

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.10.037

糖度与酸度对鲁氏接合酵母生长的影响*

王虎玄 胡仲秋 牛晨 袁亚宏 岳田利

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 研究了恒温 25℃ 条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母潜在最大生长速率 μ_{\max} 及迟滞期 λ 的影响, 以及恒温 25℃ 及变温条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母腐败所需时间 (TFS) 的影响。采用 Baranyi - Roberts 方程对不同酸度糖度组合菌株的生长曲线进行拟合, 得到菌株 μ_{\max} 及 λ , 结果显示拟合曲线的决定系数 R^2 均在 0.95 以上, 拟合度较好。采用响应面分析法 (RS) 分析了恒温条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母 μ_{\max} 和 λ 的影响以及恒温及变温条件下糖度与酸度对鲁氏接合酵母 TFS 的影响, 得到了二次回归模型。结果显示各模型方差分析极显著, 失拟项不显著, R^2 分别为 0.992 1 (μ_{\max})、0.962 5 (λ)、0.986 6 (TFS 恒温)、0.995 8 (TFS 变温)。通过标准回归系数比较了各因素对鲁氏接合酵母生长的影响, 结果显示酸度是影响鲁氏接合酵母生长的主要限制因素, 糖度对其生长影响较小。pH 值 2.3 时可以大幅抑制鲁氏接合酵母的生长, pH 值 2.0 时可以完全抑制其生长。这些研究结果为后期预测与控制鲁氏接合酵母在苹果浓缩汁中污染提供了一定基础。

关键词: 鲁氏接合酵母 糖度 酸度 污染 响应面分析

中图分类号: TS255 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2015)10-0279-06

Effect of Sugar Content and Acidity on Growth of *Zygosaccharomyces rouxii*

Wang Huxuan Hu Zhongqiu Niu Chen Yuan Yahong Yue Tianli

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

Abstract: The effect of sugar content and acidity on potential maximum growth rate (μ_{\max}) and lag phase duration (λ) of *Zygosaccharomyces rouxii* at 25℃ was investigated. The effect of sugar content and acidity on the time for spoilage (TFS) was also analyzed under isothermal (25℃) and non-isothermal conditions. The values of μ_{\max} and λ in all sugar content and acidity combinations were obtained through fitting the growth curves by using Baranyi and Roberts model. The results showed that the determination coefficients (R^2) of all fitting curves were above 0.95, which indicated that a good fitting was obtained. The effect of sugar content and acidity on μ_{\max} and λ at 25℃ and the effect of sugar content and acidity on the TFS under isothermal (25℃) and non-isothermal conditions were analyzed by using response surface (RS) method, and quadratic regression models were obtained. The results showed that R^2 of each model was 0.992 1 (μ_{\max}), 0.962 5 (λ), 0.986 6 (TFS, isothermal) and 0.995 8 (TFS, non-isothermal), which effectively revealed the influence of sugar content and acidity on the growth of *Z. rouxii*. The influence magnitude of each factor on the growth of *Z. rouxii* was analyzed by comparing their standard regression coefficients. The results showed that the main limiting factor that affected *Z. rouxii* growth was the acidity whereas sugar content had less impact. The growth of *Z. rouxii* was largely inhibited at pH value of 2.3 and it was fully inhibited at pH value of 2.0. The results provide a research basis for predicting and controlling the contamination of apple juice concentrate by *Z. rouxii* in future.

Key words: *Zygosaccharomyces rouxii* Sugar content Acidity Contamination Response surface analysis

收稿日期: 2014-12-24 修回日期: 2015-01-20

*“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAD31B01)

作者简介: 王虎玄, 博士生, 主要从事食品科学研究, E-mail: mn37bvexz@163.com

通讯作者: 岳田利, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物技术及食品安全控制技术研究, E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

引言

鲁氏接合酵母是一种重要的腐败菌,由于它具有耐酸、耐高渗、耐弱酸防腐剂 and 适应高渗环境及高温的特性,能够引起低 pH 值、高糖并且含有山梨酸钾或者苯甲酸钠等防腐剂的食品变质^[1-3]。已有报道指出鲁氏接合酵母能够引起蜂蜜、糖浆、水果浓缩汁及果酱等含糖量极高的食品腐败变质^[4-7]。文献[8]也从苹果浓缩汁(糖度 70°Brix; pH 值 3.5)中分离出鲁氏接合酵母,并证实其能够在苹果浓缩汁中生长,使其质量下降。因此对鲁氏接合酵母的检测与控制是果汁加工企业亟待解决的问题。

