

赤霞珠相关酵母菌的分离及其分子生物学鉴定

焦红茹, 刘树文, 祖显生, 常亚维

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 利用 WL 营养培养基对分离自昌黎地区赤霞珠葡萄品种的 114 株酵母菌进行了聚类分析, 共得到 5 个培养类型, 并采用 5.8 SrDNA- ITS 区域 RFLP 分析对从 5 个培养类型中选出的 27 株酵母菌进行了分子生物学鉴定, 结果获得了 4 种不同的酶切图谱。17 株被鉴定为 *Hanseniaspora uvarum*, 6 株被鉴定为 *Saccharomyces cerevisiae*, 并对其余 4 株也进行 5.8 SrDNA- ITS 区域 RFLP 分析。

关键词: 微生物; 赤霞珠; 酵母菌; 分子生物学鉴定; 5.8 SrDNA- ITS; RFLP

中图分类号: TS261.1; Q93- 3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001- 9286(2007) 12- 0017- 04

Isolation and Molecular Biology Identification of Yeasts Related to Cabernet Sauvignon

JIAO Hong-ru, LIU Shu-wen, ZU Xian-sheng and CHANG Ya-wei

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: 114 yeast strains of Cabernet Sauvignon from Changli region were under cluster analysis by the use of WL nutrient culture medium and 5 culture types in total were obtained. 27 strains were selected from the above five types for molecular biology identification with the amplify of the 5.8SrDNA-ITS region by PCR (analyzing restriction fragment length polymorphisms of the region) and four different restriction patterns were found. As a result, 17 strains were identified as *Hanseniaspora uvarum*, 6 strains were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and the other 4 strains were also identified with the same method.

Key words: microbe; Cabernet Sauvignon; yeast; molecular biology identification; 5.8 SrDNA-ITS; RFLP

酵母与人类生活关系密切, 几千年前人类就开始利用酵母生产发酵食品和酒类饮料, 而酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 是葡萄酒发酵工业中占主导地位的微生物, 它的特性不仅直接影响着葡萄酒的产量、质量和经济性, 还对葡萄酒特色风味的形成至关重要。赤霞珠(Cabernet Sauvignon)是古老的优良酿酒红葡萄品种, 在全世界广为种植。传统的酵母菌鉴定主要依据其形态特征和生理特征, 但这些特征容易受到培养条件等的影响而出现不确定的结果^[1], 一般情况下要对一株酵母进行鉴定到种, 要做 100 多个实验, 不仅工作量大而且耗费时间^[1], 近年来应用分子生物学技术鉴定酵母菌种得到了迅速发展, 其中酵母细胞的核糖体 5.8 Sr RNA 基因及两侧的转录间隔区(ITS)具有显著的种间差异性, 可以作为鉴别酵母菌种的分类依据^[2-3]。1999 年, Esteve

Zarzoso 等人利用该 DNA 区域具有显著的种间差异性的特点并结合菌落 PCR 和 RFLP 技术第一次建立了基于 5.8 SrDNA- ITS 的 RFLP 分析快速鉴定酵母菌种的数据库(<http://www.yeast-id.com/>), 包含了 25 个属的 132 种不同的酵母^[4], 此后, 该数据库每年又得到不断补充。

本文对分离自昌黎地区赤霞珠酿酒葡萄品种的 27 株酵母菌进行了 5.8 SITS 区 RFLP 分析, 其中 17 株鉴定为 *Hanseniaspora uvarum*, 6 株鉴定为 *Saccharomyces cerevisiae*。其余 4 株也进行了 5.8 SITS 区 RFLP 分析, 但对其还需要进一步进行鉴定。并发现 *Hanseniaspora uvarum* 为赤霞珠葡萄品种的优势酵母种群。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目: 陕西省农业科技攻关项目, 项目编号: 2005K02- G02。

收稿日期: 2007- 08- 27

作者简介: 焦红茹(1982-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 酿酒微生物。

通讯作者: 刘树文, 男, 副教授, 主要从事酿酒微生物研究, E- mail: liushuwen@nwsuaf.edu.cn。

1.1.1 菌株

分离于昌黎地区华夏长城葡萄酒酿酒基地赤霞珠葡萄园,共分离酵母菌株 114 株,编号为 L1- L5、P1- P7、F₁ 1- 29、F₂ 1- 44 和 F₃ 1- 29。

