

降解山楂汁中柠檬酸酵母菌的筛选及其降酸特性研究

赵玉平^{1,2} 杜连祥^{1*} 刘丽丽¹ 王恩悦¹

(¹天津科技大学食品科学与生物工程学院 天津 300222)

(²山西师范大学生命科学学院 临汾 041004)

摘 要 采用酸碱滴定法和高效液相色谱法对山楂汁中主要有机酸进行分析,结果表明柠檬酸占总酸的 83.5%,分别以柠檬酸和山楂黄酮为唯一碳源,筛选能降解柠檬酸而不利用山楂黄酮的酵母菌,结果获得 6 株菌,再以山楂汁为培养基进行复筛,得到一株酵母菌,该菌能有效降解山楂汁中柠檬酸而对山楂黄酮的影响较小,经鉴定这株菌属于毕赤酵母属,定名为 *Pichia* sp. Y1。发酵特性研究表明该菌在山楂汁中 20℃ 培养 3d,总酸量从 19.60g/L 下降到 3.52g/L,而对黄酮含量无显著影响。

关键词 山楂汁,柠檬酸,黄酮,酵母菌,筛选,生物降解

中图分类号:Q93-3 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)02-0235-05

山楂果黄酮是山楂果中主要生物活性物质^[1],它具有可增加人体冠脉血液流量、降压、强心、抗心律失常、降血脂、增强机体免疫力等作用;同时有增加胃液分泌,促进消化的功能^[2,3]。但是由于山楂果中有机酸含量过多^[4],限制了山楂的利用。因此有效降低山楂汁的总酸含量,提高 pH,保留黄酮,且形成良好风味,成为山楂汁研究的重点。

山楂汁采用稀释降酸,其所配制饮料不但口感差,而且降低保健效果,采用阴离子交换树脂、碳酸钙沉淀、碱中和、电渗析等物理和化学方法降酸,均难以达到山楂汁总酸、黄酮和口感的均佳的效果。厌氧发酵降酸^[5],如葡萄酒生产中利用酒明串珠菌(*Leuconostoc oenos*)降低苹果酸产生乳酸和 CO₂,但几乎不利用柠檬酸;肠膜明串珠菌乳脂亚种(*Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*)在有可发酵的碳水化合物时能分解柠檬酸,生成乙酸、CO₂ 和双乙酰^[5],但由于山楂汁中柠檬酸含量在 15g/L ~ 20g/L,产生的双乙酰足以产生不良的风味,因此本文未采用厌氧发酵降酸。

本文首次对在有氧条件下降解山楂汁中有机酸,并能保留其中黄酮的酵母菌筛选,并对该株菌的发酵特性进行了研究,为山楂汁和其它含酸高的水果降酸以及微生物资源的开发利用提供一条新途径。

1 材料和方法

1.1 菌种的筛选

1.1.1 样品采集 山西省临汾市汾河制药厂柠檬酸

生产污水 2 份和废渣 2 份;山楂果样品 2 份;柠檬样品 2 份;菠萝样品 2 份;葡萄样品 2 份。

1.1.2 培养基 (1)富集培养基^[6] (2)固体分离培养基^[7] (3)山楂汁:山楂果实按 1:1 加水,煮沸 5 ~ 8min,打浆,冷却至 40℃ ~ 50℃,加 6U/mL ~ 10U/mL 的果胶酶,混匀,保温 4h ~ 6h,离心得山楂汁,各取一定量分装于三角瓶,115℃ 湿热灭菌 15min。(4)山楂黄酮培养基:该培养基是以山楂黄酮代替分离培养基中的柠檬酸制成的以山楂黄酮为唯一碳源的碳源同化培养基。山楂黄酮制备:取 1L 山楂汁经过 NKA-9 树脂吸附,用水去离子水洗涤,再用 95% 的乙醇洗脱,洗脱液经浓缩、干燥,得到山楂黄酮。(5)鉴定培养基^[8]:YEPD 培养基,麦芽汁液体培养基,酵母孢子培养基,发酵基本培养基,酵母氮基培养基,酵母碳基培养基,无维生素酵母基础培养基等。

