



研究报告

田间施药对自然发酵葡萄酒酵母菌群落结构的影响

许维娜^{*1} 刘希萌¹ 孔祥君² 陈熙³ 李梅¹ 耿常乐¹

1 滨州医学院药学院(葡萄酒学院) 山东 烟台 264003

2 烟台迈百瑞国际生物医药有限公司 山东 烟台 264006

3 亳州学院生物与食品工程系 安徽 亳州 236800

摘要:【背景】酵母菌是葡萄酒发酵过程中一类非常重要的微生物,其多样性及群体组成对葡萄酒的质量有重要贡献。影响葡萄酒中酵母菌组成的因素有很多,但目前尚未见葡萄园田管理对葡萄酒酵母菌群落结构影响方面的报道。【目的】探索田间施药对自然发酵葡萄酒酵母菌群落结构的影响。

【方法】采用分离培养、常规分子生物学鉴定和 Illumina MiSeq 宏基因组测序结合的方法分析不同样品中的酵母菌群落结构情况。【结果】从不使用内吸收型化学农药的葡萄样品自然发酵液中分离鉴定出 *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Schizosaccharomyces*、*Candida*、*Saccharomyces*、*Zygoascus*、*Issatchenkia* 等 7 个属 8 个种的酵母菌,宏基因组测序结果表明有 *Pichia* (29.42%)、*Saccharomyces* (21.91%)、*Issatchenkia* (17.99%)、*Hanseniaspora* (12.10%)、*Candida* (7.47%)、*Zygosaccharomyces* (5.32%)、*Schizosaccharomyces* (3.07%)、*Aureobasidium* (0.29%) 等属的酵母菌参与发酵;使用常规化学农药的葡萄样品自然发酵液中分离鉴定出 *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Schizosaccharomyces*、*Candida*、*Cryptococcus* 等 5 个属 6 个种的酵母菌,宏基因组测序结果表明有 *Pichia* (41.66%)、*Hanseniaspora* (21.54%)、*Candida* (19.11%)、*Zygosaccharomyces* (7.78%)、*Schizosaccharomyces* (4.04%)、*Cryptococcus* (3.21%)、*Saccharomyces* (1.12%)、*Aureobasidium* (0.49%) 等属的酵母菌参与发酵。【结论】两样品中酵母菌比例有显著差异,表明在酿酒葡萄的园田管理中化学农药的使用对自然发酵葡萄酒的酵母菌群落结构有较大影响。

关键词: 田间施药, 酵母菌群落结构, 葡萄酒, 自然发酵, MiSeq 宏基因组测序

Effect of pesticide application on the community structure of wine yeasts during spontaneous fermentation

XU Wei-Na^{*1} LIU Xi-Meng¹ KONG Xiang-Jun² CHEN Xi³ LI Mei¹
GENG Chang-Le¹

1 School of Pharmacy (School of Enology), Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China

2 MabPlex International Limited Company, Yantai, Shandong 264006, China

3 Department of Biological and Food Engineering, Bozhou University, Bozhou, Anhui 236800, China

Abstract: [Background] Yeast is a very important microorganism in wine fermentation. Its diversity and

Foundation items: Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2017LC020); Research Start Fund of Binzhou Medical University (BY2015KYQD05)

***Corresponding author:** Tel: 86-535-6901712; E-mail: xuwn1987@163.com

Received: 26-04-2018; **Accepted:** 06-06-2018; **Published online:** 31-07-2018

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2017LC020); 滨州医学院科研启动基金(BY2015KYQD05)

