

# 苹果渣固态发酵苹果醋工艺研究

宋娟, 张霖红, 胡生海, 李明泽

(甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以新鲜苹果渣为主要原料, 采用果胶酶法对苹果渣的酒精发酵和醋酸发酵工艺进行优化研究, 通过正交试验确定最优酿造工艺参数。初步获得的苹果渣酒精发酵条件是果胶酶添加量 0.06%、酵母接种量 8%、初始糖度 16 °Brix; 苹果渣醋酸发酵过程的最优工艺条件是干湿苹果渣的配料比为 1:10、醋酸菌接种量 15%、发酵温度 32 °C, 此条件下总酸含量增长到 38.267 6 g/L。

**关键词:** 苹果渣; 固态发酵; 苹果醋

**中图分类号:** TS275.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2017)08-0048-06

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2017.08.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2017.08.012)

## Research on Apple Vinegar Production from Apple Pomace by Solid State Fermentation

SONG Juan, ZHANG Jihong, HU Shenghai, LI Mingze

(Institute of Agricultural Product Storage and Processing, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** To transform waste into assets that disposing of apple process, using fresh apple pomace as the main ingredient. Being used pectinase enzymatic to study of alcohol fermentation and acetic acid fermentation technology, and orthogonal experimental design is applied for optimizing fermentation technical parameters. We have preliminary obtained the optimal conditions of alcohol fermentation is the addition amount of pectinase 0.06%, yeast inoculation quantity 8%, initial sugar degree 16° Brix. And the optimal conditions of acetic fermentation is dried apple pomace: fresh apple pomace 1:10, acetic bacteria inoculation quantity 15%, fermentation temperature 32 °C, the acidity increase is 38.267 6 g/L under this condition.

**Key words:** Apple pomace; Solid state fermentation; Apple vinegar

苹果被中国农业部确定为 11 种具有明显竞争力的特色优势农产品之一<sup>[1]</sup>, 其产量占国内水果总产量的 26.6%<sup>[2]</sup>, 是中国第一大果品产业<sup>[3]</sup>, 且年产量居世界第一位<sup>[4]</sup>。从苹果的消费及深加工方面来看<sup>[5]</sup>, 目前我国鲜食苹果消费量占苹果消费总量的 64%, 苹果加工制品的消费量约占苹果消费总量的 36%。苹果加工过程中会产生大量的下脚料(果皮、果核和残余果肉), 占原料总量的 20%~50%。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 万多 t。苹果渣中富含较高水分(约 75%~80%)<sup>[6]</sup>、丰富的多糖和酚类等具有药用价值的营养物质, 并且香味浓

郁, 具有较高的二次加工潜能<sup>[7-10]</sup>。但是, 苹果渣综合利用率尚不足 10%<sup>[5]</sup>, 仅有少量用作饲料, 其余当作废弃物处理, 堆积后腐烂变质, 造成资源的浪费和环境的污染<sup>[11]</sup>, 成为困扰果汁企业的难题。针对这一问题, 目前解决途径主要是从苹果渣中提取生物活性物质进行加工<sup>[12]</sup>, 开发功能食品, 主要包括(1)苹果渣饮料(膳食纤维饮料、果醋饮料)。(2)提取有效物质, 采用高压脉冲电场<sup>[13]</sup>、酶法<sup>[14]</sup>等技术进行苹果果胶的提取与优化<sup>[15]</sup>; 以及采用酸法<sup>[16]</sup>、超声<sup>[17]</sup>、微波<sup>[18-19]</sup>等手段对苹果多酚进行提取与纯化<sup>[20]</sup>。(3)采用生物发酵<sup>[21]</sup>、多菌种固态发酵法<sup>[22-23]</sup>生产苹果渣复合

收稿日期: 2017-03-10

**基金项目:** 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-28); 国家自然科学基金地区基金项目(31460449); 甘肃省农牧厅生物技术专项 (GNSW-2013-31); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项中青年创新基金项目(2016GAAS49)。

