

## 苹果鲜渣保藏及其发酵分析\*

于修烛 李志西 杜双奎

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌, 712100)

**摘 要** 以秦冠苹果渣为原料, 采用稀释平板法和 HPLC 分别对发酵苹果渣的微生物及有机酸组成进行了分析, 并对不同发酵方式进行了比较。结果表明, 发酵苹果渣中主要微生物是酵母菌、醋酸菌和乳酸菌。苹果渣发酵产物中的有机酸主要是醋酸和乳酸, 分别占有机酸总量的 45.840% 和 44.746%, 发酵苹果渣中尚未发现有害菌。发酵果渣的蛋白质含量较未发酵果渣有较大的提高; 采用不同方式发酵的果渣, 其蛋白质含量有较大差异, 其中以露地薄膜法发酵的蛋白质含量为最高, 且氨基酸组成较为合理, 优于小麦蛋白。

**关键词** 苹果渣, 发酵, 分析

苹果渣是指苹果榨汁后的副产物, 主要由果皮、果核和残余果肉组成, 约占鲜果质量的 25%。我国年产苹果约 2 000 万 t, 在加工果汁的过程中所排出的果渣约有 100 多万 t。由于苹果渣含有较高水分(约 75%~80%)和丰富的营养物质, 易被微生物浸染, 发霉、腐烂变质, 导致环境的污染和资源的浪费<sup>[1,2]</sup>。为了使苹果渣得到资源化利用, 首先要解决苹果渣的安全保藏问题。人们常常采用的保藏方式有人工干制、自然晾晒和鲜渣贮藏(也叫青贮)等。人工干制投资多, 能源消耗大, 费用高, 经济效益差; 自然晾晒受气候条件的制约程度大, 因而可靠性差; 鲜渣贮藏是将果汁厂刚刚排出的苹果渣进行厌氧发酵, 从而达到长期贮藏的目的。鲜渣贮藏具有简便易行, 安全可靠, 便于实现产业化等优点, 能够为自然晾晒提供原料保证。在冬季, 鲜渣贮藏可为家畜提供多汁饲料, 使奶牛产奶量提高 2.0~2.6 L/d, 经济效益大大提高<sup>[3,4]</sup>。研究中首先对鲜渣贮藏的安全性进行试验分析, 并在此基础上, 对不同贮藏方式的保藏效果进行了比较分析, 为实现鲜果渣的长期贮藏和苹果渣资源化利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原 料

鲜果渣: 由陕西海升果业发展股份有限公司提供; 活性干酵母: 广东丹宝利公司。

### 1.2 用具及仪器

无菌塑料袋(大连连大生化试剂仪器有限公司)、

200 L 可密封铁桶、100 L 可密封塑料桶、高压杀菌锅(GY-2 型, 上海医疗器械厂)、培养皿、烘箱(ZB603, 天津仪器厂)、显微镜(JGX-2 型, 上海光学仪器厂)、高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, 516 型泵, U6K 进样器, 481 型紫外检测器, Grard-pak C18 预柱, 730 型数据处理机。色谱柱: Hypersil BDS C18 ID 4.6×250 mm, 10 μm)、离心机(TDL5M 型, 湖南凯达科学仪器有限公司)、水浴锅、氨基酸分析仪(121MB 型, 日本日立)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 发酵方式

**大池发酵:** 将鲜果渣填入(5×4×3) m<sup>3</sup> 半地下水泥池中, 表面撒少量干酵母, 用塑料薄膜覆盖后进行厌氧发酵。

**大桶发酵:** 将鲜果渣装入衬有无菌袋的大铁桶(容积 180 L)中, 表面撒少量干酵母后加盖进行厌氧发酵。

**薄膜发酵:** 将鲜苹果渣在露天就地堆放成垄, 垄高 1.5 m, 底部宽 2.0 m, 表面撒少量干酵母后, 用塑料薄膜覆盖后进行厌氧发酵。

以上发酵 70 d 后, 再进行发酵果渣的微生物组成分析, 比较发酵前后果渣微生物及蛋白质等变化。

#### 1.3.2 微生物组成分析<sup>[5]</sup>

均采用稀释平板涂法: 霉菌和酵母菌分离测数采用改良 PDA 培养基(PDA 琼脂 + 1.0 g/L 酵母膏, 倒皿前加体积分数 0.3% 的灭菌乳酸, 调整 pH4.5)。放线菌分离测数采用高氏 1 号琼脂培养基。厌氧性细菌分离测数采用酵母膏吐温 80 醋酸盐琼脂培养基和双层厌氧培养法。耐酸性细菌分离自能在 pH4.5 条件下的改良 PDA 平板培养基上生长的细菌, 其产

第一作者: 博士, 讲师(李志西教授为通讯作者)。

\* 陕西省“十五”攻关项目(2003K02-G16-02)

