

苹果酒苹果酸乳酸菌顺序发酵工艺的研究

潘海燕, 徐岩*, 王栋, 赵光鳌, 李记明

(江南大学生物工程学院 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文对乳酸菌 *Oenococcus oeni* L4 在起泡苹果酒(cider)中的具体应用工艺和影响因素进行了研究。结果发现, 采用顺序发酵是三种发酵方式中产乙酸的量最少, 发酵温度在 20℃、接种量为 6×10^6 cfu/ml 最有利于苹果酸乳酸发酵的进行。研究还发现, 在相同的发酵时间内, 发酵初始苹果酸含量在 6676.95mg/L 仍能够顺利完成 MLF 发酵。在此工艺条件下酿制的苹果酒不仅实现了苹果酸向乳酸的转化, 并且苹果酒的口感能够得到较大的改善。

关键词: 苹果酒; 乳酸菌; 苹果酸乳酸发酵; 工艺

Study on Sequential Inoculation Technology of Malolactic Fermentation for Cidermaking

PAN Hai-yan, XU Yan*, WANG Dong, ZHAO Guang-ao, LI Ji-ming

(School of Biotechnology, The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This article studied the technology of malolactic fermentation (MLF) for cidermaking. It indicated that the optimum MLF would be accomplished after sequential inoculation, fermented at 20℃, and inoculated with 6×10^6 cfu/ml. With the least little acetic acid produced during the fermentation. And malolactic fermentation could still finish when the concentration of malic acid reach 6676.95mg/L. All ciders made under this technology were of softer mouth-feel and better taste than the cider samples without malolactic fermentation.

Key words: cidermaking; lactic acid bacteria; malolactic fermentation; technology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0109-05

起泡苹果酒(cider)是由苹果汁或浓缩果汁经过发酵而成的一种低度苹果酒, 但是由于苹果汁或浓缩果汁中有有机酸主要以苹果酸为主, 所以导致酿制而成的苹果酒在感官上表现酸涩、粗糙, 很大程度上影响了苹果酒的品质。苹果酒苹果酸乳酸发酵(Malolactic fermentation, MLF)是将苹果酒中苹果酸(二元酸)转化为乳酸(一元酸), 由于乳酸在感官上比较柔和、圆润, 所以苹果酒的口感会明显得到改善^[1]。另外, 乳酸菌自身还能够产生芳香活性化合物, 而改善果酒的最后香气和风味^[2]。所有这些研究表明苹果酸乳酸发酵是苹果酒生产中的不可忽视的一个工艺环节。

苹果酸乳酸发酵的顺利进行受到各种工艺参数的限制, 如苹果酸乳酸发酵的方式、苹果酒的初始苹果酸含量、发酵温度以及乳酸菌的接种量。乳酸菌的接种时间多样, 可以在接种酵母的同时接种乳酸菌(同时发酵), 可以在前酵中期接种乳酸菌(酒精发酵中期), 也可以在前酵结束后接种乳酸菌(顺序发酵)。接种时间的

不同造成了发酵结束以后酒体有机酸组成和其他风味物质的不同, 苹果酒苹果酸乳酸发酵具体采用那种方式, 还需要进一步研究。苹果酒中初始苹果酸的含量也影响着苹果酒最终的酒质, 苹果酸浓度过高对于乳酸菌的选择以及发酵时间都有很大的影响。乳酸菌菌体的生长和代谢受到发酵温度以及接种量的大小的影响, 所以要提高苹果酒的品质也不能忽略这两个因素。在评价苹果酸乳酸发酵对风味的贡献时, 葡萄酒酿造中常采用柔和指数来对这一指标进行量化, 但是由于苹果酒中多酚和酸的含量与葡萄酒有很大差别, 所以将柔和指数运用到苹果酒的评价体系中是一种崭新的尝试。

本研究室选用国内产量最大的红富士苹果品种, 先对大量分离收集得到的乳酸菌进行了生长特性以及 MLF 的比较研究, 筛选出了一株适合我国苹果(汁)组分优良的 *O.oeni* L4, 并且对其生理生化和酿造特性进行了研究^[4]。本研究是在此基础上, 以 *O.oeni* L4 为研究对象, 分别从 MLF 发酵方式、发酵温度、接种量和发酵初始

