

新疆慕萨莱思自然发酵过程中酵母菌表型多样性及优势菌分析

朱丽霞^{1,2}, 李红梅², 郭东起², 侯旭杰^{1,2}, 龚明福¹

(1.塔里木盆地生物资源保护和利用兵团重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆 阿拉尔 843300;

2.新疆特色农畜产品加工重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:目的: 研究新疆慕萨莱思自然发酵过程中酵母菌种群表型多样性与其优势菌, 探讨慕萨莱思传统工艺对其主要菌群结构的影响。方法: 来自于新疆阿瓦提一古作坊的慕萨莱思酿制原料、原料处理液及发酵液(自然发酵过程中)共 19 份样品被用于酵母菌分离, 分离株利用 WL 培养基培养归类, 筛选代表株, 对代表株进行形态观察、生理生化特征检测与类平均连算法聚类分析, 探讨新疆慕萨莱思自然发酵过程中酵母菌表型多样性及优势菌群。结果: 分离得到 217 株酵母菌, 13 种 WL 培养类型, 8 个表观群。13 株代表菌株经初步鉴定为 7 个属, 疑似为 13 个种, 表明慕萨莱思酵母菌具有丰富的多样性。*Hanseniaspora* spp. 为葡萄果皮、果汁及皮渣中的优势菌, *S.cerevisiae* 为慕萨莱思自然发酵过程中起发者及唯一一种优势菌, 非酿酒酵母偶尔在发酵液中发现。结论: 慕萨莱思酿制过程中, 葡萄原料原有的酵母菌经熬煮工序几乎被全部杀死, 自然发酵中唯一优势菌 *S.cerevisiae* 可能来自酿制场所和设备, 并具有较高适应能力。

关键词: 慕萨莱思; 酵母菌; 表型特征; 多样性; 优势菌

Phenotype Diversity and Dominant Species of Yeasts during Spontaneous Fermentation Process of Musalais from Xinjiang

ZHU Li-xia^{1,2}, LI Hong-mei², GUO Dong-qi², HOU Xu-jie^{1,2}, GONG Ming-fu¹

(1. Xinjiang Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar 843300, China;

2. Key Laboratory of Local Agricultural and Animal Production in Xinjiang, Alar 843300, China)

Abstract: Objective: To investigate the phenotype diversity and dominant species of yeasts during spontaneous fermentation process of Musalais from Xinjiang, and explore the effect of traditional technology on yeast community. Methods: A total of 19 samples were collected from the traditional spontaneous fermentation process of Musalais (including grapes, grape juice, boiled juice and fermentation broth) to analyze yeast phenotype diversity and corresponding dominant species. The isolated strains from these samples were typed and representative strains were selected for colony characteristic analysis on Wallerstein laboratory nutrient agar (WL nutrient agar) and grouped by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method and primarily identified according to their morphological and physiological characteristics. Results: Totally 217 isolates, 13 types based on WL agar culture, and 8 phenotype groups from 13 representative strains were harvested. Meanwhile, 7 genera and 13 species were primarily identified. The diversity of yeasts was associated with spontaneous fermentation of Musalais. *Hanseniaspora* spp. was the dominant strain in grape skin, grape juice and boiled grape juice. *Saccharomyces cerevisiae* is a starter and the only dominant strain during spontaneous fermentation of Musalais; however, other yeast species were also occasionally observed in fermentation broth. Conclusion: Almost all yeasts from grapes are killed by boiling during the production of Musalais. *S. cerevisiae* may come from brewing utensils and locations, and has high adaptability to spontaneous fermentation of Musalais.

