DOI:10.12441/spyswjs.20230131004 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0080-10

降酸酵母的筛选及其在柠檬汁降酸中的应用

吴 叶[1,2,3] 陈星光[1,2,3] 杨 华[1,2,3] 陆 健[1,2,3*] 谢广发[4] 吴殿辉[1,2,3]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心,江苏 无锡 214122; 4. 浙江树人学院浙江省污染暴露与健康干预重点实验室,浙江 杭州 310015)

摘要:【目的】筛选并鉴定能够高效降低柠檬汁中有机酸质量浓度的微生物菌株,并评估其应用效果。【方法】通过微生物分离纯化技术筛选目标菌株,并优化其在柠檬汁降酸中的应用条件。【结果】经过筛选发现,酵母菌株 *Saturnispora diversa* SD-59(SD-59)在高效降低有机酸的同时能产生令人舒适的风味物质。在最优培养条件(接种体积分数 1.0%,温度 31 ℃,转速 200 r/min,培养时间 60 h)下,柠檬汁的总酸质量浓度降低了 97.9%,其中苹果酸和柠檬酸分别减少了 100.0% 和 95.9%。【结论】SD-59 具有高效的降酸能力,为生物降酸提供了新的菌种资源,有望在高酸环境中发挥重要作用。

关键词:降酸;酵母;筛选;柠檬汁

Screening of Acid-decreasing Yeast and Its Application in Lemon Juice

WU Ye[1,2,3] *CHEN Xingguang*[1,2,3] *YANG Hua*[1,2,3] *LU Jian*[1,2,3*] *XIE Guangfa*[4] *WU Dianhui*[1,2,3]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Provincial Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Key Laboratory of Pollution Exposure and Health Intervention of Zhejiang Province, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to screen and identify microbial strains capable of efficiently reducing the mass concentration of organic acids in lemon juice, and evaluate their application effects. [**Method**] Target strain was screened through microbial isolation and purification techniques, and the application conditions in the acid-reducing process of lemon juice were optimized. [**Result**] After screening, it was found that the yeast strain *Saturnispora diversa* SD-59 (SD-59) can efficiently reduce the content of organic acids while producing pleasant flavor compounds. Under the optimal culture conditions (inoculation volume fraction of 1.0%, temperature of 31 ℃, rotation speed of 200 r/min, culture time of 60 h), the total acid mass concentration in lemon juice was reduced by 97.9%, with malic acid and citric acid decreasing by 100.0% and 95.9%, respectively. [**Conclusion**] SD-59 exhibits remarkable acid-reducing capability, providing a novel microbial resource for biological deacidification and holding great promise for application in highly acidic environments.

Keywords: acid decreasing; yeast; screening; lemon juice

有机酸是水果中重要的风味物质与营养成分,可以赋予果汁爽口的酸味、增加果汁风味的平衡感,其中柠檬酸、苹果酸和酒石酸是主要的有机酸[1]。然而,当果汁中含有过量有机酸时,不仅带

基金项目:安徽省科技重大专项(201903a06020030);高等学校学科创新引智计划(111 计划)项目(111-206);江苏高校优势学科建设工程资助项目。

通信作者:陆健(1968—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事酿酒工程与食品生物技术研究。E-mail:jlu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-01-31 **修回日期:**2023-03-19

来尖锐酸涩的口感，同时也制约了果汁的生物加工和生产[2]。柠檬汁的有机酸含量非常高，其中柠檬酸占总酸的90%以上，当其用于开发发酵类产品（果酒、果醋等）时，过量的有机酸还会给微生物发酵带来酸胁迫，进而导致发酵效率低，甚至无法发酵，这极大地限制了柠檬汁的开发利用。因此，需要采用有效方法降低柠檬汁的有机酸含量。

目前，果汁降酸的方法主要有物理法、化学法和生物法。物理降酸法主要包括冷冻法和稀释法，但这些方法的降酸效果并不理想[3]。化学降酸法是利用碱式盐（碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钾等）中和有机酸，该法简单快捷。有学者探索了不同的碱式盐对蓝靛果酒中总酸的降低效果，发现碳酸钠的降酸效果最好[4]。当添加质量浓度为1 g/L的碳酸钠时，五味子果汁的总酸含量下降最多[5]。但是碱式盐在降酸的同时会给果汁、果酒带来苦涩味，甚至导致浑浊、失光等不稳定情况[6]。相比之下，生物降酸法展现出巨大优势，其利用微生物分解有机酸，从而达到降酸目的，不仅可以增加果汁、果酒的稳定性，同时可以增加风味物质[7]。葡萄酒多采用乳酸菌的苹果酸-乳酸发酵（MLF）来降酸，其机理是苹果酸在苹果酸乳酸酶及Mn^{2+}参与下直接转化成乳酸[8]。但是在实际应用中，如果MLF控制不好，乳酸菌就可能变为病原菌，造成酒体微生物病害[9]。实际上，一些非酿酒酵母也可以利用有机酸。毕赤酵母在猕猴桃汁中纯培养后，柠檬酸、苹果酸和酒石酸的质量浓度分别从12.30、3.09、0.61 g/L下降至11.00、2.02、0.41 g/L[10]。葡萄汁经裂殖酵母发酵后，苹果酸含量可以降低100%[11]。因此，选育能够利用有机酸的酵母将为果汁降酸开辟新路径。

柠檬汁高酸低pH的环境导致生物降酸难以实现，因此，有关菌株在柠檬汁中降酸的研究较少。作者从柠檬果和果园土壤中筛选出降酸效果最佳的菌株，研究其在不同柠檬酸质量浓度下的性能变化，并探讨其在柠檬汁中的降酸效果和碳源利用情况，旨在为该菌株在高酸果汁中的实际应用提供理论参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

蛋白胨、葡萄糖、琼脂、酵母粉、柠檬酸、尿素、硫酸铵、磷酸二氢钾、氯化钠、磷酸氢二钠、硫酸镁和石英砂：国药集团化学试剂有限公司；Premix Ex Taq TM、6×DNA上样缓冲液、2 000 bp DNA Marker、引物ITS1和ITS4：苏州金唯智生物科技有限公司；耐酸酵母DV10：加拿大拉曼公司；降酸酵母71B：烟台帝伯仕酵母有限公司。

柠檬果由重庆檬泰生物科技有限公司提供。新鲜的柠檬果清洗干净、去皮去籽、压榨后，向所得到的1 kg压榨产物中加入500 mL水制备成柠檬汁（总酸质量浓度为39.50 g/L）。

