

四川甘孜州高山葡萄酒产区酵母菌多样性分析

杨慧敏, 任晓娜, 秦义*

西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100

杨慧敏, 任晓娜, 秦义. 四川甘孜州高山葡萄酒产区酵母菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2673-2685

Yang Huimin, Ren Xiaona, Qin Yi. Diversity analysis of yeasts in the Ganzi alpine wine region, Sichuan[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2673-2685

摘要:【背景】西南高山葡萄酒产区的甘孜州产区, 具有生产优质葡萄酒的自然禀赋。【目的】研究四川甘孜州葡萄酒产区真核微生物种类多样性、本土酿酒酵母遗传多样性, 以及商业酵母对本土酵母多样性的影响。【方法】利用 ITS 高通量测序技术对赤霞珠接种发酵和自然发酵过程中的微生物进行多样性分析, 并利用 Interdelta 指纹图谱分析法, 对经过 26S rRNA 基因鉴定的野生酿酒酵母基因型进行分类。【结果】ITS 测序结果显示, 接种发酵和自然发酵各时期均注释到 7 个科 7 个属的酵母, 通过 Interdelta 指纹图谱分析发现甘孜州产区的酿酒酵母共有 5 种基因型。该产区酿酒酵母的 6 株代表菌株与我国其他产区 109 株酿酒酵母的进化树分析结果显示, 均与来自北京产区的酿酒酵母菌株亲缘关系更近。【结论】甘孜州葡萄酒子产区酵母资源丰富, 表现出较高的微生物多样性和中等程度的本土酿酒酵母基因型多样性, 为后续优良本土酵母菌株的筛选奠定基础。

关键词: 甘孜州; 酵母菌多样性; 自然发酵; 接种发酵; 基因型多样性

Diversity analysis of yeasts in the Ganzi alpine wine region, Sichuan

YANG Huimin, REN Xiaona, QIN Yi*

College of Enology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: [Background] Ganzi, an alpine wine region in southwestern China, enjoys favorable natural conditions for making wine. [Objective] To study the diversity of eukaryotic microorganisms, the genetic diversity of native *Saccharomyces cerevisiae*, and the diversity of native yeasts under the influence of commercial yeasts in the Ganzi wine region. [Methods] Cabernet Sauvignon grapes were

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-29-jg-3)

Supported by: Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs: National Modern Agricultural Industry Technology System Funding Project (CARS-29-jg-3)

*Corresponding author: E-mail: qinyi@nwsuaf.edu.cn

Received: 2021-11-17; Accepted: 2022-01-18; Published online: 2022-03-07

grouped for Inoculated fermentation and natural fermentation. Then, Internal Transcribed Spacer (ITS) high-throughput sequencing was used to analyze the diversity of microorganisms during fermentation, and Interdelta fingerprinting was employed for classifying the genotypes of wild *S. cerevisiae* identified by 26S rRNA gene. **[Results]** Yeasts in 7 genera of 7 families in the natural fermentation and Inoculated fermentation were respectively identified, and Interdelta fingerprinting showed 5 genotypes of *S. cerevisiae* in Ganzi wine region. According to the phylogenetic tree of 6 representative *S. cerevisiae* strains in the Ganzi wine region and 109 *S. cerevisiae* strains from other producing areas in China, the 6 strains were in close genetic relationship with those from Beijing. **[Conclusion]** Ganzi wine region is rich in yeast resources, showing high microbial diversity and moderate genotypic diversity of native *S. cerevisiae*, which presents a potential for searching excellent native strains.

Keywords: Ganzi; yeast diversity; natural fermentation; inoculated fermentation; genotypic diversity

葡萄酒的酿造过程本质上是酵母菌、乳酸菌等微生物代谢活动的过程^[1]。酵母广泛存在于葡萄园土壤、酿酒设备、葡萄浆果表面、葡萄汁中^[2-6]，形成了十分复杂的酵母群体。酵母菌群是“微生物风土”的核心菌群，其多样性受葡萄酒产区气候、土壤等多个因素的影响^[5,7-9]。

近年来，西南高山葡萄酒产区由于其独特的地理气候特点，受到葡萄酒产业越来越多的关注^[10]。西南高山产区位于 N22°-34° 之间的喜马拉雅山东麓横断山脉周围，平均海拔 1 900 m，年日照 2 000-2 600 h，年均气温 1-20 °C，属于我国酿酒葡萄种植纬度较低而海拔最高的产区之一^[11-12]。四川甘孜州葡萄酒产区属于西南高山产区的一部分，甘孜州葡萄园主要分布在海拔 1 800-2 560 m 的横断山脉“两江一河”沿线，地处高海拔峡谷地区，坡度较大，葡萄园非集中连片，多为梯田分散分布，通风透光，天然屏蔽了病虫害的传播，符合发展酒庄葡萄酒的要求，不同地块、峡谷、河流等非常适宜于生产不同风格和特色的酒庄葡萄酒^[10]。截至 2020 年，在甘孜州、阿坝州境内已经有 1 300 余 hm² 的酿酒葡萄园。近年来对高山葡萄酒产区部分产区的本土酵母多样性进行了大量研究，然而对甘孜葡萄酒产区本土酵母的研究有限。

目前，在我国西南高山葡萄酒产区的云南

产区，赵悦等从香格里拉的 4 个不同海拔葡萄园的赤霞珠自然发酵葡萄酒中，共分离鉴定出 9 属 10 种酵母，且不同海拔葡萄园的酵母种之间存在显著差异^[13]；杨宽等从弥勒云中舞葡萄中分离鉴定出了葡萄汁有孢汉逊酵母、陆生伊萨酵母、库德毕赤酵母、粘红酵母和桔假丝酵母 5 属 5 种，显示了该地酵母菌种类的多样性^[14]；史涛涛从德钦产区赤霞珠冰葡萄自然发酵过程中分离鉴定出浅黄隐球酵母、*Cryptococcus amyloletus*、*Hyphopichia pseudoburtonii*、葡萄汁有孢汉逊酵母、酿酒酵母等 5 种酵母^[15]。在西南高山葡萄酒产区的四川产区，蒋丽在阿坝州威代尔冰葡萄果实上分离鉴定出了葡萄汁有孢汉逊酵母、美极梅奇酵母、酿酒酵母、解脂耶罗维亚酵母和异常威克汉逊酵母等 5 种酵母^[16]。这些研究表明西南高山产区的酵母属、种具有多样性，且不同产地之间具有明显差异。这些产区的酵母菌多样性和特性可能在产区葡萄酒风格形成中发挥了作用。