***通信作者:** Tel: 0535-6901712; E-mail: xuwn1987@163.com

收稿日期: 2018-04-26; **接受日期:** 2018-06-06; **网络首发日期:** 2018-07-31

population composition play an important role in wine quality. There are many factors that affect the distribution and presence of yeast flora in wine. However, the influence of grape field management, for example the use of pesticides, on wine yeast community structure has not been reported yet. **[Objective]** We studied the effect of pesticide application on the community structure of wine yeasts during spontaneous fermentation. **[Methods]** Methods of pure culture, molecular biology identification and Illumina MiSeq metagenomic sequencing were used. **[Results]** In the spontaneous fermentation broth of grape samples without internal absorption chemical pesticides, 7 genera (8 species) of yeast strains including *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Zygoascus*, and *Issatchenkia* were isolated and identified, while the result of metagenomic sequencing confirmed the dominance of *Pichia* (29.42%), *Saccharomyces* (21.91%), *Issatchenkia* (17.99%), *Hanseniaspora* (12.10%), *Candida* (7.47%), *Zygosaccharomyces* (5.32%), *Schizosaccharomyces* (3.07%), and *Aureobasidium* (0.29%). In the spontaneous fermentation broth of grape samples with conventional chemical pesticides, 5 genera (6 species) of yeast strains including *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, and *Cryptococcus* were isolated and identified, while the result of Illumina MiSeq sequencing showed that *Pichia* (41.66%), *Hanseniaspora* (21.54%), *Candida* (19.11%), *Zygosaccharomyces* (7.78%), *Schizosaccharomyces* (4.04%), *Cryptococcus* (3.21%), *Saccharomyces* (1.12%), and *Aureobasidium* (0.49%) were involved in the fermentation. **[Conclusion]** Yeast community compositions in the two samples were significantly different, indicating that pesticide application on grapes had great influence on the community structure of wine yeasts during spontaneous fermentation.

Keywords: Pesticide application, Yeast community structure, Wine, Spontaneous fermentation, MiSeq sequencing

葡萄酒是多个酵母菌株互作生长和发展变化形成的复杂体系, 酵母菌的多样性、群体组成及发酵特性, 对葡萄酒的质量有重要贡献^[1-2]。葡萄酒的自然发酵是指依靠附着在葡萄表面和生产环境中的土著微生物完成发酵而不添加外源商业菌株的过程。优良的自然发酵会有很多种类的酵母菌参与, 无疑会增加葡萄酒香气和风味的复杂度, 使其酒体更加饱满, 口感更加精致。研究自然发酵过程中酵母菌的群落组成, 有利于葡萄酒自然发酵过程的微生物学控制, 更好地利用自然发酵提高国产葡萄酒的品质和竞争力^[3-6]。

自然发酵的葡萄酒存在较多优势, 将逐渐成为新的消费热点。同时, 自然发酵中的野生酵母菌也引起了很多研究者的关注。国内研究者对新疆、甘肃、昌黎、宁夏、东北等不同产区、不同树龄、不同品种酿酒葡萄的酵母菌多样性和菌群结构进行了研究, 发现了数十种野生葡萄酒酵母菌^[1,3,7-10]; 国外葡萄酒自然发酵普及程度相对较高, 法国、意大利、德国、美国、西班牙、澳大利亚等地的学者对自然发酵过程的酵母菌群落结构和动力学进行

了较多研究^[11-14]。迄今为止发现的葡萄酒相关酵母菌有 20 多个属 100 多个种, 并且酵母菌的种类、数量、比例会随地区、气候、年份、葡萄品种等有较大差异, 一般不会在同一样品中出现所有种属的酵母菌。目前尚未见葡萄园田管理对酵母菌群落结构影响方面的报道。

葡萄酒酵母菌分类鉴定中常用的方法有 WL 鉴别培养基培养法^[15]和分子生物学方法 (5.8S rDNA-ITS 区的测序、酶切分析及 26S rDNA D1/D2 区序列分析等)^[1,16], 通常先根据酵母菌在 WL 培养基上的菌落颜色及形态进行初步聚类, 再利用分子生物学方法进行精确鉴定。近年来, 454 高通量焦磷酸测序、Illumina 高通量测序等宏基因组学方法因工作量小、重现性高等优点逐渐被用于微生物种群多样性分析^[17-20]。

本研究的葡萄样品取自烟台蓬莱两种不同管理模式, 即常规化学农药治理和不使用内吸收型化学农药治理的葡萄园。自然发酵结束后获得的酵母菌样品采用 WL 鉴别培养基培养、26S rDNA D1/D2 区序列分析、Illumina MiSeq 宏基因组测序结合的方法

法进行酵母菌多样性、群落组成分析, 通过对比解析田间施药对自然发酵葡萄酒酵母菌群落结构的影响, 以期对葡萄园田管理、本土优良酵母菌资源开发利用和败坏性酵母菌的控制防范提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

葡萄样品取自烟台蓬莱某蛇龙珠葡萄园。其中一地块近三年不使用内吸收型化学农药(地块 1), 另一地块采用常规化学农药治理(地块 2)。分别从两地块中央选取葡萄植株进行葡萄采收(样品 1、2), 采收的果穗置于无菌袋于 12 h 内运回实验室。

1.2 主要试剂和仪器

果胶酶, 烟台帝伯仕自酿机有限公司; WL 营养琼脂培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 酵母基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