酵母浸粉蛋白胨葡萄糖（YPD）培养基：酵母粉10 g/L、蛋白胨20 g/L、葡萄糖20 g/L，115 ℃灭菌20 min。

降酸培养基：柠檬酸20 g/L、尿素0.01 g/L、$(NH_4)_2SO_4$ 0.01 g/L、KH_2PO_4 0.025 g/L、Na_2HPO_4 0.005 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L、酵母粉0.005 g/L，121 ℃灭菌15 min。

柠檬酸培养基：酵母粉10 g/L、蛋白胨20 g/L、柠檬酸按需添加，121 ℃灭菌15 min。

1.2　仪器与设备

无菌操作台：SW-CJ-1D型，苏州净化设备有限公司；离心机：LEGEND MICRO 17型，美国Thermo Fisher Scientific公司；自动高压蒸汽灭菌器：LS-B50L型，致微（厦门）仪器有限公司；组合式摇床：HYL-C型，太仓市强文实验设备有限公司；隔水式恒温培养箱：GHP-9050型，上海一恒科学仪器有限公司；PCR扩增仪：Eppendorf AG 22331 Hamburg型，德国艾本德股份公司；多功能酶标仪：Varioskan LUX型，美国Thermo Fisher Scientific公司；冷场发射扫描电子显微镜（FESEM）：SU8220型，日本Hitachi公司；光学显微镜：SZ40型，日本Olympus公司；高效液相色谱仪（HPLC）：UltiMate3000型，美国Dionex公司。

1.3　试验方法

1.3.1　降酸菌株的分离与纯化

将柠檬果和果园土壤分别收集到无菌袋中，取25 g果皮和土壤分别放入225 mL无菌生理盐水中，在28 ℃、150 r/min条件下培养30 min。取5 mL混悬液加入100 mL YPD培养基中，在28 ℃、150 r/min条件下培养24 h。取5 mL菌液转接入20 g/L的柠檬酸培养基中培养，连续转接4次，同时柠檬酸质量浓度由20、40、60 g/L逐渐递增到80 g/L。采用无菌生理盐水连续稀释培养24 h的富集菌液，每个稀释

度涂布3个平板。选择稀释度合适的平板，将单菌落分离纯化2次，保存于YPD培养基斜面。

1.3.2 降酸菌株的筛选与鉴定

1）初筛：将分离得到的菌株在YPD培养基中活化后，按体积分数1.0%接种至降酸培养基中，在28 ℃、150 r/min的条件下培养3 d。挑选变浑浊的培养基，依据国际果汁生产商联合会（IFU）的方法测定其总酸质量浓度（以柠檬酸计），选择降酸率高的菌株。降酸率按式（1）计算。

$$D=\frac{A_1-A_2}{A_1}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

D——降酸率，%；

A_1——初始的总酸质量浓度，g/L；

A_2——最终的总酸质量浓度，g/L。

2）复筛：将初筛的菌株活化后按体积分数1.0%接种至柠檬汁中，在28 ℃、150 r/min的条件下培养3 d，测定其降酸率。同时由感官测评小组对气味舒适度进行评估，+++++表示非常好，+++表示良好，++表示中等，+表示非常差。

3）菌种鉴定：采用石英砂破壁法提取目的菌株基因组DNA[12]，并用酵母ITS通用引物进行扩增。PCR产物通过核酸电泳检测，并进行测序。将测定的18S rDNA序列与GenBank中酵母菌的序列进行比对，使用Mega 7.4软件构建系统发育树。

1.3.3 降酸能力测定

菌株活化后按体积分数1.0%接种至不同pH（2.7、2.8、2.9、3.0）和不同柠檬酸质量浓度（20、40、80 g/L）的柠檬酸培养基中。在28 ℃、180 r/min培养48 h，测定总酸质量浓度后计算降酸率，并与耐酸酵母DV10和降酸酵母71B的降酸率进行对比。

1.3.4 耐酸性能分析

1）生长曲线测定：酵母活化后，以体积分数1.0%接种至不同柠檬酸质量浓度（20、40、80 g/L）的柠檬酸培养基中，置于28 ℃、180 r/min条件下培养，以YPD培养基为对照。每隔2 h取一次样，在波长600 nm处测定光密度值。

2）不同pH和柠檬酸质量浓度下的生长情况分析：菌株活化后按体积分数1.0%接种至不同pH（1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0）和不同柠檬酸质量浓度（20、40、80 g/L）的柠檬酸培养基中。在28 ℃、180 r/min条件下培养15 h后，进行活细胞计数并测定OD_{600}值。

3）不同柠檬酸质量浓度下的酵母细胞形态分析：菌株活化后按体积分数1.0%接种至不同柠檬酸质量浓度（20、40、80 g/L）的柠檬酸培养基中，以YPD培养基为对照，在28 ℃、180 r/min条件下培养15 h后，取菌液置于光学显微镜下直接观察，随后制样，置于冷场发射扫描电子显微镜下观察[13]。

1.3.5 降酸酵母在柠檬汁中的应用条件分析

1）最适培养温度的测定：在柠檬汁中接入体积分数1.0%的菌株活化液。置于转速为160 r/min，温度分别为25、28、31、34 ℃的条件下培养48 h，测定总酸质量浓度并计算降酸率。

2）最适培养转速的测定：在柠檬汁中接入体积分数1.0%的菌株活化液。设置转速分别为160、180、200、220 r/min，在最适温度条件下培养48 h，测定总酸质量浓度并计算降酸率。

3）最适接种体积分数的测定：在柠檬汁中分别接入体积分数为0.5%、1.0%、1.5%、2.0%的菌株活化液。置于最适转速和最适温度下培养48 h，测定总酸质量浓度并计算降酸率。

4）最适培养时间的测定：在柠檬汁中接入最适体积分数的菌株活化液。置于最适转速和最适温度下培养，分别在42、48、54、60 h取样，测定总酸质量浓度并计算降酸率。

1.3.6 降酸酵母在柠檬汁中碳源利用情况分析

菌株活化后按1.0%的接种体积分数接入柠檬汁中，在优化的条件下培养。分别在12、24、36、48、60 h取样，测定其对糖类和有机酸的利用情况。糖类（葡萄糖、果糖、蔗糖）和有机酸（苹果酸、柠檬酸）通过HPLC进行测定[14]。