苹果浓缩汁中一般不加入山梨酸钾等防腐剂,其主要依靠高糖含量(糖度 66~70°Brix)及高可滴定酸含量(质量分数 2.2%~2.5% 以柠檬酸计;pH 值 3.0~3.5)来抑制微生物的污染,但上述环境压力并不能够完全避免鲁氏接合酵母污染苹果浓缩汁^[8]。因此研究这 2 个环境压力因子对鲁氏接合酵母生长的影响对于有效控制其污染具有重要意义。本文运用响应面分析方法研究 25℃(苹果浓缩汁储藏温度)条件下不同糖度及酸度组合对来源于苹果浓缩汁的鲁氏接合酵母潜在最大生长速率 μ_{\max} 及迟滞期 λ 的影响。同时研究恒温 25℃及变温(苹果浓缩汁船运环境)条件下上述 2 个因素对鲁氏接合酵母造成培养液出现污染迹象所需时间(TFS)的影响,以期有效预测与控制鲁氏接合酵母在苹果浓缩汁中污染提供一定的研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂

高渗培养基:蛋白胨 20 g, 酵母浸粉 10 g, 糖(葡萄糖与果糖, 质量比 1:1) 分别为 810 g (66°Brix)、842 g (68°Brix) 及 874 g (70°Brix), 少量蒸馏水溶解后补加蒸馏水至 1 L。用浓硫酸将各高渗培养基的 pH 值调节至所需值, 具体见表 1。

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

50% YPD 固体培养基:蛋白胨 20 g, 酵母浸粉 10 g, 葡萄糖 500 g, 琼脂 20 g, 少量蒸馏水溶解后补加蒸馏水至 1 L。

30% 葡萄糖稀释液:葡萄糖 300 g, 蒸馏水 1 L。

1.1.2 主要实验仪器

JA2003 型电子天平, 雷磁 PHS-3C 型 pH 计, 陆恒 LH-T32 型手持糖度仪。

表 1 25℃条件下鲁氏接合酵母在所有组合中的 μ_{\max} 及 λ

Tab.1 μ_{\max} and λ values of *Z. rouxii* in all combinations at 25℃

组合 序号	糖度 /°Brix	pH 值	μ_{\max} /(lg CFU·(mL·d) ⁻¹)	λ /d
1	66	2.0	0	>50
2	66	2.3	0.164 ± 0.009 ^c	13.866 ± 2.090 ^d
3	66	2.5	0.265 ± 0.020 ^c	4.764 ± 0.926 ^b
4	66	3.5	0.875 ± 0.034 ^b	1.022 ± 0.248 ^a
5	68	2.0	0	>50
6	68	2.3	0.091 ± 0.009 ^b	15.370 ± 2.182 ^d
7	68	2.5	0.193 ± 0.031 ^{cd}	7.364 ± 1.192 ^c
8	68	3.5	0.629 ± 0.031 ^e	1.380 ± 0.237 ^a
9	70	2.0	0	>50
10	70	2.3	0.052 ± 0.016 ^a	21.193 ± 1.458 ^d
11	70	2.5	0.122 ± 0.010 ^b	13.676 ± 1.415 ^d
12	70	3.0	0.224 ± 0.026 ^{de}	4.340 ± 0.781 ^b
13	70	3.5	0.361 ± 0.018 ^f	4.120 ± 1.383 ^b

注:每个组合重复测定 3 次,结果以均值 ± 标准差表示,不同小写字母代表多重比较差异显著($p < 0.05$),下同。

1.1.3 实验菌株

来源于苹果浓缩汁的鲁氏接合酵母菌株 LB。

1.2 实验方法

1.2.1 菌液制备

从实验菌株斜面上挑取一环单菌落,接种于装有 100 mL YPD 培养液的 250 mL 三角瓶中,27℃条件下,120 r/min 摇床培养 24 h。接种前,为了使菌体细胞避免剧烈高渗冲击,将种子液接入 50% YPD 液体培养基(高渗培养基)使其适应高糖环境,在 27℃条件下,120 r/min 摇床培养 2 d。培养结束后用血球计数板对种子液计数,根据计数结果将种子液菌体浓度调节到 10⁵ CFU/mL。再定量吸取 10 μ L 种子液接种到 10 mL 各培养液中,使得接种后培养液菌体浓度为 10² CFU/mL。将各培养液 25℃条件下静置培养 50 d。每 2 d 取样进行酵母菌浓度测定。

