乙醇利用菌株的分离鉴定及在低醇苹果酒中的应用

宋靓靓，袁亚宏，刘斌，王虎玄，岑涛

（西北农林科技大学食品科学与工程学院，陕西杨凌 712100）

摘要：随着人们对自身健康的关注，低醇酒越来越受到人们的欢迎。为获得利用乙醇的菌株，利用 YPD 以及乙醇唯一碳源的培养基，经过多次分离与筛选，得到 3 株乙醇利用菌株 SJ01、SJ02、SJ03，并对筛选菌株进行乙醇耐受特性的测定及乙醇利用曲线的绘制。同时，通过菌株菌落形态，细胞形态特征，结合 26S rDNA 序列分析和系统发育树的构建，确定了 3 株分离菌的遗传学位置。结果表明：SJ01、SJ02、SJ03 三株菌株的乙醇耐受浓度分别为 10%、8%、9%。在唯一碳源培养基中培养 20 d 后，其乙醇利用率分别为 39.9%、35.7%、31.8%。菌株 SJ01 和 SJ02 为 *Pichia kudriavzevii*，菌株 SJ03 为 *Candida ethanolica*。最后根据菌株能够利用乙醇作为唯一碳源生长的特性，将菌株 SJ01 和 SJ03 加入至苹果酒中进行低醇苹果酒的酿造，苹果酒的酒精度分别降低了 17.5%和 27.8%，且苹果酒品质得到了改善。

关键词：乙醇利用；26S rDNA；低醇；苹果酒

文章篇号：1673-9078(2015)6-254-258 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.040

Isolation and Identification of Ethanol-utilizing Strains and Application in Low-alcohol Cider

SONG Jing-jing, YUAN Ya-hong, LIU Bin, WANG Hu-xuan, CEN Tao

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The popularity of low-alcohol ciders has risen owing to increasing health awareness. Here, yeast strains were repeatedly isolated and screened using culture media with yeast extract peptone dextrose (YPD) and ethanol as the sole carbon source, which resulted in the isolation of three ethanol-utilizing strains, SJ01, SJ02, and SJ03. The ethanol tolerance and ethanol-utilizing curve of the three strains were measured. In addition, the colony and cell morphology was observed, and the phylogenetic tree based on 26S rDNA sequence analysis was constructed to determine the genetic location of the isolates. The results showed that after incubation in media containing ethanol as the sole carbon source for 20 days, the ethanol utilization rates of SJ01, SJ02, and SJ03 were 39.9%, 35.7%, and 31.8%, respectively, while ethanol tolerance was 10%, 8%, and 9%, respectively. SJ01 and SJ02 were identified as *Pichia kudriavzevii* and SJ03 as *Candida ethanolica*. Finally, based on the growth characteristics of the strains with ethanol as sole carbon source, SJ01 and SJ03 were selected for the brewing of low-alcohol apple cider. The alcohol contents of apple cider were reduced by 17.5% and 27.8%, respectively, and the quality of the ciders was improved.

Key words: ethanol-utilizing; 26S rDNA; low-alcohol; apple cider

苹果酒营养丰富，既能软化血管、防止动脉粥样硬化、调节人体新陈代谢、抗衰老、还具有养颜美容功效[1]，但由于酒精度过高，不能满足老人、妇女、小孩及酒精不耐受等人群的需要，随着社会的进步、物质不断丰富和消费理念的变化，人们变得更加注重自身的健康。加上与酒精有关的社会问题的出现，因此，市场上出现了许多低醇及无醇酒[2]。低醇及无醇酒不仅降低了酒精含量，减少了酒精对人体的危害，而且保留了原有酒的营养及风味，同时又能满足人们对酒喜好。欧美国家已拥有了非常广泛的品种和完善的工艺。随着我国苹果产业的不断发展，苹果酒成为果酒行业的新贵。发展苹果酒产业具有广阔的市场前景。

目前文献报道的生产无醇及低醇酒的方法主要有两种，一是物理方法，如：渗析法、反渗透法、真空蒸馏和精馏以及旋转锥体蒸发[3~4]；二是生物方法，如：限制发酵法和使用特殊酵母（非酿酒酵母和基因工程菌株）[5~7]。物理方法和限制发酵法的主要问题表现在：最终酒中的营养物质及香气成分含量较少，进而影响酒的口感[8]，而生物方法中基因工程菌株的使用备受争议，很难在食品中得到应用[9]。因此，寻找

