

生物降解柠檬酸及其影响因素的研究进展

王金玲^{1,2}, 晏雨辰¹, 李巧月¹, 张福舜¹, 李鑫¹, 卢志全³

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040) (3. 黑龙江省宾县农业技术推广中心, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要: 柠檬酸 (citric acid, CA) 是一种天然的有机酸, 在成熟的柠檬、百香果、红树莓等柠檬酸型水果中含量高, 导致此类水果酸感尖锐, 加工产品的适口性、感官品质会受到不同程度的影响。柠檬酸可以被乳酸菌利用生成双乙酰、乙偶姻和丁二醇等香气化合物, 也可以在酵母菌内转化为醇、乙醛酸、琥珀酸等多种代谢产物。不同的柠檬酸降解途径赋予柠檬酸型水果加工产品的品质和风味有显著差异。该研究详细地阐述了乳酸菌、酵母菌生物降解柠檬酸的途径及主要代谢产物, 分析了 pH、碳源两种因素对生物降解柠檬酸的影响及生物降解柠檬酸在果汁、果酒等加工中的应用, 指出了限制乳酸菌和酵母菌用于生物降解柠檬酸的条件, 旨在为柠檬酸降解的研究及应用提供理论依据和技术参考。

关键词: 柠檬酸; 乳酸菌; 酵母菌; 脱酸; 代谢途径; 因素

文章编号: 1673-9078(2022)02-347-357

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0575

Research Progress of Biodegradable Citric Acid and Its Influencing Factors

WANG Jinling^{1,2}, YAN Yuchen¹, LI Qiaoyue¹, ZHANG Fushun¹, LI Xin¹, LU Zhiquan³

(1. College of Forestry, Northeast Forest University, Harbin 150040, China)

(2. Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Harbin 150040, China)

(3. Agricultural Technology Extension Center of Binxian, Harbin 150001, China)

Abstract: Citric acid (CA) is a kind of natural organic acid, which has a high content in mature citric acid fruits such as lemon, passion fruit and red raspberry, resulting in sharp acidity of such fruits, and the palatability and sensory quality of processed products will be affected to varying degrees. Citric acid can be used by lactic acid bacteria to produce aromatic compounds such as diacetyl, acetoin and butanediol, and can also be transformed into multiple metabolites such as alcohol, acetaldehyde acid and succinic acid in yeast. The quality of citric acid type fruit processing products and flavor brought by different degradation pathways of citric acid have significant differences. In this paper, the pathways and metabolites of citric acid biodegradation by lactic acid bacteria and yeast were described in detail. The effects of pH and carbon source on citric acid biodegradation and the application of citric acid biodegradation in the processing of fruit juice and fruit wine were analyzed. The conditions limiting the use of lactic acid bacteria and yeast in citric acid biodegradation were pointed out, so as to provide theoretical basis and technical reference for the research and application of citric acid biodegradation.

Key words: citric acid; lactic acid bacteria; yeast; deacidification; metabolic pathway; factor

引文格式:

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, +312

WANG Jinling, YAN Yuchen, LI Qiaoyue, et al. Research progress of biodegradable citric acid and its influencing factors [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 347-357, +312

柠檬酸 (citric acid), 化学名为 2-羟基丙烷-1,2,3-三羧酸, 分子式为 $C_6H_8O_7$, 是三羧酸循环

收稿日期: 2021-05-29

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (2572018BA07); 东北林业大学大学生创新项目 (202010225138)

作者简介: 王金玲 (1975-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物活性物质的研究, E-mail: wangjinling08@163.com

(Tricarboxylic acid cycle, TCA) 重要的代谢中间产物, 其结构如图 1 所示。以柠檬酸为成熟果实中含量最高的有机酸的水果属于柠檬酸优势型^[1], 也可称为柠檬酸型水果; 如柠檬、红树莓、百香果、蓝靛果、杨梅、猕猴桃等。由于果实中柠檬酸含量较高, 用这些原料加工的果汁、果酒会出现口感酸涩、适口性差等问题, 要进行一定程度的降酸处理。果酒常用的降

酸方法分为物理降酸、化学降酸和生物降酸^[2]。化学降酸和物理降酸有一定的局限性,会产生酒体不稳定、苦涩味及风味物质、有益成分的损失和颜色的吸附等影响^[3]。生物降酸是利用微生物的生长代谢分解有机酸,与物理降酸和化学降酸相比具有条件绿色、反应温和、食用安全性高等优点^[4]。

目前生物降酸常用的降酸菌株主要对苹果酸发挥作用,常采用苹果酸-乳酸发酵(malo-lactic fermentation, MLF)和苹果酸-乙醇发酵(malo-alcohol fermentation, MAF)。

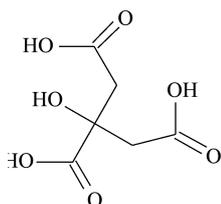


图1 柠檬酸的分子结构

Fig.1 Chemical structure of citric acid

MLF(图2)是指酒精发酵结束后进行的将L-苹果酸转化为L-乳酸的第二次发酵过程^[5]。在苹果酸-乳酸发酵期间,乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)降解柠檬酸产生乙酸导致挥发酸成分增加^[6]。葡萄酒中适量的乙酸(200~700 mg/L)可以通过乙酰辅酶A(Ac-CoA)形成水果乙酸酯改善酒的香气,但超过700 mg/L会导致醋酸异味^[7]。另外,乳酸菌的柠檬酸代谢有助于葡萄酒形成重要的羰基风味化合物即双乙酰、乙偶姻和2,3-丁二醇,根据其浓度对葡萄酒质量和香气产生正或负影响,1~4 mg/L的双乙酰浓度有助于产生理想的葡萄酒香气,超过5 mg/L则会掩盖水果或植物原本的香气^[8]。乙偶姻在葡萄酒中含量超过150 mg/L阈值时,感官上具有黄油或奶油味^[9];2,3-丁二醇的浓度超过600 mg/L阈值时,葡萄酒略有苦味^[10],故苹果酸-乳酸发酵降酸往往需要严格控制。

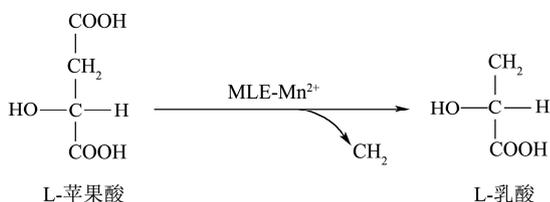


图2 苹果酸-乳酸发酵的转化途径

Fig.2 Transformation of MLF

MAF(图3)属于酵母菌降酸途径,利用酵母菌将苹果酸分解为乙醇和CO₂,从而降低酒的酸度,典型的有粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*, *S. pombe*),该方法能实现发酵的同时降酸。基于以上两种途径的生物降酸技术对于柠檬酸型水果的降酸效果不佳^[11,12],柠檬酸型水果深加工中酸度过高问题仍