1.2.2 实验设计

设计了 13 个组合研究糖度与酸度对鲁氏接合酵母生长的影响(表 1)。由于苹果浓缩汁的糖度介于 66~70°Brix 之间,因此糖度取 70、68、66°Brix 3 个水平。由于苹果浓缩汁偏酸,pH 值一般小于 3.5,因此取 3.5、2.5、2.3 及 2.0 4 个水平。进行全面实验共 3 × 4 = 12 个组合。由于 70°Brix 是苹果浓缩汁的主要糖度,因此还考察了该糖度下 pH 值 3.0 对鲁氏接合酵母的生长影响。由此构成表 1 所述 13 个组合。将各组合培养液 25℃条件下静置培养 50 d。每 2 d 取样进行酵母菌浓度测定。每个组合实验重复测定 3 次。

1.2.3 酵母菌浓度测定

用灭菌后的 30% 葡萄糖水溶液将酵母培养液进行连续 10 倍梯度稀释,再取适当梯度的稀释液 0.1 mL 分别涂布于 50% YPD 平板及 YPD 平板上,并置于 27℃ 培养 3~5 d,然后对菌落数量进行统计。每个稀释梯度样品作 3 次平行测定。

1.2.4 恒温及变温条件下 TFS 测定

配制 1.2.2 节中的各组合培养液,接种后分别置于恒温(25℃)及变温条件下静置培养 50 d。变温条件参考葡萄酒在船运过程中的温度记录,具体条件为:18、22、26、30℃ 各培养 4 h,重复 8 d;18℃ 及 20℃ 各培养 12 h,重复 2 d;20℃ 及 25℃ 各培养 12 h,重复 6 d;25℃ 及 30℃ 各培养 12 h,重复 20 d;剩余时间在 25℃ 下培养。用杜氏发酵管监测鲁氏接合酵母在各组合培养液中的产气现象,每天进行观察。当杜氏发酵管中出现气泡时便认为培养液已出现明显腐败迹象,培养时间便是 TFS。同时对培养液中的酵母菌浓度进行测定。

1.2.5 数据处理

(1) 一级模型的建立

运用 DMFit 软件中的 Baranyi - Roberts 模型对 25℃ 条件下各组合菌落数(单位:lg CFU/mL)及培养时间(单位:d)进行拟合,继而计算出各组合菌株生长曲线的潜在最大生长速率 μ_{\max} 及迟滞期 λ ^[10]。该模型的简化形式为

$$N = N_0 \exp(-\lambda \mu_{\max}) [-1 + \exp(\lambda \mu_{\max}) + \exp(\mu_{\max} t)]$$

式中 t ——任意时刻, h

N —— t 时刻的微生物数, CFU/mL

N_0 ——初始时刻的微生物数, CFU/mL

μ_{\max} ——潜在最大生长速率, lg CFU/(mL·d)

λ ——迟滞期, d

(2) 二级模型的建立

运用 Experiment Design 8.0 软件中的响应面方法分析 25℃ 条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母 μ_{\max} 及 λ 的影响,建立回归方程。通过标准回归系数的比较判断各因素对鲁氏接合酵母生长影响的大小。同时分析恒温 25℃ 及变温条件下糖度及酸度对 TFS 影响的大小。

2 结果与分析

2.1 菌株生长拟合结果

分别采用 50% YPD 平板及 YPD 平板得到的菌落计数结果并无显著差异。采用 Baranyi - Roberts 方程对各组合 25℃ 条件下菌株的生长曲线进行拟合,建立一级模型,得到菌株生长曲线 μ_{\max} 及 λ 。结果显示拟合曲线的相关系数均在 0.95 以上,拟合度

较好。表 1 所示 Baranyi - Roberts 模型计算得到的各组合菌株 μ_{\max} 及 λ 。可以看出,在 25℃ 条件下不同组合之间鲁氏接合酵母 μ_{\max} 及 λ 有显著差异($p < 0.05$)。总体而言,随着糖度或酸度的增加,菌株 μ_{\max} 逐渐减小, λ 逐渐增加,说明高酸及高浓度糖环境均对鲁氏接合酵母的生长具有抑制作用。在 pH 值为 2.0 的条件下,所有组合中实验菌株均被完全抑制,在培养期(50 d)未观察到菌体生长。