**作者简介:** 宋娟 (1988—), 女, 甘肃榆中人, 研究实习员, 硕士, 主要从事农产品贮藏与加工研究工作。联系电话: (0)15214032113。E-mail: songjuan88126@126.com。

**通信作者:** 张霖红 (1977—), 女, 陕西周至人, 副研究员, 硕士, 主要从事果蔬加工方面的研究工作。联系电话: (0931)7781216。

蛋白饲料<sup>[24-25]</sup>。我们在苹果醋液态发酵研究的基础上,采用果胶酶法<sup>[26]</sup>对苹果渣发酵制作苹果醋固态的工艺进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 苹果渣为苹果白兰地加工过程产生的下脚料,甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所提供。酵母菌 CICC1750、醋酸菌 CICC20056 购自中国微生物菌种保藏中心。

1.1.2 培养基 马铃薯培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,自来水 1 000 mL, pH 6.0。液体培养基:葡萄糖 1%,酵母膏 1%,无水乙醇 3%, pH 4.5。固体培养基:葡萄糖 1%,酵母膏 1%,无水乙醇 3%,琼脂 2%, pH 4.5。121 °C, 30 min 高压灭菌,备用。

1.1.3 试剂 氢氧化钠(粒),分析纯(天津大茂);葡萄糖(上海广诺);酵母膏(北京奥博星);琼脂(上海致化);无水乙醇、碳酸钙、酚酞(天津光复);果胶酶(> 50 000 u/g,上海源聚)。

### 1.2 实验仪器

BSA224S-CW 电子天平(赛多利斯); YXQ-LS 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯); ZHJH-C1112B 超净工作台(上海智城); ZWY-2102 恒温培养振荡器(上海智城); LRH-250 生化培养箱(上海一恒); TGL-16MC 冷冻离心机(长沙维尔康); HH-S4 电热恒温水浴锅(北京科伟); KDM-2000 型可调式电热套(北京科伟); 碱式滴定管(上海国药); PAL-1 糖度计: JAPAN ATAGO; 酒精计(河北科化)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 工艺流程 苹果→分选→清洗→破碎→汁、渣分离→果胶酶处理苹果渣→糖化→酵母菌液→酒精发酵→测定酒精体积分数和糖度→加干苹果渣、醋酸菌→固态醋酸发酵→测定酒精体积分数和总酸含量

1.3.2 菌种活化 购置的冻干保藏菌种先打管复活,将溶解后的菌悬液转移至盛有 4~5 mL 液体培养基的试管中,并取 100 μL 转接到固体培养基,一代菌种需延长培养时间,再转接至 2~3 代恢复活力,备用。

1.3.3 发酵苹果渣制备 将鲜渣 90 °C 杀菌 10 min,冷却备用;将鲜渣经过太阳能干燥脱水处理得到的干苹果渣真空保存备用。

1.3.4 苹果渣发酵的指标测定方法 糖度用手持糖度仪测定;酒精体积分数采用蒸馏法测定<sup>[27]</sup>;总酸含量采用酸碱滴定法测定<sup>[28]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果渣酒精发酵工艺研究

2.1.1 果胶酶添加量对苹果渣酒精发酵的影响 取 5 份同质量(500 g)的苹果渣,其中 1 份不添加果胶酶,作为对照样品,4 份果胶酶添加量分别为 0.01%、0.02%、0.04%、0.06%,搅拌均匀,在水浴锅中 45 °C 酶解 4 h。酶解后接种 8% 酵母菌、初始糖度调整到 15 °Brix。24 °C 发酵,检测到酒精体积分数不增加、糖度不降低时结束酒精发酵,记录酒精体积分数。

