

葡萄酒酿造及葡萄酒酵母菌种的改良

王晓飞,吴晓玉,孔令保*

(江西农业大学生物科学与工程学院发酵应用技术南昌市重点实验室,江西南昌 330045)

摘要:酿酒酵母是一种重要的工业微生物,是葡萄酒品质的灵魂。在无氧条件下,由葡萄转化成葡萄酒的过程中,酿酒酵母起了至关重要的作用。叙述了葡萄酒酵母与葡萄酒酿造的关系,介绍了工业化葡萄酒发酵过程中的调控手段及当前应用现代科技手段选育优良葡萄酒酵母菌种的方法,最后,对当前酿酒行业的形势和未来作出了预测和展望。

关键词:酵母,葡萄酒,DNA 微阵列技术,LONWORKS 技术,菌种选育

Wine brewing and the improvement of wine yeast species

WANG Xiao-fei, WU Xiao-yu, KONG Ling-bao*

(Key Laboratory of Fermentation Applied Technology, College of Biological Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* is an important industrial micro-organism, which is the soul of the wine quality. In anaerobic conditions, *Saccharomyces cerevisiae* has played a crucial role in the process from grape to wine. The relationship of wine yeast and wine brewing was described. And the manipulation methods occurred in wine industrialization fermentation process, the current application of modern scientific and technological means to breed wine yeast species were also introduced. Finally, the current situation and future prospects for the wine brewing industry was discussed and viewed.

Key words: yeast; wine; DNA microarray technology; LONWORKS technology; strain breeding

中图分类号:TS262.6

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2010)11-0420-04

葡萄酒是一种营养丰富的低酒精度发酵饮料。葡萄酒酿造是在酿酒酵母的作用下,采用自然发酵或者纯种发酵将葡萄原料中的各种潜在质量在酒中充分发挥出来。酿酒酵母是一种应用广泛的工业微生物,长期以来它被用于发酵生产面包和酒精饮料,近来,酵母又被广泛用于制药行业和塑料工业,作为“细胞工厂”生产胰岛素、聚酮和 L-乳酸等。酿酒酵母也是进行真核生物研究的一种很好的模式生物。自从 1996 年酿酒酵母全基因组测序工作的完成,人们对葡萄酒酵母的复杂代谢过程有了越来越多的认识,研究人员深入开展了酵母的分子生物学研究^[1]。基因组测序获得的巨大生物学信息量呼唤新的后基因组学研究如酵母基因表达调控机制的研究,高通量的组学研究如基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学研究,以及应用生物信息学对获得的生物信息进行分析整合的系统生物学研究。在现代葡萄酒发酵过程中应用 LONWORKS 系统,通过计算机远程通讯将所有酒罐的信息储存在网络服务器上,工作人员随时可以查阅酒罐温度、储量、密度等

信息,实现对发酵过程的现代化、网络化、自动化的监控与调控。为了满足不同地区、不同人群、不同风格的葡萄酒消费需求,优良葡萄酒酵母的选育工作尤其重要。传统的自然筛选、采用理化因素的诱变等经典的育种手段仍是目前实用的常规技术,随着现代科技的发展,出现了很多选育酵母的新技术如基因重组、基因工程育种等手段。

1 葡萄酒酿造的关键因子——葡萄酒酵母

葡萄酒是以葡萄汁为原料,在一定条件下经酵母部分或完全发酵所得的低度饮料酒。从物理化学角度,葡萄酒可以定义为一种非理性的、多组分的透明溶液,包含主要成分水、酒精、甘油和有机酸,次要成分如芳香气味和石碳酸复合物等^[2]。其风味物质主要来源于葡萄本身和由酵母发酵代谢产生的物质,其含量和组成比例决定着葡萄酒的特性。

酵母是葡萄酒酿造的灵魂。在无氧条件下,由葡萄转化成葡萄酒的过程中,酿酒酵母的作用至关重要。在自然或自发发酵情况下,微生物的群体消长现象是自发进行的,其必要条件也随时间的变化而改变,包括真菌、酵母、细菌(醋酸菌、乳酸菌)和病毒(真菌病毒和抗菌素)的相互作用。微生物群体间的相互作用引发协同效应,促使芳香类化合物的生成,这类化合物不是简单的通过混合各纯培养发酵

