

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

孙悦¹, 张方方², 褚遂兴¹, 李佳幸¹, 邵帅¹, 张军翔^{1,*}

(1.宁夏大学葡萄酒学院, 宁夏 银川 750021; 2.湖北省酵母功能重点实验室, 湖北 宜昌 443003)

摘要:以赤霞珠葡萄为原料, 分别接种不同嗜杀特性的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株NXU17-26 (中性)、UCD522 (敏感菌株) 和UCD2610 (嗜杀菌株), 并以自然发酵为对照, 研究各菌株对赤霞珠葡萄酒的发酵特征及发酵中酵母多样性的影响。结果表明, 接种发酵在启动和发酵速度上显著快于自然发酵。WLN培养基将分离到的480株酵母菌鉴定为7种类型, 26S rDNA D1/D2序列分析进一步将其鉴定为4属5种: 葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*)、克鲁维毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*)、伯顿丝孢毕赤酵母 (*Hyphopichia burtonii*)、*S. cerevisiae*、库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*)。这4属5种的酵母均存在于自然发酵中, 而接种发酵中仅有*H. uvarum*和*S. cerevisiae*两种酵母, 接种发酵中酵母菌多样性较低。Interdelta指纹图谱分析表明, 所接种的酿酒酵母菌株是相应发酵中的优势菌株: 接种中性酵母NXU17-26的发酵中, NXU17-26的基因型占比为63.46%; 接种敏感菌株UCD522中, UCD522的基因型占比为44.68%, 野生酿酒酵母NXU18-15表现出较强的竞争力, 基因型占比为34.04%; 接种嗜杀酵母UCD2610的发酵中, UCD2610的基因型占比为62.74%。非加权算术平均数法聚类分析表明, 分离自同一发酵中的不同酿酒酵母菌株间的遗传差异性较小; 分离自不同发酵中的酿酒酵母菌株间遗传差异性较大。

关键词:葡萄酒; 接种发酵; 赤霞珠; Interdelta指纹图谱

Effects of *Saccharomyces cerevisiae* Strains with Different Killer Activities on Yeast Diversity during Inoculated Fermentation of Cabernet Sauvignon

SUN Yue¹, ZHANG Fangfang², CHU Suixing¹, LI Jiaxing¹, SHAO Shuai¹, ZHANG Junxiang^{1,*}

(1. School of Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. Hubei Provincial Key Lab of Yeast Function, Yichang 443003, China)

Abstract: In this study, Cabernet Sauvignon was inoculated with different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, NXU17-26 (natural strain), UCD522 (sensitive strain) and UCD2610 (killer strain), or naturally fermented (control) in order to investigate the effects of these yeast strains on the fermentation performance and yeast diversity during the fermentation process. The results showed that the inoculated strains initiated fermentation more rapidly and exhibited a higher fermentation rate compared to spontaneous fermentation. A total of 480 yeast isolates were classified into 7 phenotypes by using Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN) agar. In addition, 26S rDNA D1/D2 domain sequence analysis found that they belonged to 5 species in 4 genera: *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Hyphopichia burtonii*, *S. cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. All of the yeast species were found in the spontaneous fermentation, while the yeasts isolated from the inoculated fermentations were *H. uvarum* and *S. cerevisiae*. Interdelta fingerprints showed that the inoculated yeasts were the dominant strains in the corresponding fermentations. The natural strain NXU17-26 accounted for 63.46% of the *S. cerevisiae* strains isolated from the fermentation inoculated with NXU17-26. In the fermentation inoculated with it, the sensitive strain UCD522 accounted for 44.68% of the *S. cerevisiae* strains isolated, while the indigenous *S. cerevisiae* NXU18-

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 宁夏自然科学基金项目 (2018AAC03046); 宁夏大学科学研究基金项目 (ZR1728);

宁夏自治区“十三五”重大科技项目 (2016BZ06)

第一作者简介: 孙悦 (1986—) (ORCID: 0000-0002-2945-6760), 女, 副教授, 博士, 研究方向为酿酒微生物。

E-mail: yuesun86@126.com

*通信作者简介: 张军翔 (1971—) (ORCID: 0000-0002-9487-0247), 男, 教授, 博士, 研究方向为葡萄酒化学与酿造工艺。

E-mail: zhangjunxiang@126.com

15 showed strong competitiveness with a percentage of 34.04%. The killer strain UCD2610 accounted for 62.74% of the *S. cerevisiae* strains during the corresponding fermentation. According to UPGMA cluster analysis, the genetic diversity among *S. cerevisiae* strains isolated from the same fermentation was small, while the genetic diversity between *S. cerevisiae* strains isolated from different fermentations was large.