本研究以西南高山产区四川甘孜州产区葡萄酒微生物为研究对象，运用 ITS 高通量测序技术，分析了赤霞珠葡萄在自然发酵和接种商业酵母发酵进程中的真核微生物多样性，并利用纯培养结合 Interdelta 基因分型技术，考察了该产区的酿酒酵母基因型多样性。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

从四川甘孜州乡城县挑选生长势好、无病害的赤霞珠葡萄, 置于无菌袋中运回实验室。

自然发酵(Z)和接种商业酵母(CEC01)发酵(S): 将葡萄除梗破碎后装入已灭菌的 3 L 玻璃罐中, 于 18–20 °C 进行带皮发酵。分别在葡萄破碎后(S1、Z1)、发酵母液(自然发酵)或接种商业酵母后(S2、Z2)、发酵启动期(S3、Z3)、发酵旺盛期(S4、Z4)、发酵后期(S5、Z5)和发酵末期(S6、Z6)取样。

商业酿酒酵母 CEC01, 安琪酵母股份有限公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

YEPD 培养基, 北京奥博星生物技术有限责任公司; WLN 营养琼脂培养基, 海博生物技术有限公司。培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 微量紫外分光光度计, NanoDrop 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京市六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, Syngene 公司; 超低温冰箱, Sanyo 公司。

1.3 方法

1.3.1 ITS 高通量测序

ITS 扩增选择区域为 ITS2 区。引物为 forward primer (5'-GCATCGATGAAGAACGCA GC-3'), reverse primer (5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3')。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切胶回收 PCR 产物。回收后, 利用微量紫外分光光度计和 2% 琼脂糖凝胶电泳进行文库质检。文库质检合格后, 使用 Qubit 进行文库定量。使用 Illumina HiSeq PE250 进行上机测序。上述 ITS amplicon 测序工作由上海锐翌基因有限公司完成。

1.3.2 酵母菌分离纯化与 WLN 鉴定

取自然发酵液, 用无菌水稀释至适当梯度

(10^{-1} – 10^{-8}), 均匀涂布于含 100 mg/L 氯霉素的 YEPD 平板上, 28 °C 倒置培养 5 d。随机挑取单菌落接种于 YEPD 液体培养基 150 r/min 活化 12 h 后, 划线接种于 WLN 培养基上, 28 °C 倒置培养 10 d。根据各酵母菌落在 WLN 平板上的菌落特征(菌落颜色、形态、表面特征、边缘特征), 对各菌落进行 WLN 培养类型分类。

1.3.3 酿酒酵母菌的分子鉴定

(1) 酿酒酵母菌株基因组 DNA 提取及检测 DNA 提取采用石英砂破壁法^[17], DNA 纯度和浓度使用微量紫外分光光度计检测。

(2) 26S rRNA 基因 D1/D2 区测序鉴定

从 WLN 培养类型为酿酒酵母的 101 株菌中, 随机选取 30 株进行 26S rRNA 基因 D1/D2 区测序鉴定, 引物为 NL1 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAAG-3')和 NL4 (5'-GGTCCGT GTTCAAGACGG-3')。PCR 产物经生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果在 NCBI 进行 BLAST 搜索比对。

(3) Interdelta 分型

对经 26S rRNA 基因 D1/D2 区测序鉴定的 30 株酿酒酵母菌种进行 Interdelta 指纹图谱分析, 使用引物 delta12 (5'-TCAACAATGGAATCCC AAC-3')和 delta21 (5'-CATCTTAACACCGTATA TGA-3')进行 PCR 扩增, 对所得电泳图进行对比, 找出相同的分型进行汇总^[18–19]。

1.3.4 酵母菌株进化分析

为了进一步确定供试菌株与我国其他产区已公布的酿酒酵母菌株的亲缘关系, 将 Interdelta 指纹图谱分型鉴定结果显示的每个基因型中随机挑取的 1–2 个菌株与从 NCBI 下载中国新疆、宁夏、甘肃、山西、北京、山东等葡萄酒产区的已公布的 109 株酿酒酵母的 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列, 利用 MEGA 7.0 软件中的 neighbor-joining 法构建系统发育树展示酿酒酵母菌的遗传多样性和各菌株间的亲缘关

系, 并进行 1 000 次的 bootstrap 检验。

2 结果与分析

2.1 ITS amplicon 测序结果分析

对赤霞珠接种发酵样本和自然发酵样本进行 ITS amplicon 测序, 经序列质量控制后共得到 438 377 条有效序列, 序列平均长度在 319 bp。根据 97% 的相似度, 抽平后的样品共得 180 个 OTU。其中, 接种发酵和自然发酵共有的 OTU 为 132 个, 特有的 OTU 分别为 29 个和 19 个(图 1)。

2.1.1 接种发酵和自然发酵在不同发酵时期的物种 α 多样性分析

α 多样性(alpha diversity)是对单个样品中物种多样性的分析, 利用 QIIME 软件计算样品的 α 多样性指数的值^[20]。甘孜州赤霞珠葡萄在接种发酵和自然发酵条件下不同发酵时期的真菌种群结构组成特点见表 1。在 97% 的序列相似性水平上, 葡萄破碎后的醪液中(S1、Z1)的有效序列数以及产生的 OTU 数量较多。

自然发酵各时期的 Shannon 指数和 Simpson 指数, 分别在 0.08–3.59 和 0.01–0.87 之间, 而接种发酵各时期分别介于 0.11–3.64 和 0.02–0.88 之间。2 个不同发酵方式样品中的 Shannon

