

发酵过程果酒成分对苹果酸乳酸发酵的影响

赵国群¹ 张 桂¹ 张秋生² 张 薇²

(1.河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018;

2.河北省产品质量监督检验院, 河北 石家庄 050051)

摘 要: 苹果酸-乳酸发酵 (MLF) 是果酒(葡萄酒、苹果酒)酿造中非常重要的二次发酵过程。本研究采用人工模拟果酒, 研究果酒成分对 MLF 的影响。结果表明, 葡萄糖抑制乳酸菌的 MLF, 果糖却有促进作用, 而且果糖可解除葡萄糖对酿酒酵母菌 MLF 的抑制作用, 果酒中葡萄糖和果糖的浓度及其比例是预测和控制 MLF 的重要参数; 高浓度乙醇、低 pH 抑制乳酸菌的 MLF, 其抑制作用的大小与使用的菌种有关; 酒中酚类物质(没食子酸和阿魏酸)对酿酒酵母菌的 MLF 几乎无任何显著影响; 酒精发酵完成后果酒中营养的缺乏会抑制乳酸菌的 MLF。

关键词: 果酒; 苹果酸-乳酸发酵; 果酒成分

中图分类号: TS262.7; TS261.4; TQ920 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2006)05-0039-04

Investigation on the Effects of Fruit Wine Constituents on Malolactic Fermentation

ZHAO Guo-qun¹, ZHANG Gui¹, WANG Qiu-sheng² and ZHANG Wei²

(1.College of Bioscience and Biotech, Hebei University of Science and Technology; 2. Institute of Product Quality Supervision & Examination, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

Abstract: Malolactic fermentation (MLF) is an important secondary fermentation in fruit wine (including grape wine and cider). The effects of fruit wine constituents on MLF were investigated by manual simulation. The results presented as follows: Glucose inhibited MLF of lactic acid bacteria and on the other hand fructose advanced MLF of lactic acid bacteria. Besides, fructose could relieve the inhibition of MLF of *O. oeni* by glucose. The concentration and ratio of glucose and fructose was an important parameter to predict and control MLF. High ethanol concentration and low pH inhibited MLF of lactic acid bacteria (the inhibition influenced by the used bacteria species). And phenol compounds (gallic acid and ferulic acid) had hardly significant effects on MLF of *O. oeni*. The scarcity of nutrients in wine after alcoholic fermentation would inhibit MLF of lactic acid bacteria. (Tran. by YUE Yang)

Key words: fruit wine; malolactic fermentation; fruit wine constituents

在果酒(葡萄酒、苹果酒)生产中, 苹果酸-乳酸发酵(简称 MLF) 是酒精发酵后由乳酸菌引起的第二次发酵, 该过程将苹果酸经脱羧作用转化为乳酸和 CO₂。许多乳酸菌都能发生 MLF, 如乳杆菌(*Lactobacillus*)、酒明串珠菌(*Leuconostoc*)、片球菌(*Pediococcus*)和酒球菌(*Oenococcus*), 主要是酿酒酵母菌(*Oenococcus oeni*)^[1,2]。MLF 的主要作用是: 降低果酒的酸度; 增加果酒香气的复杂性和进行风味修饰; 增加果酒的微生物学稳定性^[3,4]。MLF 是一个非常重要的过程, 在现代葡萄酒生产工艺中, 大部分红葡萄酒、部分白葡萄酒和苹果酒都必须经过 MLF^[5,6]。

目前, 在果酒生产中 MLF 的方式有两种: 自然

MLF, 由果酒中自然存在的苹果酸-乳酸菌(malolactic bacteria)来完成; 人工接种发酵, MLF 由经过人工选育的苹果酸-乳酸菌制剂来完成。无论是那种方式, MLF 都依赖于苹果酸-乳酸菌在果酒中的生长。MLF 能否顺利启动并最终完成受菌种和果酒环境条件(乙醇含量, pH, SO₂ 浓度及营养条件等)的影响, 生产上常常出现 MLF 发酵迟滞甚至接种失败^[7,8]。因此, 有必要系统地了解发酵过程中果酒各成分对 MLF 的影响, 以便更好地预测和控制 MLF 过程, 从而顺利地完 MLF 发酵。

为了便于研究, 本文使用人工模拟果酒, 研究了糖类、乙醇、苹果酸、营养状况对 MLF 的影响, 以期 MLF 的生产实践提供理论指导。

收稿日期: 2006-01-12

作者简介: 赵国群(1963-), 男, 河北省藁城市人, 博士, 副教授, 从事发酵工程及膜技术方面的教学及科研工作。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株