Keywords: wine; inoculated fermentation; Cabernet Sauvignon; Interdelta fingerprinting

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190109-100

中图分类号: TS261

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 02-0166-07

引文格式:

孙悦, 张方方, 褚遂兴, 等. 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190109-100. <http://www.spkx.net.cn>

SUN Yue, ZHANG Fangfang, CHU Suixing, et al. 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 with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190109-100. <http://www.spkx.net.cn>

葡萄酒的酒精发酵是多酵母属、种及菌株共同参与的过程, 发酵过程中的酵母菌的种类组成变化及其酿酒特性对葡萄酒的感官质量有重要贡献^[1-2]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是完成酒精发酵的主要菌种, 葡萄酒发酵中的酿酒酵母菌株多样性及其遗传差异受年份、产区、气候、葡萄品种和接种酵母的性能等因素的影响^[3-6]。即使在接种商业酵母的情况下, 仍有野生酿酒酵母的不同株系共同参与发酵过程, 野生酿酒酵母甚至可以表现出较强的竞争能力, 并主导发酵过程^[7-9]。因此, 对葡萄酒发酵过程中的主导酿酒酵母菌株进行监控非常重要。接种嗜杀酵母进行葡萄酒酿造, 在一定程度上可以净化发酵体系、预防野生酵母菌污染, 确保酒精发酵的正常进行, 提高产品质量^[10-14]。酵母菌的嗜杀特性与其培养时间、接种量、pH值和温度等因素有关^[15-16]。

通过酵母菌株区分技术可以揭示其种内遗传多样性, 常规的生理生化手段难以达到菌株水平的区分, 须借助于DNA分子标记方法完成。目前, 应用于酿酒酵母菌株区分最广泛、最有应用前景的技术有: 随机扩增多态性DNA标记法、线粒体DNA限制性片段长度多态性分析、微卫星DNA标记法、Interdelta指纹图谱法以及COX1基因指纹图谱法等^[17-18]。Interdelta序列之间差异非常丰富, 同时Interdelta序列的数目和位置在种内具有一定的差异性, 所以被作为基因标记用于区分酿酒酵母菌株的首选方法^[6,19]。Ayoub等^[20]在研究中发现Interdelta序列在酿酒酵母基因组中数量最多, 分布最广, 且方法简单, 操作容易, 适用于酿酒酵母菌株的区分。

对接种发酵过程中酿酒酵母的菌株区分可以揭示野生酵母与接种的酵母的竞争关系和消长变化, 有效控制发酵过程。本研究利用WLN营养琼脂培养基和分子分析技术, 研究了不同嗜杀特性的酿酒酵母菌株对赤霞珠葡萄酒酒精发酵过程中酵母菌群体及其数量影响, 探索发酵过程中微生物之间的相互作用, 为良好、健康的葡萄酒发酵提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

赤霞珠葡萄(糖221.57 g/L, 总酸5.9 g/L, pH 3.54)宁夏银川产区; 酿酒酵母: NXU17-26(中性菌株)宁夏大学葡萄酒学院葡萄酒微生物资源与遗传育种实验室; UCD2610(嗜杀菌株)、UCD522(敏感菌株)美国加州大学戴维斯分校葡萄栽培与葡萄酒酿造系菌种保藏中心。

1.1.2 培养基

酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YEPD)培养基: 葡萄糖2%、蛋白胨2%、酵母浸粉1%, 自然pH值, 121 ℃灭菌20 min, 添加100 mg/L的氯霉素排除细菌的干扰。配制固体培养基时加入2%的琼脂。

WLN营养琼脂培养基配制见参考文献[21]。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-2FD超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; SHP-150B型生化培养箱 常州诺基仪器有限公司; GDH-100干式恒温器 上海巴玖实业有限公司; 5424R台式冷冻离心机 德国艾本德股份公司; TAdvanced 96 SG基因扩增仪 德国耶拿分析仪器股份公司; ChampGel 15000全自动凝胶成像仪 北京赛智创业科技有限公司; DYY-6C型电泳仪 北京六一生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 葡萄汁发酵

本实验设置了4种发酵处理方式: A.自然发酵; B.接种中性菌株NXU17-26的发酵; C.接种敏感菌株UCD522的发酵; D.接种嗜杀菌株UCD2610的发酵。用无菌自封袋将成熟的葡萄原料在无菌状态下进行除梗破碎, 于灭菌的1 L三角瓶中进行带皮发酵, 发酵

体积为700 mL, 每个处理设置两个发酵重复。对于接种发酵而言, 在葡萄破碎后的第2天进行接种, 接种量为 10^6 CFU/mL。所有的发酵均于 $25\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 控温发酵, 采用 CO_2 失重法监控发酵进程, 发酵至连续损失质量2 d变化低于0.1 g时视为发酵结束。待发酵结束后分析原酒的基本理化指标。

