

# 祁连葡萄酒产区葡萄酒相关 野生酵母菌株的分离及初步分类

张珍<sup>1</sup>, 韩舜愈<sup>1\*</sup>, 王婧<sup>1</sup>, 盛文军<sup>1</sup>, 杨学山<sup>2</sup>, 侯晓瑞<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;

2. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:**取祁连葡萄酒产区葡萄园原料自然发酵筛选葡萄酒相关野生酵母菌株68株,利用YEPD培养基的形态观察以及WL营养培养基的聚类分析,并结合生理生化实验对其进行初步分类,结果表明,与葡萄酒相关的野生酵母菌株有假丝酵母、有孢汉逊酵母、酒香酵母、毕赤氏酵母、红酵母以及酿酒酵母,其中有孢汉逊酵母属和酒香酵母属为优势菌株。

**关键词:**野生酵母, 筛选, 生理生化, WL营养培养基

## Isolation and preliminary classification of the wine-related wild yeast strains from qilian wine region

ZHANG Zhen<sup>1</sup>, HAN Shun-yu<sup>1\*</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, SHENG Wen-jun<sup>1</sup>, YANG Xue-shan<sup>2</sup>, HOU Xiao-rui<sup>1</sup>

(1. Food Science and Engineering College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

(2. Life Science and Technology College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In the test, the material from Qilian wine region vineyards fermented naturally to screen wine-related wild yeast strains 68. The YEPD medium morphological observation, WL nutrient medium clustering analysis and physiological and biochemical tests were used to classify initially. The result showed that wine-related wild yeast strain including *Candida*, *H. uvarum*, *Brettanomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* and *Saccharomyces cerevisiae*, in which *H. uvarum* and *Brettanomyces* were predominant strains.

**Key words:** wild yeast; screening; physiology and biochemistry; WL nutrient medium

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)08-0179-04

酵母菌是葡萄酒生产的主要微生物,酵母菌的种类和特点直接影响到葡萄酒的口感和风味,决定葡萄酒品质的优劣<sup>[1-2]</sup>。目前我国葡萄酒酿造使用的酵母菌完全依赖进口,导致葡萄酒质量同质化问题日趋严重。同时,进口活性干酵母的使用会降低酵母多样性和本土酵母作用的重要性,使本土酵母菌资源受到严重威胁,急需对野生酿酒酵母菌的本土资源进行研究和保护<sup>[3]</sup>。而甘肃河西地区地处黄河上游,紧邻东部季风区、西北干旱区和青藏高原区,具有典型的气候特征和独特的生态条件,蕴含着丰富的酵母菌资源,因此,野生酵母菌的收集和保藏有助于保护本土酵母菌资源,而且对我国葡萄酒产业发展具有实际意义<sup>[4]</sup>。葡萄酒酿造是一个复杂的生态学及生物化学过程,Constant等研究了一些葡萄品种自然发酵过程中酵母菌种类的变化。这些酵母菌主要

来源于葡萄浆果表面,有研究表明,在葡萄浆果表面占据主导地位的酵母菌主要是葡萄汁有孢汉逊酵母、假丝酵母、红酵母及克鲁维酵母<sup>[5]</sup>。非酵母属的酵母在发酵初期生长良好,随后被耐酒精能力更强及在高糖环境中更具竞争力的酿酒酵母所代替<sup>[6]</sup>。由于不同葡萄产区本土酵母具有独特的代谢特性,有利于生产出独具地区特色的葡萄酒<sup>[6]</sup>,因此开展对葡萄酒产区野生酵母菌资源的分类研究,具有重要的实际意义。本实验旨在分离保藏甘肃葡萄酒主产区之一——祁连葡萄酒产区的酿酒酵母资源,并根据生理生化实验以及酵母菌在Wallerstein Laboratory Nutrient Agar(WL营养培养基)上所形成的菌落颜色和形态,对野生酵母菌株进行初步分类鉴定。初步揭示此地区相关酵母菌资源状况,为本地区葡萄酒酿造酵母种子资源库的建设奠定一定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

菌株来源 于祁连葡萄酒厂葡萄种植基地(总面积约500公顷)取相聚较远的三个地块采摘新鲜、成熟度较好的红葡萄浆果(蛇龙珠)进行自然发酵,从自然发酵醪中分离野生酵母菌株;YEPD培养基 酵

