

# 葡萄酒酿酒酵母嗜果糖特性的评价方法

赵文英\* 贾万利 高莉 王蕊欣

(中北大学 化工与环境学院 山西 太原 030051)

**摘要:** 【目的】酿酒酵母的嗜果糖性是葡萄酒酵母选育工作的一项重要内容。建立评价菌体发酵果糖能力的方法,是葡萄酒酿酒酵母嗜果糖性研究的基础。【方法】以3株不同果糖发酵能力的酵母菌为研究对象,考察菌体在模拟葡萄汁培养基条件下,发酵情况与单糖利用之间的关系;并通过数学方程拟合单糖动力发酵曲线,得到发酵持续时间、葡萄糖浓度拟为0时的果糖浓度、果糖与葡萄糖曲线面积的差值等参数。【结果】这些参数可以反应出菌体的发酵速率和嗜果糖性。其中后两个参数能显著将3个菌株的嗜果糖特性区分开。【结论】为高果糖利用优良葡萄酒酿酒酵母菌株的筛选和构建,提供了较为全面、客观和有效的评价方法。

**关键词:** 酿酒酵母, 葡萄酒, 模拟葡萄汁培养基, 嗜果糖性

## A method for assessment of the fructophilicity of wine yeast strains

ZHAO Wen-Ying\* JIA Wan-Li GAO Li WANG Rui-Xin

(College of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan, Shanxi 030051, China)

**Abstract:** [Objective] Fructophilicity of wine yeasts is critically important for the maintenance of a high fermentation rate at the end of alcoholic fermentation. [Methods] In this study three *Saccharomyces cerevisiae* strains with different fermentation traits were investigated in synthetic

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目

\*通讯作者: Tel: 86-351-3922116; ✉: zzrlzwy2@163.com

收稿日期: 2013-01-27; 接受日期: 2013-03-18

grape medium to determine the relationship between their relative abilities to utilise glucose and fructose and fermentation performances. **[Results]** Parameters obtained by calculating from kinetic glucose and fructose fermentation curve, include fermentation duration, fructose concentration if glucose concentration was 0, area difference under fructose and glucose curve. The latter two parameters can rank their fructophilicity significantly. **[Conclusion]** This study provides an effective and objective method for programs which seek to generate strains that have a high fructose utilization capacity in wine fermentation.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, Wine, Synthetic grape medium, Fructophilicity

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)常常被筛选作为葡萄酒酒精发酵菌种<sup>[1]</sup>。葡萄浆汁中葡萄糖和果糖含量基本相等,但在酒精发酵过程中,酿酒酵母通常利用葡萄糖的能力比利用果糖的能力强。其结果是果糖与葡萄糖比例随着发酵的进行不断升高,以致在发酵后期果糖成了主导糖<sup>[2]</sup>。有研究表明,酿酒酵母的低果糖利用能力与发酵停止、发酵后期发酵速率低和发酵不彻底密切相关<sup>[2-3]</sup>。另外,由于果糖不能被有效利用而残留在葡萄酒中,一方面果糖甜度高,会造成葡萄酒口感失衡;另一方面,酒中残糖的存在具有引发微生物污染的危险<sup>[4-5]</sup>。因此酿酒酵母的嗜果糖性是葡萄酒酵母选育工作的一项重要内容。国内尚未见葡萄酒酿酒酵母嗜果糖性的研究报道。

本研究以 3 株具有不同果糖发酵能力的酵母菌为研究对象,考察菌体在模拟葡萄汁培养基中,发酵情况与单糖利用之间的关系,试图通过数学拟合单糖动力发酵曲线,找到酿酒酵母菌合理有效的嗜果糖参数,为高果糖利用菌株的筛选、构建,提供客观的酿酒酵母嗜果糖特性的评价方法。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 本实验选用葡萄酒生产商业用酿酒酵母 EC1118,该菌通常能使葡萄酒发酵至干,也能成功进行二次发酵接种,拟设定为较高果糖利