1.3.2 酵母菌的分离

在发酵的第3、5、7天进行取样并梯度稀释, 选取合适的稀释浓度在YPD培养基上进行涂布(加入氯霉素100 mg/L以抑制细菌的生长), 并于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养3 d, 根据菌落的颜色和形态不同, 每个时期选取20个单菌落进行划线纯化, 纯化后的酵母菌于20%的无菌甘油中 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏备用。

1.3.3 理化指标分析

发酵结束后的残糖、总酸、挥发酸质量浓度和乙醇体积分数等指标参照GB/T 15038—2006《葡萄酒、果酒通用分析法》^[22]。

1.3.4 菌株的WLN培养基聚类分析

将保藏的酵母菌划线接种于WLN培养基上, 酵母菌株的初步形态分类参考文献[21,23]。

1.3.5 酵母菌DNA的提取

DNA的提取方法参考文献[24]。

1.3.6 酵母菌26S rDNA D1/D2测序分析

26S rDNA D1/D2区的扩增的PCR反应体系及条件参照文献[25]。

1.3.7 酿酒酵母的Interdelta指纹图谱分析

Interdelta分型法进行酿酒酵母分析的PCR体系、电泳条件及数据处理参考文献[6]。

1.3.8 聚类分析

对Interdelta PCR电泳图谱进行统计, 将特定位置上DNA条带的有、无分别按“1”和“0”进行统计区分, 建立数据矩阵, 利用NTsys 2.10e版软件进行非加权算术平均数法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)构建相关酵母菌株的系统发育树^[6]。

1.4 数据处理

所得数据通过Office 2007和SPSS Statistics V19.0进行均值和方差分析, 采用Duncan检验方法($P<0.05$); 绘图软件使用Origin 8.0。

2 结果与分析

2.1 不同酿酒酵母菌株的发酵曲线

本研究采取 CO_2 失重法监控不同发酵的发酵进程, 接种不同酵母菌株的发酵曲线(CO_2 累计释放量表示)如图1所示。从发酵曲线可以看出, 接种发酵(10 d)比自然发酵(15 d)快5 d发酵结束。接种发酵在启酵和发

酵速度上均快于自然发酵, 敏感菌株UCD522和嗜杀菌株UCD2610的发酵速度最快, 中性菌株NXU17-26次之, 而自然发酵的发酵速度最慢(图1)。

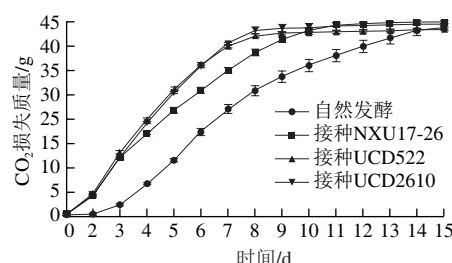


图1 接种不同酿酒酵母菌株发酵的 CO_2 失重曲线

Fig. 1 Comparison of CO_2 mass loss among fermentations inoculated with different *S. cerevisiae* strains

对于自然发酵而言, 葡萄醪中的酵母菌主要来源于葡萄果皮, 而这些酵母主要为非酿酒酵母, 非酿酒酵母的发酵能力较酿酒酵母的弱, 且对酒精的耐受性更低, 因此, 发酵的时间比接种酿酒酵母的发酵时间长。

2.2 发酵结束后的理化指标

表1 赤霞珠发酵结束后的理化指标

Table 1 Physicochemical indexes of fermented Cabernet Sauvignon

发酵处理	残糖质量浓度/(g/L)	总酸质量浓度/(g/L)	pH	挥发酸质量浓度/(g/L)	乙醇体积分数/%
自然发酵	3.58 ± 0.25^a	6.92 ± 0.01^a	3.80 ± 0.02^a	0.38 ± 0.02^a	13.25 ± 0.08^a
接种NXU17-26	3.37 ± 0.04^a	7.46 ± 0.02^a	3.77 ± 0.01^a	0.36 ± 0.02^a	13.13 ± 0.05^a
接种UCD522	3.35 ± 0.04^a	8.26 ± 0.07^a	3.74 ± 0.01^a	0.33 ± 0.00^a	13.50 ± 0.07^a
接种UCD2610	3.51 ± 0.01^a	8.61 ± 0.01^a	3.71 ± 0.00^a	0.41 ± 0.03^a	13.33 ± 0.09^a

注: 同列不同小写字母表示不同发酵处理间差异显著($P<0.05$)。

如表1所示, 各发酵处理均能发酵完全(残糖 $<4\text{ g/L}$), 且各理化指标均差异不显著。由于本研究选用的是同一批次的葡萄原料进行的发酵研究, 各发酵中的起始糖浓度、酸浓度和pH值等理化指标无显著差异, 所有发酵均顺利完成(图1)。因此, 并未造成发酵后的葡萄酒中残糖、总酸质量浓度和乙醇体积分数等理化指标存在显著差异。

