

文章编号:1673-1689(2009)03-0385-05

内蒙古土默川平原葡萄酒相关酵母多样性研究

王凤梅^{1,2}, 马利兵³, 刘树文^{*1}

(1. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100; 2. 内蒙古包头轻工职业技术学院, 内蒙古包头 014030; 3. 内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古包头 014010)

摘要: 考察酿酒葡萄中酵母菌种的多样性, 分别采用形态学及基于酵母 5.8S rRNA-ITS 区域的 RFLP 分析法对内蒙古土默川平原酿酒葡萄中的酵母菌种进行了鉴定。结果表明, 该地区葡萄酒相关酵母分属于 5 个属的 6 个酵母菌种, 分别为葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)及星形假丝酵母(*Candida stellata*)。实验表明, 该地区酿酒葡萄中的酵母菌种具有多样性; 此外, 采用形态学及分子生物学相结合的方法可以快速、准确地对酵母菌种进行鉴定。

关键词: 葡萄酒相关酵母; 5.8S rRNA-ITS; RFLP

中图分类号: TS 26

文献标识码: A

Diversity of Wine Related Yeasts Isolated from Tumochuan plain of Inner Mongolia

WANG Feng-Mei^{1,2}, MA Li-Bing³, LIU Shu-Wen^{*1}

(1. College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Baotou Vocational College of Light Industry, Baotou 014030, China; 3. College of Mathematics, Physics and Bioengineering, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014010, China)

Abstract: The research of yeast diversity in wine grape can found a base for the screening and breeding of wine related yeasts. In this study, using morphological and RFLP analysis based on 5.8S rRNA-ITS region, wine related yeasts isolated from Tumochuan plain of Inner Mongolia were identified. The results indicated that there are six different species of yeast, including *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia anomala* and *Candida stellata*, and those yeast can be sorted into five genres, in wine grape of this area. This study indicated that the yeast species in wine grape was diverse in this area, and yeast can be quickly and accurately identified combined the methods of morphological and molecular analysis.

Key words: wine related yeast, 5.8S rRNA-ITS, RFLP

收稿日期: 2008-04-01

基金项目: 陕西省农业攻关项目(2005K02-G02)。

作者简介: 王凤梅(1975-), 女, 内蒙古包头人, 工学硕士, 讲师, 主要从事酿酒微生物方面的研究。

* 通讯作者: 刘树文(1965-), 男, 黑龙江北安人, 工学博士, 副教授, 主要从事葡萄酒工艺方面的研究。

Email: liushuwen@nwsuaf.edu.cn

在葡萄汁经发酵转变为葡萄酒的过程中,酵母菌起着决定性的作用。然而,葡萄汁发酵不是单一酵母菌种的行为。在发酵早期,柠檬型克勒克酵母/葡萄汁有孢汉逊酵母(*Kloeckera apiculata* / *Hanseniaspora unarum*)占优势,也有少量的假丝酵母(*Candida*)、红酵母(*Rhodotorula*)、毕赤酵母(*Pichia*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces*)、汉逊酵母(*Hansenula*)。发酵3~4 d后,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)开始占据主导地位,葡萄汁继续进行发酵^[1]。

传统的酵母菌种鉴定主要以形态特征、生理特征为依据,但这些特征易受培养条件的影响而常出现不确定的结果,且费时、费力。为了可靠地将酵母鉴定到种的水平,常需要做50~100次实验^[2]。近年来,采用分子生物学技术对酵母菌种进行鉴定得到了快速的发展。酵母菌种的核糖体5.8S rRNA基因及其两侧的转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)具有显著的种间差异性,基于该区域的限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)分析可用于酵母菌种的鉴定,且具有操作方法简单、重复性好等优点,因而已被广泛应用于临床病原酵母^[3]、果汁及果酒^[4-5]中的酵母种群鉴定。

不同的葡萄产地、气候、年份等因素决定了葡萄汁和葡萄酒中酵母菌的种类和构成比例^[1]。内蒙古土默川平原地区属温带半干旱气候,该地区种植葡萄已有200多年的历史,但种植酿酒葡萄起步较晚,相关酵母菌种的研究也未见报道。本研究分别采用形态及分子生物学的方法对该地区酿酒葡萄中的酵母菌种进行鉴定,旨在为该地区酿酒葡萄的病害防治、葡萄酒发酵工艺控制及优良酿酒酵母的筛选提供依据。

