

■自然科学研究



户太八号葡萄酒发酵过程中菌群种类研究

党 欢, 葛含静, 张慧敏, 安萌原, 张 梅, 李璟琦

(陕西学前师范学院生命科学与食品工程学院, 陕西西安 710100)

摘要:本研究对西安地区特有葡萄品种——户太八号在自然发酵酿制葡萄酒的不同时期分离出的酵母菌种类进行研究。利用WL营养琼脂培养基,对分离出的339株酵母菌进行初步鉴定。结果表明,在发酵前期,分离出的酵母菌数量最少,种类最多,可归入6个属8个种,即葡萄汁有孢汉逊酵母、东方伊萨酵母、美极梅奇酵母、膜璞毕赤酵母、季也蒙有孢汉逊酵母、酿酒酵母、毕赤克鲁维酵母及红冬孢酵母,分别占发酵前期酵母菌总数的48.8%,20.9%,11.6%,7.0%,4.7%,2.3%,2.3%和2.3%;在发酵中期,分离出的酵母菌种类仅有4种,即酿酒酵母、东方伊萨酵母、毕赤克鲁维酵母及葡萄汁有孢汉逊酵母,分别占发酵中期酵母菌总数的67.1%,26.0%,5.5%和1.4%;而发酵末期,只有酿酒酵母。户太八号在自然发酵酿制葡萄酒的不同时期菌群种类不尽相同,为户太八号葡萄酒发酵过程中菌群种类动态变化的研究及优势菌种的筛选奠定了基础。

关键词:户太八号;自然发酵;WL培养基;菌群

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:2095—770X(2016)12—0145—04

PDF获取:<http://sxxqsfxy.ijournal.cn/ch/index.aspx>

doi:10.11995/j.issn.2095—770X.2016.12.033

Research of Microbiome Species During Wine Fermentation with No. 8 Hutai Grape

DANG Huan, GE Han-jing, ZHANG Hui-min, AN Meng-yuan, ZHANG Mei

(College of Life Science and Food Engineering, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710100, China)

Abstract: The study intended to research the species of yeasts isolated from must of spontaneous fermentation with No. 8 Hutai—the unique species in Xi'an. 339 isolated yeasts were identified primarily on Wallerstein Laboratory Nutrient Agar(WL agar). The result is that in the initial stage of fermentation, eight species of six genera mainly belonging to *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenka orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia membranefaciens*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Rhodosporidium mucilaginosum* were found among all stains, with proportion of 48.8%, 20.9%, 11.6%, 7.0%, 0.6%, 2.3%, 2.3% and 2.3%, respectively, and the quantity of yeast was the least but the species was the most, while there were 4 species in the middle stage, such as *H. uvarum*, *I. orientalis*, *S. cerevisiae* and *P. kluyveri*, with proportion of 1.4%, 26.0%, 67.1% and 5.5%, and additionally there was only *S. cerevisiae* at the end. The microbiome were different during wine spontaneous fermentation with No. 8 Hutai. The study lays a foundation of researching microbiome species dynamically and screening dominant bacterial strains during wine fermentation.

Key words: No. 8 Hutai; spontaneous fermentation; Wallerstein Laboratory Nutrient Agar (WL agar); microbiome species

收稿日期:2016—06—27; **修回日期:**2016—09—22

基金项目:陕西学前师范学院大学生创新创业训练计划项目(2015DC032);陕西省教育厅2015年教改项目(15BY120);
陕西学前师范学院博士研究生科研专项(2014DS001)

作者简介:党欢,女,陕西西安人,陕西学前师范学院生命科学与食品工程学院本科生。

通讯作者:葛含静,女,陕西咸阳人,陕西学前师范学院生命科学与食品工程学院讲师,工学博士,主要研究方向:粮食工程与发酵技术创新,学前儿童营养与保健。

目前,许多葡萄酒生产企业面临的一个突出问题是,大量使用进口活性酿酒酵母,虽保证了发酵速率和产品质量的稳定性,却导致葡萄酒品质严重同质化,从而降低了本土酿酒酵母对葡萄酒香气的贡献^[1-2]。葡萄酒自然发酵则是利用葡萄果皮、果梗或空气中的天然野生酵母完成的酒精发酵过程。在此复杂的生态生化过程中,不同酵母属种此消彼长,处于动态变化之中;多种酵母在发酵过程中的协同作用,可以有效地增加葡萄酒风味的多样性,但也可能影响葡萄酒质量的稳定性^[3]。探究葡萄酒在自然发酵过程中酵母菌种类及动态变化,揭示其变化规律,有利于控制葡萄酒自然发酵过程中的微生物,也可为酵母菌对葡萄酒风味的影响提供理论依据。