2 结果与讨论

2.1 降酸菌株的筛选与鉴定

2.1.1 初筛

在柠檬果和果园土壤中分离了256个菌株，将它们分别接入降酸培养基中培养。培养3 d后，选择变浑浊的培养基，测定其总酸质量浓度后计算降酸率。

如图1所示，68个变浑浊的培养基中有29个培养基的总酸质量浓度显著降低（降酸率≥5%），说明这29个菌株具有降酸能力。因此，选择这29个菌株进行复筛。

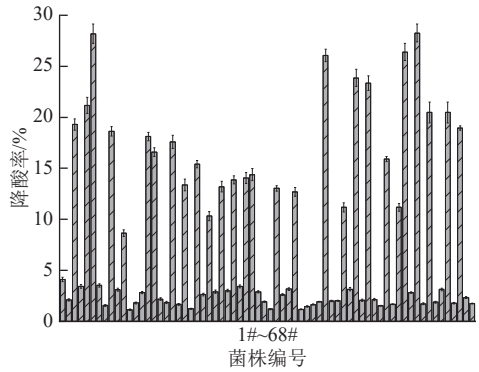


图1　菌株在降酸培养基中的降酸率

Fig. 1　Acid-decreasing rates of strains in acid-decreasing culture medium

2.1.2　复筛

将29个显著降酸的菌株接入柠檬汁，培养3 d后测定总酸质量浓度并计算降酸率。结果如表1所示，初筛的大部分菌株能够降低柠檬汁的总酸质量浓度，其中59#菌株的降酸率能够达到88.4%。此外，由于菌株在生长代谢过程中会产生不同的风味物质，因此，由感官评测小组评估了发酵后柠檬汁的气味舒适度。如表1所示，部分菌株在降酸的同时会产生令人不舒适的风味物质，因此不适合用于实际降酸。值得注意的是，59#菌株在柠檬汁中不仅具有非常高的降酸率，而且能产生令人舒适的风味物质，在柠檬汁中具有良好的降酸效果。因此，选择59#菌株进行进一步鉴定。

2.1.3　菌种鉴定

将59#菌株进行18S rDNA测序，然后将测得的序列通过NCBI的BLAST程序进行同源性比对分析。测得菌株的序列长度为380 bp，同源性分析显示该菌株的ITS序列与*Saturnispora diversa*（*S. diversa*）的相似性为99.4%。基于ITS的DNA序列绘制系统发育树，结果如图2所示。结合同源性分析和系统发育树分析，59#菌株鉴定为酵母*S. diversa*，将其命名为SD-59。目前，*S. diversa*主要在葡萄浆果表面非酵母的多样性研究中被发现，小鼠急性经口毒性试验表明其为实际无毒性酵母[15]。Zhao等[16]将菌株*S. diversa*用于葡萄汁发酵，发现其具有较强的发酵能力，并且能够产生大量的2，3-丁二醇和2-苯乙醇。此外，Morera等[17]通过研究认为，酵母*S. diversa*可以用作葡萄酒的纯发酵剂以及用于混菌发酵。但是，关于该菌在降酸方面的作用鲜有报道。

表1　菌株在柠檬汁中的降酸率和气味舒适度

Table 1　Acid-decreasing rates of strains in lemon juice and comfort degrees of odors

菌株编号	降酸率/%	气味舒适度	菌株编号	降酸率/%	气味舒适度
3#	2.2±0.1	+++	32#	19.5±0.2	+
5#	15.0±0.5	++	36#	1.3±0.0	+++
6#	55.9±0.9	+++	39#	13.1±0.2	+
9#	39.4±0.5	++	44#	58.2±1.4	+
11#	10.5±0.2	+++++	47#	13.1±0.4	+++
15#	46.5±1.3	+	49#	−2.1±0.1	+++++
16#	16.1±0.3	++	51#	−2.4±0.1	+++
19#	10.5±0.4	++	54#	1.8±0.1	+++
21#	1.4±0.0	+++	56#	20.6±1.0	++
23#	13.1±0.3	+	57#	30.9±0.5	+
25#	11.9±0.5	+++	59#	88.4±1.7	+++++
27#	14.3±0.6	++	61#	13.3±0.3	++
29#	−0.7±0.0	++	64#	43.7±1.1	+
31#	3.5±0.1	+++	66#	13.3±0.3	++

注：“+++++”表示非常好；“+++”表示良好，“++”表示中等；“+”表示非常差。

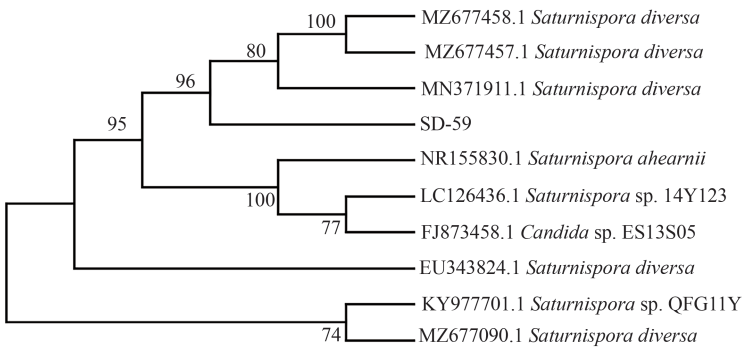


图2　系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree

2.2 菌株降酸能力的验证

为了进一步验证酵母SD-59的降酸能力，将其与常用的降酸酵母71B和耐酸酵母DV10对比，测定了它们在不同pH和不同柠檬酸质量浓度下的降酸率。如表2所示，当控制柠檬酸质量浓度为20 g/L时，酵母71B和酵母DV10无法利用柠檬酸，而酵母SD-59的降酸率随着pH的升高而升高。即便是在pH为2.7的条件下，酵母SD-59仍然能够保持86.4%的降酸率。如表3所示，随着柠檬酸质量浓度的升高，酵母71B和DV10仍然无法消耗柠檬酸，而酵母SD-59的降酸率逐渐降低。这些结果说明酵母SD-59能够将柠檬酸作为唯一碳源利用，而酵母71B和DV10缺乏这种能力。有研究表明，酵母71B能够利用葡萄汁中38%的苹果酸[18]，酵母DV10能够吸收芒果浆中38%的苹果酸[19]，它们可能缺乏利用柠檬酸的能力。一些酵母可以将有机酸作为底物进行代谢。根据利用苹果酸和其他三羧酸循环中间产物的能力，酵母可以分为2类：三羧酸循环阳性菌（krebs-positive），即能够使用一种或多种TCA循环中间体而不需要可同化糖的酵母菌株；三羧酸循环阴性菌（krebs-negative），即只有在葡萄糖或其他可同化碳源存在的情况下才能利用这些二羧酸的酵母菌株[12]。因此，酵母SD-59属于三羧酸循环阳性菌。此外，质量浓度为40 g/L的柠檬酸已经影响了酵母SD-59代谢柠檬酸的能力（见表3），说明过多的柠檬酸会对菌株产生胁迫作用。

