



引用格式:张俊杰,尚益民,程大伟,等.河南安阳赤霞珠葡萄果表酵母菌的分离与鉴定[J].轻工学报,2018,33(3):39-44.

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.03.005

文章编号:2096-1553(2018)03-0039-06

河南安阳赤霞珠葡萄果表酵母菌的分离与鉴定

Isolation and identification of yeast strains from *Cabernet Sauvignon* in Anyang, He'nan Province

张俊杰^{1,2},尚益民²,程大伟¹,宋玉婷²,陈锦永¹,刘崇怀¹

ZHANG Junjie^{1,2}, SHANG Yimin², CHENG Dawei¹, SONG Yuting², CHEN Jinyong¹, LIU Chonghuai¹

1. 中国农业科学院 郑州果树研究所,河南 郑州 450009;

2. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450002

1. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China;

2. School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

关键词:

赤霞珠葡萄;酵母菌;
26S rDNA D1/D2;
分离鉴定

Key words:

Cabernet Sauvignon;
yeast strain;
26S rDNA D1/D2;
isolation and
identification

摘要:为了丰富对安阳地区赤霞珠葡萄果表酵母菌组成的认识,从采自安阳地区的赤霞珠葡萄果表进行富集、分离、纯化得到70株酵母菌,通过传统的形态学分类与现代分子生物学鉴定,这70株酵母菌被确定为3个已知酵母属的3个种,分别为 *Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia terricola* 和 *Candida quercitrusa*, 其中 *Hanseniaspora opuntiae* 和 *Pichia terricola* 为优势种群,而 *Candida quercitrusa* 的含量极少. 该研究对产区特色葡萄酒的酿造具有一定的实践指导意义.

收稿日期:2018-03-26

基金项目:河南省自然科学基金项目(162300410330);国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-30-YZ-1);郑州轻工业学院博士科研基金项目(2014BSJJ006)

作者简介:张俊杰(1984—),男,河南省汝州市人,中国农业科学院郑州果树研究所博士后,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为微生物分类与分子生态学.

通信作者:刘崇怀(1965—),男,陕西省西安市人,中国农业科学院郑州果树研究所研究员,博士,主要研究方向为葡萄遗传育种.

Abstract: In order to enrich the understanding of the composition of the yeast strains of the *Cabernet Sauvignon* in planting region of Anyang, 70 yeast strains were enriched, isolated and purified from the *Cabernet Sauvignon* surface. Combined with traditional morphological classification and identification of modern molecular biology, these 70 yeast strains were identified as three well-known yeast species: *Hanseniopora opuntiae*, *Pichia terricola* and *Candida quercitrusa*, in which *Hanseniopora opuntiae* and *Pichia terricola* were dominant, while only few strains belong to *Candida quercitrusa*. This study has a good practical significance for the brewing of specialty wines in the producing areas.

0 前言

我国葡萄品种较多,种植广泛,不同产区生态条件差异较大,这就使得葡萄果表蕴含的酵母菌较为丰富^[1]. 酵母菌是葡萄酒酿造过程中最重要的微生物菌群^[2]. 葡萄酒自然发酵过程中的大多数酵母菌来自果皮,仅有少数来自空气^[3]. 酵母菌不仅影响葡萄酒质量,而且对其色泽、香气、感官品质和风格等的形成有重要贡献^[4]. 因此,因地制宜地筛选土著酵母菌株,对于生产有地域特色的葡萄酒至关重要^[5];同时,可为利用酵母菌资源开展遗传多样性研究奠定坚实的酵母菌菌种基础^[6].

传统酿酒酵母的分类鉴定主要根据细胞繁殖类型,产孢子状况,菌落的颜色、大小和形态,以及生理生化试验结果等,再参照《酵母菌的特征和鉴定手册》^[7]进行相关菌种的鉴定,然而,传统鉴定方法不仅工作量大、周期长、操作复杂,且鉴定结果的可重复性也较差^[8-9]. 现代分子鉴定法以核酸作为主要研究对象,研究的是基因型而非表现型,因此能更清晰地反映菌种的遗传本质^[10-12]. 如杨莹等^[13]利用传统分类方法与现代分子鉴定方法相结合对广西毛葡萄产区葡萄酒相关酵母菌的种类进行鉴定,明确了毛葡萄产区主要酵母菌种类与分布规律,为当地酿酒酵母资源的开发利用打下了基础.

