

苹果酸-乳酸发酵在葡萄酒酿造中的应用

甄会英,王 颀,李长文,张 伟,袁 丽

(河北农业大学食品科技学院,河北 保定 071001)

摘 要: 苹果酸-乳酸发酵(MLF)是红葡萄酒酿造的必经步骤,是葡萄酒生物降酸的主要方法,MLF 可有效降低葡萄酒中的苹果酸。苹果酸是一种具有强烈辛酸味的双羧基酸,常规的物理、化学降酸方法对苹果酸不起作用,而 MLF 可降解苹果酸,使之转化为单羧基的、口感酸味柔和的乳酸,使葡萄酒的有机酸含量降低,酒体协调性增加,并可提高其生物稳定性和风味复杂性。本文介绍了 MLF 的机理、引起 MLF 的微生物及其在葡萄酒酿造中的作用,对影响 MLF 环境因素和现代发酵工程技术(固定化技术和膜生物反应器)在 MLF 中的新的应用与发展也作了阐述。

关键词: 葡萄酒; 苹果酸-乳酸发酵; 酿造; 降酸

中图分类号:TS262.6;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)03-0075-03

Application of Malolactic Fermentation in Wine Production

ZHEN Hui-ying, WANG Jie and LI Chang-wen et al

(Food Science & Technology College of Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: MLF is the necessary procedure in red grape wine production and the important approach to decrease acid content in wine. Malic acid is a kind of bicarboxylic acid with strong pungent smell and ordinary physical and chemical treatment could not eliminate it. MLF could effectively reduce malic acid in red grape wine by degrading malic acid and converting it into carboxylic lactic acid of soft taste. As a result, organic acid content in grape wine decreased, wine body harmony enhanced, and wine biostability and wine taste multiplicity promoted. In this paper, the mechanism of MLF, the microbes causing MLF, and the effects of MLF in grape wine production were introduced. Besides, the environmental factors and modern fermenting engineering techniques (stabilization techniques and membrane bioreactor) influencing MLF and the newly-developed MLF application and MLF development foreground were also discussed. (Tran. by YUE Yang)

Key words: grape wine; malolactic acid fermentation (MLF); brewing; acid content decrease

有机酸是葡萄酒的风味物质之一,葡萄酒中的有机酸主要包括酒石酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸等。葡萄酒中各有机酸的组成和含量直接或间接地影响着葡萄酒的感官特性和质量。而在较寒冷地区和年份(如我国黄河以北地区),葡萄酒中的有机酸尤其是苹果酸的含量过高,苹果酸酸味尖刻、粗硬^[1],使酒体不协调,必须进行降酸处理。

葡萄酒的降酸方法主要有物理降酸法、化学降酸法和生物降酸法,但物理降酸法和化学降酸法主要是去除酒中酒石酸及其盐类,不能除去苹果酸,其弊端在生产上日益受到重视。要降低酒中苹果酸含量,必须采用生物降酸法。

苹果酸-乳酸发酵是葡萄酒生物降酸的主要方法,

在增加葡萄酒风味和微生物稳定性、提高葡萄酒质量等方面有重要作用,具有长远的研究和应用历史,目前在国际葡萄酒生产中已得到了较广泛的应用。

1 苹果酸-乳酸发酵的机理和作用

苹果酸-乳酸发酵是葡萄酒酿造中乙醇发酵后的第二个生化过程,是 L-苹果酸在乳酸菌(*Lactic acid bacteria LAB*)的苹果酸-乳酸酶(malolactic enzyme, MLE)催化下转变成 L-乳酸和二氧化碳的过程。引起 MLF 的乳酸菌分属于酒球菌属(*Oenococcus*)、酒明串珠菌属(*Leuconostoc oenos*)、足球菌属(*Pediococcus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)和链球菌属(*Streptococcus.sp.*)。

经过 MLF, 酸味尖刻的二元酸 L-苹果酸转变为酸

收稿日期:2004-11-09

作者简介:甄会英(1974-),女,河北人,在读硕士,研究方向为果蔬加工原理与技术。

味柔和的一元酸 L-乳酸,葡萄酒酸度降低,新(生)葡萄酒酸涩、粗糙等特点消失,果香、醇香增加,获得柔软、有皮肉和肥硕的口感,质量提高^[2]。另外,苹果酸的生理代谢活跃,易被微生物分解利用,经过 MLF 还能增加葡萄酒的生物稳定性,并生成双乙酰和乙偶姻而增加葡萄酒的风味复杂性(Flavor complexity),因此,苹果酸-乳酸发酵是酿造优质红葡萄酒必须进行的工艺。