是食品加工行业亟待解决的难题之一,因此生物降解柠檬酸逐渐成为降酸研究的新突破点。

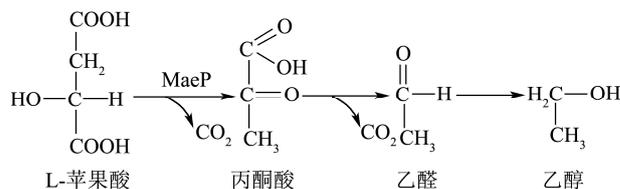


图3 苹果酸-乙醇发酵的转化途径

Fig.3 Transformation of MAF

乳酸菌有降解柠檬酸的潜力,乳制品乳酸菌和葡萄酒乳酸菌的降酸机制研究比较深入。最近,胡丽云等^[13]从青梅中筛选出一株能高效降解柠檬酸的乳酸菌,经鉴定为发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*, *L. fermentum*)。一些非酿酒酵母的降酸现象也开始受到关注,有研究发现部分非酿酒酵母可以有效降低果汁、果酒的有机酸含量,增加总酚、花青素的含量,改善产品的感官品质。王冰倩等^[14]筛选鉴定了3株红树莓降酸酵母:发酵毕赤酵母M-1(*Pichia fermentans* M-1, *P. fermentans* M-1)、美极梅奇酵母M-4(*Metschnikowia pul-cherrima* M-4, *M. pul-cherrima* M-4)和近玫红锁掷孢酵母M-5(*Sporidiobolus pararoseus* M-5, *S. pararoseus* M-5),利用*M. pul-cherrima* M-4发酵柠檬酸含量为8775.24 mg/L的红树莓果汁,得到的功能型饮料柠檬酸含量较未发酵红树莓果汁降低了74%,总酚较未发酵红树莓果汁提高了84%,抗氧化活性显著提高。由于非酿酒酵母一般难以完成酒精发酵,故实际应用中常采用非酿酒酵母与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)混合发酵,但混合发酵目前的降酸幅度较小。Zhong等^[15]研究发现毕赤酵母JT-1-3在与商业酿酒酵母菌RV002的联用中具有较高的柠檬酸降解能力和强耐受力,在猕猴桃汁中纯培养,结果表明柠檬酸、苹果酸和酒石酸分别从12.30、3.09和0.61 g/L显著下降至11.00、2.02和0.41 g/L。

我国柠檬、百香果等柠檬酸型水果栽培面积大,产量高,加工产品种类少,利用乳酸菌和酵母菌在此类水果加工中进行生物降解柠檬酸具有广阔的应用前景。本文综述了柠檬酸生物降解菌种及其现有的代谢途径及代谢产物研究、代谢影响因素及应用,以期生物降酸技术在柠檬酸型水果的降酸研究及应用方面提供参考。

1 生物降解柠檬酸的微生物种类

柠檬酸降解相关的代谢活动广泛存在于乳酸菌中,如乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, *L. lactis*)、

明串珠菌属 (*Leuconostoc* spp.)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*, *L. casei*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. rhamnosus*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*, *E. faecium*) 和酒类酒球菌 (*Oenococcus oeni*, *O. oeni*)^[16]、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*, *L. fermentum*) 等^[17]。柠檬酸降解仅出现在具有柠檬酸转运和降解能力的乳酸菌内,这种乳酸菌含有必需的编码柠檬酸转运酶和柠檬酸裂解酶亚基的基因,被称为柠檬酸阳性(*cit*⁺)菌。相对的,缺乏一个或多个这些基因的乳酸菌,被称为柠檬酸阴性(*cit*⁻)菌^[18]。最初大多数涉及柠檬酸降解途径的相关知识来源于乳制品中的乳酸菌,一个多世纪前,在奶油成熟过程中研究人员发现了第一批能够降解柠檬酸的产香菌,这批细菌被鉴定为明串珠菌属和乳酸乳球菌亚种双乙酰变种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *L. lactis* biovar. *diacetylactis*)^[19]。葡萄酒乳酸菌在柠檬酸盐的降解方面有着与乳制品乳酸菌相似的代谢途径^[20]。Ramos等^[21]通过¹³C核磁共振技术显示出的*O.oeni*柠檬酸降解途径与乳制品乳酸菌基本相同。Aline等^[22]研究发现了异型发酵的球杆菌 (*Leuconostoc* and *Oenococcus* spp.) 或兼性异型发酵的乳杆菌 (*L. plantarum* and *L. casei*) 通过 MLF 降解葡萄酒中的柠檬酸: 酒中柠檬酸初始浓度为 250~300 mg/L, 根据 MLF 速率的差异, 最终浓度在 0~100 mg/L 之间, 并且亚硫酸处理后柠檬酸仍能继续降解至完全消失。除

了乳酸菌,最近研究还发现一些酵母菌具有突出的柠檬酸降解能力,主要有非酿酒酵母伊萨酵母属 (*Issatchenkia* sp.) 和毕赤酵母属 (*Pichia* spp.), 以及假丝酵母属 (*Candida* sp.) 的一些菌株^[23]。

2 生物降解柠檬酸途径和形成的代谢产物

2.1 乳酸菌

乳酸菌是典型的兼性厌氧菌,由于厌氧菌的 TCA 循环是不完整的,一般情况下不能通过 TCA 循环降解柠檬酸,而是形成了一种独特的途径^[25],主要包括柠檬酸的转运、裂解和丙酮酸代谢(见图4)。编码柠檬酸转运和降解基因的组成有三种类型, *L. lactis* biovar *diacetylactis* 原型菌株 CRL264 中由位于乙酰乳酸合成酶基因 *als* 旁的染色体 *cit* 簇 *citM-I-CDEFXG* 和一个编码柠檬酸渗透酶 (citrate permease, CitP) 的 8.5 kb 质粒组成; *L. lactis* biovar *diacetylactis* Bpl1 和 KF67 与前者不同在于其染色体 *cit* 簇 *citM-I-CDEFXG* 位于脂磷壁酸合成酶基因 *ltaS* 旁; *L. lactis* biovar *diacetylactis* GL2 的柠檬酸降解相关基因编码在一个大的 23 kb 质粒中^[26]。缺乏草酰乙酸盐脱羧酶的乳酸菌在严格的通气条件下,通过 TCA 循环的一部分将 OAA 进一步由苹果酸脱氢酶、富马酸酶和富马酸还原酶转化为琥珀酸^[25]。Ramos等^[21]利用¹³C的核磁共振光谱学研究了*O.oeni*非生长细胞的柠檬酸降解途径,发现大约有10%的柠檬酸转化为天冬氨酸保留在细胞内,在此基础上还能生成以天冬氨酸前体合成的亮氨酸、缬氨酸、天冬酰胺等必需氨基酸。

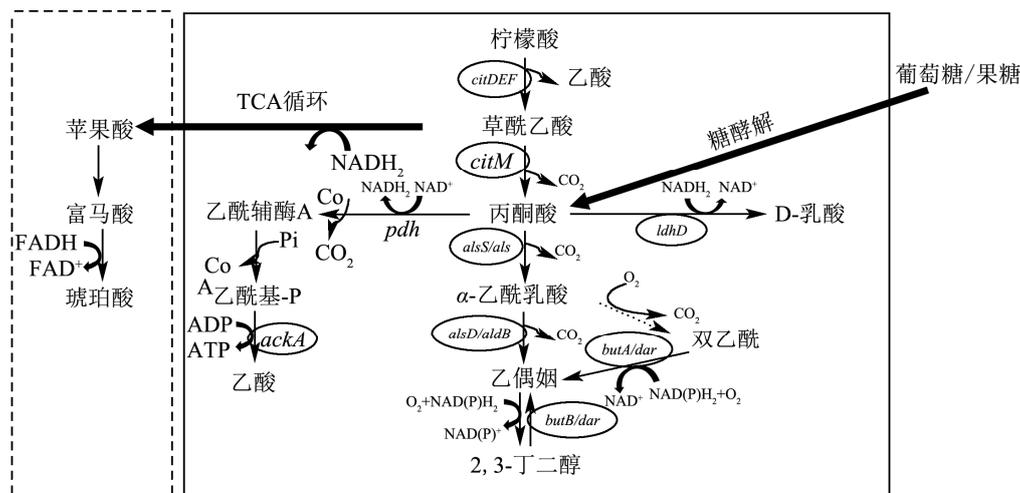


图4 乳酸菌柠檬酸代谢途径^[24]

Fig.4 Citrate metabolic pathway of lactic acid bacteria^[24]

