

赤霞珠葡萄酒自然发酵中酿酒酵母的菌株区分

裴颖芳¹ 王国平¹ 刘延琳^{1,2*}

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

摘要: 采用 Interdelta 指纹图谱分析, 对分离自宁夏地区赤霞珠葡萄自然发酵过程中的 45 个酿酒酵母单菌落进行菌株区分, 研究发酵过程中酿酒酵母菌株的变化, 为发酵的有效控制及选育优良酿酒酵母菌株提供依据。结果发现, 本研究分离到的 45 个酿酒酵母单菌落中, 产生 5 种指纹图谱, 代表 5 种不同的基因型, 基因型 I-V 分别占所分离单菌落的 71%、13%、9%、5.0%、2.0%, 基因型 I 是发酵过程中的优势菌株。本研究中, 二氧化硫处理影响自然发酵过程中酿酒酵母菌株的类型、数目及比例, 但其影响不是很大。

关键词: 酿酒酵母, Interdelta 指纹图谱, 菌株区分, 优势菌株

Strain Typing of *Saccharomyces cerevisiae* During Spontaneous Fermentation of Cabernet Sauvignon Wine

PEI Ying-Fang¹ WANG Guo-Ping¹ LIU Yan-Lin^{1,2*}

(1. College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)
(2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Interdelta fingerprinting has been carried out for *Saccharomyces* strain typing by using 45 *Saccharomyces* isolates from spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon in Ningxia. The dynamic changes of the *Saccharomyces cerevisiae* strains were observed, which can provide an approach for better control of the fermentation process. The result revealed that 5 genetic patterns were distinguished by interdelta fingerprinting among the total *Saccharomyces* isolates. The genetic pattern I to V accounted 71%、13%、9%、5.0%、2.0% respectively for the proportion of the total *Saccharomyces* isolates. Therefore, the genotype I was the dominant strain during the fermentation. Moreover, the influences on the genotype, the number and the proportion of *S. cerevisiae* strains by sulphur dioxide added before fermentation were also demonstrated in this study.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Interdelta fingerprinting, Strain typing, Dominant strain

葡萄酒发酵过程是一个复杂的动态变化过程, 在这个进程中酿酒酵母菌株及数目也在不断的变化。研究此过程中酿酒酵母菌株的动态变化, 揭示

不同处理和不同发酵阶段酿酒酵母菌株的变化, 有利于葡萄酒发酵过程中的微生物学控制, 也可以为研究本土酿酒酵母菌株对葡萄酒风味的影响提供依

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA10Z314); 国家葡萄产业技术体系建设专项经费资助(No. Z225020801)

* 通讯作者: Tel: 86-29-87092931; E-mail: lyisun@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-20; 接受日期: 2009-05-07

据。而有效进行酿酒酵母菌株水平的区分已成为监测葡萄酒发酵过程中种群动态变化的先决条件^[1-3]。菌株区分有利于对发酵过程进行有效的控制, 并为选育该地区具有典型酿酒特性的本土酿酒酵母菌株资源提供依据, 为生产该产区具有典型性的优质葡萄酒提供保证。

目前, 对酿酒酵母进行菌株区分, 分辨率高的方法有脉冲电泳核型分析、线粒体 DNA 限制性片段长度多态性分析、Interdelta 序列指纹图谱分析以及 *COX1* 基因指纹图谱分析等。其中, Interdelta 指纹图谱分析法操作方便简单、所得条带多态性丰富且稳定, 已逐渐取代前两种经典方法而成为酿酒酵母菌株区分的主导方法^[4]。本研究利用 Interdelta 指纹图谱对宁夏地区赤霞珠葡萄自然发酵中的酿酒酵母进行了菌株区分, 研究其菌株差异及分类、发酵过程中酿酒酵母菌株的变化, 及二氧化硫处理的影响, 为有效控制发酵提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

2007 年 9 月下旬在宁夏御马葡萄酒厂葡萄园, 采摘成熟的赤霞珠葡萄, 按 2 种方式处理: 1) 破碎后直接自然发酵; 2) 破碎后加入 40 mg/L 二氧化硫再自然发酵, 在发酵过程的初、中、后期取样。初期从葡萄破碎进罐至发酵启动; 中期即发酵旺盛期; 后期为发酵消退期。稀释合适梯度, 在固体 YPD 培养基上涂板, 28°C 培养 2 d~5 d, 待菌落长出后, 每平板挑取 15~20 个单菌落置于 40% 灭菌甘油管中于 -20°C 冰箱保存。后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 d~7 d 后, 根据菌落的颜色和形态^[5], 获得 45 个酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的单菌落(表 1)。

