

王凤梅,马利兵. 内蒙古西部赤霞珠葡萄自然发酵酵母菌群的动态变化[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):340-343.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.099

内蒙古西部赤霞珠葡萄自然发酵酵母菌群的动态变化

王凤梅¹, 马利兵²

(1. 包头轻工职业技术学院, 内蒙古包头 014030; 2. 内蒙古科技大学数理与生物工程学院, 内蒙古包头 014010)

摘要: 在无菌条件下,对内蒙古西部地区赤霞珠葡萄汁进行自然发酵,分别在发酵初、中、后期分离酵母菌株,采用WL营养琼脂对其进行形态学分类,采用基于酵母5.8S rRNA-ITS区域的RFLP(restriction fragment length polymorphism)分析对分类酵母菌株进行分子生物学鉴定,统计不同发酵时期发酵液中酵母菌株的种类及数量。结果表明,分离到的327株酵母菌分属于5个属的5个酵母菌种,分别是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、克鲁维毕赤氏酵母(*Pichia kluyveri*)、浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flaveszens*)及葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*);自然发酵初期,葡萄汁有孢汉逊酵母、克鲁维毕赤氏酵母的数量占据优势,分别占分离总菌株数的64.22%、17.43%;随着发酵进行,非酿酒酵母(non-*Saccharomyces*)菌株的数量有所减少,酿酒酵母的数量逐渐增加,至发酵后期,发酵液中仅能检测到酿酒酵母的存在。这表明内蒙古西部地区野生酵母菌种较为丰富,WL营养琼脂形态学分类法结合酵母5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析能够快速分类、鉴定野生酵母菌种,实时监测发酵液中酵母菌群的动态变化趋势。

关键词: 葡萄酒;酵母;赤霞珠;WL营养琼脂;动态变化

中图分类号: S182;TS262.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0340-04

葡萄表面、葡萄园土壤、葡萄酒厂乃至酿酒设备上存在着

收稿日期:2015-08-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160245)。

作者简介:王凤梅(1975—),女,河北定县人,硕士,副教授,主要从事发酵微生物研究。E-mail:maywfm@126.com。

通信作者:马利兵,博士,教授,主要从事细胞工程及基因工程研究。E-mail:mlb-xn2004@163.com。

度。通过方差分析和多重比较后进行验证试验,可知最佳工艺参数:料液比为1 g:35 mL、提取时间为1.0 h、提取温度为80℃、甲醇浓度为70%,此时提取得率为19.13%。

甲醇提取物在0~1 000 μg/mL浓度范围内有较明显的抗氧化活性,各指标活性随着浓度的增加而增强;当甲醇提取物的浓度为1 000 μg/mL时,甲醇提取物对羟基自由基清除率为50.23%,对1,1-二苯基-2-苯基自由基的清除率达到78.86%,对亚硝酸盐(NO₂⁻)的清除率高达87.24%;甲醇提取物的总抗氧化能力和浓度呈正相关,与对照品维生素C相比,总抗氧化力变化趋势基本接近。

参考文献:

- [1]高静,周日宝,王朝晖. 鱼腥草的现代研究进展[J]. 湖南中医学院学报,2005,25(6):60-61.
- [2]全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编·上册[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:553-554.
- [3]胡风莲,倪细炉,刘文哲. 鱼腥草中总黄酮和鞣质含量的动态变化[J]. 陕西师范大学学报,2007,36(增刊2):91-94.
- [4]宗晓萍. 鱼腥草有效成分的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2005:20-23.
- [5]陈春花,臧莹安,李荣誉. TMP对鱼腥草抑菌效果的影响[J]. 中

大量与葡萄酒发酵有关的天然酵母菌种^[1]。在这些酵母菌种中,酵母属(*Saccharomyces*)在发酵过程中起主要作用,发酵力较强,产酒精多,产生的有益副产物多;而非酵母属(non-*Saccharomyces*)在葡萄汁中数量较多,能启动发酵,但其发酵力相对较弱^[2]。在传统的葡萄及葡萄酒产区,一些天然酵母菌种在每年生长、繁殖过程中逐渐适应了当地的气候及土壤条件,并与当地葡萄品种形成良好的共生关系,再经自然选择

