

葡萄果表天然酵母菌多樣性與醱酵過程中的酵母菌相變化的調查偵測

鍾伊婷¹ 汪碧涵^{2*}

¹東吳大學微生物學系

²東海大學生命科學系

(接受刊載日期: 中華民國一〇一年二月六日)

本研究調查鑑定葡萄鮮食品種巨峰及釀酒品種黑后之果實表面酵母菌菌種, 分離獲得473株, 以PCR-RFLP分析核糖體核酸ITS區域的多型性, 分屬12群, 根據形態特徵、生理生化特性與26S rDNA D1/D2序列, 鑑定出其中六屬九種: *Bulleromyces albus*、*Sporidiobolus pararoseus*、*Cryptococcus albidus*、*Cryptococcus aureus*、*Cryptococcus luteolus*、*Hanseniaspora uvarum*、*Rhodospiridium paludigenum*、*Rhodospiridium sphaerocarpum*與*Rhodotorula minuta*。兩個葡萄品種果實表面酵母菌, 皆以*Sporidiobolus pararoseus*、*Cryptococcus aureus*與*Rhodospiridium paludigenum*為優勢種, 佔總菌數約92%。經培養與非培養法調查葡萄酒釀製過程中菌相的變化, 初期多樣性較高, 後期則以*Saccharomyces cerevisiae*為優勢菌。

關鍵字: 釀酒酵母菌, 天然酵母菌, 多樣性。

Investigation of Indigenous Yeasts on Grapes and Detection of Yeast Flora Dynamics During the Fermentation

Yi-Ting Chung¹ and Pi-Han Wang^{2*}

¹Department of Microbiology, Soochow University, No. 70, Linhsi Rd., Shihlin, Taipei 111, Taiwan, ROC

²Department of Life Science, Tunghai University, No. 181, Sec. 3, Taichung-Kan Rd., Taichung 40704, Taiwan, ROC

(Accepted for publication: February 6, 2012)

This study investigated the yeast diversity on the fruit surfaces of two grapevine varieties of Taiwan, Kyoho and Black Queen, and the yeast flora fluctuation during the fermentation of Black Queen. There were 12 yeast RFLP groups clustered by RFLP analysis of rDNA ITS region from 473 yeast isolates and 9 species of 6 genera identified by morphological and physiological characters and 26S rDNA D1/D2 sequence analysis. They were *Bulleromyces albus*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Cryptococcus albidus*, *Cr. aureus*, *Cr. luteolus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Rhodospiridium paludigenum*, *Rhodospiridium sphaerocarpum* and *Rhodotorula minuta*. *Sporidiobolus pararoseus*, *Cryptococcus aureus* and *Rhodospiridium paludigenum* were the dominant species on the fruit surfaces of both grapevine varieties. Culture-dependent and -independent methods were used to examine the yeast diversity present in Black Queen fermentation. In the early stage of fermentation, several yeast species were present, while in the middle and the end of fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* was dominant.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, natural yeast, diversity.

前 言

台灣栽培的鮮食品種葡萄以歐洲種 (*Vitis vinifera*) 及美洲種 (*Vitis labrusca*) 所選育出之四倍體品種巨峰 (Kyoho) 及蜜紅為主, 釀酒品種則有黑后 (Black Queen) 與金香 (Golden Muscat)

等。黃⁽¹⁾曾調查田間三種釀酒葡萄果實上天然酵母菌, 發現七類菌落形態的酵母菌, 以第一類為優勢菌, 該文為我國葡萄園天然酵母菌早期重要的生態研究報告, 由於酵母菌鑑定複雜, 未鑑定酵母菌, 未能得知該七類為何種酵母菌及其族群變化, 田間葡萄果實上天然酵母

* Corresponding author. E-mail: phwang@thu.edu.tw

菌的多樣性仍待了解。

酵母菌的鑑定根據菌落與細胞的巨觀與微觀形態特性，然因形態特徵有限，菌種間不易區別，相對重要的是其生理與生化特性，其項目很多，已有商品化的套組可應用，且建構的資料庫已累積許多重要或常見菌種，可供比對鑑定。此外，在GenBank有豐富的酵母菌核醣體核酸的編碼序列資料，可供比對與佐證鑑定。

葡萄表面酵母菌隨栽培地區之地理位置、氣候條件及栽培品種而不同。法國南部Bordeaux地區，Cabernet-Sauvignon、Cabernet franc與Sérnilon三種品種葡萄(*Vitis vinifera*)共分離出四種酵母菌⁽²⁾，皆以*Kloeckera apiculata*為優勢酵母菌種，其次為*Metschnikowia pulcherrima*與二種*Rhodotorula*。西班牙南部分離出七屬15種酵母菌，Pedro Ximénez與Tempranillo de Rioja兩個品種的葡萄(*Vitis vinifera*)皆以*Sporobolomyces roseus*為優勢，佔76.69%；*Cryptococcus* spp.為次優勢菌種，佔18.35%，而*Rhodotorula* spp.佔3.53%⁽³⁾。西班牙北部Folle Blanche和Hondarrabi Zuri兩個品種的葡萄(*Vitis vinifera*)，其表面以*Rhodotorula glutinis*為優勢菌，*Kloeckera* spp. (*K. apiculata*及*K. lindneri*)其次，共五屬七種⁽⁴⁾。義大利成熟葡萄果實上，以*Kloeckera apiculata*為優勢種，其餘有*Cryptococcus albidus*、*Cr. flavus*、*Debaryomyces hansenii*、*Metschnikowia pulcherrima*、*Rhodotorula glutinis*、*Torulopsis apiculata*、*T. candida*、*T. stellata*等菌種⁽⁵⁾。日本中部四種白葡萄品種有*Cryptococcus albidus*、*Cr. laurentii*、*Kloeckera apiculata*、*Hanseniaspora occidentalis*、*Rhodotorula glutinis*、*R. minuta*、*Candida* spp. (四種)等酵母菌，其中以*K. apiculata*及*Cryptococcus* spp.分離率最高⁽⁶⁾。美國東南部Muscadine葡萄(*Vitis rotundifolia*)表面分離出六屬十種酵母菌，分別為*Candida albicans*、*C. edax*、*C. humicola*、*C. sake*、*Hanseniaspora osmophila*、*Lodderomyces elongisporus*、*Pichia membranaefaciens*、*Rhodotorula glutinis*、*R. minuta*及*Saccharomyces cerevisiae*⁽⁷⁾。綜合上述不同葡萄種植地區及栽培品種之調查研究，葡萄果實上各有其天然酵母菌種類，以*Candida*、*Cryptococcus*、*Rhodotorula glutinis*及*Kloeckera apiculata*較常被報導。