注: 参与柠檬酸代谢的基因以及其对应编码的酶: *citDEF*: 柠檬酸裂解酶; *citM*: 柠檬酸脱氢酶; *ldhD*: D-乳酸脱氢酶; *pdh*: 丙酮酸脱氢酶; *alsS/als*: α -乙酰脱氢酶; *alsD/aldB*: α -乙酰脱羧酶; *butA/dar*: 二乙酰/乙酰酶还原酶。实线方框中表示在厌氧条件下柠檬酸降解途径, 虚线方框中表示有氧条件下不完整的三羧酸循环。

2.1.1 柠檬酸的转运

柠檬酸转运是限制柠檬酸降解的关键步骤,需要各种相关的膜渗透酶做载体,比如柠檬酸渗透酶(citrate permease, CitP)或苹果酸渗透酶(malate permease, MaeP)。大多数乳酸菌例如 *Lactococcus lactis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*L. plantarum* 通过 CitP 实现柠檬酸的转运^[2]。Oscar 等通过量化 pH、柠檬酸含量分别对 *L. lactis* biovar *diacetylactis* 内质粒拷贝数、*citP* 转录水平、*citP* mRNA 加工、柠檬酸盐利用能力四个方面变化的贡献程度,构建了该菌株柠檬酸利用情况调控模型;培养基中提供了柠檬酸和乳糖,结果表明,低 pH 和柠檬酸都能诱导 *citP* 基因加倍表达且柠檬酸的诱导效果更好, *citP* 基因表达从最低达最高的同时,柠檬酸利用率大约从每分钟每克原料干重中利用 1 μmol 提高到 65 μmol ^[27]。根据不同的环境条件, CitP 转运柠檬酸的方式随之变化。柠檬酸作为乳酸菌的唯一能量来源时,除了 CitP 催化二价柠檬酸盐离子和质子的同向运输,还可以进行单价柠檬酸盐离子的单端口运输。Pudlik 等^[28]在 CitP 的动力学研究的基础上完善了柠檬酸的运输方式,结果显示细胞内存在单价乳酸根离子(monovalent lactate, lactate⁻)、或者中间产物 α -乙酰乳酸、丙酮酸、终产物乙酸时, CitP 催化二价柠檬酸盐离子(divalent citrate, CitH²⁺)与上述四种底物对向运输;而四种底物均不存在时,二价柠檬酸盐离子和质子通过缓慢的同向运输进入细胞。还有一部分乳酸菌例如 *O. oeni* 通过苹果酸渗透酶 MaeP 转运柠檬酸。这两种渗透酶都属于 2-羟基羧酸盐(2-hydroxycarboxylate, 2-HCT)转运蛋白,分别由 *citP* 和 *maeP* 基因编码。与其他乳酸菌相反,柠檬酸盐和低 pH 都不能诱导 *O. oeni* 中 *maeP* 的转录^[29],这种转运体的作用机制需要进一步阐明。

CitP 是目前在 *Lactococcus lactis* 中发现的柠檬酸唯一的转运体,但最近研究发现可能存在其他的转运体系。Delphine 等^[30]测定了 16 种不同菌株包括环境菌株和 *L. lactis* biovar. *diacetylactis* 驯化菌株 30 °C 下培养 24 h 后培养基中的柠檬酸含量,发现 UCMA5716 (*cit(M-G)*⁺, *citP*) 是其中唯一能够代谢少量柠檬酸的环境菌株,但代谢速率仅是驯化菌株 LD61 (*cit(M-G)*⁺, *citP*⁺) 的十分之一,推测该菌株中可能有其他的柠檬酸转运系统。*L. lactis* biovar. *diacetylactis* 菌株 M20、TIFN2、TIFN4 和 KF67 的 *cit* 基因簇中存在编码一种 CitO 转运蛋白的全长拷贝,这种假定的转运蛋白与 *O. oeni* 及其他相关细菌中苹果酸乳酸酶相关的苹果酸转运体有高度的氨基酸相似性^[26]。许多研究表明苹果酸存在时,柠檬酸的降解会受到抑制直至

苹果酸消耗尽。出现这种降解先后顺序的原因尚不明确,存在几种猜测有待证实。柠檬酸和苹果酸互相作为苹果酸乳酸酶活性位点的竞争性抑制剂^[31-32],从转运的角度推测,苹果酸渗透酶 MaeP 作为两种酸共同的转运体,由于该酶以苹果酸为底物的 K_m 值很高,在两种酸都存在的情况下可能优先转运苹果酸;除此之外,苹果酸还可能抑制柠檬酸渗透酶 CitP 或柠檬酸裂解酶的合成^[33]。Palles 等^[34]观察到在含柠檬酸和半乳糖的培养基上预生长的 *L. plantarum* 1919 和 *L. casei* ATCC393 的柠檬酸降解量比不含柠檬酸预生长时分别增加了 6 和 22 倍,推测是培养基中加入的柠檬酸诱导产生了更多的柠檬酸裂解酶引起的。由此可见,在含有柠檬酸的培养基上预生长诱导相关酶的合成可以用于应对苹果酸的抑制作用,显著提高菌株的柠檬酸降解能力,但对不同菌株发挥的效果不同。另外,一些肠球菌和乳杆菌的柠檬酸转运蛋白来自柠檬酸盐-金属同源物(CitMHS)家族^[35],以柠檬酸和 Ca²⁺、Mn²⁺、Fe³⁺复合物形式运输。

2.1.2 柠檬酸转化为丙酮酸进而产生香气化合物

运输到细胞内的柠檬酸被柠檬酸裂解酶转化为乙酸和草酰乙酸(oxaloacetate, OAA), OAA 在草酰乙酸脱羧酶的作用下,进一步转化为代谢中间体丙酮酸,脱羧反应消耗质子形成了柠檬酸跨膜运输的质子动力(protonmotive force, PMF)^[36,37]。柠檬酸裂解酶由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成,分别由 *citD*、*citE* 和 *citF* 基因编码^[38]。

乳酸和乙酸是乳酸菌降解柠檬酸产生的主要代谢物(如图 4)。由于条件不同,乳酸菌的代谢产物也随之改变,与丙酮酸代谢途径的差异和外源电子受体的使用有关^[39]。 α -乙酰乳酸合成酶可以消耗丙酮酸生成 α -乙酰乳酸,其中大部分产物经 α -乙酰乳酸脱羧酶脱羧形成乙偶姻,少部分经过非酶反应的氧化脱羧形成双乙酰,这两种产物是赋予乳制品奶油风味的香气化合物^[28],其他途径的代谢产物主要有 D-乳酸、乙酸、2,3-丁二醇和乙醇^[40]。乙醇影响 *O. oeni* 柠檬酸代谢的代谢活性和代谢通量。Olguin 的研究证实 MLF 期间乙醇在低 pH 下诱导了参与柠檬酸降解的基因的转录反应,乙醇不存在的条件下, *O. oeni* PSU-1 柠檬酸降解与 MLF 同时进行;乙醇存在的条件下,柠檬酸降解虽延迟于 MLF,但柠檬酸消耗摩尔数与菌生物量的摩尔比明显增高,并且柠檬酸到乙酸的代谢通量增加^[29]。

乳酸乳球菌的丙酮酸分解代谢途径受到生长条件的影响,比如氧气条件、碳和能源、NADH/NAD⁺的比例、pH 以及辅助因素等^[41]。Cretenet 等的研究表明, N₂ 条件下产生更多的甲酸和乙醇, O₂ 条件下产生更多