1.1.2 分离用培养基

采用 YEPD 培养基,其成分为:葡萄糖 20.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,酵母浸粉 10.0 g/L,琼脂 20.0 g/L,其中加入 100 mg/L 氯霉素为抑制细菌生长。

酵母菌株的初步形态分类用 WL 营养培养基^[7]。

1.1.3 主要试剂

引物 ITS1/ITS4 由上海生物工程技术服务有限公司合成,Taq 酶购自 Fermentas(MBI)。

限制性内切酶 HinfI、HaeII 购自 Fermentas(MBI)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离

酵母菌从赤霞珠葡萄果皮,自然发酵过程及赤霞珠葡萄园土壤中分离得到。方法分别为取葡萄果实 20 粒于 YEPD 液体培养基中,培养 1 d 后,取培养液 100 μL 涂布接种于固体 YEPD 培养基上;取适量葡萄醪于无菌三角瓶中进行自然发酵,在发酵前中后期分别取样,采用稀释梯度涂布法接种于固体 YEPD 培养基上;取葡萄园土壤 1 g,用无菌水梯度稀释后,涂布接种于固体 YEPD 上,以上均在 28℃ 下培养 3 d,然后根据菌落颜色及形态,每平板选择 15~20 个单菌落用甘油管保存。

1.2.2 菌株的 WL 培养基聚类分析

将保藏的酵母菌株用液体 YEPD 培养基活化后,划线接种于 WL 培养基上,28℃ 培养 5~7 d 后,观察记录菌落的颜色和形态,并根据菌落的颜色和形态进行聚类。

1.2.3 酵母菌菌株的 DNA 提取

采用周小玲等人所用的石英砂破壁法提取酵母菌 DNA^[9]。

1.2.4 菌株的 5.8S- ITS 区的 PCR 扩增

引物 ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'), ITS4(5'- TCCTCCGCTTAT TGATATGC- 3') 反应体系见文献[6]。

1.2.5 扩增产物的限制性内切酶消化

PCR 扩增产物分别用限制性内切酶 HinfI、HaeII 消化,酶切反应体系为 20 μL,PCR 产物 8 μL,Buffer 2 μL,内切酶 1 μL,双蒸水 7 μL,在 37℃ 温育 3 h;3% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 菌株的 WL 营养培养基聚类分析

WL 营养培养基是被设计用来检测饮料发酵过程

中的微生物类群的。Cavazza 等研究表明,在葡萄酒自然发酵过程中出现的大多数典型的酵母菌种都可以用 WL 营养培养基进行区分,主要基于菌落颜色及菌落形态^[7]。把采集于昌黎地区赤霞珠葡萄品种的 114 株酵母菌用 WL 营养培养基进行培养,根据其菌落颜色及形态将其聚为 5 类,分类见下表 1。

表1 昌黎华夏葡萄酒厂赤霞珠葡萄品种相关酵母菌株WL营养培养基聚类结果

培养类型	菌落颜色及形态	菌株
I	奶油色带绿色,球状凸起,表面光滑,不透明,奶油状	L1-5、F ₂ -2、27、43 , F ₃ -1、2、23、18、27
II	灰绿色带蓝顶,表面平坦,具褶皱,粉状	F ₁ -1、3、4、7、9-17、20-22、25、F ₂ -3-16、18-22、24-26、28、30、32-37、39、40-44、F ₃ -3-6、8-11、14、16-20、22-29
III	深绿色,扁平,光滑不透明,黄油状	F ₂ -1、23、29、38、P-1、7
IV	蓝灰色,球形凸起,表面光滑,粘稠,不透明	F ₂ -31
V	红色,球形凸起,凸面,表面光滑,粘稠,不透明	P-2-6

注:表1中L代表土壤,以L开头的酵母菌株采集自当地的土壤中,P代表果皮表面,F代表自然发酵,1、2、3分别代表前中后期。

2.2 PCR 扩增,酶切及菌种鉴定结果

经 WL 营养培养基将采集到的酵母菌株聚为以上 5 类,在第 I 类中取菌株 L- 1、3, F₂- 2、27, F₃- 2、18、23、27;在第 II 类中取菌株 F₁- 12、20、21、22, F₂- 19、36、40, F₃- 5、15、21、25、29;在第 III 类中取菌株 P- 1、7, F₂- 29、38;在第 IV 类中取菌株 F₂- 31;在第 V 类取菌株 P- 3、6,分别对其进行 5.8 SrDNA- ITS 区域的 PFLP 分析。对选出的菌株进行编号,编号顺序为: 1, 2, 11, 12, 23, 30, 24, 31, 9, 7, 8, 10, 18, 17, 13, 25, 28, 29, 26, 27, 3, 4, 20, 21, 22, 5, 6(选取菌株时尽可能在每个采样源、每个阶段选取)。