1.1.3 筛选方法 (1)样品预处理:称取 2g 固体样品于 250mL 摇瓶中,加数粒玻璃珠,每瓶中分别加入 100mL 生理盐水,室温 150r/min 振荡 20min,取出静置 20min,污水样直接静置 20min,得上清液。(2)菌种分离:取预处理的上清液 5mL,接入装有 100mL 富集培养基的 250mL 三角瓶中,20℃ 150r/min 振荡培养 24h。以同样条件在富集培养基中连续转接培养 5 次,菌液适当稀释后涂布于分离培养基平板上,20℃ 培养 4d,获得单菌落,纯化,根据菌体形态和菌落生长速度对菌株归类和编号。(3)酵母菌降解柠檬酸能力的筛选试验:将分离到的酵母菌分别用装有 100mL 富集培养基的 250mL 三角瓶,20℃

* 通讯作者。Tel:86-22-28193580

作者简介:赵玉平(1964 -)男,山西省运城市人,天津科技大学博士研究生,发酵食品专业。E-mail:water15689@163.com。

收稿日期:2003-06-20,修回日期:2003-10-22

150r/min培养 5d ,根据降酸量进行筛选 ,以获得降解柠檬酸速度快的酵母菌。(4)酵母菌降解山楂黄酮能力的筛选试验 :在含有山楂黄酮培养基的试管中 ,分别接种经活化的降解柠檬酸速度快的菌株 ,20℃培养 21d ,观察每支试管中菌体生长情况 ,与不加任何碳源的培养基进行比较(不加碳源的培养基的生长状况确定为阴性) ,以获得不生长或生长弱的酵母菌。(5)山楂汁中降解柠檬酸能力筛选试验 :将以上筛选得到的菌株接种到山楂汁中 ,20℃、150r/min 培养 5d ,间隔 12h 取样 ,测定总酸和黄酮。

1.2 菌种鉴定

按文献[6 8]方法进行。

1.3 菌种发酵特性研究实验

1.3.1 种子培养 :接种一环斜面菌种于盛有 60 mL 山楂汁的 250 mL 三角瓶中 ,20℃、150r/min 培养 24h 得一级种子液 ,按 10% 接种量转接一级种子液于盛有 100mL 山楂汁的 500mL 三角瓶中 ,20℃、150r/min 培养 24h 得二级种子液。

1.3.2 发酵罐培养 :转接 300mL 二级种子液于盛有 3L 山楂汁的容积 5L 的发酵罐中 ,20℃、DO 25% ~ 35% 条件下培养 84h。定期取样测定发酵不同时间

的山楂汁中有机酸种类、总酸、pH、黄酮含量、还原糖。

1.4 分析方法

总酸测定(以柠檬酸计) ,有机酸分析(HPLC 法) ,采用文献[9]的方法 ;黄酮测定 ,采用文献[10]的方法 ;还原糖测定 ,采用文献[11]的方法 ;pH 测定 ,采用 pH 计。

2 结果

2.1 筛选培养基中碳源和 pH 的确定

采用 HPLC 和酸碱滴定法对山楂汁中总酸和各有机酸含量进行了分析(表 1)。由表 1 可知 ,山楂汁中的柠檬酸占总酸的 83.5% ,表明山楂汁中主要的有机酸是柠檬酸。柠檬酸含量的降低将使山楂汁总酸含量就降低 ,因此富集培养基中碳源确定为柠檬酸。由于山楂汁中总酸为 19.6g/L ,为了选择耐酸酵母菌 ,确定富集培养基中柠檬酸含量为 20g/L。由于山楂汁的 pH 值为 2.95 ,因此筛选的菌株也应耐受 pH 值小于或等于 2.95 ,而配制的富集培养基的 pH 为 2.5 ,所以没有对富集培养基的 pH 值进行调整。

表 1 山楂汁中各种有机酸含量

Composition	Citric acid	Oxalic acid	Tartaric acid	Acetic acid	Malic acid	Lactic acid	Titration acidity
Content(g/L)	16.37	0.425	0.832	0.055	1.446	0.524	19.6

2.2 菌种的筛选

2.2.1 降解柠檬酸酵母菌的筛选 :用富集培养基对采集的 12 个样品进行富集 ,再以分离培养基分离和纯化 ,得到 36 株酵母菌能降解柠檬酸。

2.2.2 降解柠檬酸速度高的酵母菌的筛选 :将 36 株菌分别接种到装有富集培养基中培养 5d ,测定总酸含量 ,结果有 13 株菌降酸速度高 ,由 20g/L 降到 3.5g/L。