1.2 酵母菌株基因组 DNA 提取

采用石英砂破壁法^[6]。

1.3 Interdelta 序列扩增

使用优化的 Interdelta 引物为: delta12 (5'-TCAA

CAATGGAATCCCAAC-3') 和 delta21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3')^[1]。PCR 反应体系为 25 μ L, 每管中加入 1 \times PCR buffer (10 mmol/L Tris pH 8.4, 50 mmol/L KCl); 2.5 mmol/L 的 $MgCl_2$; 0.5 μ mol/L delta 引物; 200 μ mol/L dNTPs; 模板 DNA 30 ng~100 ng, *Taq* 酶 2.0 U。PCR 循环为 95°C 4 min; 95°C 30 s, 46°C 30 s, 72°C 90 s, 循环 35 次; 72°C 10 min。扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳 2.5 h, 在紫外成像仪上观察, 照相。每个单菌落做 3 次重复, 得到稳定的指纹图谱用于以下分析。

2 结果与分析

2.1 Interdelta 指纹图谱分析

Interdelta 序列经 PCR 扩增、电泳、照相后, 得到电泳图 A、B(图 1), 扩增 DNA 片段的分子量在 100 bp~3100 bp 之间, 且扩增产生 5 种指纹图谱。可认为所有供试的 45 株酿酒酵母单菌落中, 共分为 5 种基因型并用罗马数字 I 到 V 来表示。

本研究中, 赤霞珠自然发酵获得 45 个酿酒酵母单菌落, Interdelta 分析共得到 5 种指纹图谱(表 2), 代表 5 种基因型 I-V, 分别占所分离菌落数的 71%、13%、9%、5.0%、2.0%。在发酵前期分离的单菌落中未检出酿酒酵母菌株。在未添加 SO_2 的发酵中, 发酵中期和后期取样, 分离鉴定得到 19 个酿酒酵母单菌落, 得到 4 种图谱, 代表 4 种基因型(I-IV), 分别占此发酵所分离酿酒酵母单菌落的 68%、16%、11%、5%; 在添加 SO_2 的发酵中, 分离鉴定得到 26 个酿酒酵母单菌落, 得到 5 种图谱, 代表 5 种基因型(I-V), 分别占此发酵所分离酿酒酵母单菌落的 68%、12%、12%、4%、4%。

2.2 发酵过程中酿酒酵母菌株的变化

用两种方式处理的自然发酵中, 不同发酵时期所分布的酿酒酵母基因型及所占同时期所得到的酿酒酵母单菌落总数的比例见表 2。在赤霞珠葡萄未用 SO_2 处理的发酵中, 所分离的酿酒酵母单菌落属于 4 个不同的基因型, 其中基因型 I 明显主导着发酵

表 1 赤霞珠葡萄自然发酵中分离的酿酒酵母单菌落
Table 1 *Saccharomyces* isolates from grape of Cabernet Sauvignon during spontaneous fermentation

发酵情况 The condition of fermentation	发酵中期 Middle stage of fermentation		发酵后期 End stage of fermentation	
	未添加 SO_2 No SO_2 added	添加 SO_2 SO_2 added	未添加 SO_2 No SO_2 added	添加 SO_2 SO_2 added
酿酒酵母单落 <i>Saccharomyces</i> isolates	J2-3, J2-5, J2-6, J2-8, J2-9, J2-11, J2-12	JS2-1~JS2-10, JS2-12~JS2-15	J3-1~J3-12	JS3-1~JS3-12