用葡萄酒酿酒酵母。自行分离所得的优良野生葡萄酒酿酒酵母 SX-1,该菌分离自山西戎子酒庄 2011 年自然发酵的赤霞珠葡萄酒中,从该菌的发酵特性上拟设定为一般果糖利用葡萄酒酿酒酵母。实验室用单倍体酿酒酵母 S288c (购买于中国科学院微生物研究所),具有较差的葡萄酒发酵特性,拟设定为较差果糖利用酿酒酵母,以作对照。商业用活性干菌在无菌条件下复水 20 min,接入 YPD 培养基(20 g/L 葡萄糖,10 g/L 酵母浸提物,20 g/L 蛋白胨)中,于 28 °C 条件下摇床振荡培养过夜(180 r/min)。酿酒酵母培养物于 YPD 琼脂培养基上进行划线培养以检测纯度并获得单菌落,将多个单菌落菌体接入 25 mL YPD 培养液中培养过夜,进行发酵试验。另取 1 mL 配以 0.5 mL 灭菌后的 80% (V/V)甘油,在-80 °C 冰箱中长期保存。

**1.1.2 模拟葡萄汁培养液:** 每升含葡萄糖 110 g,果糖 110 g,DL-苹果酸 5 g,柠檬酸 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g, 酒石酸钾 0.25 g, 调整 pH 3.6 后,灭菌。冷却后,将通过 0.45 μm 过滤膜的 FeSO<sub>4</sub>、微量元素、维生素及 300 g/L 的可利用氮含量(包括铵盐氮 18.6% 和氨基酸 81.4%)添加入培养液中<sup>[6]</sup>。

### 1.2 发酵试验

将过夜培养的菌体接入 12 mL 酵母培养管中,其中装有 8 mL 模拟葡萄汁培养液。接种密度为 1×10<sup>6</sup> 个细胞/mL。将发酵管放置摇床培养箱

(18 °C, 130 r/min), 以提供充足的氧气。每日通过称量发酵管的重量, 以跟踪发酵情况。同时吸取 10  $\mu$ L 发酵液置于 PCR 管中, 并直接加入 90  $\mu$ L 蒸馏水, 稀释 10 倍后, 于 -20 °C 条件下冷冻保藏, 以备测定葡萄糖果糖浓度。

### 1.3 发酵曲线的绘制

每组发酵试验做 3 个重复, 重量损失取平均值。以培养时间为横坐标, 以重量损失为纵坐标, 绘制发酵曲线。发酵结束, 糖含量小于 2.5 g/L 可用 Clini-test<sup>®</sup> 片剂(Bayer)进行复查。

### 1.4 葡萄糖果糖的测定

利用 Megazyme 试剂盒进行葡萄糖果糖的测定。对样品进行适当稀释后, 利用 96 孔平板, 在 340 nm 光照下扫描读数。葡萄糖浓度的计算公式:  $c=0.692 \ 0 \times \Delta A_{D\text{-glucose}}$ 。果糖浓度的计算公式:  $c=0.697 \ 8 \times \Delta A_{D\text{-fructose}}$ 。每个样品重复测定 3 次, 取平均值。

### 1.5 嗜果糖系数的计算

以培养时间为横坐标, 以将葡萄糖果糖的测定值为纵坐标, 绘制葡萄糖果糖动力曲线。对单糖动力曲线进行方程模拟。设定葡萄糖浓度为 0 时, 发酵所需时间为理论发酵持续时间。设定葡萄糖浓度为 0 时, 果糖的浓度为菌体嗜果糖参数之一。以理论发酵持续时间为终点, 计算葡萄糖果糖动力曲线面积值。其面积的差值视为菌体嗜果糖参数之二。

### 1.6 数据处理

采用 DPSv7.55 数据处理软件对实验数据的方差显著性进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菌株的发酵曲线

3 种酵母菌经活化后, 以  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 的接种密度进行发酵试验。如图 1 所示, S288c 菌发酵速率最慢, 直到第 7 天生长速率才有明显下降,