- 医医药杂志,2002,20(1):16-18.
- [6]熊大胜,席在星,邓应威. 鱼腥草提取物抑菌作用研究[J]. 常德师范学院学报,2002,14(4):59-60.
- [7]苏金祥,石磊. 鱼腥草注射液的药理及临床应用[J]. 现代中西医结合杂志,2004,13(17):2360-2361.
- [8]李小定,荣建华,吴谋成. 灰树花多糖PGF-1体外对羟基自由基的抑制作用[J]. 食品科学,2003,24(7):126-130.
- [9]张庭延,聂刘旺,陶瑞松,等. 三种植物多糖的抗氧化活性研究[J]. 安徽师范大学学报,2002,25(1):56-58.
- [10]朱萍萍,廖慧珍. 麦草食品抗氧化作用初步研究[J]. 福建医科大学学报,1997,31(1):40-43.
- [11]高鹤娟. 食品卫生检验方法(理化部分)注释[M]. 北京:卫生部食品卫生监督检验所,1987:244.
- [12]谭萍,方玉梅,王毅红,等. 苦荞种子黄酮类化合物清除DPPH自由基的作用[J]. 食品研究与开发,2008,29(12):20-23.
- [13]朱萍萍,廖慧珍. 麦草食品抗氧化作用初步研究[J]. 福建医科大学学报,1997,31(1):40-43.
- [14]方允中,郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [15]张英,丁霄霖. 竹叶有效成分和抗活性氧自由基效能的研究[J]. 竹子研究汇刊,1996(3):17-24.

作用形成适应于不同类型葡萄酒的酵母菌系^[3]。对天然酵母种群的研究报道表明,绝大多数情况下,葡萄品种、地理位置及气候条件等会影响天然酵母的菌群及其数量^[4]。

内蒙古西部地区属中温带半干旱大陆性气候,干旱少雨,日照充足,昼夜温差大,有效积温高,是我国优质的酿酒葡萄产区。本研究采用 WL 营养琼脂形态学分类法,结合酵母 5.8S rRNA - ITS 区域的 RFLP(restriction fragment length polymorphism)分析,对内蒙古西部地区赤霞珠葡萄中的酵母菌种进行分类、鉴定,确定该地区天然酵母菌群的种类,探究自然发酵过程中天然酵母菌群的动态变化趋势,为该地区葡萄酒发酵工艺控制及后续优良酿酒酵母筛选提供理论及技术依据。

1 材料与方法

1.1 菌种分离

1.1.1 培养基 YPD 培养基(yeast extract peptone dextrose medium)^[5];酵母浸粉 1%、蛋白胨 2%、葡萄糖 2%,固体培养基中需添加 2% 琼脂、0.01% 氯霉素。WL 琼脂培养基(wallerstein laboratory nutrient agar)配方^[6]:酵母浸粉 0.4%、胰蛋白胨 0.5%、葡萄糖 5%、琼脂 2%、磷酸二氢钾 0.055%、氯化钾 0.042 5%、氯化钙 0.012 5%、硫酸镁 0.012 5%、氯化铁 0.000 25%、硫酸锰 0.000 25%、溴钾酚绿 0.002 2%,pH 值为 5.5。

1.1.2 自然发酵过程中酵母的分离 赤霞珠来源于内蒙古西部阿拉善盟酿酒葡萄产区,选取成熟的赤霞珠果粒,无菌条件下破碎,转入 1 L 的无菌玻璃容器内,室温下进行自然发酵;分别在自然发酵前期(瓶底部有少量气泡产生,发酵启动)、中期(大量气泡上升,发酵旺盛)及后期(无明显气泡上升,发酵消退期)取发酵液,经梯度稀释,涂布于 YPD 平板上,28 ℃ 培养 3 d;结合菌落颜色及形态挑取菌落,对挑取的单个菌落以划线方式在 YPD 平板上进一步分离、纯化。