的乙酸、2,3-丁二醇和乙偶姻；氧是 α -乙酰乳酸形成双乙酰的关键组成部分，编码丙酮酸脱氢酶、 α -乙酰乳酸合酶和 α -乙酰乳酸脱羧酶 E1 α 亚基的基因在 O_2 存在的条件下过表达，产生更多的双乙酰、乙偶姻、2,3-丁二醇^[42]。NADH/NAD⁺的比例也与 O_2 有关，通气条件下，NADH 氧化增加同时引发同型发酵向混合酸发酵转变，伴随较少的乳酸和较多乙酸、双乙酰、乙偶姻形成^[43]。pH 为 4 时有利于乙偶姻产生，较高 pH 下乳酸、乙酸显著增加。

目前已有许多研究通过涉及几种酶活性的代谢工程的调控或基因工程菌的构建，得到丙酮酸代谢通量显著改变的菌株。在这些研究的基础上，与生物降解柠檬酸技术联系，我们可以更好地解决降解途径产生的香气

化合物难以控制的问题。Curic 等^[41]通过破坏 α -乙酰乳酸脱氢酶提高双乙酰的产量。*L. lactis* biovar. *diacetylactis* IL1403 是不含质粒的 *L. lactis* biovar. *diacetylactis* 柠檬酸渗透酶突变体，Pudlik 等^[44]通过将质粒 pFL3 转移到 *L. lactis* biovar. *diacetylactis* IL1403，构建了有产生乙偶姻和双乙酰能力的菌株，质粒 pFL3 在肺炎链球菌 *polA* 启动子的控制下使 *L. lactis* biovar. *diacetylactis* IL1403 含有乳球菌 *citP* 基因，且转运体和质粒拷贝数的表达都不受柠檬酸或培养基 pH 的控制。这种基因工程菌能更可控地完成柠檬酸降解任务，但实际操作的可行性和降酸效果还需要进一步实验探索。

2.2 酵母菌

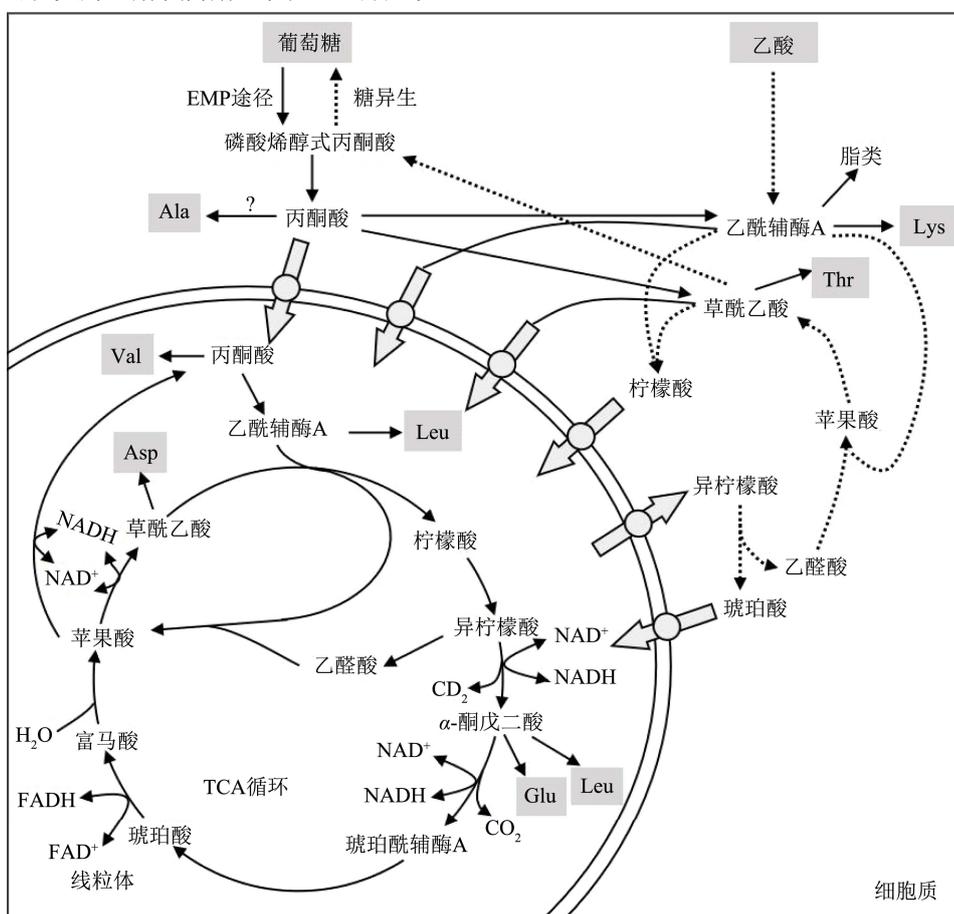


图 5 酵母菌柠檬酸代谢途径^[46]

Fig.5 Citrate metabolic pathway of yeast^[46]

注：虚线代表葡萄糖存在时不会发生的过程。

与乳酸菌不同的是酵母菌可以通过三羧酸 (TCA) 循环降解柠檬酸，能产生更多的 NADH 为生长代谢提供能量。丙酮酸是 TCA 循环的起始点，首先，在丙酮酸脱氢酶系的作用下丙酮酸脱羧形成乙酰辅酶 A，在柠檬酸合酶 (Citrate synthase, CS) 的催化下乙酰辅酶 A 再与线粒体中的草酰乙酸缩合为柠檬酸^[45]。在顺乌头酸酶的催化作用下柠檬酸生成中间产

物顺乌头酸，继而转变为异柠檬酸。随后，异柠檬酸经过异柠檬酸脱氢酶的作用生成 α -酮戊二酸，接着在 α -酮戊二酸脱氢酶催化下形成琥珀酰-CoA 和 CO_2 。在琥珀酰-CoA 合成酶作用下琥珀酰-CoA 形成琥珀酸。琥珀酸又能在琥珀酰脱氢酶、富马酸酶和苹果酸脱氢酶的作用下生成草酰乙酸。乙醛酸支路^[46]是酵母降解柠檬酸的另一条路径。在顺乌头酸酶作用下柠檬酸转

化为异柠檬酸, 异柠檬酸在异柠檬酸裂解酶的作用下生成乙醛酸和琥珀酸。随后, 乙醛酸和乙酰辅酶 A 在苹果酸合酶作用下生成苹果酸, 苹果酸在苹果酸脱氢酶作用下生成草酰乙酸。当体系中存在葡萄糖时, 酿酒酵母的乙醛酸通路中位于细胞质中的酶以及位于线粒体中的苹果酸脱氢酶受到抑制不表达^[47]。除此之外, 柠檬酸可以被细胞质中的 ATP 柠檬酸裂解酶 (ATP citrate lyase, ACL) 裂解为乙酰辅酶 A 和草酰乙酸。

酵母菌降解的柠檬酸的代谢途径 (图 5) 较为复杂, 代谢中间产物有苹果酸、琥珀酸、乙醛酸等其他有机酸, 柠檬酸的含量也受其降解和合成两个方面因素的共同调控。酵母菌的代谢中间产物丙酮酸没有生成乳酸菌代谢产生的乙酸、双乙酰、乙偶姻、2,3-丁二醇等香气化合物, 而是大部分进入了 TCA 循环。酵母菌的有完整的 TCA 酶系, 乳酸菌 TCA 相关酶仅有苹果酸脱氢酶、富马酸酶和富马酸还原酶。葡萄糖不存在时, 酵母菌能通过将乙酸转化为乙酰辅酶 A 的机制应对乙酸胁迫, 而乳酸菌内并未发现类似机制。推测酵母菌的柠檬酸转运模式与乳酸菌有相似之处, 假丝酵母 (*Candida utilis*) 在柠檬酸培养基上能够通过两种转运系统在质膜上实现柠檬酸的转运, 一种专门用于单羧酸、二羧酸和三羧酸的质子系统, 以及一种能够接受酸未解离形式的运输系统, 这两种运输系统都是可诱导的, 并受到葡萄糖抑制^[46], 但还未证实两种菌运输柠檬酸的相关酶是否有所联系。对筛选出的具有高浓度柠檬酸降解能力的酵母菌的研究大多集中在应用层面, 而酵母菌降解的具体代谢机制及代谢途径鲜有报道, 降酸酵母如何应对高浓度柠檬酸胁迫, 哪些基因和酶参与了柠檬酸的转运和降解等, 都有待继续深入研究。

