

产地葡萄酒优良酵母菌株的筛选及鉴定

王 慧,张立强,刘天明,刘庆军,赵 蕊

(山东轻工业学院食品与生物工程学院,山东 济南 250353)

摘 要: 从山东、甘肃、宁夏、陕西、新疆酿酒葡萄产区采集的 99 份葡萄果粒中分离到酵母 258 株,通过抗性和发酵特性评价,筛选出 3 株发酵性能优良的菌株。经菌落特征、细胞形态、生理生化特性鉴定,结合 26S rDNA D1/D2 序列,菌株 ZYFJQ 和 QLM LZ2 被鉴定为酿酒酵母,菌株 ZYY 73-2 被鉴定为葡萄酒有孢汉逊氏酵母。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 菌株筛选; 鉴定

中图分类号:TS262.6;TS261.1 Q 93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2007)09-0029-03

Screening and Identification of Quality Yeast Strains in Grape Wine Production Area

WANG Hui,ZHANG Li-qiang,LIU Tian-ming,LIU Qing-jun and ZHAO Rui

(College of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jihua, Shandong 250353, China)

Abstract: 258 yeast strains were isolated from the surface of 99 grape samples collected from grape wine production area including Shandong, Gansu, Shanxi, Ningxia and Xinjiang. 3 quality yeast strains of excellent fermenting performance were screened out by the evaluation of their tolerance and fermenting properties. Strains ZYFJQ and QLM LZ were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and strain ZYY 73-2 identified as *Hanseniaspora uvarum* by the analysis of their morphological and physiological characteristics and their 26S rDNA D1/D2 sequence.

Key words: microbes; *saccharomyces cerevisiae*; screening of strains; identification

在传统的葡萄和葡萄酒产区,酵母菌逐渐适应了当地的气候、土壤和葡萄品种,再加上自然选择的作用,形成了适应当地葡萄酒的菌系。所以,传统葡萄园酿出的美酒,具有很强的甚至独一无二的地方特性。优良酵母菌株的获取有两种途径,一是从外引入酵母,二是从天然酵母中选育。引入酵母由于葡萄品种、栽培及工艺条件等的变化,在当地葡萄酒生产上并不一定能完全表现出其优良性状,或不能完全体现产地葡萄酒的品质和特色^[1]。宁夏贺兰山、甘肃武威、山东胶东半岛、新疆吐鲁番等地是中国葡萄栽培的最适生态区,也是酿酒葡萄原料和葡萄酒的主要生产基地,可能存在与地方优质名牌葡萄酒的品种形成相关的天然优良酵母菌株。基于此,我们对甘肃、宁夏、山东、陕西、新疆的主要酿酒葡萄产地的野生酵母资源进行了系统的收集,通过耐性实验及酒精模拟发酵实验,从中筛选出了 3 株优良的酵母菌株,并通过分子鉴定(26S rDNA D1/D2 序列)^[2]、形态、生理生化特征对其进行分类。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

于 2006 年 8~10 月从新疆吐鲁番、石河子、甘肃武威黄羊河、宁夏贺兰山东麓、陕北延安、榆林以及山东烟台酿酒葡萄产区采集成熟的葡萄果粒或压榨汁。样品运抵实验室后,立即分离酵母菌。

1.1.2 培养基

筛选培养基:葡萄糖 5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%,酵母膏 0.05%,灭菌后加亚硫酸钠至 30 mg/L。

分离和保藏培养基:(YEPD 培养基)酵母膏 1%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%,琼脂 2%。麦芽汁培养基:自制。

酵母菌生理生化实验培养基^[3]。

发酵培养基^[4]:蔗糖 20%,酵母膏 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%。

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(编号:Y2005D15)。

收稿日期:2007-08-06

作者简介:王慧,女,山东济南人,硕士研究生,研究方向:工业微生物优良菌株的选育。

通讯作者:刘天明,教授,硕士研究生导师。

1.2 方法

1.2.1 酵母的富集培养及分离

称取葡萄果皮 1.0 g, 加入 50 mL 灭菌的液体富集培养基 (加 30 mg/L 亚硫酸钠), 25 ℃ 摇床培养 48 h。将富集液用生理盐水进行不同梯度稀释后涂布于分离纯化平板上, 25 ℃ 培养 48 h 转接并经多次划线纯化, 获得纯化菌株。纯化菌株保藏于试管斜面或甘油管中, 备用。

