

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.015137

引用格式:丁玉萍,高鹏飞,陈琦,等.山葡萄酒主发酵降酸工艺筛选及优化[J].食品与发酵工业,2018,44(5):125-129.

DING Yu-ping, GAO Peng-fei, CHEN Qi, et al. Screening and optimization of the optimum fermentation process for reducing acid in *V. amurensis* wines[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(5):125-129.

山葡萄酒主发酵降酸工艺筛选及优化

丁玉萍,高鹏飞,陈琦,韩诚武,李春丰,刘德江

(佳木斯大学 生命科学学院,应用微生物研究所,黑龙江 佳木斯,154007)

摘要 以降低山葡萄酒酸度为目的,探究山葡萄酒降酸最佳主发酵用菌及工艺条件。通过对比试验筛选出最佳降酸菌种组合为同时添加降酸酵母菌与乳酸菌;单因素试验和正交试验结果表明,降酸酵母与乳酸菌的接种比例为6:4,总接种量为12%,发酵温度为22℃,发酵时间为14 d,此条件下进行山葡萄酒主发酵,降酸效果最好。

关键词 山葡萄酒;降酸;主发酵工艺;条件优化

山葡萄与欧亚种酿酒葡萄差异较大,产于我国东北地区^[1],寒冷的地域特性造成山葡萄3大特点:一是糖度低,一般为130~150 g/L;二是酸度高,成熟果实的可滴定酸度含量在15~25 g/L(以酒石酸计)之间^[2-3],是酿酒葡萄酸度规定值的3~5倍,果汁pH值在2.90~2.95之间,尤其苹果酸含量高^[4];三是营养成分高,其多酚、单宁、花青素、白藜芦醇等物质含量均高于普通酿酒葡萄,这也是东北人喜欢用来酿酒的主要原因^[5]。由于山葡萄苹果酸含量较高,酿制的酒酸涩,降低酸度是生产干型山葡萄酒面临的主要工艺难题。

目前,葡萄酒的降酸方法主要有3种:物理降酸、化学降酸和生物降酸^[6-8],其中应用较多的是生物降酸,即苹果酸-乳酸发酵(malolactic fermentation, MLF)^[9-10]。MLF是在主发酵结束后进行的二次发酵^[11],由于苹果酸-乳酸发酵菌受到高酸度以及酒精的抑制作用,山葡萄酒苹果酸-乳酸发酵难以启动^[12-13],所以本研究尝试将苹果酸-乳酸发酵菌应用主发酵过程中,使酒精发酵与苹果酸-乳酸发酵同时进行,旨在为降低山葡萄酒的酸度探究最佳工艺组合。

1 材料与方法

1.1 材料

第一作者:高级工程师(本文通讯作者, E-mail: 1479407748@qq.com)。

基金项目:黑龙江省教育厅自然科学研究项目(2016-KYYWF-0612);佳木斯大学校长创新创业基金项目(xzyf2016-29);佳木斯大学研究生科技创新项目(YZ2016_009)

收稿日期:2017-07-07, 改回日期:2017-09-20

1.1.1 山葡萄酒及菌株

山葡萄:佳木斯地区野生山葡萄(山葡萄汁 pH 2.93 ± 0.05 , 总酸度 13.60 ± 0.50 , 含糖量约为 10.50 ± 0.50)。

葡萄酒酵母(Y_1):安琪酵母股份有限公司;降酸酵母(Y_2):烟台帝伯仕商贸有限公司;乳酸菌(Lactobacillus 450 PreAC[L]):烟台帝伯仕自酿机有限公司。

1.1.2 仪器与试剂

仪器:YXQ-LS-75SII 高压蒸汽灭菌锅:上海博讯事业有限公司医疗设备厂;150G 恒温振荡培养箱:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;TDZ4-WS 低速台式离心机:长沙湘仪离心机仪器有限公司;CJ-78-1A 磁力加热搅拌器:上海跃进医疗器械厂;PHS-3C 型精密酸度计:杭州雷磁分析仪器公司。