本研究以河南安阳葡萄种植园的赤霞珠葡萄为原料,采用菌落形态、细胞显微形态与序列系统发育分析相结合的方法,对从赤霞珠葡萄果表分离得到的70株酵母菌进行多样性研究,

以丰富对安阳地区赤霞珠葡萄果表酵母菌组成的认识,为优良酵母菌的筛选和鉴定提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料 赤霞珠葡萄,2017年9月21日采自安阳葡萄种植园,共采3个葡萄样品用于3次重复实验,每个样品包含3串健康的葡萄,分别标记为AY₁,AY₂和AY₃,并在当天置于冰盒中运回实验室,于无菌条件下,分别将3个葡萄样品的表皮收集起来备用.

1.1.2 主要培养基与试剂 YEPD培养基,WL培养基,北京双旋微生物培养基制造厂产;Ezup柱式基因组DNA抽提试剂盒(酵母),26S rDNA D1/D2区扩增引物NL-1和NL-4,生工生物工程(上海)股份有限公司产.

1.1.3 主要仪器与设备 SW-CJ-2D超净工作台,HH-S恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗器械有限公司产;TGL-16G台式离心机,上海安亭科学仪器厂产;C1000PCR扩增仪,苏州净化安泰公司产;DH-600生化培养箱,北京中兴伟业仪器有限公司产;JY023紫外分析仪,北京君意东方电泳设备有限公司产;FD-4new真空干燥机,郑州沃邦仪器设备有限公司产;普通光学显微镜,上海光学仪器五厂有限公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 酵母菌的富集、分离与纯化 参见张俊杰等^[14]研究方法,简述如下:在无菌条件下向已灭菌的YEPD(含氯霉素)液体培养基中加入葡萄浆果表皮,于180 r/min,28℃条件下振荡

培养 48 h. 梯度稀释富集液,选择 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 共 3 个梯度稀释液进行 YEPD 固体平板涂布和培养,并随机挑取单菌落进行纯化和保藏.

1.2.2 酵母菌的初步鉴定 显微镜观察:挑取菌体,接种到液体 YEPD 培养基中,于 28 °C 条件下培养 1 d,在显微镜下观察酵母菌细胞的形态特征^[14].

WL 培养基上酵母菌的菌落观察:将酵母菌接种于 WL 培养基,于 28 °C 条件下培养 5 d 使其长出单菌落. 根据不同酵母菌在 WL 培养基上的形态描述(如菌落颜色等)进行初步分类^[15].

1.2.3 酵母菌 26S rDNA D1/D2 区和 5.8S-ITS 区序列的 PCR 扩增与检测 按照试剂盒说明书进行酵母菌的 DNA 提取,使用正向引物 NL-1 和反向引物 NL-4 扩增 26S rDNA D1/D2 区段^[15]. 使用正向引物 ITS1 和反向引物 ITS4 进行 5.8S-ITS 区基因扩增^[16]. PCR 反应体系和反应程序参照刘爱国等^[17]的研究方法,结果检测参照张俊杰等^[15]的检测方法,即进行琼脂糖凝胶电泳,并通过凝胶成像拍照确认.

1.2.4 PCR 产物测序及系统发育分析 测序结果采用 MEGA 6 软件进行序列比较,具体方法参照张俊杰等^[15]的方法.

2 结果与分析

2.1 酵母菌的初步鉴定结果

本研究从安阳赤霞珠葡萄果表分离得到共 70 株酵母菌,依据 WL 培养基上不同的菌落形态将其划分为 5 个表型,然后从每个表型随机挑选代表菌株,并对代表菌株进行显微镜观察. 代表菌株在 WL 培养基上的表型特征和显微细胞特征如图 1 所示,具体菌落表型聚类结果见表 1. 由图 1 和表 1 可知,安阳赤霞珠葡萄果表酵母菌的代表菌株,在 WL 培养基上,菌落颜色呈黄色或白色边,绿色或蓝色顶,菌落形态均呈

现为中部凸起,表面光滑,有光泽,干燥,不透明,菌落大的特征;在显微镜下,菌株细胞形态呈柠檬形、椭圆形、棱形或圆形,单生,单端芽殖.