2 影响苹果酸-乳酸发酵的因素

MLF 对环境条件的要求与乙醇发酵相比要苛刻得多,影响 MLF 的因素包括:乳酸菌的营养条件、酒精浓度、二氧化硫含量、温度、葡萄酒的 pH 值等,这些因素不同程度地影响 MLF 的进程。

2.1 营养条件的影响

苹果酸-乳酸发酵的乳酸细菌对营养的要求远远超过酵母,尤其是对于氨基酸、尼古丁酸和泛酸,有时还需要核黄素和吡醇^[3];碳水化合物主要是果糖和葡萄糖^[4]; Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等是乳酸菌代谢所必需的矿质元素^[5];精氨酸对于乳酸菌的生长具有促进作用^[6]。

2.2 酒精浓度的影响

酒精浓度过高会对乳酸菌的新陈代谢产生抑制作用,尤其当酒精度超过了 10%(v/v),酒精就会变成阻碍乳酸菌生长的重要因子,不同的菌株对酒精浓度的抗性不同。研究表明,12.5%(v/v)的酒精不仅抑制乳酸菌的生长,还造成乳酸菌的大量死亡。在酿造葡萄酒时,人们常常考虑在发酵醪酒精度较低时尽早进行苹果酸-乳酸发酵。葡萄酒酒度越高,诱导期就越长,酒中的乳酸菌数目也越稀少,苹果酸分解速度就越慢^[7-9]。

2.3 二氧化硫浓度的影响

二氧化硫(SO_2)对乳酸菌是一个强烈的抑制因子, SO_2 能够强烈抑制 ATP 酶的活性,使之降低到 37%~58%^[10]。葡萄酒中的二氧化硫有结合二氧化硫、游离二氧化硫等存在形式,游离二氧化硫比结合二氧化硫对乳酸菌作用强,二氧化硫对苹果酸-乳酸发酵的抑制作用取决于使用的乳酸菌种、葡萄酒的 pH 值以及酒中存在的可溶性固形物含量。

一般情况下,总二氧化硫在 100 mg/L 以上,或结合二氧化硫在 50 mg/L 以上,或游离二氧化硫在 10 mg/L 以上,就可抑制葡萄酒中乳酸菌繁殖^[11]。

2.4 发酵温度的影响

温度是影响苹果酸-乳酸发酵的重要因子。葡萄酒明串菌属的最适生长温度为 20~25℃^[12]。当温度低于 18℃时,苹果酸-乳酸发酵的速度开始下降;当温度在 5~10℃可阻止苹果酸-乳酸发酵;而当温度高于 30℃时,苹果酸-乳酸发酵也将减弱。在实际应用中,苹果酸-乳酸发酵的温度多在 18~20℃^[8,11]。

2.5 有机酸含量的影响

葡萄酒中有机酸的含量决定了葡萄酒的 pH 值,而 pH 值是影响苹果酸-乳酸发酵的最基本因素之一,其作用主要表现在:①影响乳酸菌成活率,从而决定进入苹果酸-乳酸发酵前迟滞期的长短;②影响乳酸菌的生长速率,从而减缓苹果酸-乳酸发酵速度;③影响葡萄酒中乳酸菌的生长种类。

苹果酸-乳酸发酵在酸度较低的酒中很容易发生。通常需要进行 MLF 的酒的 pH 值为 2.8~3.5 之间^[13],乳酸菌最适生长 pH 为 4.2~4.5^[2]。当 pH 值为 3.0 或更低时,几乎所有的乳酸菌都受到抑制,在 pH 值 3.0~4.5 之间,pH 值越高,苹果酸-乳酸发酵就越容易^[14]。

2.6 通气的影响

通入空气常常有利于乳酸细菌的生长。饱和空气的新葡萄酒提前几天出现苹果酸-乳酸发酵,相反,如果用纯氧饱和反而延迟,但不完全阻碍。总的说来,对葡萄酒发酵过程通风有利于进行苹果酸-乳酸发酵^[8]。

此外,葡萄酒中还存在着乳酸细菌的噬菌体,而且这些噬菌体在形态和类型等方面都存在着差异,因此,用于进行苹果酸-乳酸发酵的乳酸菌必须具有抗性;铜离子、残留杀虫剂等也会影响乳酸菌的生长及对葡萄酒的作用;以前普遍认为红葡萄酒中的多酚化合物酚酸、单宁酸等也可以抑制苹果酸-乳酸发酵^[15],而 Rozes N^[16]等发现 50 mg/L 或更多的酚类化合物促进乳酸菌的生长,在柠檬酸和海藻糖存在的条件下,优先利用柠檬酸和海藻糖而不是葡萄糖和果糖,酚类化合物可以降低糖的消耗而提高对柠檬酸的降解。