1.2.2 优良菌株的筛选实验

1.2.2.1 杜氏管发酵实验

麦芽汁发酵法: 将活化传代的酵母菌接入带有杜氏管的麦芽汁 (10°Brix) 培养基中, 25 ℃ 培养 48 h, 初筛出产气好的酵母菌株。接种量为 1.0×10^7 cfu/mL。

1.2.2.2 酵母菌的耐性实验^[5]

分别采用不同的乙醇浓度 (6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%)、二氧化硫浓度 (100 mg/L、200 mg/L、250 mg/L、300 mg/L、350 mg/L、400 mg/L)、pH (1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0)、温度 (37 ℃、45 ℃) 以及糖浓度 (10%、20%、30%、40%、50%、60%) 的带有杜氏管的 YPD 培养基中, 25 ℃ 培养 3 d, 选择产气好的菌株。接种量为 1.0×10^7 cfu/mL。

1.2.3 优良菌株的发酵筛选实验

将初筛得到的耐性较好的酵母菌株以 5% 的接种量接入发酵培养基, 28 ℃ 静止发酵 (以发酵液重量不再下降时为发酵终点)。

检测方法^[6-7]: 发酵力采用 CO₂ 失重法; 酒精度 (以体积百分数计, % vol) 采用比重法; 残还原糖 (g/L) 采用费林法; 酸度 (以酒石酸 g/L 计) 采用滴定法; 感官评定项目包括外观、香味和酒的风格等。

1.2.4 选育酵母的鉴定

常规鉴定: 将试验菌株活化 3~4 代, 镜检合格后, 根据酵母菌分类学研究标准方法对供试菌株进行形态学观察及生理生化检测^[8]。

分子鉴定: 26 S rDNA D1D2 序列分析法。采用玻璃珠法^[9]提取基因组总 DNA, PCR 扩增: 正向引物 NL1 (5'-GCA TAT CGG TAA GCG GAG GAA AAG-3'), 反向引物 NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'), PCR 扩增程序: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min; 53 ℃ 8 min; 72 ℃ 1 min (20 s) 共 36 个循环; 72 ℃ 10 min。然后电泳和 EB 染色检测目标产物有无及效果。所得 PCR 产物送交北京华大基因公司测序。

2 结果与分析

2.1 酵母菌株的分离

从山东、甘肃、宁夏、新疆酿酒葡萄产区收集葡萄果粒 99 份, 经过富集培养和划线分离, 镜检共分离得到酵母 258 株。

2.2 优良菌株的筛选

2.2.1 杜氏管发酵实验

对分离得到的 258 株酵母菌进行杜氏管产气实验, 结果显示, 在 48 h 内充满气体的有 68 株。进一步进行菌株耐性实验。

2.2.2 耐性实验

对供试菌株进行不同浓度的酒精、SO₂、NaCl、酸碱度及不同温度的耐性实验。68 株中能耐 14% 酒精的有 22 株, 其中 9 株可耐受 16% 的酒精度。进一步的耐 SO₂ 筛选实验表明, 这 9 株酵母菌均可耐受 200 mg/L 的 SO₂, 4 株甚至可耐 400 mg/L。耐酸实验显示, 9 株酵母菌均可耐受 pH 2.0 的酸度, 有 2 株能耐受 pH 1.0 的酸度环境。葡萄酒生产过程的 pH 范围在 3.0~4.0, 所以这 9 株酵母菌均适宜葡萄酒酵母耐酸性较强的要求。综上所述, 4 株供试菌株总体耐性较好, 分别命名为 ZYFJQ、ZYY73-2、QLMLZ 和 ZYBSBD2, 并以此菌株为出发株完成后续模拟发酵。