收稿日期: 2004-02-03 * 通讯作者

基金项目: 国家“十五”科技攻关资助项目(2001BA501AOF)

作者简介: 潘海燕(1978-), 女, 硕士研究生, 主要从事酿造微生物及相关酶学研究。

苹果酸浓度四方面对起泡苹果酒 MLF 工艺进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

本研究所采用菌种为 *O.oeni* L4(研究室收集筛选)。

1.1.2 培养基

菌种保藏培养基主要是改良的 MRS 培养基;
菌种扩培培养基^[5] 稀释果汁 + 0.05% 酵母粉。

1.2 实验方法

1.2.1 *O.oeni* L4 的培养

菌种斜面培养条件 培养温度 30℃, 厌氧培养 4~5 d;

菌种扩培培养条件 培养温度 30℃, 培养 6d 以达到稳定期。

1.2.2 酿酒酵母种子的培养

一级种子为试管培养(装液量 10ml, 培养 1d);
二级种子为 250ml 三角瓶培养(装液量 50ml, 培养 1d)。

1.2.3 苹果酒(cider)的前酵酒的制备

本实验酿造原料为浓缩苹果汁(由烟台安得利公司提供)。首先将浓缩果汁稀释到 13~14(外观糖), 总酸调至 5g/L(以苹果酸计), 前酵是在配有发酵栓的三角瓶(体积 2L 或 3L)中进行的。发酵菌种为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* CCTCC M201022), 发酵温度采用低温发酵(15℃), 发酵时间 15d 左右^[6]。发酵结束后, 采用倒吸方法将上清酒液与下层酵母泥分离, 进行苹果酸乳酸发酵。其前酵结束后酒精浓度在 5%~6%(V/V)。

1.2.4 苹果酸乳酸发酵

前酵结束以后, 将扩培好的乳酸菌按体积比 10% 的接种量(使得初始 10⁶cfu/ml)加入苹果酒中, 发酵温度 20℃, 发酵时间 12~15d。

1.2.5 有机酸的测定^[5]

本文采用高效液相色谱法测定有机酸, 色谱条件如下: 色谱柱: ZORBAX SB (C₁₈, 250 × 4.6mm 5μm); 柱温 30℃; 流动相: 0.1mol/L KH₂PO₄/H₃PO₄, pH2.5; 流速: 0.5ml/min; 进样量: 5μl; 检测波长: 215nm。

1.2.6 细胞密度、色度的测定

细胞密度采用平板计数法测定^[7]。色度的测定采用分光光度计法测定^[8]。

1.2.7 柔和指数的测定

柔和指数 = 酒精度 - (总酸 + 单宁), 总酸以每升苹果酒中相当于硫酸的克数来表示, 单宁也是以每升多少克计。酒精度、总酸的测定参见酿酒工业分析手册^[9],

单宁采用比色法测定^[10]。

1.2.8 苹果酒感官评定

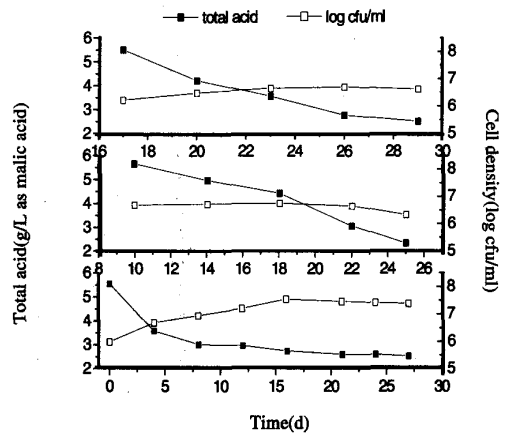
苹果酒的感官评定参见^[11]。

2 结果与讨论

2.1 乳酸菌 *O.oeni* L4 在苹果酒 MLF 中参数的确定

2.1.1 不同发酵方式对苹果酒 MLF 的影响

本文研究了不同发酵方式(同时发酵、酒精发酵中期、顺序发酵)下, 苹果酸乳酸发酵过程中乳酸菌、有机酸以及其它相关指标的变化情况, 目的是为了寻找一种适合我国苹果酒的 MLF 方式。其中图 1 是三种不同接种时间下乳酸菌与总酸的变化关系。