1 材料与方法

1.1 自然发酵

葡萄浆果于2006年9月采收于内蒙古土默川平原维信葡萄酒厂。葡萄在发酵车间经除梗、破碎处理后,转入无菌的玻璃容器内,在实验室内室温下进行自然发酵。

1.2 菌种分离

分别在自然发酵的前期、中期、后期,使用YPD培养基对自然发酵葡萄汁中的菌种进行分离纯化培养,然后将纯化的菌株涂布于WL培养基上,于28℃条件下继续培养。培养5 d后,根据菌落颜色、形态进行初步分类。YPD培养基配方为:酵母万方数据

浸粉10 g、蛋白胨20 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL,培养基中需添加100 mg/L氯霉素,用于抑制细菌的生长。WL培养基(Wallerstein Laboratory Nutrient Agar)配方参照Cavazza等^[6]提供的数据:酵母浸粉4 g、胰蛋白胨5 g、葡萄糖50 g、琼脂20 g、磷酸二氢钾0.55 g、氯化钾0.425 g、氯化钙0.125 g、硫酸镁0.125 g、氯化铁0.002 5 g、硫酸锰0.002 5 g、溴钾酚绿0.022 g、蒸馏水1 000 mL。

1.3 酵母DNA的提取

用无菌的接种环挑取经初步分类的酵母菌落,转移到含50 μL STES缓冲液的微量离心管中。随后,向酵母悬液中加入50 μL酸洗过的玻璃珠(Sigma)、20 μL TE(pH 7.6)、60 μL 酚:氯仿混合液(V/V, 1:1)。将上述混合液振荡1 min,使有机相与水相充分混合。室温下最大转速离心混合液5 min,将上层水相转移到一个新的离心管中,置于冰水混合物中使温度降至0℃。向离心管中加入200 μL预冷乙醇沉淀酵母DNA,4℃下最大转速离心10 min,弃上清液。沉淀用体积分数70%乙醇洗涤1~2次,室温下最大转速离心1 min,弃上清液,离心管置于超净工作台上干燥DNA沉淀15 min。最后,将沉淀溶于40 μL TE(pH 7.6)中,于4℃下保存。

1.4 酵母5.8S rRNA-ITS区域的PCR扩增

用于5.8S rRNA-ITS区域扩增的引物序列参见文献^[7],由上海生物工程公司合成。正义引物(ITS1)序列为:5'-TCC GTA GGG TGA ACC TGC GG-3';反义引物(ITS4)序列为:5'-CGT ATA GTT ATT CGC CTC CT-3'。PCR反应混合液包括:1 μL DNA模板、1 μL ITS1(10 μmol/L)、1 μL ITS4(10 μmol/L)、1 μL Taq DNA聚合酶(2.5 U/μL, TaKaRa)、5 μL 10×PCR缓冲液(500 mmol/L KCl、100 mmol/L TrisCl、15 mmol/L MgCl₂, TaKaRa)、1 μL dNTP混合液(2.5 mmol/L each, TaKaRa)、40 μL 超纯水,反应总体积为50 μL。PCR反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,55℃退火2 min,78℃延伸2 min,共35个循环,最后72℃延伸10 min,反应于PCR仪上进行(DNA Engine DYAD, MJ Research Inc. USA)。少量PCR产物经1 g/dL琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像分析仪(北京君意)下观察并摄影。

1.5 酵母5.8S rRNA-ITS区域RFLP分析

不同菌种的PCR扩增产物分别采用限制性核

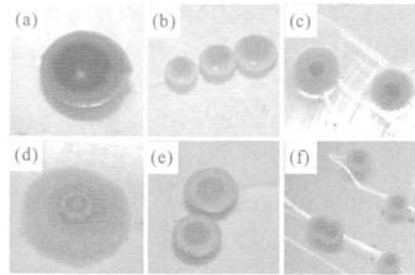
酸内切酶 *Hinf*I、*Hae* III、*Hha*I(IBM) 进行酶切。酶切反应体系包括:10 μ L PCR 扩增产物、2 μ L 10 \times buffer、2 μ L 限制性核酸内切酶、6 μ L 超纯水,反应总体积为 20 μ L。反应混合液置于微量离心管中,于 37 $^{\circ}$ C 的恒温水浴锅中酶切 16 h。酶切产物经 1.4 g/dL 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像分析仪下观察并摄影。

2 结果与讨论

2.1 酿酒葡萄中酵母菌种的形态学鉴定

从自然发酵的葡萄汁中共分离纯化出 276 株酵母菌,将所有菌株在 WL 培养基上继续进行培养,根据菌落的颜色、形态将其划分为 6 种不同类型,结果见图 1 及表 1。