发酵罐, 烟台帝伯仕自酿机有限公司; 冷冻离心机, Eppendorf 公司; 生化培养箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 琼脂糖水平电泳仪, Bio-Rad 公司; 蛋白核酸测定分光光度计、PCR 仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 葡萄酒自然发酵与酵母菌样品的获得

葡萄样品 1、2 在无菌条件下进行手动除梗破碎, 葡萄汁带皮装入 3 L 罐, 加入 30 mg/L 的果胶酶后开始自然发酵, 控制发酵温度在 24–26 °C。残糖 < 4 g/L 时结束发酵, 皮渣分离后获得葡萄原酒。取 50 mL 原酒样品, 6 000 r/min 离心 10 min 收集酵母菌体, 无菌生理盐水洗涤 2 次后制得酵母菌悬液。

1.3.2 酵母菌分离、聚类分析与分子生物学鉴定

(1) 酵母菌分离与聚类分析

两个样品的酵母菌悬液各取 1 mL, 无菌生理盐水梯度稀释后涂布 WL 平板培养基^[21], 28 °C 培养 7 d。根据各酵母菌在 WL 平板的菌落特征(菌落颜色、形态、表面特征、边缘特征等), 对各菌落进行聚类分析和初步鉴定。每个聚类的典型酵母菌纯化后保藏于 YEPD 斜面培养基^[10]。

(2) 酵母菌的分子生物学鉴定

选取不同菌落形态的酵母菌(不同样品中形态相同的酵母菌各取 1 株)进行分子生物学鉴定。

采用酵母基因组提取试剂盒进行各菌株基因组 DNA 的提取, 并以此为模板, 使用通用引物 NL1 (5'-GCATATCAATAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 进行 26S rDNA D1/D2 区序列的 PCR 扩增^[22]。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果利用 NCBI BLAST 从核酸序列数据库中进行同源搜索, 比较测定序列与已知酵母菌相应序列的相似度, 对酵母菌进行鉴定。

1.3.3 混菌样品的 MiSeq 宏基因组测序

(1) 样品总 DNA 的提取与纯化

2 个样品总 DNA 的提取采用天根酵母基因组提取试剂盒。抽提的基因组 DNA 经 1% 琼脂糖电泳检测浓度合格、无降解、无杂质后备用。

(2) 总 DNA 样品的宏基因组测序与分析

对提取的总 DNA 进行 18S rDNA 的 PCR 扩增与测序。PCR 扩增引物为 SSU0817F (5'-TTAGCATGG AATAATRRRAATAGGA-3') 和 1196R (5'-TCTGGACC TGGTGAGTTTCC-3')^[23]。PCR 反应体系: 5×FastPfu buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 上、下游引物 (5 μmol/L) 各 0.8 μL, TransStart FastPfu DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.4 μL, 基因组 DNA 模板 10 ng, ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后送上海美吉生物医药科技有限公司, 利用 MiSeq PE250 平台进行高通量测序分析。

采用 RDP classifier 贝叶斯算法以 97% 为划定阈值对序列划分操作分类单元 (Operational taxonomic unit, OTU), 并在各个分类水平(门、纲、目、科、属、种)统计样品的群落组成。比对采用 SILVA 数据库, 置信度阈值为 0.7。所有原始序列提交 GenBank 数据库, 登录号为 SRP141300。

2 结果与分析

2.1 可培养酵母菌株的分离鉴定结果

样品 1 和样品 2 在 WL 平板上分别得到了 8 类和 6 类菌落特征不同的酵母菌群, 菌落形态描述见表 1。每个菌群选取典型菌落分离纯化, 提取基因组 DNA 进行 26S rDNA D1/D2 区序列扩增与测序, 各序列经过 BLAST 比对后, 鉴定结果如表 1 所示。各菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列与核酸序列数据库中的已知序列相似性均为 99% 或 100%, 可鉴定到种水平。样品 1 中鉴定出 *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Schizosaccharomyces*、*Candida*、*Saccharomyces*、*Zygoascus*、*Issatchenkia* 等 7 个属 8 个种的酵母菌(分别命名为 1-1-1-8), 样品 2 中鉴定出 *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Schizosaccharomyces*、*Candida*、*Cryptococcus* 等 5 个属 6 个种的酵母菌(分别命名为 2-1-2-6), 其中 *P. occidentalis*、*P. fermentans*、*H. uvarum*、*S. pombe*、*C. oleophila* 在 2 个样品中均有出现, 而 *S. cerevisiae*、*Z. meyeriae* 和 *I. occidentalis* 只在样品 1 中出现, *C. flaveszens* 只在样品 2 中出现。