表2 酵母在不同pH下的降酸率

Table 2 Acid-decreasing rates of yeast strains at different pH

pH	降酸率/%		
	酵母SD-59	酵母71B	酵母DV10
2.7	86.4±1.6	0.1±0.0	0.2±0.0
2.8	90.8±1.7	0.2±0.0	0.4±0.0
2.9	92.1±1.6	0.5±0.1	0.6±0.0
3.0	95.0±1.5	1.2±0.1	1.6±0.2

表3 酵母在不同柠檬酸质量浓度下的降酸率

Table 3 Acid-decreasing rates of yeast strains cultured with citric acid at different mass concentrations

柠檬酸质量浓度/（g/L）	降酸率/%		
	酵母SD-59	酵母71B	酵母DV10
20	76.8±1.5	1.1±0.1	2.0±0.1
40	44.8±2.0	0.2±0.1	0.2±0.0
80	29.1±0.9	0.1±0.0	0.2±0.0

2.3 降酸酵母耐受高质量浓度柠檬酸的性能分析

2.3.1 降酸酵母生长曲线

为了研究酵母SD-59在高质量浓度柠檬酸下的性能变化，首先测定了其在不同柠檬酸质量浓度下的生长曲线。由图3可知，酵母SD-59在不同柠檬酸质量浓度下的生长情况不同。与不存在柠檬酸的情况相比，当柠檬酸质量浓度为20 g/L时，酵母SD-59的生长出现了明显的滞后现象。随着柠檬酸质量浓度的增加，酵母SD-59的对数生长期出现得越来越晚，表明柠檬酸作为三羧酸对酵母生长具有胁迫作用。此外，对照组YPD培养基中的酵母SD-59在15 h时进入了稳定期，而经过柠檬酸处理的菌株都正处于对数生长期。因此，在后续试验中，将培养时间统一为15 h。

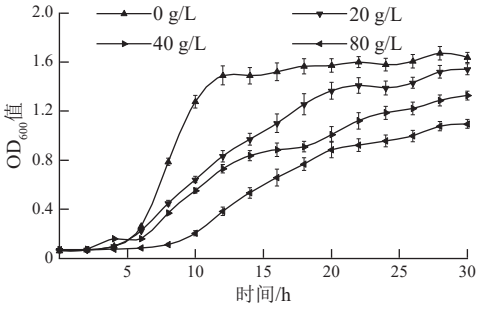
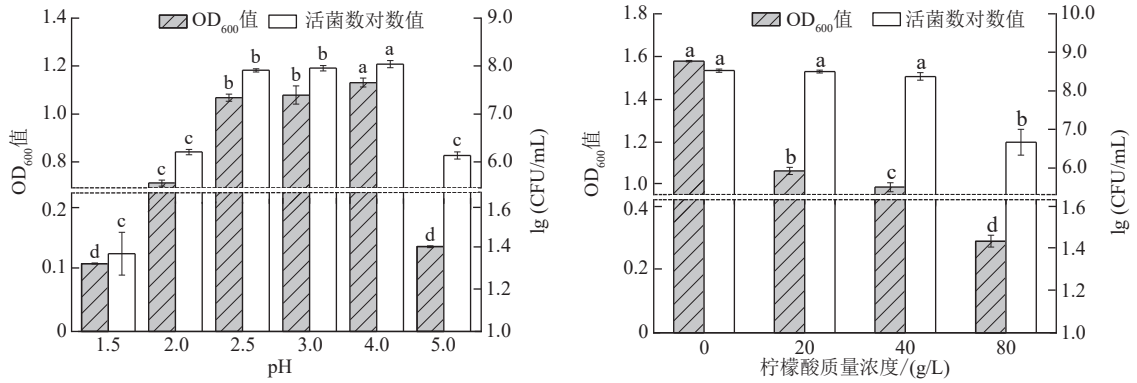


图3 酵母SD-59在不同柠檬酸质量浓度下的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of yeast strain SD-59 cultured with citric acid at different mass concentrations

2.3.2 降酸酵母在不同条件下的生长情况

采用OD_{600}值和平板计数法观察酵母SD-59在不同pH和柠檬酸质量浓度下的生长情况。图4（a）是在控制柠檬酸质量浓度为20 g/L时，酵母SD-59在不同pH条件下的生长情况。从OD_{600}值来看，酵母SD-59在pH等于2.5、3.0、4.0时都能维持正常的生长，在pH为1.5、2.0、5.0时难以生存。从活菌数来看，酵母SD-59在pH等于4.0时能够达到1×10^8的菌体量，在pH为2.5和3.0时也能达到接近1×10^8的菌体量。因此，酵母SD-59在pH 2.5~4.0的条件下都能正常生长。此外，考察了酵母SD-59在不同柠檬酸质量浓度下的生长情况，结果如图4（b）所示。从OD_{600}值来看，酵母SD-59的OD_{600}值随着柠檬酸质量浓度的增加而减少，在YPD培养基中的OD_{600}值最大。从活菌数来看，酵母SD-59在YPD培养基、20 g/L和40 g/L柠檬酸质量浓度下没有显著差异，这说明酵母SD-59有望在40 g/L的柠檬酸质量浓度下保持较好的降酸能力。



