后期44株。所有菌株在WL培养基上培养共形成5种不同类型的菌落。其中I、II、III型出现在自然发酵的前期,且类型II占前期所筛选酵母菌的50%;自然发酵中期出现的类型为II、III、IV、V,类型IV占45%;发酵的后期只有类型III出现,

见表 1。

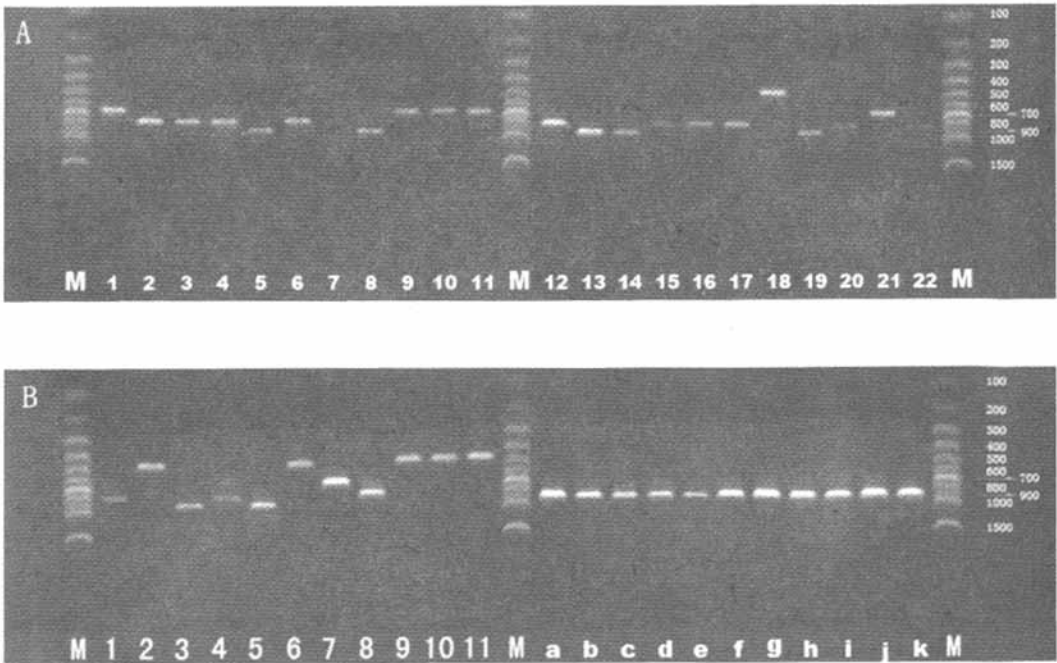
表 1 自然发酵前、中、后期酵母菌在 WL 培养基上的培养表现

Tab. 1 Description of isolates on WL medium		
菌落类型	菌落颜色	菌落形态
I	中央奶油色, 边缘绿色	扁平、光滑、不透明
II	深绿色	扁平、光滑、不透明、黄油状
III	奶油色带绿色	球形突起、表面光滑、不透明、奶油状
IV	白色带淡淡的绿色	扁平、表面褶皱、粗糙、边缘不整齐、中央火山状
V	奶油色	扁平、表面光滑、不透明

2.2 RFLP 分析

根据初步的分类,发酵前期选择 22 株(记为 BF1-BF22),中期选择 11 株(记为 MF1-MF11),后期选择 11 株(记为 FF1-FF11)对其 5.8S-ITS rRNA 基因进行扩增。PCR 产物用限制性内切酶(*Hinf* I, *Hae* III, *Hha* I)进行酶切分析,所得酶切图谱见表 2。根据酶切图谱,山葡萄酒自然发酵的整个过程中酵母菌的酶切图谱包括 19 个类型,显示了东北产区葡萄酒相关酵母多样性的丰富。酶切图谱与 Guillamon 和 Esteve-Zarzoso 等建立的标准图谱^[6]进行对照鉴定。酶切图谱中只有类型 6