Key words: Musalais; yeast; phenotype characteristics; diversity; dominant species

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0142-06

收稿日期: 2011-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(13060023); 塔里木盆地生物资源保护和利用兵团重点实验室开放课题(BR0907)

作者简介: 朱丽霞(1975—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品微生物。E-mail: judyzhu1@sina.com

新疆慕萨莱思酿制工艺及其品质与葡萄酒完全不一致,是新疆当地维吾尔人将和田红葡萄取汁、熬煮、自然发酵成的一种纯天然酒精饮料,为民族传统饮品之一。在慕萨莱思主产区——新疆阿瓦提地区,不同地域,不同作坊,即使同一个酿造师利用同样的原料与方法酿制的慕萨莱思品质具有很大不同,是慕萨莱思神秘面纱之一。慕萨莱思品质丰富多样^[1],进一步印证于此。随着我国经济的迅速发展,人们消费观念的改变,原生态的慕萨莱思市场逐步扩大,激发经营者对其酿制规模的扩大,但其传统工艺现代化改进所需的科技支撑几乎为零,造成市场上慕萨莱思品质参差不齐^[1-2]。为解开慕萨莱思特性,为其传统工艺现代化改进提供科学依据,为其优质品质保持及进一步提升,认识与掌握慕萨莱思酒精发酵的主要微生物菌群——酵母菌显得十分必要。依据葡萄酒自然酿制过程中酵母菌种群多样性^[3-7],新疆独特光热和水土资源、慕萨莱思独特酿制工艺(图1)、浓郁的慕萨莱思酿制生境等蕴育着酿制慕萨莱思具有丰富多样的及特殊生理代谢特性的酵母种群,从而赋予当地慕萨莱思特有的风味特征。本实验从一个慕萨莱思传统古作坊采样对慕萨莱思自然发酵过程中酵母菌进行分离,利用WL培养基(wallerstein laboratory nutrient aga, WL)进行培养类型归类,筛选代表菌株,并对其进行形态观察、理化特征表型多样性分析,并完成初步鉴定,结合分离结果,探寻慕萨莱思酿制优势菌,为充分认识慕萨莱思酵母菌及传统慕萨莱思工艺改进与品质提高提供参考。

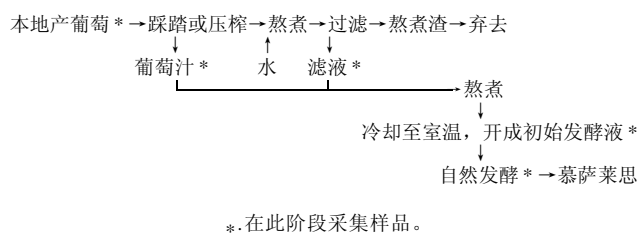


图1 慕萨莱思传统工艺

Fig.1 Flow chart for traditional production of of Musalais

1 材料与方法

1.1 分离源与培养基

1.1.1 分离源

慕萨莱思酿酒用葡萄(和田红)果皮(GP)、压榨汁(JGP)、皮渣汁(JBR,葡萄果压榨后皮渣加水熬煮而成的),以及15种慕萨莱思葡萄酒自然发酵过程中的发酵液(0、4、9、11、14、18、21、25、28、32、35、39、44、62、90d)。初始发酵液(0d)是将压榨汁与皮渣汁混合熬煮而成的。

1.1.2 培养基

基础氮源培养基^[8]、基础碳源培养基^[8]、糖发酵培养基^[8]、无维生素培养基^[8]、抗放线菌酮(0.01g/100mL)培养基^[8]、尿素培养基^[8]及WL培养基^[9-10];YPD液体培养基组成(g/100mL):酵母膏1、蛋白胨2、葡萄糖2;YPD固体培养基:在YPD液体培养基基础上加入2g/100mL琼脂粉,121℃灭菌20min。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌分离与WL培养型归类

将葡萄样品称取5g放入45mL无菌水进行表面菌洗涤,洗涤液作为葡萄表皮菌的分离源。将19份分离液(图1中带*阶段的采集样品)以10的倍数进行梯度稀释,选择适宜的稀释梯度,取0.1mL稀释液涂布于YPD平板培养基上,28℃培养2~3d,挑取单菌落于YPD平板培养基进行划线纯化,纯化后菌株转接于YPD斜面,4℃保藏,备用。将纯化的菌株利用WL营养琼脂培养基进行归类,并筛选代表株。

1.2.2 表型特征分析

将代表株进行菌落形态观察,包括质地、表面、颜色及边缘特征;液态培养特征,包括膜璞、浑浊度及沉淀紧实度;细胞形态观察;出芽方式观察;产孢子性及孢子形态特征;假丝形态特征;利用描述法与0、1法记录各特征,以供聚类分析。