2.2 糖度及酸度对实验菌株 μ_{\max} 及 λ 的影响

通过响应面法分析糖度及酸度对实验菌株 μ_{\max} 及 λ 的影响,得到的模型公式分别为

$$\begin{aligned} \mu_{\max} &= -12.05874 + 0.16504a + 6.02734b - \\ &0.085825ab + 6.24147 \times 10^{-5}a^2 + 0.040784b^2 \\ \lambda &= 2144.25862 - 60.50566a - 85.54206b - \\ &0.98409ab + 0.47744a^2 + 24.25056b^2 \end{aligned}$$

式中 a ——糖度, °Brix b ——pH 值

表 2 所示为响应面分析 25℃ 条件下糖度与酸度对鲁氏接合酵母 μ_{\max} 及 λ 的影响所得回归模型的方差分析结果。结果显示这 2 个模型方差分析极显著($p < 0.0001$),失拟项不显著($p = 0.2870$, $p = 0.1130$),除了 μ_{\max} 模型中 a^2 因素方差分析不显著外($p = 0.9719$),2 个模型中其他因素方差分析均极显著($p < 0.01$)。决定系数分别为 0.9921 及 0.9625,表明这 2 个模型可以较好地揭示糖度与酸度对鲁氏接合酵母 μ_{\max} 及 λ 的影响。

表 2 同时列出了回归模型中各因素的标准回归系数,用以比较各因素对鲁氏接合酵母生长影响的大小。可以看出, μ_{\max} 模型中, b 对菌株 μ_{\max} 的影响最大(标准回归系数为 0.21873), a 、 ab 及 b^2 对菌株 μ_{\max} 的影响较小(标准回归系数分别为 -0.084368、-0.080607 和 0.01285)。 a^2 则对 μ_{\max} 没有影响,方差分析不显著。 λ 模型中 b 及 b^2 对菌株 λ 的影响较大(标准回归系数分别为 -8.381256 及 6.530928), a 、 a^2 及 ab 对菌株 λ 的影响较小(标准回归系数分别为 3.042848、1.387882 及 -0.870112)。这 2 个模型中糖度对鲁氏接合酵母生长的影响均小于酸度,可能是由于鲁氏接合酵母能较好地适应高糖环境。

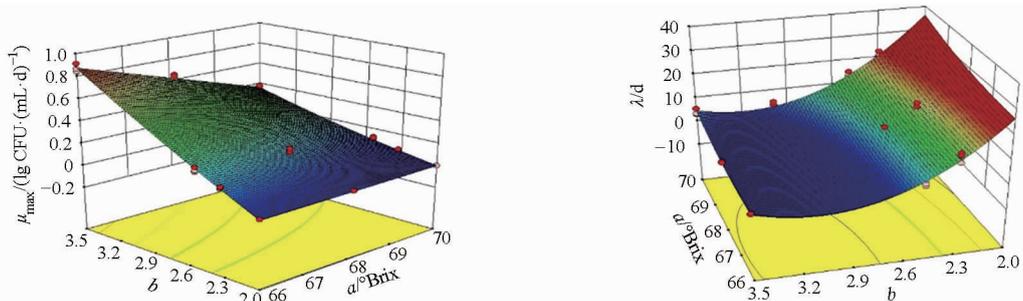
图 1 为 2 个模型的响应面图,可以看出随着 pH 值的降低,菌株 μ_{\max} 逐渐减小(正相关), λ 逐渐增大(负相关)。糖度的增加也引起菌株 μ_{\max} 下降(负相关), λ 增加(正相关),但糖度对 μ_{\max} 及 λ 的影响幅度小于酸度。

2.3 糖度及酸度对 TFS 的影响

表 3 为恒温 25℃ 及变温条件下鲁氏接合酵母在所有组合中的 TFS,通过菌落计数发现,鲁氏接合酵母菌浓度一般高于 10^6 CFU/mL 时培养液发生明

表2 25℃条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母 μ_{\max} 及 λ 影响所得模型的方差分析及回归系数Tab.2 Results of ANOVA analysis and regression coefficient of the model revealing influence of sugar content and acidity on μ_{\max} and λ of *Z. rouxii* at 25℃