收稿日期:2012-09-19

作者简介:张珍(1986-),女,硕士研究生,主要从事葡萄酒微生物方面的研究。

基金项目:甘肃省科技厅科技支撑计划(1011NKCA059);甘肃河西地区野生葡萄酒酵母资源收集及优选(GAU-CX1106)。

母浸膏1.0%, 蛋白胨2.0%, 葡萄糖2.0%, 琼脂2.0%, 为了在筛选过程中排除细菌的干扰, 在YEPD培养基中添加60 $\mu$ g/mL链霉素; WL营养培养基(Wallerstein Laboratory Nutrient Agar) 酵母浸粉0.4%, 胰蛋白胨0.5%, 葡萄糖5%, 琼脂2%; 储液A 磷酸二氢钾5.5g, 氯化钾4.25g, 氯化钙1.25g, 硫酸镁1.25g, 定容至400mL, 使用时按40mL/1000mL比例添加; 储液B 氯化铁0.25g, 硫酸锰0.25g, 定容至100mL, 使用时按1mL/1000mL比例添加; 储液C 0.44g溴甲酚绿溶于100mL 50%乙醇溶液中, 使用时按1mL/1000mL比例添加; 同化氮源基础培养基 葡萄糖20.0g, 磷酸氢二钾1.0g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, 酵母膏0.2g, 琼脂20.0g, 蒸馏水1000mL。

SW-CJ-2FD型超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; CPJ214型电子天平 奥豪斯仪器(上海)有限公司; SYQ-DSX-280B型手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; Nikon Eclipse E100型光学显微镜 上海衡浩仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 葡萄酒相关酵母菌株的分离及保藏<sup>[7]</sup> 参照A Capece等方法<sup>[8]</sup>, 采用葡萄汁自然发酵法分离: 将采集的葡萄浆果1kg手工破碎后, 并添加链霉素混匀, 置于5L无菌玻璃罐中, 室温自然发酵, 每隔48h取样, 梯度稀释(10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup>)后涂于YEPD平板培养基, 28℃培养2~3d, 待形成清晰易辨的菌落时, 挑取形态不同的菌落, 在YEPD平板培养基上划线纯化2~3次, 经纯化后, 将纯化后的单菌株在YEPD液体培养基中活化1d, 将活化的菌液与30%无菌甘油以1:1混合于甘油管中, -80℃下冻藏。

1.2.2 初筛菌株的形态学观察 从自然发酵醪中分离出的野生酵母菌株进行形态学鉴定, 主要进行细胞形态特征、繁殖方式、培养特征等方面的鉴定<sup>[9]</sup>。

### 1.2.3 生理生化实验

1.2.3.1 氮源同化实验 配制同化氮源基础培养基, 灭菌后制斜面, 接入供试菌(以没有加氮源的斜面试管作为对照)后28℃恒温培养1周, 观察。试管中没有菌落生长记为“-”, 反之记为“+”。

1.2.3.2 糖发酵实验 将活化好的酵母菌接种于糖发酵试管内摇匀, 28℃培养。每天观察杜氏小管内气体产生情况。

1.2.3.3 子囊孢子观察 将酵母菌接种于麦氏琼脂斜面, 培养约1周后, 染色镜检。

1.2.3.4 水解尿素实验 挑取活化好的菌株, 接种于制好的斜面上, 28℃培养, 每天观察结果, 5~7d后, 若斜面呈现淡红色, 则说明此菌株能分解尿素<sup>[10-11]</sup>。

1.2.4 菌株的WL聚类分析 将保藏的酵母菌株用YEPD液体培养基活化1~2d, 分别划线接种于WL营养培养基, 于28℃培养, 观察, 记录菌落颜色和形态。

## 2 结果与讨论

### 2.1 初筛菌株形态学鉴定结果

通过平板划线分离纯化结合镜检, 初步筛选出68株酵母菌株。依据酵母菌形态学特征的描述, 根据菌落特征、细胞形态及繁殖方式的不同<sup>[12]</sup>, 将得到的68株菌株进行初步分类(见表1)。

菌株编号为H6、J14、J15、R1~3、N7~10、M2~6和Z6、Z16的繁殖方式为单边芽殖, H1~5、H7~8、H10~13、M7~10、N1~2和Z1、Z7~15的繁殖方式为两端出芽, J1~13、H9、H14、N3~6、Z2~5、M1为多边芽殖; 编号为R1~3、N7~10的菌落显示出淡红色, Z1、Z7~15、N2、H10~13和M7~10的菌落颜色为淡紫色, H1、H8、N1、H9、H14、M1和J12~13的菌落为乳黄色, 而且H1、H8、N1的菌落相比于其他菌株的菌落较小, 其余36株菌株的菌落均为乳白色。

### 2.2 生理生化鉴定结果

将本实验筛选到的68株葡萄酒相关酵母菌株归为12类, 并按照1.2.3所示的实验方法, 将筛选出的菌株分别进行子囊孢子观察、氮源同化实验、糖发酵实验、水解尿素实验, 结果见表2。

