

山葡萄酒苹果酸—乳酸发酵工艺优化

Optimization of malolactic fermentation process condition of northeast China *V.amurensis* wines

韩诚武 高鹏飞 丁玉萍

HAN Cheng-wu GAO Peng-fei DING Yu-ping

(佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007, China)

摘要:为改善山葡萄酒的风味,对其苹果酸—乳酸发酵工艺条件进行优化。结果表明,山葡萄酒苹果酸—乳酸发酵的最佳工艺条件:初始 pH 3.00, 温度 20 °C, 接种量 4 mL/100 mL, 含糖量 10.7 g/L。在最佳工艺条件下对东北山葡萄酒进行二次发酵, 制品 pH 值相对于原发酵葡萄汁升高 0.19 ± 0.05 , 总酸度(以苹果酸计)相对于原发酵葡萄汁降低 (2.67 ± 0.10) g/L, 缓解了山葡萄原酒的酸涩味, 增加了适口性。

关键词:山葡萄; 果酒; 苹果酸—乳酸发酵

Abstract: In order to improve the flavor of *Vitis amurensis* Rupr. wines, adopted the single factor experiment and orthogonal experiment method, aimed to optimize the process condition of the malic acid-lactic acid fermentation. The optimal fermentation conditions were as followed: initial pH 3.00, fermentation temperature 20 °C, inoculation of *Lactobacillus* 4 mL/100 mL and sugar content above 10.7 g/L. Under the optimum conditions, malic acid was converted into lactic acid by malic acid-lactic acid fermentation. pH value was increased 0.19 ± 0.05 , total acidity(in terms of malic acid) decreased (2.67 ± 0.10) g/L, which weaken the tartness of original wine.

Keywords: wild grape; fruit wines; malic acid-lactic acid Fermentation

山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)是葡萄属落叶藤本植物,果实粒小,成熟后为紫黑色,主要分布于中国东北、内蒙古等寒带地区。山葡萄以富含原花青素、黄酮类和白藜芦醇等高效生物活性物质而深受人们的喜欢。东北地区年平均温度低、日照时间短,导致东北山葡萄含酸量高,有机酸量为

15~25 g/L,是普通酿酒葡萄含酸量的 3~5 倍^[1-3]。山葡萄酿制的山葡萄酒酸度大,适口性差,难以生产出高档山葡萄酒,山葡萄酒降酸成为近年来行业研究的热点。苹果酸—乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)是在酒精发酵结束后,乳酸菌利用苹果酸—乳酸酶(malolactic enzyme, MLE)将苹果酸转化为 L-乳酸和 CO₂,属于生物降酸^[4-6]。MLF 优于化学降酸和物理降酸之处是分解葡萄酒中口味酸涩生硬的苹果酸,生成口味柔和的乳酸,二元酸转化为一元酸,酸度降低,口感变得柔和。MLF 也是高档干红葡萄酒改善口味、提高酒质量必要的二次发酵工艺,一部分厚重型干白葡萄酒也采取该工艺^[7-8]。

目前,关于山葡萄酒 MLF 工艺条件的研究较少,尤其含糖量对山葡萄酒降酸的影响尚未见报道。苹果酸—乳酸发酵能否启动并顺利完成,受到诸多因素影响^[9-10]。本研究拟以自筛选耐酸酒类酒球菌 Loe-11 为苹果酸—乳酸发酵菌株,以佳木斯地区产山葡萄为酿酒原料,探究接种量、初始 pH、温度、含糖量对山葡萄酒 MLF 的影响,通过单因素和正交试验法对 MLF 工艺条件进行优化,旨为山葡萄酒的生产开发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 山葡萄及菌株

山葡萄:佳木斯四丰山山葡萄园;

乳酸菌 Loe-11:佳木斯大学生命科学学院发酵工程实验室筛选保存的耐酸酒类酒球菌;

葡萄酒专用活性干酵母:宜昌安琪酵母股份有限公司。

1.1.2 仪 器

台式离心机:TDZ4-WS 型,湖南湘仪离心机仪器有限公司;