试剂:酵母膏、牛肉膏、胰蛋白胨、葡萄糖、硫酸镁、苹果酸钠、柠檬酸三铵、碳酸钾(食品级)、吐温-80、苹果酸、乳酸、正丁醇、冰乙酸、溴酚蓝等,试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基

酵母培养基:葡萄糖 20 g/L, 酵母浸液 5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L, CaCl_2 0.3 g/L, 溶于 1 000 mL 蒸馏水, 于 121℃ 灭菌 20 min。

MRS 培养基:葡萄糖 10 g, 牛肉蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, 吐温-80 1 mL, 柠檬酸氢二铵 2 g, 乙酸钠 5 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 0.58 g, MnSO_4 0.25 g, 121℃ 灭菌 20 min。

1.1.4 纸层析液

展开剂:正丁醇:冰乙酸:蒸馏水为 2:1:1。显色

剂:1 L 展开剂中加入 0.6 g 溴酚蓝。将试剂混合均匀后,倒入试剂瓶中,密封储存备用^[14-15]。

1.2 方法

1.2.1 干红山葡萄酒酿制

工艺流程:
山葡萄→清洗挑选→破碎→加糖→接种→主发酵→过滤

技术要点:
山葡萄预处理:山葡萄清洗后,进行除梗分离,破碎,分装在发酵瓶中。按葡萄重量 10% 的量加入蔗糖。

菌种活化:将保存的酵母菌、乳酸菌菌种分别接入酵母培养基和 MRS 培养基中,于 25 ℃ 活化培养 48 h 后备用。

接种:按所需接种量取活化液体菌种,于 2 800 r/min 离心 10 min,弃去上清液,将离心得到的沉淀用葡萄汁洗入发酵瓶中。

发酵:放置设定温度的培养箱里发酵,每天测量失重,至恒重即主发酵结束。

过滤:用 100 目过滤袋进行自然过滤,得干红山葡萄酒,于 4 ℃ 恒温储藏备用。

1.2.2 山葡萄酒主发酵降酸最佳用菌组合筛选

将葡萄酒酵母(Y_1)、降酸酵母(Y_2)、乳酸菌(L)按表 1 进行组合,接入山葡萄汁中进行发酵,通过比较发酵后山葡萄酒的 pH 值,筛选出最佳用菌组合。

表 1 山葡萄酒最佳菌种组合的筛选方案				
Table 1 V. amurensis wines of the best strains combined screening programme				
菌种	1 组	2 组	3 组	4 组
Y_1	10%		5%	
Y_2		10%	5%	5%
L				5%

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 温度对山葡萄酒主发酵降酸的影响

将破碎分装后的山葡萄按酵母菌和乳酸菌为 6% 和 4% 的量接入两种菌种,分别置于室温(20 ~ 22 ℃)、25、27、30℃ 四组温度下进行发酵,探究温度对山葡萄酒主发酵降酸的影响。

1.2.3.2 降酸酵母与乳酸菌比例对山葡萄酒主发酵降酸的影响

将降酸酵母菌(Y_2)和乳酸菌(L)分别以 5% + 5%、6% + 4%、4% + 6% 和 3% + 7% 的接种量接入葡萄酒中,于 25 ℃ 下进行发酵,探究降酸酵母菌与乳

酸菌比例对山葡萄酒主发酵降酸的影响。

1.2.4 正交试验

1.2.4.1 正交试验

在单因素试验的基础上,对山葡萄酒主发酵温度、混合菌(Y_2 : L = 1: 1)用量、发酵时间进行三因素三水平正交试验 $L_9(3^3)$ 。正交试验设计如表 2 所示。每组试验做 3 个重复,结果取平均值。

表 2 正交试验设计表			
Table 2 Orthogonal test designs table			
因素水平	发酵温度 (A)/℃	混合菌 用量(B)/%	发酵天数 (C)/d
1	22	8	14
2	25	10	16
3	28	12	18