2.3 不同发酵中酵母菌种类的差异

2.3.1 WLN初步聚类分析

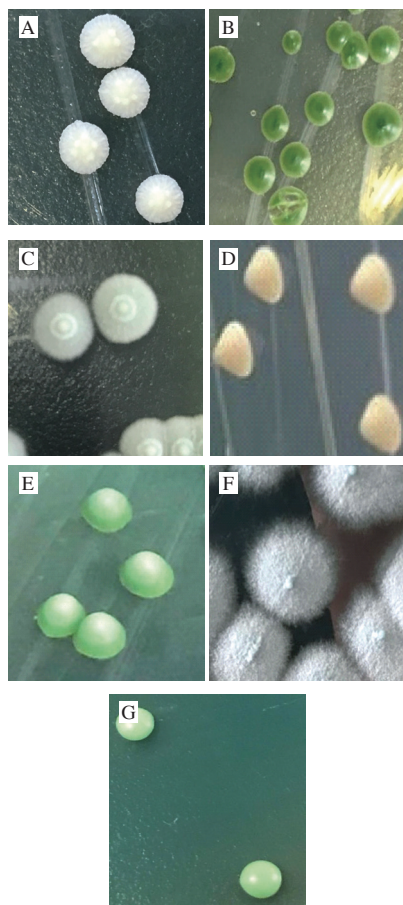
表2 WLN聚类结果分析

Table 2 Analysis of WLN clustering results

类型	描述	总个数
类型1	扁平, 面粉状, 表面褶皱, 不透明; 菌落奶油色	1
类型2	扁平, 表面光滑, 菌落整体呈绿色, 从边缘至中心为浅绿、绿、深绿晕开, 极小的淡黄边缘略透明	301
类型3	整体呈圆形, 面粉状, 中心圆乳白色颗粒状, 外圈有白色粉末, 最外圈有放射性绒毛	12
类型4	菌落呈奶油色, 中央呈圆锥形突起, 表面光滑, 不透明	69
类型5	菌落圆形, 呈圆锥状突起, 表面光滑, 不透明, 中央具少量白色, 四周浅绿, 边缘白色	70
类型6	中心一点青绿色圆锥突起, 四周为大面积粉末长毛状, 扁平, 不透明	1
类型7	菌落呈青色, 表面扁平光滑, 不透明	26

WLN营养琼脂培养将赤霞珠葡萄发酵过程分离到的480株酵母菌的颜色和形态进行聚类分析, 参照Pallmann

等^[21]对WLN琼脂培养基上酵母菌落颜色以及形态的描述,将分离到的480株酵母菌分为7个不同的培养类型。结果表明,类型2的数量最多,占分离自总菌株的62.71%,其次是类型4和类型5,分别为69株和70株。



A~G分别为类型1~7。

图2 代表性菌株在WLN上的聚落特征

Fig. 2 Cluster characteristics of representative strains on WLN

2.3.2 26S rDNA D1/D2区测序分析

表3 测序菌株26S rDNA D1/D2片段大小及与相关菌株的序列相似性
Table 3 Size of the 26S rDNA D1/D2 fragment and sequence similarity to related strains

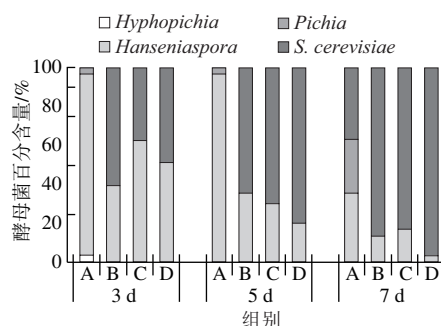
菌株编号	PCR产物/bp	参考菌株	WLN类型	相似性/%
NXU28-20	542	<i>H. burtonii</i> CBS:4571	类型1	99
NXU18-16	574	<i>H. uvarum</i> CBS:276	类型2	99
NXU28-13	576	<i>H. uvarum</i> S1-15	类型2	99
NXU28-07	575	<i>H. uvarum</i> SEH13C	类型2	100
NXU18-16	568	<i>P. kudriavzevii</i> CBS:12548	类型3	99
NXU18-10	568	<i>P. kudriavzevii</i> CBS573	类型3	100
NXU28-08	575	<i>S. cerevisiae</i> L1222	类型4	100
NXU28-10	581	<i>S. cerevisiae</i> L1222	类型4	100
NXU18-04	574	<i>S. cerevisiae</i> S288c	类型5	100
NXU18-01	576	<i>S. cerevisiae</i> S288c	类型5	99
NXU28-19	572	<i>P. kluyveri</i> YG14	类型6	99
NXU28-06	545	<i>S. cerevisiae</i> L1222	类型7	100
NXU28-01	576	<i>S. cerevisiae</i> L1222	类型7	100