葡萄酒釀製有自然醱酵及接種醱酵兩種方式。自然醱酵法以葡萄天然酵母菌為醱酵菌

種，釀酒時，葡萄果實表面酵母菌在果實破碎時混入果泥中，參與葡萄酒醱酵，所釀製葡萄酒的風味較為豐富，但果實表面酵母菌種類與數量隨著葡萄的品種、成熟度及栽培環境而變化，成為影響葡萄酒品質的重要因素。為確保酒的品質優良與穩定，採用接種醱酵法釀酒，即在葡萄果泥中接種*Saccharomyces cerevisiae*，減少醱酵過程中雜菌污染，降低損失，縮短醱酵時間。混合天然酵母菌與培養酵母菌發酵製造紅葡萄酒的發酵過程中，接種的培養酵母菌立即取得生長優勢，第四天佔總量的91%，天然酵母菌總菌數略為增加，第七天之後失去活性⁽¹⁾。

研究方法上，調查葡萄酒醱酵過程中菌相的變化，多以平板培養分離計數各種類酵母菌族群，再以傳統生理生化測試方法鑑定^(4,8-10)，但需要有經驗的專家方能完成酵母菌的培養及傳統鑑定，其過程耗時費力，優點在於同時獲得菌株，供作研究與應用。核酸分子生物技術可應用在偵測樣本中的菌相多樣性分析，例如聚合酶連鎖反應—變性梯度明膠電泳法(PCR-DGGE)應用在葡萄酒醱酵物中的酵母菌菌相變化分析⁽¹¹⁻¹³⁾，這個方法有其優點與缺點，優點有：不需培養即可區辨不同種的酵母菌，較傳統培養分離、鑑定法省時，並可偵測到無法培養(non-culturable)的酵母菌⁽¹⁴⁾。但是，DGGE法有其限制，包括：只可定性，無法精確定量；雖無需培養，但也無法獲得菌株；PCR不能增幅的菌即無法測出，例如：由於常用的引子對無法擴增*Metschnikowia*屬的酵母菌的核酸⁽¹⁴⁾，DGGE便無法偵測*Metschnikowia* spp.。

本研究調查我國食用及釀酒葡萄果表酵母菌之多樣性，以直接培養法分離酵母菌株，純化後以核酸序列比對與生理生化特性鑑定菌種。帶有天然酵母菌的葡萄在果農添加培養酵母後，醱酵紅葡萄酒的過程中，葡萄酒醱酵物中的酵母菌菌相的消長變化以直接培養活性計數、核酸定序鑑定與DGGE兩種方法偵測與比較。

材料與方法

一、採樣

本研究於彰化縣溪湖鎮(Sihu)兩個巨峰(Kyoh, *Vitis vinifera* L. × *V. labrusca* L.o)葡萄園，及二林鎮(Erlin)黑后(Black Queen)葡萄園，採集果實。樣本以乾淨耐熱塑膠袋收集，4℃冷

藏，24小時內處理樣本。

酒類醱酵樣本取自彰化縣溪湖鎮百成酒莊。酒莊釀造首先將黑后葡萄果實破碎，以80 ppm偏重亞硫酸鉀(potassium metabisulfite)處理四小時，接種商業用釀酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*種麴，一般每公升酒醪總量接種0.25 g酵母粉，於16℃恆溫醱酵。本試驗分別於醱酵第一、六、九及14天採樣，先均勻混合發酵物，以50 mL無菌離心管收集，4℃冷藏，24小時內處理。

二、酵母菌之計數、分離純化與保存

1. 果實表面酵母菌之檢測

修改Rosa等人⁽¹⁵⁾的方法。樣本袋中加入無菌水，以60 rpm水平振盪一小時，取1 mL進行連續稀釋，各稀釋度取100 μ L塗抹於含chloramphenicol (40 mg/L)之酸化YM培養基(yeast extract-malt extract agar: pH 4.5, yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g, chloramphenicol 40 mg, agar 18 g, distilled water 1,000 mL)平板⁽¹⁶⁾上，每稀釋度三重複，25℃培養三至四天。選總酵母菌數介於30-300菌落數的稀釋度的平板，在培養皿底部畫線，挑選交點上之菌株，若交點上無菌株，則依序自第一象限開始，挑選離交點最近之菌株，以此方法每份樣本隨機挑選30株，所有菌株分別以四區畫線法純化培養於酸化YM平板，單一菌落經挑取重複純化後，獲得純菌。保存菌株先接種在YM培養液中，以25℃培養二天，將菌液與無菌甘油(Nacalai, Japan)以7:3之體積比例置於微量離心管中，混合均勻後，保存於-80℃⁽¹⁷⁾。

2. 醱酵葡萄酵母菌之檢測

一般紅葡萄酒醱酵，在五到11日間完成酒精醱酵作用^(18,19)，因此本實驗分別於醱酵第1、6、9及14天採樣檢測，將葡萄發酵物均質，取1 mL均質液連續稀釋後，以前述方法分離純化與保存菌株。

三、酵母菌菌種鑑定

所有菌株均經RFLP分群後，以各RFLP群的代表菌株根據菌落與細胞的形態特徵、rDNA ITS序列與Biolog系統測定之生理生化特性，鑑定酵母菌菌種，核酸序列、形態特徵與生理生化特性均符合者為完成鑑定。