1.2.5 检测方法

pH 值的检测采用精密酸度计测定;总糖的检测采用 3,5-二硝基水杨酸法测定;苹果酸乳酸转化量的检测采用纸层析法测定。

2 结果与分析

2.1 山葡萄酒主发酵降酸最佳用菌组合筛选结果

测量接入不同菌种的山葡萄主发酵 12 ~ 16 d 酒液的 pH 值,结果如图 1 所示。

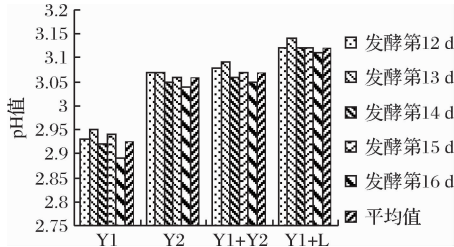


图 1 不同菌种发酵山葡萄酒 pH 值的变化
Fig. 1 Different strains fermentation of V. amurensis wine pH value changes

从图 1 可看出,接入不同菌种 4 个试验组的 pH 值都有升高,随着发酵时间的延长,pH 值会略有下降。只添加葡萄酒酵母的山葡萄酒 pH 值的平均值为 2.93,在为 4 组中最低;在发酵第 13 天时 pH 值达到最高值 2.95,与发酵前的 pH 值相比增加了 0.08。只添加降酸酵母的山葡萄酒 pH 值的平均值为 3.06,发酵第 12 天和第 13 天均为最大值 3.07,与发酵前的 pH 值相比增加了 0.20。同时添加葡萄酒酵母和降酸酵母的山葡萄酒 pH 值的平均值为 3.07,在发酵第 13 天时达到最大值 3.09,与发酵前的 pH 值相比

增加了 0.22。同时添加降酸酵母和乳酸菌的山葡萄酒 pH 值的平均值为 3.12, 为 4 组中最高; 在发酵第 13 天时 pH 值达到最高值 3.14, 与发酵前的 pH 值相比增加了 0.27, 是 4 组中 pH 值升高最多高的一组。

比较各组最大 pH 升高值, $(Y_1 + L)$ 组 (0.27) > $(Y_1 + Y_2)$ 组 (0.22) > Y_2 组 (0.20) > Y_1 组 (0.08), 即添加降酸酵母和乳酸菌组合降酸效果最好, 其次为添加葡萄酒酵母和降酸酵母组合、添加单一降酸酵母组, 添加单一葡萄酒酵母组降酸效果最差。

测量接入不同菌种的山葡萄主发酵 12 d 酒液的总糖, 结果如表 3 所示。

表 3 不同菌种发酵的山葡萄酒总糖含量

Table 3 Total sugar content of different strains fermentation of *V. amurensis* wine

组号	1-1	1-2	1-3	1-4
总糖含量/(g · L ⁻¹)	3.80	1.76	2.50	2.02

总糖含量小于 4 g/L 为干红葡萄酒, 从表 3 可看出, 4 种不同菌种发酵的山葡萄酒总糖含量均小于 4 g/L, 说明发酵 12 d, 发酵基本结束, 为干红葡萄酒。

2.2 单因素试验

2.2.1 温度对山葡萄酒主发酵降酸的影响

测量山葡萄在不同温度下发酵 13 ~ 17 d 的 pH 值, 结果如图 2 所示。

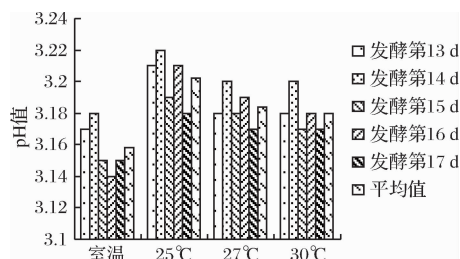


图 2 温度对山葡萄酒主发酵降酸的影响

Fig. 2 Effect of temperature on *V. amurensis* wine main fermentation and deacidification