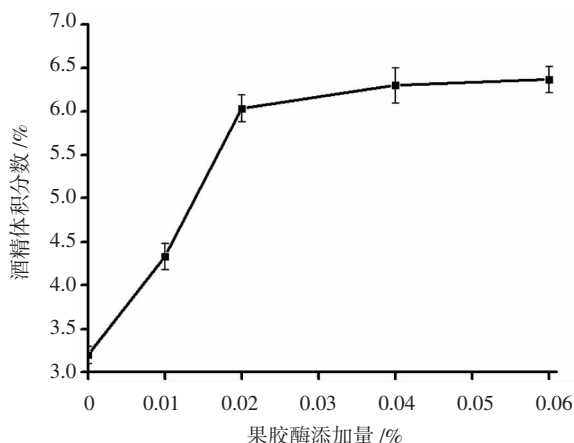


图1 果胶酶添加量对苹果渣酒精发酵的影响

从图 1 可知,随着果胶酶添加量的增大,酒精体积分数也在增大,可见苹果渣酒精发酵的酒精体积分数与果胶酶添加量呈正相关。当果胶酶添加量大于 0.02% 时,酒精体积分数的增加趋势比较缓和,综合考虑,选择果胶酶添加量范围 0.02%~0.06%。

2.1.2 酵母接种量对苹果渣酒精发酵的影响 取 5 份同质量(500 g)苹果渣,依次接种 2%、4%、6%、8%、10% 酵母菌,搅拌均匀,果胶酶添加量为 0.02%,初始糖度调整到 15 °Brix。24 °C 发酵,检测到酒精体积分数不增加、糖度不降低时结束酒精发酵,记录酒精体积分数。

从图 2 可以看出,发酵周期的长短与酵母接种量密切相关。随着酵母接种量的增大,酒精体积分数先升高后降低,酵母接种量 8% 时酒精体积分数达到最大值,故选择酵母接种量范围 6%~10%。

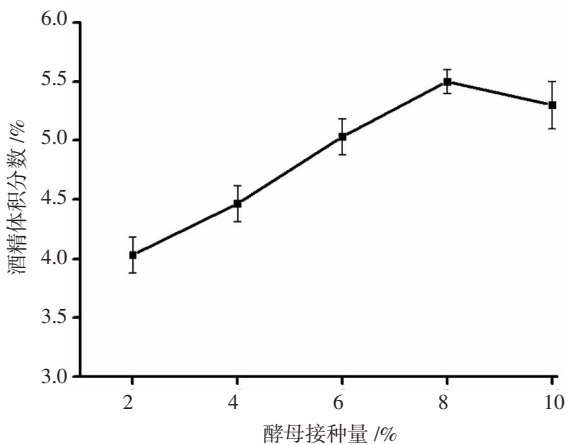


图2 酵母接种量对苹果渣酒精发酵的影响

2.1.3 初始糖度对苹果渣酒精发酵的影响 取 5 份同质量(500 g)苹果渣, 其中 1 份苹果渣初始糖度为 13 °Brix, 作为对照样品, 后 4 份调整糖度到 14 °Brix、15 °Brix、16 °Brix、17 °Brix, 搅拌均匀, 接种 8% 酵母菌、果胶酶添加量为 0.02%。24 °C 发酵, 检测到酒精体积分数不增加、糖度不降低, 即可结束酒精发酵, 记录酒精体积分数。