收稿日期: 2005-03-22, 改回日期: 2006-06-16

酸试验采用豆芽汁液体培养基,灭菌后按 50 mL/L 加入体积分数为 95% 的乙醇。

### 1.3.3 苹果渣发酵产物中有机酸分析

苹果渣发酵产物中有机酸组成分析,采用高效液相法。流动相:质量分数 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 2.5)。流速 1 mL/min,UV 波长 200 nm。用外标法定性、定量。样品处理:将发酵苹果渣以 4 000 r/min 离心,准确吸取上清液 5 mL 于 25 mL 容量瓶中,加体积分数为 85% 的乙醇溶液在 75℃ 水浴中温育 15 min,取出后冷却定容。再经离心后取上清液 5 mL 于 75℃ 水浴蒸干,用流动相定容至 5 mL,微孔 (0.45 μm) 过滤后进样,进样量 10 μL。

### 1.3.4 理化分析

粗蛋白测定:凯氏定氮法,GB/T5511-1985;氨基酸组成测定:参照 GB7649-1987;粗脂肪测定:索氏提取法,参照 GB/T5499-1985;粗纤维测定:参照 GB 5009.10-1985;粗灰分测定:参照 GB/T5505-1985;水分测定:105℃ 恒重法;无氮浸出物测定:计算法得到参考文献[6];总酸测定(以乙酸计,%):酸碱滴定法;热值测定(J/g):氧热式测热仪法[6];还原糖测定:斐林试剂滴定法。

### 1.3.5 发酵浸出液的利用

将收集到的发酵浸出液装入干净塑料桶中进行自然发酵,每隔 1 天倒桶 1 次。直到酸度不再有明显升高为止,将发酵液过滤后离心,取上清液即得食醋。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果渣发酵贮藏前后微生物组成的比较分析及安全评价

将从榨汁车间刚刚排出的新鲜苹果渣装入内衬无菌塑料袋的大铁桶中(容积 180 L),表面加入少量酵母菌,然后加盖进行厌氧发酵。同时按照无菌操作要求从鲜苹果渣中取样,在实验室进行新鲜苹果渣微生物组成分析。鲜果渣在内衬无菌塑料袋的大铁桶中发酵 90 d 后,再对发酵果渣进行微生物组成分析,比较发酵前后果渣微生物组成的变化,表 1 是苹果渣发酵前后微生物区系分析结果。

表 1 苹果渣发酵前后微生物区系比较分析 个/g(湿样)

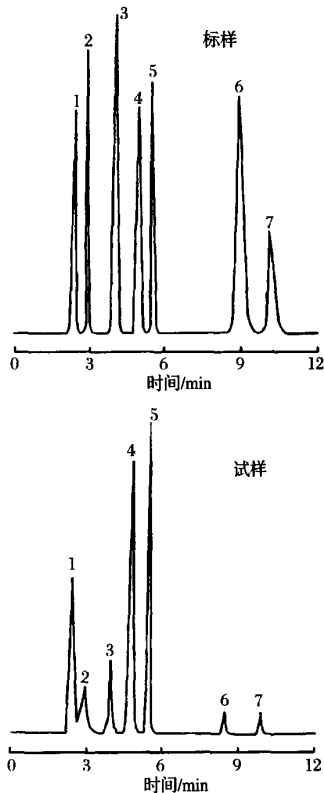
	霉菌	放线菌	酵母菌	耐酸性细菌	厌氧性细菌
鲜果渣	1.2×10 <sup>2</sup>	极少数	6.4×10 <sup>2</sup>	2.5×10 <sup>4</sup>	6.4×10 <sup>3</sup>
发酵果渣	未检出	未检出	4.8×10 <sup>5</sup>	1.8×10 <sup>8</sup>	1.8×10 <sup>5</sup>

由表 1 可以看出,鲜苹果渣中含有一定量的霉菌、酵母菌、极少量的放线菌和较多的细菌。在发酵

过程中,微生物组成发生了较大的变化,霉菌和放线菌在发酵过程中基本消失,在发酵后的果渣中霉菌和放线菌未能检出,而酵母菌和细菌则大量增加。发酵后的苹果渣中的主要微生物组成菌是酵母菌、耐酸性细菌和厌氧性细菌。

### 2.2 苹果渣发酵浸出液有机酸组成分析

用高效液相色谱仪对发酵苹果渣浸出液的有机酸组成进行分析,结果见图 1 和表 2。



1-草酸;2-酒石酸;3-苹果酸;4-乳酸;5-醋酸;  
6-柠檬酸;7-琥珀酸

图 1 有机酸分析色谱图

表 2 发酵苹果渣有机酸组成

有机酸	含量/g·kg <sup>-1</sup>	相对量/%
醋酸	13.83	45.84
乳酸	13.50	44.746
草酸	0.71	2.353
酒石酸	0.71	2.353
苹果酸	1.01	3.348
柠檬酸	0.03	0.099
琥珀酸	0.38	1.260
总量	30.17	100