收稿日期：2014-08-22

基金项目：十二五国家科技支撑计划资助项目(2012BAD31B01)

作者简介：宋靓靓（1990-），女，硕士，研究方向为食品发酵工程

通讯作者：袁亚宏（1971-），女，博士，教授，研究方向为食品生物工程及食品安全控制

一种新的方法来生产低醇及无醇酒很有必要。

本研究欲从陕西省太白酒厂的窖泥、酒醅及酒曲中分离纯化得到能代谢乙醇的酵母菌，然后基于 26S rDNA 序列分析技术对其进行鉴定，并测定其耐乙醇特性及乙醇利用特性，利用其能利用乙醇的特性，进行苹果酒酿造试验，以期开发其在低醇及无醇苹果酒制作中的潜在用途，并为低醇及无醇酒的生产提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

WLS21 酿酒酵母。西北农林科技大学食品科学工程学院发酵动力学实验室提供。

1.1.2 分离样品

窖泥、酒醅及酒曲，采自陕西太白酒厂。

1.1.3 培养基

分离培养基：葡萄糖 20 g，蛋白胨 20 g，酵母浸粉 10 g，琼脂 20 g，蒸馏水 1 L，121 ℃、20 min 灭菌后，加入 2%的无水乙醇。

唯一碳源液体培养基：$(NH_4)_2SO_4$ 5 g，KH_2PO_4 1 g，$MgSO_4$ $7H_2O$ 0.5 g，$CaCl_2$ 0.1 g，NaCl 0.1g，蒸馏水 1 L，121 ℃、20 min 灭菌后，加入适量的无水乙醇[10]。

YPD 固体培养基：葡萄糖 20 g，蛋白胨 20 g，酵母浸粉 10 g，琼脂 20 g，蒸馏水 1 L。

1.2 主要仪器与设备

UV-2550 型紫外可见分光光度计，日本岛津公司；JA2003 型电子天平，上海精密科学仪器有限公司；CX31 型显微镜，奥林巴斯公司；HC-3018R 型高速冷冻离心机，安徽中科中佳科学仪器有限公司；PTC-200 型 PCR 仪，MJ Research 公司；DYY-7C 型电泳仪，北京六一仪器厂；Dolphin-doc 型凝胶成像系统，美国 Wealtec 公司。

1.3 乙醇利用菌株的分离与纯化

初筛：称取 10 g 样品加入到含有 90 mL 无菌水的三角瓶中，振荡均匀后进行梯度稀释，选取合适的梯度稀释液后各取 100 μL 于分离固体培养基上进行涂布，28 ℃培养 7 d。挑选具有典型酵母菌落特征的单菌落进一步划线分离纯化。确认无杂菌后转接到 YPD 斜面培养基上，于 28 ℃培养 2~3 d 后置于 4 ℃冰箱保存备用。

复筛：将分离菌株分别接种至 5%乙醇含量的唯一碳源液体培养基中，28 ℃、150 r/min 摇床培养 7 d，选择使培养基浑浊的菌株进行下一步的耐乙醇特性测定试验及乙醇利用试验。

1.4 耐乙醇特性的测定

将复筛的菌株分别接种至以乙醇为唯一碳源且含量分别 6%、7%、8%、9%、10%、11%的培养基中，28 ℃、150 r/min 摇床培养 3 d，分别于培养前后测定其在 600 nm 波长下的吸光度。

1.5 乙醇利用曲线的绘制

将各菌株分别接种至 5%乙醇含量的唯一碳源培养基中，28 ℃、150 r/min 摇床培养 1 d，制得种子液，然后按 10%的接种量将各种子液转接至 8%乙醇含量的唯一碳源培养基中，28 ℃静置培养，每四天用酒精计法测定其酒精度，并绘制乙醇利用曲线。同时以未加菌株的 8%乙醇含量的唯一碳源培养基做空白对照。

1.6 菌落及细胞形态观察

菌种在 YPD 培养基平板上划线接种，28 ℃培养 3 d 后进行菌落形态观察，并拍照。选取 24 h 内培养菌株的纯培养物，制成菌悬液，在光学显微镜下观察分离株的细胞形态。

1.7 分子鉴定

1.7.1 模板制备

取 24 h 培养的分离株纯培养物 3 mL，按照酵母基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型：美国 Omega 公司生产）说明书描述的方法提取 DNA。