表2子囊孢子观察结果表明, 除了类型I、V中的7株菌株未观察到子囊孢子, 其余61株供试菌株都观察到2~4个子囊孢子; 水解尿素实验结果表明, 类型III、V、IX、X中包含的19株菌株的斜面呈现红色, 其余49株菌株未出现红色, 说明只有类型III、V、IX、X中包含的19株菌株可以分解尿素; 糖发酵实验结

表1 68株菌株形态学结果

Table 1 Morphological results of 68 strains

菌株编号	菌落	细胞形态	繁殖方式
H1、H8、N1	乳黄色, 菌落较小, 扁平, 边缘光滑	椭圆形	两端出芽
H2~5、H7	乳白色, 表面凸起, 顶部较尖, 边缘光滑	椭圆形	两端出芽
H6、J14~15	乳白色, 表面隆起, 边缘光滑	椭圆形	单边芽殖
H9、H14	乳黄色, 表面隆起, 边缘光滑	椭圆形	多边芽殖
R1~3、N7~10	淡红色, 表面隆起, 边缘光滑, 粘稠	圆形	单边芽殖
J1~3、J5	乳白色, 表面隆起, 边缘光滑	圆形	多边芽殖
J4、J6~11	乳白色, 表面凸起, 边缘光滑	椭圆形	多边芽殖
M1、J12~13	乳黄色, 表面隆起, 边缘光滑	椭圆形	多边芽殖
M3、M6、Z16	乳白色, 表面隆起, 边缘光滑	圆形	单边芽殖
M2、M4~5、Z6	乳白色, 表面凸起, 边缘光滑	椭圆形	单边芽殖
N3~6、Z2~5	乳白色, 表面隆起, 边缘光滑	椭圆形	多边芽殖
Z1、Z7~15、N2、H10~13、M7~10	淡紫色, 表面隆起, 边缘光滑	圆形	两端出芽

表2 68株菌株生理生化实验结果  
Table 2 Physiological and biochemical test results of 68 strains

类型	菌株编号	子囊孢子	尿酶反应	糖发酵实验			氮源同化实验		碳源同化实验		
				葡萄糖	蔗糖	乳糖	KNO <sub>3</sub>	葡萄糖	蔗糖	乳糖	
I	H1、H8、N1	0	-	+	+	-	+	+	+	-	
II	H2~5、H7	2~3	-	+	+	-	+	+	+	-	
III	H6、J14~15	2~3	+	+	+	-	-	+	+	-	
IV	H9、H14	2~3	-	+	+	-	-	+	+	-	
V	J1~3、J5	0	+	-	-	-	-	-	-	-	
VI	J4、J6~11	2	-	+	+	-	-	+	+	-	
VII	M1、J12~13	2	-	+	+	-	-	+	+	-	
VIII	M3、M6、Z16	2	-	+	+	-	-	+	+	-	
IX	M2、M4~5、Z6	2~3	+	+	+	-	-	+	+	-	
X	N3~6、Z2~5	2~3	+	+	+	-	-	+	+	-	
XI	Z1、Z7~15、N2、H10~13、M7~10	2	-	+	+	-	-	+	+	-	
XII	R1~3、N7~10	2~4	-	+	+	-	+	+	+	-	

注：脲酶反应中，“-”表示不能够水解尿素，“+”表示能够水解尿素；糖发酵实验中“-”表示不能够发酵此糖，“+”表示能够发酵此糖；碳源与氮源实验中，“-”表示不能够同化，“+”表示能够同化。

表3 WL营养培养基对葡萄酒相关酵母菌的鉴别<sup>[1]</sup>  
Table 3 WL nutrient medium to identify wine-related yeast