2.2.3 降解黄酮能力弱的酵母菌筛选 :将筛选出的 13 株酵母菌分别用山楂黄酮培养基进行培养 ,结果只有 3 号、7 号、15 号、18 号、24 号、29 号 6 株酵母菌在 2 周内没有明显生长 ,说明 13 株菌降解山楂黄酮的能力不同 ,降解山楂黄酮能力弱的 6 菌株是候选菌株 ,将进一步筛选。

2.2.4 酵母菌在山楂汁中的复筛 :将所筛选 6 株酵母菌分别接入山楂汁(总酸含量 19.6g/L ,黄酮含量 9.23g/L)培养 5d。测定经过各菌株发酵的山楂汁 ,结果(表 2)表明菌株之间对山楂黄酮含量的影响不

明显 ,都在 7.3 ~ 7.5g/L 之间 ,而对山楂汁中总酸含量的影响差异显著。由表 2 可知 ,从总酸的变化看 ,3 号、15 号两株菌都将总酸降到 3.5g/L ;风味评价显示 15 号菌株优于其它菌株 ,所以认定 15 号菌株是所筛选的最理想的菌株。

表 2 发酵过程中山楂汁总酸含量变化

Strain No.	Content of total acids(g/L)					
	0d	1d	2d	3d	4d	5d
3	19.6	18.7	15.7	11.3	7.4	3.5
7	19.6	19.5	19.2	18.5	17.45	16.4
15	19.6	18.3	16.0	11.6	7.55	3.5
18	19.6	19.5	18.4	17.7	17.3	16.9
24	19.6	19.3	19.2	18.7	17.4	16.1
29	19.6	19.4	19.2	17.3	16.45	15.6

2.3 菌种鉴定

参照 The Yeasts , A Taxonomic Study 对 15 号菌株进行鉴定。

2.3.1 形态与培养特征 :在 10 °Brix 的麦芽汁液体培养基中 20℃ 培养 2d ,显微镜观察 ,细胞从椭圆形到腊肠形 (2.0 ~ 4.6) μm × (3.5 ~ 11.0) μm ,多边芽殖 ,形成假菌丝 ,有醭形成 ;在 10 °Brix 的麦芽汁固体培养基上 20℃ 培养 3d 的菌落特征 :白色 ,粘质菌落 ,很薄 ,表面光滑 ,平坦 ,边缘不整齐。在酵母产孢子培养基中 20℃ 培养 5d ,显微镜观察 :子囊孢子球形 ,表面光滑 ,每个子囊有 1 ~ 4 个孢子 ,没有观察到子囊孢子释放。

2.3.2 生理生化特征 :第 15 号菌株能发酵葡萄糖、半乳糖、蔗糖与棉子糖 ,不发酵海藻糖、乳糖、麦芽糖 ,能同化葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨糖、纤维二糖、棉子糖、海藻糖、菊粉、乙醇、甘油、D-甘露醇、 α -甲基-葡萄糖苷、水杨苷、琥珀酸、柠檬酸 ;不同化所测的其他碳源 ,如乳糖、蜜二糖、松三糖、可溶性淀粉、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯糖、D-核糖、L-鼠李糖、赤藓醇、核糖醇、半乳糖醇、甲醇、D-葡萄糖酸、DL-乳酸、肌醇。氮源同化实验 :不同化 KNO_3 。在无维生素培养基上不生长。脲酶测试阴性 ,类淀粉化合物的形成测定阴性。37℃ 生长实验 :能在 37℃ 生长。上述形态与生理生化特征试验结果均为毕赤酵母属的特征 ,初步确定 15 号株菌属毕赤酵母属 ,定名为 *Pichia* sp. Y1。

2.4 *Pichia* sp. Y1 降酸特性的研究

2.4.1 降酸过程中山楂汁总酸、柠檬酸和 pH 的变化 :发酵所使用的山楂汁的总酸含量为 19.6g/L ,柠檬酸为 16.37g/L ,pH 值为 2.95。按 1.3 的方法发酵山楂汁 ,测定发酵过程中不同时间所取样品中总酸、柠檬酸和 pH 值(图 1)。发酵前期总酸和柠檬酸下降较慢 ,而在 12h 到 72h 之间降酸较快。发酵使总酸从 19.60g/L 下降到 3.52g/L ,下降了 82.04% ,柠檬酸由 16.37g/L 降解为零。将发酵在 12h 到 72h 之