磁力加热搅拌器:CJ-78-1A 型,金坛区白塔新宝仪器厂;

精密酸度计:PHS-3C 型,上海雷磁有限公司。

1.1.3 培 养 基

山葡萄汁 200 mL、葡萄糖 30 g、胰蛋白胍

基金项目:黑龙江省教育厅自然科学研究项目(编号:2016-KYYWF-0612);黑龙江省教育厅自然科学研究项目(编号:2016-KYYWF-0545);佳木斯大学校长创新创业基金项目(编号:zzyf2016-29);佳木斯大学研究生科技创新项目(编号:YZ2016_009)

作者简介:韩诚武,男,佳木斯大学讲师,硕士。

通信作者:丁玉萍(1964—),女,佳木斯大学副教授,本科。

E-mail:1479407748@qq.com

收稿日期:2018-03-07

15 g、牛肉膏 10 g、酵母膏 5 g、苹果酸钠 20 g、柠檬酸铵 2 g、MgSO₄ 0.56 g、吐温-80 1 g 依次溶解,混合均匀,蒸馏水定容到 1 L,调 pH 至 4.6,121 °C 灭菌 20 min^[11]。

1.1.4 纸层析液配制 以正丁醇:冰乙酸:蒸馏水=2:1:1(体积比)为展开剂。1 L 展开剂中加入 0.6 g 溴酚蓝显色剂。将展开剂和显色剂混合均匀,倒入层析缸中备用^[12]。

1.2 方法

1.2.1 山葡萄酒的酿制

(1) 山葡萄的处理:去除腐烂、破损果粒,用清水冲洗干净,沥干水分,除梗,破碎。

(2) 主发酵:将破碎的山葡萄装入发酵瓶中,按山葡萄重量 10% 的比例加入蔗糖,接入葡萄酒专用活性干酵母,置室温(18~22 °C)下发酵至发酵瓶恒重,即为发酵结束,过滤,分装,得主发酵干红葡萄酒,4 °C 恒温储藏备用。主要指标:酒精度(125±5) g/L,pH 2.92±0.05,总酸度(13.16±0.50) g/L,总糖(3.7±0.5) g/L。

(3) MLF(二次发酵):在完成主发酵的干红山葡萄酒中接入酒类酒球菌,控制条件,进行苹果酸-乳酸发酵,并测定发酵过程中 pH 的变化。

1.2.2 酒类酒球菌活化与接种

(1) 活化:取冷冻保藏的酒类酒球菌菌种,置室温下 2 h,加入 1 mL 无菌水,并保持 10 min,然后接种至活化培养基上,于 25 °C 厌氧培养 72 h,备用。

(2) 接种:量取活化酒类酒球菌菌种,置于 3 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液;加入无菌水,再于 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,即为洗涤 1 次;重复洗涤 3 次。将沉淀用待接种酒洗入发酵瓶中。

1.2.3 单因素试验设计

(1) 接种量:将酒类酒球菌分别以 2%,4%,6%,8%,10% 的接种量接入用碳酸钾(食品级)调初始 pH 为 3.00 的山葡萄酒中,于 20 °C 下进行发酵,监测苹果酸-乳酸发酵 15~20 d 的 pH 值。每组试验做 3 个重复,结果取平均值。

(2) 初始 pH:用碳酸钾(食品级)分别调初始 pH 值 2.92 的山葡萄酒至 pH 为 3.00,3.05,3.10,3.15,再分别接入 4% 的酒类酒球菌,于 20 °C 下进行发酵,监测苹果酸-乳酸发酵 15~20 d 的 pH 值。每组试验做 3 个重复,结果取平均值。

(3) 发酵温度:调初始 pH 为 3.00 的干红山葡萄酒,按 4% 接种量接入酒类酒球菌、分别置于温度为 16,18,20,22,24 °C 的恒温箱进行发酵,监测苹果酸-乳酸发酵 15~20 d 的 pH 值。每组试验做 3 个重复,结果取平均值。