从图 1 及表 1 可知,内蒙古土默川平原酿酒葡萄中至少存在 6 种酵母菌种,这些酵母菌种在 WL 培养基上表现出明显的形态及颜色差异,因而可采用 WL 培养基对酵母菌种进行形态学初步鉴定。



(a) BF26 菌株;(b) EF12 菌株;(c) MF28 菌株;(d) BF1 菌株;(e) BF16 菌株;(f) BF35 菌株

图 1 WL 培养基上不同酵母菌落形态

Fig. 1 Morphology of yeast colonies cultured on WL medium

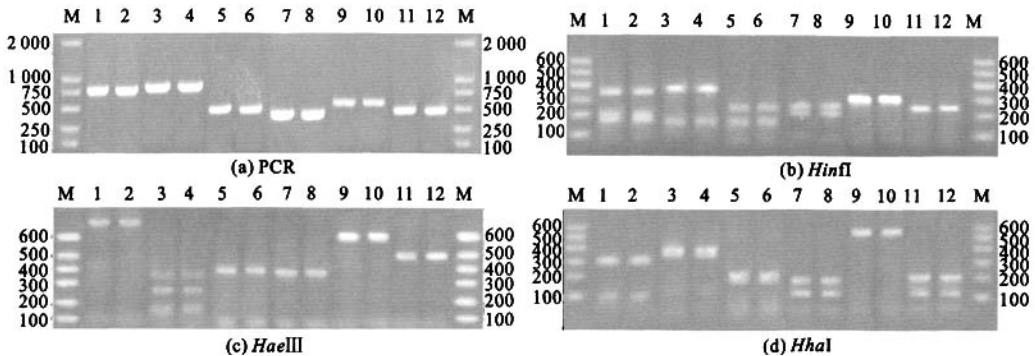
2.2 酿酒葡萄中酵母菌种的 RFLF 分析

对经 WL 培养基初步分类的上述 6 种酵母菌种各取 2 株进行基于 5.8S rRNA-ITS 区域的 RFLP 分析,PCR 扩增产物及酶切片段电泳结果见图 2。

表 1 WL 培养基上不同酵母菌落形态描述

Tab. 1 Morphological description of yeast colonies cultured on WL medium

类型	菌株	菌落形态
I	BF26, BF27	中央深绿色,边缘绿色,扁平,表面光滑,油状
II	MF33, EF12	奶油色至淡绿色,球形凸起,表面光滑,有光泽,油状
III	BF11, MF28	中央淡绿色,乳头状凸起,边缘白色,放射状,表面粉状
IV	BF1, BF6	奶油色至淡绿色,中间火山状,边缘放射状,表面凸凹不平,面粉状
V	BF16, BF17	蓝灰色,边缘奶油色,平坦,表面光滑,干燥无光
VI	BF35, BF51	菌落小,奶油色至绿色,锥状凸起,表面光滑,油状



(a) PCR 扩增产物;(b) PCR 扩增产物经 *Hinf*I 酶切后的片段;(c) PCR 扩增产物经 *Hae* III 酶切后的片段;(d) PCR 扩增产物经 *Hha* I 酶切后的片段;1, BF26; 2, BF27; 3, MF33; 4, EF12; 5, BF11; 6, MF28; 7, BF1; 8, BF6; 9, BF16; 10, BF17; 11, BF35; 12, BF51; M. DNA 分子量标准

图 2 酵母菌种 5.8S rRNA-ITS 区域的 PCR 扩增产物及限制性酶切片段电泳图

Fig. 2 Electrophoresis results of PCR production amplified from yeast 5.8S rRNA-ITS region and endonuclease digestion fragment of PCR production

由图2可知,12株酵母菌株分属于形态学鉴定出的6种酵母菌种。这6种酵母菌种的5.8S rRNA-ITS区域扩增产物长度及HinfI、Hae III、HhaI三种酶切片段长度存在极大的差异。因而,基于5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析可用于对酵母进行菌种鉴定。通过与Esteve-Zarzoso B、Fernandez-Espinar M T等人有关酵母菌种5.8S

rRNA-ITS区域的RFLP分析结果比对^[7-11],最终确定上述6种酵母菌种分别为葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)及星形假丝酵母(*Candida stellata*)(见表2)。

表2 不同酵母菌种基于5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析
Tab.2 RFLP analysis based on yeast 5.8S rRNA-ITS region