第 8-9 天时质量损失基本趋于平稳。对于 EC1118 和 SX-1 而言, 发酵速率较快, 一天迟滞期后, 进入快速生长阶段, 第 4 天后生长速率明显下降, 第 6 天后质量损失趋于平稳, 但 SX-1 质量损失略低于 EC1118。总体而言, S288c 菌的质量损失最低, 说明 S288c 作为单倍体酵母菌, 较难在模拟葡萄汁环境下生长。尽管 EC1118 和 SX-1 生长速率接近, 但在发酵后期, SX-1 的发酵性略低于 EC1118。

### 2.2 不同菌株葡萄糖果糖的测定曲线

对各菌单糖的利用情况进行连续测定后发现, 糖利用情况基本与发酵曲线相吻合(图 2)。在迅速生长期, 糖的消耗量最大, 无论葡萄糖还是果糖下降速率都较大。在发酵后期, 糖的消耗要低得多。在整个发酵过程中, 3 个菌都表现出葡萄糖比果糖能优先被利用的特点, 这与前人研究结果一致<sup>[4,9]</sup>。但各个菌株间葡萄糖果糖的利用情况却有明显差异。S288c 葡萄糖的消耗明显低于商业用酿酒酵母菌, 果糖的消耗差距更明显。SX-1 和 EC1118 对葡萄糖的消耗比较接近, 但果糖的利用在发酵后期开始有了明显差距, 直至发酵结束, 这种差距一直存在。说明 EC1118 的果糖利用能力要强于 SX-1。各菌株的嗜果糖性不同, 这可能与菌体基因背景或生理特性有关, 有待进一步研究探讨。

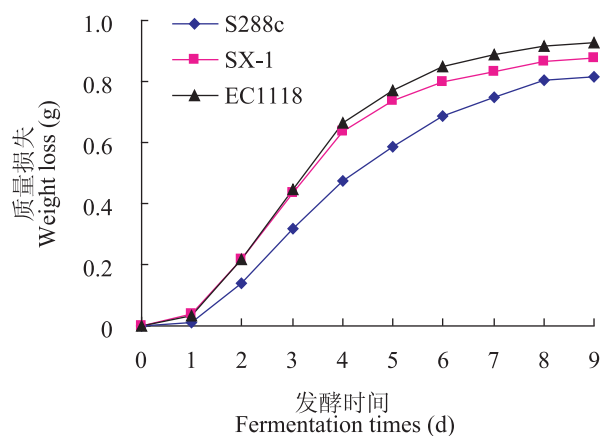


图 1 不同酿酒酵母菌在模拟葡萄汁条件下的发酵曲线  
Fig. 1 The fermentation curve of different *S. cerevisiae*s in synthetic grape medium

### 2.3 不同菌株的嗜果糖参数

我们对各菌株的葡萄糖果糖的动力曲线进行了方程模拟。S288c 菌的糖动力趋势线方程和拟合度相关系数见图 3-5。首先通过计算出葡萄糖动力曲线与横坐标的交叉点,以确定为理论发酵持续时间。即根据数学模拟,可知 S288c 在第 8.3 天时,葡萄糖利用完全。此时通过果糖动力曲线计算得知,相对应的果糖浓度为 24.1 g/L。该值可近似说明 S288c 菌体在葡萄糖利用完全的情况下,果糖的利用能力还比较差,仍有 24.1 g/L 的果糖未被利用。该值是菌体嗜果糖性的重要参数,可显著区分菌株间的差异。S288c 菌体葡萄糖果糖的曲线面积值平均值分别是 485.5、624.1。曲线面积越大,说明菌体发酵该糖的能力越弱,发酵速率低。葡萄糖曲线面积小于果糖曲线面积,

即菌体葡萄糖利用能力高于果糖。其差值大小可表示菌体发酵葡萄糖和果糖的能力差异的大小,差值越小,菌体嗜果糖性越强,差值越大,菌体嗜果糖性越弱。该值是菌体嗜果糖性的另一重要参数,可显著区分菌株间的差异。

由表 1 可知, S288c 发酵理论持续时间最长,为 8.3 d; 当葡萄糖浓度拟为 0 时, 剩余果糖浓度最高; 葡萄糖和果糖曲线面积均大于商业用酿酒酵母; 且面积之差也是最高。所以说, S288c 菌体发酵能力最弱, 嗜果糖性最差。