1.7.2 26S rDNA PCP 扩增

采用通用引物 NL-1：5’-GCATATCAATAAG CGGAGGAAAAG-3’及 NL-4：5’-GGTCCGTGTTT CAAGACGG-3’进行 PCR 扩增。引物由北京六合华大基因有限公司合成。

PCR 扩增体系：总体积 50 μL，包括 10 μL 模板，1 μL 上游引物，1 μL 下游引物，0.2 μL Taq DNA 聚合酶，1 μL dNTP，1.8 μL $MgCl_2$，5 μL 10×PCR 缓冲液，2.5 μL DMSO，27.5 μL 灭菌蒸馏水。

PCR 反应程序：94 ℃/3 min(预变性)；94 ℃/1 min 变性；58 ℃/1 min 退火；72 ℃/2 min 延伸，36 个循环，72 ℃/5 min 延伸[11]。

1.8 序列比对及系统发育树构建

采用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增的 DNA 片

段将检测后的 PCR 扩增产物寄送至上海英骏生物有限公司进行测序。

获得的序列与 GenBank 数据库中序列进行 Blast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）比对，用 Clustal X[12] 软件进行序列比对，并用软件 Mega 4 进行系统发育树构建。

1.9 低醇苹果酒酿造

1.9.1 种子液的制备

将 WSL21、SJ01、SJ03 酵母接种于可溶性固形物含量为 17 Brix 的苹果汁中，28 ℃、150 r/min 摇床培养 24 h、48 h、48 h。

1.9.2 苹果酒酿造

将 WLS21 酵母种子液接种于可溶性固形物含量为 17 Brix 的苹果汁中，28 ℃下发酵 7 d 后，进行倒罐。得到的苹果酒在 80 ℃下处理 15 min。待苹果酒冷却后然后将 SJ01、SJ03 菌株种子液按 10%接种量接种于苹果酒中，28 ℃下发酵 15 d。分别于 SJ01、SJ03 菌株种子液接种前后测苹果酒的总酸含量、还原糖含量、总酯含量、酒精度、可溶性固形物含量以及 pH 值[13~14]。

1.9.3 苹果酒感官评定

采用百分制法，由 10 名具有相关经验人员组成感官评定小组，从外观(20 分)、香气(20 分)、滋味(40 分)、典型性(20 分)四个方面分别对各个酒样进行评分，酒样的得分为四项得分之和[14]。

1.10 数据处理

所有数据都以平均值（mean）±标准差（sd）表示，应用 DPS v7.05 统计软件进行数据处理。试验重复三次。采用单因素方差分析（ANOVA）和多重比较进行差异显著性分析，P<0.05 认为具有显著差异。

2 结果

2.1 乙醇利用菌株的分离纯化及耐乙醇特性

经过初筛和复筛，从酒醅中分离纯化得到 3 株乙醇利用菌株。分别命名为 SJ01、SJ02、SJ03。三株菌株的耐乙醇特性曲线如图 1 所示。以能生长的最高乙醇浓度作为该菌株的乙醇耐受浓度。SJ01、SJ02、SJ03 三株菌株的乙醇耐受浓度分别为 10%、8%、9%。由图还可以看出，当乙醇含量大于 8%时，随着乙醇浓度的提高，菌株的生长都受到了抑制。对于菌株 SJ01，乙醇含量为 7%和 8%时，其生长情况基本一致。菌株 SJ02 则随着乙醇含量的增加，其生长逐渐变弱。SJ03 菌株在乙醇浓度为 7%时，生长的最好，此后，随着乙醇浓度的提高，其生长受到抑制。