选用酿酒酒球菌 (*Oenococcus oeni* 11648) 和某苹果酒厂 MLF 使用的短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis* BM2) 作为试验菌株。

1.1.2 MLF 乳酸菌生长培养基

组成: 葡萄糖 5 g/L, 果糖 5 g/L, 酵母抽提物 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, 微量元素溶液 20 mL/L。将配制好的上述液体培养基在 121 ℃ 下杀菌 10 min。

1.1.3 人工模拟果酒

葡萄糖 2 g/L, 果糖 1 g/L, 苹果酸 3 g/L, 乙醇 10 % (v/v), 酵母抽提物 4 g/L, 微量元素溶液 20 mL/L, 然后用 1 M 的 NaOH 溶液调 pH 为 4.0, 指明 pH 的除外。

1.2 试验方法

1.2.1 苹果酸- 乳酸菌的培养

试验菌株接种在 MLF 乳酸菌生长培养基中, 在厌氧条件下于 25 ℃ 培养 72 h, 备用。

1.2.2 MLF 发酵

将 1 mL 上述已培养好 MLF 乳酸菌接种到 100 mL 人工模拟果酒中, 在 25 ℃ 下培养 72 h, 然后终止发酵, 测定样品中苹果酸的浓度。模拟果酒的成分根据试验要求而调整。

1.2.3 苹果酸浓度的测定

采用高效液相色谱法。色谱条件: 色谱柱 Ionpac AS11- HC 4 ×250 mm(P/N 052960), 柱温 35 ℃, 流动相为程控混合的 0.5 mM 和 100 mM 的 NaOH 溶液, 进样量 20 μL。

1.2.4 苹果酸降解率(MAD)

$$MAD = \frac{MLF \text{ 前苹果酸浓度} - MLF \text{ 后苹果酸浓度}}{MLF \text{ 前苹果酸浓度}} \times 100 \%$$

2 结果与分析

2.1 果酒中糖 (葡萄糖和果糖)的影响

模拟果酒的其他成分保持不变, 按表 1 改变糖的种类和浓度, 接种后进行 MLF 发酵。从表 1 可知, 当酒中不含任何糖时, 短乳杆菌的苹果酸分解率(MAD) 仅为 30 %。碳源的缺乏影响乳杆菌的生长, 进而影响 MLF。当葡萄糖的浓度为 2 g/L 时, MAD 增加到 63.9 %; 但酒中葡萄糖的浓度增加为 6 g/L 时, MAD 略有下降。同可利用糖类为葡萄糖相比, 当酒中糖类为果糖时, 短乳杆菌的 MAD 显著增加。果糖的浓度也影响短乳杆菌的 MLF。当果糖的浓度从 2 g/L 增加到 6 g/L 时, MAD 表现为先升后降的趋势。当酒中同时含有葡萄糖和果糖时, 短乳杆菌的 MAD 要低于含相同浓度果糖的酒样的

MAD。这一结果表明葡萄糖抑制短乳杆菌的 MLF。

表 1 酒中糖类(葡萄糖和果糖)及其浓度对 MLF 的影响

糖含量 (g/L)	<i>L. brevis</i>		<i>O. oeni</i>	
	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)
糖 0	0.9±0.02	30.0	2.832±0.02	94.4
葡萄糖 2	1.917±0.05	63.9	1.704±0.04	56.8
葡萄糖 4	1.854±0.03	61.8	1.248±0.01	41.6
葡萄糖 6	1.767±0.02	58.9	1.071±0.02	35.7
果糖 2	2.202±0.03	73.4	2.865±0.03	95.5
果糖 4	2.397±0.04	79.9	2.865±0.02	95.5
果糖 6	2.055±0.02	68.5	2.871±0.01	95.7
葡萄糖 2 + 果糖 2	1.965±0.02	65.5	2.865±0.02	95.5

酿酒酒球菌的 MLF 与短乳杆菌的 MLF 不同。当酒中不含任何糖时, 酿酒酒球菌仍表现出很高的 MAD, 为 94.4 %。这一结果表明, 不同的菌种有着不同的 MLF 活力, 酿酒酒球菌的 MLF 活力要远远高于短乳杆菌。从表 1 可看出, 当酒中含 2 g/L 葡萄糖时, MAD 降低明显, 而且 MAD 随着酒中葡萄糖浓度的增加而降低。这也表明, 葡萄糖抑制酿酒酒球菌的 MLF。当酒中的可利用糖类为果糖, 且浓度从 2 g/L 增加到 6 g/L 时, MAD 几乎相同。还表明当酒中同时含有葡萄糖和果糖时, 酿酒酒球菌的 MAD 保持不变。这意味着当果糖存在时葡萄糖无抑制酿酒酒球菌 MLF 的作用。