SX-1 菌发酵理论持续时间为 6.3 d; 当葡萄糖浓度拟为 0 时, 剩余果糖浓度为 16.2 g/L; 葡萄糖和果糖曲线面积均小于 S288c; 且面积之差较 S288c 小很多; 说明 SX-1 菌体发酵能力和嗜果糖性均要显著高于 S288c。

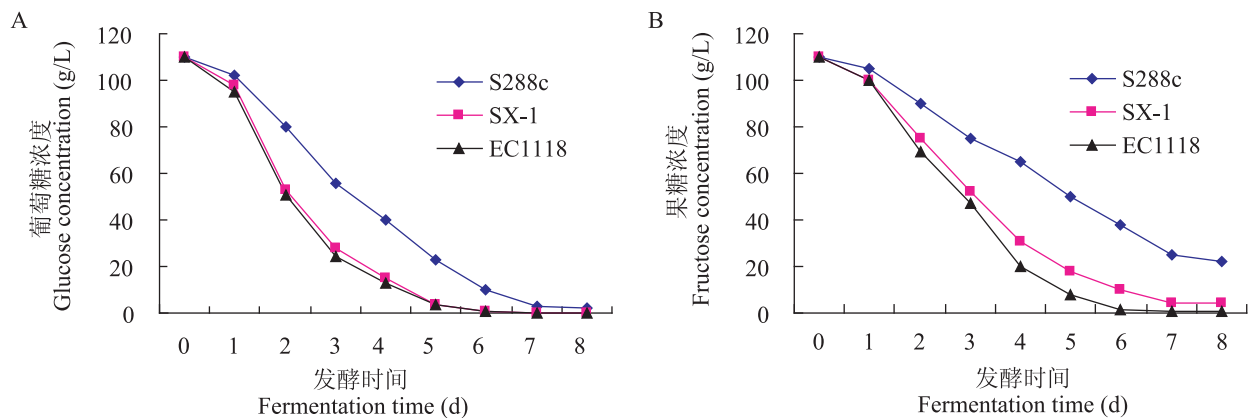


图 2 不同酿酒酵母菌在模拟葡萄汁条件下的单糖利用曲线

Fig. 2 The glucose and fructose curve of different *S. cerevisiae*s in synthetic grape medium

表 1 不同菌株的果糖利用参数( $n=3$ )

Table 1 Fructose utilization parameters of different *S. cerevisiae*s strains ( $n=3$ )

菌株 Strain	拟葡萄糖消耗完所需 发酵持续时间 Fermentation duration if glucose is 0 (d)	葡萄糖浓度拟为 0 时的 果糖浓度 Fructose concentration if glucose is 0 (g/L)	葡萄糖曲线面积 Area under glucose curve	果糖曲线面积 Area under fructose curve	面积差 Area difference
S288c	8.3±0.9 <sup>b</sup>	24.1±3.1 <sup>c</sup>	485.6±42.2 <sup>b</sup>	624.1±48.9 <sup>b</sup>	138.5±11.2 <sup>c</sup>
SX-1	6.3±0.7 <sup>a</sup>	16.2±1.8 <sup>b</sup>	383.2±35.6 <sup>a</sup>	453.6±39.5 <sup>a</sup>	70.4±5.8 <sup>b</sup>
EC1118	6.2±0.5 <sup>a</sup>	10.7±1.1 <sup>a</sup>	370.3±39.4 <sup>a</sup>	426.2±41.2 <sup>a</sup>	55.8±5.1 <sup>a</sup>

注: <sup>a,b,c</sup>: 试验数据在  $P<0.05$  水平上的显著性差异。

Note: <sup>a,b,c</sup>: The results are significantly different ( $P<0.05$ ).

