

宁夏葡萄自然发酵过程中酵母菌 的分子生物学鉴定

刘爱国¹,刘延琳^{1,2},王泽举¹,韩 娜¹,胡劲光¹

(1 西北农林科技大学 葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100;2 陕西省葡萄与葡萄酒工程技术研究中心,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】** 探明宁夏地区葡萄自然发酵过程中酵母菌的多样性,为酵母菌资源的开发利用提供依据。**【方法】** 应用 26S rDNA D1\D2 区序列,分析鉴定了分离自宁夏广夏三基地葡萄园的 21 株野生葡萄酒酵母菌,在此基础上又构建了 21 株被测菌株与相关菌种模式株的系统发育树,分析了供试菌株与已知酵母菌的亲缘关系及其分类地位。**【结果】** 序列分析和系统发育树分析表明,21 株被测菌株鉴定为 6 属 7 种,分别为拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、罕见有孢汉生酵母(*Hanseniaspora occidentalis*)、葡萄汁有孢汉生酵母(*Hanseniaspora uvarum*)、美极梅齐酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientali*)和克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)。**【结论】** 宁夏葡萄酒产区的相关酵母具有多样性。

【关键词】 野生葡萄;酿酒酵母;自然发酵;生物学鉴定
【中图分类号】 S663. 109;TS261. 1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)11-0203-05

Molecular identification of wild wine-related yeasts isolated from spontaneous wine fermentation in Ningxia district

LIU Ai-guo¹, LIU Yan-lin^{1,2}, WANG Ze-ju¹, HAN Na¹, HU Jin-guang¹

(1 College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was done to reveal the diversity and the composition of the yeast so as to provide supports for development and utilization of yeast. **【Method】** 21 wild yeasts isolated from Guangxia Third vinayard of Ningxia were identified by using 26S rDNA D1/D2 domain sequences. Phylogenetic tree was constructed to study the relationship and confirm the classification status of the yeast strains. **【Result】** As a result, 7 species belonging to 6 genera were recognized. They were *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora occidentalis*, *Issatchenkia orientali*. **【Conclusion】** The result reveals the diversity of wine related wild yeasts in wine district of Ningxia.

Key words: wild grape; wine-related yeast; spontaneous fermentation; molecular identification

葡萄酒野生酵母是存在于葡萄园和葡萄酒产区
自然环境中的本土酵母。在传统的葡萄和葡萄酒产
区,酵母菌逐渐适应了当地的气候、土壤和葡萄品
种,再加上自然选择的作用,最终形成了适应当地葡

* [收稿日期] 2007-11-21
[基金项目] 西北农林科技大学青年骨干支持计划项目(01140301)
[作者简介] 刘爱国(1981—),男,内蒙古乌盟市人,硕士,主要从事酿酒微生物研究。E-mail:liuaiguo000@163.com
[通讯作者] 刘延琳(1966—),女,陕西富县人,教授,博士,博士生导师,主要从事葡萄酒及酿酒微生物研究。
E-mail:lylsun@yahoo.com.cn

葡萄酒的酵母菌系^[1]。因此,每个微环境的本土酵母均具有一些独特的代谢特性,这些特性可以赋予当地葡萄酒特别的风味特征。因而对葡萄酒产区野生酵母菌的分类研究,具有重要的实践意义。

近两个世纪以来,有许多依据形态学和生理生化特点对酵母菌进行分类的研究,但由于受到环境因素的影响,某些酵母菌属、种在形态学及生理生化特性方面的差异并不显著,采用传统方法对其进行准确分类就显得相当困难^[2]。

随着 DNA 序列分析技术的日趋成熟和简化, rRNA 基因(rDNA)及其转录间隔区(ITS)的序列分析已经被广泛应用于酵母菌的鉴定。Kurtzman 等^[3-4]和 Fell 等^[5]的研究表明,大亚基 rRNA 基因(26S rDNA)中的 D1/D2 区域,能将绝大部分子囊菌酵母和担子菌酵母的种区分开来,而种内不同菌株间 D1/D2 区域序列差异一般在 1% 以内,碱基差异在 1% 以上则可能代表着不同的种。由于这些序列均已经公布于 GenBank/EMBL/DDBJ 等国际核酸序列数据库,从而为酵母菌的鉴定带来了极大的便利^[6]。