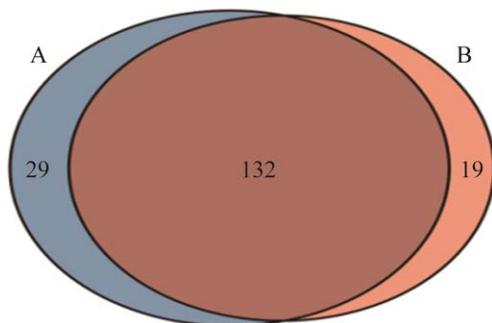


图 1 赤霞珠接种发酵和自然发酵各时期 OTU 数分布韦恩图 A: 接种发酵组; B: 自然发酵组

Figure 1 Venn diagram of the distribution of OTUs for each stage of inoculated and natural fermentation of Cabernet Sauvignon. A: Inoculated fermentation; B: Natural fermentation.

指数和 Simpson 指数均逐渐下降, 表明随着发酵的进行, 真菌丰度不断下降, 主导发酵的微生物种类不断下降。

2.1.2 接种发酵和自然发酵在不同发酵时期的物种 β 多样性分析

β 多样性是用来比较一对样品在物种多样性方面存在的差异大小, 该指数越大表示样品间的差异越大。基于 Unweighted UniFrac 距离矩阵, 将具有相似 β 多样性的样品聚在一起, 反应样品间的相似性。自然发酵过程中, Z3 时期与 Z4、Z5 时期之间的物种组成相似, 而 Z1 时期与 Z3、Z4、Z5、Z6 时期之间的物种组成差异较大。接种发酵过程中, S5 时期与 S4、S6 时期之间的物种属组成相似, 而 S1 时期与 S4、S5、S6 时期之间的物种属组成差异较大。接种发酵和自然发酵各时期之间的物种属组成差异, 均随着发酵进行越来越大。综合来看, 2 种发酵处理的 Z1 和 S1 之间, Z2 和 S2 之间, Z3、S5 之间, Z5、S5 的物种属水平组成相似(图 2)。

2.1.3 接种发酵和自然发酵在不同时期的酵母菌群组成分析

接种发酵和自然发酵各时期可归类的微生物群落 OTU, 共归于 20 个科 20 个属, 其中酵母菌有 7 科 7 属(图 3、图 4)。

在科的水平上, 接种发酵和自然发酵样品中均检测到 7 个科的酵母。其中, 类酵母科(*Saccharomycodaceae*)是 S1 和 Z1 时期的优势科, 分别占样品序列总数的 60.65% 和 69.18%; 而在 S2–S6 时期和 Z2–Z6 时期, 酵母科(*Saccharomycetaceae*)为优势酵母科, 其占比均大于所在时期样品序列总数的 80% (图 3)。

在属的水平上, 在 2 组发酵样本中均检测到 7 个酵母属(图 4), 分别为酿酒酵母属(*Saccharomyces*)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)、隐球酵母属(*Cryptococcus*)、假

表 1 赤霞珠接种发酵和自然发酵各时期物种的 α 多样性指数分析

Table 1 Analysis of alpha diversity index for each stage of inoculated and natural fermentation of Cabernet Sauvignon

样品 Samples	有效序列数 Number of valid sequences	OTU 数量 Number of OTUs	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	覆盖度 Coverage (%)
接种发酵 Inoculated fermentation	S1 38 592	152	3.64	0.88	99.91
	S2 38 515	98	1.29	0.31	99.87
	S3 33 059	54	0.47	0.12	99.91
	S4 38 834	26	0.20	0.05	99.96
	S5 36 040	22	0.12	0.02	99.97
	S6 37 250	25	0.11	0.02	99.97
自然发酵 Natural fermentation	Z1 37 716	144	3.59	0.87	99.92
	Z2 36 246	88	1.49	0.42	98.88
	Z3 36 364	31	0.18	0.03	99.96
	Z4 36 517	30	0.15	0.03	99.96
	Z5 35 463	19	0.11	0.02	99.97
	Z6 33 781	22	0.08	0.01	99.92

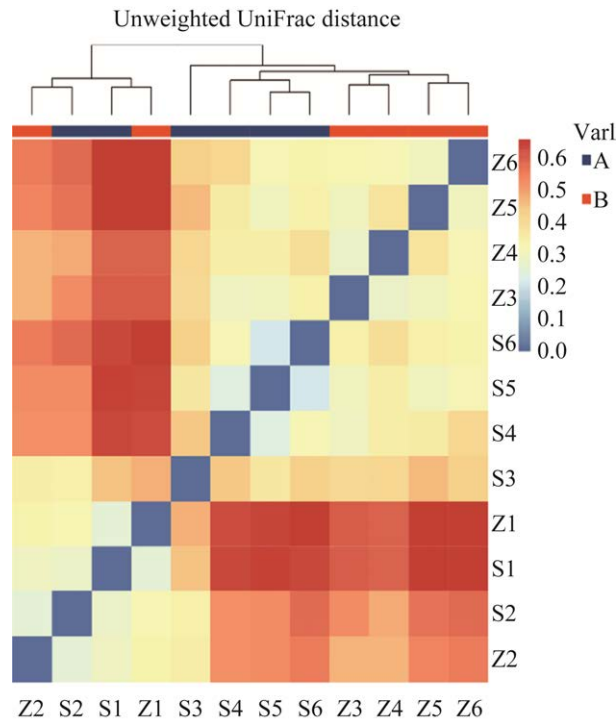


图 2 赤霞珠葡萄接种发酵和自然发酵各时期物种 β 多样性热图 A: 接种发酵组; B: 自然发酵组

Figure 2 Heatmap of beta diversity for each stage of inoculated and natural fermentation of Cabernet Sauvignon. A: Inoculated fermentation; B: Natural fermentation.

