

低醇葡萄酒酿造固定化工艺研究

薛海燕

(浙江省台州学院生命科学院, 浙江 台州 317000)

摘 要: 研究海藻酸钠固定葡萄酒酵母生产低度葡萄酒的工艺。试验确定最佳的固定化细胞浓度为 10^9 个/mL, 最佳固定化颗粒直径为 0.3 cm, 淋包固定化颗粒的最佳海藻酸钠浓度为 1.4 %, 最佳平衡液为 0.05 mol/L 氯化钙溶液, 加入 4 % (v/v) 的葡萄汁, 细胞固定化技术可以较好地维持细胞活力。

关键词: 葡萄酒; 低醇葡萄酒; 葡萄酒酵母; 发酵; 固定化; 工艺

中图分类号: TS262.6; TS261.4; Q814.2 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2007) 11- 0065- 03

Study on Immobilization Techniques of Low- alcohol Grape Wine

XUE Hai-yan

(Taizhou Life Science Institute, Taizhou, Zhejiang 317000, China)

Abstract: The technique of *saccharomyces uvarum* immobilization in sodium alginate to produce low-alcohol grape wine was studied. The optimum technical conditions were as follows through experiments: the optimum density of the immobilized *saccharomyces uvarum* cell was 10^9 cells/mL, the optimum diameter of the immobilized granule was 0.3 cm, the optimum density of sodium alginate to enwrap the granule was 1.4 %, and the optimum balance solution was 0.05 mol/L Ca-Cl_2 solution with addition of 4 % grape juice. Cell immobilization techniques could maintain good cell vitality.

Key words: wine; low-alcohol grape wine; *saccharomyces uvarum*; fermentation; immobilization

葡萄酒酒精度较高(12 %vol 左右), 限制了某些消费者的饮用, 如青少年、育龄期妇女及一些由于药物原因不能摄入过多酒精的病人和司机等。低醇葡萄酒具有普通葡萄酒的色泽和香气, 其营养成分与普通葡萄酒基本一致, 只是酒精度低, 避免了高酒精度对人体的不良影响, 使人们能够更经常、更多地饮用葡萄酒, 从而发挥其保健作用^[1]。同时, 各类酒的降度已经是酿酒产业发展的趋势, 大力研究开发低醇葡萄酒必能带来良好的社会效益和经济效益。生产低度葡萄酒的原理方法主要有利用减少葡萄或葡萄汁中可发酵性糖的原理生产低醇葡萄酒, 利用从葡萄酒中移走酒精的原理生产低醇葡萄酒, 中途抑制发酵法生产低醇葡萄酒。中途抑制法有成本低、方法直接简便、效果好、对葡萄酒的影响小的特点^[2]。本研究用固定化葡萄汁酵母来生产低度葡萄酒。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种: 葡萄汁酵母, 湖北工业大学菌种试验室保存。

葡萄: 台州市场采购。

试剂: 海藻酸钠、氯化钙、酵母膏、牛肉膏、氯化钠。

仪器: 比重瓶, 蒸馏瓶, 水浴锅, 恒温培养箱, 显微镜,

糖度计, 注射器。

1.2 方法

活化培养基: 1 %酵母膏, 2 %蛋白胨, 2 %葡萄糖。

菌种保存培养基: 活化培养基中加入 2 %琼脂。

发酵培养基: 葡萄汁加入 50 mg/L 的 SO_2 。

菌种活化: 活化培养基接入菌种, 26 °C 培养 20 h。

菌体计数: 用梯度稀释法稀释到 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} , 涂布平板, 选取适当稀释度换算菌体浓度。

海藻酸钠溶液: 加热蒸馏水溶解一定量海藻酸钠, 降温至 30 °C。

海藻酸钠- 酵母菌悬液: 菌种活化菌液用 4000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入原菌液 2 倍的 2 %葡萄糖溶液, 震荡后 4000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 按要求配制固定化酵母菌液的浓度, 计算要加入的海藻酸钠的体积。

葡萄汁酵母固定: 取一定量无水氯化钙, 用蒸馏水配成 2 mol/L 的溶液, 置于设定温度的水浴锅中恒温 27 °C, 用选定的注射器将海藻酸钠- 酵母菌悬液点滴滴入氯化钙溶液中造粒, 并恒温维持 1 h, 使酵母充分固定化。倾去上清液后, 用蒸馏水冲洗固定化酵母一次, 然后重新置于 0.05 mol/L 的氯化钙溶液中平衡 24 h^[3]。

