

不同树龄葡萄自然发酵过程中酵母菌的研究

刘树文, 常亚维, 胡 廷, 焦红茹, 刘丽丽
(西北农林科技大学 葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**研究葡萄树龄与葡萄自然发酵过程中葡萄酒相关酵母菌之间的关系。**【方法】**利用 WL 培养基,对分离自华夏长城葡萄酒厂葡萄生产基地、不同树龄(2,3,5 年)西拉葡萄自然发酵液的 240 株酵母菌进行了聚类分析。**【结果】**240 株酵母菌共分为 5 个 WL 营养类型。结合酵母菌菌株 5.8 S rDNA-ITS 区基因序列分析,不同树龄西拉葡萄自然发酵液中的酵母菌共有 5 种,分别为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、陆生伊萨酵母(*Issatchenkia terricola*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*)、葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)。不同树龄西拉葡萄自然发酵过程中酵母菌的种类及其比例是变化的。**【结论】**用树龄较高的葡萄发酵,可加速发酵的启动,缩短发酵周期,同时有利于性状优良野生酿酒酵母菌株的筛选。

[关键词] 西拉葡萄;树龄;酵母菌;自然发酵;5.8 S rDNA-ITS 基因序列

[中图分类号] S663.1;TQ926.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)07-0051-06

Study on yeasts of different ages of grape in the course of spontaneous fermentation

LIU Shu-wen, CHANG Ya-wei, HU Ting, JIAO Hong-ru, LIU Li-li
(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shannxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The paper studied the relationship between the grape age and wine-related yeast in the process of spontaneous fermentation of grape. **【Method】** 240 wine-related yeasts isolated from different ages(Two years, Three years, Five years) of syrah vineyards of Huaxia Great Wall Winery were classed by WL Nutrient Medium. **【Result】** The result indicates that there are 5 WL culture types of the 240 strains. Identification analysis based on the sequence of 5.8 S rDNA-ITS region of the strains indicates that the isolates belong to 5 different species, *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia terricola*, *Pichia kluyveri*, *Cryptococcus flavescens* and *Hanseniaspora uvarum*. **【Conclusion】** Yeasts existing in the spontaneous fermentation of different ages of syrah vary in species and percentage. Using older grape for fermentation can quicken up the start-up of fermentation, shorten the period of fermentation, and is in favor of the filtration of wild yeast strains with eminent properties.

Key words: syrah; age of grape; yeast; spontaneous fermentation; 5.8 S rDNA-ITS gene sequence

酵母菌是自然界中分布较广的微生物之一,因用途广泛而备受关注,其中葡萄酒相关酿酒酵母与葡萄酒工业的发展息息相关。在影响葡萄酒质量的诸多因素中,生态条件与葡萄品种、工艺条件、酿酒设备和微生物 4 个因素起着决定性作用,这些因素的相互作用最终决定了葡萄酒的品质^[1-2]。酿酒微

* [收稿日期] 2007-07-25
[基金项目] 陕西省农业科技攻关项目(2005K02-G02)
[作者简介] 刘树文(1965—),男,黑龙江北安人,副教授,博士,主要从事葡萄酒工艺、发酵微生物研究。
E-mail:liushuwen@nwsuaf.edu.cn

生物是葡萄酒质量和感观风格的关键性因素。因为葡萄酒酿造的实质是微生物引起的生物转化过程,因此在其他因素相对稳定的情况下,葡萄酒微生物(酵母菌和乳酸菌)的酿酒适应性和酿造学特性在生产中的重要作用就显得十分突出。酵母菌是葡萄酒生产中的主要微生物,通过一系列代谢活动影响葡萄酒的风味及质量^[3]。研究葡萄酒相关酵母菌,对提高葡萄酒的质量及防治葡萄酒中的微生物病害具有重要作用^[1-2]。目前,国内外在对酵母菌的影响因素方面,尤其是葡萄品种和葡萄树龄与葡萄酒相关酵母菌的关系研究尚属空白。

本试验对不同树龄西拉葡萄自然发酵液中的酵母菌进行了聚类研究,旨在为研究葡萄树龄与葡萄酒相关酵母菌的关系提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 原 料 中国河北昌黎华夏长城葡萄酒有限责任公司酿酒葡萄基地 2 年、3 年和 5 年生西拉葡萄。