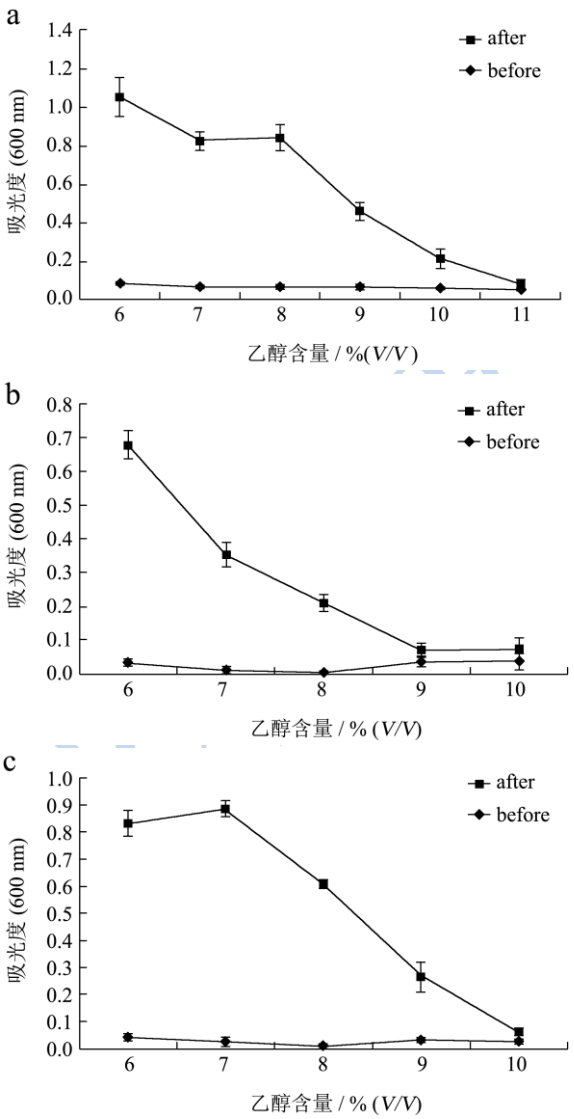


图 1 各菌株的耐乙醇特性

Fig.1 Ethanol tolerance of different strains

注：(a) SJ01 菌株；(b) SJ02 菌株；(c) SJ03 菌株。

2.2 乙醇利用曲线及特性

每四天测定酒精度，总共测定 20 d。各菌株乙醇利用曲线如图 2。从图可以得出，3 株分离菌株都能利用乙醇生长，在唯一碳源培养基中培养 20 d，SJ01、SJ02、SJ03 菌株的乙醇利用率分别为 39.9%、35.7%、31.8%。说明这 3 株都有利用乙醇生长的能力。

2.3 菌落形态及细胞形态观察

3 株分离菌在 YPD 培养基上培养 3 d 后其菌落形态均为乳白色的圆形菌落。B、C 菌落形态相似，为圆形、不透明、中间隆起、边缘正齐、表面干燥、呈现双圈状。D 菌落形态为圆形、不透明、中间隆起、边缘锯齿状、表面干燥、呈现双圈状（图 3）。显微

镜下观察各菌株细胞均为椭圆形，出芽生殖（图 4）。

2.4 26S rDNA 基因序列系统发育树的构建和菌种鉴定

利用BLAST工具与GenBank中已知的26S rDNA序列进行比对，比对结果见表 1。运用 NJ 法（Neighbour-joining）构建系统进化树（图 5），确定了分离菌株的系统发育地位。

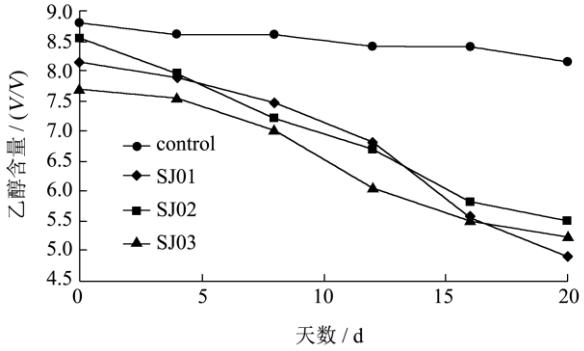
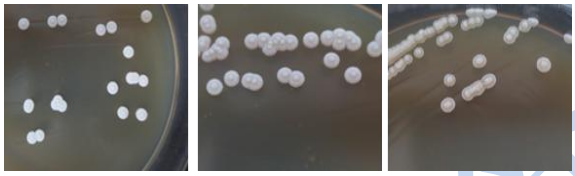


图 2 各菌株乙醇利用曲线

Fig.2 Ethanol-utilization curve of different strains

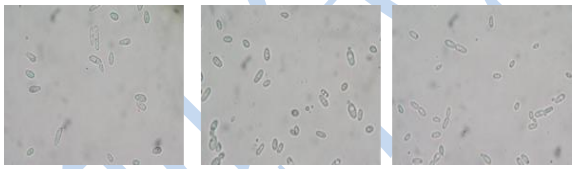


（a） （b） （c）

图 3 各分离株在 YPD 平板生长菌落形态

Fig.3 Colony morphology of each isolates on YPD plates

Note: (a-b) *Pichia kudriavzevii* strain SJ01 and SJ02, (c) *Candida ethanolica* strain SJ03.