从试验结果可看出, 果酒中葡萄糖和果糖对乳酸菌的 MLF 有很大的影响, 而且与所使用的菌种有关, 因此果酒中葡萄糖和果糖及其浓度是 MLF 控制工艺中的一个重要参数, 由果糖含量较高的果汁制得的果酒应更易进行 MLF 发酵, 但葡萄糖与果糖的比例对 MLF 的影响还有待进一步研究。Miranda^[9]等人 1997 年报道了葡萄糖对酿酒酒球菌的 MLF 有抑制作用。当果糖存在时, 由葡萄糖造成的这种抑制作用可完全解除。在本试验中得到了相同的结论。然而, 在试验中发现当酒中同时含有葡萄糖和果糖时, 短乳杆菌的 MAD 要低于含相同浓度果糖的酒样的 MAD。Miranda 等人当时共研究了 4 个酿酒酒球菌菌株 M3, 8A, LOD004 和 LOD004 的葡萄糖抑制现象。他们发现葡萄糖抑制现象仅发生在前两个菌株上。因此, 葡萄糖造成的 MLF 抑制是否发生取决于所使用的乳酸菌种。

2.2 乙醇浓度的影响

为了研究乙醇对 MLF 的影响, 模拟果酒的其他成分保持不变, 仅改变乙醇的浓度, 接种后进行 MLF 发酵, 试验结果见表 2。如预料的那样, 乙醇抑制乳杆菌的 MLF, 但抑制作用与乙醇浓度并不呈线性关系。当乙醇浓度低于 10 %时, 几乎不表现对短乳杆菌的 MLF 活性

的抑制。然而, 当乙醇浓度大于 12 % 时, 短乳杆菌的 MAD 剧烈下降, 乙醇显示出了强烈的抑制作用。从表 2 可看出, 乙醇同样表现出对酿酒酒球菌 MLF 的抑制作用。但与短乳杆菌不同的是, 当乙醇浓度大于 12 % 时, 酿酒酒球菌的 MAD 稍有下降。这个试验结果表明, 不同乳酸菌对乙醇的忍耐性是不同的, 选用高乙醇忍耐性的乳酸菌对 MLF 的发生及顺利完成很重要。

表 2 酒中乙醇浓度对 MLF 的影响

乙醇 浓度 (%, v/v)	<i>L. brevis</i>		<i>O. oeni</i>	
	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)
0	1.929±0.02	64.3	2.865±0.03	95.5
3	1.905±0.03	63.5	2.856±0.04	95.2
5	1.917±0.02	63.9	2.862±0.05	95.4
8	1.899±0.03	63.3	2.859±0.03	95.3
10	1.893±0.04	63.1	2.865±0.02	95.5
12	0.564±0.05	18.8	2.781±0.04	92.7

2.3 苹果酸及 pH 的影响

酒样中的苹果酸浓度变化及其 pH 值见表 3。苹果酸的浓度影响果酒的 pH 值, 进而影响乳酸菌的生长和 MLF。低 pH 被认为是抑制乳酸菌生长及 MLF 活性的主要因素之一^[10]。如表 3 所示, 当苹果酸浓度为 1 g/L (pH3.91) 时, 0.154 g/L 苹果酸被降解, 短乳杆菌的 MAD 很低, 为 15.4 %。当苹果酸浓度为 2 g/L (pH3.72) 时, 0.114 g/L 苹果酸被降解, 短乳杆菌的 MAD 仅为 5.7 %。对于更高浓度苹果酸, 短乳杆菌的 MAD 稍有下降。从表 3 中还可看出, 号酒样与对照的成分相同, 所不同的仅是 pH 值, 然而 号酒样短乳杆菌的 MAD 要远低于对照。这说明短乳杆菌对 pH 敏感。

表 3 酒中苹果酸浓度对 MLF 的影响

苹果酸 浓度 (g/L)	<i>L. brevis</i>		<i>O. oeni</i>	
	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)
① 1	0.154±0.02	15.4	0.911±0.03	91.1
② 2	0.114±0.03	5.7	1.890±0.03	94.5
③ 3	0.165±0.02	5.5	2.775±0.02	92.5
④ 4	0.204±0.02	5.1	1.508±0.05	37.7
对照	1.893±0.03	63.1	2.865±0.03	95.5

