

# 果香型葡萄酒酵母菌种选育的研究进展

姜凯凯<sup>1</sup>, 秦伟帅<sup>2</sup>, 田冬<sup>3</sup>, 苗丽平<sup>1</sup>, 赵新节<sup>1</sup>

(1. 齐鲁工业大学 生物工程学院, 山东省微生物工程重点实验室, 山东 济南 250353; 2. 泰山学院 生物与酿酒工程学院, 山东 泰安 271021; 3. 青岛啤酒(济南)有限公司, 山东 济南 250104)

**摘要:**酯类是影响葡萄酒香气的主要成分,使用果香型葡萄酒酵母能够酿造酯类含量相对较高的葡萄酒,提升葡萄酒的香气质量。因此,选育果香型葡萄酒酵母具有重要意义。现通过5种不同的育种技术,尤其是基因工程育种方面,对国内外果香型酵母的选育进行了综述,以期对未来果香型葡萄酒酵母的选育提供理论参考。

**关键词:**酯类;葡萄酒香气;果香型葡萄酒酵母;基因工程

**中图分类号:**S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)23-0185-04

葡萄酒是上百种化合物的复杂混合,许多化合物显著影响葡萄酒的颜色、口感和香气<sup>[1]</sup>。酯类是香味化合物,广泛出现在许多食品中<sup>[2]</sup>。在发酵型饮料葡萄酒和啤酒中,酯类作为一个群体,是果香的重要组成部分<sup>[3]</sup>。酯类对发酵类饮料香味的判定十分重要,不同酯类存在协同作用,影响发酵酒的口感。酒精发酵期间,酯类是酵母次生代谢产物中的主要物质<sup>[1]</sup>。研究表明,在葡萄酒生产和最终酯类产品中,菌种选择至关重要<sup>[4-7]</sup>。因此,选育能够高产酯类化合物的酵母对生产高品质果酒具有重要意义。

## 1 国内外酵母菌种选育现状

传统酿酒酵母的选育方法主要有筛选法育种、有性杂交育种和诱变育种。近年来,随着DNA重组技术的发展,原生质体融合育种和基因工程育种得到迅速发展,广泛应用到酿酒酵母的选育中<sup>[8-9]</sup>。美国比较重视葡萄酒酵母的发酵性能,利用有性杂交技术、原生质体融合技术和基因工程选育产量较高、发酵性能优良、葡萄酒风味协调的葡萄酒酵母菌株。欧洲一些国家很重视本土野生葡萄酒酵母菌的使用,因此,欧洲人一般采用葡萄自然发酵的工艺。我国应用自然筛选、原生质体融合技术以及紫外线诱变技术对酿酒酵母进行选育,取得了不错的效果,分别得到耐高温、耐低温、耐二氧化

硫、降酸、高产酯的酵母菌种。

## 2 果香型酵母菌种选育

### 2.1 筛选法育种

在自然界中,数百种野生酵母生活在葡萄园的土壤中,葡萄叶片、茎秆、藤蔓或葡萄浆果上<sup>[10]</sup>。因此葡萄园对果香型酵母菌种筛选来说,是一个巨大的资源库。有研究表明,利用从葡萄浆果和葡萄汁中分离得到的酵母能生产果香浓郁、香气持久的葡萄酒<sup>[11]</sup>。PEREZ-COELLO等<sup>[12]</sup>从德国La Mancha地区的3个葡萄园中筛选出392株酵母菌,其中第27、41、230株酵母菌能够产生高浓度的己基乙酸酯和乙酸戊酯,增加葡萄酒的果香,并能产生高浓度的顺-3-己烯-1-醇和1-己醇,提高葡萄酒的草药香气。商敬敏<sup>[13]</sup>从山东蓬莱、云南德钦产地葡萄园土壤中分离得到118株天然酵母菌,在9#、10#、11#、12#、13#酒样中检测出呈葡萄酒优雅果香的乳酸乙酯。

### 2.2 有性杂交育种

有性杂交一般指不同遗传型的两性细胞间发生的接合和随之进行的染色体重组,进而产生新遗传型后代的一种育种技术。酿酒酵母有其完整的生活史,从自然界分离得到的,或在工业生产中应用的菌株,一般都是双倍体细胞,适宜进行有性杂交<sup>[10]</sup>。日本学者KISHIMOTO等<sup>[14]</sup>利用嗜冷葡萄酒酵母 *Saccharomyces bayanus* YM-84、YM-126 与中温葡萄酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 进行杂交,得到6个杂交种,经过气相色谱分析乙酸异戊酯和 $\beta$ -乙酸苯乙酯的产量是 *Saccharomyces cerevisiae* OC-2 产量的2~4倍。此外,经过7种感官评价,这6个杂交种香气浓郁。SHINOHARA等<sup>[15]</sup>利用31株 *Saccharomyces cerevisiae* 进行杂交,结果发现杂交株 RIFT 1046、1057、1065 能产生高浓度的芳香酯类。