A: 同时发酵; B: 酒精发酵中期; C: 顺序发酵

A: Simultaneous fermentation; B: MLF starting in the middle of alcohol fermentation; C: Sequential fermentation

图1 不同接种时间乳酸菌细胞密度和苹果酒总酸的变化

Fig.1 The courses of *O.oeni* cell density and total acid during fermentations with different inoculation times

从图 1 可以看出, 在同时发酵条件下, 菌体生长较快, 比较三种发酵方式的乳酸菌浓度的变化, 同时发酵情况下, 菌浓度在发酵第 16d 左右最高, 达到 7.54 (log cfu/ml)。而在其它两种方式下, 菌体生长相对缓慢。三种发酵方式下, 总酸在苹果酸乳酸发酵结束后都达到 2.5g/L 左右, 其乳酸菌的细胞密度分别为 7.38 和 6.33、6.62, 说明单位细胞密度下采用顺序发酵有利于提高发酵速率。同时, 本文还比较了三种发酵方式下的苹果酸降解速率(表 1)。由于三种方式下的 MLF 时间不一样, 在 12~26d 之间, 所以苹果酸降解速率也有较大的区别。顺序发酵时苹果酸降解速率最大为 419.79mg/L · d。乙酸由于直接影响着苹果酒口味, 所以其含量的大小是评价 MLF 的另一个重要指标, 在三种发酵方式下其浓度的变化有较大的区别, 根据表 1, 发现同时发酵方式下

表1 不同发酵方式下苹果酒中各参数在MLF前后的变化
Table 1 Comparison of different MLFs in cidermaking

参数	接种时间					
	A		B		C	
	MLF 前	MLF 后	MLF 前	MLF 后	MLF 前	MLF 后
pH	3.83	4.06	3.83	4.10	3.83	4.09
单宁(mg/L)	311.57	278.24	337.06	307.65	315.49	290.00
苹果酸(mg/L)	5682.27	57.73	5575.62	76.13	5337.65	300.20
乙酸(mg/L)	ND	325.80	144.91	258.03	157.25	227.50
发酵时间(d)	26		16		12	
苹果酸降解速率(mg/L·d)	216.33		343.72		419.79	
柔和指数	3.07		3.09		4.18	
色度	0.38		0.48		0.43	

注: A: 同时发酵(Simultaneous fermentation) B: 酒精发酵中期(MLF starting in the middle of alcohol fermentation) C: 顺序发酵(Sequential fermentation)

表2 不同发酵温度下苹果酒中各参数在MLF前后的变化
Table 2 Comparison of MLFs in cidermaking under different temperature

参数	发酵温度					
	15℃		20℃		25℃	
	MLF 前	MLF 后	MLF 前	MLF 后	MLF 前	MLF 后
pH	3.60	4.01	3.60	4.00	3.60	3.97
苹果酸(mg/L)	4486.07	85.71	4486.07	40.74	4486.07	68.79
乙酸(mg/L)	61.99	206.35	61.99	316.38	61.99	500.13
单宁(mg/L)	313.53	301.76	313.53	288.04	313.53	291.96
柔和指数	1.31	3.10	1.31	3.76	1.31	3.18
色度	0.429	0.502	0.429	0.505	0.429	0.502
发酵时间(d)	12		9		9	
苹果酸降解速率(mg/L·d)	366.70		493.92		490.81	

乙酸含量最高, 分析原因, 可能该条件下菌体生长代谢较快, 所以产生的乙酸量也就越多。MLF 结束后, 三种方式下的柔和指数分别为 3.07、3.09 和 4.18, 以顺序发酵柔和指数为最高, 柔和指数越高, 表明口味圆满、醇和而味长^[12]。