1. 以Biolog MicroLog™ system鑑定

依照Biolog MicroLog™ system之操作方法，先將菌株培養於YM培養基，取單一菌落於Biolog Universal Yeast (Biolog, USA)培養基，於26℃培養二天，接種至96孔微量檢定盤，26℃培養，分別於培養第24、48與72小時以Biolog's MicroLog™ 3.0版資料庫鑑定酵母菌。

2. 菌株形態與特性觀察

菌株在YM培養基於25℃培養三天，以光學顯微鏡觀察其細胞形態與出芽生殖；培養七天，以解剖顯微鏡觀察菌落特徵。並根據Biolog套組測定之生理生化反應與形態特性，參考專書檢索鑑定⁽¹⁶⁾。

四、核酸分析

修改Doyle和Doyle⁽²⁰⁾的方法抽取酵母菌DNA，保存於-20℃。葡萄發酵物經均質後取1 mL，以14,000 \times g離心二分鐘，去除上清液。加入1 mL無菌水重新懸浮，再重複兩次，以去除水溶性的有機物。離心後以500 μ L CTAB緩衝液(2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris (pH 8.0), 2% PVP-40 [w/v])重新懸浮，加入海砂(Sea Sand C, 40-80 mesh, Nacalai Tesque, INC. Kyoto, Japan)，劇烈振盪二分鐘，以95℃熱水浴加熱30分鐘、65℃ 10分鐘以打破細胞壁，並根據前述方法抽取與保存DNA。

1. 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

菌種鑑定是比對rDNA ITS區域之核酸序列，選用廣效性引子對ITS1或ITS5與ITS4⁽²¹⁾進行PCR。發酵物之菌相以LSU rDNA之D1/D2區域之PCR-DGGE進行分析，首次PCR以引子對F63 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')與LR3 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG AAC G-3')增幅D1/D2區域⁽²²⁾；每25 μ L反應中，含有2.5 μ L 10 \times PCR buffer、1.5 mM MgCl₂、50 μ M dNTPs、引子對各0.1 μ M、1 U *Taq* polymerase (MBI Fermentas, Lithuania)及12.5 ng模板DNA，反應條件：94℃作用二分鐘使DNA變性，引子黏合溫度58℃、20秒，聚合溫度72℃、三秒、一個循環；變性溫度94℃、一分鐘，黏合溫度58℃、20秒，聚合溫度72℃、三秒，進行40個循環；最後以變性溫度94℃、一分鐘，黏合溫度58℃、20秒，聚合溫度72℃、五秒，進行一個循環。PCR-DGGE第二次增幅，將rDNA之D1/D2區域

之產物以引子對GCF63 (5-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GCG GGG GCG GGG GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')與LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3')增幅5'端區域⁽¹⁴⁾，條件同上述，唯加入50 ng模板DNA，反應條件如下：95℃作用5分鐘使DNA變性；變性溫度95℃、一分鐘，黏合溫度52℃、45秒，聚合溫度72℃、一分鐘，進行40個循環；最後以聚合溫度72℃、七分鐘，進行一個循環。

2. 限制片段長度多型性分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

選取HaeIII、HhaI及HinfI (New England Biolabs, UK)三種酵素⁽²³⁾處理後分析，取8 μL rDNA ITS區域的PCR產物，加入1 U內切限制酵素及1 μL緩衝液，37℃反應四小時後電泳分析。

3. 變性梯度膠體電泳分析

PCR產物以1.2%膠體 (Agarose I™, Amresco, USA)置於水平式電泳槽 (Mupid II, Advance, USA)，加入0.5倍TBE緩衝液，以100 V電泳。RFLP產物以1.5%膠體 (Seakem LE agarose, BMA, USA)置於水平式電泳槽 (GNA 200, Pharmacia Biotech, USA)，加入0.5倍TBE緩衝液，120 V電泳。

變性梯度膠體電泳：使用8%聚甲醯胺 (polyacrylamide, BioRad, USA)，添加變性劑7 M尿素為100%變性梯度，加入N, N, N', N'-

tetramethylethylenediamine (TEMED)與次硫酸銨 (ammonium persulfate, BioRad)使膠片凝固。取16 μL LSU rDNA之5'端區域增幅產物，加入0.5 μL 1 U Mung Bean Nuclease與2 μL Mung Bean Nuclease buffer (MBI Fermentas, Lithuania)，加無菌水至總體積為20 μL，於37℃作用30分鐘。將反應產物置於變性梯度膠體電泳槽 (Dcode system, BioRad)中，以20%-60%變性範圍的膠體電泳，加入一倍TAE緩衝液，180 V電泳四小時，反應後膠體經ethidium bromide染色，照相 (ImageStore 7500, UVP, USA)紀錄。

4. 解序及序列比對

酵母菌rDNA ITS區域及LSU rDNA區域之PCR產物解序 (明欣生物科技有限公司，台北)，解出之序列進入美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI)的GenBank資料庫，搜尋比對菌種序列。

結 果

一、葡萄果實上的酵母菌多樣性 (表一)

在巨峰及黑后葡萄的生長時期，分離果實表面的酵母菌，以隨機取樣方式得到473株酵母菌。這些菌株之rDNA ITS區域長度介於550-

表一 分離自葡萄果實表面十二個酵母菌菌群的菌株數、核醣體核酸內部轉錄區大小、三種內切處理之核酸片段大小、代表菌株編號與鑑定結果，菌群依菌株數多少排列

Table 1. The rDNA ITS region size, RFLP banding sizes derived from digestion with 3 endonucleases and the identities of 12 yeast groups isolated from grape berry surface

Group	Isolate no.	ITS (bp)	HaeIII (bp)	HhaI (bp)	HinfI (bp)	Isolate code	Identity
1	245	600	600	300, 300	275, 110, 110, 110	V6Cb-13	Sporidiobolus pararoseus
2	84	550	520	250, 200, 70	300, 170, 70	V5Db-30	Cryptococcus aureus
3	59	630	420, 210	300, 230, 100	430, 200	V1Eb-25	Rhodospodium paludigenum
4	49	550	550	260, 220, 80	300, 175, 175	V1Eb-28	Cryptococcus albidus
5	16	550	400, 80, 50	300, 150, 100	275, 275	V6Eb-12	NID
6	8	650	600, 50	350, 300	280, 230, 150	V6Bb-18	NID
7	4	610	500, 90	350, 280	280, 220, 150	V5Bb-17	Bulleromyces albus
8	3	750	750	320, 320, 100	350, 210, 190	V5Eb-14	Hanseniaspora uvarum
9	2	650	650	340, 190, 80	290, 175, 175	V1Eb-22	NID
10	1	620	400, 220	300, 250, 100	340, 220, 80	V5Cb-22	Rhodospodium sphaerocarum
11	1	600	600	500, 100	350, 220	V5Eb-3	Rhodotorula minuta
12	1	840	450, 300	225, 225, 150, 150, 100	450, 400	V6Cb-13	Cryptococcus luteolus

NID: not identified.