3 MLF 的诱导

3.1 自然诱导

提供适宜的环境条件,MLF 可以自然发生。但是,自发的苹果酸-乳酸发酵是难以预测的,由于酒精发酵后的葡萄酒中可能还存在乳酸菌的噬菌体,它们可能延迟或抑制 MLF,使得 MLF 在触发上难以保证。这种延迟对葡萄酒酿造者而言,是相当昂贵的,它增加了腐败菌在进行 MLF 的同时产生异香与异味,导致葡萄酒病害的可能性。这种危险在允许葡萄酒中细菌生长的情况下会增加,温暖的气温、很低的 SO_2 、适宜的 pH 值,非常有利于微生物腐败。调查发现,仅有一半未接种葡萄酒在一个月后进行苹果酸-乳酸发酵^[17]。

3.2 人工接种诱导

生产上常利用优良乳酸菌种经人工培养后添加到葡萄酒中,以克服自然发酵不稳定、难控制等问题。现在人们已开始应用更为简单的方法进行 MLF。如可利用引子培养物(含乳酸菌的发酵剂),不但可以迅速达到触发 MLF 的数量级,而且在 MLF 过程中居于主导地位,有利于酿造优质干红葡萄酒。目前,一些冷冻干菌种不用活化和扩培就可以直接加入到葡萄酒中。根据不同的地域

条件和原料品质选择适宜的菌种进行 MLF ,成为葡萄酒厂酿制优质高档佳酿的关键^[7]。

4 MLF 的抑制

苹果酸-乳酸发酵并不总是对改进葡萄酒的品质有益处,有时即使用理想的乳酸菌发酵,也难免会产生一些不愉快的气味。一般来说,如果希望获得口味清爽、果香味浓,尽早上市的白葡萄酒,则应防止这一发酵的进行。为此,可以采取以下抑制措施:保持葡萄酒的 pH 值在 3.2 以下;使酒精度达 14 %以上;低温贮存;把总二氧化硫浓度调至 50 mg/L 以上;尽早倒酒和澄清;减少葡萄皮的浸渍时间;巴斯德灭菌和滤菌板过滤;添加化学抑制剂;添加细菌素,如乳酸链球菌素(Nisin)、植物乳杆菌素(Plantaricin)和片球菌素(Pediocin)等;添加溶菌酶^[18]。

5 现代发酵工程技术在苹果酸-乳酸发酵中的应用

由于 MLF 对发酵条件的要求比较复杂,生产上常常出现 MLF 发酵迟滞甚至接种失败的现象。为此,酿酒者希望有快速、可行的方法启动并完成 MLF。近年来,现代发酵工程技术的进展,为革新 MLF 的工艺操作提供了新的思路。

5.1 固定化技术

固定化技术是 20 世纪 60 年代在相应学科发展的基础上产生的一种新的生物技术。所谓固定化技术,是指利用化学或物理手段将游离的微生物细胞或酶,定位于限定的空间区域并使其保持活性,使之成为连续流动的生物反应器,并可反复使用的一种基本技术^[19]。包括固定化酶技术和固定化细胞技术。

微生物的固定化法主要有包埋法、吸附法、交联法和微胶囊化 4 种方法。以前用于葡萄酒 MLF 的固定化技术只有包埋法和吸附法两种。Kosseva MR^[20]等在用果胶酸盐制成的微胶囊固定乳酸菌 *casei* 细胞进行 MLF,控制二氧化硫、pH 值和有机酸的含量对苹果酸-乳酸酶的影响,固定化的乳酸菌降解了 30 %的苹果酸,使白葡萄酒的 pH 从 3.15 上升到了 3.40,固定化的乳酸菌的苹果酸的转化率是游离 *Lactobacillus casei* 细胞的 2 倍,且稳定性好,可持续达 6 个月。并且试验还表明微胶囊可提高发酵率,能在高酒精度下诱导 MLF。

与固定化细胞技术相比,固定化酶技术需要酶的分离,并且需要辅酶再生,因此该技术在生产上的应用受到很多限制。Tsakiris, A.a^[21]等用商业的 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株(Uvaferme 299)制成固定化生物催化剂(Immobilized Biocatalysts),用于常温(15~25℃)的干白葡萄酒的发酵,发酵产物具有低挥发酸、低甲醇和乙醛含量等特性,该固定化细胞系统可稳定持续 4 个月,感官评价表明与游离细胞系统相比,葡萄酒风味品质有明显