从图 2 可看出, 不同温度下发酵的山葡萄酒的 pH 值都有升高, 随着发酵时间的延长, pH 值会略有下降。室温 (20 ~ 22 °C) 下发酵的山葡萄酒平均 pH 值为 3.158, 为 4 组中最低, 在发酵第 14 d 时 pH 值达到最高值 3.18, 最大值与发酵前的 pH 值相比增加了 0.23, pH 升高值为 4 组中最小; 25 °C 下发酵的山葡萄酒平均 pH 值为 3.202, 为 4 组中最高, 在发酵第 14 天时 pH 值达到最高值 3.22, 最大值与发酵前的 pH 值相比增加了 0.27, pH 升高值为 4 组中最大; 27 °C 下发酵的山葡萄酒平均 pH 值为 3.184, 发酵第

14 天时 pH 值达到最大值 3.20, 最大值与发酵前的 pH 值相比增加了 0.25; 30 °C 下发酵的山葡萄酒平均 pH 值为 3.180, 在发酵第 14 天时达到最大值 3.20, 最大值与发酵前的 pH 值相比也增加了 0.25。

比较各组最大 pH 升高值为 25 °C (0.27) > 27 °C (0.25) = 30 °C (0.25) > 室温 (0.23)。即降酸效果最好的发酵温度, 25 °C, 其次为 27 °C、30 °C, 降酸效果最差的为室温 (20 ~ 22 °C)。由此可见, 主发酵温度为 25 °C 时有利于山葡萄酒的降酸。

2.2.2 降酸酵母与乳酸菌比例对山葡萄酒主发酵降酸的影响

测接种不同比例的降酸酵母与乳酸菌的山葡萄酒发酵 13 ~ 17 d 的 pH 值, 结果如图 3 所示。

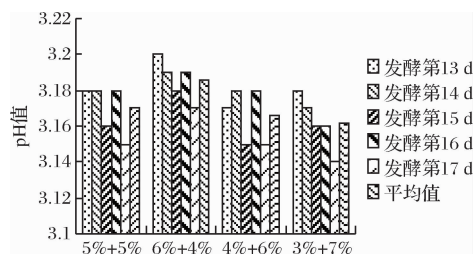


图 3 酵母菌与乳酸菌比例对山葡萄酒主发酵降酸的影响

Fig. 3 The proportion of lactic acid bacteria and yeast effects on main fermentation of *V. amurensis* wine and deacidification

从图 3 可看出, 4 组设置不同酵母菌与乳酸菌比例的山葡萄酒的 pH 值整体都有升高, 随着发酵时间的延长, pH 值会略有下降。

接种酵母菌和乳酸为 (6% + 4%) 的山葡萄酒平均 pH 值是 3.186, 为 4 组中最高, 在发酵第 13 天时 pH 值达到最高值 3.20, 最大值与发酵前的 pH 值相比增加了 0.25, 为 4 组中最大; 接种酵母菌和乳酸为 (5% + 5%) 的山葡萄酒平均 pH 值为 3.170, 在发酵第 13、14、15 天时 pH 值均为检测 5 d 中的最高值 3.18, 最大值与发酵前的 pH 值相比增加了 0.23; 接种酵母菌和乳酸为 (4% + 6%) 的山葡萄酒平均 pH 值为 3.166, 发酵第 14、16 天时 pH 值均为检测 5 d 中的最大值 3.18, 最大值与发酵前的 pH 值相比增加了 0.23; 接种酵母菌和乳酸为 (3% + 7%) 的山葡萄酒平均 pH 值为 3.162, 在发酵第 13 天时达到最大值 3.18, 最大值与发酵前的 pH 值相比增加了 0.23。

比较酵母菌与乳酸菌接种比例不同的各组平均 pH 值, $(6\% + 4\%)$ 组 (3.186) > $(5\% + 5\%)$ 组 (3.170) = $(4\% + 6\%)$ 组 (3.166) = $(3\% + 7\%)$ 组