3 影响生物降解柠檬酸的因素

3.1 pH 对生物降解柠檬酸的影响

Lactococcus lactis 的柠檬酸利用率有 pH 依赖性, 这种 pH 依赖性是由柠檬酸渗透酶的活性决定的, Starrenburg 等^[48]对 *L. lactis* 的柠檬酸盐渗透酶进行克隆、测序和表征, 得出该蛋白的最适 pH 范围为 5.5~6.0, 与研究中发现的降解柠檬酸最佳 pH 范围一致。较低的 pH 对 *L. plantarum* 柠檬酸的降解有抑制作用, 通过调整发酵果汁的 pH 可以使 *Lactobacillus plantarum* 更倾向于降解柠檬酸。Wei 等^[49]采用 *L. plantarum* B7 和或 C8-1 菌株对不同 pH 条件下的笃斯越桔汁进行发酵, 结果显示 *L. plantarum* 在非 pH 调整

果汁 (pH=2.65) 中主要代谢苹果酸和还原糖, 在 pH 调整果汁 (pH=3.50) 中柠檬酸和奎宁酸被大量消耗。一些研究表明 pH 在 4.0~5.0 范围内时, *L. plantarum* 消耗柠檬酸的速度较其他的 pH 条件下更快。Kennes 等^[50]实验得到的发酵橙汁中 *L. plantarum* DSM 20174 柠檬酸降解的最佳 pH 为 4.0。Pretorius 等^[18]评估了不同 pH 下 *L. plantarum* 在合成酒基质中的柠檬酸降解特性, 观察到 pH 4.0 和 5.0 时 cit⁺ *L. plantarum* IWBT B382 均将合成酒基质中的柠檬酸 (0.5 g/L) 消耗尽, 而 cit⁺ *O. oeni* 菌株在培养基 pH 5.0 时几乎不能降解柠檬酸。

pH 在柠檬酸盐代谢的一些基因的调控中也起着重要作用, 因此影响柠檬酸降解途径中代谢物的浓度。Quintans 等^[51]发现酸性生长条件会对 *L. lactis* biovar *diacetylactis* 柠檬酸降解的相关基因产生诱导作用, pH 7.0 转变为 5.5 后, 检测到组成柠檬酸裂解酶亚基的 CitE 和 CitF、草酰乙酸脱羧酶、 α -乙酰乳酸合成酶的多肽表达水平增加, 消耗的柠檬酸最终由生成乳酸转变为只产生较少的酸性和中性化合物。Ramos 等^[21]观察到, *O. oeni* 中调控双乙酰脱羧为乙偶姻的基因在 pH 低于 4.0 时受到刺激表达。需要注意的是在含有柠檬酸盐的培养基中初始外部 pH 低于 4.5 时, 柠檬酸代谢产物之一的乙酸在含有柠檬酸的介质中迅速积累并进入细胞, *O. oeni* ATCC BAA-1163 的生长受到很强的抑制, 因而只观察到较弱的脱酸, 这些结果表明, *O. oeni* 不适用于环境 pH 低于 4.5 时柠檬酸的降解^[52]。乙酸积累对 *O. oeni* 生长的抑制限制了其降酸的 pH, 而东方伊萨酵母 (*Issatchenkia orientalis*, *I. orientalis*) 不仅具有良好的乙酸抗性^[53], 甚至可以耐受 pH 2.0 的酸性条件^[54], 在高酸环境的生物降酸中形成了天然的优势。

3.2 碳源对生物降解柠檬酸的影响

细菌降解柠檬酸的同时会释放能量, 这些能量可以用于维系或促进细菌的生长^[55]。许多降解柠檬酸的乳酸菌使用柠檬酸作为电子受体与提供 NADH 的葡萄糖、果糖、乳糖或木糖一起共代谢 (柠檬酸+2[H] \rightarrow 乳酸+乙酸+CO₂), 研究表明只有少数乳酸菌可以以柠檬酸为唯一碳源生长^[56]。*O. oeni* 可以在乙醇发酵后将剩余葡萄糖和柠檬酸一起代谢, 这种代谢方式对这些细菌增加 ATP 合成底物的磷酸化很重要^[57]。培养基中存在柠檬酸和另一种碳源时, 以 *L. rhamnosus* ATCC 7409 为例, 该菌株可以用柠檬酸作为能量来源, 在葡萄糖加柠檬酸盐的培养基上会发生两峰生长, 柠檬酸在诱导其降解的相关酶合成后才能被利用, 故直到葡

葡萄糖耗尽才开始被消耗^[34]。*L. lactis* 是乳制品发酵剂中降解柠檬酸的主要菌种之一, *L. lactis biovar diacetylactis* 可以在柠檬酸是唯一碳源的培养条件下生长^[58]。乳杆菌和酒类酒球菌不能代谢柠檬酸作为唯一能量来源。近年来, Yu 等^[59]从青梅中筛选出一株能有效降解柠檬酸的 *L. fermentum*, 不消耗(或仅少量消耗)果汁中糖的情况下优先利用柠檬酸维持生长。*L. plantarum* 不能使用柠檬酸作为唯一能源, 但能够在处于静止生长期的培养物中将柠檬酸转化为乙酸, 且如果菌数足够多, 可以在无能量来源的情况下代谢柠檬酸^[34]。肠球菌与乳酸菌的不同之处在于不能共代谢柠檬酸和葡萄糖^[60]。

葡萄糖对不同菌株降酸能力的影响存在差异, 郝爱林等^[12]通过初筛获得了 20 株降解柠檬酸效果好且发酵性能优良的非酿酒酵母菌, 与利用 YPD-柠檬酸培养基(含 1%柠檬酸, 2%葡萄糖)复筛时相比, 大多数菌株的柠檬酸降解率明显降低, 相反东方伊萨菌 B9S-2、M130 的柠檬酸降解率却有所增高。葡萄糖的存在也会影响柠檬酸代谢产物的生成, 在有葡萄糖的条件下, 乳酸菌柠檬酸代谢生成乳酸和丁二醇的含量会增加; 在缺乏葡萄糖的条件下, 柠檬酸代谢的主要产物是乙偶姻。葡萄糖还与柠檬酸代谢相关酶的活性和基因的表达相关, Pretorius 等^[18]评价了不同水平的葡萄糖(2.5、50 和 115 g/L), 果糖(2.5、50 和 115 g/L)和 pH(3.0、3.5、4.0 和 5.0)对 cit^+ 、 cit^- 的 *O. oeni* 和 *L. plantarum citE* 基因表达的影响, 研究发现 cit^+ *L. plantarum* 和 *O. oeni* 在果糖和 pH 处理中比在葡萄糖处理中消耗更多的柠檬酸盐, 特别是在果糖处理中 *citE* 基因表达最高, 葡萄糖处理中 cit^+ *O. oeni* 菌株 *citE* 基因相对表达较低, 不产生任何双乙酰和乙偶姻, 可以解释之前研究发现的葡萄糖能刺激双乙酰和乙偶姻还原为 2,3-丁二醇的现象^[37]。此外, 曾有学者观察到葡萄糖的分解代谢物能抑制柠檬酸渗透酶和柠檬酸裂解酶的表达^[33,60]。说明葡萄糖的存在对 *L. plantarum* 和 *O. oeni* 的柠檬酸降解是不利的。