(a) (b) (c)

图 4 各分离株细胞形态

Fig.4 Cell morphology of each yeast isolate

Note: (a-b) Pichia kudriavzevii strain SJ01 and SJ02, (c) Candida ethanolica strain SJ03.

BLAST 及系统发育树结果表明，菌株 SJ01 和 SJ02 与 *P.kudriavzevii* 的亲缘关系最近（100%）。菌株 SJ03 与嗜酒假丝酵母（*C.ethanolica*）的亲缘关系最近（100%）。据此可以将菌株 SJ01 和 SJ02 归为 *P.Kudriavzevii*，菌株 SJ03 归为嗜酒假丝酵母（*C.ethanolica*）。

表 1 分离菌株与 Genbank 参考菌株的比对结果

Table 1 Blast results of isolates with the reference strains from Genbank

分离株	比对结果	同源率/%	参考菌株
SJ01	*P. kudriavzevii*	100	GU126742.1
SJ02	*P.kudriavzevii*	100	GU126742.1
SJ03	*C.ethanolica*	100	KC146373.1

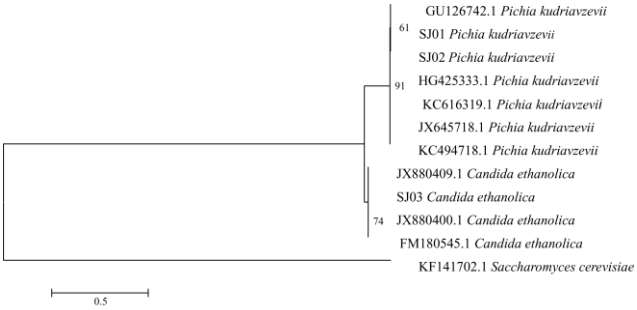


图 5 分离株 26S rDNA 序列系统发育树

Fig.5 Phylogenic tree of the 26S rDNA sequences of the isolates

2.5 低醇苹果酒的酿造

表 2 苹果酒的指标测定结果

Table 2 Parameter analysis of different ciders

测定指标	酒样		
	WLS21	WLS21&SJ01	WLS21&SJ03
pH 值	3.45 ± 0.04^{a}	3.53 ± 0.04^{a}	3.48 ± 0.05^{a}
可溶性固形物含量/ °Brix	5.70 ± 0.14^{a}	5.25 ± 0.07^{b}	5.55 ± 0.07^{ab}
还原糖/(g/L)	3.84 ± 0.06^{a}	2.72 ± 0.09^{b}	3.04 ± 0.05^{c}
总酸/(g/L)	10.86 ± 0.19^{a}	9.07 ± 0.09^{b}	10.49 ± 0.15^{a}
总酯/(g/L)	5.33 ± 0.04^{a}	5.94 ± 0.13^{b}	5.55 ± 0.07^{a}
酒精度/%(*V/V*)	8.3 ± 0.14^{a}	6.9 ± 0.35^{b}	6.1 ± 0.22^{b}

注：同列中上标字母不相同代表差异显著（Duncan 新复极差法，p=0.05），下同

分别测定 SJ01、SJ03 菌株加入前后苹果酒的各指标。结果如表 2 所示。由表可以看出，加入菌株 SJ01、SJ03 后，pH 值、可溶性固形物含量、还原糖、总酸以及总酯这几个指标虽然发生了一些变化，但其变化并不大。这说明加入乙醇利用菌株后，其对苹果酒的理化指标影响不大。苹果酒的酒精度分别降低了16.8%和 26.5%，总酯含量得到了提高。综合外观、香气、滋味和典型性等感官指标（表 3），加入菌株 SJ03 后，虽然总酯含量并未提高多少，但是在感官品评试验中，除了外观评分外，苹果酒的各项感官指标得分及总分都显著提高，这表明菌株 SJ03 可以提高苹果酒的质量，尤其是从香气和口感上均可以改善苹果酒的

品质。加入菌株 SJ01 后，总酯含提高，香气感官评分也较未加入的酒样高，这表明菌株 SJ01 苹果酒的增香方面有一定的贡献。由此说明 SJ01、SJ03 菌株在酿造低醇苹果酒方面，有一定的应用前景。