(3.162)。由此看出,降酸效果最好的组为酵母菌与乳酸菌为(6% + 4%)的山葡萄酒,其次为(5% + 5%)、(4% + 6%),降酸效果最差的为(3% + 7%)的山葡萄酒。所以,酵母菌与乳酸菌为(6% + 4%)的配比组合更有利于山葡萄酒主发酵的降酸。

2.3 正交试验

表 3 $L_9(3^3)$ 正交试验结果与数据分析
Table 3 $L_9(3^3)$ The results of orthogonal experiment and data analysis

试验号	温度(A)/ ℃	接种量(B)/ %	发酵天数(C)/ d	pH 值
1	1(22)	1(8)	1(13)	3.15
2	1	2(10)	2(15)	3.13
3	1	3(12)	3(17)	3.17
4	2(25)	1	2	3.15
5	2	2	3	3.09
6	2	3	1	3.19
7	3(28)	1	3	3.10
8	3	2	1	3.14
9	3	3	2	3.14
K_1	9.45	9.40	9.48	
K_2	9.43	9.36	9.42	
K_3	9.38	9.50	9.36	
k_1	3.150	3.133	3.160	
k_2	3.143	3.120	3.140	
k_3	3.127	3.167	3.120	
R	0.023	0.047	0.017	

通过对表 3 进行分析,比较极差 R 可得, $R_B > R_A > R_C$,3 个因素对山葡萄酒主发酵降酸的影响为:菌种接种量对山葡萄酒降酸影响最大,其次为发酵温度,发酵时间对试验结果影响最小; A 因素列: $K_1 > K_2 > K_3$, B 因素列: $K_3 > K_1 > K_2$, C 因素列: $K_1 > K_2 > K_3$,因此,正交试验结果的最优组合为 $A_1B_3C_1$,即发酵温度 22 ℃,菌种接种量为 12%,发酵时间 13 d。

直接观察表 3 可知,6 组($A_2B_3C_1$)的 pH 值 3.19,是 9 个试验组中最高的。分别按 6 组($A_2B_3C_1$)和分析得到的最优组合 Y 组($A_1B_3C_1$)的条件发酵山葡萄酒,对 2 份酒样以及单一葡萄酒酵母发酵的山葡萄酒样(Y_{11})进行纸层析对比试验,观察苹果酸、乳酸转化进程,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,Y 组和 6 组均有乳酸斑点出现,葡萄酒酵母发酵的山葡萄酒酒样(Y_{11})无乳酸斑点出现,说明 Y 组和 6 组酒样已有苹果酸转化为乳酸,而葡萄酒酵母发酵的山葡萄酒酒样的没有苹果酸转化为乳酸,此酒样 pH 值为 2.89,pH 升高值很小,与纸层析结果相吻合。6 组比 Y 组比较,6 组苹果酸的斑

点明显,说明 6 组的苹果酸转化比 Y 组的多,6 组工艺为最优组合,即发酵温度 25℃,菌种接种量为 12%,发酵时间 13d。

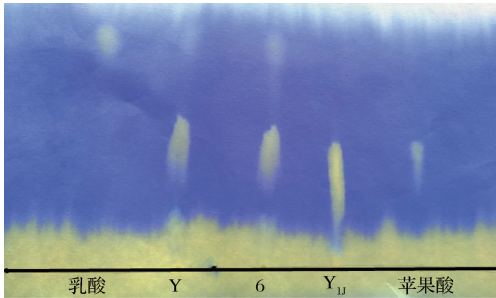


图 4 验证试验酒样的苹果酸-乳酸转化进程
Fig. 4 Malolactic fermentation process on replication experiment wine samples

3 结论与讨论

通过对山葡萄酒主发酵降酸最佳用菌的筛选和主发酵降酸最佳工艺条件的优化试验可知,如果将降酸酵母菌和苹果酸-乳酸发酵菌同时接入山葡萄汁进行主发酵,在完成酒精发酵的同时,可以部分地将苹果酸转化为乳酸,降低山葡萄酒的酸度,而不影响酒的发酵速度和风味。山葡萄酒主发酵降酸最佳菌种组合为降酸酵母菌与乳酸菌组合,降酸酵母菌与乳酸菌最佳比例为 3:2,最佳总接种量为 12%,最佳发酵温度为 25 ℃,最佳发酵时间为 13 d。在此条件下进行干红山葡萄酒发酵,可使葡萄酒 pH 值升高 0.25 ~ 0.30,山葡萄原酒的酸涩味会有一定程度的减弱,适口性提高。