6种糖发酵,包括葡萄糖、菊糖、乳糖、棉子糖、麦芽糖、蔗糖;25种碳源同化,包括D-半乳糖、D-山梨糖醇、D-核糖、D-木糖、L-鼠李糖、蔗糖、麦芽糖、甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷、纤维二糖、蜜二糖、乳糖、棉子糖、松三糖、菊糖、甘油、赤鲜糖醇、核糖醇、木糖醇、D-甘露糖醇、柠檬酸、乙醇、L-阿拉伯糖、肌醇、可溶性淀粉、乳酸;5种氮源同化,包括硝酸钾、硫酸铵、尸胺、L-赖氨酸、肌酐;脲酶实验;抗放线菌酮实验;无维生素实验;37℃高温培养实验;50%耐高糖实验及重氮基蓝B(DBB)实验。各实验做2~3次平行。上述52项实验参照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[8]和《微生物分类学》^[11]方法进行。

1.2.3 聚类分析

对上述不同生理生化特征和形态特征采用DPS软件利用类平均连算法(UPGMA)进行系统聚类分析^[12]。

1.2.4 初步鉴定

基于形态与生理生化特征,利用《酵母菌的特征与鉴定手册》^[8]、《微生物分类学》^[11]、真核生物多样性中心网站(CBS)网站(<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx>)及WL表型特征^[9-10,12-13]对代表株进行初步鉴定。

2 结果与分析

2.1 酵母菌分离与 WL 培养型归类

对上述样品进行酵母菌分离,共得217株纯菌,将其利用WL培养基培养归类为13大类培养型(I~XIII),并筛选出13株代表菌株(表1,图2)。IV培养型共占105株,为分离株的48%,且其分布在慕萨莱思自然发酵液中,为慕萨莱思自然发酵过程唯一一种优势菌(包括前发酵),在压榨汁、果皮及皮渣汁中未检测到该类菌。在果皮上共分离到10大类WL培养型,III、VII、X、XI、XIII类在果皮上分布最高,其中优势菌为VI与XII类;压榨汁中共分离到共7大类WL培养型,V、VI、XII类在压榨汁中分布最高,且VI与XII类为优势菌;皮渣汁中共分离到7大类WL培养型,其优势菌为VI与XII类;原始发酵液总酵母菌数不超过100CFU/mL(相关数据在此未显示),共分离到5大类WL培养型,菌数较多的为VIII类。

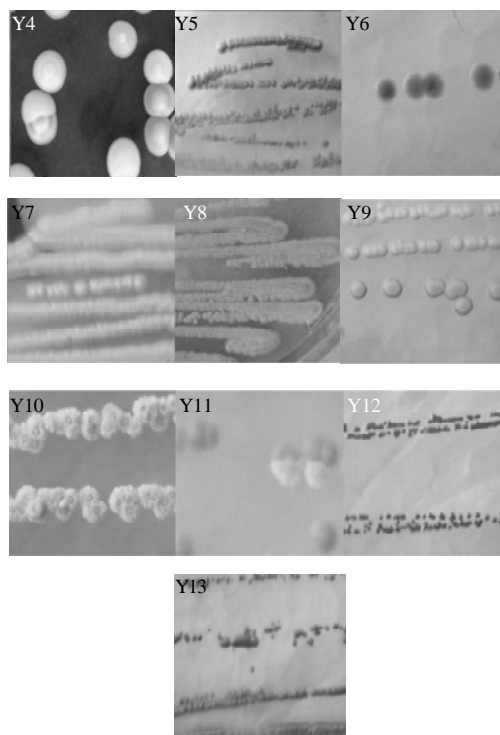
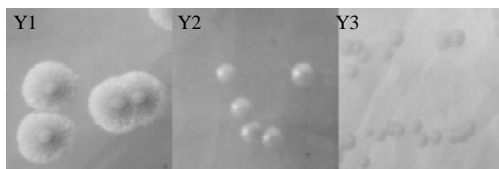