一些毕赤酵母降解柠檬酸也出现了受葡萄糖抑制的现象。发酵毕赤酵母 JT-1-3 (*P. fermentans*, JT-1-3) 和季也蒙毕赤酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*, *M. guilliermondii*) JP-4-2 在培养基中同时存在柠檬酸和葡萄糖的情况下柠檬酸利用率比柠檬酸单独存在时明显降低^[61]。龚丽娟等^[61]以 *S. cerevisiae* RV002 为对照, 将 *M. guilliermondii* JP-4-2 接种于以柠檬酸、葡萄糖和乙醇为单一碳源或双碳源的培养基中, 测定酵母生物量及碳源代谢动态变化。结果表明, *M. guilliermondii* JP-4-2 对柠檬酸的代谢率最高(28.30%), 乙醇或葡

萄糖的存在会抑制其对柠檬酸的利用, 与赵玉平等^[62]的研究结果一致。

4 生物降解柠檬酸在降酸领域中的实际应用

乳酸菌降解柠檬酸较多应用于果汁的降酸领域, Yu 等^[59]利用一株不损失糖分的情况下优先利用柠檬酸的 *L. fermentum* 调整茶枝柑果汁(柠檬酸含量为 39.3 g/kg)的糖酸比, 该菌株在 30 °C 发酵 6 h 后将柑橘汁的糖酸比由 12:1 提高到 22:1。胡丽云等从青梅中筛选出一株能高效降解柠檬酸的 *L. fermentum*, 结果表明在基础培养液(含 10 g/L 的柠檬酸)中经过 36 h 的发酵后培养液中柠檬酸减少了 86.2%, 可滴定酸含量降低 50%以上, 但低 pH 对菌株的生长产生了明显的抑制作用; 进一步探究该菌的生理生化特性以及对乙醇、亚硫酸盐等的耐受性发现, 该菌株的乙醇耐受性较高但对亚硫酸敏感, 培养液中仅添加 0.5 mmol/L 的亚硫酸钠后, 菌株的柠檬酸代谢将会被完全抑制^[13]。在高酸果汁的降酸实际应用中, 缓解低 pH 对菌株生长的抑制作用可以采用固定化细胞的方式。固定化技术(immobilization technology)是利用化学或物理手段, 将游离微生物或酶定位在限定的空间区域里, 提高微生物细胞或酶的浓度, 从而保持较高的生物活性, 并实现反复利用的方法^[63]。*L. fermentum* 对乙醇的高耐受性为其应用于果酒降酸创造了可能, 但亚硫酸敏感的特征对该菌株应用于果酒降酸有一定限制。目前的研究对于接种 *O. oeni* 能否有效降解果酒中的柠檬酸存在一定争议, Lasik-Kurdyś 等^[64]比较了酒精发酵后接种乳酸菌、共接种酵母菌和乳酸菌、酒精发酵后避免 MLF 发生以及酒精发酵后自然 MLF 四种不同的发酵工艺, 只有在不接种 *O. oeni* VP41 的自发性 MLF 过程中才记录到葡萄酒中柠檬酸浓度的显著降低, 在这一过程中, 柠檬酸的浓度降低了 26.8%~39.3%。Balmaseda 等^[6]接种酿酒酵母前接种非酿酒酵母完成连续酒精发酵, 再对赤霞珠葡萄酒进行自发 MLF 或接种 *O. oeni*, 结果与 Lasik-Kurdyś 的结论相反, 接种了 *O. oeni* 的赤霞珠葡萄酒 MLF 结束后柠檬酸含量更低。

酵母菌中的非酿酒酵母广泛用于果汁和果酒降酸领域, 较高的柠檬酸一般会对菌种的生长造成胁迫, 非酿酒酵母菌伊萨酵母属、毕赤酵母属以及假丝酵母属对高柠檬酸含量有较高的耐受力, 非常适用于柠檬酸型水果果汁的降酸。文连奎等^[65]利用 *I. terricola* 对柠檬酸进行降解, 培养时间为 60 h 时, 接种量在 $1.25 \times 10^6 \sim 7.5 \times 10^6$ CFU/mL 的条件下, 质量浓度为 8~12 g/L 柠檬酸降解率均能达到 90%以上, 该菌株对 SO_2

的抵抗力较弱但对酸性环境的耐受性强, *I. terricola* 可耐受最大质量浓度为 450 mg/L 的 SO_2 、体积分数 5% 的酒精、最低 pH 为 2 的酸度。对降酸条件进行优化, 而 *I. terricola* 对高柠檬酸果汁的降酸效果显著, 陈思睿等^[66]对红树莓果园土壤和红树莓鲜果上的微生物进行分离纯化得到两株降酸菌, 经过菌株形态学观察、生理生化试验及分子生物学鉴定, 两株菌均为 *I. terricola*, 分别定名为 *I. terricola* WJL-T2、*I. terricola* WJL-G4; 采用静置和振荡两种发酵方式进行发酵, 结果表明, 接种量为 4% (V/V), 28 °C 静置发酵 8 d 时红树莓果汁总酸降酸率分别达 55.32% 和 60.41%; 120 r/min 振荡发酵 3 d, 总酸降酸率分别达 89.82% 和 94.66%, 适合用在高浓度柠檬酸的果汁降酸^[66,67], 该研究同时发现有氧发酵显著加快降酸速度并提高降酸效果。已有的两种接种方式有各自的优势和缺陷, 先接种降酸酵母菌株 S8、加热杀菌后再接种酿酒酵母不会对起降酸作用的 *I. terricola* 产生抑制, 但发酵出的果酒有异味; 共接种降酸菌株 S8 和酿酒酵母降酸幅度小, 但发酵出的树莓酒感官更佳, 酿造时间更短, 产生的酒精可以较好的抑制杂菌生长。隋韶奕等^[68]利用一株以 L-苹果酸和柠檬酸为碳源的 *I. terricola* (代号 S8) 采用在生物降酸的同时进行酒精发酵, 通过正交试验得到了最佳生物降酸条件为 *I. terricola* 接种量 3%、酿酒酵母接种量 0.08%、降酸温度为 28 °C、降酸时间为 5 d, 树莓酒中可滴定酸含量下降 1.13%, 酿酒酵母会在接种初期, 与同处于对数生长期的 *I. terricola* S8 争夺生长所需的碳源和氮源, 而且会提高产酒精的速度, 过早的抑制了 S8 的活性, 降酸幅度小, 不适用于高浓度柠檬酸水果的降酸。综上, 可以考虑优化先对果汁降酸, 再酿酒的工艺, 怎样的接种方式能从而更好地发挥非酿酒酵母在酿酒中的降酸能力。非酿酒酵母也具有一定的酒精发酵能力, 有学者尝试用 *I. orientalis* 或 *P. fermentans* 降酸并直接完成酒精发酵。郝爱玲等^[69]通过实验筛选出的 *I. orientalis* M130 在猕猴桃酒纯发酵试验中综合评价最优, 348 h 发酵结束后的酒精度为 7.67% (V/V), 能够将猕猴桃酒 13.12 g/L 的柠檬酸降到 10.74 g/L, 降酸率达 18.12%, 且发酵结束后酒体澄清、透明, 香气浓郁, 酒精度。Zhong 等^[70]将 *P. fermentans* JT1-3 接种到蓝莓汁中进行发酵, 酿造出酒精度为 6.25% (V/V), 残糖为 1.83% (m/m) 的果酒, 柠檬酸显著下降了 43.35%。非酿酒酵母还能够降低酒中的中链脂肪酸含量, 有利于 MLF 的进行^[6]。