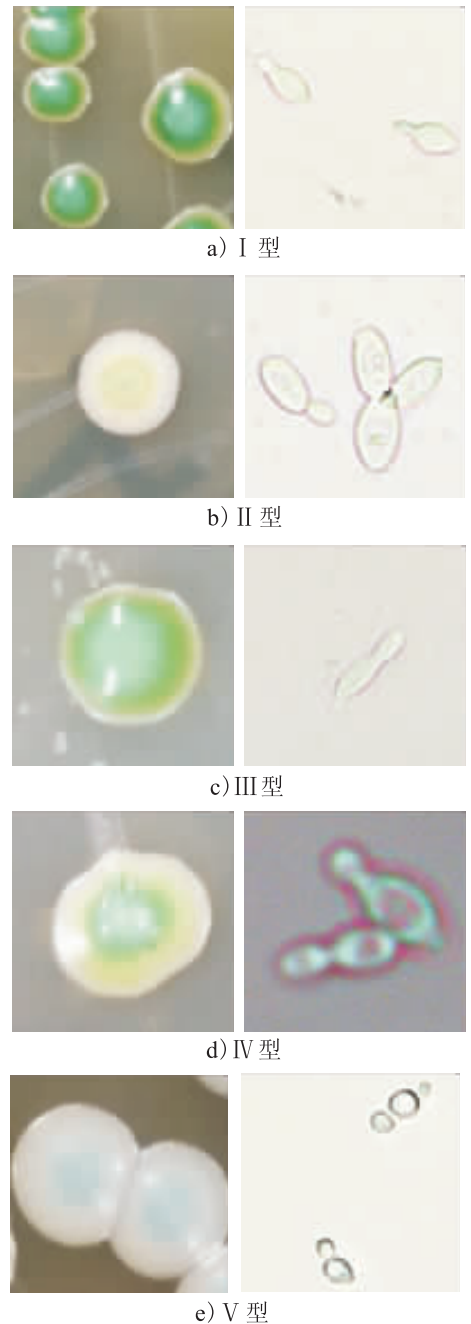


图 1 各类型代表菌株在 WL 培养基上的表型特征(左)和显微细胞特征(右)
Fig.1 The colony characteristics on WL medium (the left picture) and cell microscopic characteristics (the right picture) of the representative strains from different types

2.2 酵母菌的 26S rDNA D1/D2 区系统发育分析结果

对 5 株代表酵母菌 (AY1 - 3, AY1 - 16, AY1 - 22, AY3 - 2, AY3 - 11) 进行 DNA 的提取, 并对其扩增的 26S rDNA D1/D2 区域进行测序, 所得序列在 NCBI 数据库进行比对, 得到与所测序列最相近的参比酵母菌株的相关序列, 通过 Mega 6 进行序列比对并构建 NJ 系统发育树, 见图 2.

由图 2 可知, 菌株 AY3 - 2 与 *Candida quercitrusa* 聚为一支, 序列相似性为 100%, 因此可将菌株 AY3 - 2 归为 *Candida quercitrusa*; 菌株 AY1 - 22 和菌株 AY3 - 11 与 *Hanseniaspora opuntiae* 的序列相似性为 100%, 处于同一分支,

故菌株 AY1 - 22 和菌株 AY3 - 11 被鉴定为 *Hanseniaspora opuntiae*; 而菌株 AY1 - 3 和菌株 AY1 - 16 与 *Pichia terricola* 序列相似性为 100%, 表明菌株 AY1 - 3 和菌株 AY1 - 16 属于 *Pichia terricola*.