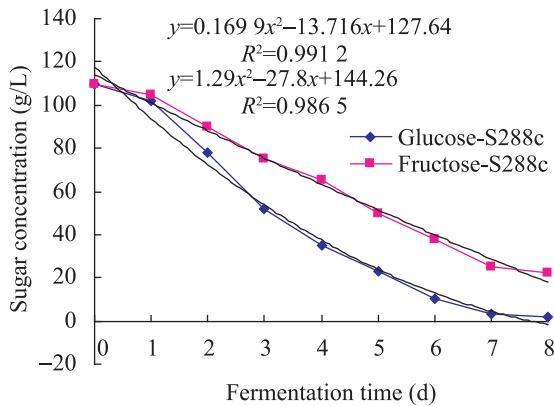


图3 S288c 菌的单糖发酵模拟曲线及方程

Fig. 3 The glucose and fructose curve of S288c made by mathematic calculation

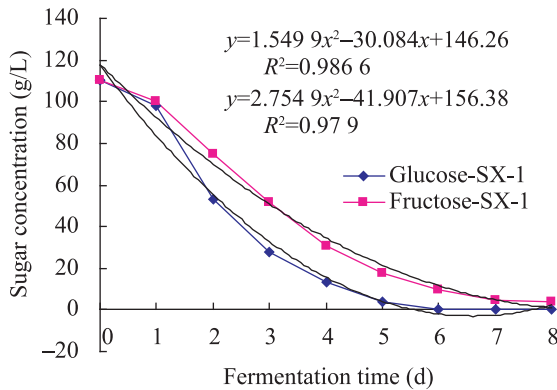


图4 SX-1 菌的单糖发酵模拟曲线及方程

Fig. 4 The glucose and fructose curve of SX-1 made by mathematic calculation

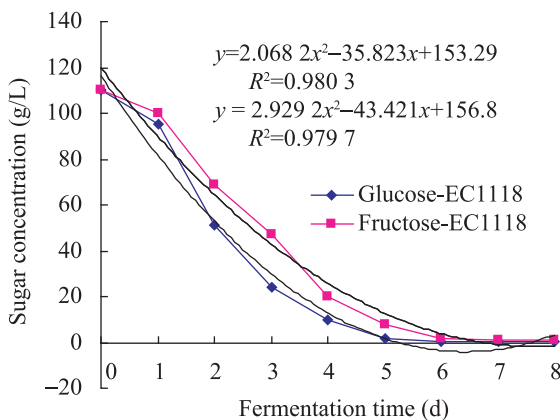


图5 EC1118 菌的单糖发酵模拟曲线及方程

Fig. 5 The glucose and fructose curve of EC1118 made by mathematic calculation

EC1118 葡萄糖消耗完所需理论持续时间为 6.2 d; 当葡萄糖浓度拟为 0 时, 剩余果糖浓度为 10.7 g/L; 葡萄糖和果糖曲线面积均小于前两者, 说明葡萄糖果糖发酵能力均强于前两种菌株; 且面积之差最小; 从果糖浓度值和曲线面积差值可说明 EC1118 嗜果糖性显著高于前两者。

### 3 结论与讨论

酿酒酵母的嗜果糖性是葡萄酒酵母选育工作的一项重要内容。建立评价菌体发酵果糖能力的方法, 是酿酒酵母嗜果糖性研究的基础。我们采用的模拟葡萄汁培养基, 其中初始葡萄糖果糖含量相等。Liccioli 等<sup>[9]</sup>用只含果糖的培养基, 认为不能正确评价菌体在葡萄酒环境下的嗜果糖性, 因为葡萄糖对果糖的代谢具有积极的影响<sup>[10]</sup>。试验证明我们采用的模拟葡萄汁培养基对评价菌体的嗜果糖性是合理有效的。

为了区分各菌株果糖利用情况的差异, 评价各菌株的嗜果糖特性。Berthels 等<sup>[4]</sup>计算出当 20%、30%、40%、50% 的葡萄糖被消耗完时, 葡萄糖与果糖的比值线性增加。他们根据菌体线性增加的幅度, 对菌株的嗜果糖性进行了排序。这种方法的可操作性较差, 因为无法控制取样点的准确性。另外, 有研究认为发酵后期菌体对果糖的利用能力对彻底发酵更重要<sup>[5]</sup>。Guillaume 等以残糖为纵坐标, CO<sub>2</sub> 释放量为横坐标, 画出两个菌的葡萄糖果糖利用曲线以区分它们的嗜果糖性<sup>[7]</sup>。该方法没有与发酵持续时间联系起来, 因此不能全面认识菌体的发酵性, 而且只是定性区分, 对菌体的嗜果糖性没有量化。Dumont 等<sup>[1]</sup>提出的嗜果糖系数, 是指发酵后半部分, 葡萄糖与果糖曲线面积的差值。差值越小, 嗜果糖性越强。该方法对发酵后半部分的界定比较模糊, 随机性强。