收稿日期: 2007- 07- 20

作者简介: 薛海燕(1979-), 男, 湖北人, 教师, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程, 发表论文多篇。

葡萄汁制备:葡萄漂洗后,用粉碎机粉碎,然后用纱布粗滤,滤液再用滤纸过滤,滤液保存在冰箱中。

葡萄汁发酵:接入计算好量的固定化的酵母到三角瓶中,设定好恒温培养箱的温度,转速 150 r/min,发酵时加入 50 mg/mL 的 SO_2 ,发酵终止时用纱布过滤,去除固定化酵母。

海藻酸钠颗粒直径的测定:在 100 个同一批次海藻酸钠颗粒中随机取 30 个,用游标卡尺测量颗粒直径,计算平均数。

酒精度的测定^[4]:采用蒸馏法测定。取 100 mL 成熟发酵液到蒸馏瓶中,加入 100 mL 水,混匀后蒸馏。取馏出液 100 mL。用酒精比重计测定馏出液中的酒精浓度。

残糖的测定:采用糖度计测定。

口感评定:滤纸过滤的发酵液,澄清后让 20 人品尝,分值平均值为最终分值。味道生涩,口感非常差,打分为 0;口感有涩味,难入口,打分为 1;口感较好,打分为 2;口感非常好,有淡淡香味,打分为 3。

固定化酵母颗粒强度:感官法^[9]。

2 结果与分析

2.1 酵母菌浓度对固定化特性的影响 表 1)

表 1 固定酵母浓度对发酵的影响

项目	酵母浓度(个/mL)				
	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}
酒精度(%vol)	5.3	5.2	5.0	5.1	5.1
残糖(g/L)	6.55	6.62	7.01	7.28	8.06
口感	0	0	0	1.2	0
颗粒强度	+++	+++	+++	+++	++

注:“+”代表颗粒的强度。

发酵温度为 26℃,接种量为 10%,发酵时间为 60 h,固定化酵母的颗粒直径为 0.3 cm。当菌体包埋的浓度为 10^{10} 个/mL 时,酒精度最低,但是低度葡萄酒更重要的是要有较丰富的营养功能和口感,在该菌体浓度下,葡萄酒的口感非常差,生涩味和酸味较重,难入口,颗粒强度也较差。原因可能是颗粒内部的菌体浓度过高,外界物质的输送已经远远不能满足菌体正常的代谢需求,所以酒精度下降,而且从残糖看,在正常的代谢途径下,残糖浓度应该在 9.0 g/L,测得的糖度为 8.06 g/L,说明有一部分糖转化为其他物质,而这部分物质可能就是引起口感较差的原因。在菌体浓度大于 10^9 个/mL 时,颗粒的强度差别不显著,当菌体浓度为 10^9 个/mL 时,酒精度比 10^6 个/mL 和 10^7 个/mL 要低,原因是在固定化的环境下,物质输送受影响,在固定菌体浓度较低时,每一个菌体所拥有的有效物质交换面积要大一些,物质转化为酒精的速度更快,所以酒精度更高。 10^8 个/mL 的菌体浓度比 10^9 个/mL 的酒精度低,可能是因为 10^9 个/mL 菌体的浓度较适宜葡萄酒的发酵环境,因而它的转换效率更高,口感也最好,固定化颗粒的强度也最好。在发酵 72 h 后,破开固定化颗粒,显微镜下观察,发现 10^9 个/mL 的固定化菌体形态均一,结构完整, 10^{10} 个/mL 的菌体有 20% 左右出现自溶现象。从酒精度、葡萄汁发酵

的口感及颗粒硬度等方面综合考虑,较适宜的固定化细胞浓度为 10^9 个/mL。

2.2 颗粒直径对葡萄汁发酵的影响

选用不同型号的针头,制得不同直径的固定化酵母颗粒,在发酵温度为 26℃,10% 的接种量,发酵时间为 60 h 的条件下对葡萄汁发酵。结果见表 2。

表 2 颗粒直径对葡萄汁发酵的影响

项目	颗粒直径(cm)				
	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
酒精度(%vol)	5.1	5.1	5.0	4.80	4.72
残糖(g/L)	7.01	7.18	7.21	7.41	7.50
口感	1	1.20	0.95	0.75	0.4
颗粒强度	+++	+++	+++	++	++