840 bp。以HaeIII、HinfI及HhaI三種酵素處理473株酵母菌rDNA ITS區域的PCR產物，可分為12個RFLP菌群(Group 1至Group 12)。其中，Group 1、3、10及Group 11為紅色酵母菌，其餘為白色酵母菌。Group 1共245株，佔總分離株數之51.8%；Group 2共84株，佔17.8%；Group 3共59株，佔12.3%。

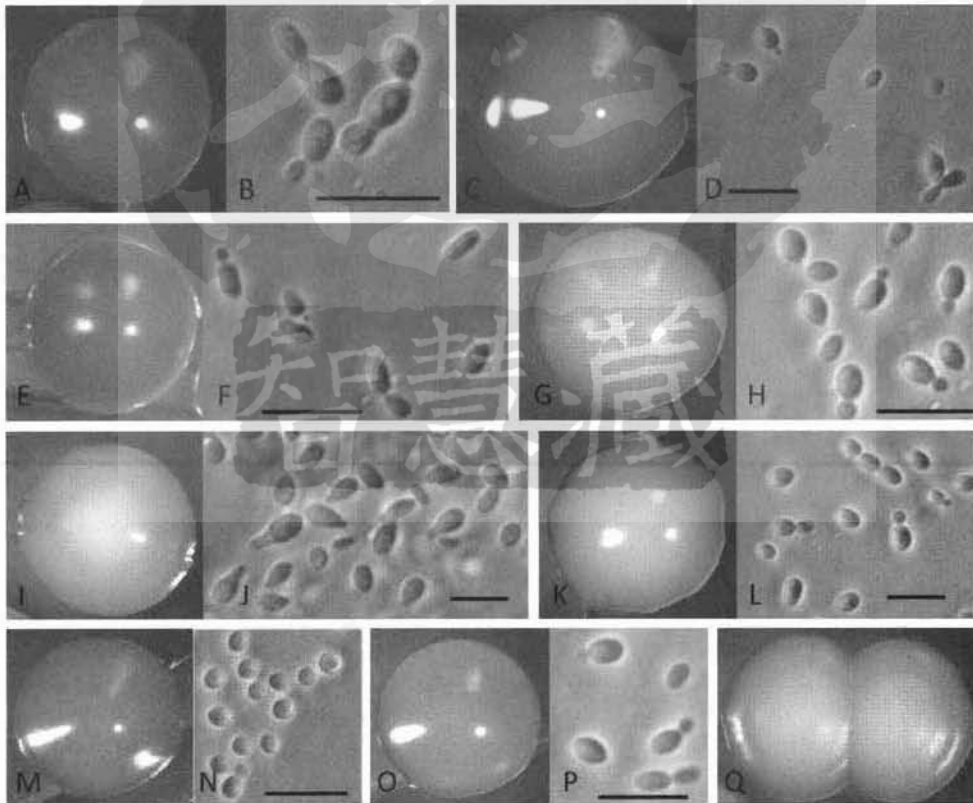
1. 菌種鑑定(表一)

由12個菌群選取28株代表菌株，以菌落與細胞的形態特徵(圖一)、rDNA ITS序列與Biolog™系統測定之生理生化特性，鑑定出六屬九種酵母菌，分別為：*Sporidiobolus pararoseus*、*Cryptococcus aureus*、*Rhodospiridium paludigenum*、*Cryptococcus albidus*、*Hanseniaspora uvarum*、*Bulleromyces albus*、*Rhodospiridium sphaerocarpum*、*Rhodotorula minuta*及*Cryptococcus luteolus*，另

有三個菌群未能鑑定。

2. 巨峰與黑后葡萄表面的酵母菌種分離

由兩處巨峰葡萄園調查的果表酵母菌，共鑑定出四屬六種，分別為*Sporidiobolus pararoseus*、*Cryptococcus aureus*、*Rhodospiridium paludigenum*、*Cryptococcus albidus*、*Rhodospiridium sphaerocarpum*及*Bulleromyces albus*。黑后葡萄果表則分離鑑定出六屬八種，分別為*Sp. pararoseus*、*Cr. aureus*、*Rh. paludigenum*、*Cr. albidus*、*B. albus*、*Hanseniaspora uvarum*、*Rhodotorula minuta*及*Cr. luteolus*。其中，*Rh. sphaerocarpum*只從巨峰葡萄果實上分離到；*Hanseniaspora uvarum*、*Rhodotorula minuta*及*Cr. luteolus*，則僅於黑后葡萄果實上分離到。二個品種的葡萄果表皆未分離出*Saccharomyces cerevisiae*。



圖一 *Sporidiobolus pararoseus* V6Cb-13 (A, B) , *Cryptococcus aureus* V5Db-30 (C, D) , *Rhodospiridium paludigenum* V6Cb-13 (E, F) , *Cryptococcus albidus* V1Eb-28 (G, H) , *Hanseniaspora uvarum* V5Eb-14 (I, J) , *Bulleromyces albus* V5Bb-17 (K, L) , *Rhodospiridium sphaerocarpum* V5Cb-22 (M, N) , *Rhodotorula minuta* V5Eb-3 (O, P) , *Cryptococcus luteolus* V6Cb-13 (Q)的菌落形態與營養細胞出芽生殖。以YM培養基25℃培養，培養七天的菌落與培養第三天的營養細胞。比例尺為10 μM。