酵母菌株分离和鉴定结果显示, 酿酒葡萄的园田管理中是否使用化学农药对自然发酵葡萄酒的

酵母菌群落结构有一定影响。不使用内吸收型化学农药的葡萄样品酵母菌多样性相对丰富一些, 并有酿酒酵母(*S. cerevisiae*)参与发酵; 使用常规化学农药的葡萄样品中酵母菌种类相对简单, 有浅黄隐球酵母(*C. flaveszens*)出现。

2.2 混菌样品的微生物群落结构分析结果

利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对自然发酵葡萄酒酵母菌群落结构进行分析, 样品 1 获得 35 339 条有效序列, 序列平均长度为 401.7 bp; 样品 2 获得 34 028 条有效序列, 序列平均长度为 401.0 bp; 每个样本优质序列覆盖率均高于 99%。

利用 RDP classifier 分类器从门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)、种(Species) 6 个分类水平统计酵母菌样品的群落组成。门、纲、目、科 4 个水平的酵母菌群落组成如表 2 所示。2 个样品中共检测到 2 个真菌门, 分别为子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*), 其中以子囊菌门(99.69%、96.47%)为优势类群; 检测到 6 个纲, 包括酵母纲(*Saccharomycetes*)、裂殖酵母纲(*Schizosaccharomycetes*)、粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)、座囊菌纲(*Dothideomycetes*)、散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)、

表 1 两个样品中葡萄酒酵母菌的分离鉴定结果

Table 1 Separation and identification results of wine yeasts in the two samples

Cluster	Strains	Colony morphology on WL plate	GenBank accession No.	Homology (%)	Identification results
Cluster 1	1-1, 2-1	Green center and white rim; Convex colony with radial edge; Surface: wrinkled, consistency of flour	KY849376.1	100	<i>Pichia occidentalis</i>
Cluster 2	1-2, 2-2	Green center and cream rim; Convex colony with volcanic center; Surface: wrinkled and rough	FJ468445.1	100	<i>Pichia fermentans</i>
Cluster 3	1-3, 2-3	Intense green; Flat; Surface: smooth, opaque	KY992079.1	99	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Cluster 4	1-4, 2-4	Intense green; Small size; Convex; Surface: smooth, opaque, consistency of butter	AJ550639.1	100	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Cluster 5	1-5, 2-5	Gray-green with white ring; Flat; Surface: smooth, opaque	KY106621.1	100	<i>Candida oleophila</i>
Cluster 6	1-6	Bluish grey; Cone-shaped colony with transparent ring at the bottom; Surface: smooth, opaque	MH142729.1	99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cluster 7	1-7	Cream; Flat; Surface: smooth, opaque	KY110228.1	99	<i>Zygoascus meyeriae</i>
Cluster 8	1-8	Green center and cream rim; Convex colony with volcanic center and plush edge; Surface: wrinkled and rough	FJ432598.1	99	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
Cluster 9	2-6	Light yellow; Elevated to a dome; Regular edge; Surface: smooth, mucoid	KC442270.1	100	<i>Cryptococcus flaveszens</i>

表 2 2 个样品在不同分类水平的酵母菌群落组成
Table 2 Yeast community composition in different classification levels of the two samples

Sample	Phylum	Class	Order	Family
Sample 1	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i> 95.49%;	<i>Saccharomycetales</i> 95.49%;	<i>Saccharomycetaceae</i> 94.21%;
		<i>Schizosaccharomycetes</i> 3.07%;	<i>Schizosaccharomycetales</i> 3.07%;	<i>Schizosaccharomycetaceae</i> 3.07%;
	Unclassified	<i>Sordariomycetes</i> 0.04%;	<i>Hypocreales</i> 0.04%;	<i>Incertae sedis</i> 0.04%;
	0.31%	<i>Dothideomycetes</i> 0.29%;	<i>Dothideales</i> 0.29%;	<i>Dothioraceae</i> 0.29%;
		<i>Eurotiomycetes</i> 0.67%;	<i>Eurotiales</i> 0.67%;	<i>Trichomonascaceae</i> 0.67%;
		Unclassified 0.31%;	Unclassified 0.31%;	Unclassified 0.31%;
		Others 0.13%	Others 0.13%	Others 1.41%
Sample 2	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i> 91.46%;	<i>Saccharomycetales</i> 91.46%;	<i>Saccharomycetaceae</i> 91.21%;
		<i>Schizosaccharomycetes</i> 4.04%;	<i>Schizosaccharomycetales</i> 4.04%;	<i>Schizosaccharomycetaceae</i> 4.04%;
	<i>Basidiomycota</i>	<i>Tremellomycetes</i> 3.21%;	<i>Tremellales</i> 3.21%;	<i>Tremellaceae</i> 3.21%;
	3.21%;	<i>Dothideomycetes</i> 0.49%;	<i>Dothideales</i> 0.49%;	<i>Dothioraceae</i> 0.49%;
	Unclassified	<i>Eurotiomycetes</i> 0.30%;	<i>Eurotiales</i> 0.30%;	<i>Trichomonascaceae</i> 0.30%;
	0.32%	Unclassified 0.32%;	Unclassified 0.32%;	Unclassified 0.32%;
		Others 0.18%	Others 0.18%	Others 0.43%