**第一作者简介:**姜凯凯(1989-),男,硕士研究生,研究方向为现代酿酒技术。E-mail:jiangkaikai1011@163.com.

**责任作者:**赵新节(1962-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为葡萄与葡萄酒。E-mail:zxj@qlu.edu.cn.

**基金项目:**山东省现代农业产业技术体系创新团队资助项目(SDAIT-03021-12)。

**收稿日期:**2015-07-27

### 2.3 诱变育种

酵母菌的诱变育种是通过人为的诱变方法诱变酵母菌产生基因突变,改变遗传的结构和功能,通过进一步筛选,从众多的变异体中筛选出性状优良的突变株<sup>[16]</sup>。许多诱导突变的物理学方法,例如 $\gamma$ 射线、 $\beta$ 射线、快中子、紫外线辐射、激光、太空育种以及最近几年流行的等离子体诱变技术,此外,一些化学诱变剂的使用,主要包括某些烷化剂、碱基类似物、抗生素等化学药物,这些化合物与核苷酸中的嘧啶、嘌呤和磷酸等分子直接进行反应,从而引起微生物基因的突变,这些物理化学诱变方法,得到广泛的研究并且应用于诱变育种<sup>[17]</sup>。WANG等<sup>[18]</sup>利用甲基磺酸乙酯(EMS)和紫外线(UV)辐射诱变,将*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 1252进行处理,得到突变株 W3-8,利用 GC-FID 检测乙酸酯和乙基酯,检测结果表明乙酸丙酯、乙酸异丁酯和乙酸异戊酯含量较原菌株增加。

### 2.4 原生质体融合育种

原生质体融合技术是将遗传性状不同的2个细胞去壁后,将得到的原生质体,在一定融合剂的促融作用下,使二者相互凝集并发生细胞之间的融合,使得2个亲株的整套基因相互重新组合的一种技术<sup>[8,19]</sup>。原生质体融合技术是继转化、转导和接合等基因重组方式之后,又一个重要的基因重组技术。应用原生质体融合技术后,细胞间基因重组频率得以大大提高<sup>[10]</sup>。王瑞明等<sup>[20]</sup>将产酯能力较低的酒精酵母*S. cerevisiae* 1300(a)与产酯酵母*H. anomala* 1312进行原生质体,得到产乙酸乙酯能力高的 FSH-12 菌株。

### 2.5 基因工程育种

基因工程是指利用分子生物学理论的技术,自觉设计、操纵和重组细胞基因组,使得生物体遗传性状发生定向改变,达到超远缘杂交的定向育种技术<sup>[21]</sup>。葡萄酒酵母基因组的测序工作1996年已经全部完成,它是第一个完成基因组测序的真核生物,包含16条染色体,全长为12 068 kb。国内外正在对其全部的6 000多个基因功能进行破译,研究人员对葡萄酒酵母的复杂代谢过程有了更多的了解<sup>[22]</sup>。近几年来,通过基因工程获得了众多专业葡萄酒酿酒酵母菌株,大多具有优良或新颖的酿酒特性,能够满足现代酿酒技术的需求<sup>[23]</sup>。

大量研究表明,酯类是葡萄酒果香的重要成分<sup>[1]</sup>。葡萄酒中,酯类分为2种,有些通过酶促反应形成,有些在葡萄酒老化时期,通过酒精与酸在低pH值下,化学酯化合成<sup>[24]</sup>。发酵过程中,葡萄酒中有关酯的酶类积累是酯酶合成与水解反应平衡,以及醇乙酰转移酶合成的结果<sup>[25-26]</sup>。醇乙酰转移酶是含巯基的酶,能够催化高级醇和乙酰辅酶A合成酯<sup>[1]</sup>。