提高。

5.2 膜生物反应器(Membrane Bioreactor, MBR)的应用

膜生物反应器技术是对固定化技术的发展,是通过凝胶膜、人工聚合膜或其他膜载体把酶/酶、酶/辅酶、酶/细胞或细胞器/酶等反应组元固定起来(也可以是游离态)进行生化反应^[22]。目前,该技术已被用来进行 MLF 的研究。Vaillan^[23]等从酒明串珠菌 8406 中提取纯化了 MLE,并把游离的 MLE 和辅酶因子通过特制的 Polysulfone 膜及有机玻璃反应板制成生物反应器进行 MLF,结果表明,苹果酸的分解率可达 70 %以上。

6 结语

几十年来,人们对 MLF 进行了大量的研究,但目前仍存在着一些需要解决的问题,发酵工程技术在 MLF 中的应用还只是处在一个开发和研究的阶段,MLF 还只能部分地进行,虽然通过基因工程技术选育出了苹果酸-乳酸酵母,但菌株的遗传稳定性、苹果酸-乳酸酶基因和苹果酸通透酶基因在工业葡萄酒酵母菌中的表达及其安全性等问题还有待解决,并且这两方面的研究都在一定程度上依赖于生物技术的发展。目前,选育耐低 pH、较高酒精度和 SO₂ 且酿酒特性好的乳酸菌种的需求较为迫切,LAB 的营养条件、MLF 的发生与控制的研究还需加强。

参考文献:

- [1] 朱华.葡萄酒的芳香成分[J].酿酒科技,1996 (2):52-53.
- [2] 李华.葡萄酒的苹果酸-乳酸发酵与生物脱酸[J].酿酒,1986, (6):11-15.
- [3] E.卑诺,朱宝镛译.葡萄酒科学与工艺[M].北京:中国轻工业出版社,1984. 136-150.
- [4] 林春国,等译.葡萄酒中苹果酸-乳酸发酵的研究进展[J].葡萄栽培与酿酒,1997 (3):52-58.
- [5] Spetoli P, Nuti M.P, Zamorani. A. Properties of Malolactic Activity Purified from *Leuconostoc oenos* ML34 by Affinity Chromatography[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1985 (48): 900-901.
- [6] Cocalgn -Bousquet M, Carrlgués C, Novak L et al. Rational Development of a Simple Synthetic Medium for the Sustained Growth of *Lactococcus Lactic*[J]. J. Appl. Bacteriol, 1995, (79):108-116.
- [7] 马永明,王焕香,贾宇亮.干红葡萄酒苹果酸-乳酸发酵菌种的选择[J].中外葡萄与葡萄酒,2002 (5):50-52.
- [8] 丁正国.葡萄酒苹果酸-乳酸发酵的理论与实践[J].中国酿造,1995 (5):11-15.
- [9] 王华,张春晖,李华.乳酸菌在葡萄酒酿造中的应用[J].西北农业大学学报,1996 (6):92-98.
- [10] Carreté, Ramona, Vidal, M. Teresa, Bordon, Alberta et al. Inhibitory Effect of Sulfur Dioxide and Other Stress Compounds in Wine on the ATPase Activity of *Oenococcus*

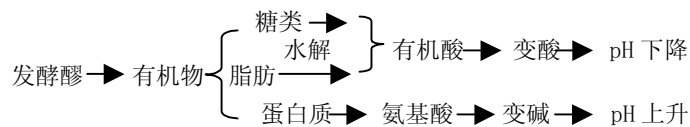
(下转第 79 页)

pH 值,同时也能调节黄酒的风味。酵母在发酵中后期醪液的 pH 值有慢慢回升之势,因为此时产酒精的速度比糖化的速度快,在醪液中酒精量增加,酒精的 pH 值大于水的 pH 值。同时醪液中糖类减少尤其是葡萄糖减少,有机酸相对减少了,所以 pH 值有上升之势。

随着发酵的进一步进行,发酵产生酒精的速度逐渐减慢,同时糖化的速度也在减慢,发酵醪中碳源与氮源比相对稳定,也就是说有机酸与氨基酸类相对平衡。因此会使发酵醪中的 pH 值达到一个相对平稳的过程。