模型	来源	平方和	F 值	P 值	回归系数	标准回归系数
μ_{\max} 模型	模型	2.45	1 205.67	<0.000 1		
	<i>a</i>	0.38	943.91	<0.000 1	0.165 04	-0.084 368
	<i>b</i>	1.96	4 812.18	<0.000 1	6.027 34	0.218 73
	<i>ab</i>	0.23	576.39	<0.000 1	-0.085 825	-0.080 607
	a^2	5.122×10^{-7}	1.258×10^{-3}	0.971 9	$6.241 47 \times 10^{-5}$	1.564×10^{-4}
	b^2	3.094×10^{-3}	7.60	0.009 4	0.040 784	0.012 85
	截距				-12.058 74	0.220 68
	失拟项	3.495×10^{-3}	1.31	0.287 0		
	纯误差	9.944×10^{-3}				
	总计	2.47				
	R^2	0.992 1				
λ 模型	模型	1 310.32	128.19	<0.000 1		
	<i>a</i>	235.34	115.11	<0.000 1	-60.505 66	3.042 848
	<i>b</i>	864.08	422.66	<0.000 1	-85.542 06	-8.381 256
	<i>ab</i>	21.21	10.37	0.003 5	-0.984 09	-0.870 112
	a^2	22.71	11.11	0.002 7	0.477 44	1.387 882
	b^2	236.15	115.51	<0.000 1	24.250 56	6.530 928
	截距				2 144.258 62	0.781 22
	失拟项	14.74	2.13	0.113 0		
	纯误差	36.37				
	总计	1 361.42				
	R^2	0.962 5				

图1 25℃条件下糖度与酸度对鲁氏接合酵母 μ_{\max} 及 λ 影响所得模型的响应面图Fig.1 Response surface figures of the model revealing influence of sugar content and acidity on μ_{\max} and λ of *Z. rouxii* at 25℃

显腐败迹象。可以看出,在恒温 25℃ 或者变温条件下,不同组合培养液 TFS 有显著差异 ($p < 0.05$)。总体而言,随着糖度或酸度的增加,培养液 TFS 逐渐增加。pH 值 2.3 时可以大幅抑制鲁氏接合酵母的生长,pH 值 2.0 时可以完全抑制其生长。pH 值 2.5 时可以使苹果浓缩汁主要糖度 (70°Brix) 培养液 TFS 在恒温 25℃ 或变温条件下储存超过 50 d。与同糖度条件下 pH 值 3.5 (苹果浓缩汁常见酸度) 培养液 TFS (恒温 (18.670 ± 1.155) d、变温 (16.333 ± 0.577) d) 相比,稳定性得到大幅提高。对同一组合恒温及变温条件下培养液 TFS 值进行 *t* 检验,结果表明变温条件下培养液 TFS 小于恒温条件下培养液 TFS ($p < 0.05$),说明变温环境 (船运) 有助于鲁

氏接合酵母的生长。

表 4 为响应面分析恒温 (25℃) 及变温条件下糖度与酸度对 TFS 影响所得模型的方差分析结果。结果显示这 2 个模型方差分析极显著 ($p < 0.0001$),失拟项不显著 ($p = 0.252 4$ 、 $p = 0.175 1$),决定系数分别为 0.986 6 和 0.995 8,模型中各因素方差分析极显著 ($p < 0.01$),表明这 2 个模型可以较好地揭示恒温 (25℃) 及变温条件下糖度与酸度对 TFS 的影响。最终得到的模型公式为

$$d_h = 7\,764.202\,50 - 224.954\,07a - 156.036\,75b - 2.987\,89ab + 1.754\,80a^2 + 55.618\,82b^2$$

$$d_b = 8\,451.816\,45 - 248.645\,17a - 87.725\,77b - 4.297\,35ab + 1.959\,63a^2 + 59.412\,83b^2$$

表 3 恒温 (25℃) 及变温条件下鲁氏接合酵母在所有组合中的 TFS

Tab.3 TFS values of *Z. rouxii* in all combinations under isothermal (25℃) and non-isothermal conditions

组合 序号	糖度 /°Brix	pH 值	25℃ TFS/d	变温 TFS/d
1	66	2.0	> 50	> 50
2	66	2.3	43.333 ± 1.155 ^f	38.000 ± 1.000 ^f
3	66	2.5	24.667 ± 1.155 ^d	20.000 ± 1.000 ^d
4	66	3.5	6.000 ± 0.001 ^a	3.333 ± 0.577 ^a
5	68	2.0	> 50	> 50
6	68	2.3	> 50	45.667 ± 1.155 ^e
7	68	2.5	30.670 ± 2.309 ^e	26.333 ± 0.577 ^e
8	68	3.5	6.000 ± 0.001 ^a	3.667 ± 0.577 ^a
9	70	2.0	> 50	> 50
10	70	2.3	> 50	> 50
11	70	2.5	> 50	> 50
12	70	3.0	21.330 ± 2.309 ^e	18.333 ± 1.155 ^e
13	70	3.5	18.670 ± 1.155 ^b	16.333 ± 0.577 ^b