(4) 含糖量:用葡萄糖将初始 pH 为 3.00 的山葡萄酒含糖量分别调至 3.7,10.7,20.7,50.7 g/L,分别为干红、半干红、半甜、甜红山葡萄酒,按 4% 的接种量接入酒类酒球菌,置于 20 °C 恒温箱进行发酵,监测苹果酸-乳酸发酵 15~20 d 的 pH 值。每组试验做 3 个重复,结果取平均值。

1.2.4 正交试验设计 在单因素试验的基础上,对山葡萄酒一乳发酵的接种量、初始 pH、发酵温度、含糖量进行四因素三水平 L₉(3⁴) 正交试验。每组试验重复做 3 瓶,结果取平均值。

表 1 L₉(3⁴) 正交试验表

Table 1 L₉(3⁴) orthogonal experiment designs table

水平	A 接种量/%	B 初始 pH	C 温度/°C	D 含糖量/(g·L ⁻¹)
1	4	2.92	18	3.7(干红酒)
2	6	3.00	20	10.7(半干红酒)
3	8	3.05	22	20.7(半甜酒)

1.2.5 对比试验 以山葡萄酒原酒为对照,以 pH 值的升高量为指标,纸层析监控苹果酸-乳酸发酵进程,确定山葡萄酒一乳发酵最佳工艺参数。每组发酵 3 瓶,结果取平均值。

1.3 指标测定方法

1.3.1 pH 值的测定 精密 pH 计直接测定。

1.3.2 总酸度的测定 按 GB/T 15038—2006《葡萄酒、果酒通用分析方法》中电位滴定法(以苹果酸计)执行。

1.3.3 苹果酸-乳酸发酵监测 采用纸层析法^[13]。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 接种量对山葡萄酒 MLF 的影响 由图 1 可知,接种量 8%,10% 的酒样第 18 天 pH 值升至最高,接种量 4%,6% 的酒样第 19 天 pH 值升至最高,接种量 2% 的酒样第 20 天 pH 值升至最高。不同接种量(2%,4%,6%,8%,10%)的山葡萄酒发酵后 pH 最大值分别为 3.13,3.19,3.18,3.16,3.10,pH 升高值(即ΔpH)分别为 0.13,0.19,0.18,0.16,0.15。结果表明,接种量对山葡萄酒 MLF 有影响,接种量为 4%~6% 山葡萄酒发酵的 pH 升高值最大。

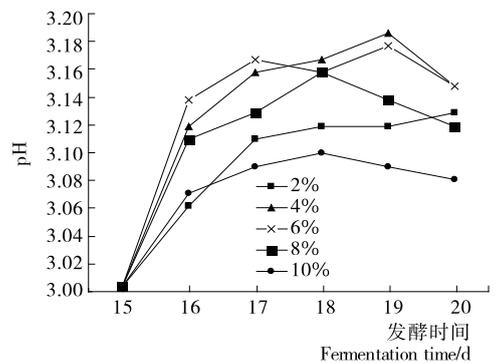


图 1 接种量对山葡萄酒 MLF 的影响

Figure 1 Effects of different inoculations about MLF

2.1.2 初始 pH 对山葡萄酒 MLF 的影响 由图 2 可知,初始 pH 2.92 的酒样第 20 天 pH 值升至最高,其他酒样第 18 天 pH 值升至最高。5 组(pH 为 2.92,3.00,3.05,3.10,3.15)酒样发酵后 ΔpH 分别为 0.13,0.19,0.19,0.17,0.16,初始 pH 为 3.00,3.05 时,ΔpH 最大,高于其他 3 组。初始 pH 为 2.92 原干红山葡萄酒 ΔpH 最小,说明起始 pH 低于 3.00 对乳酸菌的 MLF 有所抑制,影响生物降酸效果。