2.3 优良菌株的发酵实验

几株优良菌株的发酵实验结果见表 1。

由表 1 可知, 在 20% 的葡萄糖发酵液中, 与所有供试菌株相比, 菌株 QLM LZ 和 ZYFJQ 的酒精产率最高, 分别为 8.8% vol 和 7.9% vol; 还原糖残留量低, 分别为 0.4 g/L 和 0.5 g/L; 发酵力高, 72 h 内 CO₂ 的失重量分别为 18.5 g 和 19.9 g。同时, 结合感官评定结果, 这 2 株菌发酵后的香气纯正、香味浓郁, 酒质醇厚。菌株 ZYY73-2 酒精产率虽较低, 为 5.0% vol, 但发酵过程中香味突出, 故而作为后续的实验菌株。

2.4 选育优良酵母的鉴定

2.4.1 菌株的形态和培养特征

表 2 列出了 3 株菌株的形态和培养特征。

2.4.2 生理生化鉴定结果

几株优良菌株的生理生化特征结果见表 3。

表 3 表明, 基于形态与培养特征、发酵糖、同化碳源、同化氮源、50% 和 60% 葡萄糖酵母膏中生长、37 ℃ 生长以及抗放线菌酮等试验结果。综合 3 个菌株的形态特征 (表 2)、部分生理生化特性 (表 3) 和 26 S rDNA D1D2 序列 (表 4) 鉴定结果, 参照《The Yeasts: A Taxonomic Study》第三版以及分子鉴定的结果, ZYFJQ 和 QLM LZ 酵母菌均被鉴定为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*); 菌株 ZYY73-2 为葡萄酒有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*)。

表 1 发酵实验结果

项目	菌株			
	ZYFJQ	ZYY73-2	QLMLZ	ZYBSBD2
乙醇体积分数 (%)	7.9±0.2	5.0±0.1	8.8±0.4	4.0±0.2
总酸 (g/L)	4.75±0.20	4.50±0.15	4.75±0.20	5.50±0.10
挥发酸 (g/L)	0.612±0.012	0.294±0.008	0.306±0.006	0.405±0.005
72 h 时 CO ₂ 失重 (g)	19.9±0.2	8.9±0.6	18.5±0.1	8.7±0.2
残还原糖 (g/L)	0.34±0.05	0.45±0.11	0.40±0.08	0.50±0.10

表2 形态和培养特征

菌株	ZYFJQ	ZYY73-2	QLMLZ
颜色	乳白色	灰白色	乳白色
质地	粘稠	粘稠	粘稠
表面	光滑暗淡	光滑暗淡	光滑
边缘	整齐	平滑透明	平滑暗淡
液体培养液	澄清	澄清	澄清
沉淀物	白色	白色	白色
特征	无	有菌璞	无
细胞形状	椭圆形腊肠形	卵圆形椭圆形	椭圆形
繁殖方式	裂殖, 2~4 个子囊孢子	芽殖	一端出芽

表3 3株优良酵母菌生理生化鉴定及抗性实验结果

鉴定项目	菌株编号		
	ZYFJQ	ZYY73-2	QLMLZ
碳源同化(16种)			
蔗糖	w	+	+
麦芽糖	+	—	—
海藻糖	+	—	+
乳糖	—	—	—
棉子糖	—	—	—
D-木糖	—	—	—
D-核糖	—	—	—
L-鼠李糖	—	—	—
半乳糖	—	—	—
L-山梨糖	—	—	—
可溶性淀粉	—	—	+
肌醇	—	—	—
D-山梨醇	—	—	—
柠檬酸	+	+	+
氮源同化(2种)	+	—	—
同化 KNO ₃ 实验	—	—	—
同化硫酸铵	+	+	+
发酵糖实验(6种)			
葡萄糖	+	+	+
麦芽糖	+	+	+
乳糖	—	—	—
半乳糖	+	+	+
蔗糖	+	+	+
棉子糖	+	—	+
其他			
无维生素生长	+	+	+
放线菌酮抗性(100 mg/L)	—	+	—
尿素酶实验	—	—	—
产淀粉实验	—	—	—
耐温 45℃	+	+	+
耐高糖 60%	+	+	+
耐酸(pH 1.5)	+	+	+
耐渗试验 16%	+	+	+
耐酒精 16%vol	+	—	+
耐酒精 18%vol	+	—	+
耐酒精 20%vol	+	—	—
耐 SO ₂ (200 mg/L)	+	+	+
耐 SO ₂ (400 mg/L)	+	+	+