收稿日期:2009-09-07 * 通讯联系人

作者简介:王晓飞(1983-),女,硕士研究生,主要从事微生物次级代谢产物方向的研究。

的成分就能实现的。这点已由近期的代谢足迹技术,通过单纯培养、混合发酵和将几种酒混杂的方法,利用气相色谱分析发酵产物中挥发性物质的组分,予以证实^[3]。在实际应用中,葡萄酒活性干酵母为葡萄酒品质控制提供了非常有效的手段和保证。在发酵中,活性干酵母在数量上占相对优势,能形成同质性及稳定性的群体,使葡萄酒酿造者更易于测试其纯度、活性及酵母菌种特征。从生物技术角度,活性干酵母的应用对微生物学发酵过程具有深远的影响。

另外,葡萄酒发酵过程中,必须防止一些有害微生物的侵染,如灰葡萄孢菌会影响风味独特、高档的贵腐葡萄酒的酿造,啤酒、葡萄酒、清酒酿造中出现嗜杀酵母现象^[4],造成酵母污染,并影响酒的风味,甚至引起酒变质,阻碍酿酒的正常进行。近期,功能基因组技术的应用,在相应的工业环境条件下,对识别被胁迫控制的基因、控制代谢的转录因子及相关的工艺性能具有重要的作用^[5]。酵母作为一个体系明确的生物体,在可以操控的前提下,以其独特的优良特性,成为研究“系统生物学”、洞悉特定环境条件下某一具体表型调节机制的“模式生物”^[6]。

2 葡萄酒发酵操控

酒精发酵是一个动力学的、复杂的过程,在此过程中,由于环境培养条件发生巨大变化以及发酵酵母的生理活性,葡萄酒要经历持续的转变。酿酒工业化生产远比实验室条件下小量的葡萄酒制作艰难复杂。工业生产用酿酒酵母菌株与实验室品系差异显著,实验室用的品种多为单倍体或双倍体。工业用葡萄酒酵母菌株主要是双倍体或非整倍体,个别多倍体表现出染色体长度的高度多态性^[7]。实验室培养用葡萄酒酵母菌株与工业生产用葡萄酒酵母菌株在对环境变化所作出的反应上也存在着明显差异^[8]。因此,为了保持细胞的完整性以及整个酿酒过程的代谢活性,酿酒酵母形成了一整套机制以灵活适应不断变化的环境条件。下面简要介绍葡萄酒发酵的操控手段:

在葡萄酒发酵操控系统中,要求精确地控制葡萄酒汁发酵温度和密度,使发酵按照既定的质量要求发展。然而,发酵的动态复杂性使温度很难人为控制,造成香味挥发、口感粗糙,甚至蝇虫滋生、发酵骤停等恶性事件,因此需要一套完备的控制系统操控发酵过程。现代酿酒车间利用 LONWORKS 系统实现对发酵的操控目的。系统是由一个主机节点和若干个 LON 节点构成的集散系统。通过计算机远程通讯将所有酒罐的信息储存在网络服务器上,在有关人员的联网计算机上,可以随时查阅所有酒罐的储量、密度、液位、酒种、发酵过程的密度曲线、温度曲线等实时数据和历史数据。决策者及管理人员能够及时掌握生产情况,进而进行生产调度和指挥,对酿造过程的生产管理和质量管理具有极高的使用价值。LONWORKS 这一高新技术的引用显示了酿酒行业正朝着网络化和工业化的方向迈进^[9]。

网络组成分析(NCA)是一种由转录分析如 DNA

微阵列或 SAGE 重建调节信号的方法,用于确定发酵过程中位于某一特定的点的转录因子是否具有活性^[10]。DNA 微阵列技术是鉴别混合在一起的各种细菌的理想工具,可以得到细菌丰度和细菌种类的信息。利用该技术比对标准实验室菌种、突变种和工业酵母菌基因型,进而得到适合消费者和商家需要的理想酵母。微阵列技术也是评价基因表达的主要工具,这项技术可以用于发酵过程中阳性性状的基因表达分析。尤其对获得那些调控序列,即用于操控只能在上述条件下才能进行转录的自然的或被导入基因产物的表达是非常有帮助的。用 SAGE 和微阵列技术所获得的结果相类似,但因为 SAGE 不需要精确了解酵母基因序列,因此 SAGE 对于新基因的发现是非常有意义的。