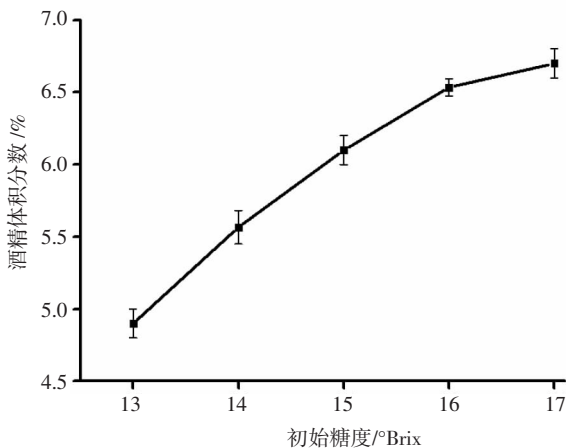


图3 初始糖度对苹果渣酒精发酵的影响

从图 3 可知, 随着初始糖度的增加, 酒精体积分数也在增加, 然而糖度越大, 其酒精体积分数增加趋于平缓, 故选择初始糖度范围 15 ~ 17 °Brix。

2.1.4 酒精发酵最佳工艺参数的确定 在以上 3 个单因素试验的基础上, 选择果胶酶添加量(A)、酵母接种量(B)、初始糖度(C), 设计三因素三水平  $L_9(3^3)$  的正交试验, 以酒精体积分数为指标, 确定酒精发酵最佳工艺参数。正交试验设计见表 1。

从表 2 可知, 第 8 组和第 9 组试验的酒精体积分数最大, 为 7.0。

表 1 酒精发酵正交试验因素水平

水平	A 果胶酶添加量 /%	B 酵母接种量 /%	C 初始糖度 /°Brix
1	0.02	6	15
2	0.04	8	16
3	0.06	10	17

表 2 苹果渣酒精发酵正交试验结果

实验编号	A	B	C	酒精体积分数 /%
1	1	1	1	5.5
2	1	2	2	6.5
3	1	3	3	6.0
4	2	1	2	6.5
5	2	2	3	6.5
6	2	3	1	6.5
7	3	1	3	6.5
8	3	2	1	7.0
9	3	3	2	7.0

从表 3 可知, 通过正交试验分析, 得到苹果渣酒精发酵的各因素主次关系为  $A > B > C$ , 即果胶酶添加量 > 酵母接种量 > 初始糖度。综合各因素 K 值和直观比较分析, 获得苹果渣酒精发酵的最佳工艺组合为:  $A_3B_2C_2$ 。

表 3 苹果渣酒精发酵正交试验结果分析

水平	因素		
	A	B	C
K1	6.000	6.167	6.300
K2	6.500	6.667	6.667
K3	6.833	6.500	6.333
R	0.833	0.500	0.334
因素主次	A > B > C		
优化方案	$A_3B_2C_2$		

然而, 最佳工艺组合  $A_3B_2C_2$  没有出现在正交试验中, 所以将优化组合  $A_3B_2C_2$  与表 2 中的 8 号组合  $A_3B_2C_1$ 、9 号组合  $A_3B_3C_2$  进行验证, 以酒精体积分数为考察指标, 结果见表 4。

表 4 验证实验结果

项目	酒精体积分数 /%
$A_3B_2C_1$	7.0
$A_3B_3C_2$	7.0
$A_3B_2C_2$ (最佳组合)	7.2

由表4可知,最佳组合(A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>)的酒精体积分数为7.2%,大于表2中所有组合数值,因此初步获得的苹果渣酒精发酵最优工艺参数是A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即果胶酶添加量0.06%、酵母接种量8%、初始糖度16°Brix。

2.1.5 酒精发酵过程中酒精体积分数和糖度的变化 从图4可知,随着发酵时间的延长,酒精体积分数也在逐渐增加,2~4 d增加明显,5~7 d增加缓慢,因此选控好酒精积累的最佳时间点对生产有重大意义。另外,随着发酵时间的延长,糖度呈现下降趋势,1~4 d明显降低,5~7 d缓慢降低,初步判断酒精发酵停止。