2.2.1 PCR 法扩增菌株 5.8 SrDNA- ITS 区域

用引物 ITS1 和 ITS4 扩增以上挑选出来的 27 株酵母菌的 5.8 SrDNA- ITS 区域,PCR 结果见图 1 和图 2。编号为 1, 2, 11, 12, 22, 23 的菌株的 PCR 产物长度为 880 bp, 与数据库中 *Saccharomyces cerevisiae* 区域的 PCR 产物长度描述完全一致,而 22 号菌株从 WL 营养培养基上看,菌落形态属于 I 组。7~10, 13, 17, 18, 20, 21, 24~31, 这 17 株菌株的 PCR 产物长度为 750 bp, 与数据库中 *Hanseniaspora uvarum* 的 PCR 产物长度一致,而 20, 21 从 WL 培养基上看属于 III 类,24, 31, 30 从 WL 培养基看归为 I 类。3, 4 这两株的 PCR 长度为

600 bp, 5, 6 这两株的 PCR 长度为 500 bp。各菌株的 5.8 SrDNA- ITS 区域 PCR 产物长度见表 2。

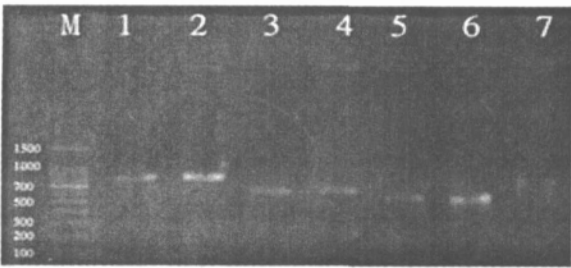


图 1 酵母菌 5.8 SITS 区域的 PCR 产物长度(单位 bp)

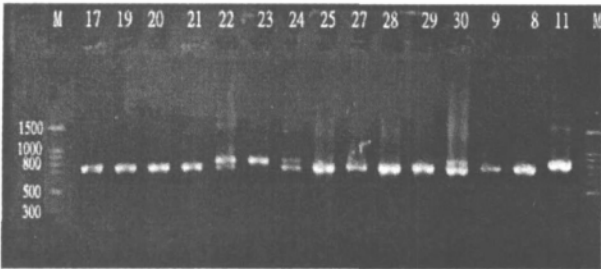


图 2 酵母菌 5.8 SITS 区域的 PCR 产物长度(单位 bp)

2.2.2 限制性酶切片段长度多态性分析(RFLP)

对以上 27 株酵母的 5.8 SrDNA- ITS 区域 PCR 产物分别经过限制性内切酶 HaeIII 和 HinfI 酶切后的电泳图谱见图 3 和图 4。

HinfI 酶切结果见图 3。1, 2, 11, 12, 22, 23 菌株经 HinfI 酶切后, 酶切片段大小均为 365 bp 和 155 bp。7~10, 13, 17, 18, 20, 21, 24~31 这 17 株菌都被切为相同的 3 个片段, 大小分别为 350 bp、200 bp 和 180 bp, 在这 17 条图谱中均可隐约看到一条大约 70 bp 的条带, 由于小于(包括) 70 bp 的片段在琼脂糖凝胶电泳体系中很难看到, 故数据库中不包含含有 70 bp 及以下的酶切片段, 在此也做相同处理。以上均与库中相关信息一致。分别定名为 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Hanseniaspora uvarum*。3 和 4, 5 和 6, 分别具有相同的 HinfI 酶切图谱, 酶切片段大小分别为: 280 bp+170 bp; 300 bp +160 bp, 但在现有的数据库中未找到完全一致的图谱信息。