1.1.2 培养基 酵母菌菌株的分离培养采用 YEPD 培养基。YEPD 培养基的组成为: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,为抑制细菌生长,在培养基中加入 0.1 g/L 氯霉素。

酵母菌菌株的初步形态分类采用 WL 营养培养基。WL 营养培养基的组成为:酵母浸粉 4.0 g/L,蛋白胨 5.0 g/L,葡萄糖 50.0 g/L,琼脂 20.0 g/L,磷酸二氢钾 0.55 g/L,氯化钾 0.425 g/L,氯化钙 0.125 g/L,硫酸镁 0.125 g/L,氯化铁 0.0025 g/L,硫酸锰 0.0025 g/L,溴甲酚绿 0.022 g/L,pH 6.5^[4]。

1.1.3 主要试剂 引物(ITS1/ITS4)由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成,*Taq* 酶、*Hinf* I、*Hae* III、*Alu* I 均购自 Fermentas(MBI)。

1.1.4 主要仪器 包括 28 ℃培养箱、-20 和 4 ℃冰箱、37 和 65 ℃烘箱、离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶成像系统,均购自北京科普仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母菌菌株的分离 采用稀释平板涂布法^[5]。分离步骤为:采集葡萄浆果(葡萄园多点采样,并注意采集植株各个部位的浆果)→手工去梗、榨汁→置于已灭菌的容器中,于 28 ℃进行自然发酵→分别于发酵的前期(BF,1~2 d)、中期(MF,3~5

d)、后期(FF,6~7 d)取样,梯度稀释涂平板(YEPD 培养基)→28 ℃培养 3 d 后选取 10~15 个具有代表特征的菌落(据菌落干燥程度、粘稠度、表面光滑度、边缘整齐度来确定)进行保藏^[6]。

1.2.2 酵母菌菌株的初步形态分类 将保藏的菌株活化,划线接种于 WL 营养培养基,28 ℃培养 5 d 后,观察记录菌落的颜色、形态。然后根据菌落的形态、颜色将所采集的菌株进行初步分类^[4]。

1.2.3 酵母菌 DNA 的制备 采用石英砂破壁法^[7]。根据 WL 营养培养基的培养聚类结果,挑选每 1 种培养特征的代表菌株 2~3 株进行培养,3 d 后取 2~3 个菌落置于 200 μL 裂解液中,加入 3/10 体积石英砂振荡 13 min。65 ℃放置 10 min,加入 200 μL 醋酸钾(5 mol/L)冰浴 8 min,于 4 ℃、14 000 r/min 离心 5 min,转移上清液 300 μL 至另一无菌离心管中,加入 35 μL 醋酸钾(3 mol/L)及 180 μL 异丙醇,颠倒混匀,冰浴 8 min,于 4 ℃、14 000 r/min 离心 5 min,弃上清液收集沉淀。用 200 μL TE 溶液溶解沉淀,加入 10 μL RNase(25 μg/mL),65 ℃温浴 10 min,再加入 200 μL 氯仿-异戊醇溶液(V(氯仿):V(异戊醇)=24:1)抽提 1 次,于 4 ℃、14 000 r/min 离心 5 min,取上清液 200 μL 至另一无菌离心管中,加入 20 μL NaAc(3 mol/L)及 375 μL 无水乙醇,于 4 ℃、14 000 r/min 离心 8 min,弃上清液,收集染色体 DNA 沉淀,用 100 μL 体积分数 70%乙醇洗涤 1 次,于 4 ℃、14 000 r/min 离心 5 min,待乙醇挥发完全,用 30 μL TE 溶液溶解沉淀,放置于-20 ℃冰箱保藏备用。

1.2.4 酵母菌 5.8 S rDNA-ITS 区基因的 PCR 扩增 PCR 扩增所用引物^[8]由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成,包括 ITS1(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCTTAT-TGATATGC-3'),Esteve-zarzoso 目前已用其共鉴定了酵母菌的 25 个属、132 个种^[9],PCR 扩增目标区域为 5.8 S rDNA-ITS(图 1)^[10]。