通过比较此三种发酵方式, 发现顺序发酵所需要的发酵时间最短, 生成乙酸量最低, 苹果酒的 MLF 宜采用此接种方式。

2.1.2 不同发酵温度对苹果酸乳酸发酵的影响

苹果酒的前酵温度大约在 15℃, 但是乳酸菌的最适生长温度为 25℃, 所以发酵温度对于 MLF 的顺利进行是非常重要的。此外, 发酵温度同时影响着乳酸菌的代谢。本文在实验室的研究规模上, 采用顺序发酵, 考察了温度(15~25℃)对 MLF 的影响, 希望能够找到适合苹果酒 MLF 的发酵温度。

如图 2 所示, 在相同接种量的情况下, 温度越高, 乳酸菌 *O.oeni* L4 生长越快。在 25℃时, 菌体在发酵第 3d 就达到平衡, 而 15℃时菌体达到稳定需要 9d, 可见温度对乳酸菌进行 MLF 的影响非常明显。同时, 从图

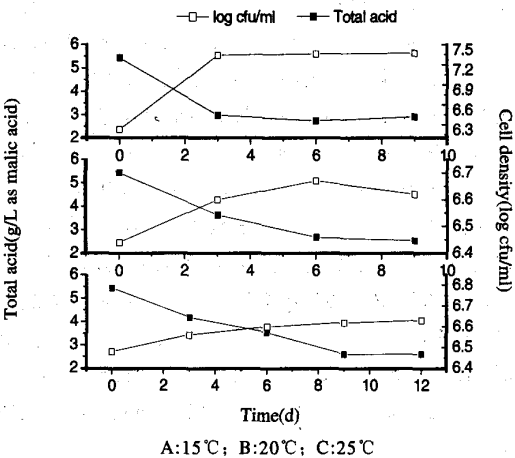


图2 不同发酵温度乳酸菌细胞密度和苹果酒总酸的变化
Fig.2 The courses of *O.oeni* cell density and total acid during fermentations under different temperature

上可以看出, 总酸随着菌体的增殖而下降, 在菌体达到稳定时总酸也基本不再改变, 从而得知大部分苹果酸乳酸转化过程是在 *O.oeni* L4 的生长繁殖期间完成的。

表3 不同初始苹果酸浓度下苹果酒中各参数在 MLF 前后的变化
Table 3 Comparison of MLFs in cidermaking with different initial total acid

参数	发酵初始总酸(g/L)					
	8.53 (A)		6.37 (B)		4.72 (C)	
	MLF 前	MLF 后	MLF 前	MLF 后	MLF 前	MLF 后
pH	3.30	3.69	3.47	3.87	3.65	4.00
单宁(mg/L)	410.78	402.94	412.75	400.98	428.43	410.78
柔和指数	0.35	3.37	1.93	4.42	3.12	4.84
色度	0.817	0.843	0.817	0.850	0.817	0.953
乙酸(mg/L)	176.64	238.54	212.72	241.86	188.53	580.67
苹果酸(mg/L)	8426.70	411.99	6676.95	27.47	4722.86	25.50
发酵时间(d)	12		12		12	
苹果酸降解速率(mg/L · d)	667.89		554.12		393.57	

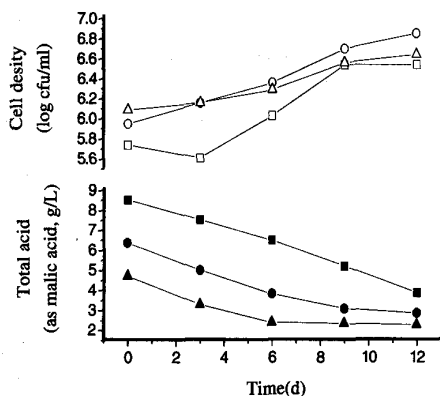
表2列出了不同发酵温度下各参数的变化情况,从研究结果来看,温度越高,MLF所需要的时间越短,当温度大于20℃时,MLF只需要9d,苹果酸降解速率也分别达到493.92mg/L · d(20℃)和490.81mg/L · d(25℃)。然而,温度越高,发酵产生的乙酸也随之升高,尤其当发酵温度为25℃,乙酸含量在MLF后达到了500.13mg/L。从柔和指数的变化来看,当温度在20℃时,柔和指数值为3.76,比MLF发酵前升高了2.45。综合考察温度对MLF的影响,本研究最终选用20℃作为MLF的发酵温度。