1.2 分离菌种的形态学分类

将各时期分离的酵母菌株划线接种于 WL 培养基上,28 ℃ 培养 5 d,观察记录菌落的颜色、形态,并对其进行分类,统计不同发酵时期不同酵母菌株的数量。

1.3 酵母菌种的分子生物学鉴定

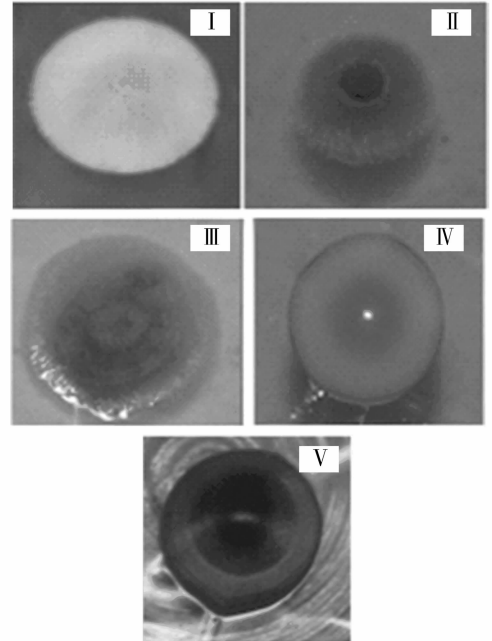
对经形态学鉴定的酵母菌种,参照 Esteve - Zarzoso 等的方法^[7-8],进一步进行 5.8S rRNA - ITS 区域 RFLP 分析。采用天根生化科技(北京)有限公司生产的酵母基因组提取试剂盒,按试剂盒说明书提取酵母菌的基因组 DNA, -20 ℃ 冻存、备用;采用由生工生物工程(上海)股份有限公司合成的引物 ITS1: 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3' 和 ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3' 对不同酵母菌株的 5.8S rRNA - ITS 区域进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:模板 DNA 1 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,10 × PCR buffer 5 μL、2.5 U/μL Taq DNA 聚合酶 1 μL,dNTP 混合液 1 μL,超纯水 40 μL。反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 2 min,72 ℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物分别采用由宝生物(大连)有限公司生产的限制性核酸内切酶 *Hinf* I、*Hae* III 及 *Hha* I 于 37 ℃ 条件下酶切 16 h,酶切反应体系为:PCR 扩增产物 10 μL,10 × buffer 2 μL,限制性核酸内切酶 2 μL,超纯水 6 μL。酶切产物

经 1% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色,在凝胶成像分析仪下观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 WL 培养基上酵母菌株的聚类分析

从赤霞珠自然发酵的葡萄汁中共分离、纯化出 327 株酵母菌,将所有菌株划线接种于 WL 培养基上继续进行培养,观察酵母菌株在 WL 培养基上的菌落颜色及形态。根据不同酵母菌种在 WL 培养基上呈现的不同菌落颜色及形态(图 1、表 1),将分离纯化的 327 株酵母菌分为 5 类。



I—CS-3-14; II—CS-1-8; III—CS-1-86; IV—CS-1-95;
V—CS-2-109。

图1 WL 培养基上不同酵母菌的菌落形态

表1 不同酵母菌落在 WL 培养基上的形态描述

菌株	菌落颜色	菌落形态
I	奶油色至淡绿色	凸起,表面光滑,有光泽,油状
II	中央绿色,边缘淡绿色至白色	中央乳头状凸起,放射状,表面粉状
III	奶油色至淡绿色	呈火山状,边缘放射状,表面粉状
IV	边缘奶油色,中间灰绿色	凸起,表面湿润光滑,有光泽,油状
V	深绿色	菌落较大,扁平,表面光滑,有光泽,油状

2.2 酵母 5.8S rRNA - ITS 区域的 RFLP 分析

分别提取 5 种类型酵母菌的基因组 DNA,以 ITS1/ITS4 为引物对其 5.8S rRNA - ITS 区域进行 PCR 扩增,扩增产物分别用 *Hif*、*Hae* III 及 *Hha* I 进行酶切,经凝胶电泳检测,共有 5 种不同的酶切类型,见图 2、表 2。通过与 Esteve - Zarzoso 等研究结果^[7-10]进行比对分析,确定 I 至 V 类型酵母菌种分别为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*)和葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)。