注:“+”固定化酵母颗粒的硬度。

从表 2 可看出,随颗粒直径的增加,酒精度总体呈现下降的趋势,糖度总体呈现上升趋势。当颗粒直径为 0.3 cm 时,口感最好;当颗粒直径为 0.2 cm 时,酒精度与颗粒直径为 0.3 cm 的相同,但是残糖比颗粒直径为 0.3 cm 的少,口感也相对较差;仔细观察颗粒在发酵三角瓶中的分布发现,在相同转速下,颗粒直径为 0.3 cm 的分布更加均匀,而颗粒直径为 0.2 cm 的都集中于瓶的底部。因此,由于局部的菌体浓度过高,可能使菌体代谢发生轻微改变,产生一些不利于口感的物质,这从前者残糖浓度为 7.01 g/L,后者为 7.18 g/L 得以证明。随着菌体直径的增加,物质在颗粒缝隙间的流动难度增加,不利于物质的代谢,所以酒精度降低,口感也较差,有较强的刺口感。口感最好的为颗粒直径为 0.3 cm,颗粒强度也相对较好,所以选固定化颗粒直径为 0.3 cm。

2.3 淋包液浓度对固定化效果的影响

中途抑制法生产低度葡萄酒的关键是彻底移出酵母或终止酵母产酒精的代谢。发酵温度为 26℃,10% 的接种量,固定化酵母的颗粒直径为 0.3 cm,菌体固定化的浓度为 10^9 个/mL,发酵 60 h 后用灭菌的纱布过滤,镜检发现,有不同数量的酵母菌在葡萄汁的发酵液中存在,这对低度葡萄酒的生产是非常不利的。原因可能是在固定化颗粒时,有一部分固定的酵母细胞在颗粒的外面,仅仅被一极其薄的薄层包裹,在发酵中受外界因素(撞击、摩擦等)的影响,薄层被破坏,在最外层的酵母细胞渗漏出来,因此非常有必要在酵母固定化颗粒表面加上保护层。加保护层的方法为用小型喷雾器喷雾颗粒,然后让颗粒分散倾倒入氯化钙溶液。

表 3 不同海藻酸钠淋包液浓度对固定化效果的影响

项目	海藻酸钠浓度(%)					
	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2
形状均一度	好	好	一般	一般	差	很差
固定效果	差	好	好	不好	不好	不好
酒精度(%vol)	5.1	5.1	5.1	5.0	5.0	5.0
残糖(g/L)	7.18	7.18	7.18	7.21	7.21	7.21
口感	1.20	1.20	1.20	1.00	1.00	1.00

从表 3 可以看出,用不同浓度的海藻酸钠形成外包

层,当海藻酸钠溶液的浓度大于 1.8 %时,形状极不均匀,而且发酵 60 h 后,酵母渗漏的数量虽然减少,但仍然有酵母游离出来,这种保护层形成时决大部分颗粒仅仅被包埋一小部分,原因是海藻酸钠浓度过大后,黏度较大,不利于形成整个包裹层。当海藻酸钠的浓度为 1.4 %时,发酵 60 h 后,酵母没有游离出来,口感也较好。所以选定淋包液海藻酸钠的最佳浓度为 1.4 %。

2.4 不同的平衡方式对固定化的影响

平衡液中仅为 0.05 mol/L 的氯化钙溶液记为 A,平衡液中另加入 2 %葡萄糖溶液记为 B,平衡液中另加入 4 % (v/v) 的葡萄汁的溶液记为 C。不同的平衡方式对固定化的影响结果见表 4。

表 4 不同的平衡方式对固定化的影响

项目	平衡方式		
	A	B	C
颗粒强度	+++	+++	+++
酒精度(%vol)	5.1	5.3	5.5
残糖(g/L)	7.18	6.72	6.4
口感	1.20	1.20	1.50

注:“+”表示固定化酵母颗粒的硬度。

在不同的平衡方式下,酒精度和残糖都有改变,当平衡液中另加入 4 % (v/v) 的葡萄汁后,酒精度和残糖都明显不同于其他两者。原因可能是葡萄汁提供了更丰富的营养成分,使酵母细胞在平衡时仍然能够吸收充足的营养,细胞维持较高活力。口感比另外两种处理方式都要好,原因是细胞的活力高,代谢的产物形成较好的口感。虽然酒精度要比另外两者高,但可以通过控制发酵时间来调控酒精度,发酵 56 h 时,口感没有变化,酒精度下降到 5.3 %vol。所以在固定化酵母时,选用平衡液为 0.05 mol/L 的氯化钙溶液,加入 4 % (v/v) 的葡萄汁。