2.1.3 不同起始苹果酸浓度对苹果酸乳酸发酵的影响

在苹果酒MLF过程中,起始苹果酸浓度对乳酸菌的生长以及风味的影响也很大。考虑到实际生产中不同的苹果品种、不同的苹果成熟期其果汁中的苹果酸浓度都不一致,本文研究了不同苹果酸浓度对MLF的影响,作者将前酵结束的苹果酒样品用苹果酸分别将总酸调至4.5g/L到8.5g/L之间,再接种*O.oeni* L4进行MLF。结果发现,*O.oeni* L4的增殖在总酸为8.5g/L时受到限制,在发酵过程中细胞密度先下降,再逐渐升高,最终达到稳定(图3),而总酸在小于8.5g/L时不存在此现象。经过测定这三种不同酸度下的苹果酸浓度,发现当苹果酸初始浓度达到6676.95mg/L时,发酵结束后苹果酸仅存27.47mg/L,说明*O.oeni* L4在此苹果酸浓度下仍然能够完成MLF。而当苹果酸初始浓度达到8426.70mg/L时,在发酵12d以后,苹果酸浓度为411.99mg/L,苹果酸乳酸发酵不能彻底完成。

从表3的研究结果可以看出,苹果酸浓度越高,越有利于乳酸菌*O.oeni* L4对苹果酸的降解,其苹果酸降解速率随之升高。从表中还可以看出:当苹果酒体系酸度越高,越不利于乙酸的生成,当总酸从6.37g/L变化到8.53g/L,其乙酸浓度增加了338.61mg/L。

2.1.4 不同接种量对苹果酸乳酸发酵的影响



□: 初始总酸 8.53g/L; ○: 初始总酸 6.37g/L; △: 初始总酸 4.72g/L
□: 8.53g/L; ○: 6.37g/L; △: 4.72g/L of initial total acid

图3 不同酸度下乳酸菌细胞密度和总酸在MLF过程中的变化

Fig.3 The courses of *O.oeni* cell density and total acid during MLF fermentations with different initial total acid

在实际生产中,苹果酸乳酸发酵很难触发,所以酿酒工程师通常通过增加乳酸菌接种量而减少发酵的触发时间。但是过高的接种量可能会使苹果酒在MLF后因乙酸含量过高而具有不好口感,所以本文研究了不同的接种量对MLF的影响。将培养好的乳酸菌种子按照6%、8%、10%的浓度梯度添加到同体积的苹果酒前酵酒中,对MLF过程中各指标的变化进行考察,其结果见图4。

当接种量大于 6×10^5 cfu/ml时,对于MLF的进行几乎没有影响,苹果酸降解速率相差不大。通过实验,发现乳酸菌的接种量越高,发酵结束以后乙酸的浓度也就越高,在接种量从6%变化到10%的过程中,乙酸的浓度增加了近一倍(表4),所以为了提高苹果酒的品质要严格控制接种量。从表4的结果可以得出,在苹果酸

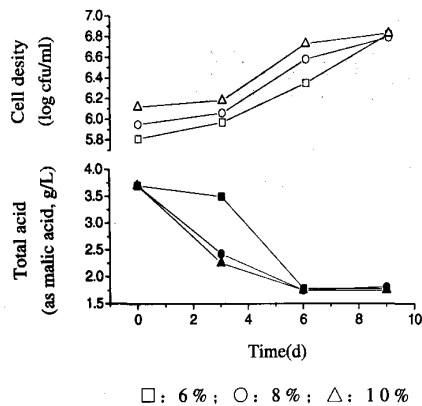


图4 不同接种量下乳酸菌细胞密度和总酸在MLF过程中的变化

Fig.4 The courses of *O.oeni* cell density and total acid during MLF fermentations with different inoculation size