由图 1 和表 2 可以看出,发酵产物中的有机酸主要是醋酸(占有机酸总量的 45.840%)和乳酸(占有机酸总量的 44.746%);其次是少量的苹果酸、草酸、

酒石酸和琥珀酸,分别占有机酸总量的 3.348%、2.353%、2.353%、1.260%。苹果渣发酵浸出液含有醋酸和其它果酸,并具有特有的果香味,可作为果醋供人们食用。

2.3 苹果渣发酵产物中两种细菌的初步鉴定

2.3.1 耐酸性细菌的初步鉴定

为了进一步确定耐酸性细菌的类型,将其放在显微镜下进行观察,可以看到耐酸性细菌的形状为短杆状,大小为 $(0.47 \times 0.70) \mu\text{m}$ ;将该菌接种在曲汁  $\text{CaCO}_3$  培养基上培养,其菌落周围有透明圈形成;在接有该菌的产酸液体(发酵液)中加入  $10 \text{ g/L FeCl}_3$  后加热,有红褐色沉淀出现;高效液相色谱测定结果表明,发酵产物中约 46% 有机酸为醋酸(图 1),根据以上结果可以初步判定耐酸性细菌为醋酸菌。

2.3.2 厌氧性细菌的初步鉴定

为了进一步确定厌氧性细菌的类型,将厌氧细菌在显微镜下观察,其形态为杆菌状,大小为 $(0.70 \sim 0.90) \mu\text{m} \times (3.0 \sim 4.2) \mu\text{m}$ ;在厌氧条件下培养 48 h 后,取 1 环涂抹于滴有体积分数为 3% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  的玻璃片上,无气泡产生,表示该菌无过氧化氢酶;液相色谱

测定结果表明,苹果渣在发酵过程中产生的有机酸中,乳酸含量所占比例高达 44.8% (图 1)。依据分离条件、形态、过氧化氢酶特性及发酵产物为乳酸等特征,初步判定该厌氧细菌为乳酸菌。

以上研究结果表明,鲜苹果渣中含有一定量的霉菌、酵母菌、少量的放线菌和较多的细菌。在发酵过程中,由于处于厌氧发酵状态,使苹果渣发酵后的微生物组成与发酵前的微生物区系有较大的差异,其中霉菌和放线菌在发酵后的果渣中基本消失,而酵母菌和细菌则大量增加。发酵后的苹果渣的微生物主要组成菌是酵母菌和两种细菌(耐酸性细菌和厌氧性细菌),其中耐酸性细菌主要为醋酸菌,厌氧性细菌主要为乳酸菌。酵母菌、醋酸菌和乳酸菌都是有益菌,有助于动物消化,提高发酵果渣的营养价值。在发酵果渣中尚未发现有害菌的存在。由此可知,采用厌氧发酵法贮藏苹果渣不但是有益的,也是安全可靠的。生产实践表明,苹果渣发酵贮藏可使苹果渣保藏期长 12 个月以上不变质。

2.4 不同发酵方式的比较

表 3 是采用不同发酵方式所得到的发酵苹果渣营养成分的分析结果。

表 3 不同发酵方式的比较

发酵方式	粗蛋白/%	粗脂肪/%	粗纤维/%	粗灰分/%	无氮浸出物/%	总酸/%, 乙酸计	热值 $\times 10^{-6} \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$
未发酵	5.32	5.94	16.47	6.85	65.42	1.11	18.03
大池发酵	6.70	4.39	23.10	5.31	60.49	3.25	17.78
大桶发酵	7.02	4.77	22.40	6.27	59.55	3.31	18.64
薄膜发酵	7.86	3.91	26.58	4.52	57.14	3.14	19.17

由表 3 可以看出,发酵后的苹果渣,其蛋白质含量和热值均有较大的提高。其中,采用露地薄膜发酵方式得到的发酵苹果渣的蛋白质含量和热能值最高,分别达到 7.86% 和  $19.17 \times 10^6 \text{ J/g}$ ,较未发酵分别提高了 2.54% 和  $1.15 \times 10^6 \text{ J/g}$ ,相对提高幅度分别达到 47.69% 和 6.34%。这一试验结果可以说明,采用露天薄膜发酵能够充分利用阳光来提高发酵期间的