酿酒酒球菌在不同苹果酸浓度及 pH 值下的 MLF 表现与短乳杆菌有很大的不同。当苹果酸浓度为 1 g/L (pH3.91) 时, 有 0.911 g/L 苹果酸被其降解, 其 MAD 为 91.1 %, 远高于同等情况下短乳杆菌的 MAD, 且酒样中苹果酸的浓度从 1 g/L (pH3.91) 增加到 3 g/L (pH3.08) 时, MAD 并没有降低, 而是稍有增加。此外, 当 号酒样与对照相比时, 号酒样酿酒酒球菌的 MAD 略低于对照。显然酿酒酒球菌对 pH 胁迫的抵抗力比短乳杆菌要

大得多。如所预料的那样, 当酒样中苹果酸的浓度超过 4 g/L (pH2.90) 时, 酿酒酒球菌的 MAD 剧烈下降, 显示出了显著的低 pH 抑制 MLF。

从表 3 中还可发现, 号酒样的 pH 与对照很近似, 但无论是酿酒酒球菌还是短乳杆菌, 其 号酒样的 MAD 均低于对照, 这表示苹果酸盐有刺激 MLF 活性的作用, 其程度取决于苹果酸盐的浓度和乳酸菌种类。Loubierre1992 年也发现苹果酸盐有刺激酿酒酒球菌细胞生长和 MLF 活性的作用^[11]。

2.4 酚类化合物 (没食子酸和阿魏酸) 的影响

果酒尤其是红葡萄酒含有丰富的酚类化合物。为了研究酚类化合物对乳酸菌 MLF 的影响, 在模拟果酒中加入没食子酸和阿魏酸, 接种后进行 MLF 发酵, 其试验结果见表 4。同未加酚类化合物的对照相比, 添加没食子酸后短乳杆菌的 MAD 增加, 从而表现出对短乳杆菌 MLF 的刺激作用。当酒样中阿魏酸的浓度从 50 mg/L 增加到 100 mg/L 时, 阿魏酸可增加短乳杆菌的 MAD 而表现出刺激作用。但阿魏酸的浓度超过 200 mg/L 时却表现出抑制作用。

表 4 酒中酚类物质对 MLF 的影响

酚类物质 (mg/L)	<i>L. brevis</i>		<i>O. oeni</i>	
	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)
没食子酸 50	2.022±0.02	67.4	2.892±0.04	96.4
没食子酸 100	2.055±0.03	68.5	2.856±0.02	95.2
没食子酸 200	2.076±0.03	69.2	2.868±0.03	95.6
阿魏酸 50	2.046±0.02	68.2	2.859±0.05	95.3
阿魏酸 100	2.232±0.05	74.4	2.862±0.02	95.4
阿魏酸 200	1.572±0.04	52.4	2.883±0.03	96.1
对照	1.893±0.05	63.1	2.865±0.05	95.5

从表 4 可看出, 在本试验条件下, 没食子酸和阿魏酸的添加对酿酒酒球菌的 MLF 几乎无任何显著影响。这一点并不令人奇怪, 因为对照酒样中 95 % 以上的苹果酸已被分解。因此, 酚类化合物对 MLF 的影响取决于所用的 MLF 菌种。

2.5 对酒中营养状况的影响

发生 MLF 的乳酸菌有复杂的营养需求, 而酒中的营养状况取决于葡萄或苹果的品种、季节、果酒的加工技术和水平等条件。酵母抽提物含有丰富的氨基酸、维生素及微量元素。在本研究中, 我们以酒样中酵母抽提物添加的多少来考察酒精发酵完成后酒中营养状况对 MLF 的影响, 结果见表 5。

表 5 表明, 当酒中不添加酵母抽提物时, 酿酒酒球菌和短乳杆菌均表现出最低的 MAD, 尤其是短乳杆菌的 MAD 仅为 6.1 %。酒中营养的缺乏抑制了乳酸菌的

表 5 酒中营养状况对 MLF 的影响

酵母抽提物 (g/L)	<i>L. brevis</i>		<i>O. oeni</i>	
	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)	降解苹果酸 (g/L)	降解率 (%)
0	0.183±0.03	6.1	1.629±0.05	54.3
2	1.884±0.05	62.8	2.166±0.03	72.2
4	1.893±0.03	63.1	2.865±0.03	95.5

生长及 MLF。当酒中添加酵母抽提物后,酿酒酒球菌和短乳杆菌的 MAD 大幅度增加。尤其是酿酒酒球菌,其 MAD 随着酵母抽提物浓度的增加而增加。从表 5 中还可发现酿酒酒球菌的 MLF 活力远高于短乳杆菌。