我国气候多样化的特点造就了丰富的葡萄酒酵母资源,但在葡萄酒酵母研究和利用方面还处于起步阶段,对葡萄产区酵母菌生物多样性的研究尚属空白。为此,本研究通过 26S rDNA D1/D2 区域序列分析,对宁夏广夏三基地葡萄园的野生酿酒酵母进行了分类研究,旨在为该产区优良酿酒酵母资源的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

引物 NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') 和 NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')^[5],由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。*Taq* 酶、dNTP、DNA Marker 购自 Fermentas(MBI)。

1.2 试验方法

1.2.1 野生葡萄酒相关酵母菌的分离 菌株分离自宁夏广夏三基地葡萄园,从自然发酵葡萄汁中分离获得野生葡萄酒酵母菌。菌株分离使用 YEPD 培养基(每升含酵母浸粉 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g。为排除细菌干扰,外加 100 mg/L 的氯霉素)。从分离到的 120 株酵母菌中,选出具有代表性的 21 株酵母菌进行分类鉴定,其编号分别为 N2-1-1、N3-2-8、N3-2-14、N3-4-3、N3-2-18、N2-2-9、

N2-2-2、N3-2-15、N3-2-25、N3-2-22、N3-2-1、N2-3-14、N2-4-6、N2-1-3、N2-1-5、N2-4-7、N2-4-1、N2-4-2、N2-4-5、N9-3-21 和 N9-3-23。

1.2.2 菌落 PCR 所用模板 DNA 的制备 使用移液枪的枪头蘸取新鲜生长于平板或斜面上的菌体,转移至 30 μ L 浓度为 20 g/L 的 SDS(十二烷基磺酸钠)溶液中,并缓慢抽吸几次;在漩涡混匀器上混匀 15 s;90 $^{\circ}$ C 热激 4 min;4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min 离心 1 min,取上清液 15~20 μ L 至新的 0.5 mL 离心管中,-20 $^{\circ}$ C 保藏备用^[7]。

1.2.3 26S rDNA D1/D2 区的扩增 使用由上海生工合成的引物 NL1 (5'-GCATATCAATA-AGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGT-GTTTCAAGACGG-3') 进行 26S rDNA D1/D2 区的扩增^[5]。

PCR 循环次序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 20 s;循环 36 次;再 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min^[8]。

PCR 反应液的组成(采用 50 μ L 体系):每管中含 PCR 缓冲液(10 $\times$)5.0 μ L;25 mmol/L MgCl₂ 3.0 μ L;10 mmol/L dNTP 1.0 μ L;10 μ mol/L NL1 和 NL4 各 1 μ L;0.5 U/ μ L DNA 聚合酶 0.3 μ L;10~1 000 ng/ μ L 模板 DNA 1.0 μ L;最后添加 ddH₂O 定容到 50 μ L。

1.2.4 26S rDNA D1/D2 区的序列测定及系统发育树的构建 将 PCR 产物送北京三博远志生物技术有限责任公司进行纯化和测序。以 Chromas 作参照对测序结果进行正反序列图谱人工校对,用校正后的 26S rDNA D1/D2 区序列在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索(BLAST search),比较供试菌株与已知酵母菌相应序列的同源性。

为进一步显示供试菌株与已知酵母菌的亲缘关系及其分类地位,根据同源序列搜索结果,下载相关酵母菌菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列,与供试菌株序列一起用 Clustal X^[9] 软件进行匹配排列(Align),用 MEGA3.1 软件中的 Kimura2-Parameter Distance 模型及 Heighbor-joining^[10] 分析法构建系统发育树,并进行 1 000 次的 Bootstraps 检验^[11]。

2 结果与分析

2.1 供试菌株的序列分析

使用引物对 NL1 和 NL4 对供试 21 株菌株的 26S rRNA 基因序列进行扩增,结果表明,其片段大小为 490~600 bp,共获得了 21 个序列。经 BLAST

分析及序列相似性计算,被测菌株的 26S rRNA 1。
D1/D2 区基因序列及相关菌种模式菌株信息见表

表 1 被测序菌株 26S rDNA D1/D2 片段大小及其与相关菌株的序列相似性分析

Table 1 26S rDNA D1/D2 fragment size of the sequenced strains and the identity with related yeast