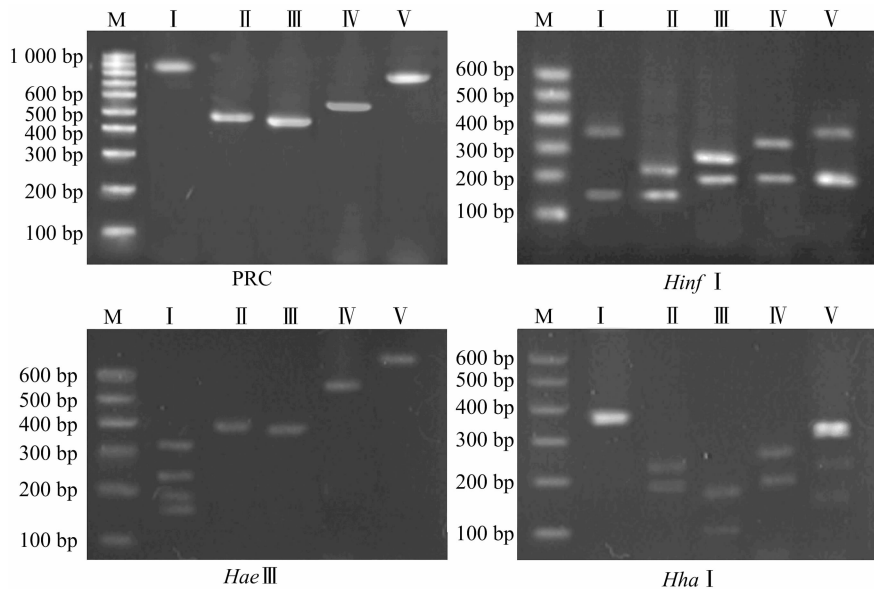


图2 酵母菌株 5.8S rRNA-ITS 区域的 PCR 扩增产物及限制性酶切片段电泳图

表2 不同酵母菌种基于5.8S rRNA-ITS区域的RFLP分析结果

菌株	菌种	PCR 产物长度 (bp)	限制性片段长度 (bp)		
			<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I
I	酿酒酵母	880	365 + 155	320 + 230 + 180 + 150	385 + 365
II	东方伊萨酵母	480	230 + 160 + 90	390 + 90	230 + 200 + 60
III	克鲁维毕赤酵母	450	250 + 200	370 + 90	175 + 115 + 80 + 80
IV	浅黄隐球酵母	550	320 + 200	550	260 + 200 + 80
V	葡萄汁有孢汉逊酵母	750	350 + 200 + 180	750	320 + 310 + 105

2.3 不同发酵时期酵母菌的种群分布

由图3可见,不同发酵时期的发酵液中,不同酵母菌种的分布存在很大差异;发酵前期,分离到的菌株为酿酒酵母、东方伊萨酵母、克鲁维毕赤氏酵母、浅黄隐球酵母和葡萄汁有孢汉逊酵母,分别占分离总菌株的2.75%、9.17%、17.43%、6.42%、64.22%,葡萄汁有孢汉逊酵母是这一时期的优势酵母菌,其次是克鲁维毕赤酵母,酿酒酵母、东方伊萨酵母及浅黄隐球酵母检出量相对较少;发酵中期,发酵液中葡萄汁有孢汉逊酵母的数量锐减,其他非酿酒酵母的数量也有所减少,而酿酒酵母随发酵的进行逐渐占据优势地位;发酵后期,发酵液中仅能检测到酿酒酵母的存在。