环境中也筛选出了柠檬酸降酸菌株, 但是否能用于食品行业降酸有待评估。张铎等^[23]从柠檬酸废水废

渣中分离培养纯化获得 5 株具有较强的降柠檬酸能力的菌株, 发酵 5 d 降解了培养基中 70% 以上的柠檬酸, 其中菌株 NS2、NL2 的酒精耐受能力相对较强, 可以耐受 0%~4% vol 的酒精度, NS2 经鉴定为库德里阿兹威毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*, *P. kudriavzevii*), NL2 经鉴定为热带假丝酵母菌 (*Candida*, *C. tropicalis*)。但关于假丝酵母降解柠檬酸的研究较少, 未见其应用于果汁果酒降酸领域。

5 展望

5.1 早在一个多世纪以前, 乳酸菌降解柠檬酸的代谢机制研究就比较深入, 但研究方向局限于在乳制品工业中增加双乙酰生成和葡萄酒中复杂香气的形成, 少有在果汁或果酒的生物降酸领域的应用。目前生物降酸已逐渐成为降酸技术未来的发展趋势, 由于柠檬酸是许多水果中主要的有机酸, 逐渐有学者分离并筛选出有柠檬酸降解能力的乳酸菌, 并取得一定的降酸效果。就目前的研究来看, 乳酸菌虽然具有降解柠檬酸的能力, 但柠檬酸降解率不高, 不适合高柠檬酸水果的降酸。另外, 利用乳酸菌降解柠檬酸耗时久, 往往滞后于苹果酸的降解。故近年来有研究人员主要研究各种因素以及接种方式对乳酸菌柠檬酸代谢的影响, 今后可以以此为依据进一步充分探讨乳酸菌应用于果汁、果酒降酸的可能性。或许可以通过构建基因工程菌、调控柠檬酸转运和降解相关基因表达、诱导相关酶的合成, 来强化乳酸菌的柠檬酸降解能力。

5.2 近年来发现了新的降解柠檬酸的微生物, 伊萨酵母和毕赤酵母、以及假丝酵母, 其中的一些酵母菌株甚至在高柠檬酸含量的果酒中仍能发挥出较好的降酸效果, 但这些酵母菌的降解柠檬酸机理方面仍有待研究, 下一步可以就其降解柠檬酸的机理、影响因素、代谢途径等进行深入研究。此外, 非酿酒酵母和酿酒酵母之间也会相互作用, 联用时有诸多因素考虑, 在联用两种酵母时可能使非酿酒酵母活性比单独接种时降低, 如果能解决异味问题, 使降酸过程先进行可能会得到更好的降酸率。一般非酿酒酵母不能完成酒精发酵, 郝爱玲等^[69]成功尝试仅接种东方伊萨酵母 M130 将 13.12 g/L 的柠檬酸降低到 10.74 g/L, 同时完成了酒精发酵, 说明有可能利用一些降酸酵母纯发酵酿酒。降酸效果较好的 *L. fermentum* 和 *I. terricola* 都表现出亚硫酸敏感性, 而亚硫酸是酿酒工艺中的一环, 可能对发酵工艺造成影响, 采用先进行果汁降酸再酿酒的工艺、通过现代分子生物技术或者基因工程得到耐受亚硫酸的菌种去突破这个限制因素也是今后的研究方向之一。

参考文献

- [1] 郑丽静, 聂继云, 闫震. 糖酸组分及其对水果风味的影响研究进展[J]. 果树学报, 2015, 32(2): 304-312
ZHENG Lijing, NIE Jiyun, YAN Zhen. Advances in research on sugars, organic acids and their effects on taste of fruits [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(2): 304-312
- [2] 梁艳玲, 陈麒, 伍彦华, 等. 果酒的研究与开发现状[J]. 中国酿造, 2020, 39(12): 5-9
LIANG Yanling, CHEN Qi, WU Yanhua, et al. Research and development status of fruit wine [J]. China Brewing, 2020, 39(12): 5-9
- [3] 王宝石, 李林波, 武忠伟, 等. 高浓度柠檬酸对酿酒酵母生长的抑制效应[J]. 中国酿造, 2018, 37(6): 56-60
WANG Baoshi, LI Linbo, WU Zhongwei, et al. Inhibiting effects of high concentration of citric acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Brewing, 2018, 37(6): 56-60
- [4] 辛宇, 邱智东, 伍法杰, 等. 灵芝菌生物发酵北五味子果汁降酸工艺优化及其护肝作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 177-182
XIN Yu, QIU Zhidong, WU Fajie, et al. Optimizing the fermentation process of ganoderma lucidum to deacidify fresh *Schisandra chinensis* juice and its liver protection effects [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(2): 177-182
- [5] Jiang J, Sumby K M, Sundstrom J F, et al. Directed evolution of *Oenococcus oeni* strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment [J]. Food Microbiol, 2018, 73: 150-159
- [6] Balmaseda A, Rozes N, Leal M A, et al. Impact of changes in wine composition produced by non-*Saccharomyces* on malolactic fermentation [J]. Int J Food Microbiol, 2021, 337: 108954
- [7] Wojdylo A, Samoticha J, Chmielewska J. The influence of different strains of *Oenococcus oeni* malolactic bacteria on profile of organic acids and phenolic compounds of red wine cultivars Rondo and Regent growing in a cold region [J]. J Food Sci, 2020, 85(4): 1070-1081
- [8] Bartowsky E, Henschke P. The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(3): 235-252
- [9] Malherbe S, Tredoux A, Nieuwoudt H, et al. Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 39: 477-494
- [10] Romano P, Brandolini V, Ansaloni C, et al. The production of 2,3-butanediol as a differentiating character in wine yeasts [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1998, 14: 649-653
- [11] 覃瑶, 吴波, 秦晗, 等. 我国果酒发展及研究现状[J]. 中国酿造, 2020, 39(9): 1-6
QIN Yao, WU Bo, QIN Han, et al. Development and research status of fruit wine in China [J]. China Brewing, 2020, 39(9): 1-6
- [12] 何翠婵. 微生物降酸技术在青梅汁中的应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2014
HE Cuichan. Application of bio-deacidification technology in prunus juice [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014
- [13] 胡丽云, 余元善, 徐玉娟, 等. 一株发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)对柠檬酸的发酵特性研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(8): 109-114
HU Liyun, YU Yuanshan, XU Yujuan, et al. Study on the fermentation characteristics of citric acid by a *Lactobacillus fermentum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(8): 109-114
- [14] 王冰倩, 魏雪团. 降酸酵母的筛选及其在红树莓功能饮料中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(21): 133-138
WANG Bingqian, WEI Xuetuan. Screening of acid-reducing yeast and its application in red raspberry functional beverage [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(21): 133-138
- [15] 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
- [16] Vaningelgem F, Ghijsels V, Tsakalidou E, et al. Cometabolism of citrate and glucose by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in the absence of cellular growth [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 319-326
- [17] 袁星星, 余元善, 吴继军, 等. *Lactobacillus fermentum* 发酵降酸对三华李汁品质的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 134-138
YUAN Xingxing, YU Yuanshan, WU Jijun, et al. Effect of deacidification by fermentation with *Lactobacillus fermentum* on the qualities of plum (*Prunus salicina* lindl. cv. *sanhua*) juice [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(11): 134-138
- [18] Pretorius N, Engelbrecht L, Du Toit M. Influence of sugars and pH on the citrate metabolism of different lactic acid