丝酵母属(*Candida*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、红酵母属(*Phodotorula*)和黑粉酵母属(*Filobasidium*)。

在接种发酵过程中, S1 时期检测到 7 个酵母属, 其中有孢汉逊酵母属和隐球酵母属的比例分别为 63.33% 和 27.21%。随着发酵的启动, S2 时期样品中的有孢汉逊酵母属和隐球酵母属所占比例急剧下降, 而酿酒酵母属所占比例由 S1 的 4.65% 迅速升高至 94.12%。随着发酵进行, 在发酵过程中起主要作用的为酿酒酵母属, 其次是有孢汉逊酵母属。

在自然发酵过程中, Z1 时期同样也检测到 7 个酵母属, 其中有孢汉逊酵母属、隐球酵母属分别为 72.02% 和 20.78%。随着发酵的启动, Z1 时期的 3 个酵母属所占比例同样快速下降, 酿酒酵母属则由 Z1 时期的 0.26% 升高至 80.99%; 与接种发酵 S2 时期不同的是, 假丝酵母属所占比例由 Z1 的 0.49% 升高至 15.43%。在自然发酵过程中起主要作用的是酿酒酵母属, 其次是有孢汉逊酵母属和假丝酵母属。

在种的水平上, 2 组发酵样本中共检测到 13 个种, 分别是酿酒酵母属的 *S. cerevisiae*; 有孢汉逊酵母属的 *Hanseniaspora thailandica*; 隐球酵母属的 *Cryptococcus victoriae*、*Cryptococcus*

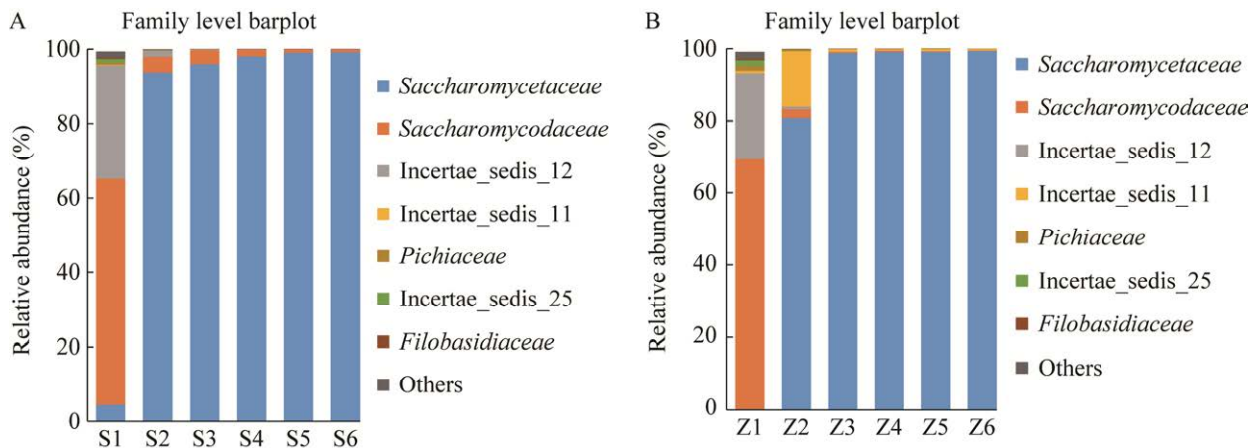


图 3 赤霞珠葡萄接种发酵和自然发酵各时期酵母菌群科水平分布柱形图 A: 接种发酵组; B: 自然发酵组

Figure 3 Relative abundance of yeast community for each stage of inoculated and natural fermentation of Cabernet Sauvignon at the family level. A: Inoculated fermentation; B: Natural fermentation.

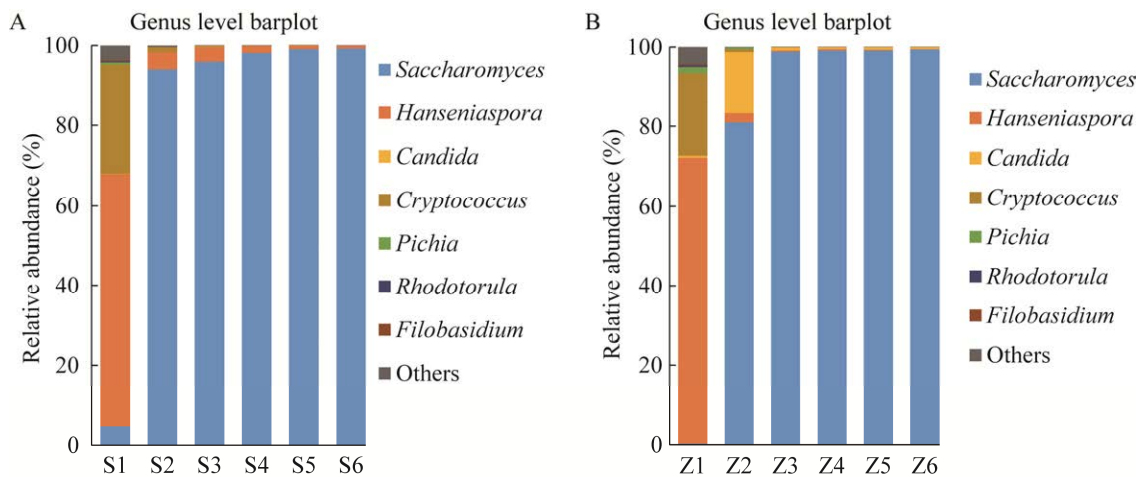


图 4 赤霞珠葡萄接种发酵和自然发酵各时期酵母菌群属水平分布柱形图 A: 接种发酵组; B: 自然发酵组

Figure 4 Relative abundance of yeast community for each stage of inoculated and natural fermentation of Cabernet Sauvignon at the genus level. A: Inoculated fermentation; B: Natural fermentation.