菌种	菌落颜色	菌落形态
酿酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	奶油色带绿色	球形突起、表面光滑、不透明、奶油状
戴尔有孢圆酵母 ( <i>Torulaspora delbrueckii</i> )	奶油色带淡淡的绿色	球形突起、表面光滑、不透明、奶油状
葡萄汁有孢汉逊酵母 ( <i>Hanseniaspora uvarum</i> )	深绿色	扁平、表面光滑不透明、黄油状
路氏类酵母 ( <i>Saccharomyces ludwigii</i> )	鲜绿色	球形突起、表面光滑、不透明、奶油状
栗酒裂殖酵母 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )	深绿色	菌落很小，表面光滑、不透明、黄油状
红酵母 ( <i>Rhodotorula species</i> )	红色	球形突起、突面、表面光滑、粘稠、黄油状
全美梅氏酵母 ( <i>Metschnikowia pulcherrima</i> )	奶油色，带淡淡的红色；红棕色	菌落小、突面、面粉状
膜醭毕赤氏酵母 ( <i>Pichia membranaefaciens</i> )	灰绿色带淡蓝色	较高的突面、表面褶皱、面粉状
异常汉逊氏酵母 ( <i>Hansenula anomala</i> )	奶油色到蓝灰色；8d后呈蓝色	扁平、表面光滑、奶油状
中间型酒香酵母 ( <i>Brettanomyces intermedius</i> )	奶油色 (8d后呈现)	菌落小、较高的圆屋顶状突起、表面光滑、奶油状
拜耳结合酵母 ( <i>Zygosaccharomyces bailii</i> )	奶油色	菌落小、较高的圆屋顶状、表面光滑、奶油状
假丝酵母 ( <i>Candida species</i> )	中央奶油色、边缘绿色	扁平、光滑、不透明
克鲁维毕赤氏酵母 ( <i>Pichia kluyveri</i> )	白色带淡绿色	表面褶皱、粗糙、扁平、中央火山状

果表明，除了菌株J1~3、J5之外，其余菌株都能够利用葡萄糖、蔗糖，并且所有供试菌株均不能够利用乳糖；氮源同化实验结果说明，只有类型 I、II、XII中的15株菌株能够同化KNO<sub>3</sub>，其余53株菌株均不能同化KNO<sub>3</sub>。碳源同化实验结果表明，多数菌株都可以同化葡萄糖和蔗糖，然而菌株J1~3、J5不能同化这两种糖，同时结果表明，所有供试菌株不能同化乳糖。

### 2.3 WL营养培养基鉴定结果

WL营养琼脂培养基常被用来监测饮料发酵过程中的微生物类群。国内外研究发现，利用酵母菌株在WL固体培养基上的菌落特征的不同，大多数典型的葡萄酒相关酵母都可以用WL培养基进行区分<sup>[6]</sup>，葡萄酒相关酵母菌在WL营养培养基上生长的菌落颜色及其形态聚类如表3所示。

将2.2结果中的每一类别优选出1株代表菌株在WL营养培养基上培养，观察菌株所形成的菌落颜色和形态。供试菌株编号为：H1、H2、H6、H9、R1、J3、

J4、M1、M3、M4、N3、Z7。

依据表3中菌落颜色和形态对照可知，以上菌株归为6个属。选育出的12株野生酵母菌中，H6、M3、M4为假丝酵母属。假丝酵母经常出现在葡萄浆果表面，自然发酵的葡萄汁开始发酵时有大量的假丝酵母存在。H1、H9、M1为毕赤氏酵母属，毕赤氏酵母为非常典型的产膜酵母，对酒精的耐受力一般较弱，通常能够生长在酒精含量低于10% (v/v) 的葡萄酒中。J4、N3为酒香酵母属。Z7为有孢汉逊酵母属，是葡萄采收时浆果表面的主导自然酵母菌群，不耐酒精，只能在酒精发酵前活动。R1为红酵母，研究发现，此菌株不能发酵，但能同化某些糖类，无酒精发酵能力，能合成脂肪、葡萄糖。菌株H2、J3为酿酒酵母，是葡萄酒生产中最主要的酵母菌，当基质中的氧和营养物质被完全消耗并产生酒精后，绝大部分酵母死亡，然而酿酒酵母开始占据主导地位 (10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>cfu/g)，使发酵继续，直至完成。酿酒酵母在WL营养培养基上培

表4 自然发酵过程中葡萄酒相关酵母在WL营养培养基上的生长记录

Table 4 Growth record of wine-related yeast in WL nutrient medium during the natural fermentation

菌株编号	菌落颜色	菌落形态
H1	白色带淡绿色	表面褶皱、粗糙、扁平、中央火山状
H2	奶油色带绿色	球形突起、表面光滑、不透明、奶油状
H6	中央奶油色,边缘绿色	扁平、光滑、不透明
H9	白色带淡绿色	表面褶皱、粗糙、扁平、中央火山状
J3	奶油色带绿色	球形突起、表面光滑、不透明、奶油状
J4	奶油色	菌落小、较高的圆屋顶状突起、表面光滑、奶油状
M1	白色带淡绿色	表面褶皱、粗糙、扁平、中央火山状
M3	中央奶油色,边缘绿色	扁平、光滑、不透明
M4	中央奶油色,边缘绿色	扁平、光滑、不透明
N3	奶油色	菌落小、较高的圆屋顶状突起、表面光滑、奶油状
Z7	深绿色	扁平、表面光滑不透明、黄油状
R1	红色	球形突起、突面、表面光滑、粘稠、黄油状