本研究提出的嗜果糖性评价方法考虑到了整个发酵过程, 但无需在特定残糖浓度时准确取

样。发酵期间每日取样即可,然后通过二次曲线方程模拟单糖发酵曲线,其模拟方程  $R^2$  均在 0.97 以上。设定葡萄糖浓度为 0 时,发酵所需时间为理论发酵持续时间,该值与发酵曲线所得的发酵持续时间基本吻合。本研究提出的嗜果糖参数计算方法把发酵持续时间与嗜果糖性联系在了一起,这有助于筛选获得发酵快速且彻底的优良菌株。另外,我们发现葡萄糖通常能接近完全消耗,而此时果糖浓度可指示菌体的嗜果糖性。以理论发酵持续时间为限,其果糖与葡萄糖曲线面积的差值,也可有效指示菌体的嗜果糖性。通过该方法所得嗜果糖参数值能将 3 个菌体显著区分开,且与其他文献报道一致<sup>[2,8]</sup>。S288c 菌体嗜果糖性最差,EC1118 最强,本实验室菌株 SX-1 居中。葡萄糖果糖动力曲线面积值,可反映菌体发酵该糖的速率,面积值越大,发酵速率越低。S288c 菌体葡萄糖果糖动力曲线面积值均最大,说明发酵速率最低。对 3 个菌体而言,葡萄糖曲线面积均小于果糖曲线面积,说明葡萄糖发酵速率高于果糖。其面积的差值可视为菌体嗜果糖参数之二,差值越大,嗜果糖性越低,差值越小,嗜果糖性越强。S288c 菌差值最大,其嗜果糖性最低;EC1118 菌差值最小,其嗜果糖性最强。

由此可见,本方法所得菌体发酵参数,一方面可反映发酵速率,另一方面可反映菌体的嗜果糖性。这为评价和筛选高果糖利用葡萄酒酿酒酵母提供了有力的工具。对于该方法的客观性和准确性,我们将利用更多的菌株来实验,而且要进一步分析菌株间嗜果糖差异的分子基础。

## 参 考 文 献

- [1] Dumont A, Raynal C, Raginel F, et al. The ability of wine yeast to consume fructose[J]. Australian and New Zealand grapegrower and winemaker, 2009, 543: 52-57
- [2] Gafner J, Schütz M. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experiences to restart stuck fermentations[J]. Viticulture and Enology Science, 1996, 51: 214-218.
- [3] 陈莹, 屈慧鸽, Gafner J. 葡萄糖-果糖比对发酵停滞的影响及其预防、重启策略[J]. 中外葡萄与葡萄酒(Sino-Oversea Grapevine & Wine), 2010, 5: 69-71.
- [4] Berthels NJ, Cordero Otero RR, Bauer FF, et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains[J]. FEMS Yeast Research, 2004, 4: 683-689.
- [5] Santos J, Sousa MJ, Cardoso H, et al. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations[J]. Microbiology, 2008, 154(2): 422-430.
- [6] Varela C, Pizarro F, Agosin E. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 3392-3400.
- [7] Guillaume C, Delobel P, Sablayrolles JM, et al. Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation[J]. Applied and Environmental & Microbiology, 2007, 73: 2432-2439.
- [8] Galeote V, Novo M, Salema-Oom M, et al. FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H<sup>+</sup> symporter[J]. Microbiology, 2010, 156: 3754-3761.
- [9] Liccioli T, Chambers P. A novel methodology independent of fermentation rate for assessment of the fructophilic character of wine yeast strains[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(7): 833-843.
- [10] Arroyo-Lopez N, Querol A, Barrio E. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36: 663-669.