aff. taibaiensis、*Cryptococcus paraflavus*、*Cryptococcus laurentii* 和 *Cryptococcus rajasthanensis*; 假丝酵母属的 *Candida xylopsoci*、*Candida smithsonii* 和 *Candida quercitrusa*; 毕赤酵母属的 *Pichia fermentans*、红酵母属的 *Phodotorula nothofagi*、黑粉酵母属的 *Filobasidium floriforme*。其中 *C. smithsonii* 和 *C. rajasthanensis* 只存在于接种发酵中, *C. xylopsoci* 只存在于自然发酵中。2 组发酵样本中, 丰度最高的是 *S. cerevisiae*, 其次是 *H.*

thailandica (图 5)。

2.2 酵母菌的 WLN 培养鉴定

Cavazza 等研究表明, 根据菌落的颜色和形态, WLN 培养基可以区分在葡萄酒发酵过程中出现的大多数典型的酵母菌^[21]。从甘孜州赤霞珠葡萄自然发酵过程中分离到 183 株野生酵母菌株, 将其在 WLN 培养基上培养 10 d 后, 根据菌落形态特征初步鉴定了野生酵母菌的种属, 并对形态相似的菌株进行了归类(表 2)。如

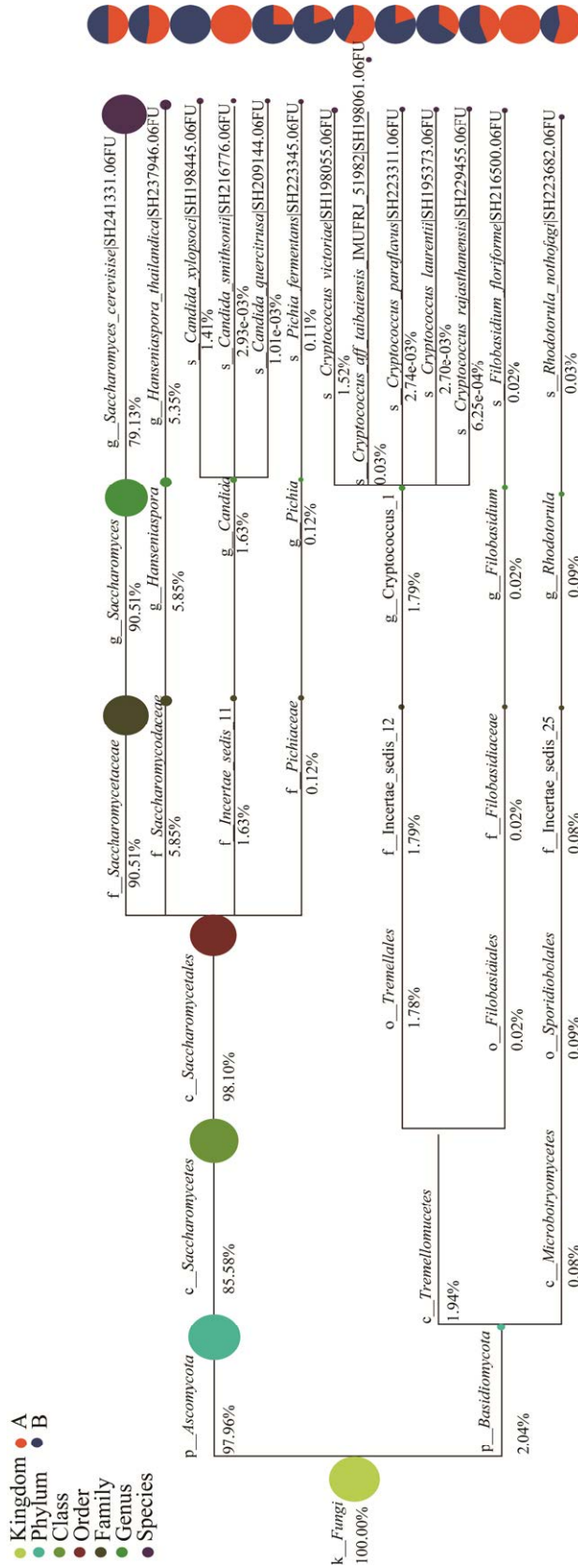


图5 赤霞珠葡萄接种发酵和自然发酵酵母分类树 A: 接种发酵组; B: 自然发酵组。扇形的大小表示该分组在分类上相对丰度的比例
Figure 5 Yeast classification tree of natural fermentation and inoculated fermentation of Cabernet Sauvignon. A: Inoculated fermentation; B: Natural fermentation. Size of each sector represents proportion of relative abundance (%) at class.

表 2 酵母菌在 WLN 培养基上的形态分型结果

Table 2 Morphological classification of yeasts by WLN nutrient medium

类型	菌落特征	鉴定结果	菌株个数
Types	Colony characteristics	Identification results	Number of strains
CT1	Cream, knoblike, convex, surface: smooth, opaque, consistency of cream	<i>Saccharomyces</i>	96
CT2	Cream to green, knoblike, surface: smooth, opaque, consistency of cream		5
CT3	Gray-green with green center, flat, surface: smooth, opaque, consistency of cream	<i>Hanseniaspora</i>	46
CT4	Intense green with white rim, flat, surface: smooth, opaque, consistency of butter		7
CT5	Pale green, flat, surface: smooth, opaque, consistency of butter		6
CT6	Green to grey-green, knoblike, convex, surface: smooth, opaque	<i>Cryptococcus</i>	3
CT7	Gray-green with hint of blue, flat, surface: smooth, opaque, consistency of cream		9
CT8	White, surface: opaque, wrinkled and rough, consistency of flour	<i>Pichia</i>	11
Total			183

表 2 所示, 183 株酵母菌被分成 8 个 WLN 培养类型。根据 Cavazza 等的描述以及前人的验证及补充^[22-24], 依据菌落的颜色和形态, 判定 CT1 和 CT2 类为酿酒酵母属, 占总数的 55.19%; CT3、CT4 和 CT5 为有孢汉逊属酵母, 占总数的 32.24%; CT6、CT7 类为隐球酵母属, 占总数的 6.56%; CT8 为毕赤酵母属, 占总数的 6.01%。