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

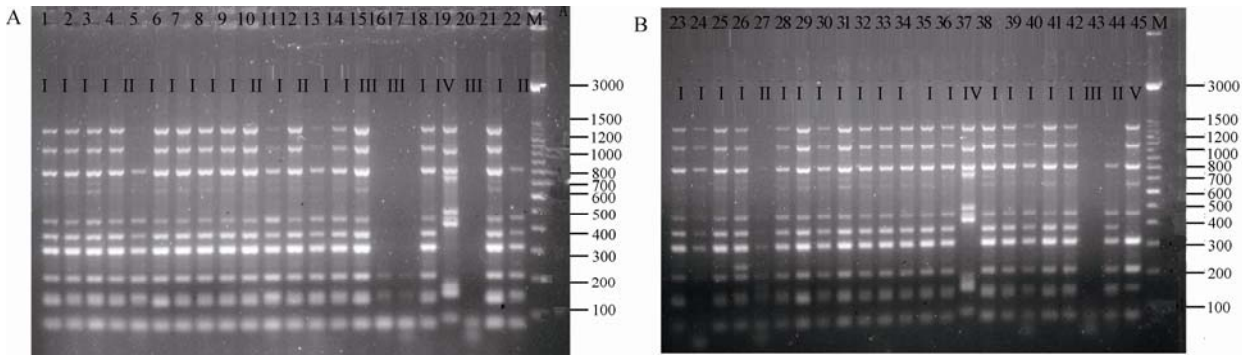


图 1 45 个酿酒酵母单菌落的 Interdelta 指纹图谱

Fig. 1 Interdelta fingerprinting patterns of 45 *Saccharomyces* isolates

注: 罗马数字代表不同的基因型。
Note: Roman numerals represent the different genotype. M: 100 bp plus marker; 1: J2-3; 2: J2-5; 3: J2-6; 4: J2-8; 5: J2-9; 6: J2-11; 7: J2-12; 8: J3-1; 9: J3-2; 10: J3-3; 11: J3-4; 12: J3-5; 13: J3-6; 14: J3-7; 15: J3-8; 16: J3-9; 17: J3-10; 18: J3-11; 19: J3-12; 20: JS2-1; 21: JS2-2; 22: JS2-3; 23: JS2-4; 24: JS2-5; 25: JS2-6; 26: JS2-7; 27: JS2-8; 28: JS2-9; 29: JS2-10; 30: JS2-12; 31: JS2-13; 32: JS2-14; 33: JS2-15; 34: JS3-1; 35: JS3-2; 36: JS3-3; 37: JS3-4; 38: JS3-5; 39: JS3-6; 40: JS3-7; 41: JS3-8; 42: JS3-9; 43: JS3-10; 44: JS3-11; 45: JS3-12.

表 2 赤霞珠葡萄自然发酵过程中酿酒酵母基因型的分布与比例				
Table 2 Distribution of <i>Saccharomyces</i> genotype isolated during the spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon from Ningxia, and the percentage of each genotype is indicated between brackets (%)				
基因型 Genotype	未添加 SO ₂ No SO ₂ added		添加 SO ₂ SO ₂ added	
	发酵中期 Middle of fermentation 单菌落数(%) Isolate number (%)	发酵后期 End of fermentation 单菌落数(%) Isolate number (%)	发酵中期 Middle of fermentation 单菌落数(%) Isolate number (%)	发酵后期 End of fermentation 单菌落数(%) Isolate number (%)
I	6(86)	7(58)	11(79)	7(58)
II	1(14)	2(17)	2(14)	1(8)
III		2(17)	1(7)	2(17)
IV		1(8)		1(8)
V				1(8)
Total	7	12	14	12

的进行, 分别占中期和后期酿酒酵母单菌落总数的 86%和 58%。基因型 II、III 在后期发酵中, 也占有一定的比例, 在发酵中也有一定的作用。基因型 IV 也参与了发酵的进行, 但所占比例小于 10%。而在用 SO₂ 处理的自然发酵中, 所得酿酒酵母单菌落属于 5 个不同的基因型(表 2), 基因型 I 也为发酵的优势菌株, 占中期的 79%, 后期的 58%。此外, 基因型 I 在用 SO₂ 处理的发酵中, 所含单菌落数目多于未用 SO₂ 处理的数目, 说明基因型 I 可能具有较强的 SO₂ 抗性, 需进一步的验证。

综合以上分析, 葡萄自然发酵时, 是用二氧化硫处理, 影响酿酒酵母的基因型及数目的变化。此外, 在发酵不同时期, 酿酒酵母的基因型及数目也有所变化, 可能与发酵过程中物质成分的变化等因素有关。

3 讨论

利用 PCR 对 Interdelta 序列进行扩增, 最早是由 Ness 等^[7]在 1993 年提出。在酵母基因组中, Interdelta 序列一般位于 Ty1/Ty2 反转座子两端, 但在酵母中也存在约 100 个独立的 δ 元件, 称为单独 δ s。Goodwin 等^[8]在研究中发现 Interdelta 序列在酿酒酵母基因组中数量最多, 分布最广, 在基因标记中具有潜在的应用前景。Schuller 等^[9] (2004)对 23 株商业酿酒酵母进行了微卫星分析、优化的 interdelta 指纹图谱分析以及 mtDNA-RFLP 分析, 研究表明, 进行酿酒酵母菌株的 Interdelta 指纹图谱分析具有与 mtDNA-RFLP、脉冲电泳核型分析相当的菌株区分能力。Interdelta 指纹图谱分析方法简单、操作容易、