图2 13株慕萨莱思酵母菌代表株 WL 菌落形态图

Fig.2 Colony characters on WL agar of the 13 representative strains

表1 慕萨莱思酵母菌分离株归类及代表菌株

Table 1 Classification of isolated strains by culture on WL nutrient agar and 13 representative strains

| WL 培养型 | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII |
|--------|-------------|-----------------------------|-----|-----------|--------------------|-------------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 代表菌株编号 | Y1 | Y2 | Y3 | Y4 | Y5 | Y6 | Y7 | Y8 | Y9 | Y10 | Y11 | Y12 | Y13 |
| 分离源 | 4d 发酵液 | JBR | GP | 44d 发酵液 | JBR | JBR | GP | GP | 0d 发酵液 | GP | 0d 发酵液 | GP | JGP |
| 检出样 | JGP、4d 发酵液* | JGP、JBR、GP 及 0、4、9、25d 发酵液* | GP* | 0~90d 发酵液 | JBR、JGP*、0d 发酵液、GP | JGP*、JBR、GP | GP* | GP、JBR、0d 发酵液* | GP*、JBR、0d 发酵液 | GP*、JBR、0d 发酵液 | GP*、JBR、0d 发酵液 | JGP*、JBR、0d 发酵液 | JGP*、JBR、0d 发酵液 |
| 菌株数 | 6 | 25 | 3 | 105 | 12 | 15 | 4 | 9 | 3 | 8 | 8 | 15 | 5 |

注:*.含对应类最多的样品。

表2 13株慕萨莱思酵母菌代表株形态特征

Table 2 Morphological characteristics of 13 representative strains

| 菌株号 | 细胞形态 | 繁殖方式 | 液态特征 | | | 菌落特征 | | | | 孢子 | 假丝 |
|-----|--------|---------|-------|-------|-------|--------|-------|---------|--------|----|----|
| | | | 膜璞 | 浊清 | 沉淀 | 质地 | 颜色 | 表面 | 边缘 | | |
| Y1 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 皱状“1” | 浑浊“1” | 松散“1” | 干粉状“N” | 白色“1” | 粗糙粉末“0” | 蚀刻状“0” | 0 | 1 |
| Y2 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 无“0” | 清澈“0” | 紧密“0” | 奶油状“1 | 乳白“0” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 0 | 0 |
| Y3 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 光滑“N” | 浑浊“1” | 紧密“0” | 湿粉状“0” | 乳白“0” | 粗糙粉末“0” | 蚀刻状“0” | 0 | 0 |
| Y4 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 无“0” | 清澈“0” | 松散“1” | 奶油状“1 | 白色“1” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 1 | 0 |
| Y5 | 圆球“0” | 多端出芽“1” | 无“0” | 清澈“0” | 松散“1” | 奶油状“1” | 白色“1” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 0 | 0 |
| Y6 | 柠檬型“N” | 两端出芽“0” | 无“0” | 清澈“0” | 松散“1” | 奶油状“1” | 乳白“0” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 0 | 1 |
| Y7 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 光滑“N” | 浑浊“1” | 松散“1” | 奶油状“1” | 乳白“0” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 0 | 1 |
| Y8 | 圆球“0” | 多端出芽“1” | 皱状“1” | 浑浊“1” | 松散“1” | 干粉状“N” | 白色“1” | 平滑有纹“N” | 蚀刻状“0” | 0 | 0 |
| Y9 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 光滑“N” | 清澈“0” | 松散“1” | 奶油状“1” | 乳白“0” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 0 | 1 |
| Y10 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 皱状“1” | 浑浊“1” | 松散“1” | 干粉状“N” | 白色“1” | 粗糙粉末“0” | 蚀刻状“0” | 0 | 1 |
| Y11 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 皱状“1” | 浑浊“1” | 松散“1” | 湿粉状“0” | 白色“1” | 平滑有纹“N” | 蚀刻状“0” | 1 | 1 |
| Y12 | 柠檬型“N” | 两端出芽“0” | 无“0” | 清澈“1” | 紧密“0” | 奶油状“1” | 乳白“0” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 0 | 1 |
| Y13 | 椭圆“1” | 多端出芽“1” | 光滑“N” | 浑浊“0” | 紧密“0” | 奶油状“1” | 红色“N” | 光滑无纹“1” | 平滑“1” | 0 | 0 |