式中 d_h ——恒温 TFS, d d_b ——变温 TFS, d

表 4 同时列出了回归模型各因素的标准回归系数。可以看出,恒温及变温条件下 b 及 b^2 对 TFS 的影响较大(标准回归系数分别为 -14.191 74、14.468 67 及 -18.844 65、16.496 8), a 及 a^2 对 TFS 具有影响,但影响幅度小于 b 及 b^2 (标准回归系数分别为 6.516 14、5.113 97 及 7.138 04、4.984 3), ab 则对 TFS 的影响较小(标准回归系数分别为 -2.601 54 及 -3.611 39)。这 2 个模型中糖度对鲁氏接合酵母 TFS 的影响均小于酸度,说明酸度是鲁氏接合酵母生长的主要限制因素。

图 2 为 2 个模型的响应面图,可以看出恒温 (25℃) 或者变温条件下随着 pH 值降低, TFS 逐渐增大(负相关),当 pH 值小于 2.5 时,较小的减小 pH 值便会大幅增加培养液 TFS。糖度的增加也引起 TFS 延长(正相关),但其对 TFS 的影响幅度小于酸度。

表 4 恒温 (25℃) 及变温条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母 TFS 影响所得模型的方差分析及回归系数结果

Tab.4 Results of ANOVA analysis and regression coefficient of the model revealing influence of sugar content and acidity on TFS of *Z. rouxii* at under isothermal (25℃) and non-isothermal conditions

模型	来源	平方和	F 值	P 值	回归系数	标准回归系数
恒温 (25℃)	模型	3 188.63	295.98	<0.000 1		
	a	288.27	133.79	<0.000 1	-224.954 07	6.516 14
	b	1 090.53	506.13	<0.000 1	-156.036 75	-14.191 74
	ab	29.88	13.87	0.002 0	-2.987 89	-2.601 54
	a^2	143.85	66.76	<0.000 1	1.754 8	5.113 97
	b^2	287.20	133.29	<0.000 1	55.618 82	14.468 67
	截距				7 764.202 5	3.968 98
	失拟项	2.99	1.43	0.252 4		
	纯误差	29.33				
	总计	1 361.42				
变温	R^2	0.986 6				
	模型	4 490.04	1 083.37	<0.000 1		
	a	736.48	888.50	<0.000 1	-248.645 17	7.138 04
	b	3 136.22	3 783.59	<0.000 1	-87.72577	-18.844 65
	ab	120.42	145.28	<0.000 1	-4.297 35	-3.611 39
	a^2	186.50	225.00	<0.000 1	1.959 63	4.984 3
	b^2	796.32	960.69	<0.000 1	59.412 83	16.496 8
	截距				8 451.816 45	2.290 65
	失拟项	2.92	1.95	0.1751		
	纯误差	12.00				
总计	4 504.96					
R^2	0.995 8					

3 讨论

文献[10]指出 700 g/L 葡萄糖质量浓度是鲁氏接合酵母能够生长的最高质量浓度,这与本文研究结果不一致。本文研究结果显示将葡萄糖质量浓度从

810 g/L 提高到 874 g/L 并没有对鲁氏接合酵母的生长指标有较大影响。同时笔者以前关于鲁氏接合酵母耐糖性研究发现其不仅能够在高达 900 g/L 的葡萄糖环境中生长,而且在用 900 g/L 葡萄糖环境中培养的细胞作为种子液时,其耐糖性高达 960 g/L,表明鲁氏接合

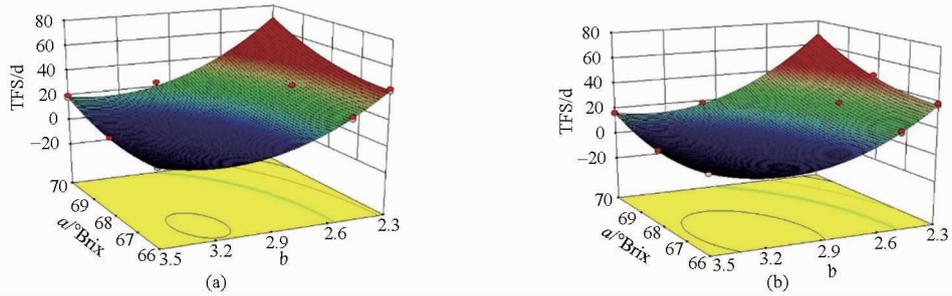


图2 恒温及变温条件下糖度与酸度对鲁氏接合酵母 TFS 影响所得模型的响应面图

Fig. 2 Response surface figures of the model revealing influence of sugar content and acidity on TFS of *Z. rouxii* under isothermal (25°C) and non-isothermal conditions
(a) 恒温(25°C) (b) 变温