银耳纲 (*Tremellomycetes*)，其中以酵母纲 (95.49%、91.46%)为优势类群；共检测到 6 个目，包括酵母目 (*Saccharomycetales*)、裂殖酵母目 (*Schizosaccharomycetales*)、肉座菌目(*Hypocreales*)、座囊菌目(*Dothideales*)、散囊菌目(*Eurotiales*)、银耳目(*Tremellales*)，以酵母目(95.49%、91.46%)为优势类群；检测到 6 个科，包括酵母科(*Saccharomycetaceae*)、裂殖酵母科(*Schizosaccharomycetaceae*)、分类位置未定的科(*Incertae sedis*)、小穴壳科(*Dothioraceae*)、发菌科(*Trichomonascaceae*)、银耳科(*Tremellaceae*)，其中以酵母科(94.21%、91.21%)为优势类群。

从 2 个样品中共检测到 11 个属的微生物，包

括 9 个酵母菌属以及轮枝菌属(*Verticillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)，不同样品在酵母菌属水平上的分布如图 1A、B 所示。样品 1 中出现 *Pichia* (29.42%)、*Saccharomyces* (21.91%)、*Issatchenkia* (17.99%)、*Hanseniaspora* (12.10%)、*Candida* (7.47%)、*Zygosaccharomyces* (5.32%)、*Schizosaccharomyces* (3.07%)、*Aureobasidium* (0.29%)等 8 个属的酵母菌。样品 2 中出现 *Pichia* (41.66%)、*Hanseniaspora* (21.54%)、*Candida* (19.11%)、*Zygosaccharomyces* (7.78%)、*Schizosaccharomyces* (4.04%)、*Cryptococcus* (3.21%)、*Saccharomyces* (1.12%)、*Aureobasidium* (0.49%)等 8 个属的酵母菌。两样品在酵母菌种类上

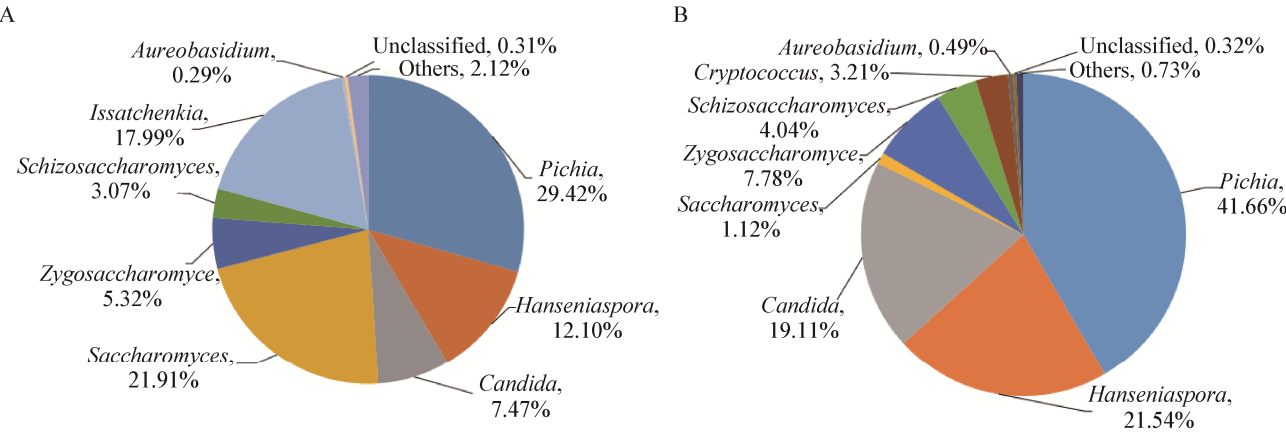


图 1 样品 1 (A)、2 (B)中酵母菌在属水平的分布饼图
Figure 1 The pie chart of yeast abundance in Sample 1 (A) and Sample 2 (B) on genus level