ATF1和ATF2基因是酿酒酵母中第一组乙酰转

移酶结构基因分别编码醇乙酰转移酶I和醇乙酰转移酶II<sup>[27]</sup>。醇乙酰转移酶I有ATF1基因编码,具有最大的活性,且研究最多<sup>[28-29]</sup>。ATF1基因首次从酿酒酵母中克隆,酿酒酵母只有1个ATF1基因,而啤酒酵母*Saccharomyces uvarum*有1个ATF1基因和1个同源基因Lg-ATF1<sup>[30]</sup>。有研究表明,携带多个ATF1基因或者Lg-ATF1基因的酵母菌具有高的醇乙酰转移酶活性,较只有1个ATF1基因的酵母菌能产生更多的乙酸酯类。乙酸异戊酯的浓度有27倍的增加,乙酸乙酯的浓度有9倍的增加<sup>[31]</sup>。敲除ATF1基因,酯类产量急剧下降。LILLY等<sup>[25]</sup>使用PGK1作为启动子和终止子,在3株商业酵母中表达ATF1基因,所产生的乙酸乙酯含量增加3~10倍,乙酸异戊酯含量增加3.8~12.0倍,乙酸苯乙酯含量增加2~10倍,其它酯类仅显示轻微变化。醇乙酰转移酶II由ATF2基因编码,最初从*Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No.7的1个 $\lambda$ -EMBL3噬菌体抗体库中克隆。ATF1和ATF2基因,在发酵过程中负责乙酸乙酯和异戊酯的生成<sup>[32]</sup>。TIWARI等<sup>[33]</sup>报道称,ATF2基因负责形成乙酰化甾醇也可能在类固醇解毒中发挥作用。有研究分析了多子囊真菌醇乙酰转移酶的同源基因,并且发现了第2个值得关注的活性位点H-X-X-X-D,此活性位点发现存在于在醇乙酰转移酶的所有序列,并且位于酿酒酵母从残基198~202的Atf1p氨基酸序列<sup>[34]</sup>。进一步研究发现,此活性位点与醇乙酰转移酶的生理作用有关系,并且在酯合成中比较重要<sup>[1]</sup>。

SAERENS等<sup>[35]</sup>报道了中链脂肪酸乙基酯合酶和酯酶2个蛋白的活性,这2个蛋白命名为EHT1和EEB1。EHT1基因编码一个乙醇己酰转移酶,此酶催化乙醇和己酰辅酶A生成己酸乙酯。EEB1基因编码乙醇酰基转移酶,负责中链脂肪酸乙基酯的合成。

有报道称,IAH1基因是最终的酯酶基因,参与乙酸乙酯的水解。一个IAH1 $\Delta$ 突变株显示,相对于野生酵母,IAH1 $\Delta$ 突变株所产生的2-甲基丙基酯和乙酸异戊酯含量均增加<sup>[36]</sup>。

## 3 展望

果香型葡萄酒酵母菌种的选育方法包括筛选法、有性杂交法、诱变法、原生质体融合法和基因工程法等。筛选法工作量较大,但易于筛选出适宜的本土果香型酵母;诱变法的操作较为简便,但获得优良果香型酵母机率较小;有性杂交法和原生质体法对试验的操作与仪器的选择较为严格;基因工程法需要强大的理论支持,最能够获得令人满意的菌株,但由于酵母菌代谢中,酯类的生理作用没有被全部了解<sup>[1]</sup>,加上基因操作的安全性,在国际、国内是一个很有争议的问题,通过基因工程构建果香型葡萄酒酵母存在一定阻力。但是,基因工程技术对果香型酵母的选育具有诸多的潜在优势,基因工

程势必会对未来果香型酵母的选育做出巨大贡献。只要选择合适的方法进行科学试验,可以有效缩短育种时间,提高育种效率。果香型葡萄酒酵母菌种的筛选对生产果香浓郁的葡萄酒具有重大意义,能够提升消费者的认可度,推动葡萄酒及其它果酒行业的发展。