如表3所示,表明赤霞珠发酵过程中的酵母菌有4属5种,分别为葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、伯顿丝孢毕赤酵母(*Hyphopichia burtonii*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)。不同发酵处理的酵母菌种类也不同,接种酿酒酵母的发酵中酵母多样性低于自然发酵,各接种发酵处理之间酵母多样性无差异。结果表明,自然发酵过程中共分离出酵母菌4属5种;接种发酵中分离出酵母菌均为2属2种:*H. uvarum*和*S. cerevisiae*。

表4 发酵过程中酵母菌的细胞总数
Table 4 Total yeast counts in different fermentations

发酵处理	细胞总数/(10^6 CFU/mL)		
	3 d	5 d	7 d
自然发酵	34.17±4.9	31.45±5.29	7.45±2.44
接种NXU17-26	13.3±1.14	8.77±1.25	4.55±1.11
接种UCD522	26.18±7.15	19.77±3.02	5.77±3.1
接种UCD2610	12.22±3.56	28.4±6.58	8.32±3.45

如表4所示,在发酵的各时期,自然发酵中的酵母菌数量相对较高。接种嗜杀酵母UCD2610的发酵,在发酵的第5天酵母菌的数量达到最大值(28.4 ± 6.58) $\times 10^6$ CFU/mL;其余发酵中酵母菌的数量,均在发酵第3天达到最大值。如图3所示,不同发酵处理的酵母菌种属组成也存在明显的差异,自然发酵中非酵母属的比例较其他发酵的高。随着发酵的进行,各发酵中非酵母属酵母的比例下降,酿酒酵母逐渐占主导地位并完成酒精发酵;在发酵中后期,接种嗜杀酵母UCD2610的发酵中,非酵母属酵母的数量较其他发酵的低。



A.自然发酵; B.接种NXU17-26的发酵; C.接种UCD522的发酵; D.接种UCD2610的发酵。

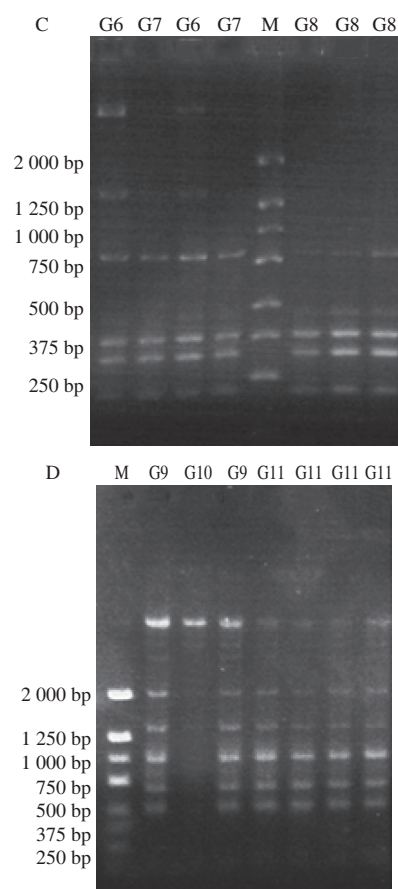
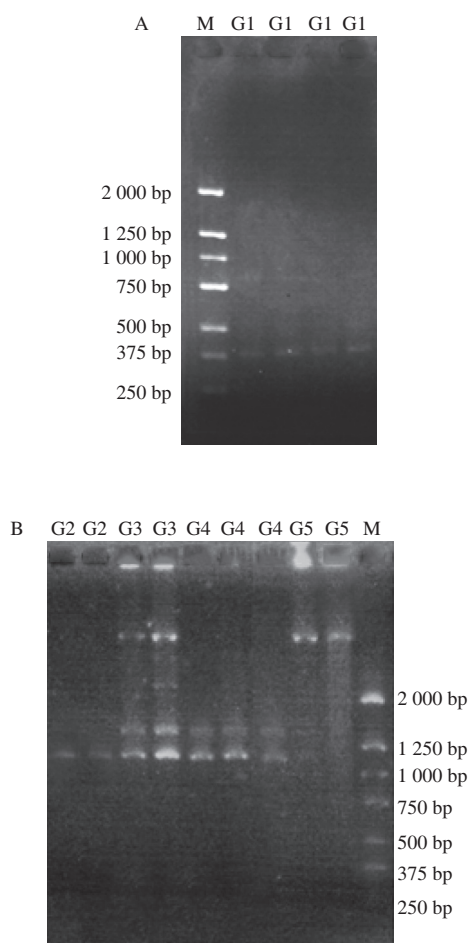
图3 不同处理中酿酒酵母与非酵母属的比例