有很高的相似性,主要区别在于样品 1 中有伊萨酵母(*Issatchenkia*)参与发酵,而样品 2 中有隐球酵母(*Cryptococcus*)出现。另外,各属酵母的比例有较大差异,如毕赤酵母属(*Pichia*)、酿酒酵母属(*Saccharomyces*)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)、假丝酵母属(*Candida*)等。

种水平的酵母菌群落组成见图 2A、B,各酵母菌的比例也有较大区别。例如,酿酒酵母(*S. cerevisiae*)在样品 1 中约占 22%,在样品 2 中只占 1%左右。样品 1 的优势菌群(占比 10%以上)依次为 *S. cerevisiae* (21.91%)、*I. occidentalis* (17.99%)、*P. occidentalis* (17.39%)、*H. uvarum* (12.10%)和 *P. fermentans* (11.40%),样品 2 的优势菌群依次为 *P. fermentans* (22.12%)、*H. uvarum* (21.54%)、*P. occidentalis* (19.31%)和 Unclassified *Candida* (19.11%)。

3 讨论与结论

本研究采用分离培养、常规分子生物学鉴定和 Illumina MiSeq 宏基因组测序的方法探索田间施药对自然发酵葡萄酒酵母菌群落结构的影响。可培养菌株的分子生物学鉴定采用 26S rDNA D1/D2 区序列分析法。Kurtzman 等^[16]的研究发现 26S rDNA D1/D2 区序列(500–600 bp)具有较高的变异率,能将绝大部分的种区分开,可用于亲缘关系较近的酵母菌的分类研究。同种(Species)不同菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列差异一般在 0–1%,超过 1%基

本为不同种的菌株。本研究中分离到的酵母菌的 26S rDNA D1/D2 区序列与数据库中已知序列的相似性均为 99%或 100%,可鉴定到种水平。纯培养得到的酵母菌株可进行深入的发酵特性研究,优良菌株可应用于自然发酵过程的加强与优化,有助于加快本土优良酵母菌资源的开发利用,促进自然发酵的普及和推广。

宏基因组学分析结果与可培养菌株的分子生物学鉴定结果具有较高的相似度,均鉴定出 *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Schizosaccharomyces*、*Candida*、*Saccharomyces*、*Issatchenkia*、*Cryptococcus* 等属的酵母菌。另外,宏基因组学分析表明两样品中还存在接合酵母(*Zygosaccharomyces*)和黑酵母(*Aureobasidium*),而这 2 个属的酵母菌因菌群数量少、营养苛求等原因未在分离培养中获得。本研究中鉴定出的酵母菌与其他学者对烟台产区葡萄酒相关酵母菌的研究结果有相似之处,如王会会等^[15]从烟台产区赤霞珠、蛇龙珠的不同发酵时段发酵液中分离到 *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Issatchenkia*、*Saccharomyces*、*Rhodotorula*、*Lodderomyces* 等属的酵母菌;王慧^[24]从同种类酿酒葡萄的果粒和压榨汁中分离到了 *Hanseniaspora*、*Issatchenkia*、*Saccharomyces*、*Pichia*、*Candida*、*Torulaspora*、*Metschnikowia*、*Cryptococcus* 等属的酵母菌。其中 *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Saccharomyces*、*Issatchenkia* 等属的酵母菌在烟台产区较为常见。