PCR 反应体系为(50 μL):ddH₂O 34.7 μL,10× buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 3 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,10 μmol/L ITS1 2.5 μL,10 μmol/L ITS4 2.5 μL,5 U *Taq* 酶 0.3 μL,酵母菌 DNA 模板 1 μL。

PCR 扩增反应程序^[11]:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 1 min,52 ℃退火 2 min,72 ℃延伸 2 min,35 个循环;最后于 72 ℃延长 10 min,于 4 ℃条件下保

存。

图 1 酵母菌的 5.8 S rDNA-ITS 区域

Fig. 1 The 5.8 S rDNA-ITS region of yeast

1.2.5 PCR 扩增产物的限制性酶切及酶切片段分析 (1)PCR 扩增产物的限制性酶切。酶切反应体系为(20 μ L):ddH₂O 9 μ L,10 $\times$ buffer 2 μ L,PCR 扩增产物 8 μ L,各种限制性内切酶(*Hinf* I、*Hae*Ⅲ、*Alu* I)1 μ L。各种限制性内切酶(*Hinf* I、*Hae*Ⅲ、*Alu* I)的使用方法参见产品说明书。酶切反应体系于 37 $^{\circ}$ C 下酶切 3 h。将酶切产物用 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

(2)酶切片段的 PCR-RFLP 分析。DNA 限制性内切酶作用片段多态性(RFLP)是指每种 DNA 限制性内切酶都有特定的作用位点,来源不同菌株的 DNA 分子、结构和序列不同,用某一限制性内切酶作用后,会形成大小不等的一些片段,凝胶电泳后会形成种(株)特异性图谱^[12]。分析图谱可以达到区分菌株的目的,并可以通过与模式菌株图谱的比较对菌株进行鉴定^[13]。

本研究对酵母菌菌株 5.8 S rDNA-ITS 区 PCR 产物及其对应的 3 种核酸内切酶(*Hinf* I、*Hae*Ⅲ、*Alu* I)产物的条带进行统计,与已建立的 5.8 S rDNA-ITS 区 RFLP 数据库资料对照进行分析^[10]。

2 结果与分析

2.1 酵母菌菌株的形态分类结果

WL 营养培养基被用于监测饮料发酵过程中微生物类群的产生情况。Cavazza 等^[4]研究表明,在葡萄酒自然发酵过程中,出现的大多数典型酵母菌,均可根据其在 WL 营养培养基上的培养结果(菌落大小、颜色、干燥程度、粘稠度、表面光滑度、边缘整齐度)进行分类。根据在 WL 营养培养基上的培养结果,本研究采集的 240 株酵母菌菌株可分为 5 类(表 1)。

表 1 酵母菌菌株的形态分类结果^[4]

Table 1 Result in morphological classification of yeast Strains

营养类型 Culturetype	WL 营养培养基上的菌落形态 Morphology on WL nutrient medium	菌株编号 Strain	菌种 Species
I	奶油色,中心灰绿,圆锥型突起,表面光滑不透明,奶油状 Knobike, surface, smooth, opque, consistency of cream	X2-SF1-12 X2-SF2-2~6,8~11,13~17,19~27、29 X2-SF3-1~20 X3-SF1-10、20、25 X3-SF2-1~7,11,12,14~17,19~24,26~30 X3-SF3-1~20X 5-SF1-8,11,20,23,24、26 X5-SF2-1~5,7~9,11,12、15~27、29,30 X5-SF3-1~20	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
II	奶油色带灰绿色,平坦,边缘呈放射状表面干燥,面粉状 Cream with hint of blue, flat, convex, surface wrinkled, consistency of flour	X3-SF1-8	克鲁维毕赤酵母 <i>Pichia kluyveri</i>
III	奶油色,乳头状突起,边缘放射状表面干燥,面粉状 Cream pea-green, challiness, frin-ge, nipple-kile wrinkled	X2-SF1-6 X3-SF2-18 X5-SF1-6 X3-SF2-28	未提及 No recorder
IV	绿色至深绿色,平坦,表面光滑,不透明 Green and intensgreen, flate, surface smooth, consintency of cream	X2-SF1-1,2,4,5,7~11,13~30 X2-SF2-1,12,18,28,30 X3-SF1-1~3,5~7,9,11~19,21~24,26~30 X3-SF2-8~10,13,25 X5-SF1-1~5,7,9,10,12~19,21~22,25,27~30 X5-SF2-6,10,13,14,28	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>Hanseniaspora uvarum</i>
V	奶油色带灰绿色,圆顶状突起,表面湿润光滑,边缘整齐 Cream gray, elevated, smoothy and wetness	X2-SF1-3 X2-SF2-7 X3-SF1-4	未提及 No recorder