酵母具有较好的高糖适应能力,这种适应能力可能是由于高渗环境导致鲁氏接合酵母基因变异造成的^[11-12]。有报道将鲁氏接合酵母归类为嗜高渗酵母而非耐高渗酵母体现了其极端的生理性能^[13-14]。

响应面分析法结果显示酸度是影响鲁氏接合酵母生长的主要限制因素,特别当 pH 值小于 2.5 时,鲁氏接合酵母的 μ_{\max} 大幅减小, λ 及 TFS 大幅延长。而糖度对鲁氏接合酵母生长的影响作用较小。这一结果与国外有关报道相一致,它们也指出酸度是影响鲁氏接合酵母生长的主要限制因素^[15]。因此,可以预测仅通过苹果浓缩汁中的高糖度并不能完全抑制鲁氏接合酵母的生长,文献[8]的研究结果也证实了这一点。高糖度条件的同时适当降低苹果浓缩汁 pH 值(小于 2.5)更能有效抑制鲁氏接合酵母的生长,延长产品保质期。

恒温 25°C 条件下的 TFS 大于变温条件下 TFS,

这可能是由于变温环境中高温条件下产生水蒸气,低温条件下水蒸气冷凝导致培养液表面糖浓度减小继而促进鲁氏接合酵母生长。

4 结束语

研究了恒温 25°C 条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母潜在最大生长速率及迟滞期的影响,以及恒温及变温条件下糖度及酸度对鲁氏接合酵母腐败所需时间 TFS 的影响。结果表明酸度是影响鲁氏接合酵母生长的主要限制因素, pH 值 2.3 时可以大幅抑制鲁氏接合酵母的生长, pH 值 2.0 时可以完全抑制其生长。工业生产条件下很难降低苹果浓缩汁的 pH 值至 2.0,但尽可能降低其 pH 值至 2.5 就可以使得苹果浓缩汁(70°Brix)在恒温 25°C 或变温条件下储存超过 50 d,大幅增加其保质期(pH 值 3.5 时,保质期仅为 16~18 d)。

参 考 文 献

- Mira N P, Teixeira M C. Microbial mechanisms of tolerance to weak acid stress [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013(12): 416.
- Bubnova M, Zemancikova J, Sychrova H. Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses [J]. *Yeast*, 2014, 31(8): 309-321.
- Martorell P, Stratford M, Steels H, et al. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 114(2): 234-242.
- Marvig C L, Kristiansen R M, Madsen M G, et al. Identification and characterisation of organisms associated with chocolate pralines and sugar syrups used for their production [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185: 167-176.
- Combina M, Daguerre C, Massera A, et al. Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(2): 192-197.
- Schneider A, Horn H, Hammes W P. The occurrence of osmophilic yeasts in honey [J]. *Deutsche Lebensmittel-rundschau*, 2003, 99: 310-319.
- Senses-Ergul S, Ozbas Z Y. Characterization of the yeast flora present in some Turkish high-sugar products [J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2006, 52(2): 99-106.
- 王虎玄,岳田利,胡仲秋,等. 陕西浓缩苹果汁中高渗酵母的分离鉴定 [J]. *农业机械学报*, 2015, 46(4): 246-251.
Wang Huxuan, Yue Tianli, Hu Zhongqiu, et al. Identification of osmotolerant yeast in apple juice concentrate from Shaanxi [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015, 46(4): 246-251. (in Chinese)
- 李敏. 巴氏杀菌奶中优势微生物预测模型的建立及风险评估 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- Praphailong W, Fleet G H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts [J]. *Food Microbiology*, 1997, 14(5): 459-468.