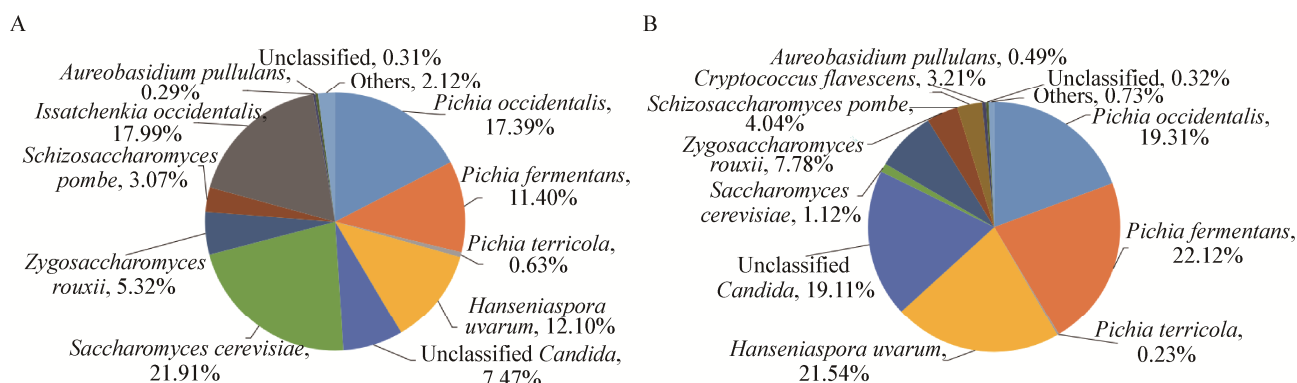


图 2 样品 1 (A)、2 (B)中酵母菌在种水平的分布饼图

Figure 2 The pie chart of yeast abundance in Sample 1 (A) and Sample 2 (B) on species level

不使用内吸收型化学农药和使用常规化学农药的葡萄样品自然发酵液中酵母菌种类较为相似, 但各酵母菌比例有较大差异。不使用化学农药样品的菌群结构更合理, 酒精发酵的主力酿酒酵母(*S. cerevisiae*)占优势地位, 同时有多种其他种类的酵母菌参与发酵, 发酵速度比较快(8 d 完成发酵), 预期香气会更加复杂和精致。使用常规化学农药的样品中 *S. cerevisiae* 只占很小比例(1%左右), *Pichia*、*Hanseniaspora*、*Candida* 等酵母菌主导发酵, 并有葡萄酒有害菌浅黄隐球酵母(*C. flavescentis*)参与发酵, 这与文献已报道的自然发酵过程的酵母菌群落组成有差异^[4,7,25-26], 同时该发酵过程比较缓慢(10 d 完成发酵), 可能与 *S. cerevisiae* 的菌量少有关系, 预期该发酵产品杂异味会比较明显。综合分析, 酿酒葡萄化学农药的使用会影响自然发酵过程酵母菌的种类和比例, 导致酿酒酵母(*Saccharomyces*)等发酵有益菌的数量和比例降低, 隐球酵母(*Cryptococcus*)等发酵有害菌的种类和数量得以提高。类似研究中, Comitini 等^[27]考察了无机杀菌剂(非内吸收型)、无机有机杀菌剂(内吸收型)共用对葡萄表面酵母菌菌落分布的影响, 发现有机杀菌剂的直接使用会导致酵母菌种类的变化和种群数量的急剧减少。使用无机杀菌剂的样品中, 优势菌群为 *H. uvarum*、*M. pulcherrima*、*Cryptococcus* spp.、*A. pullulans*, 无机有机杀菌剂共用的样品中, *Cryptococcus* spp.和 *A. pullulans* 为优势菌群, 而发酵型菌株几乎不存在。该结果也证实了内吸收型药物对葡萄酒微生物的不良影响。因此酿酒葡萄的园田管理中, 可在保证葡萄品质的前提下, 尽量减少化学农药的使用。