注:生理生化特征中,“1”.阳性;“0”.阴性;“N”.可变;孢子和假丝特征中,0.无;1.有。

表 3 13 株慕萨莱思酵母菌代表株生理生化特征
Table 3 Physiological characters of the 13 representative strains

| 菌株号 | 氮源同化 | | | | | 糖类发酵 | | | | | | 碳源同化 | | | | | | |
|-----|------|-----|-------|----|----|------|-----|----|-----|-----|----|------|--------|-------|------|-----|----|-----|
| | 硝酸钾 | 硫酸铵 | L-赖氨酸 | 尸胺 | 肌酐 | 菊糖 | 葡萄糖 | 乳糖 | 棉子糖 | 麦芽糖 | 蔗糖 | 麦芽糖 | D-山梨糖醇 | L-鼠李糖 | D-核糖 | 蜜二糖 | 乳糖 | 核糖醇 |
| Y1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Y4 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | N | N | 0 | 1 | N | 1 | 0 |
| Y5 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | N | N | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Y6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y7 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Y8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y9 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | N | 0 | N | 0 | 0 | N |
| Y10 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | N | 0 | N | N | N | 1 | 1 | 1 | N | N | N | 1 |
| Y11 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Y12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | N | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Y13 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | D | 1 | 0 |

| 菌株号 | 碳源同化 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|----|------|-----|----|----|--------|-------|-----|------|------|----|----|-------|--------|------------------------|
| | 棉子糖 | 松三糖 | 菊糖 | 赤鲜糖醇 | 柠檬酸 | 甘油 | 蔗糖 | L-阿拉伯糖 | D-半乳糖 | 木糖醇 | D-木糖 | 纤维二糖 | 乙醇 | 肌醇 | 可溶性淀粉 | D-甘露糖醇 | 甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷 |
| Y1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | N | 1 | 1 | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Y3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Y4 | N | N | 1 | 1 | 0 | N | N | 1 | N | 1 | 1 | 1 | N | 1 | N | N | 1 |
| Y5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | N | N |
| Y6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y9 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | N | 1 | 0 | 0 | N | N | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Y10 | N | N | N | N | 1 | 1 | 1 | N | 1 | 1 | 1 | N | 1 | 1 | N | N | 1 |
| Y11 | 1 | N | N | 1 | 0 | N | 1 | 1 | 1 | N | N | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y12 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Y13 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| 菌株号 | 其他 | | | | | |
|-----|------|-------------|--------|-----|---------|--------|
| | 脲酶实验 | 0.01% 抗放线菌酮 | 无维生素实验 | 37℃ | 50% 耐高糖 | 重氮基蓝 B |
| Y1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Y2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Y3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Y4 | 1 | 0 | N | 1 | N | 1 |
| Y5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Y6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Y7 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Y9 | 0 | 0 | 0 | N | N | N |
| Y10 | 1 | N | N | N | 1 | 0 |
| Y11 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Y12 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0N | 0 |
| Y13 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |

注：0. 阴性；1. 阳性；N. 可变。

2.2 聚类分析

对 13 株慕萨莱思酵母菌代表株基于形态特征(表 2)及生理生化特征(表 3)进行 UPGMA 聚类分析, 当 Waston 距离为 0.26 时, 可将 13 株代表菌分为 8 个表观群(图 3), 表明来自慕萨莱思的酵母菌具有丰富的表型多样性。形态特征和理化特征相似度高的菌株为 Waston 距离小的菌株, 图 3 中 Y2 与 Y9 之间 Waston 距离为 0.20, Y10 与 Y11 之间 Waston 距离为 0.21, 表明基于本实验所用的理化特征与形态特征可以区分 Waston 距离 ≥ 0.20 的菌株。

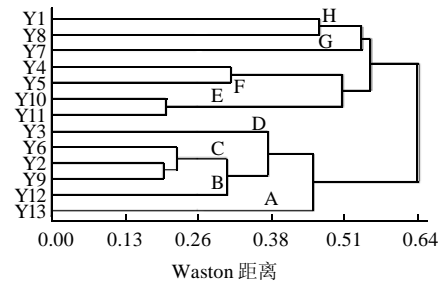


图 3 13 株慕萨莱思酵母菌代表株表型特征聚类图
Fig.3 Dendrogram showing phenotypic relationship among 13 representative yeast strains