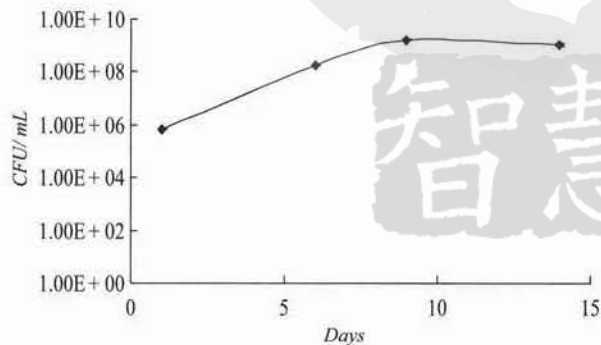
Fig. 1. Colony morphology and budding of vegetative cells of *Sporidiobolus pararoseus* V6Cb-13 (A, B), *Cryptococcus aureus* V5Db-30 (C, D), *Rhodospiridium paludigenum* V6Cb-13 (E, F), *Cryptococcus albidus* V1Eb-28 (G, H), *Hanseniaspora uvarum* V5Eb-14 (I, J), *Bulleromyces albus* V5Bb-17 (K, L), *Rhodospiridium sphaerocarpum* V5Cb-22 (M, N), *Rhodotorula minuta* V5Eb-3 (O, P), *Cryptococcus luteolus* V6Cb-13 (Q) after 7-and 3-day incubation at 25°C on YM agar. Bar = 10 μM.

二、葡萄酒醱酵過程中酵母菌菌相變化

供試的黑后葡萄果園的葡萄在成熟採收後，由農友自行釀製紅葡萄酒，醱酵的第一、六、九及14天，以隨機取樣方式各純化30株菌，共分得酵母菌120株。菌株DNA經PCR擴增得到LSU rDNA之D1/D2區域產物，以HaeIII、HinfI與HhaI三種酵素處理，比較圖譜多樣性，可區分出三種RFLP菌群。將三群菌的26S rDNA D1/D2區域解序，經序列比對，分別鑑定為*Candida stellata*、*Saccharomyces cerevisiae*與*Issatchenkia terricola*。

1. 直接培養法

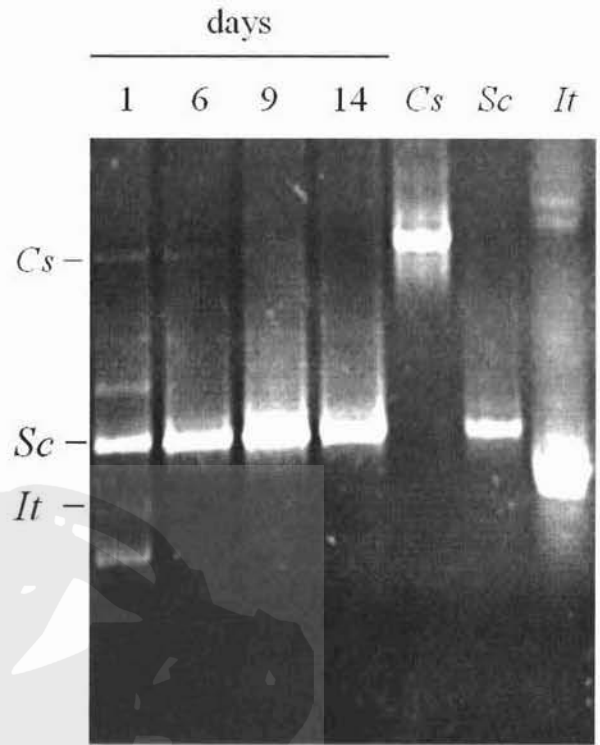
醱酵第一天總酵母菌數近 10^6 CFU/mL，直線上升到第九天達 10^9 CFU/mL，之後維持在 10^8 - 10^9 CFU/mL，而趨於穩定(圖二)。以序列稀釋與平板培養方式觀察菌落形態並計數菌落數，輔以菌株核酸序列驗證，第一天分離出*C. stellata*、*I. terricola*與*S. cerevisiae*，菌數分別為 4.3×10^4 CFU/mL、 2.1×10^4 CFU/mL與 5.8×10^5 CFU/mL。醱酵第六、九與14天只分離到*S. cerevisiae*，菌數分別為 1.7×10^8 CFU/mL、 1.9×10^9 CFU/mL與 1.2×10^9 CFU/mL。



圖二 葡萄酒醱酵過程中所含酵母菌總菌數
Fig. 2. Total yeast counts isolated during wine fermentation.

2. 變性梯度膠片電泳分析法(圖三)

葡萄酒醱酵樣本之全量DNA以引子對GCF63/LS2擴增後，得到約250 bp的產物，將樣本的250 bp的產物以DGGE分析，獲得醱酵第一、六、九與14天酒醪中酵母菌的DGGE圖譜，與相同樣本中分離出的*C. stellata*、*I. terricola*以及*S. cerevisiae*純菌的圖譜比對，發現醱酵期第一天樣本的DGGE圖譜中，有六條條帶，其中三條條帶與*C. stellata*、*I. terricola*以及*S. cerevisiae*相同；醱酵第六天樣本的圖



圖三 葡萄酒醱酵過程及其分離所獲純菌之DGGE圖譜。lane 1-4：分別為醱酵第一、六、九與14天的DGGE圖譜，lane 5：*Candida stellata* (Cs)，lane 6：*Saccharomyces cerevisiae* (Sc)，lane 7：*Issatchenkia terricola* (It)的純菌圖譜

Fig. 3. DGGE patterns of wine fermentation samples and pure cultures isolated from the samples. lane 1-4: wine fermentation on the 1st, 6th, 9th and 14th day. Lane 5: *Candida stellata* (Cs), lane 6: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), lane 7: *Issatchenkia terricola* (It).