表 3 苹果酒的感官评判结果

Table 3 Sensory evaluation results of cider

	外观	香气	滋味	典型性	总分
WLS21	18.25±1.63[a]	20.11±3.10[a]	29.13±3.91[a]	6.90±0.93[a]	74.36±5.85[a]
SJ01	15.56±2.51[b]	25.44±3.39[b]	29.00±5.27[a]	6.33±1.22[a]	76.33±3.24[a]
SJ03	16.44±3.00a[b]	26.33±1.80[b]	33.33±0.90[b]	8.33±1.32[b]	84.44±3.30[b]

3 结论

从陕西太白酒厂的酒醅中分离得到 3 株乙醇利用菌株，经过 26S rDNA 序列同源性分析和系统发育树的构建，判定 2 株为 P. Kudriavzevii，1 株为 C.ethanolic，分别命名为 SJ01、SJ02、SJ03。三株菌株的乙醇耐受浓度分别为 10%、8%、9%。通过苹果酒发酵试验及感官品评试验，接种 C.ethanolic SJ03 后，苹果酒的酒精度降低了 26.5%，感官品质得到了改善，由此说明，SJ03 在低醇及无醇苹果酒的酿造方面有一定的应用前景。

参考文献

[1] 张楠,岳田利,郭彩霞,等.反渗透法应用于苹果酒脱醇的工艺研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,1:195-199
ZHANG Nan, YUE Tian-li, GUO Cai-xia, et al. Application of reverse osmosis to dealcoholization of apple cider [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat.Sci.Ed.), 2013, 1: 195-199

[2] Alejandro Ruiz-Rodríguеza, Tiziana Fornaria, Laura Jaimea, et al. Supercritical CO_2 extraction applied toward the production of a functional beverage from wine [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2012, 61: 92-100

[3] Margarida Catarinoa, Adélio Mendesa, Luis Madeiraa, et al. Beer dealcoholization by reverse osmosis [J]. Desalination, 2006, 200(1-3):397-399

[4] A J Wright, D L Pyle. An investigation into the use of the spinning cone column for in situ ethanol removal from a yeast broth process biochem [J]. Process Biochemistry, 1996, 31(7): 651-658

[5] Radoslav Selecký, Daniela Šmogrovičová, Pavol Sulo. Beer with reduced ethanol content produced using saccharomyces cerevisiae yeasts deficient in various tricarboxylic acid cycle enzymes [J]. J. Inst. Brew, 2008, 114(2): 97-101

[6] Giovanni De Francesco, Gary Freeman, Eung Lee, et al. Eects of operating conditions during low-alcohol beer production by osmotic distillation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(14): 3279-3286

[7] Russo P, Liguori L, Albanese D, et al. Pierucci S,Klemes JJ. Chemical Engineering Transactions [J]. Aidic Servizi Srl, Italy. 2013: 1735-1740

[8] Mariola López, Silvia Alvarez, Francisco A Riera, et al. Production of low alcohol content apple cider by reverse osmosis [J]. Industrial and Engineering Chemistry Research, 2002, 41(25): 6600-6606

[9] 郭桦,郭祀远.转基因食品安全性的探讨[J].现代食品科技,2007,8:71-73
GO Hua, GUO Si-yuan. Discussion of the security of genetically modified foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 8: 71-73

[10] 杨小柏.乙醇降解菌的筛选及特性研究[D].重庆大学,2005
YANG Xiao-bai. The selection of ethanol-degradation bacteria and the research on its characteristic [D]. Chongqing University, 2005

[11] Baleiras-Couto M M, Gomes A S, Casal M, et al. Survey of yeast diversity during wine bottling processes using restriction analysis of 26S ribosomal DNA (rDNA) [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2012, 18(1): 39-42

[12] 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 Research, 1997, 25(24): 4876-4882

[13] GB/T 5038-2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].2006
GB/T 5038-2006, Analytical methods of wine and fruit wine [S]

[14] 叶萌祺,袁亚宏,岳田利,等.产香酵母分离鉴定与苹果酒发酵中的应用[J].农业机械学报,2013,44(12):187-192
YE Meng-qi, YUAN Ya-hong, YUE Tian-li, et al. Isolation and identification of aroma-producing yeasts and and its application in cider fermentation [J]. Transactions of the Chinese society for agricultural machinery, 2013, 44(12): 187-192

现代食品科技