2.2 酵母菌菌株 5.8 S rDNA-ITS 区基因的 PCR 扩增结果

在 WL 营养培养基所分的 5 种营养类型中,挑选出代表性的酵母菌菌株共 24 株,使用引物 ITS1 和 ITS4 对其 5.8 S rDNA-ITS 区基因进行 PCR 扩

增,然后分别用 *Hinf* I、*Hae* III、*Alu* I 3 种限制性内切酶对该 PCR 扩增产物进行酶切,酶切产物经过 RFLP 分析及鉴定可知,所鉴定的酵母菌菌株有 5 种,此 5 种酵母菌的 PCR 扩增结果如图 2 所示。

图 2 5 种酵母菌 5.8 S rDNA-ITS 区基因的 PCR 扩增结果

M. DNA 分子量标准;1. 陆生伊萨酵母;2. 克鲁维毕赤酵母;3. 浅黄隐球酵母;4. 葡萄汁有孢汉逊酵母;5,6. 酿酒酵母

Fig. 2 Result of the PCR-amplified in 5.8 S rDNA region of five Species

M. DNA ladder;1. *Issatchenkia terricola*;2. *Pichia kluyveri*;3. *Cryptococcus flavescens*;

4. *Hanseniaspora uvarum*;5,6. *Saccharomyces cerevisiae*

由图 2 可知,1 号菌株的 PCR 产物长度为 450 bp,与数据库中陆生伊萨酵母(*Issatchenkia terricola*)区域的 PCR 产物长度描述完全一致;同时 1 号菌株经 WL 营养培养基培养,菌落形态属于Ⅲ类。2 号菌株的 PCR 产物长度为 470 bp,完全符合数据库中克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)区域的 PCR 产物长度;从其在 WL 营养培养基中培养结果可以看出,菌落形态属于Ⅱ类。3 号菌株的 PCR 产物长度为 550 bp,与数据库中浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*)区域的 PCR 产物长度一致,经 WL 营养培养基培养后菌落形态属于Ⅴ类。4 号菌株的 PCR 产物长度为 750 bp,与数据库中葡萄汁有孢汉

逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)区域的 PCR 产物长度相符,从其在 WL 营养培养基上培养结果可知菌落形态属于Ⅳ类。5、6 号菌株的 PCR 产物长度均为 850 bp,属于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),从其在 WL 营养培养基培养结果可知,菌落形态归为Ⅰ类。

2.3 酵母菌菌株 5.8 S rDNA-ITS 区基因扩增产物的 RFLP 分析

对所鉴定的 5 种酵母菌 5.8 S rDNA-ITS 区基因 PCR 扩增产物,分别用限制性内切酶 *Hinf* I、*Hae* III、*Alu* I 酶切,结果如图 3 所示。

图 3 5 种酵母菌 PCR 扩增产物的 3 种限制性内切酶酶切鉴定结果

A. *Hinf* I 酶切结果;B. *Hae* III 酶切结果;C. *Alu* I 酶切结果;M. DNA 分子量标准;1. 陆生伊萨酵母;2. 克鲁维毕赤酵母;

3. 浅黄隐球酵母;4. 葡萄汁有孢汉逊酵母;5,6. 酿酒酵母

Fig. 3 Restriction analysis of five spieces PCR products with three restriction endonucleases

A. Restriction analysis of *Hinf* I;B. Restriction analysis of *Hae* III;C. Restriction analysis of *Alu* I;M. DNA ladder;1. *I. terricola*;