3 葡萄酒酵母菌种的改良

为了满足不同地区、不同人群、不同风格的葡萄酒消费需求,优良葡萄酒酵母的选育工作尤其重要。真正优良的葡萄酒酵母应该具备起酵快,拥有连续发酵能力和可描述性,能耐酒精、高压、高 SO₂、高温,能产生甘油和糖苷酶,但不失芳香和口感,并且能使发酵过程进行地完全,残糖少,酒体协调,易于长期储存等优点^[11]。葡萄酒生产商为了使其产品在市场上有竞争力,希望得到发酵性能更优异的葡萄酒酵母菌株。例如:增加活性干酵母的抗胁迫能力和恢复能力,改善酵母对葡萄汁中糖分和氮素的吸收与同化,提高酵母对乙醇、其它微生物的代谢产物及毒素的耐受力,提高它们对亚硫酸盐、重金属和农业化学残留物的耐受力,减少发酵过程中泡沫的形成,借助抗菌酶和多肽的表达或二氧化硫的代谢生产以实现有害微生物的控制等。消费者对葡萄酒品质要求也在不断提高,口味日趋多样化,倾向于新型、健康的葡萄酒。例如:要求增加葡萄酒中有益于健康的物质如白藜芦醇和水杨酸等,以及涉及葡萄酒风味的物质如酯类和醇类等的含量;减少葡萄酒中的酒精含量以及可能存在的微量有害物质如被怀疑有致癌可能的氨基甲酸乙酯和神经毒素生物胺等^[12-13]。葡萄酒厂和消费者的这些需求直接推动了葡萄酒酵母的筛选和改良。

传统的自然筛选、采用理化因素的诱变等经典的育种手段仍是目前最实用的常规技术,随着现代科技的发展,出现了很多选育酵母的新技术如基因重组、基因工程育种等手段。

3.1 酵母的基因重组

采用杂交、接合、转化和转导等遗传学方法,把两个不同形状个体内的基因放在一起,经遗传交换(crossing over),重新组合后,使外源目的基因进入酵母细胞,并得以表达,以期使得酵母细胞在原有性状的基础上,获得人们所需要的特殊性状。基因重组技术是菌种改良的重要手段。

3.1.1 杂交育种 杂交育种利用了酵母的生活史、不同遗传特性和相反交配型的细胞产生的双倍体等特点。这种育种方式可以消除菌株在经历长期诱变后所出现的产量性状难以继续提高的障碍。如利用

选自乳清的酿酒酵母与葡萄汁酵母为亲本进行杂交,可以在获得杂合子的同时又具有两个亲本的良好性状(分解苹果酸能力强和生成乙酸能力弱)^[14]。

3.1.2 细胞融合育种 细胞融合育种是将两种不同的菌株经酶法去壁后,得到的原生质体,置于高渗溶液中,在融合剂的作用下产生细胞之间的融合,进而导致基因重组,获得融合了亲本优良性能的新菌株的育种方法^[15]。陈海昌等^[16]用啤酒酵母和糖化酵母进行原生质体融合,筛选出融株,既有较高的发酵度和絮凝性,又能水解淀粉和糊精,适宜生产低糖啤酒。微生物细胞融合技术是通过改变微生物细胞的遗传性进行育种。高年发等^[17]采用赖氨酸缺陷型酿酒酵母原生质与肌醇缺陷型粟酒裂殖酵母原生质体融合选育了葡萄酒发酵性能良好且具有降解苹果酸能力的酵母菌株。它不受亲缘关系影响,可克服细胞壁的天然屏障,遗传信息传递量大,不需了解双亲详细的遗传背景,便于操作,而且原生质体的再生过程本身也可以认为是筛选的过程。所以可以在种内、属内、属间甚至跨界进行,并且在各个领域中都取得了一定的效果。

值得一提的是跨界融合技术,其作为细胞融合技术的一个扩展领域,具有很大的前景和挑战性。然而由于跨界融合的亲缘关系甚远,融合难度大,筛选困难,且融合后代遗传稳定性差等原因^[18],因此跨界融合成功的事例并不多见。期待将来利用酵母的天然优良品质,打破种属间界线,应用跨界融合技术,为葡萄酒酿造研发出更佳的酵母菌株。

3.1.3 Genome shuffling 技术 Genome shuffling 技术是在传统诱变基础上,通过多轮递推细胞融合技术的方式,使诱变后的酵母细胞进行基因组重组,进而提高酵母细胞的正向突变频率及正向突变速度,最终从获得的突变体库中筛选出所需要的酵母菌株。Genome shuffling 技术在只了解微生物遗传性状的基础上实现了微生物的定向育种,获得了大幅度正突变的菌株,也成为微生物发酵工程中的一种有效的工具。陆筑凤等^[19]采用了紫外诱变和 Genome shuffling 技术相结合的方法筛选得到既耐高温又耐乙醇的酵母菌,选育出高温下能高产乙醇和香味物质的酿酒酵母。