2.3 13株慕萨莱思酵母菌代表菌株初步鉴定

基于形态(表2、图2)与理化特征(表3),依据《酵母菌的特征与鉴定手册》^[8]和《微生物分类学》^[11],WL培养特征^[9-10,13]及CBS网站,将13株代表株初步鉴定为:3株 *Candida* 属、3株 *Pichia* 属、2株 *Hanseniaspora* 属、2株 *Issatchenkia* 属、*Saccharomyces*、*Lachancea* 和 *Metschnikowia* 属各1株。其中,Y1和Y4依据文中测试特征与文献中参考特征^[8-11]及CBS网站特征具有80%的相似度,可以分别初步鉴定为 *I.orientalis* 和 *S.cerevisiae*;Y13依据WL表型特征则鉴定为 *M.pulcherrima*。其余疑似为 *C.zemplinina*(Y2)、*P.kluyveri*(Y3)、*L.thermotolerans* (Y5)、*H.vineae*(Y6)、*P.guilliermondii*(Y7)、*P.anomala* (Y8)、*I.hanoiensis*(Y9)、*P.membranifaciens*(Y10)、*P.manshurica*(Y11)、*H.uvarum*(Y12),还需进一步鉴定。

2.4 优势菌分析

由上述结果可以得到,涉及慕萨莱思酿制的酵母菌丰富多样。菌种的丰富程度依次为果皮>压榨汁>皮渣汁>初始发酵液>自然发酵过程中的发酵液。在果皮、压榨汁及皮渣汁中共分离到12类非酿酒酵母,其优势菌初步鉴定为 *Hanseniaspora* spp.(VI、XII WL培养类型,Y6与Y12代表菌株);经过长时间熬煮过滤后的皮渣汁蕴含酵母菌总数虽然远远低于压榨汁(数据未显示),但其种类与压榨汁中一致,与预期猜测不符;而经过长时间熬煮并自然冷却后的初始发酵液,菌数与种类数明显减少;非酿酒酵母只有II类WL培养类型(代表株为Y2,初步鉴定为 *C.zemplinina*)间歇进入自然发酵过程中,间接可以推测此菌可能具有较高的抗渗透压性及耐酒精性;IV类WL培养类型(代表株Y4)为慕萨莱思自然发酵过程的唯一一种优势菌,初步鉴定为 *S.cerevisiae*,这与葡萄酒自然发酵过程前期为非酿酒酵母占主导优势不一致^[3-4]。但 *S.cerevisiae* 在果皮、压榨汁与皮渣汁中未检测到,与诸多研究相符^[14-15]。在已成熟的慕萨莱思,如从贮藏45d的慕萨莱思中分离到大量的 *S.cerevisiae*(数据在此未显示),说明慕萨莱思 *S.cerevisiae* 具有较高的耐酒精能力。

3 讨论

本研究只限制于一个慕萨莱思酿制作坊,其已经表现出参与慕萨莱思酿制酵母的多样性,或许还有其他非酿酒酵母类,它们浓度太低而未检测出,有待运用免培养技术,如变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)进一步对其多样性进行详尽研究。如果扩大研究范围,如不同酿制作坊,不同酿制工艺,可能会增加当地慕萨莱思酿制酵母菌菌群多样性,甚至其优势菌多样性,这有待深入研究。本实验

涉及到的代表株也还有待深入鉴定。

葡萄酒自然发酵过程中酵母菌属种的一般更替规律,即先非酿酒酵母占主导地位的酵母菌启动发酵,随着酒精的积累,非酿酒酵母迅速消亡,而酿酒酵母逐步占主导地位且最终完成发酵^[3-5,7,14-15]。慕萨莱思的两次熬煮工序视为一个杀菌过程,把来自于果皮、葡萄果汁及皮渣汁中的所有酵母菌几乎全部杀死,使得很有可能来自于长时间自然冷却过程中空气降落或为酿酒设备的酿酒酵母以唯一优势菌群存在于慕萨莱思自然发酵过程中。