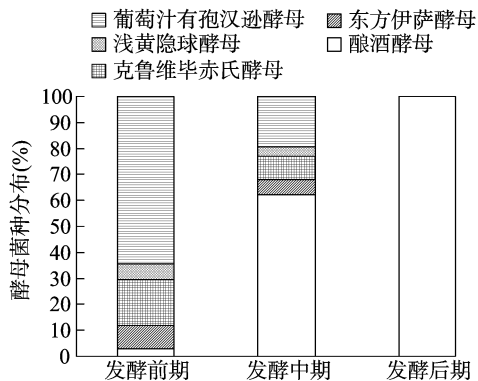


图3 不同发酵时期酵母菌种的分布

3 结论与讨论

酵母菌普遍存在于葡萄果实、叶片、根系以及葡萄园土壤颗粒中,葡萄果实表面是各种酵母菌的天然栖息地,其上分布的酵母菌数量尤为可观。葡萄汁在发酵过程中,酵母菌群种类及其数量处于动态变化中,不同酵母菌群有规律地此消彼长,发酵力强的酿酒酵母比例会逐渐上升,发酵力弱的酵母比例会迅速下降。近些年,有关葡萄发酵过程中酵母菌群的动态变化国内外已做了大量研究与报道,结果表明,在葡萄浆果表面占主导地位的酵母主要为葡萄汁有孢汉逊酵母属、假丝酵母属(*Candida*)及毕赤酵母属(*Pichia*)等,这些非酿酒酵母在发酵初期占据优势;随着发酵的进行,非酿酒酵母的数量会逐渐减少,直至消失,而耐酒精能力更强的酵母属酵母会逐渐增多,直至占据主导地位;发酵结束,发酵液中存活几乎全部是酵母属酵母^[11-14]。本试验得到同样一致的结论,这说明不同葡萄产区的天然酵母虽然存在种属差异,然而,葡萄汁在发酵过程中,天然酵母种群的变化趋势是相同的。

本试验中使用的 WL 培养基是一种非选择性培养基,该培养基最初由 Wallerstein 实验室设计,用于检测饮料中的微生物菌群。国内外研究表明,使用 WL 培养基能够实现基于菌落的颜色及形态对酵母菌进行分类,该培养基对自然发酵过程中葡萄汁中分离到的酵母菌种具有良好的鉴别能力^[6,13,15]。Pallmann 等采用 WL 营养培养基对发酵过程中发

酵液的酵母菌种进行分类,采用 26S rDNA 测序技术对分类结果进行验证,结果表明,WL 营养琼脂培养基可用于监测发酵液中酵母菌群的动态变化趋势^[16]。杨莹等也采用 WL 营养培养基对葡萄酒相关酵母菌种进行分类,采用酵母 5.8S - ITS 区及 26S rDNA D1/D2 区扩增与测序技术对分类结果进行验证,结果表明,WL 营养琼脂与分子生物学的鉴定结果相一致^[13]。因此,WL 营养琼脂能对葡萄酒相关酵母进行分类,此法经济简单、易行。

亲缘关系相近的菌种,其 5.8S rRNA 序列很相似,但其两侧的间隔序列(ITS)由于相对较快的进化速率,而具有长度和序列上的高度变异性,可以提供丰富的变异位点和信息位点。因此,采用酵母菌种 5.8S rRNA - ITS 区的 RFLP 分析,可作为鉴别酵母菌种的依据^[6]。Esteve - Zarzoso 等首次建立了 132 种酵母的 RFLP 分析图谱数据库,并确定 5.8S rRNA - ITS 扩增片段的 RFLP 分析在种的水平上鉴定酵母的有效性^[6]。此后,该数据库得到不断的补充和完善^[7-9],Echeverrigaray 等使用该方法鉴定出巴西葡萄酒中的非酵母属败坏酵母^[17],Ubeda 等也采用 5.8S rRNA - ITS 区 RFLP 分析及 26S rDNA D1/D2 区扩增与测序技术研究西班牙 La Mancha 地区葡萄酒厂的非酵母属的多样性^[18]。