表4 不同接种量下苹果酒中各参数在MLF前后的变化

Table 4 Comparison of MLFs in cidermaking with different inoculation size

参数	接种量			
	MLF	6%	8%	10%
	前	(MLF后)	(MLF后)	(MLF后)
pH	3.95	4.14	4.14	4.21
单宁(mg/L)	451.96	424.51	420.59	399.02
柔和指数	3.04	5.37	5.36	5.22
色度	0.826	0.928	0.934	0.970
乙酸(mg/L)	101.63	267.70	331.27	474.54
苹果酸(mg/L)	5014.52	34.57	37.40	39.80
发酵时间(d)	/	9	9	9
苹果酸降解速率 (mg/L·d)	/	415.00	414.76	414.56

乳酸发酵顺利进行的情况下，采用较小的接种量有利于提高苹果酒的风味，本研究最终采用接种量6%(初始接种细胞密度达到 6×10^5 cfu/ml)。

2.2 苹果酒在MLF前后的感官变化

本文在确定了以上苹果酒酿造工艺参数的基础上，对苹果酒进行了感官品尝，与对照相比较，其感官品尝结果如表5。

经过上述工艺进行苹果酸乳酸后得到的苹果酒通过感官品尝，无论是闻香还是口味比未经过MLF的苹果酒好。这表明本文的研究结果能够应用在实际的苹果酒生产中，并且为大规模苹果酒生产提供研究基础。

3 结论

O.oeni L4 是在大量分离收集到的乳酸菌中筛选得到

表5 苹果酒(cider)的感官品尝结果

Table 5 Sensory evaluation of cider

样品	对照	苹果酒(cider)
色：清澈透明，金黄	色：清澈透明，金黄	色：清澈透明，金黄
感官品尝结果	香：果香中等	香：果香浓郁
	味：较酸涩	味：口感圆润，清爽

注：对照为未进行MLF的苹果酒。

的一株优良的苹果酸乳酸发酵菌株，本文对该乳酸菌在起泡苹果酒中的具体应用进行了研究，初步确定了起泡苹果酒进行苹果酸乳酸发酵的工艺参数，即采用顺序发酵方式、发酵温度20℃、接种量在 6×10^5 cfu/ml。在研究中，我们也发现乙醇的浓度在苹果酸乳酸发酵后有所上升，初步推测这是由于*O.oeni* L4 属于异型发酵，所以在发酵过程中会产生少量的乙醇。

参考文献：

[1] Roger B Boulton. 葡萄酒酿造学—原理及应用[J]. 赵光鳌, 等译. 中国轻工业出版社, 2001. 241-246.

[2] Gilles de Revel, Nathalie Martin, Laura Pripis-Nicolau, et al. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 4003-4008.

[3] Herrero M, Roza C de la, Garcia LA, et al. Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic bacteria in apple juice[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 22: 48-51.

[4] 潘海燕, 徐岩. The Brewing Properties Comparison of *Oenococcus oeni* for Cidermaking[C]. 第五届国际食品科学与工程会议论文集, 2003.

[5] Herrero M, Luis A, García, et al. Organic acids in cider with simultaneous inoculation of yeast and malolactic bacteria: effect of fermentation[J]. Journal of the institute of brewing, 1999, 105: 229-232.

[6] 徐岩. 一种苹果酒酵母和用该酵母发酵酿制苹果酒的方法[P]. 中国专利: 1335392A, 2002. 02.13

[7] Wibowo D Fleet, G H Lee, et al. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Oenococcus oeni*[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1988, 64: 421-428.

[8] 梁冬梅, 李记明, 林玉华. 分光光度法测葡萄酒的色度[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2002, (3): 9-10.

[9] 蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京: 轻工出版社, 1988 .341-342.

[10] 齐凤兰, 庞玉珍. 比色法测定葡萄酒中单宁的条件实验[J]. 天津微生物, 1991, (4): 36-40.

[11] 郭其昌, 郭松泉, 张春娅, 等. 葡萄酒品尝法[M]. 中国轻工业出版社, 2002. 16-36.

[12] E 卑诺. 葡萄酒科学与工艺[M]. 朱宝镛, 等译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 17-18.