2.1.3 发酵温度对山葡萄酒 MLF 的影响 由图 3 可知,温度为 16,18,20 °C 时发酵速度基本一致,pH 值均在第 18 天升至最高,之后 pH 值下降;温度为 22,24 °C 2 组酒样发酵

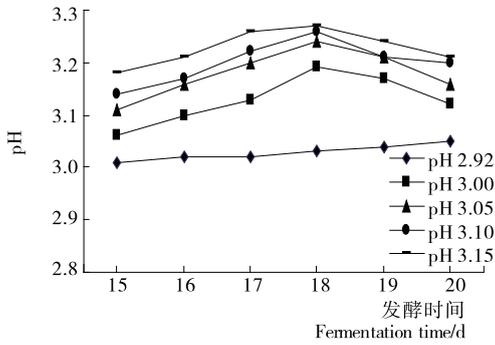


图 2 初始 pH 对山葡萄酒 MLF 的影响

Figure 2 Effect of different initial pH about MLF

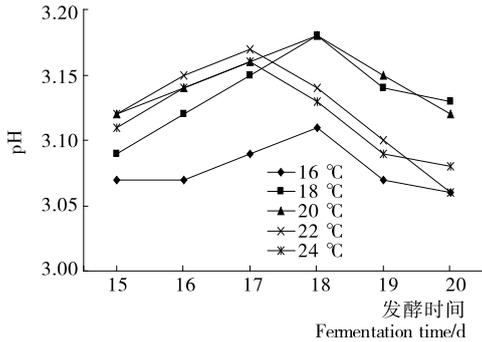


图 3 发酵温度对山葡萄酒 MLF 的影响

Figure 3 Effects of different fermentation temperatures on the MLF

速度较快,第 17 天 pH 值升至最高,之后 pH 值降低。

不同温度下(16, 18, 20, 22, 24 °C)山葡萄酒 MLF 的 Δ pH 分别为 0.14, 0.18, 0.18, 0.17, 0.16。温度为 18、20 °C 2 组 Δ pH 值一样,且高于其他 3 组;16 °C 组样的 pH 升高较缓慢,升高值最小;22, 24 °C 2 组酒样的 pH 升高较快,但升高值不是最大,说明温度过高或过低均不利于山葡萄酒 MLF。

2.1.4 含糖量对山葡萄酒 MLF 的影响 由图 4 可知,4 组山葡萄酒均在第 18 天 pH 值升至最高,之后 pH 值下降。4 组酒样(含糖量分别为 3.7, 10.7, 20.7, 50.7 g/L) pH 最大值分别为 3.13, 3.18, 3.16, 3.11, Δ pH 分别为 0.13, 0.18, 0.16, 0.11。结果表明,含糖量对山葡萄酒 MLF 有影响,含糖量为 10.7 g/L 的山葡萄酒 MLF 的 pH 升高值最大。说明无糖或含糖量过高均不利于山葡萄酒 MLF。

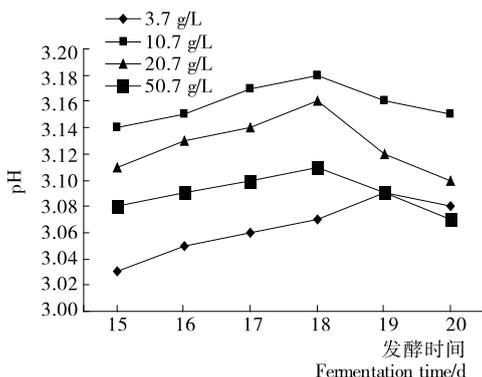


图 4 含糖量对山葡萄酒 MLF 的影响

Figure 4 Effects of different sugar content on the MLF

2.2 MLF 工艺条件优化正交试验

通过对表 2 进行分析,比较极差 R 可得,影响 MLF 因素从主到次顺序是 $B > C > A > D$; B_2 、 C_2 、 A_3 、 D_3 为各因素的优水平,最优组合为 $B_2 C_2 A_3 D_3$ 。即初始 pH 3.00, 温度 20 °C, 接种量 8% 和含糖量 20.7 g/L 是山葡萄酒苹果酸—乳酸发酵的最优工艺条件。