供试菌株 Strain	PCR 产物 大小/bp Size	相关模式菌株 The related members of the Family yeast	模式菌株编号 Type strain	相似性/% Identity	基因库登录号 GenBank accession number
N2-1-1	568	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	NRRL Y-1614 ^T	99.6	EU268632
N3-2-8	579	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	NRRL Y-1614 ^T	99.6	EU268633
N3-2-14	574	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	NRRL Y-1614 ^T	99.8	EU268634
N3-4-3	574	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	NRRL Y-1614 ^T	100.0	EU268637
N3-2-18	572	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	NRRL Y-1614 ^T	99.3	EU268635
N2-2-9	574	<i>Hanseniaspora uvarum</i> U84229	NRRL Y-1614 ^T	99.6	EU268636
N2-2-2	569	<i>Hanseniaspora occidentalis</i> U84225	NRRL Y-7946 ^T	100.0	EU268638
N3-2-15	571	<i>Hanseniaspora occidentalis</i> U84225	NRRL Y-7946 ^T	100.0	EU268639
N3-2-25	575	<i>Hanseniaspora occidentalis</i> U84225	NRRL Y-7946 ^T	100.0	EU268640
N3-2-22	574	<i>Hanseniaspora occidentalis</i> U84225	NRRL Y-7946 ^T	100.0	EU268641
N2-3-14	589	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> U72161	NRRL Y-2227 ^T	100.0	EU268642
N2-4-6	575	<i>Pichia kluyveri</i> AJ746339	NRRL Y-11519 ^T	100.0	EU268643
N2-4-7	570	<i>Issatchenkia orientalis</i> U76347	NRRL Y-5396 ^T	100.0	EU268644
N2-4-1	570	<i>Issatchenkia orientalis</i> U76347	NRRL Y-5396 ^T	100.0	EU268645
N2-4-2	575	<i>Issatchenkia orientalis</i> U76347	NRRL Y-5396 ^T	100.0	EU268646
N2-1-5	500	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> U45736	NRRL Y-7111 ^T	100.0	EU268647
N2-1-3	490	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> U45736	NRRL Y-7111 ^T	99.0	EU268661
N3-2-1	552	<i>Hanseniaspora occidentalis</i> U84225	NRRL Y-7946 ^T	98.7	EU268663
N2-4-5	542	<i>Issatchenkia orientalis</i> U76347	NRRL Y-5396 ^T	99.3	EU268662
N9-3-21	579	<i>Saccharomyces cerevisia</i> U44806	NRRL Y-12632 ^{NT}	99.8	EU268656
N9-3-23	576	<i>Saccharomyces cerevisia</i> U44806	NRRL Y-12632 ^{NT}	99.1	EU268657

注:模式菌株编号栏中, NRRL 表示美国农业研究菌种保藏中心; T 表示模式菌株; NT 表示新型菌株。
Note: NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA.
T=type strain; NT=neotype strain.

2.2 供试菌株的系统发育树分析

构建了包括 21 株供试菌株及相关菌种模式株在内的 26S rDNA D1/D2 区序列系统发育树。由图 1 可见,系统发育树以粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) 26S rDNA D1/D2 区序列为外群。
基于 26S rDNA D1/D2 区的序列分析结果表明, N2-1-1、N3-2-8、N3-2-14、N3-4-3、N3-2-18、N2-2-9、N2-2-2、N3-2-15、N3-2-25、N3-2-22、N3-2-1、N2-3-14、N2-4-6、N2-1-3、N2-1-5、N2-4-7、N2-4-1、N2-4-2、N2-4-5、N9-3-21 和 N9-3-23 分别归属于接合酵母(*Zygosaccharomyces*)、酿酒酵母(*Saccharomyces*)、有孢汉生酵母(*Hanseniaspora*)、梅齐酵母(*Metschnikowia*)、伊萨酵母(*Issatchenkia*)、毕赤酵母(*Pichia*)6 个属。
由图 1 可见, N3-2-8、N2-1-1、N3-4-3、N3-2-18、N2-2-9、N3-2-14 以较高的置信度聚在以有孢汉生酵母(*Hanseniaspora uvarum*)为代表的分枝上,应