2.3 Interdelta 指纹图谱分析

将鉴定为酿酒酵母的菌株进行 Interdelta 指纹图谱分型, 共获得 5 种基因型, 其典型 Interdelta 指纹图谱如图 6 所示。对 5 种酿酒酵母基因型的 Interdelta 结果进行 UPGMA 聚类分析(图 7)。当欧式距离为 0.68 时, 可将 5 个基因型分为 3 类, 第一类以酿酒酵母 H14 为代表的基因型, 第二类以酿酒酵母 H15 为代表的基因型, 第三类则是以酿酒酵母 B13、B15 和 F11 为代表的 3 种基因型。

2.4 甘孜州高山葡萄酒产区酿酒酵母菌进化分析

参与对比的所有酿酒酵母的 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列, 均起源于一个共同的祖先, 主要分为 3 个大支。甘孜州高山葡萄酒产区的 6 株酿酒酵母分为 2 支, 酿酒酵母 K12、J32、

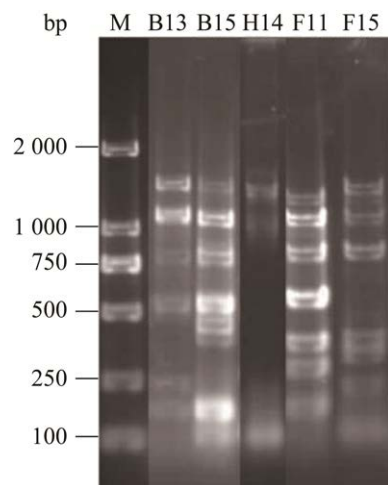


图 6 自然发酵中酿酒酵母 Interdelta 指纹图谱分析结果

Figure 6 Interdelta fingerprint analysis of *S. cerevisiae* during natural fermentation.

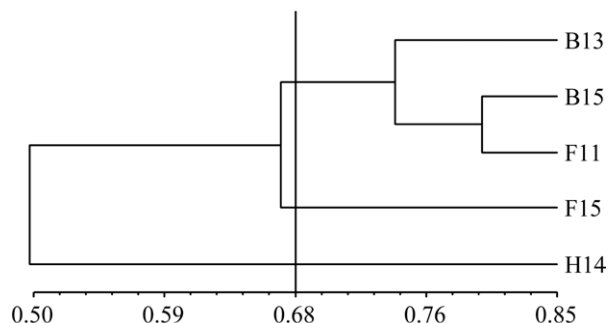


图 7 自然发酵中酿酒酵母 5 个基因型的聚类分析图
Figure 7 Cluster analysis diagram of 5 genotypes of *S. cerevisiae* during natural fermentation.

B13、C33、E13 和其他产区的 37 株酿酒酵母聚于一大支,酿酒酵母 D11 和其他产区的 37 株酿酒酵母聚为一支。聚类结果显示,酿酒酵母 D11、B13,酿酒酵母 E13、K12、J32,以及酿

酒酵母 C33,均与来自北京的酿酒酵母菌株亲缘更近。同时,基于 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列的进化分析也显示,我国各葡萄酒产区酿酒酵母之间亲缘关系较近(图 8)。



图 8 酿酒酵母 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列进化树分析

Figure 8 Phylogenetic tree of *S. cerevisiae* based on the sequence analysis of the 26S rRNA gene D1/D2 region.

3 讨论

葡萄酒酵母群落在不同产区具有鲜明的地域差异,这是“微生物风土”的一个重要特征^[25]。在甘孜州赤霞珠葡萄酒发酵过程中,检测到了7个属13个种的酵母,分别为酿酒酵母属(*Saccharomyces*)、有孢汉逊酵母属(*Hanseniaspora*)、隐球酵母属(*Cryptococcus*)、假丝酵母属(*Candida*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、红酵母属(*Phodotorula*)和黑粉酵母属(*Filobasidium*)等。这与Zhao等^[26]研究的同样处于高山产区的香格里拉产区赤霞珠葡萄的微生物多样性存在显著差异。本研究中检测到的红酵母属(*Phodotorula*)和黑粉酵母属(*Filobasidium*)在香格里拉并未检测到,而香格里拉产区中的*Brettanomyces*、*Debaryomyces*、*Meyerozyma*、*Saccharomycopsis*等11个属的酵母,在甘孜州的葡萄中没有发现^[26]。这表明在高山产区内,不同地理位置和气候条件对酵母群落也有很大影响。类似地,Gao等^[27]对新疆葡萄酒产区酿酒葡萄表皮微生物群落与环境条件的关系进行分析,结果也同样表明酿酒葡萄表面的微生物群落结构主要受地理条件控制。

值得一提的是,甘孜州葡萄酒产区还栖息着几种产胞外酶的酵母,如*C. xylopsoci*、*C. quercitrusa*、*F. floriforme*,能产生至少一种胞外酶,如果胶酶、纤维素酶和 β -葡萄糖苷酶等对葡萄酒的风味有积极作用^[28-30]。这些酵母菌在葡萄酒中的应用尚未被广泛研究。甘孜州葡萄酒产区产胞外酶的酵母菌株具有重要的潜在价值,可在将来的研究中进一步开发。

在甘孜州赤霞珠自然发酵和接种发酵初期,*Hanseniaspora*和*Cryptococcus*均是优势菌属,而*Saccharomyces*的数量相对较低。无论是自然发酵还是接种发酵,随着酒精发酵的启动,

非酿酒酵母的数量急剧降低,而之前不占优势的*Saccharomyces*快速成为优势菌群,主导发酵的进行。与此同时,在接种发酵的酒样中,*Hanseniaspora*一直存在,表现出了较强的生存能力。类似地,在多个研究,都发现*Hanseniaspora*是葡萄果皮或者发酵初期的优势菌群^[26,31-32],近年来研究发现其具有高产乙酸乙酯、分泌糖苷酶增加葡萄酒香气、提高香气含量和香气复杂度等优良特性,对具有混合接种发酵应用潜力的*Hanseniaspora*进行研究是开发利用该属酵母资源的基础^[33-36]。与接种发酵相比,自然发酵酒样中,*Candida*却表现出了较强生存能力。*Candida*一方面可能给自然发酵葡萄酒贡献复杂的香气物质,但另一方面,由于*Candida*是引起“酒花病”的主要微生物,因此会给自然发酵葡萄酒贮存期间的“酒花病”防治带来压力。