本研究利用 WL 营养琼脂培养基对西安地区特有葡萄品种——户太八号在自然发酵过程中的葡萄酒相关酵母进行了初步鉴定,旨在揭示户太八号自然发酵过程中酵母菌种类及动态变化规律。

1 实验材料

1.1 实验原料

2013年9月中旬从西安产区采集成熟户太八号葡萄果实,于陕西学前师范学院生物科学与技术系创新实验室压榨酿造成酒,在酿造的不同阶段分离得到酵母菌。

1.2 培养基

富集培养基^[4]:葡萄糖 5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, 酵母膏 0.05%, 灭菌后加 Na_2SO_4 30mg/L。如制固体培养基,加琼脂 2%。

分离培养基(YEPD 培养基):酵母膏 1%,蛋白胨 2%,葡萄糖 2%。如制固体培养基,加琼脂 2%。保藏培养基同分离培养基。

WL 营养琼脂培养基配方^[5]:酵母浸粉 0.4%,蛋白胨 0.5%,葡萄糖 5%,琼脂 2%。无机盐类: KH_2PO_4 0.055%, KCl 0.0425%, CaCl_2 0.0125%,

表 1 户太八号自然发酵的葡萄醪中各菌特征及比例

种名	菌株数	菌落特征	比例/%
葡萄汁有孢汉逊酵母	23	绿色,扁平,表面光滑,不透明,有透明环	6.8
东方伊萨酵母	47	淡绿色,表面皱褶,扁平,中央火山状突起	13.9
美极梅奇酵母	5	奶油色,略带淡红,突面,菌落小,面粉状表面光滑	1.5
膜醭毕赤酵母	3	灰绿色,略带淡蓝,圆顶状突起,面粉状,表面皱褶	0.9
季也蒙有孢汉逊酵母	2	深绿色,扁平,表面光滑,不透明,无透明环	0.6
酿酒酵母	248	奶油色,略带淡绿,球形突起,表面光滑,不透明	73.3
毕赤克鲁维酵母	9	白色,略带淡绿,表面褶皱,粗糙,扁平	2.7
红冬孢酵母	1	红棕色,突面,表面光滑,粘稠	0.3

MgSO_4 0.0125%, FeCl_3 0.0025%, MnSO_4 0.00025%, 溴酚绿 22mg/L, pH5.5。

2 实验方法

2.1 酵母菌的筛选

将所采户太八号葡萄破碎,连皮带汁一起装入 2 个 2000 mL 灭菌的发酵瓶中,每瓶装 1200 mL,于 25 ℃ 自然发酵,并在其中一瓶中按照 40 mg/L 浓度加入 SO_2 作为对照。同时做 2 组平行试验。

分别在户太八号葡萄酒自然发酵过程的前期、中期、后期 3 个时期取样。前期,即从葡萄破碎进罐至发酵启动(此时罐底部有少量气泡向顶部上升);中期,即发酵旺盛期(此时罐内有大量气泡上升);后期,即发酵消退期(此时液面又降至初期,发酵醪中无明显气泡上升)^[6]。量取酒样 10 mL,加入到 100 mL 无菌液体富集培养基中,于 25℃、170 rpm 培养 24 h。将富集液用无菌生理盐水按 $10^{-1}, 10^{-2}, \dots, 10^{-6}$ 等不同浓度梯度进行稀释,吸取稀释液 0.2 mL,均匀涂布于分离培养基平板上,于 25 ℃ 培养 72 h,选择菌生长良好且密度适当的平板,随机挑取 10-20 个单菌落进行转接,并多次划线培养,从而获得纯化菌株。

纯化菌株保藏于试管斜面或 10% 甘油管中,以备用。

2.2 酵母菌的初步鉴定

将保藏的菌种在 5 mL YEPD 液体培养基中活化 24 h,划线接种于 WL 营养琼脂培养基,于 25 ℃ 培养 5 d,观察并记录单菌落特征。

3 结果与分析

3.1 自然发酵过程中酵母菌的种类

从户太八号自然发酵的葡萄醪中共分离到 339 株酵母菌,利用 WL 营养琼脂培养基对其进行分类,结果见表 1。

由表 1 可知,分离到的 339 株酵母菌分别属于 6 个属 8 个种,即葡萄汁有孢汉逊酵母、东方伊萨酵母、美极梅奇酵母、膜璞毕赤酵母、季也蒙有孢汉逊酵母、酿酒酵母、毕赤克鲁维酵母和红冬孢酵母,分别占分离总菌株数的 6.8%, 13.9%, 1.5%, 0.9%, 0.6%, 73.3%, 2.7% 和 0.3%, 其中,酿酒酵母所占比例最大。