2. *P. kluyveri*;3. *C. flavescens*;4. *H. uvarum*;5,6. *S. cerevisiae*

由图 3 可知,1 号菌株 PCR 扩增产物经 *Hinf* I 酶切,有 3 个片段(240,105 和 80 bp);经 *Hae* III 酶

切,有 2 个片段(290 和 125 bp);经 *Alu* I 酶切有 2 个片段(310 和 80 bp)。2 号菌株 PCR 扩增产物经 *Hinf* I 酶切,有 2 个片段(250 和 220 bp);经 *Hae* III 酶切片段大小分别为 375 和 85 bp;*Alu* I 酶切后片段大小分别为 350 和 80 bp。3 号菌株 PCR 扩增产物经 *Hinf* I 酶切后出现了 3 个片段(300,180 和 70 bp);经 *Hae* III 和 *Alu* I 酶切后,均只有 1 个片段(550 bp)。4 号菌株 PCR 扩增产物经 *Hinf* I 酶切后,片段大小分别为 350,200 和 180 bp;经 *Hae* III 酶切后的片段大小为 750 bp;经 *Alu* I 酶切后的片段

为 525 和 175 bp。5、6 号菌株 PCR 扩增产物经 *Hinf* I 酶切后的片段均为 380,140 和 80 bp;经 *Hae* III 酶切后的片段均为 320,230,200 和 120 bp;经 *Alu* I 酶切后的片段均为 800 bp。以上结果与 5 种酵母菌在数据库中所描述的相关信息一致^[10]。

根据 WL 营养类型、5.8 S rDNA-ITS 区基因 PCR 产物片段大小及其 *Hinf* I、*Hae* III、*Alu* I 3 种限制性内切酶酶切产物片段大小,可将 24 株代表酵母菌菌株分为 5 种(表 2)。

表 2 24 株代表酵母菌菌株的 WL 营养类型、PCR 产物及酶切鉴定结果

菌株编号 Strain	WL 营养类型 Cultue type	菌种 Species	PCR 产物/bp Size of PCR products	酶切片段/bp Size of the restriction fragment		
				<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Alu</i> I
X2-SF1-6	Ⅲ	陆生伊萨酵母 <i>I. terricola</i>	450	240+105+80	290+125	310+80
X3-SF2-18	Ⅲ	陆生伊萨酵母 <i>I. terricola</i>	450	240+105+80	290+125	310+80
X5-SF1-6	Ⅲ	陆生伊萨酵母 <i>I. terricola</i>	450	240+105+80	290+125	310+80
X3-SF2-28	Ⅲ	陆生伊萨酵母 <i>I. terricola</i>	450	240+105+80	290+125	310+80
X3-SF1-8	Ⅱ	克鲁维毕赤酵母 <i>P. kluyveri</i>	470	250+220	375+85	350+80
X2-SF1-3	V	浅黄隐球酵母 <i>C. flavescens</i>	550	300+180+70	550	550
X2-SF2-7	V	浅黄隐球酵母 <i>C. flavescens</i>	550	300+180+70	550	550
X3-SF1-4	V	浅黄隐球酵母 <i>C. flavescens</i>	550	300+180+70	550	550
X2-SF1-1	Ⅳ	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>H. uvarum</i>	750	350+200+180	750	525+175
X2-SF2-12	Ⅳ	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>H. uvarum</i>	750	350+200+180	750	525+175
X3-SF1-1	Ⅳ	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>H. uvarum</i>	750	350+200+180	750	525+175
X5-SF1-6	Ⅳ	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>H. uvarum</i>	750	350+200+180	750	525+175
X3-SF2-13	Ⅳ	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>H. uvarum</i>	750	350+200+180	750	525+175
X5-SF1-1	Ⅳ	葡萄汁有孢汉逊酵母 <i>H. uvarum</i>	750	350+200+180	750	525+175
X5-SF2-14	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X3-SF1-10	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X2-SF1-12	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X3-SF3-1	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X5-SF1-8	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X2-SF2-6	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X2-SF3-20	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X3-SF2-19	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X5-SF2-9	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800
X5-SF3-4	I	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	850	380+140+80	320+230+200+120	800