参 考 文 献

[1] 崔长伟,刘丽媛,王华,等.山葡萄综合利用研究进展[J].食品科学,2015,13(36):276-282.
[2] 宋润刚,路文鹏,张庆田,等.酿造冰红山葡萄酒新品种北冰红的区域试验[J].中外葡萄与葡萄酒,2014(3):25-29.
[3] 高鹏飞,丁玉萍,刘东旭,等.工艺条件对寒地山葡萄酒生物降酸的影响探究[J].中国酿造,2016,35(12):90-93.
[4] 李瑞国,韩焜,周志江.葡萄酒苹果酸乳酸发酵研究进展[J].食品研究与开发,2010,31(8):228-233.
[5] LI N, DUAN J, GAO D, et al. Mutation and selection of *Oenococcus oeni* for controlling wine malolactic fermentation [J]. European Food Research and Technology, 2014, 240(1):93-100.

- [6] RUIZ P, IZQUIERDO P, SESENA S, et al. Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenococcus oeni* strains in low pH wines. [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(10).
- [7] 金刚. 苹果酸-乳酸发酵细菌的多样性及其耐酒精分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2015.
- [8] 彭传涛,贾春雨,文彦,等. 苹果酸-乳酸发酵对干红葡萄酒感官质量的影响[J]. 中国食品学报,2014,2(14): 261-268.
- [9] 何翠婵. 微生物降酸技术在青梅汁中的应用[D]. 广州:华南理工大学,2014.
- [10] 游新勇,李琼,王国泽,等. 木瓜干酒苹果酸乳酸发酵降酸工艺技术研究[J]. 食品工业科技,2012,33(15): 202-205.
- [11] 李维新. 优良 MLF 乳酸菌选育及其产酶特性研究与应用[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [12] 金炳奎,宗成文,曹后男,等. 山葡萄 SRAP 技术体系的建立及其在品种鉴定中的应用[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(2): 198-205.
- [13] M BOUIX · S GHORBAL. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015(193): 139-146.
- [14] 邢玮,韩建春. 沙棘果酒苹果酸-乳酸发酵影响因素研究[J]. 东北农业大学学报,2012,43(2):20-27.
- [15] 李莹莹. 酒球菌 SD-2a 活性干粉直投葡萄酒进行苹果酸-乳酸发酵的研究[D]. 西北农林科技大学,2015.
- [16] IZQUIERDO P, GARCIA E, MARTINEZ J L, et al. Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel[J]. Vitis, 2015, 43(3): 149-153.

Screening and optimization of the optimum fermentation process for reducing acid in *V. amurensis* wines

DING Yu-ping, GAO Peng-fei, CHEN Qi, HAN Cheng-wu,
LI Chun-feng, LIU De-jiang

(College of Life Science, Jiamusi University, Institute of Applied Microbiology, Jiamusi 154007, China)

ABSTRACT *V. amurensis* wines in Northeast China, with high total acidity, is characterized by the poor palatability. For the purpose of reducing the acidity of grape wine, this paper is to explore the best main fermentation of wild grape wine deacidification with bacteria and process conditions. Through comparison tests screening out the best combination of reducing acid bacteria, it is adding reducing-acid yeast and *Lactobacillus* at the same time. Single Factor experiment and orthogonal experiment results show that: the inoculation ratio of reducing - acid yeast and *Lactobacillus* is 6:4, total inoculum 12%, fermentation temperature 25 °C, fermented time 14 d. Wild grape wine fermenting primarily in the conditions, deacidification brings about a striking effect.

Key words *V. amurensis* wines; deacidification; primary fermentation process; condition optimization