Fig. 3 Proportions of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* under different treatments

2.4 发酵过程中酿酒酵母菌株多样性分析

本研究对不同接种条件下各发酵时期的酿酒酵母(类型G4、类型G5和类型G7,共165株)进行了Interdelta

指纹图谱即不同基因型的分析,将分离到的165株酿酒酵母鉴定为11种基因型(如图4所示G1~G11)。自然发酵中分离的18株酿酒酵母表现出相同基因型(G1)(图4A);接种中性菌株NXU17-26的发酵中分离出52株酿酒酵母,表现出3种基因型(G2~G5),其中G2(33株)与NXU17-26具相同基因型(图4B),是发酵中的优势酵母,NXU17-26的基因型占比为63.46%;接种敏感菌株UCD522的发酵中共分离出47株酿酒酵母,表现出3种基因型(G6~G8),其中类型G8与接种的UCD522具相同基因型(图4C),菌株数为21(基因型占比为44.68%),其中G6类型的酵母16株(基因型占比为34.04%);接种嗜杀菌株UCD2610的发酵中共分离出51株酿酒酵母,表现出4种基因型(G9~G11),其中类型G9与所接种的UCD2610具相同基因型(图4D),菌株数为32(基因型占比为62.74%)。接种发酵中,接种的酿酒酵母在发酵中占主导地位,接种的敏感酿酒酵母占总酿酒酵母的比例较接种的其他两个酵母的低,这可能是因为发酵过程中野生酿酒酵母NXU18-15(G6)具较强的竞争力,影响了敏感酵母UCD522的生长。



A.自然发酵; B.接种NXU17-26的发酵; C.接种UCD522的发酵; D.接种UCD2610的发酵; G1~G11代表酿酒酵母的不同基因型。

图4 本研究中分离的酿酒酵母Interdelta指纹图谱

Fig. 4 Interdelta fingerprinting patterns of *S. cerevisiae* strains

2.5 UPGMA聚类分析

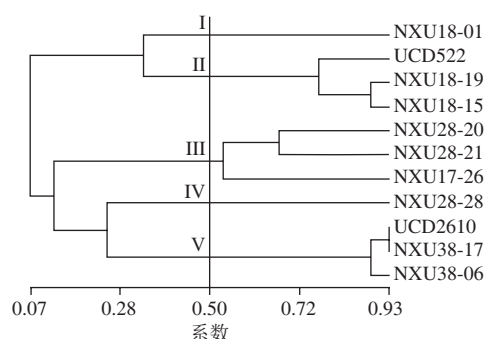


图5 11株酿酒酵母Interdelta指纹图谱UPGMA聚类图

Fig. 5 UPGMA dendrogram generated from Interdelta fingerprinting patterns of 11 *S. cerevisiae* strains

通过对分离到的上述8种野生酿酒酵母基因型及NXU17-26、UCD522和UCD2610的Inerdelta结果进行UPGMA聚类分析,以说明各菌株间的遗传关系。从图5可以看出,当欧式距离为0.50时,可将11株酿酒酵母基因型分为5大类:第I类包括1种基因型,为分离自自

然发酵的基因型NXU18-01;第II和第V类,分别由分离自接种敏感菌株UCD522和嗜杀菌株UCD2610的发酵中的基因型组成;第III和第IV类,由分离自接种中性菌株NXU17-26的发酵中的基因型组成。以上聚类结果显示,除个别菌株外(NXU28-28),分离自相同发酵中的酿酒酵母菌株间遗传差异性较小,而分离自不发酵中的酿酒酵母菌株间遗传差异性较大。

3 讨论

本研究中分离到的酵母菌属于4属5种:葡萄汁有孢汉逊酵母、克鲁维毕赤酵母、*H. burtonii*、酿酒酵母和库德毕赤酵母。宋育阳等^[26-27]在宁夏地区蛇龙珠和神索葡萄自然发酵过程也分离得到葡萄汁有孢汉逊酵母、克鲁维毕赤酵母和酿酒酵母。研究表明,葡萄汁有孢汉逊酵母是葡萄及葡萄酒发酵过程中常见的非酵母属酵母,且对葡萄酒风味形成具有重要作用^[28-29]。本研究中,葡萄汁有孢汉逊酵母是最丰富的非酵母属酵母,其在发酵过程中可能有助于葡萄酒风味的形成,因此对其发酵特性及在葡萄酒酿造中的价值有待进一步研究。