2.3 酵母菌的系统分析结果

依据上述对代表菌株的分类鉴定结果, 可将本研究所分离的 70 个菌株划归为 3 个已知酵母属的 3 个种群. 其中 *Hanseniaspora opuntiae* 含有 41 个菌株, 有 28 个菌株属于 *Pichia terricola*, 而属于 *Candida quercitrusa* 的只有 1 个菌株. 并且发现, 关于酵母菌菌落形态的描述, 尽管 I 型与 III 型的菌落形态不同, 但是它们属于同一种群 *Hanseniaspora opuntiae*; 而 I 型与 II 型

表 1 酵母菌基于 WL 培养基的表型聚类结果

Table 1 Clustering analysis of yeast strains on WL medium based on phenotypes

表型	菌落颜色	菌落形态	显微细胞形态	菌株
I	黄色边, 深绿色顶	中部凸起, 表面光滑, 有光泽, 干燥, 不透明, 菌落大	柠檬形, 单生, 单端芽殖	AY1 - 2, 5, 6, 13, 14, 15, 17; AY3 - 3—15, 17—23
II	黄色边, 草绿色顶	中部凸起, 表面光滑, 有光泽, 干燥, 不透明, 菌落大	椭圆形, 单生, 单端芽殖	AY1 - 4, 16, 23; AY2 - 1—20, 23, 24
III	黄色边, 绿色顶	中部凸起, 表面光滑, 有光泽, 干燥, 不透明, 菌落大	梭形, 单生, 单端芽殖	AY1 - 1, 7—12, 18—22; AY2 - 21, 22
IV	白色边, 青绿色顶	中部凸起, 表面光滑, 有光泽, 干燥, 不透明, 菌落大	椭圆形, 单生, 单端芽殖	AY1 - 3; AY3 - 1, 16
V	白色边, 蓝色顶	中部凸起, 表面光滑, 有光泽, 干燥, 不透明, 菌落大	圆形, 单生, 单端芽殖	AY3 - 2

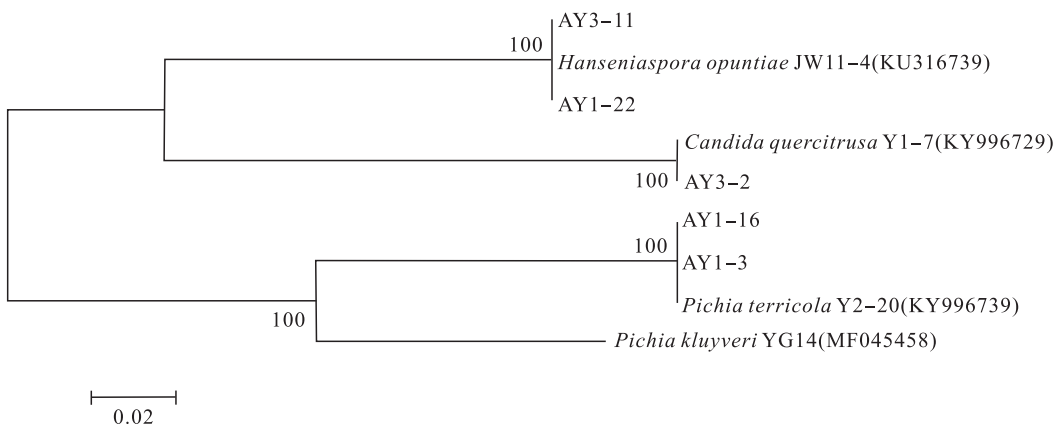


图 2 代表菌株 26S rDNA D1/D2 区段的 NJ 系统发育树 (邻接法)

Fig. 2 The NJ phylogenetic tree of 26S rDNA D1/D2 for the representative strains (Neighbor-Joining method)

的菌落形态不同,并且分属于不同的种群,即 I 型属于 *Hanseniaspora opuntiae*, II 型属于 *Pichia terricola*. 这表明,只有把传统的鉴定方法与现代分子生物学鉴定方法相结合,才可以更加全面、有效、准确地对未知酵母菌菌株进行分类鉴定^[4].