- Ma Hongyan. Study on the heavy metal pollution of tailing reclamational crops in Fengxian, Shanxi [D]. Xi'an: Xi'an University of Science and Technology, 2007. (in Chinese)
- 11 Li Z Y, Ma Z W, Yuan Z W, et al. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment[J]. *Science of the Total Environment*, 2014,468-469:843-853.
- 12 刘翠华, 依艳丽, 张大庚, 等. 葫芦岛锌厂周围土壤污染现状研究[J]. *土壤通报*, 2003,34(4):326-329.
Liu Cuihua, Yi Yanli, Zhang Dageng, et al. Cadmium pollution of soil in the surrounding area of Huludao Zinc Plant[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2003,34(4):326-329. (in Chinese)
- 13 吴双桃, 吴晓芙, 胡日利, 等. 铅锌冶炼厂土壤污染及重金属富集植物的研究[J]. *生态环境*, 2004,13(2):156-157,160.
Wu Shuangtao, Wu Xiaofu, Hu Yueli, et al. Studies on soil pollution around Pb-Zn smelting factory and heavy metals hyperaccumulators [J]. *Ecology and Environment*, 2004,13(2):156-157,160. (in Chinese)
- 14 李静, 俞天明, 周洁, 等. 铅锌矿区及周边土壤铅、锌、镉、铜的污染健康风险评价[J]. *环境科学*, 2008,29(8):2327-2330.
Li Jing, Yu Tianming, Zhou Jie, et al. Assessment of health risk for mined soils based on critical thresholds for lead, zinc, cadmium and copper [J]. *Environmental Sciences*, 2008,29(8):2327-2330. (in Chinese)
- 15 王利军, 卢新卫, 荆洪, 等. 宝鸡长青镇铅锌冶炼厂周边土壤重金属污染研究[J]. *农业环境科学学报*, 2012,31(2):325-330.
Wang Lijun, Lu Xinwei, Jing Qi, et al. Heavy metals pollution in soil around the lead-zinc smelting plant in Changqing Town of Baoji City, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012,31(2):325-330. (in Chinese)
- 16 Wang Y C, Qiao M, Liu Y X, et al. Health risk assessment of heavy metals in soils and vegetables from wastewater irrigated area, Beijing-Tianjin city cluster, China[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012,24(4):690-698.
- 17 Hu H, Jin Q, Kavan P. A study of heavy metal pollution in China; current status, pollution-control policies and counter measures [J]. *Sustainability*, 2014, 6(9):5820-5838.
- 18 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- 19 Zhu H N, Yuan X Z, Zeng G M, et al. Ecological risk assessment of heavy metals in sediments of Xiawan Port based on modified potential ecological risk index[J]. *Transaction of Nonferrous Metals Society of China*, 2012,22(6):1470-1477.
- 20 Li Q S, Cai S S, Mo C, et al. Toxic effects of heavy metals and their accumulation in vegetables grown in a saline soil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010,73(1):84-88.
- 21 GB 15618—1995 土壤环境质量标准[S]. 1995.
- 22 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值[M]. 北京: 中国科学出版社, 1990:329-380.
- 23 Li P, Lin C, Cheng H, et al. Contamination and health risks of soil heavy metals around a lead/zinc smelter in southwestern China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113:391-399.
- 24 Stefanowicz A M, Woch M W, Kapusta P. Inconspicuous waste heaps left by historical Zn-Pb mining are hot spots of soil contamination [J]. *Geoderma*, 2014, 235-236:1-8.
- 25 尹仁湛, 罗亚平, 李金城, 等. 泗顶铅锌矿周边土壤重金属污染潜在生态风险评价及优势植物对重金属累积特征[J]. *农业环境科学学报*, 2008,27(6):2158-2165.
Yin Renzhan, Luo Yaping, Li Jincheng, et al. Evaluation of the potential ecological risk of heavy metal pollution in soil and bioaccumulation characteristics of dominant plants insiding Pb-Zn mine [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008,27(6):2158-2165. (in Chinese)
- 26 Burges A, Epelde L, Garbisu C. Impact of repeated single-metal and multi-metal pollution events on soil quality [J]. *Chemosphere*, 2015,120:8-15.
- 27 Mahar A, Wang P, Li R, et al. Immobilization of lead and cadmium in contaminated soil using amendments: a review [J]. *Pedosphere*, 2015, 25(4):555-568.

(上接第 284 页)

- 11 Watanabe J, Uehara K, Mogi Y. Adaptation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* to an osmotic environment through copy number amplification of FLO11D [J]. *GENETICS*, 2013,195(2):393-405.
- 12 Wei Y H, Wang C, Wang M, et al. Comparative analysis of salt-tolerant gene HOG1 in a *Zygosaccharomyces rouxii* mutant strain and its parent strain [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(11):2765-2770.
- 13 Tokuoka K. Sugar- and salt-tolerant yeasts [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, 74(2):101-110.
- 14 Ok T, Hashinaga F. Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts [J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1997, 43(1):39-47.
- 15 Vermeulen A, Daelman J, Van Steenkiste J, et al. Screening of different stress factors and development of growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF) [J]. *Food Microbiology*, 2012,32(2):389-396.