2.5 固定化酵母和游离酵母发酵特性的比较

利用固定化酵母和游离酵母发酵共进行了 3 次发酵实验,其特性比较见图 1~图 3。

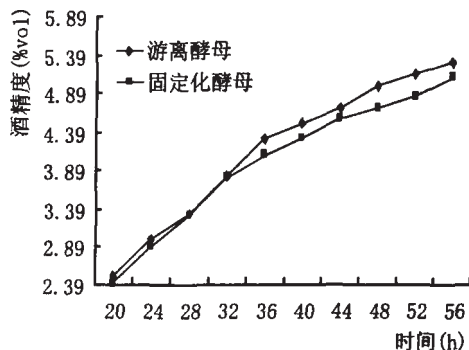


图 1 初次发酵实验结果

从图 1~图 3 可以看出,用游离酵母和固定化的酵母作对比试验,在初次发酵时,游离酵母产生的酒精比固定化酵母稍微高一些,二者口感都为 1.50。说明酵母固定化以后,其代谢并没有太多的改变。在第二次发酵时,固定化酵母产生酒精的速率要高于游离酵母产生酒精的速率。原因可能是固定化酵母的活力在固定化颗粒中没有太多的损失,而游离酵母细胞活力损失一部分。在第三次发酵时,

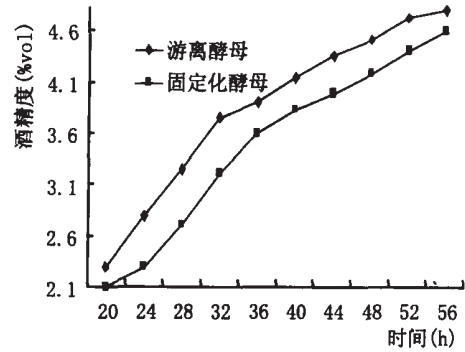


图 2 第 2 次发酵实验结果

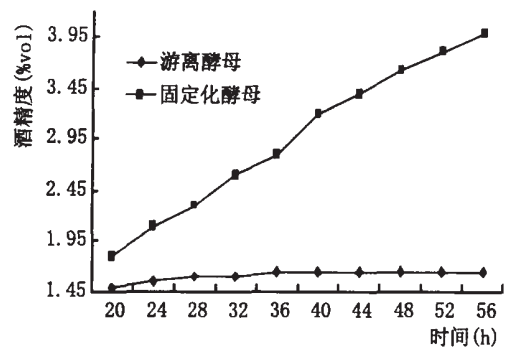


图 3 第 3 次发酵实验结果

由于游离酵母的细胞大部分衰亡,不能够进行正常的代谢,所以酒精的度数没有明显的变化。而固定化酵母细胞仍然有相当大的活力,发酵 56 h 时酒精度达到 3.95 % vol。说明固定化技术可以较好的维持细胞活力。

3 结论

固定化技术应用于低度葡萄酒的酿造,葡萄汁酵母仅需纱布过滤就能终止发酵,因此,固定化酿造低度葡萄酒有非常大的发展前景和实际应用价值。从酒精度、葡萄汁发酵的口感及颗粒硬度等方面综合考虑,较适宜的固定化细胞浓度为 10^9 个/mL,最佳固定化颗粒直径为 0.3 cm,淋包固定化颗粒的最佳海藻酸钠浓度为 1.4 %,最佳的平衡液为 0.05 mol/L 的氯化钙溶液,加入 4 % (v/v) 的葡萄汁。通过与游离酵母发酵的比较,细胞固定化技术可以较好的维持细胞活力。该研究生产出的葡萄酒口感并不是非常好,应深入研究。

参考文献:

- [1] 刘伟,李剑锋,高年发.低醇葡萄酒的初步研究[J].酿酒,2001,28(6): 99-101.
- [2] 李艳,马丽,李静.低醇葡萄酒的研究进展[J].酿酒,2006,33(7): 9-11.
- [3] 杜双奎,张茜,于修焯,等.酿酒细胞固定化研究[J].西北农业学报,2006,15(3): 208-211.
- [4] 天津轻院,等.工业发酵分析[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [5] 乐和,章小忠,姚善泾.纤维素硫酸钠的批量制备及其 NaCS-PDMAAC 微胶囊固定化黄色短杆菌培养过程研究[J].纤维素科学与技术,2003,(6): 1-7.