表4 酵母菌株 26S rDNA D1/D2 序列鉴定结果

菌株	菌属	与模式菌株同源性 (模式菌株)
ZYFJQ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99% (U44806)
ZYY73-2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99% (U84229)
QLMLZ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99% (U44806)

3 讨论

3.1 从葡萄果粒分离的酵母菌采用分子鉴定为主,再结合形态、生理生化鉴定的结果,使得鉴定结果更加准确、可靠。

3.2 本研究的生理生化鉴定结果与分子鉴定结果稍微有一些出入,分析原因可能为:实验操作有不足之处,使鉴定结果出现偏差。例如:碳源同化试验和氮源同化试验中,我们对标准鉴定方法有所改进,采用了固体生长谱法,即在 YEPD 培养基上涂布供试碳源或氮源,接种供试菌后在 28℃ 培养 2~3 d,通过观察菌落生长情况的方法来确定供试菌株能否同化被测碳源或氮源。这一方法能大量减少劳动量,节约试剂,但是存在一定不足。首先,在涂布时,有可能涂布不均,造成局部浓度过高或过低,进而影响酵母菌的生长,从而影响了鉴定结果的准确性。其次,这一方法的试验结果没有液体生长谱法明显直观。采用这一方法在对鉴定结果的统计上,由于存在主观判断的差异可能对某些结果的判断出现偏差。另外,供试菌株可能由于生存环境的不同而与模式菌株确有差异。进一步证实后,可以确定部分供试菌为模式菌的变种,这表明,葡萄果粒有丰富的野生酵母菌。

3.3 初步研究表明,菌株 ZYFJQ 和 QLM LZ 性能稳定,发酵力强。其中,汉逊酵母属菌株 ZYY 73-2 在发酵过程中高产乙酸乙酯,从而增加了产品的香味,可用于酿酒和食品工业。对筛选出的 3 株优良菌株的葡萄酒酿造试验正在进行之中,以期筛选、分离获得更优异的菌株。

参考文献:

- [1] 冯作山.优良葡萄酒酵母的选育及发酵性能研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2000.
- [2] Jack W. Fell, Teun Boekhout, A lvaro Fonseca. Biodiversity and system atics of basidiom ycetous yeasts as determ ined by large-subunit rDNA D1/D2 dom ain sequence analysis[J]. International Journal of System atic and Evolutionary M icrobiology, 2000,50: 1351- 1371.
- [3] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [4] Christian A. Lopes, M arã E R, Am paro Q. Relationship between m olecular and enological features of Patagonian wine yeasts: relevance in selection protocols[J]. W orld Journal of M icrobiology & B iotechnology, 2006,22: 827- 833.
- [5] 赵祥杰,涂国全.一株桑椹果酒酵母的分离筛选及耐性测定[J].酿酒科技,2007,(1):28-32.
- [6] 吴国峰,李国全,马永强,等.工业发酵分析[M].北京:化学工

(下转第 34 页)

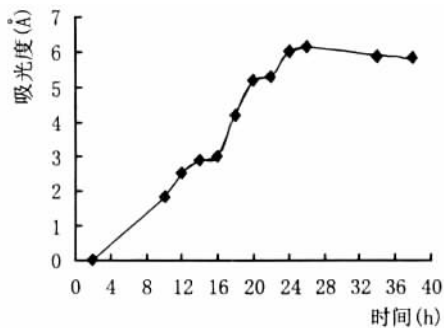


图 1 不同的培养时间下菌株 S2.101 的生长情况

由图 1 可看出,在培养时间为 0~28 h 内,随着培养时间的延长,菌体密度逐渐增大,当培养时间为 28 h 时,菌株密度达到最大值,吸光度达到 6.30;在 28~38 h 内菌体密度随培养时间的延长而逐渐降低,但下降幅度不大,吸光度仅下降了 0.45,这表明, S2.101 菌株最适宜的培养时间为 28 h。

2.5 温度对 S2.101 生长的影响(图 2)