3.2 自然发酵过程中酵母菌群的变化

在户太八号葡萄酒自然发酵过程中,酵母菌的种类会随发酵时间有规律地变化。对自然发酵各时期出现的酵母菌进行统计,结果见表 2。

表 2 发酵各阶段酵母菌种类和比例

种名	酵母数量:株数(比例/%)		
	发酵前期	发酵中期	发酵后期
葡萄汁有孢汉逊酵母	21(48.8)	2(1.4)	—
东方伊萨酵母	9(20.9)	38(26.0)	—
美极梅奇酵母	5(11.6)	—	—
膜璞毕赤酵母	3(7.0)	—	—
季也蒙有孢汉逊酵母	2(4.7)	—	—
酿酒酵母	1(2.3)	98(67.1)	150(100.0)
毕赤克鲁维酵母	1(2.3)	8(5.5)	—
红冬孢酵母	1(2.3)	—	—

注:“—”表示未检出。以下同。

由表 2 可知,发酵前期,有 8 种酵母菌,即葡萄汁有孢汉逊酵母、东方伊萨酵母、美极梅奇酵母、膜璞毕赤酵母、季也蒙有孢汉逊酵母、酿酒酵母、毕赤克鲁维酵母及红冬孢酵母,分别占发酵前期酵母菌总数的 48.8%, 20.9%, 11.6%, 7.0%, 4.7%, 2.

3%, 2.3% 和 2.3%; 葡萄汁有孢汉逊酵母最多,而酿酒酵母、毕赤克鲁维酵母和红冬孢酵母分别仅筛选到 1 株。随着发酵时间的推移,酵母菌的种类逐渐减少。在发酵中期,有 4 种酵母菌,即酿酒酵母、东方伊萨酵母、毕赤克鲁维酵母及葡萄汁有孢汉逊酵母,分别占发酵中期酵母菌总数的 67.1%, 26.0%, 5.5% 和 1.4%; 葡萄汁有孢汉逊酵母所占比例急剧下降,东方伊萨酵母比例有所下降,毕赤克鲁维酵母有些许增加,酿酒酵母比例上升幅度颇大。而在发酵末期,就只有酿酒酵母,最终发酵过程转变成酿酒酵母的纯种发酵。

许多研究表明^[12-14],在葡萄果实表面,葡萄汁有孢汉逊酵母、红冬孢酵母及毕赤克鲁维酵母等,占主导地位,由它们来启动发酵; 非酿酒酵母在发酵初期生长良好,发酵中期逐渐消亡,被耐酒精能力更强及在低糖环境中更具竞争力的酿酒酵母所替代,直到发酵完成。本研究中分离到的 6 个属 8 个种的酵母菌在发酵初期都有存在,随着发酵时间的推移,发酵醪中酒精度升高,糖含量逐渐减少,酒精耐性较差的菌株逐渐消亡,而酒精耐性高的酿酒酵母逐渐占据优势,并最终完成发酵。这与王泽举等人的研究结果一致^[6]。

3.3 SO₂ 在自然发酵过程中对酵母菌种类的影响

SO₂ 是一种杀菌剂,能控制各种发酵微生物的代谢活动,如繁殖、呼吸以及发酵。发酵微生物种类不同,抵抗 SO₂ 的能力也不同。在自然发酵的葡萄酒中加入 SO₂,对酵母菌具有选择作用^[6,15]。在户太八号葡萄酒自然发酵的各阶段,SO₂ 对酵母菌种类和比例的影响见表 3。

表 3 发酵各阶段 SO₂ 对酵母菌种类和比例的影响

种名	酵母数量:株数(比例/%)					
	发酵前期		发酵中期		发酵后期	
	未加 SO ₂	加 SO ₂	未加 SO ₂	加 SO ₂	未加 SO ₂	加 SO ₂
葡萄汁有孢汉逊酵母	3(42.8)	18(50.0)	2(2.1)	—	—	—
东方伊萨酵母	1(14.3)	8(22.2)	26(27.1)	12(24.0)	—	—
美极梅奇酵母	1(14.3)	4(11.1)	—	—	—	—
膜璞毕赤酵母	1(14.3)	2(5.6)	—	—	—	—
季也蒙有孢汉逊酵母	1(14.3)	1(2.8)	—	—	—	—
酿酒酵母	—	1(2.8)	63(65.6)	35(70.0)	5(100.0)	15(100.0)
毕赤克鲁维酵母	—	1(2.8)	5(5.2)	3(6.0)	—	—
红冬孢酵母	—	1(2.8)	—	—	—	—