早期的研究一般认为,葡萄汁有孢汉逊酵母的发酵力低,能生成较多的醋酸及乙酸乙酯,对葡萄酒的整个酿造过程具有负面影响^[19]。然而,近期研究表明,有孢汉逊酵母属中的部分菌株能生成大量的酯类、甘油及 β - 葡萄糖苷酶,对葡萄酒的化学成分和最终感官有着积极影响^[20]。Longo 等认为,随着发酵力低的克勒克酵母属、有孢汉逊酵母属及其他一些属酵母如毕赤酵母属、假丝酵母属等的发酵启动,耐酒精能力强的酿酒酵母会逐步占据优势,主导发酵的完成^[21]。本试验在无菌环境下对内蒙古西部地区采集到的赤霞珠进行自然发酵,通过分析不同发酵时期酵母菌群的动态变化过程,一方面证明发酵液中存在大量的野生酿酒酵母,发酵初期,发酵液中能分离到少量的克鲁维毕赤酵母、酿酒酵母、东方伊萨酵母及浅黄隐球酵母,葡萄汁有孢汉逊酵母在发酵早期为优势菌株,另一方面,结果表明,在发酵中期,非酿酒酵母的数量锐减,酿酒酵母的数量逐渐占据优势,分析其原因在于:随着发酵的进行,发酵液中的酒精浓度逐渐升高,非酿酒酵母由于较低的酒精耐受力而使生长受到抑制,甚至死亡,而酿酒酵母的酒精耐受力较强,仍可大量增殖,此消彼长,最终导致发酵中期的发酵液中酵母菌群的数量发生根本性改变,且这一过程持续进行,直至发酵末期,发酵液中仅能分离到酿酒酵母。

参考文献:

- [1] Boulton R B, Singleton V L, Bisson L F. 葡萄酒酿造学:原理及应用 [M]. 赵光鳌,译. 北京:中国轻工业出版社,2001:103 - 173.
- [2] 赫尔姆特·汉斯. 葡萄酒微生物学 [M]. 宋尔康,译. 北京:轻工业出版社,1989:16 - 26.
- [3] Guillamón J M, Sabaté J, Barrio E, et al. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region [J]. Archives of Microbiology, 1998, 169 (5): 387 - 392.
- [4] Granchi L, Ganucci D, Messini A, et al. Oenological properties of

- Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes [J]. FEMS Yeast Research, 2002, 2(3): 403 - 407.
- [5] 巴尼特 J A, 佩恩 R W, 亚罗 D, 等. 酵母菌的特征及鉴定手册 [M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1984.
- [6] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini [J]. Vignevini, 1992, 9: 17 - 20.
- [7] 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]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49: 329 - 337.
- [8] Fernández - 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] de Llanos Frutos R, Fernández - 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] van Keulen H, Lindmark D G, Zeman K E, et al. Yeasts present during spontaneous fermentation of lake erie chardonnay, pinot gris and riesling [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2003, 83(2): 149 - 154.
- [12] Šuranská B, Vránová D, Omelková J, et al. Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine [J]. Chemical Papers, 2012, 66(9): 861 - 868.
- [13] 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.
- [14] 宋育阳, 裴颖芳, 王国平, 等. 黑比诺葡萄接种发酵过程酵母菌的变化监控 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 125 - 130.
- [15] 薛军侠, 徐艳文, 杨莹, 等. WL 培养基在酿酒酵母筛选中的应用 [J]. 中国酿造, 2007(9): 36 - 39.
- [16] Pallmann C L, Brown J A, Olineka T L, et al. Use of WL medium to profile native flora fermentations [J]. American Journal of Enology Viticulture, 2001, 52(3): 198 - 203.
- [17] Echeverrigaray S, Randon M, da Silva Keoma, et al. Identification and characterization of non - *Saccharomyces* spoilage yeasts isolated from Brazilian wines [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(6): 1019 - 1027.
- [18] Ubeda J, Maldonado Gil M, Chiva R, et al. Biodiversity of non - *saccharomyces* yeasts in distilleries of the La Mancha region (Spain) [J]. FEMS Yeast Research, 2014, 14(4): 663 - 673.
- [19] Esteve - Zarzoso B, Manzanares P, Ramón D, et al. The role of non - *Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking [J]. International Microbiology, 1998, 1(2): 143 - 148.
- [20] Romano P, Fiore C, Paraggio M, et al. Function of yeast species and strains in wine flavour [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86(1/2): 169 - 180.
- [21] Longo E, Cansado J, Agrelo D, et al. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1991, 42(2): 141 - 144.