2.4 不同树龄葡萄自然发酵过程中酵母菌群分析

对所采集的 240 株酵母,根据 WL 培养基的初步形态鉴定,并结合菌株 5.8 S rDNA-ITS 区基因序列测定结果及限制性酶切片段长度多态性分析(RFLP),得到不同树龄西拉葡萄各发酵阶段中,5 种酵母菌占酵母总数比例(图 4)。

由图 4 可以看出,在不同树龄西拉葡萄的自然发酵过程中,发酵前期酵母种类相对较复杂,但均以葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)占主导地位,其占酵母总数的 80%左右,其他 4 种酵母所占比例很少(为 3%~7%),随着发酵的进行,

葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)逐渐被酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)替代;在发酵中期,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)均占酵母总数为 80%左右;到发酵末期,其他酵母菌群消失,仅有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[14]。同时在发酵前期和中期,随着葡萄树龄的增加,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)占酵母总数比例均有所增大,而且随着树龄差距的增加,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的比例也相应增大。产生这种差异的原因可能是随着发酵的进行,发酵液成分发生变化所致。

3 结 论

不同树龄西拉葡萄自然发酵过程中,酵母菌种类是变化的,2 年生西拉葡萄中有 4 种,分别是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、陆生伊萨酵母(*Issatchenkia terricola*)、浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*)和葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*);3 年生西拉葡萄中有 5 种,分别是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、陆生伊萨酵母(*Issatchenkia terricola*)、克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)、浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*)和葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*);5 年生西拉葡萄中有酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、陆生伊萨酵母(*Issatchenkia terricola*)和葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)3 种。在这 3 个树龄中,占主导地位的酵母菌均是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),其次是葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*),其他种类酵母所占比例很少。其中 5 年生西拉葡萄中存在的酵母种类在 2 年生和 3 年生西拉葡萄中均存在,而且随着树龄的增加,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的比例逐渐增加,葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*)的比例则降低。陆生伊萨酵母(*Issatchenkia terricola*)在 2 年生和 3 年生西拉葡萄中比例较少,而在 5 年生西拉葡萄中的比例有所增加。除此之外,2 年生西拉葡萄中还存在浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*),3 年生西拉葡萄中不仅存在浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*),还有克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)的存在,但这些酵母菌群所占比例均很小。这可能是因为不同树龄葡萄果实成分存在差异所致。

本研究结果表明,用树龄较高的葡萄发酵,可能会加速发酵的启动,缩短发酵周期,同时有利于性状优良野生酿酒酵母菌株的筛选。

[参考文献]

- [1] 张春晖,李 华.葡萄酒微生物学[M].西安:陕西人民出版社,2003.
Zhang C H, Li H. Enological microbiology [M]. Xian: Shaanxi People Publishing Company, 2003. (in Chinese)
- [2] [德]赫尔姆特·汉 斯·迪特里希.葡萄酒微生物学[M].宋尔康,译.北京:轻工业出版社,1989:1-12.
[Germany] Hermoter, Hanse, Diterlixi. Enological microbiology [M]. Translated by Song E K. Beijing: Light Industry Publishing Company, 1989: 1-12. (in Chinese)
- [3] Henschke P, Zimmerman F K, Entian K D. Yeast sugar metabolism, biochemistry, genetics, biotechnology and applications Lancaster [M]. UK: Technomic Publishing, 1997: 527-534.
- [4] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini [J]. Vignevini, 2002, 9: 17-20.
- [5] 程丽娟,薛泉宏.微生物学实验技术[M].西安:世界图书出版社,2000.
Chen L J, Xue Q H. Experiment technology of microbiology [M]. Xian: Publishing Company of World Books, 2000. (in Chinese)
- [6] Valles B S, Rosa P B, Norman F, et al. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider [J]. Food Microbiology, 2007, 24: 25-31.
- [7] 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(4): 89-92.
Zhou X L, Shen W, Rao Z M, et al. A fast method of distilling epiphyte chromosome of DNA [J]. Microbiology, 2004, 31(4): 89-92. (in Chinese)
- [8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1990, 132: 54-63.

(下转第 63 页)