### 参考文献

- [1] SUMBY K M, GRBIN P R, JIRANEK V. Microbial modulation of aromatic esters in wine; Current knowledge and future prospects[J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 1-16.
- [2] GATFIELD I L. Bioreactors for industrial production of flavours; use of enzymes[J]. Royal Society of Chemistry, 1992, 12(2): 171-185.
- [3] GURBUZ O, ROUSEFF J M, ROUSEFF R L. Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(11): 3990-3996.
- [4] FLEET G H. Yeast interactions and wine flavour[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86(1): 11-22.
- [5] MILLER A C, WOLFF S R, BISSON L F, et al. Yeast strain and nitrogen supplementation; Dynamics of volatile ester production in Chardonnay juice fermentations[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2007, 58(4): 470-483.
- [6] ROJAS V, GIL J V, PINAGA F, et al. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 70(3): 283-289.
- [7] ROMANO P, FIORE C, PARAGGIO M, et al. Function of yeast species and strains in wine flavour[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86(1): 169-180.
- [8] 魏运平, 叶俊华. 原生质体融合技术及其在酿酒酵母菌株选育中的应用[J]. 酿酒科技, 2003(1): 87-89.
- [9] 周丽艳, 刘绍军, 刘杨. 特色葡萄酒酵母菌种选育研究进展[J]. 中国酿造, 2008, 5(2): 6-7.
- [10] 张春晖, 李华. 葡萄酒微生物学[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2003: 206-233.
- [11] 王红, 刘天明, 刘思喜. 天然优良葡萄酒酵母发酵特性研究[J]. 酿酒科技, 2012(9): 75-77.
- [12] PEREZ-COELLO M S, PEREZ A I B, IRANZO J F U, et al. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region[J]. Food Microbiology, 1999, 16(6): 563-573.
- [13] 商敬敏. 蓬莱、德钦产地葡萄酒相关酵母的分离鉴定及其耐受性研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2012.
- [14] KISHIMOTO M. Fermentation characteristics of hybrids between the cryophilic wine yeast *Saccharomyces bayanus* and the mesophilic wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77(4): 432-435.
- [15] SHINOHARA T, SAITO K, YANAGIDA F, et al. Selection and hybridization of wine yeasts for improved winemaking properties; Fermentation rate and aroma productivity[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77(4): 428-431.
- [16] 王雅君, 陈力力, 廖杰琼, 等. 微生物物理诱变育种方法的研究进展[J]. 农产品加工(学刊), 2013(2): 25-31.
- [17] ZHU H, XU J, SHI J, et al. Mutation breeding for productive yeast strains through a novel method; High-energy-pulse-electron-beam[J]. Annals of Microbiology, 2008, 58(3): 549-553.
- [18] WANG H, HOU L. Genome shuffling to improve fermentation properties of top-fermenting yeast by the improvement of stress tolerance[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(1): 145-150.
- [19] 彭帮柱, 岳田利, 袁亚宏, 等. 酵母菌原生质体融合技术[J]. 西北农业学报, 2004, 13(1): 101-103.
- [20] 王瑞明, 李敏. 高活性高酒精产率产酯酵母菌株的选育[J]. 酿酒科技, 1994(2): 21-24.
- [21] 周德庆. 微生物学教程[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 235-236.
- [22] 周丽艳, 刘绍军, 刘杨. 特色葡萄酒酵母菌种选育研究进展[J]. 中国酿造, 2008(14): 13-17.
- [23] SCHULLER D, CASAL M. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(3): 292-304.
- [24] MARGALIT Y. Concepts in wine chemistry[M]. Wine Appreciation Guild, Limited, 1997.
- [25] LILLY M, LAMBRECHTS M G, PRETORIU I S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 744-753.
- [26] MATTHEWS A, GRBIN P R, JIRANEK V. Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(2): 329-337.
- [27] MASON A B, DUFOUR J P. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast[J]. Yeast, 2000, 16(14): 1287-1298.
- [28] CAUET G, DEGRYSE E, LEDOUX C, et al. Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 261(1): 317-324.
- [29] HORTON C E, BENNETT G N. Ester production in *E. coli* and *C. acetobutylicum* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(7): 937-943.
- [30] FUJII T, NAGASAWA N, IWAMATSU A, et al. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(8): 2786-2792.
- [31] LILLY M, BAUER F F, LAMBRECHTS M G, et al. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates[J]. Yeast, 2006, 23(9): 641-659.
- [32] MALCORPS P, DUFOUR J P. Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 210(3): 1015-1022.
- [33] TIWARI R, KOFFEL R, SCHNEITER R. An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols and steroids from *S. cerevisiae* [J]. The EMBO Journal, 2007, 26(24): 5109-5119.
- [34] LAERE S D M V, SAERENS S M G, VERSTREPEN K J, et al. Flavour formation in fungi; characterisation of KlAtf, the *Kluyveromyces lactis* orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferases Atf1 and Atf2[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(5): 783-792.
- [35] SAERENS S M G, VERSTREPEN K J, VERSTREPEN S D M, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(7): 4446-4456.
- [36] FUKUDA K, YAMAMOTO N, KIYOKAWA Y, et al. Brewing properties of sake yeast whose EST2 gene encoding isoamyl acetate-hydrolyzing esterase was disrupted[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85(1): 101-106.