不同字母表示不同指标间差异显著(P<0.05)。

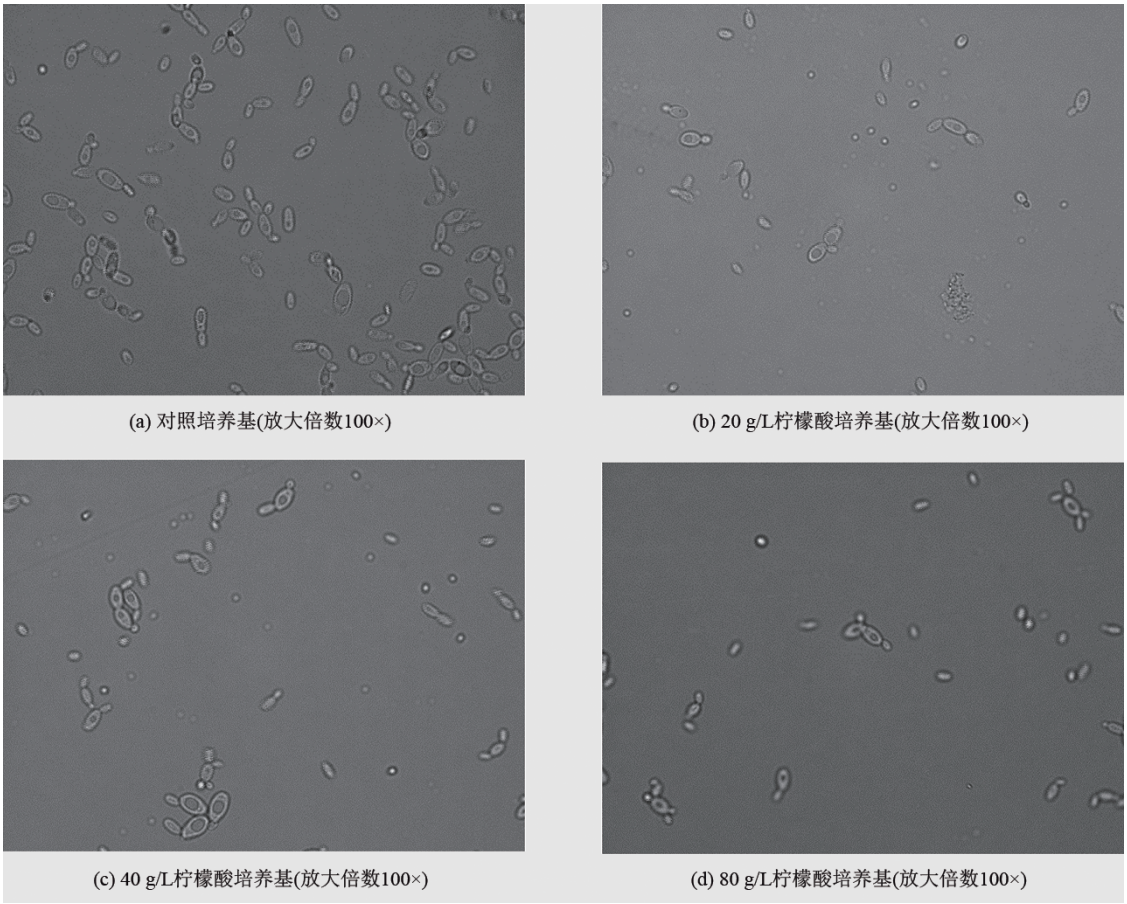
(a) 不同pH　　(b) 不同柠檬酸质量浓度

图4　酵母SD-59在不同pH和不同柠檬酸质量浓度下的生存情况

Fig. 4　Survival status of yeast strain SD-59 cultured at different pH and different mass concentrations of citric acid

2.3.3　降酸酵母在不同柠檬酸质量浓度下的形态变化

由2.3.2结果可知，酵母SD-59在80 g/L柠檬酸质量浓度下的OD_{600}值和活菌数都显著减少，说明酵母SD-59在该柠檬酸质量浓度下已经受到了胁迫。为了研究酵母SD-59在不同柠檬酸质量浓度下的形态结构变化，对其形态和结构进行了观察。如图5所示，在光学显微镜下，酵母SD-59在YPD培养基中呈椭球状、细胞结构完整、液泡圆润。当碳源改为柠檬酸并且随着柠檬酸质量浓度



(a) 对照培养基(放大倍数100×)　　(b) 20 g/L柠檬酸培养基(放大倍数100×)

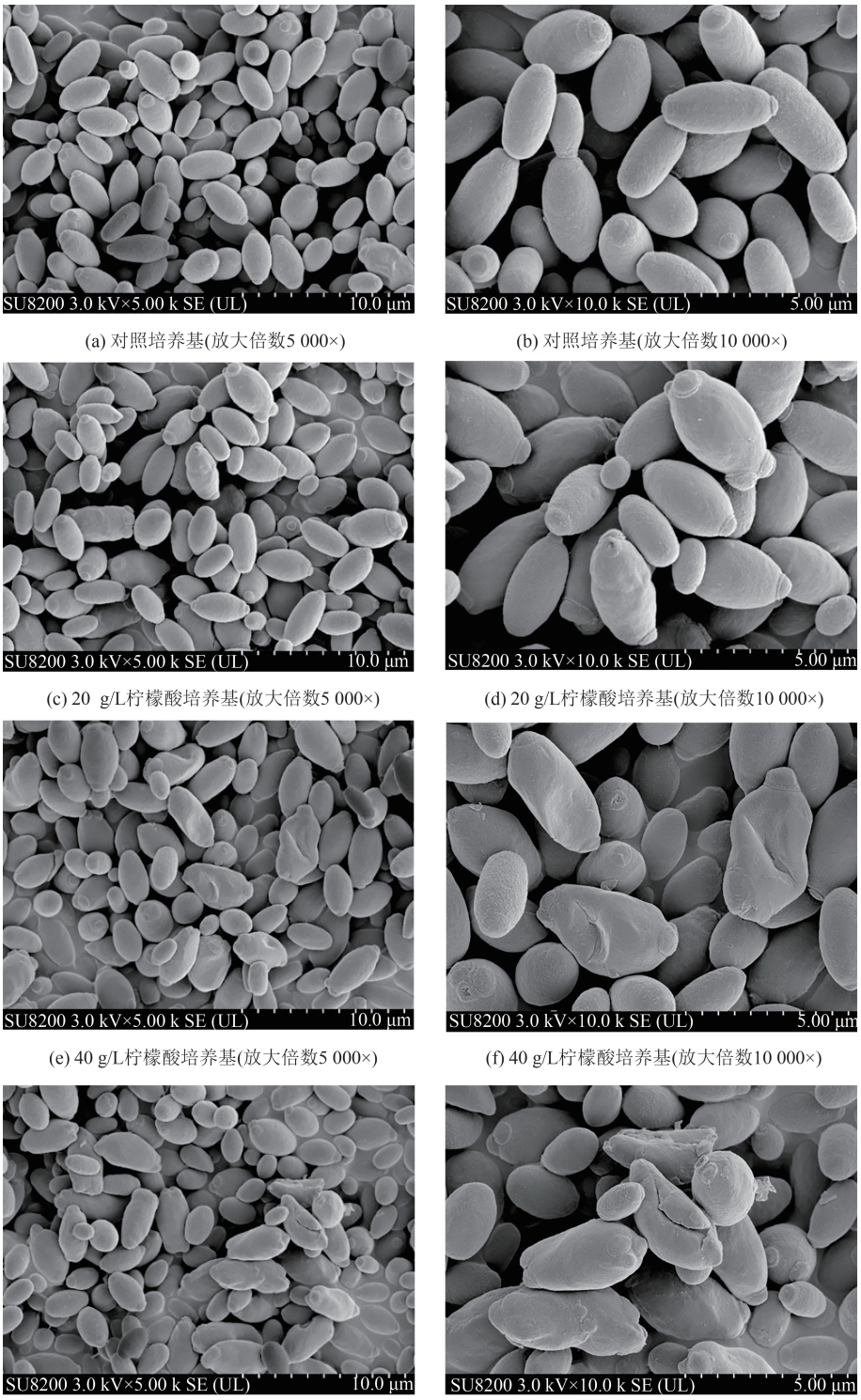
(c) 40 g/L柠檬酸培养基(放大倍数100×)　　(d) 80 g/L柠檬酸培养基(放大倍数100×)