物料温度,有利于微生物的生长繁殖,使发酵果渣的蛋白质得到较大幅度的提高,热能值也有一定的增加。

2.5 发酵苹果渣的氨基酸组成分析

采用露地薄膜法发酵得到的发酵苹果渣的氨基酸组成分析以及标准模式和小麦蛋白的比较<sup>[7,8]</sup>,其结果见表 4 和表 5。

表 4 发酵苹果渣中必需氨基酸组成

氨基酸名称	氨基酸含量 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (蛋白质)		
	发酵果渣	小麦	标准模式
苏氨酸	3.15(9.34%)	25.42(7.34%)	40 (13%)
缬氨酸	3.74(11.09%)	44.67(12.91%)	50 (14.29%)
蛋氨酸	0.07	13.48	—
蛋氨酸+胱氨酸	0.29(0.86%)	29.48(8.52%)	35 (10%)
异亮氨酸	2.91(8.63%)	45.56(13.16%)	40 (11.43%)
亮氨酸	5.31(15.74%)	81.62(27.23%)	70 (20%)
苯丙氨酸	3.29	60.99	—
苯丙氨酸+酪氨酸	5.57(16.51%)	97.86 (28.27%)	60 (17.14%)
赖氨酸	2.76(8.18%)	21.52(6.22%)	55(15.71%)

注:标准模式为 WHO/FAO 建议的必需氨基酸标准模式(1973),括号中数字是必需氨基酸占总氨基酸的百分数。

表 5 必需氨基酸与标准模式比较结果

	发酵果渣	小麦
苏氨酸	+	
缬氨酸		+
蛋氨酸+胱氨酸		+
异亮氨酸		+
亮氨酸	+	
苯丙氨酸+酪氨酸	+	
赖氨酸	+	

注：+表示必需氨基酸的百分含量与标准模式更接近于标准模式。

由表 4 可以看出,发酵苹果渣的氨基酸组成较为合理,与标准模式较为接近。较接近标准模式者以“+”表示(见表 5),从表 5 的比较结果来看,发酵果渣中的必需氨基酸构成比例较为合适,比小麦的必需氨基酸构成更为合理,发酵果渣蛋白是一种优质的蛋白。

## 2.6 发酵果渣浸出液的利用

果渣发酵后经挤压可得到 15%~20%浸出液,测定其含酸量为 1.9%~2.5%(以乙酸计),还原糖含量为 49.15 g/L。浸出液再经发酵后,其酸度继续上升,最后可达到 5.0%~6.2%酸(以乙酸计)。发酵液颜色淡黄色,为优质食醋。

## 3 结 论

(1)苹果渣经自然厌氧发酵后,没有发现霉变和腐败变质现象,且颜色淡黄,有酒香、果香和特殊的发酵味,其微生物组成以酵母菌、醋酸菌、乳酸菌为主,

放线菌、霉菌等有害菌基本消失。所以,密封自然发酵可作为果渣保藏的一种优良方法。

(2)发酵苹果渣较未发酵果渣的蛋白质含量和热值均有大幅度提高,可作为优质发酵饲料。在各种发酵方式中,以露地薄膜发酵的果渣营养价值最高,其蛋白质和热值提高幅度最大,且这种方式对硬件设施要求低,便于推广普及。其蛋白的氨基酸组成优于小麦。同时,发酵浸出液还原糖含量较高,经再发酵可得优质食醋。

## 参 考 文 献

- 1 李志西. 苹果渣综合利用研究[J]. 黄牛杂志,2002,28(4):58~63
- 2 杨福有,祁周约,李彩凤,等. 陕西苹果渣生产利用现状调查[J]. 陕西农业科学,1999(4):29~30
- 3 郭维烈,郭庆华. 新型发酵蛋白饲料[M]. 北京:科学技术文献出版社,2000.6
- 4 籍宝平,尤希风,张博润. 苹果渣发酵生产饲料蛋白的工艺研究[J]. 生物工程进展,1999,19(5):30~32
- 5 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000
- 6 韩友文. 饲料与饲料学[M]. 北京:中国农业出版社,1998
- 7 宋志军,赵锁芳. 食品营养与安全分析测试技术[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2005
- 8 杜长安,陈复生. 植物蛋白工艺学[M]. 北京:中国商业出版社,1995

# Analysis of the Storage and Fermentation of the Apple Pomace

Yu Xiuzhu Li Zhixi Du Shuangkui

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**ABSTRACT** The components of organic acids and microorganism in fermented apple pomace(FAP)have been analyzed with HPLC and delution-plate method, compared with difference ferment methods, using Qinguan apple pomace as raw material. The results showed that the microorganism in FAP were mainly yeast, acetbater and lactobacilli. The major organic acids in FAP were acetic acid(45.84% of total organic acid) and lactic acid (44.746% of total organic acid). The pernicious bacteria have not been found in FAP. The protein of FAP was higher than unfermented apple pomace. The study obtained obtained different protein content using different fermented methods. The method which was apple pomace under plastic film with the yeast yielded highest protein content, and the model of amino acid composition of the protein was better than wheat.

**Key words** apple pomce, fermentation, analysis