温度的高低影响微生物的生长、繁殖和新陈代谢,过高的温度会导致蛋白质或核酸的变性失活,而过低的温度会使酶活力受到抑制,细胞的新陈代谢活力减弱^[4]。

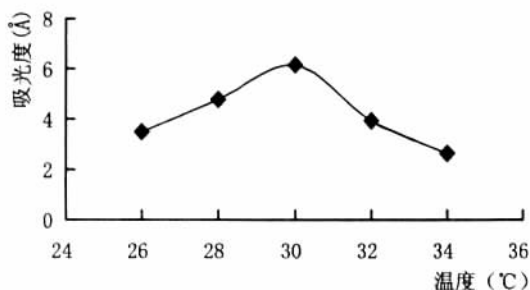


图 2 温度对菌株 S2.101 生长的影响

由图 2 可看出,温度在 26~30 °C 内,随着培养温度的升高,菌体密度逐渐增大,当温度为 30 °C 时,菌体密度达到最大值,温度超过 30 °C 后,随着温度的升高菌体密度逐渐降低。表明适宜的温度有利于菌株的生长, S2.101 酵母菌株的最适生长温度为 30 °C。

2.6 pH 值对 S2.101 生长的影响

pH 值对菌株 S2.101 生长的影响结果见图 3。

最适生长 pH 值是指细胞在最高生长率所需的 pH 值,在此 pH 值下能获得最大的细胞量,并且细胞生长过程中所需的有关酶的活性也最高。由图 3 可看出,菌株在 pH 值为 4.0~9.0 之间均能生长,在 pH 值为

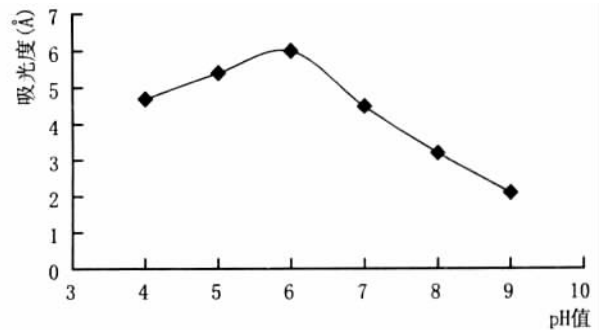


图 3 pH 值对菌株 S2.101 生长的影响

4.0~6.0 之间均能较好地生长,当 pH 值为 6.0 时,菌体密度达到最大值, pH 值大于 6.0 时对菌株生长有较强的抑制作用,由此得出,菌株 S2.101 生长最适宜的 pH 值为 6.0。

3 结论与讨论

3.1 实验证明, S2.101 酿酒酵母对高粱和小麦糖化液的发酵力最强,发酵 7 d 时,发酵力分别为 3.179 g/50 mL 和 3.034 g/50 mL,对玉米和大米糖化液也有较强的发酵力,7 d 的发酵力分别为 2.703 g/50 mL 和 2.763 g/50 mL,并且对 4 种主要酿酒原料的糖化液,其发酵力均是随着发酵时间的延长而逐渐增加,发酵液糖度随发酵时间的延长而逐渐降低,因此 S2.101 不失为一株适合白酒窖内缓慢发酵和适应性广的优良酿酒酵母菌株。

3.2 在液体酵母合成培养基中添加 50% 的麸皮培养基制成的混合培养基,不仅有利于酵母菌的生长,而且能够大大地降低培养酵母菌液的成本。

3.3 S2.101 优良酵母菌株的最佳生长时间为 28 h,最适生长温度为 30 °C,最适生长 pH 值为 6.0。

3.4 通过对 S2.101 优良酿酒酵母菌株的最适生长条件研究,为 S2.101 酵母菌液的生产 and 在酿酒生产上的推广应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 任道群,唐玉明,姚万春,等.高蛋白酵母菌株 S4.107 生长特性研究[J].酿酒,2006,(5):50-52.
- [2] 方敦煌,赵玉虎,沐应祥,等.拮抗菌株 GP13 的基本生物学特性研究[J].西南农业大学学报,2002,(5):406-408.
- [3] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [4] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2005.

(上接第 31 页)

业出版社,2006.

[7] 章银良.食品检验教程[M].北京:化学工业出版社,2006.

[8] 李剑芳,张灏.发酵猕猴桃汁中产香酵母的分离、鉴定及生长

特性的研究[J].食品科学,2001,9(22):19-23.

[9] 颜子颖,王海林译.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,1998.