- bacteria strains in a synthetic wine matrix [J]. J Appl Microbiol, 2019, 127(5): 1490-1500
- [19] Hugenholtz J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria [J]. John Wiley & Sons, Ltd(10.1111), 1993, 12(1-3): 165-178
- [20] Liu S Q. Malolactic fermentation in wine-beyond deacidification [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(4): 589-601
- [21] Ramos A, Lolkema J S, Konings W N, et al. Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos* [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(4): 1303-1310
- [22] Lonvaud-Funel A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 76(1-4): 317-331
- [23] 张铎,毛勇,毛健,等.降柠檬酸菌株的筛选及鉴定[J].食品与机械,2017,33(5):3-7
ZHANG Duo, MAO Yong, MAO Jian, et al. Study on isolation and identification of reducing citric acid strains [J]. Food & Machinery, 2017, 33(5): 3-7
- [24] Pretorius N. Evaluation of citrate metabolism in *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* [D]. Stellenbosch University, 2016
- [25] Antranikian G, Giffhorn F. Citrate metabolism in anaerobic bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 1987, 46(2): 175-198
- [26] Manno Ma T, Zuljan F, Alarcón S, et al. Genetic and phenotypic features defining industrial relevant *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* and *L. lactis* biovar. diacetylactis strains [J]. Journal of biotechnology, 2018, 282: 25-31
- [27] Van Mastrigt O, Mager E E, Jamin C, et al. Citrate, low pH and amino acid limitation induce citrate utilization in *Lactococcus lactis* biovar. diacetylactis [J]. Microb Biotechnol, 2018, 11(2): 369-380
- [28] Pudlik A M, Lolkema J S. Citrate uptake in exchange with intermediates in the citrate metabolic pathway in *Lactococcus lactis* IL1403 [J]. J Bacteriol, 2011, 193(3): 706-714
- [29] Olguin N, Bordons A, Reguant C. Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni* [J]. Food Microbiol, 2009, 26(2): 197-203
- [30] Passerini D, Laroute V, Coddeville M, et al. New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin- producing strains isolated from diverse origins [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 160(3): 329-336
- [31] Balmaseda A, Bordons A, Reguant C, et al. Non-Saccharomyces in wine: effect upon *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 534
- [32] Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Desens C. Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1988, 44(2): 183-191
- [33] Bauer R, Dicks L M T. Control of malolactic fermentation in wine. A review [J]. South African Journal of Enology & Viticulture, 2017, 25(2): 74-88
- [34] Palles, Beresford, Condon, et al. Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* [J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85(1): 147-154
- [35] Martino G P, Quintana I M, Espariz M, et al. Aroma compounds generation in citrate metabolism of *Enterococcus faecium*: genetic characterization of type I citrate gene cluster [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 218: 27-37
- [36] Pudlik A M, Lolkema J S. Substrate specificity of the citrate transporter CitP of *Lactococcus lactis* [J]. J Bacteriol, 2012, 194(14): 3627-3635
- [37] Marty-Teyssset C, Posthuma C, Lolkema J, et al. Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides* [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(8): 2178-2185
- [38] Martino Gabriela P, Perez Cristian E, Magni Christian, et al. Implications of the expression of *Enterococcus faecalis* citrate fermentation genes during infection [J]. PloS One, 2018, 13(10): e0205787
- [39] 郑遂.乳酸乳球菌与粪肠球菌高产双乙酰的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2013
ZHENG Sui. Study on high-level diacetyl production by *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* [J]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013
- [40] 袁星星,余元善,徐玉娟.柠檬酸的乳酸菌发酵降解途径及其应用[J].食品研究与开发,2017,38(10):204-208
YUAN Xingxing, YU Yuanshan, XU Yujuan. Citric acid fermentation of lactic acid bacteria and its application [J]. Food Research and Development, 2017, 38(10): 204-208
- [41] Curic M, Richelieu M D, Henriksen C, et al. Glucose/citrate cometabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* with impaired alpha-acetolactate decarboxylase [J]. Metabolic Engineering, 1999, 1(4): 291-298
- [42] Cretenet M, Gall G L, Wegmann U, et al. Early adaptation to oxygen is key to the industrially important traits of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* during milk fermentation [J].

- BMC Genomics, 2014, 15(1): 1-15
- [43] Jeanson S, Hilgert N, Coquillard M, et al. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(1): 75-81
- [44] Pudlik A, Lolkema J. Citrate uptake in exchange with intermediates in the citrate metabolic pathway in *Lactococcus lactis* IL1403 [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(3): 706-714
- [45] Xiao H, Shao Z, Jiang Y, et al. Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production [J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13
- [46] Saayman M, Viljoen-Bloom M. The biochemistry of malic acid metabolism by wine yeasts - a review [J]. South African Journal of Enology and Viticulture, 2017, 27: 113-122
- [47] Maaheimo H, Fiaux J, Çakar Z, et al. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(8): 2464-2479
- [48] Starrenburg M J, Hugenholtz J. Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(12): 3535-3540
- [49] Wei M, Wang S, Gu P, et al. Comparison of physicochemical indexes, amino acids, phenolic compounds and volatile compounds in bog bilberry juice fermented by *Lactobacillus plantarum* under different pH conditions [J]. J Food Sci Technol, 2018, 55(6): 2240-2250
- [50] Kennes C, Dubourguler H C, Albagnac G, et al. Citrate metabolism by *Lactobacillus plantarum* isolated from orange juice [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1991, 70(5): 380-384
- [51] Garcia-Quintans N, Repizo G, Martin M, et al. Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* CRL264 by acidic growth [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(7): 1988-1996
- [52] Augagneur Y, Ritt J F, Linares D M, et al. Dual effect of organic acids as a function of external pH in *Oenococcus oeni* [J]. Arch Microbiol, 2007, 188(2): 147-157
- [53] Li Y, Wu Z, Li R, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the acetic acid stress in *Issatchenkia orientalis* [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44: e13203
- [54] Suthers P F, Dinh H V, Fatma Z, et al. Genome-scale metabolic reconstruction of the non-model yeast *Issatchenkia orientalis* SD108 and its application to organic acids production [J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 11(8): e00148
- [55] Sánchez C, Neves A R, Cavalheiro J, et al. Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 74: 1136-1144
- [56] Zaunmuller T, Eichert M, Richter H, et al. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 72(3): 421-429
- [57] Taniasuri F, Lee P R, Liu S Q. Induction of simultaneous and sequential malolactic fermentation in durian wine [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 230: 1-9
- [58] 李良, 马莺. 乳酸菌对发酵乳制品风味形成的影响[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(5): 42-45
- LI Liang, MA Ying. Effect of lactic acid bacteria on flavor of fermented dairy products [J]. Journal of Fruit Science, 2012, 40(5): 42-45
- [59] Yu Y, Xiao G, Xu Y, et al. Slight fermentation with *Lactobacillus fermentum* improves the taste (sugar: acid ratio) of citrus (*Citrus reticulata* cv. *chachiensis*) juice [J]. J Food Sci, 2015, 80(11): M2543-7
- [60] Rea M C, Cogan T M. Glucose prevents citrate metabolism by enterococci [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88(2-3): 201-206
- [61] 龚丽娟, 孙婉莹, 钟武, 等. 非酿酒酵母对有机酸类碳源代谢特征的研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 84-88
- GONG Lijuan, SUN Wanying, ZHONG Wu, et al. Metabolic characteristics of non-*Saccharomyces* using organic acid as carbon sources [J]. China Brewing, 2020, 39(2): 84-88
- [62] 赵玉平, 杜连祥, 刘丽丽, 等. 降解山楂汁中柠檬酸酵母菌的筛选及其降酸特性研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(2): 235-239
- ZHAO Yuping, DU Lianxiang, LIU Lili, et al. Screening yeast degrading citric acid in hawthorn fruit juice and its degrading characteristics [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(2): 235-239
- [63] 黄鹭强. 降酸酵母菌株的构建及其在枇杷酒酿造中的应用研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013
- HANG Luqiang. Study on constructing of deacidification yeast strain and its application in loquat wine brewage [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013