3 结论

本研究选取安阳葡萄园 3 次随机采摘的赤霞珠葡萄,对其果表酵母菌进行富集、分离与纯化,共得到 70 株酵母菌. 将 WL 培养基上的表型特征、显微细胞特征与分子生物学鉴定结果相结合,最终确定这 70 株酵母菌分属于 *Hanseniaspora opuntiae*, *Pichia terricola* 和 *Candida quercitrusa* 3 个已知酵母菌种群. 其中, *Hanseniaspora opuntiae* 和 *Pichia terricola* 这两个种群是优势种群,而 *Candida quercitrusa* 的含量极少,故在安阳地区,赤霞珠果表酵母菌组成以 *Hanseniaspora opuntiae* 和 *Pichia terricola* 为主. 而 *Hanseniaspora opuntiae* 大量存在于葡萄酒酿造过程中,因此安阳地区的赤霞珠葡萄可以用于酿造葡萄酒,并且 *Hanseniaspora opuntiae* 是酿造前期的主要种群. 而对于仅有的 1 株 *Candida quercitrusa*,在先前的研究中发现,该种群主要存在于酿造后期,并会逐渐成为优势种群,因此,该株菌的发现对于葡萄酒的后期酿造具有一定的实践指导意义.

本研究结果丰富了对安阳地区赤霞珠葡萄果表酵母菌组成的认识,为葡萄表皮酵母菌的富集、分离和鉴定提供了一定参考,同时也为选育赤霞珠葡萄优质的酵母菌种质资源,进而打造产区特色葡萄酒提供了依据.

参考文献:

- [1] 王洁,胡然,姜虹伶,等. 腐败葡萄中酵母菌的分离及鉴定[J]. 酿酒科技,2015(5):29.
- [2] 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,2011,30(12):4.
- [3] 张俊杰,杨旭,郭晨,等. 不同株系梅鹿辄葡萄果皮酵母菌的分离鉴定与差异分析[J]. 酿酒科技,2016(10):22.
- [4] 张俊杰,杨旭,张文叶,等. 河南太行山区野生山葡萄表皮酵母菌的分离与鉴定[J]. 酿酒科技,2016(5):57.
- [5] 刘小珍,张汉尧. 昆明葡萄酒相关酵母菌的分离与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(5):135.
- [6] 苏龙. 东北产区山葡萄酒酵母 5.8S-ITS 区 RFLP 分析和优良酿酒酵母菌株选育[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [7] 巴尼特. 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,1991:6.
- [8] ANGELIA X, FEMANDA S, FRANCISCO M G. Use of RAPD analysis for differentiation among six enological saccharomyces strains[J]. Food Technol Biotechnol,2010,38(1):53.
- [9] DAVID C, ENRIC B, BENJAMIN P. Karyotype rearrangements in a wine yeast strain by rad 52-dependent and rad 52-independent mechanisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003(4):2161.
- [10] GIAEVER G, ANGLA M, CHU L N. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome[J]. Nature,2002,418:387.
- [11] DE LIANOS FRUTOS R, FEMANDEZESPINAR M T, Querol A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers[J]. Antonie Van Leeuwenhoke, 2004, 85(3):175.
- [12] FELL J W, BOCKHOUT T, FONSECA A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2

- domain sequence analysis [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 50(3):1351.
- [13] 杨莹, 管敬喜, 谢林君, 等. 广西毛葡萄产区野生葡萄酒酵母种群分布与系统进化分析[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(7):1123.
- [14] 张俊杰, 杨旭, 郭晨, 等. 不同葡萄品种栽培土壤中酵母菌的组成及差异分析[J]. *酿酒*, 2017, 44(1):76.
- [15] 张俊杰, 杨旭, 焦健, 等. 不同株系赤霞珠葡萄表皮酵母菌的多样性研究[J]. *中国酿造*, 2017, 36(6):126.
- [16] 刘爱国. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒酿酒酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2008.
- [17] 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(自然科学版)*, 2008, 36(11):204.

(上接第 38 页)

- [11] BOX G E P. *Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building* [M]. New York: Wiley, 1990.
- [12] MONTGOMERY D C. *实验设计与分析* [M]. 6版. 傅钰生, 张健, 王振羽, 等译. 北京:人民邮电出版社, 2009:366.
- [13] 张泽志, 韩春亮, 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. *河南教育学院学报(自然科学版)*, 2011(4):34.
- [14] 范洪臣, 李艳华, 梁金钟, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产 γ -PGA 的条件[J]. *生物加工过程*, 2008, 6(3):17.
- [15] 王允祥, 吕凤霞, 陆兆新. 杯伞发酵培养基的响应曲面法优化研究[J]. *南京农业大学学报*, 2004(3):89.