DOI:10.11937/bfyy.201523052

# 芦笋采收贮藏加工技术研究进展

柴文臣<sup>1</sup>, 阎世江<sup>1</sup>, 张 微<sup>2</sup>

(1. 山西省农业科学院 蔬菜研究所, 山西 太原 030031; 2. 山西省农业科学院 高粱研究所, 山西 晋中 030600)

**摘 要:**芦笋是多年生宿根性草本植物,是当前我国农业结构调整中利于农民创收的好项目,我国已成为世界上芦笋种植面积最大的生产和出口国,国际影响力不断提升,然而却不是芦笋生产强国。该文综述了我国芦笋分布简况和采收贮藏加工技术的研究进展,对存在的问题进行了分析,并对芦笋产业的发展前景进行了展望。

**关键词:**芦笋;采收;贮藏;加工技术;研究进展

**中图分类号:**S 644.609<sup>+</sup>.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)23-0188-06

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)属百合科天门冬属多年生宿根草本植物,学名石刁柏,别名龙须菜,以嫩茎为采收对象。起源于地中海东岸及小亚细亚地区,20世纪初在我国开始栽培,1970年后开始形成一定规模<sup>[1]</sup>。芦笋的营养丰富,科学家研究表明芦笋中富含皂苷、固醇等物质以及人类必需的多种微量元素,这些物质能抗细胞氧化、提高人体免疫力、对人体正常新陈代谢起到调节作用。临床表现为利尿、镇静、软化血管、降低“三高”等,其中皂苷和组蛋白对癌细胞具有抗性<sup>[2-3]</sup>。因此芦笋被称为“蔬菜之王”,名列世界十大名菜之一。

近年来,随着人民群众生活观念的改变,尤其是我

国加入 WTO 后,我国芦笋多外销的状况也在改变,内销数量逐年升高,对芦笋不只是简单加工,深加工产品销量也越来越大。由于芦笋形成规模后的栽培时间较短,对芦笋育种和栽培技术已有一些研究报道,对于采收贮藏加工的研究尚鲜见报道,致使各地出现了“重栽培而轻贮藏加工”的局面,许多芦笋种植基地因未对芦笋进行加工使效益降低。该研究综述了我国芦笋采收、贮藏、加工技术和深加工产品的进展,以期为我国芦笋产业的发展和农村发展农民致富提供帮助。

## 1 我国芦笋分布简况

纵观世界各地芦笋种植面积,发现近年来发达国家栽培面积减少,发展中国家栽培面积增加,绿芦笋面积扩大,白芦笋面积减少。我国在 1980—1990 年芦笋种植面积增速较快,据统计 2013 年全世界芦笋栽培总面积达 26 万 hm<sup>2</sup>,发展中国家占 13 万 hm<sup>2</sup>,我国约有 10 万 hm<sup>2</sup>,我国是名副其实的芦笋最大的生产国和出口国<sup>[1]</sup>。国内芦笋主产区有山西、山东等省,其中山西的栽培面积最大,已形成以运城永济为核心的白芦笋产区

**第一作者简介:**柴文臣(1981-),男,山西大同人,硕士,研究实习员,现主要从事蔬菜栽培等研究工作。E-mail:cwcl36136@126.com.

**责任作者:**阎世江(1975-),男,山西太原人,博士,助理研究员,现主要从事蔬菜遗传育种等研究工作。E-mail:syauyan@163.com.

**基金项目:**山西省财政厅财政支农成果转化资助项目(2014CGZH-02)。

**收稿日期:**2015-08-13

## Research Progress in Breeding Fruity Type Wine Yeast

JIANG Kaikai<sup>1</sup>, QIN Weishuai<sup>2</sup>, TIAN Dong<sup>3</sup>, MIAO Liping<sup>1</sup>, ZHAO Xinjie<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Microbial Engineering in Shandong Province, Institute of Biological Engineering, Qilu University of Technology, Jinan, Shandong 250353; 2. College of Biological and Brewing Engineering, Taishan University, Tai'an, Shandong 271021; 3. Tsingtao Brewery (Jinan) Co. Ltd., Jinan, Shandong 250104)

**Abstract:** Esters were main components influencing wine aroma, ester content was relatively high in wine by using fruity type yeast, improving the aroma quality of wine. Therefore, it is important to breed fruity type wine yeast. In this paper, 5 different breeding techniques, especially the genetic engineering breeding, were overviewed about breeding of fruity type yeast domestic and abroad, this paper provided reference for breeding fruit type wine yeast in the future.

**Keywords:** esters; wine aroma; fruity type wine yeast; genetic engineering