第三阶段:在发酵末期,菌体自溶时随着营养物质的耗尽与菌体蛋白酶的活跃,发酵醪中氨基酸增加致使 pH 值上升,此时菌体趋于自溶而代谢活动终止。

由此可见,在适合酵母菌生长及合成产物的环境下,菌体本身具有调节 pH 的能力而使 pH 处于适宜状态,但当外界条件发生变化且过于剧烈,菌体就失去调节能力, pH 就会发生波动^[2],两种菌在其生命活动中会改变发酵醪中的 pH,其可能发生的反应有以下几种^[3]。



2 pH 对黄酒发酵过程的影响^[4]

发酵过程中 pH 值是一个综合性指标,它与微生物的生长繁殖及代谢产物的积累有很大关系。

2.1 pH 值影响酶的活性,当 pH 值抑制或激活菌体中

某些酶活性时使微生物的代谢途径发生改变。

2.2 pH 值影响酵母菌,霉菌的细胞膜带电荷的状况;菌体带电荷的改变使膜的渗透性改变,从而有可能影响菌体的营养吸收及代谢产物的分泌。

2.3 pH 值还可能影响发酵醪中某些营养物质的分解或酵母中间代谢产物的解离,从而影响酵母对这些物质的利用。

3 发酵过程中 pH 的调节

当发酵出现问题时,一般可用调节 pH 的办法加以补救。目前一般采用“治本”与“治标”两种办法来调节。

在发酵中期、后期采用“治本”的办法,当发酵醪过酸时提高通气量,反之降低通气量。

在发酵末期一般采用“治标”的办法,加入 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中和或加入乳酸增酸。一般情况下最好采用“治本”的方法。所以在早期就要密切注意 pH 的变化情况,使发酵能更加完全。

参考文献:

- [1] 陈荣三,等.无机及分析化学[M].北京:北京高等教育出版社,1985.94-95.
- [2] 李永泉.发酵工程原理和方法[M].杭州:杭州大学出版社,1994.208.
- [3] 同德庆,等.微生物学教程[M].北京:北京高等教育出版社,1993.99.
- [4] 颜方贵,等.发酵微生物学[M].北京:北京农业大学出版社,1991.38.
- [17] 李记明.葡萄酒酿造中的苹果酸-乳酸发酵[J].中外葡萄与葡萄酒,2001,(5):41-44.
- [18] 张春晖,夏双梅,张军翔.葡萄酒中的生物胺的生产与工艺控制[J].食品科学,2002,(10):128-130.
- [19] 王洪祚,刘世勇.酶和细胞的固定化[J].化学通报,1997,(2):22-25.
- [20] Kosseva MR, Kennedy JF. Encapsulated Lactic Acid Bacteria for Control of Malolactic Fermentation in Wine[J]. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology, 2004,(1):1073-1199.
- [21] Tsakiris, A.a, Bekatorou, A.b, Psarianos, C.b, et al. Immobilization of Yeast on Dried Raisin Berries for Use in Dry White Wine-making[J]. Food Chemistry, 2004,(1):11-15.
- [22] De Backer L. Reaction and Diffusion in a Gel Membrane Reactor Containing Immobilized Cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992,(40):322-328.
- [23] Vaillant H and Formisyn P. Purification of the Malolactic Enzyme from a *Leuconostoc oenos* Strain and Use in a Membrane Reactor for Achieving the Malolactic Fermentation of Wine[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1996,(24):217-223.

(上接第 77 页)

- us oeni[J]. Bibliographic Page 2002,(2): 155-159.
- [11] 权英,王颀,张伟.葡萄酒中的乳酸菌[J].酿酒科技,2002,(2):59-61.
 - [12] Lafon-Lafoureaud J, Carre E, Ribereau-Gayou P. Occurrence of Lactic Acid Bacteria during the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1983,(46):874-880.
 - [13] Henick-Kling T, Lee T H and Nicholas D J D. Inhibition of Bacterial Growth and Malolactic Fermentation in Wine by Bacteriophage[J]. J Appl. Bacteriol, 1986,(61):287-293.
 - [14] Britz T J, Tracey R P. The Combination Effect of pH, SO_2 , Ethanol and Temperature on the Growth of *Leuconostoc oenos*[J]. J Appl. Bacteriol, 1990,(68):21-31.
 - [15] Bourdineaud JP, Nehme B, Lonvaud-Funel A. Arginine Stimulates Preadaptation of *Oenococcus oeni* to Wine Stress French[J]. Sciences Des Aliments, 2002,(1-2):113-121.
 - [16] Rozes N, Arola L, Bordon A. Effect of Phenolic Compounds on the Co-metabolism of Citric Acid and Sugars by *Oenococcus oeni* from Wine[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003,(5):337-341.