本研究中30株野生酿酒酵母具有5个Interdelta指纹图谱类型,表现出四川甘孜州赤霞珠葡萄自然发酵过程中丰富的酿酒酵母菌株基因型多样性。酿酒酵母是葡萄酒自然发酵中后期主要的野生酵母菌株,也是目前工业应用最广的酵母菌^[37],葡萄酒产区本土酿酒酵母,更有利于促进产区葡萄酒质量风格的形成和塑造,对其基因型多样性研究对后续开发利用具有重要意义^[38-39]。

西南高山葡萄酒产区作为我国一个新兴产区,具有酿造优质葡萄酒的自然禀赋。通过本研究对甘孜州赤霞珠在接种发酵和自然发酵过程中的酵母菌多样性分析以及对自然发酵中酵母的分离和鉴定,发现了位于西南高山产区的甘孜州葡萄酒子产区,具有较高的微生物多样性和中等程度的本土酿酒酵母基因型多样性,这对本产区葡萄酒风格的形成具有潜在重要作用。

REFERENCES

- [1] 张春芝, 江志国. 微生物对葡萄酒香气的影响综述[J]. 中国酿造, 2013, 32(9): 28-31
Zhang CZ, Jiang ZG. Review of microbial effects on wine aroma[J]. China Brewing, 2013, 32(9): 28-31 (in Chinese)
- [2] Grangeteau C, Gerhards D, Rousseaux S, Von Wallbrunn C, Alexandre H, Guilloux-Benatier M. Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: what is their involvement in grape must fermentation? [J]. Food Microbiology, 2015, 50: 70-77
- [3] Ramírez M, López-Piñero A, Velázquez R, Muñoz A, Regodón JA. Analysing the vineyard soil as a natural reservoir for wine yeasts[J]. Food Research International, 2020, 129: 108845
- [4] Brysch-Herzberg M, Seidel M. Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 214: 137-144
- [5] Drumonde-Neves J, Franco-Duarte R, Lima T, Schuller D, Pais C. Yeast biodiversity in vineyard environments is increased by human intervention[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160579
- [6] Morrison-Whittle P, Goddard MR. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation[J]. Environmental Microbiology, 2018, 20(1): 75-84
- [7] Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A, Tello J, Aporta I, Vélez MD, Valero E. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 132-139
- [8] Sun Y, Qin Y, Pei YF, Wang GP, Joseph CML, Bisson LF, Liu YL. Evaluation of Chinese *Saccharomyces cerevisiae* wine strains from different geographical origins[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2017, 68(1): 73-80
- [9] Capece A, Granchi L, Guerrini S, Mangani S, Romaniello R, Vincenzini M, Romano P. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from two Italian wine-producing regions[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1018
- [10] 毛如志, 杨宽, 鲁茸定主, 陈未海. 中国葡萄酒产区: 西南产区[J]. 农业与技术, 2019, 39(12): 175-177
Mao RZ, Yang K, Lu R, Chen WH. China wine region-southwest region[J]. Agriculture and Technology, 2019, 39(12): 175-177 (in Chinese)
- [11] 谢喜麟. 中国葡萄酒产区分布及气候变化对其影响分析: 以东北产区为例[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018
Xie XL. Study on status of wine regions in China and impact of climate change on it—take north east for example[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese)
- [12] 何毅. 四川藏区干热河谷地带酿酒葡萄栽培技术[J]. 四川农业科技, 2013(6): 26-28
He Y. Cultivation techniques of wine grape in dry-hot valley of Sichuan Tibetan region[J]. Science and Technology of Sichuan Agriculture, 2013(6): 26-28 (in Chinese)
- [13] 赵悦, 孙庆扬, 杨宽, 朱怡凡, 毛如志, 邵建辉, 何霞红. 香格里拉产区特色非酿酒酵母及自然发酵葡萄酒香气成分的研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(10): 93-100
Zhao Y, Sun QY, Yang K, Zhu YF, Mao RZ, Shao JH, He XH. Characteristic non-*Saccharomyces* from Shangri-La wine producing regions and aroma components of spontaneously fermented wine[J]. China Brewing, 2018, 37(10): 93-100 (in Chinese)
- [14] 杨宽, 杨婷, 陈云德, 毛如志, 靳百慧, 赵悦, 朱有勇, 何霞红. 云南弥勒葡萄酒产区云中舞葡萄酒酵母菌多样性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2018, 33(2): 279-285
Yang K, Yang T, Chen YD, Mao RZ, Jin BH, Zhao Y, Zhu YY, He XH. Study on the biodiversity of yeasts isolated from the variety of cloud dancer grape in Mile of Yunnan province[J]. Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science, 2018, 33(2): 279-285 (in Chinese)
- [15] 史涛涛. 云南德钦产区冰葡萄自然发酵过程中酵母的动态变化以及优良酿酒酵母的筛选[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2013
Shi TT. Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation associated with ice grapes in Deqin wine region, Yunnan and screening of *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2013 (in Chinese)
- [16] 蒋丽. 川藏高原冰酒专用酵母菌株的筛选、菌剂制备与发酵工艺优化研究[D]. 成都: 西华大学硕士学位论文, 2016
Jiang L. Strain screening, preparation agents,