图5　显微镜观察不同质量浓度柠檬酸对酵母SD-59细胞结构的影响

Fig. 5　Effects of different mass concentrations of citric acid on the cell structure of yeast strain SD-59 observed by microscope

的增加，酵母SD-59的细胞逐渐变小、液泡不再圆润。这说明在以柠檬酸为唯一碳源的情况下，酵母SD-59的细胞结构和形态会受到影响。

为了进一步观察酵母细胞结构的变化，用冷场发射扫描电镜进行了观察，结果见图6。未经过柠檬酸处理的酵母细胞呈椭球状，表面光滑且牙痕清晰可见，细胞长轴约3 μm，短轴约2 μm。但是经过柠檬酸处理后，细胞形态发生不同程度的变形。随



(a) 对照培养基(放大倍数5 000×)　(b) 对照培养基(放大倍数10 000×)

(c) 20 g/L柠檬酸培养基(放大倍数5 000×)　(d) 20 g/L柠檬酸培养基(放大倍数10 000×)

(e) 40 g/L柠檬酸培养基(放大倍数5 000×)　(f) 40 g/L柠檬酸培养基(放大倍数10 000×)

(g) 80 g/L柠檬酸培养基(放大倍数5 000×)　(h) 80 g/L柠檬酸培养基(放大倍数10 000×)

图6　冷场发射扫描电镜观察不同质量浓度柠檬酸对酵母SD-59形态的影响

Fig. 6　Effects of different mass concentrations of citric acid on the morphology of yeast strain SD-59 observed by FESEM

着柠檬酸质量浓度增加，菌株形态塌陷逐渐明显，表面粗糙程度逐渐严重。当柠檬酸质量浓度达到80 g/L的时候，虽然部分细胞形态变形和结构破损得最严重，但是一半以上的酵母保持了较好的形态结构。这说明酵母SD-59在一定程度上能够耐受80 g/L的柠檬酸。因此，在实际降酸过程中，将柠檬酸质量浓度控制在小于80 g/L时会有助于酵母SD-59发挥其降酸性能。

2.4　降酸菌株在柠檬汁中的应用效果

由以上结果可知，酵母SD-59在柠檬酸质量浓度小于80 g/L时具有消耗柠檬酸的能力。目前报道的降酸酵母在实际应用中的总酸质量浓度都在20 g/L左右，而柠檬汁中的总酸质量浓度远高于20 g/L。为了进一步探讨该酵母在实际应用中的降酸效果，研究了其在柠檬汁中的降酸特性。当接种体积分数为1.0%、转速为160 r/min、培养时间为48 h时，培养温度显著影响了酵母SD-59的降酸能力。如图7(a)所示，酵母SD-59在31 ℃下的降酸率最高，达到了53.2%。

图7(b)显示了转速也是影响酵母降酸性能的重要因素，酵母SD-59的降酸率随转速升高呈现先上升后下降的趋势，在200 r/min条件下呈现最大值，为67.6%。由图7(c)可知，接种体积分数对酵母降酸性能的影响较小，因此选择1.0%的接种体积分数进行后续试验。根据以上优化条件，在柠檬汁中接入体积分数1.0%的酵母活化液并置于31 ℃、200 r/min的条件下培养，酵母SD-59在不同时间点的降酸率如图7(d)所示。可以看出，酵母SD-59的降酸率随时间的延长而增加，当培养时间为60 h时，柠檬汁的总酸质量浓度由39.50 g/L降低至0.83 g/L，降酸率高达97.9%。因此，在实际降酸过程中，可根据实际需求将总酸质量浓度降低至特定范围。