间的山楂汁总酸和柠檬酸含量进行线性回归和计算 ,总酸降解速度为 0.223g/L/h ,柠檬酸降解速度为 0.227g/L/h ,山楂汁总酸降解速度与柠檬酸降解速度无显著差异 ,说明 *Pichia* sp. Y1 降解的有机酸是柠檬酸。发酵使山楂汁中有机酸含量的降低 ,同时 pH 值从 2.95 上升至 3.55 ,由此表明山楂汁是一个缓冲溶液体系 ,随着山楂汁中总酸含量的降低 ,发酵体系中电离出的 H^+ 离子浓度减少 ,但没有体系中总酸降低显著 ,这也是果汁类的一个特点。

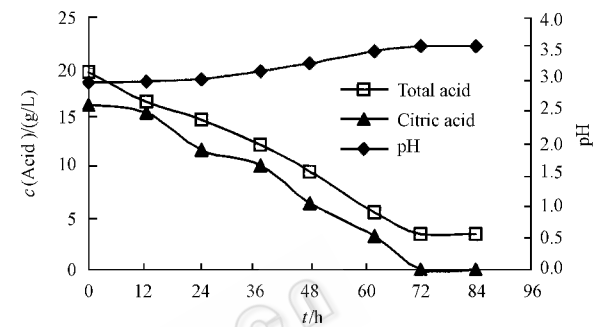


图 1 发酵过程中总酸、柠檬酸和 pH 变化

Fig.1 Variation of total acid and citric acid and pH in the fermentation

2.4.2 发酵过程中山楂汁中的有机酸种类的变化 :采用 HPLC 测定了山楂汁在发酵罐中发酵过程中各种有机酸的变化(图 2)。由图 2 可以看出 ,6 号色谱峰即柠檬酸色谱峰随着发酵时间的增长而逐渐变小 ,可知 *Pichia* sp. Y1 首先降解山楂汁的柠檬酸 ,经过 72h 发酵 ,柠檬酸全部降解。3 号色谱峰为苹果酸 ,发酵 48h 没有变化 ,发酵 72h 也消失 ,说明 *Pichia* sp. Y1 优先降解柠檬酸 ,柠檬酸降低到一定浓度后开始降解苹果酸。

2.4.3 降酸过程中黄酮含量的变化 :黄酮在降酸过程中的变化曲线见图 3。山楂黄酮在发酵前期降低较快 ,随后变慢。发酵前后黄酮含量由 9.23g/L 降低到 7.86g/L ,下降了 14.8%。这表明发酵使得山楂汁中的黄酮有所降低 ,而通过以山楂黄酮为唯一碳源的碳源同化试验 ,结果表明 *Pichia* sp. Y1 在发酵

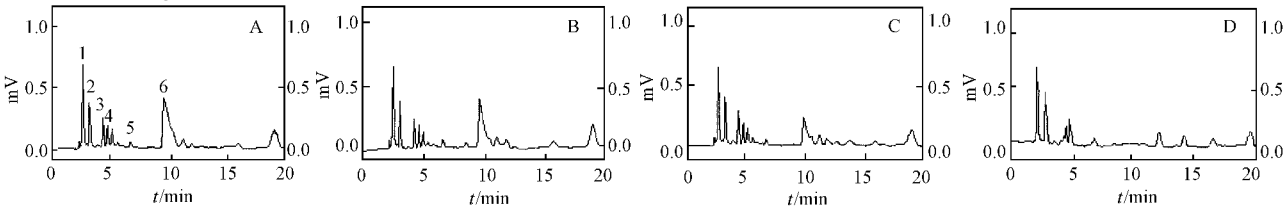


图 2 发酵过程山楂汁中有机酸 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of organic acids obtained from the hawthorn fruit juice during the fermentation process

A. Hawthorn fruit juice ; B. Fermentation for 24h ; C. Fermentation for 48 h ; D. Fermentation for 72h.

1. Oxalic acid ; 2. Tartaric acid ; 3. Malic acid ; 4. Lactic acid ; 5. Acetic acid ; 6. Citric acid.

过程中几乎不利用黄酮,可见山楂黄酮的降低并非 *Pichia* sp. Y1 作为碳源利用而降低,而是由于山楂中有 20 多种黄酮^[7],而其中部分为极易氧化的黄酮^[12,13],因此在好氧发酵过程中黄酮的降低可能是被氧化的结果。