- optimization of fermentation process of the special yeast strain of Sichuan-Tibet plateau ice wine[D]. Chengdu: Master's Thesis of Xihua University, 2016 (in Chinese)
- [17] 周小玲, 沈微, 饶志明, 王正祥, 诸葛健. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 89-92
Zhou XL, Shen W, Rao ZM, Wang ZX, Zhuge J. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA[J]. Microbiology China, 2004, 31(4): 89-92 (in Chinese)
- [18] 裴颖芳, 王国平, 刘延琳. 赤霞珠葡萄酒自然发酵中酿酒酵母的菌株区分[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1532-1535
Pei YF, Wang GP, Liu YL. Strain typing of *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation of cabernet sauvignon wine[J]. Microbiology China, 2009, 36(10): 1532-1535 (in Chinese)
- [19] 孙悦, 张方方, 褚遂兴, 李佳幸, 邵帅, 张军翔. 接种不同嗜杀特性的酿酒酵母对赤霞珠发酵中酵母多样性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 166-172
Sun Y, Zhang FF, Chu SX, Li JX, Shao S, Zhang JX. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different killer activities on yeast diversity during inoculated fermentation of cabernet sauvignon[J]. Food Science, 2020, 41(2): 166-172 (in Chinese)
- [20] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161-177
- [21] Cavazza A, Grando MS, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini[J]. Vignevini, 1992, 9: 17-20
- [22] 杨莹, 徐艳文, 薛军侠, 刘延琳. 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
Yang Y, Xu YW, Xue JX, Liu YL. Validate the identification effect of WL nutrient agar on wine yeast[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 75-78 (in Chinese)
- [23] 王冠群. 新疆葡萄酒相关酵母菌菌群结构分析及优良株酿造干化酒的研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2018
Wang GQ. Wine yeast community and sweet wine fermented sun-dried cabernet sauvignon by indigenous strains in Xinjiang[D]. Ala'er: Master's Thesis of Tarim University, 2018 (in Chinese)
- [24] 姜蕾. 焉耆葡萄产区非酿酒酵母菌的筛选及呈香效应研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2019
Jiang L. Screening and fragrance effect of non-saccharomyces cerevisiae in Yanqi grape production area[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2019 (in Chinese)
- [25] Chalvanti I, Banilas G, Tassou C, Nisiotou A. Biogeographical regionalization of wine yeast communities in Greece and environmental drivers of species distribution at a local scale[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 705001
- [26] Zhao Y, Sun Q, Zhu S, Du F, Mao R, Liu L, Tian B, Zhu Y. Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts associated with spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon wines from Shangri-La wine region, China[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 5150
- [27] Gao FF, Chen JL, Xiao J, Cheng WD, Zheng XJ, Wang B, Shi XW. Microbial community composition on grape surface controlled by geographical factors of different wine regions in Xinjiang, China[J]. Food Research International, 2019, 122: 348-360
- [28] Sun Y, Guo JJ, Liu FB, Liu YL. Identification of indigenous yeast flora isolated from the five winegrape varieties harvested in Xiangning, China[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014, 105(3): 533-540
- [29] 谭金连, 李治滢, 周斌, 董明华, 夏红钊, 韩龙, 杨丽源, 崔晓龙, 李绍兰. 云南高原湖泊抚仙湖和星云湖的酵母菌胞外酶活性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 302-313
Tan JL, Li ZY, Zhou B, Dong MH, Xia HC, Han L, Yang LY, Cui XL, Li SL. Extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from Fuxian Lake and Xingyun Lake in Yunnan Plateau[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 302-313 (in Chinese)
- [30] 丁银霆, 魏如腾, 宋英琿, 李华, 王华. 葡萄生态系统中自然微生物群落多样性及其代谢酶系统的研究现状[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2837-2852
Ding YT, Wei RT, Song YH, Li H, Wang H. Research status of the diversity of natural microbial community and metabolic enzyme system in grape ecosystem[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2837-2852 (in Chinese)
- [31] Feng L, Wang JM, Ye DQ, Song YY, Qin Y, Liu YL. Yeast population dynamics during spontaneous fermentation of icewine and selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the winemaking in Qilian, China[J]. Journal of the Science of Food and

- Agriculture, 2020, 100(15): 5385-5394
- [32] 杨金仙, 吴成, 王春晓, 田进, 许引虎, 邱树毅. 贵州紫云刺葡萄自然发酵中野生酿酒酵母基因型多样性分析[J]. 微生物学报, 2021, 61(11): 3431-3443
- Yang JX, Wu C, Wang CX, Tian J, Xu YH, Qiu SY. Genotype diversity analysis of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentations of *Vitis davidii* Föex in Ziyun, Guizhou[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(11): 3431-3443 (in Chinese)
- [33] Masneuf-Pomarede I, Bely M, Marullo P, Albertin W. The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 6: 1563
- [34] Hu K, Jin GJ, Xu YH, Tao YS. Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Research International, 2018, 108: 119-127
- [35] Hu K, Jin GJ, Xu YH, Xue SJ, Qiao SJ, Teng YX, Tao YS. Enhancing wine ester biosynthesis in mixed *Hanseniaspora uvarum*/*Saccharomyces cerevisiae* fermentation by nitrogen nutrient addition[J]. Food Research International, 2019, 123: 559-566
- [36] 原苗苗, 赵新节, 姜凯凯, 孙玉霞, 王世平. 3 株非酿酒酵母在模拟葡萄汁中的生长特性与发酵香气[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9): 111-118, 123
- Yuan MM, Zhao XJ, Jiang KK, Sun YX, Wang SP. Growth characteristics and fermentation aroma compounds of three non-*Saccharomyces* in model synthetic medium[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(9): 111-118, 123 (in Chinese)
- [37] Borneman AR, Pretorius IS. Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex[J]. Genetics, 2015, 199(2): 281-291
- [38] 赵静静, 李艳, 张利中, 庄玉婷. Interdelta PCR 指纹图谱法区分鉴定沙城产区酿酒酵母[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 281-284
- Zhao JJ, Li Y, Zhang LZ, Zhuang YT. Interdelta PCR fingerprinting for the identification of *Saccharomyces cerevisiae* from Shacheng area[J]. Food Science, 2010, 31(23): 281-284 (in Chinese)
- [39] Liu Y, Wang C, Joseph CML, Bisson LF. Comparison of two PCR-based genetic fingerprinting methods for assessment of genetic diversity in *Saccharomyces* strains[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2014, 65(1): 109-116