属于同一物种; N2-3-14 以较高的置信度聚在以接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)为代表的分枝上,属于同一物种; N2-4-6 以较高的置信度聚在以毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)为代表的分枝上,属于同一物种; N2-1-5 和 N2-1-3 以较高的置信度聚在以梅齐酵母(*Metschnikowia pulcherrima*)为代表的分枝上,属于同一物种; N2-4-2、N2-4-7、N2-4-1 和 N2-4-5 以较高的置信度聚在以伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)为代表的分枝上,属于同一物种; N9-3-23 和 N9-3-21 以较高的置信度聚在以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为代表的分枝上,属于同一物种。
N2-2-2、N3-2-15、N3-2-25 和 N3-2-22 以较高的置信度聚在以有孢汉生酵母(*Hanseniaspora occi-*
dentalis)为代表的分枝上,其同源性均为 100%,当属于同一物种;而分枝 N3-2-1 与发育枝距离相对较远,与模式株只有 98.7%的同源相似率,尚无法确定其与模式株是否为同一个种,因而还需作进一步

研究鉴定。

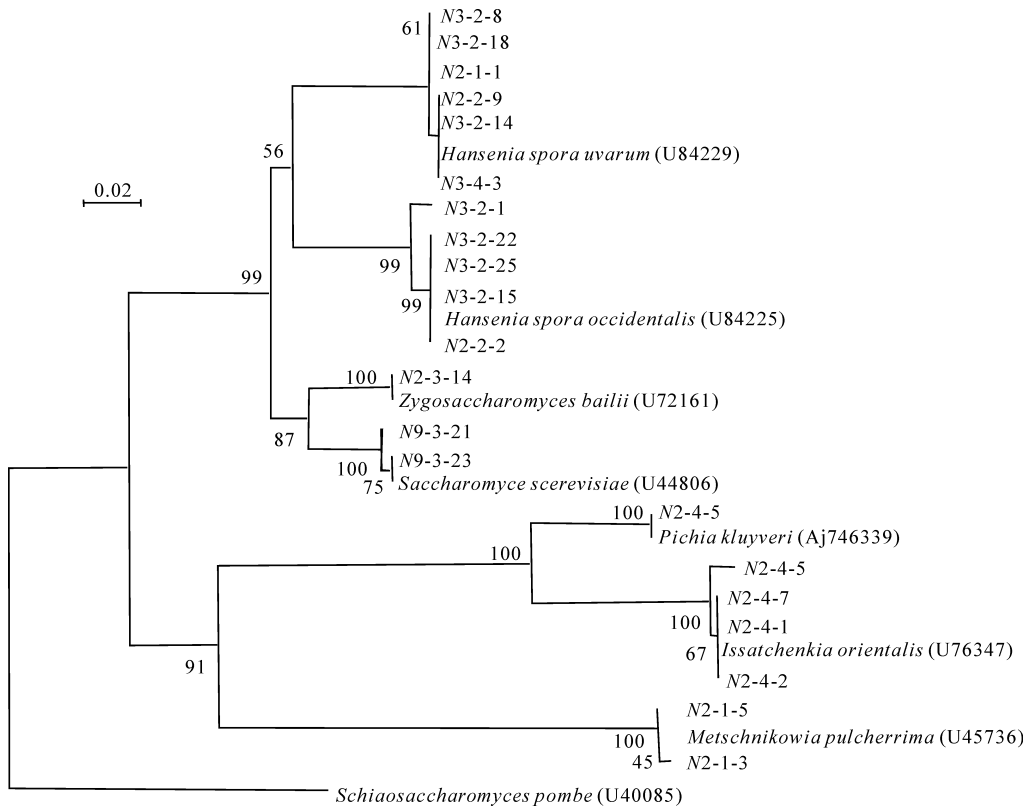


图 1 基于 26S rDNA D1/D2 区序列和 Neighbor-Joining 分析绘制的酵母菌系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree drawn from Neighbor-joining analysis based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequence alignment of yeasts