菌株	PCR产物 长度/bp	限制性片段长度/bp			菌种
		<i>HinfI</i>	<i>Hae III</i>	<i>HhaI</i>	
BF26, BF27	750	350+200+180	750	320+310+105	葡萄汁有孢汉逊酵母
MF33, EF12	880	365+155	320+230+180+150	385+365	酿酒酵母
BF11, MF28	480	230+160+90	390+90	230+200+60	东方伊萨酵母
BF1, BF6	450	250+200	370+90	175+115	克鲁维毕赤酵母
BF16, BF17	620	310+310	600+50	560	异常毕赤酵母
BF35, BF51	490	245+245	490	210+130+80	星形假丝酵母

3 结 语

WL培养基最初由Wallerstein实验室设计用来监测工业发酵过程中微生物类群的一种非选择性培养基。这种培养基可用来区分和鉴定一些常见的葡萄酒相关酵母,主要基于菌落的颜色及形态,可以用于监测接种发酵时可能的杂菌污染及作为酵母菌种鉴定的辅助手段^[12]。作者首先采用WL培养基对内蒙古土默川平原酿酒葡萄中的酵母菌种进行了形态学的初步鉴定,鉴定出的6种酵母菌种在WL培养基上表现出极大的形态及颜色差异,后续分子生物学鉴定证明了形态学鉴定的正确性。因而,实验进一步表明了WL培养基可用于对酿酒葡萄中的酵母菌种进行初步鉴定。

前人的研究表明,酵母基因组中两个非编码的具有多态性的内部转录间隔区(ITS)和编码且保守的5.8S rRNA区具有低的种内多态性和高的种间差异性^[13],因而可作为酵母菌种分类的依据。1999年,Esteve-Zarzoso等首次采用酵母5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析对分属于25个属的132个酵母菌种进行了鉴定,并提供了相应酵母菌种的RFLP数据,为酵母菌种的快速鉴定提供了方

便^[7]。在随后的几年时间里,基于酵母5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析数据得到了不断的补充,将酵母属(*Saccharomyces*)^[8]、假丝酵母属(*Candida*)^[9]、毕赤酵母属(*Pichia*)^[10]等的相关数据也包括在内,极大地增强了RFLP分析法在酵母菌种鉴定方面的实用性。本研究在对内蒙古土默川平原葡萄酒相关酵母种群进行形态学鉴定的基础上,进一步采用了基于酵母5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析。将实验数据与上述相关文献比对后,快速鉴定出内蒙古土默川平原葡萄酒相关酵母菌种分属于酵母5个属的6个菌种,分别为葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、星形假丝酵母(*Candida stellata*)。因而本实验充分说明了基于酵母5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析可对酵母菌种进行快速、准确的鉴定。

对葡萄酒相关酵母的属、种进行鉴定具有十分重要的意义。通过鉴定可以对酵母菌种进行比较,弄清它们在酿酒过程中所起的作用,解决发酵过程中出现的问题,控制败坏性酵母的危害,选择适合于该地区的优良酿酒酵母。

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—37.
- [2] Lin CC, Fung DY. Conventional and rapid methods for yeast identification[J]. *Crit Rev Microbiol*, 1987, 14(4): 273—289.
- [3] Trost A, Graf B, Eucker J, et al. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP [J]. *J Microbiol Meth*, 2004, 56(2): 201—211.
- [4] Las Heras-Vazquez FJ, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, et al. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers[J]. *FEMS Yeast Res*, 2003, 3(1): 3—9.
- [5] Valles BS, Bedri ana RP, Tasc n NF, et al. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider[J]. *Food Microbiol*, 2007, 24(1): 25—31.
- [6] Cavazza A, M. S. Grando, and C. Zini. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini[J]. *Vignevini*, 1992, 9:17—20.
- [7] Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8SrRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(1): 329—337.
- [8] Fernandez-Espinar M T, Esteve-Zarzoso B, Querol A, et al. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, 78(1):87—97.
- [9] Frutos R I, Fernandez-Espinar M T, Querol A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2004, 85(3):175—185.
- [10] Villa-Carvajal M, Querol A, Belloch C. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers(ITS1 and ITS2)and the 5.8S ribosomal DNA gene[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 90(2):171—181.
- [11] 杨莹. 新疆地区葡萄酒相关酵母菌的生物多样性研[D]. 杨凌:陕西杨陵西北农林科技大学葡萄酒学院, 2007.
- [12] 杨雪峰,苏龙,刘树文. 利用 WL 培养基鉴定葡萄酒中的相关酵母菌[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2006,4:4—7.
- [13] Cai J, Roberts IN, Collins MD. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(2), 542—549.

(责任编辑:杨萌)