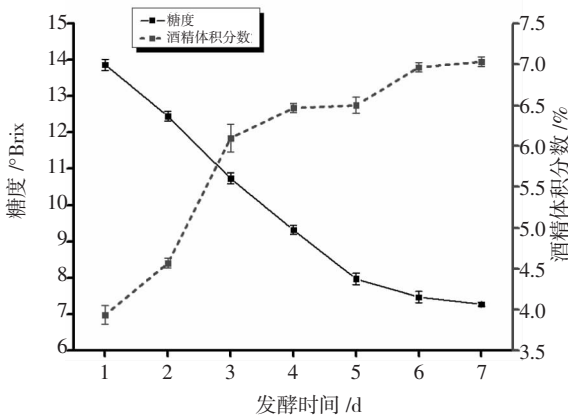


图4 酒精发酵过程中酒精体积分数和糖度的变化

2.2 苹果渣醋酸发酵工艺研究

2.2.1 配料比对醋酸发酵的影响 将经太阳能烘干处理的干苹果渣和湿苹果渣分别按照1:8、1:9、1:10、1:11、1:12 配料比进行混合,然后按10%接种醋酸菌,搅拌均匀,30℃发酵7 d左右,测定总酸含量。

从图5可知,组配料比在14 d的总酸含量以1:10最大,1:12最小。添加干苹果渣是为了疏松醋醅,促进空气流通。随着时间的延长,配料中干苹果渣的含量越低,发酵液的总酸含量越低,主要是由于发酵液内的空气流通量降低,醋酸菌呼吸需氧量不足而导致产酸速率降低。因此,选择干湿苹果渣的配料比是1:8,1:9和1:10。

2.2.2 醋酸菌接种量对醋酸发酵的影响 将经太阳能干燥处理的干苹果渣和湿苹果渣按照1:10进行混合,然后分别接种2%、5%、10%、15%、20%醋酸菌,搅拌均匀,30℃发酵7 d左右,测定总酸含量。

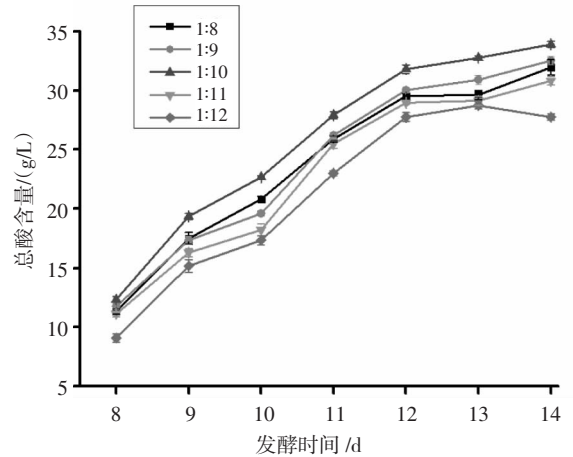


图5 配料比对醋酸发酵的影响

如图6所示,5组醋酸菌接种量在14 d的总酸含量是15%最大,2%最小。因为醋酸菌可以将乙醇氧化产生乙酸,随着发酵时间的延长,醋酸菌接种量越大,发酵液的总酸含量也伴随着不同程度的升高。因此,选择醋酸菌接种量是10%、15%和20%。

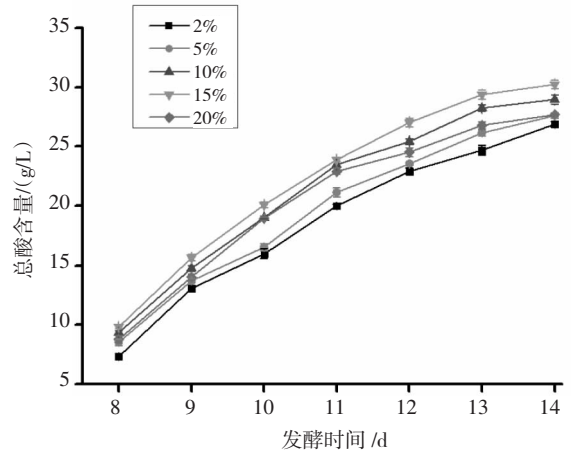


图6 醋酸菌接种量对醋酸发酵的影响

2.2.3 发酵温度对醋酸发酵的影响 将经太阳能烘干处理的干苹果渣和湿苹果渣按照1:10进行混合,然后按10%接种醋酸菌,搅拌均匀,依次放入24℃、26℃、28℃、30℃、32℃培养箱中,发酵7 d左右,测定总酸含量。