譜有第一天樣本圖譜上方的四條條帶，包括*C. stellata*與*S. cerevisiae*的條帶；第九天與第14天的圖譜，則僅測出*S. cerevisiae*的條帶。

討論與結論

本研究於三個葡萄供試果園栽種的兩個品種葡萄的果實表面，以隨機方式分離及保存473株酵母菌，其中306株為紅色酵母菌，167株為白色酵母菌，以rDNA ITS序列的限制片段長度多型性(RFLP)圖譜分成12個菌群，根據形態特徵、生理生化特性與rDNA ITS序列比對，鑑定出六屬九種，三種未能完成鑑定。台灣兩個葡萄品種果實表面有*Cryptococcus aureus* (*Cryptococcus lautentii*中的一種⁽¹⁶⁾)、*Cryptococcus albidus*、*Cryptococcus luteolus*、*Hanseniaspora uvarum* (anamorph: *Kloeckera*

apiculata)、*Rhodospiridium sphaerocarpum* (anamorph: *Rhodotorula glutinis*)、*Rhodotorula minuta*及*Sporidiobolus pararoseus*，在葡萄果實上已有分離紀錄^(2-5, 7, 24-28)。*Bulleromyces albus*及*Rh. paludigenum*是首次報告出現在果園中的葡萄上。其中以*Sporidiobolus pararoseus*、*Cryptococcus aureus*、*Cryptococcus albidus*與*Rhodospiridium paludigenum*為優勢種，佔總菌數約92% (表一)，這四種優勢菌也是兩種葡萄園間果表的普遍分布種，*Bulleromyces albus*相對是較弱勢族群，在兩種葡萄上也都有發現。此外，在活性培養(viable count)調查中，只在巨峰葡萄出現的是*Rhodospiridium sphaerocarpum*；只在黑后葡萄出現的有*Hanseniaspora uvarum*、*Rhodotorula minuta*及*Cr. luteolus*，這些差別可能與葡萄品種有關，不同品種的果實，其果表分泌物所提供的養分有異，致使果表微棲地上的微生物相有異；也有可能因為樣區在地菌相不同，或是這些菌種的族群量在偵測方法靈敏度的臨界值附近所導致。

法國南部Bordeaux地區，三種品種葡萄(*Vitis vinifera*)共分離出四種酵母菌⁽²⁾，皆以*Kloeckera apiculata*為優勢酵母菌種，其次為*Metschnikowia pulcherrima*與二種*Rhodotorula*。西班牙北部兩個品種的葡萄表面以*Rhodotorula glutinis*為優勢菌，*Kloeckera apiculata*及*K. lindneri*其次，共五屬七種⁽⁴⁾。西班牙南部分離出七屬15種酵母菌，兩個品種的葡萄皆以*Sporobolomyces roseus*為優勢，佔76.69%；*Cryptococcus* spp.為次優勢菌種，佔18.35%，而*Rhodotorula* spp.佔3.53%⁽³⁾。義大利成熟葡萄果實上，以*Kloeckera apiculata*為優勢種，其餘有*Cryptococcus albidus*、*Cr. flavus*、*Debaryomyces hansenii*、*Metschnikowia pulcherrima*、*Rhodotorula glutinis*、*Torulopsis apiculata*、*T. candida*、*T. stellata*等菌種⁽⁵⁾。一般而言，酵母菌種類隨著果實成熟度改變，以成熟果實之總酵母菌菌數最高。

綜合以上報告，歐洲葡萄園中的果實表面以*Kloeckera apiculata*^(2, 5) (teleomorph: *Hanseniaspora uvarum*)、*Rhodotorula glutinis*⁽⁴⁾ (teleomorph: *Rhodospiridium sphaerocarpum*)與*Sporobolomyces roseus*⁽²⁴⁾為常見的優勢種，台灣的黑后葡萄上有*Hanseniaspora uvarum*為*Kloeckera apiculata*有性世代學名，巨峰葡萄上有*Rhodospiridium sphaerocarpum*為*Rhodotorula glutinis*的有性世代學名，均為普遍分布種。

其他歐洲菌種有*Cr. flavus*、*Debaryomyces hansenii*、*Metschnikowia pulcherrima*、*Torulopsis apiculata* (teleomorph: *Hanseniaspora uvarum*⁽²⁹⁾)、*T. candida* (更名為*Candida saitoana*⁽²⁹⁾)、*T. stellata* (更名為*Candida stellata*⁽²⁹⁾)等菌種^(2, 4, 5)。*Candida stellata*出現在我們檢測酒醪的天然酵母菌中，未出現在葡萄園菌相調查，顯示為天然酵母菌，但相較調查名錄中的其他菌種，其族群量較低。

地緣較近的日本⁽⁶⁾，調查報告雖然是與我們不同的四種白葡萄品種，果表的優勢酵母菌*Cryptococcus albidus*、*Cr. laurentii*、*Kloeckera apiculata*、*Rhodotorula minuta*等與台灣的相同，其中以*K. apiculata*及*Cryptococcus* spp.分離率最高⁽⁶⁾，似乎東亞菌相較為相似。美國東南部葡萄表面分離出六屬十種酵母菌，分別為*Candida albicans*、*C. edax*、*C. humicola*、*C. sake*、*Hanseniaspora osmophila*、*Lodderomyces elongisporus*、*Pichia membranaefaciens*、*Rhodotorula glutinis*、*R. minuta*及*Saccharomyces cerevisiae*⁽⁷⁾，菌相與歐洲及亞洲的菌相較不相似。葡萄果實上的天然酵母菌源自於昆蟲接觸傳播⁽³⁰⁾，或空氣中之酵母菌附著⁽⁴⁾，反映自然棲地的本土菌相(indigenous yeast flora)。

黑后葡萄接種醱酵期間分離出120株白色酵母菌，沒有紅色酵母菌，經RFLP分群後，以LSU rDNA之D1/D2區域之核酸序列鑑定出三種酵母菌，*Candida stellata*、*Issatchenkia terricola*以及*Saccharomyces cerevisiae*，原來棲息在葡萄果實表面的酵母菌沒有出現在果醪分離株中，果醪中的三種酵母菌也未自果園中果表分出。雖然生長基質都是葡萄果實，但園中果實暴露在陽光下，果表屬於好氧、低養份的環境，以好氧性酵母菌佔優勢，有較高的酵母菌多樣性；兼性好氧的*Saccharomyces* spp.在這個棲地的競爭力較低，族群量很低，分離不易^(2, 5, 26, 31-33)，使得葡萄酒醱酵的主力菌種*Saccharomyces cerevisiae*未自園中葡萄果表分離出。釀造時，果實壓碎成果泥，成為高糖、高養份、寡氧的基質與環境，果表的好氧性菌種競爭力不如好高糖與寡氧的醱酵菌種，後者快速增殖，成為優勢菌，菌相此消彼長，截然不同。