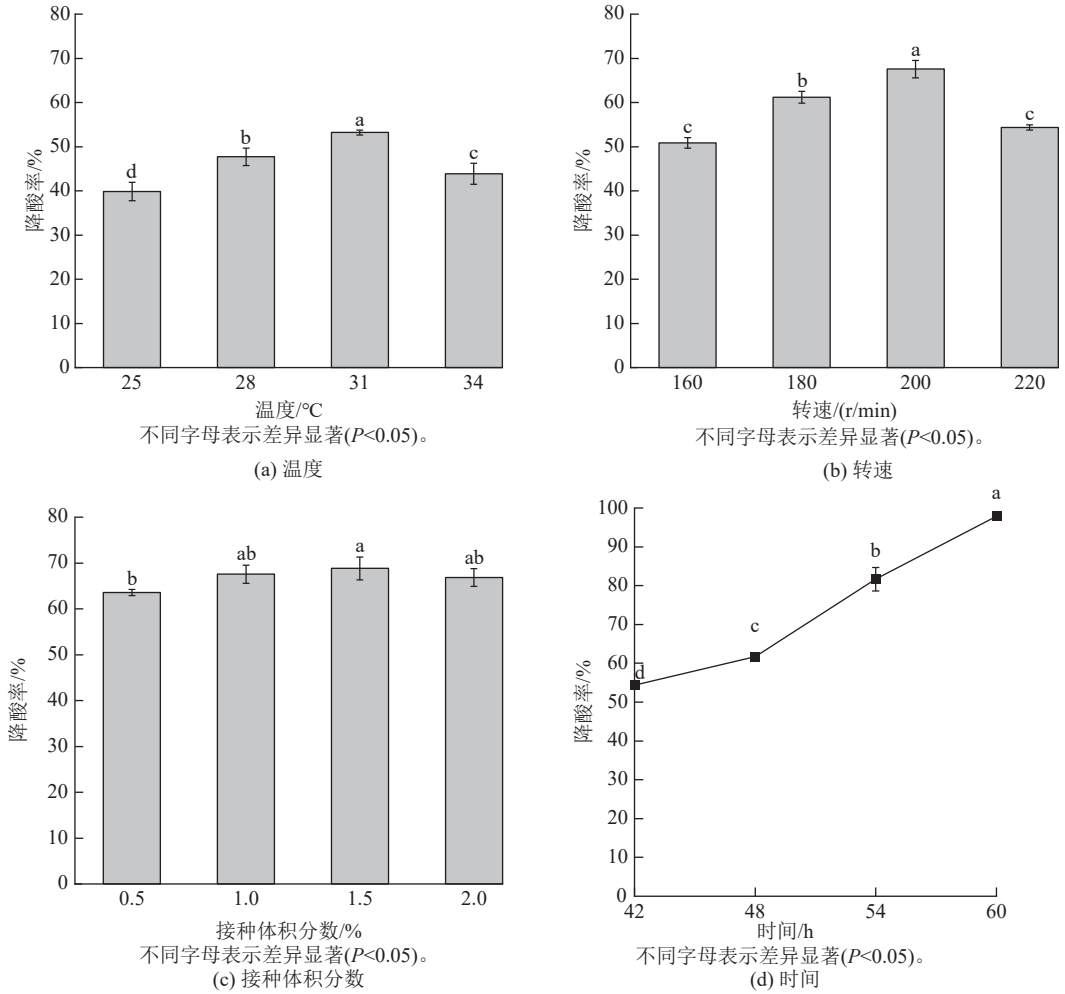


图7　酵母SD-59在不同条件下的降酸率

Fig. 7　Acid-decreasing rates of the yeast strain SD-59 under different conditions

2.5 降酸菌株在柠檬汁中的碳源利用特性

菌株 SD-59 能够有效利用柠檬汁中柠檬酸的原因是其能够将柠檬酸作为碳源利用。碳源为酵母菌的生长繁殖提供含碳元素的营养物质，可以分为碳水化合物和非碳水化合物。单糖、双糖、三糖等是酵母菌可利用的碳水化合物，有机酸、烷烃、烯烃等是酵母菌可利用的非碳水化合物。柠檬汁中的碳水化合物主要是葡萄糖、果糖和蔗糖，非碳水化合物主要是各类有机酸。为了进一步研究菌株 SD-59 在降酸过程中对各种碳源的利用情况，在不同时间点测定了各种碳源的质量浓度，为后续该菌应用于实际生产提供理论指导。

柠檬汁中各种碳源的质量浓度分别为：柠檬酸 32.15 g/L、果糖 3.24 g/L、蔗糖 1.86 g/L、葡萄糖 1.49 g/L、苹果酸 1.04 g/L，说明柠檬汁具有低糖高酸的特性。当接入降酸菌株 SD-59 并置于优化条件下培养，柠檬汁中各种碳源的质量浓度变化如图 8 所示。当培养时间达到 12 h 时，柠檬汁中的葡萄糖、果糖和苹果酸完全被消耗，同时柠檬酸也开始被消耗。这说明菌株 SD-59 可能会优先利用葡萄糖、果糖和苹果酸。菌株 SD-59 从 12 h 开始大量利用柠檬酸。当培养时间达到 60 h 时，柠檬汁中柠檬酸的质量浓度降低至 1.31 g/L，此时柠檬酸的利用率高达 95.9%。当酵母用于果汁的降酸时，较高的柠檬酸一般会对菌种生长造成胁迫[20]。目前，关于在 20 g/L 的柠檬酸质量浓度下仍能够发挥降酸作用的降酸菌株鲜有报道，而酵母 SD-59 在柠檬酸质量浓度为 32.15 g/L 的柠檬汁中仍能发挥降酸作用，说明其对高柠檬酸质量浓度有较高耐受力。此外，蔗糖作为二糖却未能被菌株 SD-59 利用，这可能是因为蔗糖不能被直接利用，必须通过分解成葡萄糖和果糖而被利用[21]。这些结果进一步证实了酵母 SD-59 对柠檬酸和苹果酸的利用能力，有望在低糖高酸环境中发挥其降酸能力。

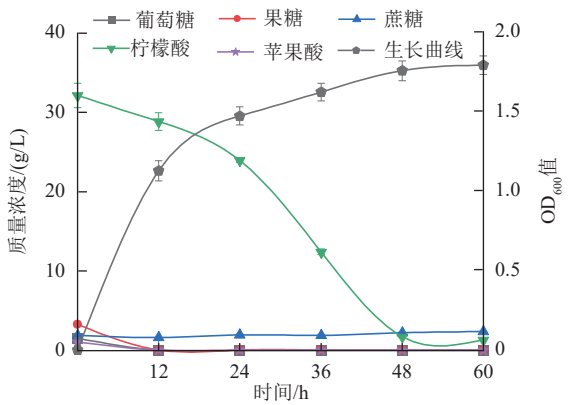


图 8 柠檬汁中菌株 SD-59 对不同碳源的利用情况

Fig. 8 Utilization of different carbon sources by the yeast strain SD-59 in lemon juice

3 结论

果汁酸度过高、糖酸比例不协调会影响其口感，不易被消费者接受。而且高酸胁迫会影响酵母、乳酸菌等微生物的生长和发酵性能，从而影响其生物加工过程和产品品质。果汁降酸方法主要包括物理吸附降酸法、化学降酸法和生物降酸法[3]。但是，物理吸附降酸法的降酸效果欠佳，且影响其风味香气成分；化学降酸法不仅影响果汁色泽，还可能导致浑浊、失光等不稳定情况。因此，生物降酸法是现代降酸工艺的研究和发展方向。作者筛选并鉴定了 1 株酵母菌株 *Saturnispora diversa*（SD-59）。现有研究认为该菌为实际无毒性酵母，且在水果采摘后对炭疽病有一定的生物防治作用。作者发现 SD-59 在柠檬汁中不仅具有高效的降酸率，还能产生舒适的风味物质。通过与商业降酸酵母 71B 和商业耐酸酵母 DV10 对比发现，酵母 SD-59 属于三羧酸循环阳性菌，能够在以柠檬酸为唯一碳源的培养基中生长，而商业菌株 71B 和 DV10 则缺乏这种能力。进一步研究了酵母 SD-59 在高质量浓度柠檬酸条件下的性能变化，发现将柠檬酸质量浓度控制在小于 80 g/L 的范围内会有助于酵母 SD-59 发挥其降酸性能。当接种体积分数 1.0% 的菌株 SD-59，并置于 31 ℃、200 r/min 条件下培养 60 h 时，柠檬汁的降酸率达到了 97.9%。通过分析柠檬汁在降酸过程中各种碳源的变化，发现其对苹果酸和柠檬酸的降酸率分别为 100.0% 和 95.9%，并且降酸能力没有受到果汁中其他单糖的影响。酵母 SD-59 不仅降酸效果明显，而且还能够提高果汁的风味复杂性，但是在高糖的环境下可能会优先利用单糖，因此还需进一步研究。