和 19 可以根据标准图谱鉴定到种,反映了东亚种群的山葡萄和欧亚种酿酒葡萄浆果表面酵母菌群的区别,其余的 17 种酶切图谱可能有潜在的新种。类型 6 为 *Dekkera anomala*,占发酵前期的 36%,中期的 9%。说明 *D. anomala* 为东北产区山葡萄浆果表面的主要种。类型 19 为 *S. cerevisiae*,只在自然发酵的后期筛选得到,主要因为群体的生长竞争影响和产物酒精的影响,前期出现的耐酒精能力弱的酵母相继减少和消失,发酵后期只有耐酒精能力强的 *S. cerevisiae* 出现。葡萄酒生产中最主要的酵母菌——*S. cerevisiae* 在浆果表面数量很少。一般情况下,其数量小于 $10\sim10^2$ cfu/g,在选育过程中最好用富集培养基而非直接铺平板^[6]。一些研究者并没有从健康、成熟的葡萄浆果表面分离筛选到 *S. cerevisiae*^[7],所以现在对葡萄酒自然发酵过程中酿酒酵母的来源产生了争论。作者在发酵的前期和中期都没有分离到 *S. cerevisiae* 的菌株,发酵后期的菌株都是 *S. cerevisia*,证明山葡萄浆果表面存在 *S. cerevisia* 的菌株,但数量很少,前期和中期都分离不到。另外,Naumov^[8]等的研究认为,在发酵温度低,气候冷凉的产区贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)的菌株会出现在自然发酵的过程中,在后期主导发酵,但本试验后期的菌株均为 *S. cerevisia*。筛选菌株的 5.8S-ITS rRNA 基因 PCR 产物及部分酶切图谱见图 1。



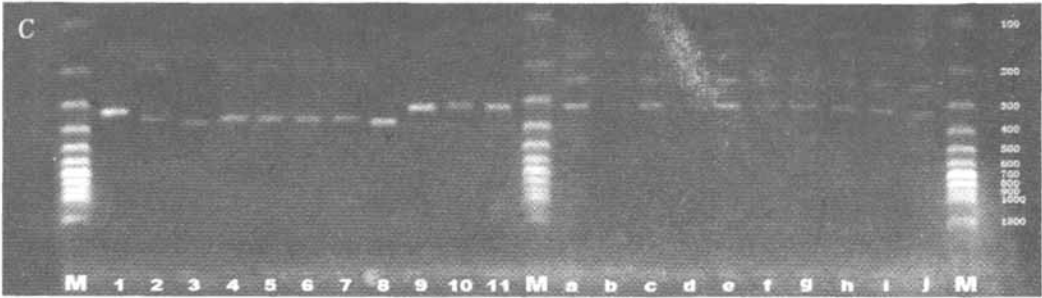


图 1 A. 自然发酵前期菌株(1-22) 5.8S-ITS rRNA 基因 PCR 产物。B. 自然发酵中期(1-11)和自然发酵后期(a-k) 5.8S-ITS rRNA 基因 PCR 产物。C. 自然发酵中期菌株(1-11) 5.8S-ITS rRNA 基因 PCR 产物限制性内切酶 *Hinf* I 酶切图谱和自然发酵后期菌株(a-j) 限制性内切酶 *Hae* III 酶切图谱。M: Maker 100 bp.

Fig. 1 A. Size of the PCR-amplified 5.8S-ITS region of yeasts isolated from begin fermentation(1-22). B. Size of the PCR-amplified 5.8S-ITS region of yeasts isolated from middle fermentation(1-11) and final fermentation(a-k). C. Restrictin analysis of PCR products of yeasts from middle fermentation(1-11) with the endonucleases *Hinf* I and yeasts isolated from final fermentation (a-j) with the endonucleases *Hae* III. Lanes M: Maker 100bp.

2.3 聚类分析

3 个核酸内切酶对 44 个供试菌株的 ITS 片段共酶切产生 35 条带。将 44 个菌株对应的限制性核酸内切酶酶切谱带有无按“1”和“0”进行统计,建立数据矩阵,进行聚类分析(聚类距离为欧式距离,聚类方法为类平均法 UPGA),获得树状图(见图 2)。在树状图上,最长距离为 2.3 时可以将 44 个菌株划分为 5 个遗传聚类群。Ⅰ:BF1,MF7 两个菌株;Ⅱ:BF9,BF10,BF11,BF18,FF1-FF10,MF8,MF1,MF10,MF11,MF9,BF21 共 20 个菌株聚为一类;Ⅲ:MF2,MF6 两个菌株;Ⅳ:BF2,BF4,BF5,BF6,BF7,BF12,BF15,BF16,BF17,BF20,BF22,MF4 共 12 个菌株为一类;Ⅴ:BF3,BF13,BF14,BF19,MF3,BF8,MF5 共 7 个菌株一类。第四类除 BF2,