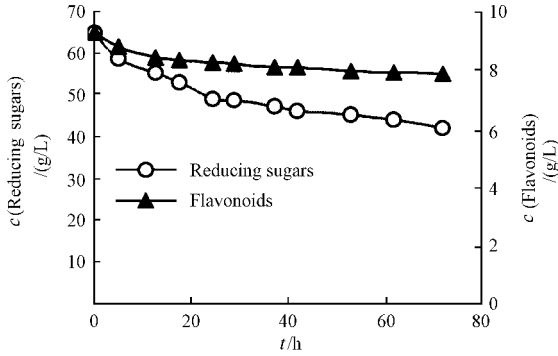


图3 发酵过程中黄酮和还原糖的变化

Fig.3 Variety of flavonoids and reducing sugars in the fermentation

2.4.4 降酸过程中还原糖含量变化 :图 3 显示还原糖含量在发酵前期下降较快,后期下降较慢,说明 *Pichia* sp. Y1 在发酵前期增殖菌体时利用还原糖较多,而在主要的降酸阶段利用还原糖较少。

3 讨论

山楂黄酮实验 :山楂黄酮是山楂果汁中的生物活性物质,降酸的目的就是在含酸量高、含山楂黄酮量也高的山楂汁中降酸而保留黄酮,因此在筛选到降酸酵母菌后,筛选不降解山楂黄酮的酵母菌就显得重要。所以又以山楂黄酮为唯一碳源对能降解柠檬酸的酵母菌进行了筛选。

山楂汁中降酸而保留黄酮菌的筛选 :由于酵母菌利用碳源的复杂性,在还原糖、有机酸、黄酮等多种碳源同时存在的条件下,酵母菌利用碳源的顺序和利用的量方面会有很大的差异,因此对筛选的能利用柠檬酸而不利用山楂黄酮的酵母菌在山楂汁中进行了筛选。

酵母菌生长与还原糖和柠檬酸的消耗 :图 4 显示菌体在生长的延滞期和指数期对还原糖的利用速度明显高于柠檬酸的利用速度,图 1 和图 3 也表明该菌株对还原糖的利用先于柠檬酸,说明该菌株对柠檬酸的利用受到还原糖的阻碍,当还原糖浓度降到一定量后阻碍作用逐步解除。这与 Cassio 等^[14]所得出的结论基本一致。

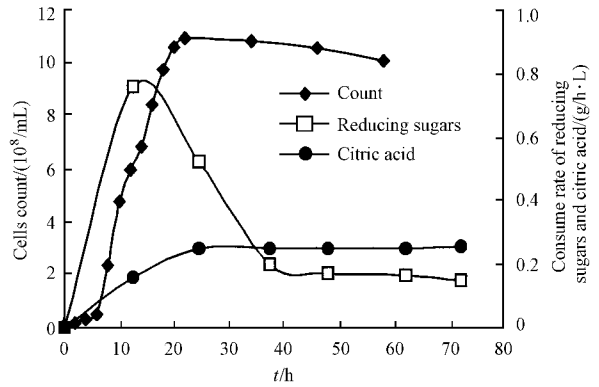


图4 菌株生长曲线与还原糖和柠檬酸的消耗速度

Fig.4 The curve of strain growth and the consume velocity of reducing sugars and citrate acid

参考文献

- [1] Abdelaty A S, Faiza H. Anti-complementary activity of *Crataegus sinaica*. *Planta Med*, 1992, **62**: 10-13.
- [2] Ammon H P T, Handel M. *Crataegus*, toxicology and pharmacology. I. Toxicity. *Plant Medical*, 1981, **43**: 105-120.
- [3] Ammon H P T, Handel M. *Crataegus*, toxicology and pharmacology. II. Pharmacodynamics. *Plant Medical*, 1981 **43**: 209-239.
- [4] Ammon H P T, Handel M. *Crataegus*, toxicology and pharmacology. III. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Plant Medical*, 1981, **43**: 313-322.
- [5] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins company, 1974, 702-708.
- [6] 杜连祥. 工业微生物学试验技术. 天津: 天津科技出版社, 1992 277-284.
- [7] 郑虎占, 董泽宏, 余 靖. 中药现代研究与应用(第一卷). 北京: 学苑出版社, 1997, 597-619.
- [8] Cletus P, Kurtzman J, Fell W. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4th ed. New York: ELSEVIER Amsterdam, 1998, 77-100.
- [9] 大连轻工业学院, 华南理工大学, 等. 食品分析. 北京: 中国轻工出版社, 1995, 130-133.
- [10] Hertog M F L, Hollman P C H, Katan M B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem*, 1993, **41**: 1242-1246.
- [11] 天津轻工业学院, 无锡轻工业学院, 等. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工出版社, 1997, 44-46.
- [12] Bahorun T, Trotin F, Pommery J. Antioxidant activity of *Crataegus momogyna* extracts. *Planta Med*, 1994, **60**: 323-328.
- [13] Rece C A, Evans N J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 1996, **24**: 790-795.
- [14] Cassio F, Leao C. Low- and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(12): 3623-3628.