慕萨莱思初始发酵液是通过两次长时间熬煮而形成,其实质是浓缩掉2/3葡萄汁水分,并且有特殊焦香味形成。*S.cerevisiae* 能在此浓缩葡萄汁中快速度过适应期,增殖达到起发浓度,并最终完成发酵,证明其在慕萨莱思自然发酵过程中具有较高的抗渗透压及良好的起发性。在初始发酵液中,少了非酿酒酵母竞争,及由于熬煮工序将来自于葡萄本身及非酿酒酵母等微生物的蛋白质降解,使得氮素不再为 *S.cerevisiae* 限制因子,或许是慕萨莱思 *S.cerevisiae* 迅速起发的主要原因。

经过长时间熬煮、过滤后的皮渣汁蕴含酵母的种类数与压榨汁一致。对这些酵母菌能够耐受长时间熬煮,而存活于过滤液(皮渣汁)的假设,有悖于熬煮对其具有杀菌的功效,故其可能性非常小。但其来源假设为过滤和盛放设备,及其作坊环境,则具有较大的可行性。如果后者假设成立,则进一步推测来自于果皮、果汁的大量非酿酒酵母,布满了酿酒设备及其环境。它们不仅可以进入到皮渣汁,同样也会侵染初始发酵液,这与皮渣汁和初始发酵液均蕴含多种酵母菌相符,而后者在工序洁净度控制上远远高于皮渣汁,故其种类数略少于皮渣汁。

将表型特征聚类结果与WL菌落培养类型进行对比,聚类结果反应的多样性不及WL菌落特征归类的结果。WL更能直观地揭示酵母菌之间的差异,其精度可以区分大于2.0 Waston距离的菌株。进一步证明,WL显色培养基对酵母菌分离与种类初步鉴定,尤其对大规模样品量及分离株处理非常有用,且准确度与精确度优于传统表型分类与鉴定^[9-10,13,16]。但WL显色培养基是定性分析,而复杂的传统表型特征分析不仅可以定性比目标菌不同,同时可从遗传相似性大小做到定量揭示酵母菌之间的差异性,从不同角度揭示了目标菌的特性,尤其在筛选一些特殊生理代谢菌时,其功能是为WL培养基所不能达到的。两者均可揭示慕萨莱思酵母菌具有丰富的多样性。

参考文献:

- [1] 朱丽霞,侯旭杰,许倩.新疆慕萨莱思葡萄酒品质分析初探[J].酿酒

- 科技, 2008(7): 68-71.
- [2] 朱丽霞, 侯旭杰. 新疆慕萨莱思葡萄酒的发展与对策探讨[J]. 酿酒科技, 2008(6): 111-113.
- [3] FLEET G H, HEARD G M. Yeasts: growth during fermentation[M]. Singapore: Harwood Academic Publishers, 1993.
- [4] FLEET G H. Wine yeasts for the future[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 86(7): 979-995.
- [5] 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(6): 239-248.
- [6] LI Shuangshi, CHENG Chao, LI Zheng, et al. Yeast species associated with wine grapes in China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(3): 85-90.
- [7] PRETORIUS I S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making[J]. Yeast, 2000, 16(8): 675-729.
- [8] BARNETT J A, PAYNE R W, YARROW D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [9] 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.
- [10] CHRISTINA L P, JAMES A B, TAMMI L O, et al. Use of WL medium to profile native flora fermentations[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52(3): 198-203.
- [11] 张纪中. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [12] 龚明福, 马玉红, 李超, 等. 苦豆子内生细菌分离及表型多样性分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(2): 408-411.
- [13] CAVAZZA A, GRANDO M S, ZINI C. Rilevazione della flora microbica dimosti e vini[J]. Vignevini, 1992, 9: 17 -20.
- [14] LONGO E, CANSADO J, AGRELO D, et al. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from North West Spain[J]. American Journal of Enological Viticulture, 1991, 42(2): 141-144.
- [15] CONSTANTINI M, POBLET M, AROLA L, et al. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery [J]. American Journal for Enology and Viticulture, 1997, 48(3): 339-344.
- [16] 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(1): 33-36.