BF6,BF7 外均为 *D. anomala*。聚类结果和用 WL 培养基的分类结果进行比较,发现两种分类的相关性很高,例如,菌株 BF2,BF4,BF5,BF6,BF7,BF12,BF15,BF16,BF17,BF20,BF22,MF8,MF1,MF4 在 WL 培养基上均为类型Ⅱ的菌落,在聚类分析中,除了 MF8,MF1 在一起聚为第二类外,其余的均聚为第四类。另外,在发酵末期筛选到的酵母菌在 WL 培养基上生长所形成的菌落均描述为类型Ⅲ,依据 Cavazza^[4]等的研究,在 WL 培养基上此种类型的菌落为 *S. cerevisiae*,经 RFLP 分析与标准酶切图谱对照确定为该种,说明 WL 培养基在葡萄酒相关酵母的初步分类中具有应用价值,可以简化后续的分子鉴定工作。

表 2 PCR 扩增产物大小及限制性内切酶酶切图谱

Tab. 1 Size in bp of the PCR products and the restriction fragments of isolates

酶切类型	菌株	PCR 扩增产物 大小/bp	限制性核酸内切酶酶切片断大小/bp		
			<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I
1	BF1	690	300	420+130	370+190+160
2	BF9,BF11	690	300	420+130	250+200
3	BF10	690	550	690	250+200
4	BF2,BF6	800	340+340+120	800	260+200
5	BF3	800	370+350+150	340+250+190+140	370+120
6	<i>Dekkera anomala</i>	800	340+340+120	800	370+190+160
7	BF7	800	340+340+120	800	300

续表 2

酶切 类型	菌株	PCR 扩增产物 大小/bp	限制性核酸内切酶酶切片断大小/bp		
			<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I
8	BF8	880	370+350+150	340+250+190+140	370+190+160
9	BF13,BF14,BF19	880	370+350+150	340+250+190+140	370+120
10	BF21	700	600	690	330
11	BF18	490	200+100	460	240
12	MF1	800	330+120	800	330
13	MF8	800	330+120	800	390
14	MF3	880	370+350+150	340+250+190+140	390
15	MF5	880	370+350+150	340+250+190+140	370+190+160
16	MF7	700	600	700	370+190+160
17	MF9,MF10,MF11	500	170+90	350	330
18	MF2,MF6	500	170+90	350	370+190+160
19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	385+365	320+220+180+145	365+155

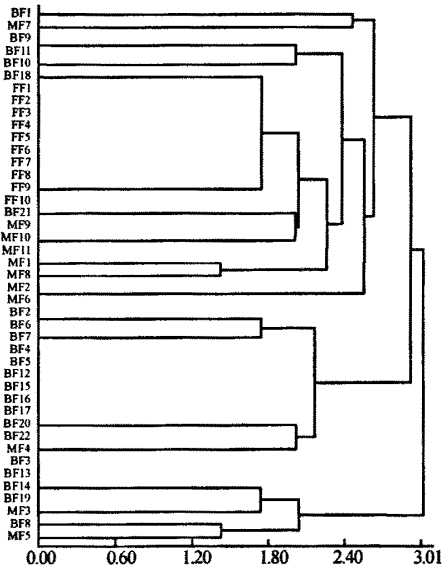


图 2 44 株酵母菌 RFLP 的聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram resulting from UPGA cluster analysis by RFLP analysis of the 5.8S-ITS

3 讨 论

优良的葡萄酒酵母可以从自然界中分离筛选获得。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，凡是酵母栖息的地方都是分离筛选酵母的取样地。而最好的材料是葡萄酒厂未添加培养酵母的自然