养所形成的菌落颜色均为奶油色带绿色,菌落形态为球形突起,表面光滑,不透明,奶油状。国外研究者MARTINI A等<sup>[14]</sup>未能从健康、成熟的葡萄浆果表面分离筛选到酿酒酵母,但Mortimer R等<sup>[15]</sup>研究发现,破损的葡萄浆果会为*S. cerevisiae*在葡萄园中栖息提供良好的条件。

### 3 结论

本实验根据观察菌株的形态学,初步分离出68株菌株,并依据生理生化实验以及WL营养培养基的聚类分析,将68株菌株归为6个属,其中,假丝酵母属11株占16.2%,有孢汉逊酵母属19株占28.0%、酒香酵母属14株占20.6%、毕赤氏酵母属8株占11.8%、红酵母7株占10.3%、酿酒酵母9株占13.2%。本实验结果为筛选适合该产区葡萄酒生产的优良酿酒酵母菌种奠定了基础,但有关该产区野生酵母的发酵特性及其利用价值还需做进一步研究。

### 参考文献

- [1] 陈兰兰,童军茂,单春会. 葡萄酒优势酵母菌筛选的研究进展[J]. 农产品加工,2008(3):65-66.
- [2] 周丽艳,刘绍军,刘畅. 特色葡萄酒酵母菌种选育研究进展[J]. 中国酿造,2008,14:6-7.
- [3] 杨莹. 新疆地区葡萄酒相关酵母菌的生物多样性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [4] 刘爱国,刘延琳,王泽举,等. 宁夏葡萄自然发酵过程中酵母菌的分子生物学鉴定[J]. 西北农林科技大学学报,2008,36(11):203-204.

- [5] 杨雪峰,苏龙,刘树文. 利用WL营养培养基鉴定葡萄酒中的相关酵母菌[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2006,4:4-7.
- [6] 徐艳文,刘爱国,刘延林. 甘肃莫高葡萄酒厂酵母种群的生态分布[J]. 生态学报,2009,29(6):3091-3092.
- [7] 周德庆. 微生物学教程[M]. 第二版. 北京:高等教育出版社,1991:151-186.
- [8] A Capece, R Pietrafesa, P Romano. Experimental approach for target selection of wild wine yeasts from spontaneous fermentation of "Inzolia" grapes[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2011,27:2775-2783.
- [9] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification[M]. 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- [10] 徐岩,康文怀. 葡萄酒酿造微生物学——实验技术与规程[M]. 第二版. 北京:中国轻工业出版社,2010:184-192.
- [11] YARROW D. The Yeasts[M]. 4th ed. Elsevier, New York, NY: C.P. Kurtzman and J.W. Fell (Eds.), 1998:77-100.
- [12] Krejer-van Rij N J W. The Yeasts: a Taxonomic Study[M]. 4rd edn. Amsteram: Elsevier, 1998.
- [13] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti ievini[J]. Vignevini, 1992,9:17-20.
- [14] MARTINI A, CIANI M, SCORZETTI G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces[J]. Am J Enol Vitic, 1996,47:435-440.
- [15] MORTIMER R, POLSINELLI M. On the origins of wine yeast[J]. Res Microbiol, 1999,150:199-204.
- [16] 李双石,陈晶瑜,韩北忠. 中国本土葡萄酒酵母种群多样性分布的研究进展[J]. 中国酿造,2011(12):4-7.

(上接第169页)

- [10] 杨超,赵娜,田斌强,等. 阴米淀粉糊的流变特性[J]. 食品科学,2010,31(11):5-10.
- [11] 夏红. 直链淀粉含量与稻米的糊化温度及胶凝度的关系[J]. 食品科学,1998,19(9):12-13.
- [12] 杨雪峰,罗志刚,罗发兴. 淀粉晶体结构研究进展[J]. 食品工业科技,2007,28(7):240-243.
- [13] 耿凤英. 预处理对淀粉结构及化学反应活性的影响[D].

- 天津:天津大学,2010.
- [14] 张雅媛,洪雁,顾正彪,等. 玉米淀粉与黄原胶复配体系流变和凝胶特性分析[J]. 农业工程学报,2011,27(9):357-361.
  - [15] 王元兰,魏玉. K-卡拉胶与魔芋胶复配体系的流变特性[J]. 食品科学,2011,32(5):92-95.
  - [16] 谭洪卓,谷文英,刘敦华,等. 甘薯淀粉糊的流变特性[J]. 食品科学,2007,28(1):58-63.