3.2 基因工程育种

基因工程育种是从生物体内提取出所要表达的基因或人工合成的 DNA 片段,导入适当的载体,再转入酿酒酵母细胞中,使遗传物质重新组合,从而实现酿酒酵母的改良。自从 1996 年酿酒酵母全基因组测序工作的完成,人们对葡萄酒酵母的复杂代谢过程有了越来越多的认识。迄今为止,科学家们已为葡萄酒酵母发展了多种有效的质粒载体和基因转移方法,以及用于外源基因在酵母体内表达和产物分泌的表达和分泌盒。上述葡萄酒酵母基因组学和分子生物学的研究成果,以及近些年生物信息学的迅速发展为新型酵母菌株的基因设计和选择提供了更广的适用性和更强的专一性手段,使葡萄酒酵母的分子改良取得了许多进展,例如:过量生产甘

油^[20]、降低酒精的含量、增加酚类化合物的释放、减少乙烷基氨基甲酸盐的生成^[21]、增加葡萄抗氧化剂白藜芦醇的生成^[22]和酯类物质的生成等。

根据目的基因的来源和所构建的酵母基因工程菌是否含有外源 DNA 片段,可以将酵母菌的遗传修饰分为非自身克隆和自身克隆两种技术。通过自身克隆技术构建的酵母基因工程菌中,不但目的基因来源于酵母菌本身,而且不引入任何其他的外源 DNA 片段,所以这种酵母基因工程菌更容易被企业和消费者接受和应用到生产实践中。近来,这项技术已被应用于葡萄酒酵母菌株的改良。Coulon J 等通过把 DUR1,2 基因置于 PGK1 启动子的控制之下,获得了减少产生致癌物氨基甲酸乙酯的菌株^[21]。随着分子生物学和分子遗传学的发展,利用基因工程技术将会定向地对酿酒酵母进行改造与构建,从而获得具有更加优良酿造特性的葡萄酒酵母。

此外,关于菌种选育的其它方法如离子束注入、激光诱变、高压静电等方法的应用,也展现了新的前景。

4 结语

葡萄酒因具有很高的营养和保健作用而越来越受到人们的青睐,人们对葡萄酒的消费越来越注重品质。生产厂家为了在竞争日趋激烈的葡萄酒市场中立于不败之地,也需要想尽一切办法来降低生产成本和提高葡萄酒的品质。生物技术在二十一世纪为提高葡萄酒的品质,降低优质葡萄酒的生产成本,满足不同消费者多元化的个性需求,提供了更为广阔的可能和选择空间。葡萄酒酵母是葡萄酒品质的灵魂,对葡萄酒产量、色泽、香气、感官质量和风格的影响非常重要,用不同菌种发酵生产的葡萄酒,其产量、酒质和风味大不相同。因此应用现代科技手段调控葡萄酒发酵工艺和选育优良酵母菌种是目前葡萄酒研究领域的热点之一。在基因技术应用方面,对消费者和生产者同样都有着巨大的潜在效益。葡萄酒行业的趋势可能会根据消费者的喜好订制菌株,这样大量的葡萄酒必将开辟适合特殊消费者群体的特殊市场。尽管很多经基因改良的酵母由于生物安全性不能保证而无法应用到工业生产上,但随着具备较高生物安全性的自克隆技术的发展,相信在不远的将来会有越来越多的基因改良的葡萄酒酵母菌株应用到葡萄酒酿造过程之中。

参考文献

- [1] Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, et al. Life with 6000 genes [J]. Science, 1996, 274: 546-567.
- [2] Pizarro F, Vargas Fand, Agosin A E. Systems biology perspective of wine fermentations [J]. Yeast, 2007 (24): 977-991.
- [3] Howell KS, Cozzolino D, Bartowsky EJ, et al. Metabolic profiling as a tool for revealing Saccharomyces interactions during wine fermentation [J]. FEMS Yeast Res, 2006 (6): 91-101.
- [4] 王贵双, 张柏林, 梁学军. 嗜杀酵母的生物学功能及其应用 [J]. 生物技术通报, 2006 (Z1): 100-105.
- [5] Varela C, Cardenas J, Melo F, et al. Quantitative analysis of

- wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions [J]. *Yeast*, 2005, 22: 369-383.
- [6] Castrillo J, Oliver S. Yeast as a Touchstone in Post-genomic Research: Strategies for Integrative Analysis in Functional Genomics [J]. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37: 93-106.
- [7] Bakalinsky A, Snow R. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 1990 (6): 367-382.
- [8] Dunn B, Levine RP, Sherlock G. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures [J]. *BMC Genom*, 2005(6): 53.
- [9] 李有洪. LONWORKS 技术在葡萄酒发酵控制系统中的应用 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 1999(2): 56-58.
- [10] Liao JC, Boscolo R, Yang YL, et al. Network component analysis: reconstruction of regulatory signals in biological systems [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15522-15527.
- [11] 张超, 王玉霞, 刘树文. 葡萄酒酵母选育研究进展 [J]. *南方农业*, 2007(2): 44-48.
- [12] Coulon J, Husnik JI, Inglis DL, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine [J]. *Am J Enol Vitic*, 2006, 57: 113.
- [13] Lema C, Garcia Jares C, Orriols I, et al. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma [J]. *Am J Enol Vitic*, 1996, 47: 206-216.
- [14] Rainnien S, Zambonelli C, Tini V, et al. Oenological properties of an interspecific *Saccharomyces* hybrid [J]. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 1999, 20(2): 47-52.
- [15] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 139-143.
- [16] 陈海昌, 刘波, 张苓花, 等. 原生质体融合技术构建糖化型啤酒酵母的研究 [J]. *微生物学报*, 1997, 24(3): 159-161.
- [17] 高年发, 王淑豪. 酿酒酵母与粟酒裂殖酵母属间原生质体融合选育降解苹果酸强的葡萄酒酵母 [J]. *生物工程学报*, 2000(6): 35-38.
- [18] 李华, 刘晓晴. 跨界融合在葡萄酒降酸微生物育种中的应用前景 [J]. *食品工业科技*, 2006(1): 204-206.
- [19] 陆筑凤, 李超, 王昌禄, 等. Genome shuffling 技术选育高耐性酿酒酵母 [J]. *酿酒科技*, 2008(7): 23-25.
- [20] Michnick S, Roustan J, Remize F, et al. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains over expressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase [J]. *Yeast*, 1997(13): 783-793.
- [21] Coulon J, Husnik JI, Inglis DL, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine [J]. *Am J Enol Vitic*, 2006, 57(2): 113-124.
- [22] Beekwilder J, Wolswinkel R, Jonker H, et al. Production of resveratrol in recombinant microorganisms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 5670-5672.
- (上接第 157 页)
- [4] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi* [M]. 10th edition. Wallingword: CAB International, 2008: 1-771.
- [5] 虞悝. 头孢霉素 C 酶裂解的进展与产生 7-ACA 产黄顶孢霉菌株的建构 [J]. *国外医药抗生素分册*, 1994, 15(6): 401-405.
- [6] 郭永霞, 刘庆洪, 王贺祥, 等. *Acremonium hansfordii*, 一中国新记录种及其抗植物病原真菌活性的研究 [J]. *菌物学报*, 2005, 24(4): 505-509.
- [7] Arnone A, Nasini G, Panzeri W, et al. Acremine G, dimeric metabolite from cultures of *Acremonium byssoides* A20 [J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71(1): 146-149.
- [8] Schiell M, Hofmann J, Kurz M, et al. Cephaibols, new peptaibol antibiotics with anthelmintic properties from *Acremonium tubakii* DSM 12774 [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2001, 54(3): 220-233.
- [9] Evans L, Hedger JN, Brayford D, et al. An antibacterial hydroxy fusidic acid analogue from *Acremonium crotocinigenum* [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(19): 2110-2114.
- [10] Ikeda Y, Hayashi H, Okuda N, et al. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticum* [J]. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(2): 333-338.
- [11] 彭凡, 胡丰林, 查晓虹, 等. 交织顶孢霉保肝活性物质的研究 [J]. *生物学杂志*, 2005, 22(3): 25-27.
- [12] Yang Jianxiong, Guo Juan, Yuan Jiangfeng. In vitro antioxidant properties of rutin [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2008, 41(6): 1060-1066.
- [13] 刘刚, 王辉, 张先洲, 等. 青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用 [J]. *中草药*, 2006, 37(1): 84-87.
- [14] 王金刚, 王西奎, 国伟林, 等. 亚甲基蓝光度法测定羟自由基 [J]. *理化检验 - 化学分册*, 2007, 43(6): 495-497.
- [15] Chyau Charng - Cherng, Ko Pei - Tzu, Mau Jeng - Leun. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2006, 39(10): 1099-1108.
- [16] 管国强, 张玲, 黄达明, 等. 桑黄深层发酵上清液抗氧化活性的研究 [J]. *食品工业科技*, 2008, 29(12): 106-107.
- [17] Harper JK, Arif AM, Ford EJ, et al. Pestacin: a 1,3-dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(14): 2471-2476.
- [18] 史佳琴, 周松林, 王梅霞, 等. 槐树内生真菌抗氧化活性的初步研究 [J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 250-253.
- [19] 阎雪芬, 黄丹虹, 代宇博, 等. 海洋真菌抗氧化活性物质的初步研究 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(3): 418-421.