本文解析了化学农药的使用对自然发酵葡萄酒酵母菌群落结构的影响, 研究结果为葡萄园田管理、优良酵母菌资源开发利用和葡萄酒有害菌的防范控制提供了参考和依据。

REFERENCES

- [1] Sun Y, Song YY, Liu YL. Diversity of wine yeasts during spontaneous fermentation of Merlot[J]. China Brewing, 2011, 30(9): 27-29 (in Chinese)
- [2] Soufleros EH, Bouloumpasi E, Tsarchopoulos C, et al. Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage[J]. Food Chemistry, 2003, 80(2): 261-273
- [3] Wang ZJ, Liu YL, Liu AG, et al. Survey on yeast population dynamics during wine spontaneous fermentation in Xinjiang[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(5): 664-667 (in Chinese)
- [4] Cheng L, Li Z, Wang J. Study on yeasts during the spontaneous fermentation of grapevine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10(2): 131-137 (in Chinese)
- [5] Cheng SW, Qu HG, Luan LY, et al. Screening and fermentation characteristics of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from spontaneous fermentation of Chardonnay grapes[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(8): 119-125 (in Chinese)
- [6] Yan HJ, Shi Y, Liu C, et al. Screening, identification and potential use of indigenous yeasts from muscat wine spontaneous fermentation[J]. Food Science, 2017, 38(22): 117-124 (in Chinese)
- [7] Wang ZJ. Study on identification and diversity of wine-related yeast from Xinjiang and Gansu[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2008 (in Chinese)
- [8] Yang MJ, Chen XB, Zhao JJ, et al. Identification of yeasts isolated from spontaneous fermentation of *Cabernet sauvignon*[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(7): 22-27 (in Chinese)
- [9] Su L, Liu SW, He L, et al. Diversity of wine related yeasts during spontaneous fermentation of *Vitis. amurensis* rupestris wine terrior in northeastern regions of China[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(3): 110-115 (in Chinese)
- [10] Liu SW, Chang YW, Hu T, et al. Study on yeasts of different ages

- of grape in the course of spontaneous fermentation[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2008, 37(7): 51-56,63 (in Chinese)
- 刘树文, 常亚维, 胡廷, 等. 不同树龄葡萄自然发酵过程中酵母菌的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 37(7): 51-56,63
- [11] Marsit S, Dequin S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review[J]. FEMS Yeast Research, 2015, 15(7): fov067
- [12] Santiago-Urbina JA, Arias-García JA, Ruiz-Terán F. Yeast species associated with spontaneous fermentation of *taberna*, a traditional palm wine from the southeast of Mexico[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(1): 287-296
- [13] Schuller D, Cardoso F, Sousa S, et al. Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions[J]. PLoS One, 2012, 7: e32507
- [14] Csoma H, Zakany N, Capece A, et al. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 140(2/3): 239-248
- [15] Wang HH, Liu TM, Wang K, et al. Identification of yeasts species in the fermentation of dry red wine of Yantai[J]. China Brewing, 2011, 30(1): 33-36 (in Chinese)
- 王会会, 刘天明, 王可, 等. 烟台干红葡萄酒发酵过程中酵母种类鉴定[J]. 中国酿造, 2011, 30(1): 33-36
- [16] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1998, 73(4): 331-371
- [17] Zhao S, Zhou N, Zhao ZY, et al. Endophytic bacterial diversity and dynamics in root of *Salicornia europaea* estimated via high throughput sequencing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(6): 1000-1008 (in Chinese)
- 赵帅, 周娜, 赵振勇, 等. 基于高通量测序分析盐角草根内共生细菌多样性及动态规律[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1000-1008
- [18] Xing MY, Du H, Xu Y. Diversity and succession of lactic acid bacteria during sesame-flavor liquor fermentation[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 19-28 (in Chinese)
- 邢敏钰, 杜海, 徐岩. 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌多样性及其演替规律[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 19-28
- [19] Sternes PR, Lee D, Kutyna DR, et al. A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation[J]. GigaScience, 2017, 6(7): 1-10
- [20] Morgan HH, du Toit M, Setati ME. The grapevine and wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 820
- [21] Yang Y, Xu YW, Xue JX, et al. Validate the identification effect of WL nutrient agar on wine yeast[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 75-78 (in Chinese)
- 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
- [22] Xu YW, Yang Y, Xue JX, et al. 26S rDNA RFLP analysis as a tool to characterize non-*Saccharomyces* yeasts[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(4): 23-26 (in Chinese)
- 徐艳文, 杨莹, 薛军侠, 等. 26S rDNA-RFLP 分析在非酿酒酵母菌分类研究中的应用[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(4): 23-26
- [23] Li KM, Fu GM, Wu CF, et al. Dynamics of eukaryotic microbial community succession during the traditional fermentation of special-flavor liquor[J]. Food Science, 2017, 38(22): 131-136 (in Chinese)
- 李凯敏, 付桂明, 吴酬飞, 等. 特香型白酒酿造过程中真核微生物菌群演替[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 131-136
- [24] Wang H. Study on the composition of wine yeast strains from main producing areas in China[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Polytechnic University, 2008 (in Chinese)
- 王慧. 中国主要产地葡萄酒酵母菌种构成研究[D]. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 2008
- [25] Sturm J, Grossmann M, Schnell S. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(6): 1241-1248
- [26] Lopandic K, Tiefenbrunner W, Gangl H, et al. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 8(7): 1063-1075
- [27] Comitini F, Ciani M. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes[J]. Annals of Microbiology, 2008, 58(3): 489-493