多态性丰富且条带稳定, 目前国外已将 Interdelta 指纹图谱分析方法用作基因标记进行酿酒酵母菌株区分和菌株遗传多样性研究。

本研究采用 Interdelta 指纹图谱分析, 对宁夏产区赤霞珠葡萄自然发酵过程中酿酒酵母菌株进行区分, 研究表明, 在自然发酵过程中分离获得 45 个酿酒酵母单菌落, Interdelta 指纹图谱分析得到 5 种基因型, 可将 45 个酿酒酵母单菌落区分为 5 株酿酒酵母菌株。同时, 少数菌株在发酵不同时期所占该时期酿酒酵母单菌落总数的比例高, 认为是该时期该品种葡萄自然发酵过程中的优势菌株, 可能引导着发酵的进行。而其余一些菌株, 所占同时期的比例很少, 可认为是发酵的次要菌株或稀少菌株。Nadal 等^[10](1996), Gutierrez 等^[11](1997), Epifanio 等^[12](1999), Lopes 等^[13](2005)曾研究西班牙 Rioja 和 EL Penede's 地区葡萄园中的野生酿酒酵母菌株时, 发现野生酿酒酵母菌株间存在异质性。近年来, Combina 等^[14](2005)在研究葡萄自然发酵中野生酵母种群动态变化时发现, 不同发酵时间所分离得到的酿酒酵母菌株不同。Blanco 等^[15](2006)在研究西班牙加利西亚酒厂的酿酒酵母菌株遗传多样性时, 从 446 个酿酒单菌落中鉴定到 19 株酿酒酵母基因型。并发现其分布随着发酵时期和葡萄品种的不同而变化, 且不同葡萄品种间存在不同的优势菌株。此结果与本文所得结果相符合。此外, 是否用二氧化硫处理, 影响着其自然发酵过程中酿酒酵母基因型的类型、数目及比例的变化。但是从本质上讲, 本研究中二氧化硫处理对参与发酵的酿酒酵母菌株的类型、优势菌群及发酵进程影响不大。深入研究这一结果的影响因素, 对减少或降低二氧化硫的使用及有机葡萄酒的生产具有重要借鉴意义。对自然发酵过程中酿酒酵母菌株进行区分, 有利于监控发酵过程中菌株的变化, 并可观察到发酵中的优势菌株, 为选育优良菌株提供依据。

参 考 文 献

- [1] Legras JL, Karst F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **221**: 249–255.
- [2] Querol A, Belloch C, Fernández-Espinar MT, *et al.* Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *International Microbiology*, 2003, **6**: 201–205.
- [3] Van der Westhuizen TJ, Augustyn OHP, Pretorius IS. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the western Cape in South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2000, **21**: 3–9.
- [4] Fernandez-Espinar MT, Lopez V, Ramon D, *et al.* Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, **70**: 1–10.
- [5] 薛军侠, 徐艳文, 刘延琳, 等. WL 培养基在酿酒酵母筛选中的应用. *中国酿造*, 2007, **147**(9): 36–39.
- [6] 周小玲, 沈 微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法. *微生物学通报*, 2004, **31**(4): 89–92.
- [7] Ness F, Lavallée F, Dubourdieu D, *et al.* Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1993, **62**: 89–94.
- [8] Goodwin TJD, Poulter RTM. Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*. *Genome Research*, 2000, **10**: 174–191.
- [9] Schuller D, Valero E, Dequin S, *et al.* Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, **231**: 19–26.
- [10] Nadal D, Colomer B, Piña B. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(6): 1944–1950.
- [11] Gutierrez AR, López R, Santamaría P, *et al.* Ecology of inoculated and spontaneous fermentations in Rioja (Spain) musts: examined by mitochondrial DNA restriction analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, **36**: 241–245.
- [12] Epifanio SI, Gutierrez AR, Santamaría MP, *et al.* The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1999, **50**(2): 219–224.
- [13] Lopes C, Lavalle T, Querol A, *et al.* Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, **3**: 1–10.
- [14] Combina M, Elíaa A, Mercado L, *et al.* Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza. *Argentina International Journal of Food Microbiology*, 2005, **99**: 237–243.
- [15] Blanco P, Ramilo A, Cerdeira M, *et al.* Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, **89**: 3.