Screening Yeast Degrading Citric Acid in Hawthorn Fruit Juice and Its Degrading Characteristics

ZHAO Yu-Ping^{1 2} DU Lian-Xiang^{1*} LIU Li-Li¹ WANG En-Yue¹

(¹ School of Food Science and Bio-engineering , Tianjin University of Science & Technology , Tianjin 300222 , China)

(² School of Life Science , Shanxi Teachers' University , Linfen 041004 , China)

Abstract : The objective of the study was to screen yeasts that were capable of degrading organic acids , and maintaining the flavonoids in hawthorn fruit juice. Citric acid , as the main organic acid in the juice , was 83.5% in total acidity by acid-base titration and HPLC. Six strains were obtained , which could degrade the citric acid but not the flavonoids in the media with citric acid or the flavonoids as sole carbon source. The best strain of the six was selected with hawthorn fruit juice as medium. The strain was identified to belong to the genus *Pichia* and was named as *Pichia* sp. Y1. Incubated the *Pichia* sp. Y1 in the juice for 3d , at 20℃ ,DO 34% ~ 40% , the total acids content in the juice decreased from 19.6g/L to 3.52g/L , meanwhile , the change of flavonoids content was not significant.

Key words : Hawthorn fruit juice , Flavonoids , Yeast , Citric acid , Biodegradation , Screening

* Corresponding author. Tel :86-22-28193580 ;E-mail :water15689@163.com

Received date :06-20-2003

科技论文中常见的一些格式

参照《中国科学院自然科学期刊编排格式规范》、国家标准 GB7713 – 87 和《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》等要求 ,对本刊经常遇到的一些格式暂作如下规定 :

正体与斜体

- 1. 物种的学名 :菌株的属、种用拉丁文斜体 ,属的首字母大写 ,其余小写 ;属以上用拉丁文正体。病毒目、科、亚科、属的接受名一律斜体 ,名称的首字母大写 ;种名用斜体 ,第一个词的首字母要大写 ,除专有名词外 ,其它词首字母一律不大写。
- 2. 限制性内切酶 :内切酶前 3 个字母用斜体 ,后面的字母和编码正体平排 ,如 *Bam*H I ,*Hind* III ,*Pst* I ,*Sau*3A I 等。
- 3. 氨基酸和碱基的缩写 :氨基酸缩写用 3 个字母表示时 ,仅第一个字母大写 ,其余为小写 ,全部正体 ;用单字母表示时为大写正体。碱基缩写均为大写正体。
- 4. 质粒和载体 :质粒一律用正体 ,首字母 P 为小写 ,后面字母和数码平排 ,如 pBR322、pGBKT-ipaB 等。

计 量 单 位

计量单位和单位符号以国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。

- 1. 时间 :日(天)用 d ,小时用 h ,分钟用 min ,秒用 s 等 ,单位符号均用英文小写正体。
- 2. 溶液浓度 :溶液浓度用 mol/L 表示 ,而不用 M 或 N。
- 3. 旋转速率 :单位符号为 r/min ,而不用 rpm。
- 4. 生物大分子的分子量 :蛋白质用 kD ,核酸用 bp 或 kb。
- 5. 光密度 :光密度符号用斜体表示 ,如 *OD* ,*OD*₆₀₀ 等。
- 6. 图表中数值的量和单位 :用量与单位的比值表示数值 ,即物理量符号(斜体)与单位(正体)之间用斜线隔开 ,如 t/h(时间 ,单位是小时)。
- 7. 有些数值带的计量单位不能省略 ,如 30cm × 0.5cm 不可写成 30 × 0.5cm。