据 Tracey 和 Britz 1989^[12]报道,氨基酸对于 MLF 乳酸菌的生长很重要。精氨酸、谷氨酸、胱氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、色氨酸和酪氨酸对于酿酒酒球菌的生长是必需的。甘氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和酪氨酸可激发 MLF,但并不促进细胞生长。在酒样中添加酵母抽提物增加乳酸菌的 MAD,其原因可能是: 提供足够的营养来满足乳酸菌生长的需要。 酵母抽提物含有可激发乳酸菌 MLF 的氨基酸。当氨基酸在酒中浓度较低时,乳酸菌的 MLF 受到抑制。Fourcassie1992 年^[6]报道,酒中亮氨酸、脯氨酸和酪氨酸的缺乏,虽然不影响酿酒酒球菌细胞的生长,但会降低其苹果酸的分解率。这些氨基酸的缺乏可能会限制乳酸穿过细胞膜的运输,从而影响 MLF。

在果酒的实际生产中,可采取以下措施来改善酒精发酵后酒中的营养状况: 延长果皮的浸泡时间,增加果皮中营养物质的溶出; 推迟倒酒时间,增加酵母自溶物; 人为添加营养物质如酵母抽提物等。

3 结论

通过人为地改变果酒的成分,研究了果酒中糖类、乙醇、苹果酸、酚类化合物和酒中营养状况对 MLF 的影响。研究表明:

3.1 葡萄糖对乳酸菌的 MLF 有抑制作用,葡萄糖的浓度越高,其抑制作用越强;同葡萄糖相比,果糖可促进乳酸菌的 MLF,而且果糖的存在可解除由葡萄糖产生的对酿酒酒球菌的 MLF 的抑制作用,因此,葡萄酒中果糖、葡萄糖的含量及比例可能是预测 MLF 能否发生及顺利完成的重要指标。果酒中葡萄糖和果糖对乳酸菌的 MLF 的影响也与所使用的菌种有关。

3.2 乙醇抑制乳酸菌的 MLF,其抑制作用的大小与使用的菌种有关,酿酒酒球菌的乙醇忍耐能力远比短乳杆菌高。

3.3 低 pH 值抑制乳酸菌的 MLF。当 pH 为 2.9 时,酿酒酒球菌的 MLF 受到明显的抑制,而短乳杆菌在 pH 为

3.9 时即受到明显的抑制。苹果酸盐有刺激 MLF 活性的作用。

3.4 酒中酚类物质(没食子酸和阿魏酸)对酿酒酒球菌的 MLF 几乎无任何显著影响。

3.5 酒精发酵完成后酒中营养的缺乏会抑制乳酸菌的 MLF。因此,为了顺利启动并完成 MLF,酒精发酵后酒中应含有足够的营养物质。

参考文献:

- [1] Lonvaud-Funel, A. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, (126): 209- 214.
- [2] 潘海燕,徐岩,赵光鳌.苹果酸乳酸发酵的研究进展[J].食品与发酵工业, 2003, (11): 75- 80.
- [3] Henschke, P. A. An overview of malolactic fermentation research[J]. Wine Industry Journal, 1993, (2): 69- 79.
- [4] Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. and Fleet, G.H. Practical implications of malolactic fermentation: A review[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1985, (36): 290- 301.
- [5] Versari, A., Parpinello, G.P. and Cattaneo, M. Leuconostoc oenos and malolactic fermentation in wine: a review[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, (23): 447- 455.
- [6] 张春晖,夏双梅,张军翔.生物工程技术在苹果酸- 乳酸发酵中的应用[J]. 酿酒科技, 2002, (5):51- 53.
- [7] Maicas, S., Natividad, á. N., Ferrer, S. and Pardo, I. Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating Oenococcus oeni[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000, (16): 805- 810.
- [8] Fourcassie, P., Makaga-Kassard, E., Belarbi, A. and Maujean, A. 1992. Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by Leuconostoc oenos strains in 18 media deficient in one amino acid[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1992, (73): 489- 496.
- [9] Miranda, M., Ramos, A., Veiga-da-cunha, M., Loureiro-dias, M. and Santos, H. Biochemical basis for glucose-induced inhibition of malolactic fermentation in Leuconostoc oenos[J]. Journal of Bacteriology, 1997, (179): 5347- 5354.
- [10] Pimentel, M.S. and Silva, M.H. 1994. Growth and metabolism of sugar and acids of Leuconostoc oenos under different conditions of temperature and pH[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1994, (76): 42- 48.
- [11] Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M.J., Lindley, N.D. and Pareilleux, A. Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium Leuconostoc oenos grown on glucose-malate mixtures[J]. Journal of Bacteriology, 1992, (174): 5302- 5308.
- [12] Tracey, R.P. & Britz, T.J. 1989. The effect of amino acids on malolactic fermentation by Leuconostoc oenos[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1989, (73): 589- 592.