3 讨论与结论

在酵母属、种级分类鉴定中,26S rDNA D1/D2 区的序列分析成为酵母菌鉴定的常规指标和必要指标^[12],其可以有效地将大多数未知菌株鉴定到种。Kurtzman 等^[3-4]和 Fell 等^[5]的研究表明,大亚基 rRNA 基因(26S rDNA)中的 D1/D2 区域,能将绝大部分子囊菌酵母和担子菌酵母的种区分开来,而种内不同菌株间 D1/D2 区域序列差异一般在 1% 以内,碱基差异在 1% 以上则可能代表着不同的种,而属于不同种的菌株其核苷酸替换率一般较大。根据这一标准,26S rDNA D1/D2 区序列分析可以将绝大部分不同的种区分开来,从而确定各个菌株的归属^[12-13]。但是对于一些特殊菌种也存在一定的不足,需要辅以其他鉴定方法。本研究,菌株 N3-2-1 与有孢汉生酵母(*Hanseniaspora occidentalis*)的同源性为 98.7%,超过了 Kuttzman 等^[3-4]所确定的同种内不同菌株间差异小于 1% 的标准,共存在 6 个碱基的差异,因此该菌株的分类地位尚待进一步

分析鉴定。近年来,人们不断应用新技术对酵母菌进行鉴定和分析,对一些疑难菌株的鉴定,往往需要应用多种方法才能获得满意的结论^[2,14]。

由于不同葡萄产区本土酵母具有的独特代谢特性,有助于生产出具地区特色的葡萄酒^[15],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。本研究利用 26S rDNA D1/D2 区序列分析,对宁夏葡萄酒产区的野生酿酒酵母进行了分类鉴定,获得了较为丰富的酵母资源,从分离到的 120 株酵母菌中共筛选出具代表性的 21 株,鉴定为 6 属 7 种,显示出宁夏葡萄酒产区本地酵母菌资源的多样性。本研究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] 王 慧,张立强,刘天明,等.产地葡萄酒优良酵母菌株的筛选及鉴定[J].酿酒科技,2007(9):29-34.
Wang H,Zhang L Q,Liu T M,et al. Screening and identifica-

tion of quality yeast strains in grape wine production area [J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2007(9): 29-34. (in Chinese)

[2] 毛志群, 张伟, 马雯. 分子生物学技术在酵母菌分类中的应用进展 [J]. *河北农业大学学报*, 2002, 25(增刊): 230-233. Mao Z Q, Zhang W, Ma W. The utilization of molecular biology in yeast taxonomy [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2002, 25(Supp.): 230-233. (in Chinese)

[3] Kurtzman C P, Rohbnett C J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1216-1223.

[4] Kurtzman C P, Rohbnett C J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 331-371.

[5] Fell J W, boekhout 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*, 2000, 50: 1351-1371.

[6] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义 [J]. *菌物系统*, 2002, 21(1): 27-32. Bai F Y, Jia J H, Liang H Y. Molecular taxonomic study on the problematic *Candida* strains based on 26S rDNA D1/D2 domain sequence comparison [J]. *Mycosystema*, 2002, 21(1): 27-32. (in Chinese)

[7] 徐艳文, 杨莹, 薛军侠, 等. 26S rDNA-RFLP 分析在非酿酒酵母菌分类研究中的应用 [J]. *微生物杂志*, 2007, 27(4): 23-27. Xu Y W, Yang Y, Xue J X, et al. 26S rDNA RFLP analysis as a tool to characterize non-*Saccharomyces* yeasts [J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(4): 23-27. (in Chinese)

[8] Sipiczki M. *Candida zemplinina* sp. nov, an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 79-83.

[9] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 24: 4876-4882.

[10] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406-425.

[11] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.

[12] 陆惠中, 王启明, 贾建华, 等. 秦岭地区子囊酵母物种多样性研究 [J]. *菌物学报*, 2004, 23(2): 183-187. Lu H Z, Wang Q M, Jia J H, et al. Species diversity of ascomycetous yeasts in Qingling Area of Shaanxi province [J]. *Mycosystema*, 2004, 23(2): 183-187. (in Chinese)

[13] 许超德, 李绍兰. 核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用 [J]. *微生物学通报*, 2004, 31(3): 126-129. Xu C D, Li S L. Molecular Systematics of nucleic acids in the yeast method of classification [J]. *Microbiology*, 2004, 31(3): 126-129. (in Chinese)

[14] 王庆国, 刘天明. 酵母菌分类学方法研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(3): 96-101. Wang Q G, Liu T M. Advanced in yeast taxonomical methods [J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(3): 96-101. (in Chinese)

[15] Heard G. Novel yeasts in winemaking-looking to the future [J]. *Food Australia*, 1999, 51: 347-352.