由表3可知,在户太八号葡萄酒自然发酵前期,分离出的酵母菌数量最少,但种类最多;在发酵中期,分离出的酵母菌种类仅有4种;而发酵末期,就只有酿酒酵母。发酵前期,未加SO₂的酒样中由于杂菌生长旺盛,酵母菌难以分离出来,仅分离到7株酵母菌,归于4个属5个种,葡萄汁有孢汉逊酵母占绝对优势;而在加入40mL/L SO₂的酒样中,杂菌生长受到抑制,共分离到36株酵母菌,归于6个属8个种,同样,葡萄汁有孢汉逊酵母占绝对优势,东方伊萨酵母所占比例次之。在发酵中期,未加SO₂的酒样中共分离到96株酵母菌,归于4个属4个种,酿酒酵母成优势菌种,东方伊萨酵母所占比例较发酵前期显著提高;而在加入40mL/L SO₂的酒样中,共分离到50株酵母菌,归于3个属3个种,未检出葡萄汁有孢汉逊酵母,酿酒酵母和东方伊萨酵母变化趋势与未加SO₂的酒样相同。在发酵后期,无论加或不加SO₂的酒样中,均只有酿酒酵母。因此,添加SO₂对发酵过程中酵母菌的种类和组成有非常显著的影响。

4 结论

户太八号葡萄酒自然发酵前期分离出的酵母菌数量最少,但种类最多;发酵中期分离出的酵母菌种类仅有4种;而发酵末期只有酿酒酵母。在酿造前期,向醪液中添加适量SO₂是筛选野生酿酒酵母的一种有效的方法。

WL营养琼脂培养基对葡萄酒自然发酵过程中绝大多数酵母菌鉴别力极好,是大量酵母菌初步鉴定的最佳方法。

[参考文献]

- [1] 刘天明,王可,李记明,等.天然酵母菌株对赤霞珠葡萄酒香气构成的影响[J].中国酿造,2010,224(11):171—174.
- [2] 苑伟,王学锋,刘延琳.优选酿酒酵母菌株发酵性能研究[J].中国酿造,2010,222(9):48—52.

- [3] 张红梅,郭俊艳,于莲波,等.葡萄酒的生产及对微生物的控制[J].食品工业,2003(4):27—28.
- [4] 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.
- [5] CAVAZZA A, GRANDO M S, ZINI C. Rilevazione della flora microbica dimostie vini [J]. Vignevini, 1992, 9: 17—20.
- [6] 王泽举,刘延琳,刘爱国,等.新疆葡萄酒自然发酵过程酵母菌的种类和动态变化[J].华中农业大学学报,2008(5):664—667.
- [7] 周春艳,张秀玲,王冠蕾.酵母菌的5种鉴定方法[J].中国酿造,2006(8):51—54.
- [8] 张珍,韩舜愈,王婧,等.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[J].食品工业科技,2013(08):179—182.
- [9] 李双石,陈晶瑜,韩北忠,等.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—8.
- [10] 程仕伟,韩鹏,赵慧,等.赤霞珠葡萄自然发酵过程中的酿酒酵母筛选及其发酵特性[J].酿酒科技,2015(3):16—19.
- [11] 刘兴艳,潘军,顾一洪,等.四株野生酵母菌株耐受性的研究[J].食品工业科技,2015(1):151—155,167.
- [12] AMERINE M A, BERG H W, KUNKEER E, et al. The Technology of Wine-making[M]. 4th ed. Westport: AVI Publish in company, 1982: 101—233.
- [13] ROMANO P, FEORE C, PARARGGI M O, et al. Function of yeast species and strains in wine flavour [J]. Int J Food Microbiol, 2003(1): 69—80.
- [14] LONGO E, ANSADO J, AGRELO D. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain[J]. Am J Enol Vitic, 1991, 42(2): 141—144.
- [15] 李华.现代葡萄酒工艺学[M].2版.西安:陕西人民出版社,2000:83—84.

[学术编辑 赵大洲]

[责任编辑 朱毅然]