醱酵初期之酵母菌菌相複雜，醱酵中期至後期菌相單純，以*Saccharomyces*為優勢菌種。我們以直接培養與DGGE兩種方法偵測葡萄酒醱酵過程中的酵母菌群落組成變化，可以了解菌相的演替：醱酵第一天，DGGE可測得六種酵母菌，比直接培養所分離的三種酵母菌

C. stellata、*I. terricola*與*S. cerevisiae*為多，三者活性計數的菌量分別佔6.7%、3.3%與90%；進入醱酵中期，直接培養法未分得的*C. stellata*，DGGE仍可測得，而且*C. stellata*條帶由第一天至第六天亮度減弱，顯示其族群數量隨醱酵進行降低，且DGGE偵測靈敏度高於活性計數法；*S. cerevisiae*之族群量則隨著醱酵天數遞增，自第一天 5.8×10^5 CFU/mL開始，第六天增加至 1.7×10^8 CFU/mL，第九天達最高峰 1.9×10^9 CFU/mL，DGGE的條帶最亮；第14天，*S. cerevisiae*菌數為 1.2×10^9 CFU/mL，開始衰減，菌量介於第六天與第九天之間，其DGGE條帶亮度也介於第六天與第九天的條帶之間，PCR-DGGE偵測與直接培養的結果相符。

澳洲Heard與Fleet⁽¹⁸⁾在接種*S. cerevisiae*醱酵紅葡萄酒與白葡萄酒過程中，第一天分離出四屬六種酵母菌，分別為*Kloeckera apiculata*、*Candida stellata*、*C. colliculosa*、*C. pulcherrima*、*Hanseniaspora anomala*與*S. cerevisiae*，前五種為天然菌種，無論在紅酒或白酒醱酵的前24到48小時生長顯著。他們研究中的*Kloeckera apiculata*是優勢菌種，我們果園葡萄的天然酵母菌群聚中有其有性世代種*Hanseniaspora uvarum* (anamorph: *Kloeckera apiculata*)，但在這個醱酵試驗樣本中沒有發現。*Candida stellata*在他們的紅、白酒醱酵中都出現，尤其白酒醱酵中是最優勢菌種，約 10^6 CFU/mL，紅酒醱酵初期達 10^3 CFU/mL到 10^4 CFU/mL；我們紅酒醱酵期第一天亦測得 4.3×10^4 CFU/mL *Candida stellata*。醱酵酒醪中的天然菌種只有*Candida stellata*均出現，其他菌種各不相同。醱酵初期，葡萄皮上棲息的野生菌種將酒醪中的糖類轉化成酒精，不同的酵母菌株生理生化特性不同，產生的風味會有差異。往往酒莊為使產品穩定，接種商業酵母菌酒麴誘導醱酵釀酒。本研究監測商用種麴酵母菌第一日即成為優勢菌種，族群量直線上升，第九天所測最高量，應已完成醱酵，使其他不具競爭力的野生菌種未再測得。楊與溫⁽¹⁹⁾以金香葡萄製作酒醪，比較不同酵母菌*S. cerevisiae*菌株醱酵的應用效果，結果顯示不同酵母菌的發酵速度與嗜好性品評有顯著差異，雖然沒有調查天然酵母菌在其中所扮演的角色，但以*S. cerevisiae*不同菌株醱酵有顯著不同的效果，醱酵前期有不同的天然酵母菌群落參與醱酵，對葡萄酒的風味應有顯著影響。

醱酵過程中影響酵母菌生長之因素包括果實成分、二氧化硫的使用、葡萄汁之澄清

與醱酵溫度等。葡萄含糖量也使酵母菌的生長速率不同，*Candida stellata*在高糖環境下生長速率佳⁽³⁴⁾，DGGE分析*C. stellata*在醱酵前六天為可測得之菌種。*C. stellata*在醱酵第六天的菌量低於第一天的 4.3×10^4 CFU/mL，與優勢菌*S. cerevisiae*族群量 1.7×10^8 CFU/mL差距超過 10^2 ，受限於平板培養計數限制，未能測得其族群量。參照細菌學的試驗經驗，在平板培養基上，每皿最多可區辨250個菌落，使得菌量低於總菌數1%的菌種不易出現，當每皿逢機純化十分之一菌落時，菌量低於總菌數十分之一的菌種出線的機率就偏低，不易獲得，致使平板培養法調查的是族群量高於總菌數1%的優勢菌種，也就是未達總菌數1%的菌種的菌落出現機率低，因而無法被計數出。如果目的只在於獲取菌株，增殖(enrichment)培養較易獲得*Saccharomyces* spp.⁽³⁰⁾，但是增殖培養使菌數改變扭曲，無法據以估算樣本中的族群量。由試驗數據看來，DGGE的靈敏度高於平板培養的活性計數法，可以偵測出族群量較小的菌種，但是需有純菌作為參考，或將條帶核酸編碼解序比對，否則無法得知條帶所代表的物種。

絲狀真菌主要以形態特徵作為分類與鑑定依據，但酵母菌形態特徵有限，不足以區辨菌種，在分類與鑑定方法上較類似細菌，須仰賴其生理生化特性。黃⁽¹⁾研究葡萄天然酵母菌族群動態，以顏色、形狀平滑或皺縮、有無假菌絲將菌落形態分成七類，不同地區採集的九個品種葡萄的24個樣本中，有22個樣本超過83%的酵母菌族群為乳白色平滑菌落無假菌絲的A類酵母菌，本研究中的*Cryptococcus aureus*、*Cryptococcus albidus*、*Hanseniaspora uvarum*與*Bulleromyces albus*都符合該類描述。由樣本分離培養出菌落後，不同菌種可能菌落形態相近，相同菌種出現多樣菌落形態，因此生態調查菌落形態判別辨識菌種困難。本研究以逢機方式選取菌落，將逢機選取的所有菌落樣本以PCR-RFLP圖譜分群後，依照酵母菌鑑定方法，形態、生理生化與核酸序列分析結果均符合者完成鑑定，以了解我國葡萄果表與酒醪醱酵的酵母菌相變化。其中有三種酵母菌未能鑑定出學名，有可能是非典型的環境菌株或是新種酵母菌。