表 2 MLF 工艺条件正交试验

Table 2 Results of MLF conditions by orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	pH	Δ pH
1	1	1	1	1	3.04	0.12
2	1	2	2	2	3.20	0.20
3	1	3	3	3	3.20	0.15
4	2	1	2	3	3.08	0.16
5	2	2	3	1	3.18	0.18
6	2	3	1	2	3.21	0.16
7	3	1	3	2	3.05	0.14
8	3	2	1	3	3.19	0.19
9	3	3	2	1	3.23	0.18
<hr/>						
T_1	0.470	0.420	0.480	0.480		
T_2	0.500	0.580	0.540	0.500		
T_3	0.510	0.490	0.470	0.510		
x_1	0.157	0.140	0.160	0.160		
x_2	0.167	0.193	0.180	0.167		
x_3	0.170	0.163	0.157	0.170		
R	0.013	0.053	0.023	0.010		

2.3 最优工艺对比试验

由表 3 可得:苹果酸—乳酸发酵结束(pH 不在升高即为终止发酵),2 号组 pH 值和总酸度均优于 y 号组。2 号组 pH 升高至 3.19, 比 y 号组高 0.49; 2 号组总酸度降至 9.26 g/L, 降低 2.67 g/L, 比 y 号组低 0.66 g/L, 故 2 号组降酸效果好于 y 号组。最佳工艺组合是 2 号($A_1 B_2 C_2 D_2$), 即初始 pH 3.00, 温度 20 °C, 接种量 4% 和含糖量 10.7 g/L 是山葡萄酒苹果酸—乳酸发酵最佳工艺组合。

分别按正交试验得到的 2 组优化工艺对山葡萄酒进行苹果酸—乳酸发酵对比试验,测发酵 18 d 山葡萄酒的 pH 值、总酸度和苹果酸—乳酸转化程度的纸层析,结果见图 5。

由图 5 可以看出,2 号酒样与 y 号组酒样相比,乳酸斑点大且清晰,苹果酸斑点较小、颜色较淡。2 号酒样苹果酸—乳酸转化效果明显好于 y 号组酒样。纸层析检测结果与表 3 pH 值、总酸度检测筛选结果相吻合,最佳工艺组合是 2 号($A_1 B_2 C_2 D_2$)。

3 结论

山葡萄酒苹果酸—乳酸发酵受初始 pH、发酵温度、接种量、葡萄汁含糖量的影响,通过单因素试验、正交试验和对比试验优化山葡萄酒苹果酸—乳酸发酵的最佳工艺条件是初始 pH 3.00、发酵温度 20 °C、接种量 4% 和葡萄汁含糖量为

表3 对比试验结果

Table 3 Results of comparison experiments

试验号	初始 pH	温度/℃	接种量/%	含糖量/(g·L ⁻¹)	pH _{max}	总酸度/(g·L ⁻¹)
0(未接种)	3.00	20	0	3.9	3.01	11.93
2(B ₂ C ₂ A ₁ D ₂)	3.00	20	4	10.9	3.19	9.26
y(B ₂ C ₂ A ₃ D ₃)	3.00	20	8	20.9	9.92	

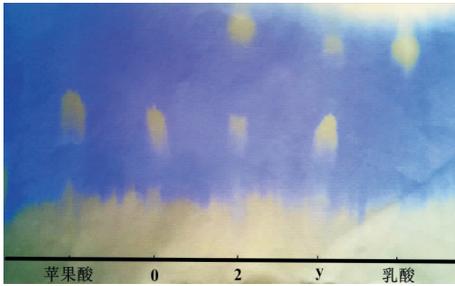


图5 对比试验纸层析图

Figure 5 Paper chromatography picture of comparative experiment

10.7 g/L。在此工艺条件下,MLF 启发顺利,pH 升高 0.19 ± 0.05 ,总酸度降低(2.67 ± 0.10) g/L,使山葡萄酒尖酸口感有一定程度的改善。