参考文献

[1] 王英，周剑忠，夏秀东，等. *L*-苹果酸降解菌酿酒酵母降酸功能影响因素分析[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(10)：1067-1072.
WANG Y，ZHOU J Z，XIA X D，et al. Analysis the influence factors and optimization the deacidification conditions of the *L*-malic acid degradation capability of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Food Science

and Biotechnology，2018，37(10)：1067-1072.(in Chinese)
[2] 陈思睿，唐琳琳，冯建文，等. 高效降解柠檬酸酵母菌的筛选鉴定及其在红树莓果汁中降酸特性[J]. 食品科学，2020，41(22)：133-139.
CHEN S R，TANG L L，FENG J W，et al. Isolation and identification of yeast capable of efficiently degrading citric acid and its acid degradation characteristics in red raspberry juice[J]. Food Science，2020，41(22)：133-139.(in Chinese)
[3] 曹颖，耿瑶，韩乃瑄，等. 果酒中的有机酸及降酸策略研究[J]. 食品工业科技，2023，44(14)：457-464.
CAO Y，GENG Y，HAN N X，et al. Research on organic acids in fruit wine and acid reduction strategies[J]. Science and Technology of Food Industry，2023，44(14)：457-464.(in Chinese)
[4] 梁敏，包怡红，徐福成. 蓝靛果酒化学降酸工艺及对花色苷组成的影响[J]. 现代食品科技，2018，34(10)：188-195.
LIANG M，BAO Y H，XU F C. Chemical deacidification technology of blue honeysuckle wine and its effect on anthocyanin composition[J]. Modern Food Science and Technology，2018，34(10)：188-195.(in Chinese)
[5] 李铁柱. 不同降酸方法对五味子汁降酸效应的研究[D]. 长春：吉林农业大学，2014.
[6] 林巧. 樱桃酒化学降酸效应研究[J]. 中国酿造，2010，29(12)：48-53.
LIN Q. Deacidifacation of Kirschwasser by chemical method[J]. China Brewing，2010，29(12)：48-53.(in Chinese)
[7] CHEN Y R，YANG Y L，CAI W Q，et al. Research progress of anti-environmental factor stress mechanism and anti-stress tolerance way of *Saccharomyces cerevisiae* during the brewing process[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2023，63(33)：12308-12323.
[8] RIBEREAU-GAYON P，DUBOURDIEU D，DONECHE B，et al. Handbook of enology：the microbiology of wine and vinifications[M]. 2nd ed. England：John Wiley & Sons，Ltd.，2006.
[9] PARAMITHIOTIS S，STASINOU V，TZAMOURANI A，et al. Malolactic fermentation：theoretical advances and practical considerations[J]. Fermentation，2022，8(10)：521.
[10] ZHONG W，CHEN T，YANG H，et al. Isolation and selection of non-*Saccharomyces* yeasts being capable of degrading citric acid and evaluation its effect on kiwifruit wine fermentation[J]. Fermentation，2020，6(1)：25.
[11] MYLONA A E，FRESNO J M，PALOMERO F，et al. Use of *Schizosaccharomyces* strains for wine fermentation：effect on the wine composition and food safety[J]. International Journal of Food Microbiology，2016，232：63-72.
[12] 周小玲，沈微，饶志明，等. 一种快速提取真菌染色体DNA的方法[J]. 微生物学通报，2004，31(4)：89-92.
ZHOU X L，SHEN W，RAO Z M，et al. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA[J]. Microbiology China，2004，31(4)：89-92.(in Chinese)
[13] 郭璐楠. 面团冻藏过程中酵母稳定性变化及其对面团品质的影响[D]. 无锡：江南大学，2021.
[14] LIU C F，LI M X，REN T，et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains on alcoholic fermentation behavior and aroma profile of yellow-fleshed peach wine[J]. LWT-Food Science and Technology，2022，155：112993.
[15] 黎春华. 生防酵母对香蕉采后炭疽病的生物防治及其机理研究[D]. 福州：福州大学，2020.
[16] ZHAO Y，SUN Q Y，TIAN B，et al. Evaluation of four indigenous non-*Saccharomyces* yeasts isolated from the Shangri-La wine region (china) for their fermentation performances and aroma compositions in synthetic grape juice fermentation[J]. Journal of Fungi，2022，8(2)：146.
[17] MORERA G，OVALLE S D，GONZÁLEZ-POMBO P. Prospection of indigenous yeasts from Uruguayan Tannat vineyards for oenological applications[J]. International Microbiology，2022，25(4)：733-744.
[18] REDZEPOVIC S，ORLIC S，MAJDAK A，et al. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology，2003，83(1)：49-61.
[19] 屠梦婷，陈琦，朱婉姣，等. 两种果酒酵母对杨梅果酒及风味的影响[J]. 食品研究与开发，2019，40(2)：91-97.
TU M T，CHEN Q，ZHU W J，et al. Studies on the effect of two different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the quality of bayberry wine[J]. Food Research and Development，2019，40(2)：91-97.(in Chinese)
[20] 王金玲，晏雨辰，李巧月，等. 生物降解柠檬酸及其影响因素的研究进展[J]. 现代食品科技，2022，38(2)：347-357.
WANG J L，YAN Y C，LI Q Y，et al. Research progress of biodegradable citric acid and its influencing factors[J]. Modern Food Science and Technology，2022，38(2)：347-357.(in Chinese)
[21] YANG H，SUN J Y，TIAN T T，et al. Physicochemical characterization and quality of Dangshan pear wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Food Biochemistry，2019，43(8)：e12891.

（责任编辑：周玥）