本研究調查台灣葡萄果表天然酵母菌的多樣性，偵測該批葡萄進入醱酵程序後的菌相消長。PCR-DGGE方法可以快速分析葡萄酒醱酵過程中之酵母菌菌相變化，應用於偵測與監控醱酵過程中的菌相變化，降低葡萄酒生產污染的

風險。

謝 誌

感謝溪湖王禮深、謝國禎先生，二林陳吉農先生提供樣區與樣本。本研究承國科會計畫 (NSC 93-2621-B-031-001) 支持，謹此致謝。

參 考 文 獻

- (1) 黃正財：葡萄天然酵母菌族群動態之研究。酒類試驗研究年報，68年度，73-80 (1979)。
- (2) J. A. Barnett, M. A. Delaney, E. Jones, A. B. Magson and B. Winch: The numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. *Arch. Microbiol.*, **83**: 52-55 (1972).
- (3) M. J. De La Torre, M. C. Millan, P. M. Perez-Juan, J. Morales and J. M. Ortega: Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. *Microbios*, **100**: 27-40 (1999).
- (4) A. Rementeria, J. A. Rodriguez, A. Cadaval, R. Amenabar, J. R. Muguruza, F. L. Hernando and M. J. Sevilla: Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain). *Int. J. Food Microbiol.*, **86**: 201-207 (2003).
- (5) G. Rosini, F. Federici and A. Martini: Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.*, **8**: 83-89 (1982).
- (6) F. Yanagida, F. Ichinose, T. Shinohara and S. Goto: Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at central Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **38**: 501-504 (1992).
- (7) M. E. Parish and D. E. Carroll: Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**: 165-169 (1985).
- (8) G. H. Fleet, S. Lafon-Lafourcade and P. Ribéreau-Gayon: Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 1034-1038 (1984).
- (9) M. Schütz and J. Gafner: Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**: 551-558 (1993).
- (10) M. J. Torija, N. Rozés, M. Poblet, J. M. Guillamón and A. Mas: Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, **79**: 345-352 (2001).
- (11) L. Cocolin, L. F. Bisson and D. A. Mills: Direct profiling of the yeast dynamic in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**: 81-87 (2000).
- (12) L. Cocolin, A. Heisey and D. A. Mills: Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**: 49-53 (2001).
- (13) D. A. Mills, E. A. Johannsen and L. Cocolin: Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 4884-4893 (2002).
- (14) L. Cocolin, D. Aggio, M. Manzano, C. Cantoni and G. Comi: An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.*, **12**: 407-411 (2002).
- (15) C. A. Rosa, P. B. Morais, S. R. Santos, P. R. Peres Neto, L. C. Mendonca-Hagler and A. N. Hagler: Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. *Mycol. Res.*, **99**: 1047-1054 (1995).
- (16) C. P. Kurtzman and J. W. Fell: *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4th edition. Elsevier Science, Netherlands (2000).
- (17) B. E. Kirsop and C. P. Kurtzman: *Living resources for Biotechnology*, Cambridge University Press, UK (1988).
- (18) G. M. Heard and G. H. Fleet: Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 727-728 (1985).
- (19) 楊淑惠、溫宏治：不同酵母菌應用於金香葡萄酒之研究。中華農業研究，**51**: 65-72 (2002)。
- (20) J. J. Doyle and J. L. Doyle: Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13 (1990).
- (21) T. J. White, T. Bruns, S. Lee and J. Taylor: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White ed.), pp. 315-322. Academic Press (1990).
- (22) J. W. Fell, T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti and A. Stazzell-Tallman: Biodiversity and systematic of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 1351-1371 (2000).
- (23) 張滄文：台灣海洋紅色酵母菌之系統學與生態學研究。東吳大學微生物學系碩士論文，台北 (2001)。
- (24) M. A. Amerine and R. E. Kunkee: Microbiology in winemaking. *Annu. Rev. Microbiol.*, **22**: 323-358 (1968).
- (25) R. R. Davenport: Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis*, **13**: 123-130 (1974).
- (26) S. Goto, K. Kitano and T. Shinohara: Utilization of KHR killer as genetic marker for purity test of starter yeast during fermentation of grape musts. *J. Ferment. Bioeng.*, **73**: 70-72 (1992).
- (27) E. Longo, J. Cansado, D. Agrelo and T. G. Villa: Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**: 141-144 (1991).
- (28) A. Martini, M. Ciani and G. Scorzetti: Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**: 435-440 (1996).
- (29) C. P. Kurtzman: Four new yeasts in the *Pichia anomala* clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 395-404 (2000).
- (30) R. R. Davenport: Distribution on yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. In: *Microbiology of aerial plant surfaces* (C. H. Dickinson and T. F. Preece ed.), pp. 325-359. Academic Press, N. Y., USA (1976).
- (31) S. Goto and I. Yokotsuka: Wild yeast populations in fresh grape musts of different harvest times. *J. Ferment. Technol.*, **55**: 417-422 (1977).
- (32) A. Martini, F. Federici and G. Risubu: A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can. J. Microbiol.*, **26**: 856-859 (1980).
- (33) M. J. De La Torre, M. C. Millan, P. M. Perez-Juan, J. Morales and J. M. Ortega: Changes in the microbiota during ripening of two *Vitis vinifera* grape varieties grown in southern Spain. *Microbios*, **96**: 165-176 (1998).
- (34) G. H. Fleet: Food fermentations-wine. In: *Food microbiology: fundamentals and frontiers* (M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville ed.), pp. 671-694. ASM Press, Washington D.C. USA (1997).