发酵过程，因这一环境条件本身就已对酵母群进行了初筛，而且目的性强，从中可以分离获得比其他材料更多的有用菌株。自然发酵是由存在于葡萄果皮和工厂设备上的酵母菌来完成的。发酵过程中酵母菌群的存在数量及种的数量取决于酒厂所在产区、酿酒的工艺、及所要生产的葡萄酒的类型。本研究工作主要基于东亚种群的中国东北山葡萄酒产区，共获得 5 个类群，19 种不同酶切类型的菌株，初步揭示了此产区葡萄酒相关酵母具有丰富的多样性。在欧亚种葡萄的自然发酵过程中，一般存在柠檬形酵母(*Kloeckera*, *Hanseniaspora*)、假丝酵母属(*Candida*)、梅氏酵母属(*Metschnikowia*)和毕赤酵母属(*Pichia*)等非酵母属的酵母菌，这些酵母一般不耐高酒精度，不能完全发酵葡萄汁糖分，随着发酵的进行被 *S. cerevisiae* 所替代。但在山葡萄酒的自然发酵菌群的研究中，并没有筛选到欧亚种自然发酵中经常出现的葡萄汁有孢汉生酵母(*Hanseniaspora uvarum*)。相反的，德克酵母属(*Dekkera*)的 *D. anomala* 为主要的非酵母属的种。反映了欧亚种和东亚种的山葡萄在浆果表面及果园酵母菌生态方面的差别，主要取决于东北产区特殊的气候及生态条件以及山葡萄自身的酸高糖低、浸出物高、单宁色素含量高等特点。应用 WL 培养基对所筛选菌种根据菌落形态和颜色的初步分类表明该培养基对葡萄汁自然发酵过程中出现的大多数酵母菌具有很好的鉴别力，可以用于酒厂来监

测接种发酵可能的杂菌污染及作为酵母菌鉴定的辅助手段。

在酵母的资源利用方面,法国、美国和意大利等葡萄酒发达国家走在世界前列,适用于不同产地、葡萄酒类型和葡萄品种的“特种”酵母已经逐渐取代了“广适性”酵母。目前我国在葡萄酒酵母的研究和利用方面还处于起步阶段,葡萄酒生产所用菌种大部分依赖进口,单一菌种接种的纯种发酵使得葡萄酒失去了其特征的香气和风味^[9]。但从酿造学的观点来看,用本土的土著菌种接种发酵或者与其他接种物相混合进行发酵,可以生产出具有地区特色的葡萄酒^[10]。另外,当地优选的菌种由于适宜当地的风土环境,因而具有更强的发酵竞争力。

东北山葡萄及产区的特点决定了必须用与欧亚品种不同的发酵工艺和选用耐高滴定酸,耐低温的酵母接种物进行发酵。本实验自然发酵筛选的菌种中有44株 *S. cerevisiae*,下一步的研究就要从中优选适合东北产区发酵的接种物以解决经常出现的发酵中止,发酵周期太长等问题并保持该产区的山葡萄酒的独特风格。而且可以从中筛选耐低温发酵的菌株用于干白葡萄酒的发酵,更好的表现干白葡萄酒的品种香气^[11]。另外,对该产区酵母菌群的代表性菌株进行深入研究,可以为原产地域保护工作提供参考信息。

参考文献(References):

- [1] 张春晖,李华. 葡萄酒微生物学[M]. 西安:陕西人民出版社,2003:30—34.
- [2] 周小玲,沈微,饶志明,等. 一种快速提取真菌染色体DNA的方法[J]. 微生物学通报,2004,31(4):89—92.
ZHOU Xiao-ling, SHEN Wei, YAO Zhi-ming, et al. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA [J]. *Microbiology*, 2004, 31(4): 89—92. (in Chinese)
- [3] Green S R, Gray P P. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing [J]. *Wallerstein Comm*, 1950, 13: 357—366.
- [4] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mostie vini[J]. *Vignevini*, 1992, 9: 17—20.
- [5] Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49: 329—337.
- [6] Mannazzu I, Clementi F, Ciani M. Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts[M]. Kerala: Research Signpost, 2002: 19—33.
- [7] Martini A, Ciani M, Scorzett G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces[J]. *Am J Enol Vitic*, 1996, 47: 435—440.
- [8] Rementeria A, Rodriguez J A, Cadavala A, et al. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain) [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 86: 201—207.
- [9] Querol A, Ramon D. The application of molecular techniques in wine microbiology [J]. *Trends in Food Sci Technol*, 1996, 7: 73—78.
- [10] Heard G. Novel yeasts in winemaking looking to the future[J]. *Food Australia*, 1999, 51: 347—352.
- [11] 李华. 葡萄酒品尝学[M]. 北京: 科学出版社, 2006.

(责任编辑:李春丽)