对葡萄酒发酵过程中的主导酿酒酵母菌株研究,不仅能揭示发酵过程中菌落的构成,还能监控发酵的过程,酵母菌株的酿造特性不同,特别是嗜杀特性,使各发酵中酵母菌株之间的相互作用有所不同。即使在接种商业酵母的情况下,野生酿酒酵母也可以表现出较强的竞争能力,在发酵过程中处于优势地位。宋育阳等^[7]研究接种商业酵母RC212的黑比诺葡萄发酵过程中酿酒酵母菌株动态变化发现,在发酵初期和中期,RC212与野生酿酒酵母的竞争性并不是很强,到了发酵末期才开始占据主导地位。Vigentini等^[8]研究表明,在酒厂A的接种发酵中,共鉴定出18种基因型,所接种的酿酒酵母菌株占的比例为44%~100%。Maturano等^[30]研究了接种中性酿酒酵母菌株Lalvin ICV D254和嗜杀酵母Lalvin Rhône 2056进行发酵,不同温度下浸渍处理的酿酒酵母菌株定殖情况,结果表明接种嗜杀酵母Rhône 2056的发酵中该菌株并没有在所有的发酵中占主导地位。本研究中,接种的酿酒酵母在发酵中均占主导地位,因此研究接种不同酿酒酵母发酵过程中酵母菌株及其演替规律很有必要。接种敏感菌株UCD522的发酵中,野生酿酒酵母NXU18-15表现出较强竞争力,通过对其酿酒特性的研究有望获得适于发酵的本土优良酵母菌株。此外,接种不同酿酒酵母菌株发酵过程的酿酒酵母菌株多样性差异明显,此结果与李梅花^[9]的研究结果类似。

我国大多数葡萄酒生产企业使用商业酿酒酵母即活性干酵母酿造葡萄酒,商业酿酒酵母对我国本土酵母菌资源的影响及其二者间的互作关系鲜见相关报道。

Sun Yue等^[6]对宁夏葡萄酒产区分离的47株酿酒酵母菌株进行Interdelta分型研究,结果表明自然发酵中分离的酵母菌和商业酵母菌株具有相同的基因型。杨宽等^[28]利用UPGMA法构建云南香格里拉葡萄酒产区所分离的47株酿酒酵母及3株商业酵母菌株的聚类图,结果表明一些葡萄园中分离的酿酒酵母菌和商业菌株具有相同的基因型。本研究中,自然发酵未分离出与接种酵母相同的基因型。因此,亟需对我国本土酵母菌资源进行收集与开发。对自然发酵中分离的我国本土酿酒酵母菌资源进行分离、鉴定,可为后续优良本土酵母菌株的筛选奠定基础,保护我国本土酵母菌资源多样性。

4 结论

本研究对接种不同嗜杀特性的酿酒酵母NXU17-26、UCD522和UCD2610的赤霞珠葡萄发酵中的酵母菌进行了分离鉴定和多样性研究。通过结合WLN和26S rDNA基因序列分析将其鉴定为4属5种。其中,自然发酵中葡萄汁有孢汉逊酵母为优势种,接种发酵中酿酒酵母为优势种。同时利用Interdelta指纹图谱法和UPGMA聚类对酿酒酵母的菌株多样性进行了分析,结果显示,所接种的酿酒酵母是相应发酵中的优势菌,在接种敏感菌株UCD522的发酵中,野生酿酒酵母NXU18-15表现出较强的竞争力(基因型占比为34.04%),基因型占比仅次于UCD522(44.68%)。此外,分离自相同发酵中的酿酒酵母菌株间遗传差异性较小,分离自不同发酵中的酿酒酵母菌株间遗传差异性较大。

参考文献:

- [1] LEJEUNE C, ERNY C, DEMUYTER C, et al. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation[J]. Food Microbiol, 2006, 23: 709-716. DOI:10.1016/j.fm.2006.02.007.
- [2] ŠURANSKÁ H, VRÁNOVÁ D, OMELKOVÁ J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(1): 181-190. DOI:10.1016/j.bjm.2015.11.010.
- [3] VALERO E, CAMBON B, SCHULLER D, et al. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts[J]. Fems Yeast Research, 2007, 7(2): 317-329. DOI:10.1111/j.1567-1364.2006.00161.x.
- [4] SCHULLER D, CARDOSO F, SOUSA S, et al. Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e32507. DOI:10.1371/journal.pone.0032507.
- [5] CAPECE A, GRANCHI L, GUERRINI S, et al. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from two Italian wine-producing regions[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1018. DOI:10.3389/fmicb.2016.01018.
- [6] SUN Y, QIN Y, PEI Y F, et al. Evaluation of Chinese *Saccharomyces cerevisiae* wine strains from different geographical origins[J].