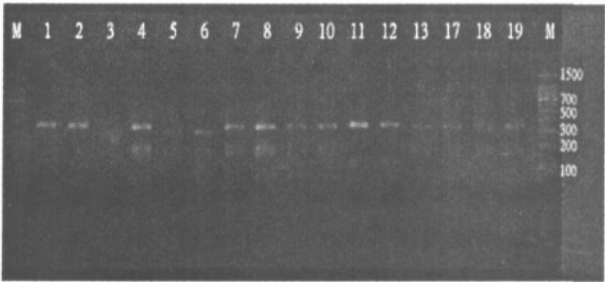


图 3 HinfI 酶切图谱

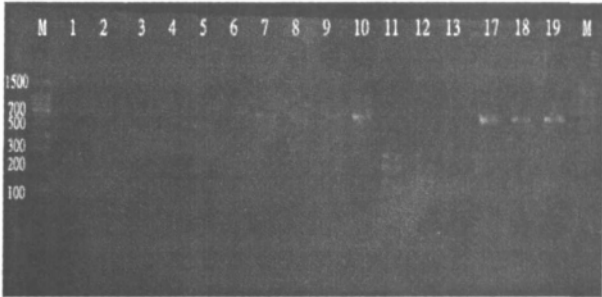


图 4 HaeIII 酶切图谱

HaeIII 酶切结果见图 4。1, 2, 11, 12, 22, 23 菌株的 HaeIII 酶切图谱完全一致, 有 4 个酶切片段, 大小分别为 320 bp、230 bp、180 bp 和 150 bp。7~10, 13, 17, 18, 20, 21, 24~31 这 17 株菌均为一条带, 长度为 750 bp, 以上均符合数据库中的信息。3 和 4, 5 和 6, 也分别有着相同的 HaeIII 酶切图谱, 为 600 bp 和 500 bp。在数据库中与相关信息完全一致。两种内切酶的具体结果见表 2。

2.2.3 菌株鉴定结果

27 株酵母菌的 5.8 SrDNA- ITS 区域的 PCR 扩增产物长度及两种限制性内切酶的 RFLP 图谱清晰, 特异性强, 重复性好, 与数据库中相关酵母菌的大多数信息一致, 并且操作简单, 适合于酵母菌的快速鉴定。以上 27 株酵母的鉴定结果见表 2。1, 2, 11, 12, 22, 23 这 6 株酵母菌的 PCR 产物长度及两种酶切多态性都与数据库中描述的 *Saccharomyces cerevisiae* 的信息完全一致, 因此可以鉴定为 *Saccharomyces cerevisiae*。7~10, 13, 17, 18, 20, 21, 24~31 这 17 株的扩增产物长度和 RFLP 多态性符合数据库中 *Hanseniaspora uvarum* 的相关信息, 因此

表2 酵母菌株PCR产物和限制性酶切片段长度

酵母菌株	PCR 产物长度 (bp)	限制性酶切片段 (bp)		种类	模式菌株
		HinfI	HaeIII		
1, 2, 11, 12, 22, 23	880	365+155	320+230+180+150	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1942 [†] , 1971
7~10, 13, 17, 18, 20, 21, 24~31	750	350+200+180	750	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	11027, 11029 [†]
3, 4	600	280+170	600	<i>Sporobolomycesreus</i> / <i>Cryptococcus laurentii</i>	1930/1095
5, 6	500	300+160	500	未知	

注: 小于 70 bp 的片段在琼脂糖凝胶电泳体系中不可见, 故此表中不包括。

鉴定为 *Hanseniaspora uvarum*。3, 4 两株酵母菌的 PCR 产物长度和 *HaeIII* 酶切结果和数据库中相关信息一致, 但是 *HinfI* 酶切结果为 280+170 (bp), 与 *Sporobolomyces* 和 *Cryptococcus laurentii* 描述的信息接近, 因此对 3 和 4 这两株酵母菌还需要进行其他种类酶的 RFLP 分析, 才能做出准确的鉴定。5 和 6 两株酵母菌的 PCR 产物长度和 *HaeIII* 酶切结果与数据库中相关信息吻合, 但是, *HinfI* 的酶切结果在数据库中未找到相近的数据, 所以这两株菌需要采取其他方法将其鉴定到种。根据以上的酶切结果及参考文献资料报道, *HaeIII* 和 *HinfI* 这两种酶的多态性相同, 在 *CfoI* 的酶切图谱上没有差异, 因此没有进行 *CfoI* 的酶切。