通过查阅资料和试验^[9-10]发现苹果酸—乳酸发酵降酸幅度有限,一般为 2~3 g/L,山葡萄酒酸度大,起始 pH 值低,一般在 2.85~2.95,仅利用苹果酸—乳酸发酵降酸难以降到适宜酸度。山葡萄酒的降酸应采用物理降酸、化学降酸和生物降酸 3 种方法相结合。从菌种选育方面,进一步加强生物降酸菌种的选育,选育耐酸、代谢苹果酸能力强的菌株,能够将苹果酸转化为乙醇等非酸性产物^[11-12]。降低山葡萄酒中酸味尖刻的苹果酸含量,改善山葡萄酒酸味,提高山葡萄酒适口性和质量,是今后努力的方向。

参考文献

[1] 崔长伟,刘丽媛,王华,等. 山葡萄综合开发利用研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 276-282.

[2] 宋润刚,路文鹏,张庆田,等. 酿造冰红山葡萄酒新品种北冰红的区域试验[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2014, 4(3): 25-29.

[3] BOUIX M, GHORBAL S. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 20(16): 64-72.

[4] 李瑞国,韩焯,周志江. 葡萄酒苹果酸乳酸发酵研究进展[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8): 228-233.

[5] LI Nan, DUAN Jin-ting, GAO Da-wei, et al. Mutation and selection of *Oenococcus oeni* for controlling wine malolactic fermentation[J]. European Food Research and Technology, 2014, 240(1): 93-100.

[6] RUIZ P, IZQUIERDO P, SESENA S, et al. Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenococcus oeni* strains in low pH wines [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(10): 579-585.

[7] 金刚. 苹果酸—乳酸发酵细菌的多样性及其耐酒精分析[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2015: 66-71.

[8] 彭传涛,贾春雨,文彦,等. 苹果酸—乳酸发酵对干红葡萄酒感官质量的影响[J]. 中国食品学报, 2014, 2(14): 261-268.

[9] 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: 33-42.

[10] 熊健,何翠婵,林伟锋,等. 植物乳杆菌在青梅汁中的生长及苹果酸乳酸发酵特性研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2 850-2 854, 2 914.

[11] 刘东旭,高鹏飞,丁玉萍,等. 东北山葡萄酒 MLF 乳杆菌最佳培养基的筛选[J]. 佳木斯大学学报: 自然科学版, 2017, 35(6): 996-1 000.

[12] 高鹏飞,丁玉萍,刘东旭,等. 工艺条件对寒地东北山葡萄酒生物降酸的影响探究[J]. 中国酿造, 2016, 35(12): 90-93.

[13] IZQUIERDO P, GARCIA E, MARTINEZ J L, et al. Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel[J]. Vitis, 2015, 43(3): 149-153.

(上接第 172 页)

[38] 廖雅丽,张晨捷,彭士明,等. 盐度对云纹石斑鱼抗氧化酶及溶菌酶活性的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(2): 169-176.

[39] 薛宝贵,楼宝,徐冬冬,等. 密度胁迫对黄姑鱼幼鱼生长、代谢及非特异性免疫的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 45-51.

[40] 刘小玲. 应激对黄颡鱼非特异性免疫细胞的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006: 33-35.

[41] 马艺丹,刘红,廖小伟,等. 神秘果种子多酚超声双水相复合提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 173-178.

[42] 徐燕燕,孙杰,陈雅卉. 莲藕多酚浸提工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 128-132.

[43] 高金伟,杜富宽,顾若波,等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和 HPI 轴基因表达影响及甘草甜素的作用[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(6): 817-825.

[44] 谢明媚,彭士明,张晨捷,等. 急性温度胁迫对银鲳幼鱼抗氧化和免疫指标的影响[J]. 海洋渔业, 2015, 37(6): 541-549.