- American Journal of Enology and Viticulture, 2017, 68: 73-80. DOI:10.5344/ajev.2016.16059.
- [7] 宋育阳, 裴颖芳, 王国平, 等. 黑比诺接种发酵过程酵母菌的变化监控[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 125-130. DOI:10.3969/j.issn.1009-7848.2010.02.018.
- [8] VIGENTINI I, FABRIZIO V, FACCINCANI M, et al. Dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* populations in controlled and spontaneous fermentations for Franciacorta D.O.C.G. base wine production[J]. Annals of Microbiology, 2014, 64: 639-651. DOI:10.1007/s13213-013-0697-7.
- [9] 李梅花. 复合酵母在赤霞珠发酵过程中酵母菌相互作用研究[J]. 酿酒科技, 2016(11): 60-64. DOI:10.13746/j.njkj.2016254.
- [10] 王麟, 谭春明, 于刚. 嗜杀酵母的生物学特性及其应用[J]. 天津农学院学报, 2017, 24(1): 83-87; 92. DOI:10.3969/j.issn.1008-5394.2017.01.021.
- [11] 苑伟. 优选酿酒酵母菌株酿酒特性的比较研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010: 54-55.
- [12] DE ULLIVARRI M F, MENDOZA L M, RAYA R R. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts[J]. Biological Control, 2018, 121: 223-228. DOI:10.1016/j.biocontrol.2018.03.008.
- [13] VELAZQUEZ R, ZAMORA E, ÁLVAREZ M L. Using *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 289: 134-144. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.010.
- [14] VILLALBA M L, SAEZ J S, DEL MONACO S. TDKT. A new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 94-100. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006.
- [15] 李丽, 冯莉, 秦义, 等. 野生嗜杀白假丝酵母LFA418的产毒条件优化及其毒素粗提物特性[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 50-56. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201712008.
- [16] SATORA P, CIOCH M, TARKO T, et al. Killer strains of *Saccharomyces*: application for apple wine production[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2016, 122(3): 412-421. DOI:10.1002/jib.338.
- [17] 裴颖芳, 刘延琳. DNA分子标记技术在酿酒酵母菌株遗传多样性分析中的应用[J]. 中国农业科学, 2010, 43(5): 1023-1030. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2010.05.018.
- [18] KALLAI Z, PFLIEGLER W P, MITERCSAK J, et al. Preservation of diversity and oenological properties of wine yeasts during long-term laboratory maintenance: a study of strains of a century-old Tokaj wine yeast collection[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 101: 789-798. DOI:10.1016/j.lwt.2018.12.002.
- [19] YE D Q, YUE S, SONG Y Y, et al. Diversity and identification of yeasts isolated from tumultuous stage of spontaneous table grape germentations in central China[J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2018, 40(1): 1-7. DOI:10.21548/40-1-2950.
- [20] AYOUB M J, LEGRAS J L, SALIBA R, et al. Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(4): 699-711. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.02817.x.
- [21] PALLMANN C L, BROWN J A, OLINEKA T L, et al. Use of WL medium to profile native flora fermentations[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2001, 52(3): 198-203. DOI:10.1016/S0065-2164(01)49013-7.
- [22] 国家质量监督检验检疫总局. 葡萄酒、果酒通用分析方法: GB/T 15038—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [23] 黄英子. 冰酒发酵过程中酵母菌的多样性及动态变化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013: 17-19.
- [24] 孙悦. 不同氮素水平对酿酒酵母混合发酵特征的影响及其代谢物研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016: 24-27.
- [25] WANG C X, LIU Y L. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China[J]. Food Microbiology, 2013, 33: 172-177. DOI:10.1016/j.fm.2012.09.014.
- [26] 宋育阳, 白稳红, 刘延琳. 神索葡萄自然发酵酵母菌群研究[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 513-517. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2011.09.008.
- [27] 宋育阳, 裴颖芳, 刘延琳. 蛇龙珠自然发酵过程酵母菌的种类和动态变化[J]. 酿酒科技, 2009(7): 33-35.
- [28] 杨宽, 毛如志, 赵悦, 等. 云南香格里拉葡萄酒产区酿酒相关酵母菌的生物多样性[J]. 微生物学通报, 2018(12): 2708-2721. DOI:10.13344/j.microbiol.china.180065.
- [29] 杨宽, 杨婷, 陈云德, 等. 云南弥勒葡萄酒产区云中舞葡萄酵母菌多样性研究[J]. 云南农业大学学报, 2018, 33(2): 279-285. DOI:10.12101/j.issn.1004-390X(n).201703022.
- [30] MATURANO Y P, LERENA M C, MESTRE M V, et al. Inoculation strategies to improve persistence and implantation of commercial *S. cerevisiae* strains in red wines produced with prefermentative cold soak[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 97: 648-655. DOI:10.1016/j.lwt.2018.07.063.