3 讨论

在真菌的鉴定方面, 传统方法主要依据形态学、生理学实验和生物生化特征来进行酵母菌的鉴定和分类。随着分子生物学技术的迅速发展, 用来快速鉴定酵母菌的方法日益增多, 但大多数使用在临床上。1999 年, Esteve-Zarzoso 等人首次建立了基于酵母核糖体 5.8 SrDNA-ITS 区域的 RFLP 快速鉴定酵母菌种的数据库, 并对 132 株酵母菌进行了鉴定, 结果表明, 132 株酵母菌属于 25 个不同的属, 其中包括 teleomorphic, anamorphic ascomycetous, basidiomycetous。在大多数情况下, PCR 产物的大小和通过这 3 种核酸内切酶 *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI* 酶切后获得的酶切片段就可以得到每一个种所特有的多态性^[9]。对分离自赤霞珠葡萄品种的 27 株酵母菌进行研究, 结果表明, 1, 2, 11, 12, 22, 23 这 6 株酵母菌株的 5.8 SrDNA-ITS 区域的 PCR 产物及其两种限制酶的 RFLP 都与模式菌株 1942^T, 1971 完全一致, 属于 *Saccharomyces cerevisiae*。7~10, 13, 17, 18, 20, 21, 24~31, 这 17 株酵母菌的 5.8 SrDNA-ITS 区域的 PCR 产物及其两种限制酶的 RFLP 与数据库中 *Hanseniaspora uvarum* 的表述完全一致。此方法操作简便, 通过检索数据库相关信息就可将酵母菌快速鉴定到种。但是, 菌株 3, 4 的 PCR 产物长度和 *HaeIII* 酶切结果与数据库中 *Sporobolomyces* 和 *Cryptococcus laurentii* 完全一致, 但酶 *HinfI* 的结果与两者都不同, 且相近, 这可能是因为一些误差造成的, 比如说电泳时的电压不稳等造成的, 因此需要再进行其他酶切, 才能鉴定到具体的种。而 5, 6 这两株虽然在 PCR 产物和 *HaeIII* 酶切结果上可以与数据库系相关信息对应上, 但是 *HinfI* 的酶切结果与数据库中相关信息相差甚远, 因此需要考虑其他方法进行鉴定。为了区分近缘菌种, 有人对一些酵母进行了多达 9 种限制性内切酶的 RFLP 分析, 这 9 种内切酶的

酶切片段多态性分析可以将绝大多数的酵母菌中区分开来^[9]。

从以上的鉴定结果可以看出, *Hanseniaspora uvarum* 为赤霞珠葡萄品种酵母菌的优势种群, 且这些菌株分离自自然发酵过程中。并且在自然发酵后期和土壤中分离到了 *Saccharomyces cerevisiae*。

26 SrDNA D1/D2 区序列分析和 5.8 SrDNA-ITS 区域的 PCR-RFLP 分析是目前酵母分子生物学鉴定最强有力的两种手段, 但两者都不是绝对正确的, 都有各自的优势和不足, 已发现含有相同 D1/D2 序列的酵母因其 ITS 序列的不同而分属不同的种^[10], 反之, ITS 序列相同的酵母也不一定属于同一个种, 但如果将两者结合起来就能大大提高酵母菌种鉴定的准确性。

参考文献:

- [1] Jose Manuel Guillamon, Josepa Sabate, Eladio Barrio[J]. Arch microbial, 1998, 169: 387- 392.
- [2] SADAON, MASAHIKO T, SHIGEKI D. Analysis of pressure sensitive adhesives by GC/MS and GC/AED with temperature programmable pyrolyzer[J]. Analytical Sciences, 2000, 16: 627- 631.
- [3] 柘植新, 大谷肇. 高分辨裂解色谱原理与高分子裂解谱图集[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993.
- [4] ESTEVE-ZARZOSO B, BELLOCH C, URUBURU F, et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 SrRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49: 329- 337.
- [5] 周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31: 89- 92.
- [6] M. Teresa Fernandez-Espinar, Braulio Esteve-Zarzoso. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8SrRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts[J]. Antonie van Leeuwenhoek 2000, 78: 87- 97.
- [7] Cavazza A, Grando MS, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mostie vini[J]. Vignevini, 1992, (9): 17- 20.
- [8] WATANABE C, SATO K, HOSAKA A, et al. Development of a multifunctional pyrolysis-GC of polymeric material[J]. American Laboratory, 2001, 33(21): 14.
- [9] JAMES S A, COLLINS M D, ROBERTS I N. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 189- 194.
- [10] SCORZETTI G, FELL JW, FONSECA A, et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: A comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions[J]. FEMS Yeast Res, 2002, (2): 495- 517.