从图7可知,5组温度处理在14 d的总酸含量是32℃最大,24℃最小。可见温度是影响生物酶活的重要条件。随着时间的延长,适宜的温度越高,发酵液的总酸含量越高,这主要是由于最适温度保证了醋酸菌代谢活跃,提高了产酸速率。因此,选择醋酸发酵温度是28℃、30℃和32℃。



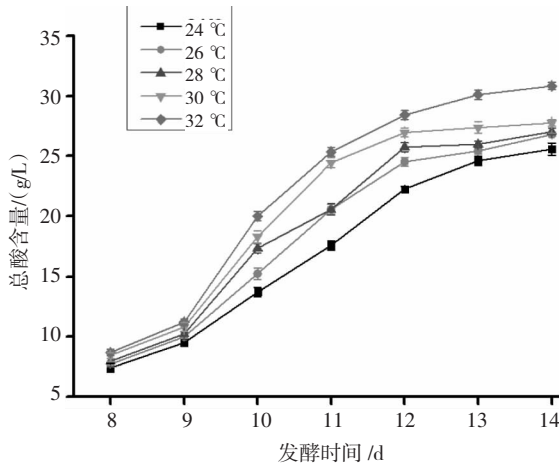


图 7 发酵温度对醋酸发酵的影响

2.2.4 醋酸发酵最佳工艺参数的确定 在以上 3 个单因素试验的基础上，选择干湿苹果渣的配料比(A)、醋酸菌接种量(B)、发酵温度(℃)，设计三因素三水平  $L_9(3^3)$  正交试验，以总酸含量为指标，确定醋酸发酵最佳工艺参数。正交试验设计见表 5，结果见表 6。从表 6 可知，第 5 组试验的总酸含量最高，为 37.945 2 g/L。

表 5 醋酸发酵正交试验因素水平

水平	A 配料比	B 醋酸菌接种量 /%	C 发酵温度 /℃
1	1 : 8	10	28
2	1 : 9	15	30
3	1 : 10	20	32

表 6 苹果渣醋酸发酵正交试验结果

实验号	A	B	C	总酸含量 / (g/L)
1	1	1	1	34.113 6
2	1	2	2	33.372 0
3	1	3	3	34.978 8
4	2	1	2	32.630 4
5	2	2	3	37.945 2
6	2	3	1	34.731 6
7	3	1	3	35.967 6
8	3	2	1	36.214 8
9	3	3	2	33.372 0

从表 7 可知，通过正交试验分析，获得醋酸发酵的各因素主次关系为  $C > B > A$ ，即发酵温度  $>$  醋酸菌接种量  $>$  配料比。其中，发酵温度是显著因素。综合各因素  $K$  值和直观比较分析，获得苹果渣醋酸发酵的最佳工艺组合为： $A_3B_2C_3$ 。

表 7 苹果渣醋酸发酵正交试验结果分析

水平	因素		
	A	B	C
K1	34.155	34.237	35.020
K2	35.102	35.844	33.125
K3	35.185	34.361	36.297
R	1.030	1.607	3.172
因素主次	$C > B > A$		
优化方案	$A_3B_2C_3$		

然而，最佳工艺组合  $A_3B_2C_3$  没有出现在正交试验中，所以将优化组合  $A_3B_2C_3$  与表 6 中的组合  $A_2B_2C_3$  进行验证，以总酸含量为考察指标，见表 8。由表 8 可知，最佳组合 ( $A_3B_2C_3$ ) 的总酸含量为 38.267 6 g/L，大于表 6 中所有组合数值，因此初步获得苹果渣醋酸发酵最优工艺参数是  $A_3B_2C_3$ ，即干湿苹果渣的配料比为 1 : 10、醋酸菌接种量 15%、发酵温度 32 ℃。

表 8 验证试验结果

项目	总酸含量 / (g/L)
$A_2B_2C_3$	37.945 2
$A_3B_2C_3$ (最佳组合)	38.267 6

2.2.5 醋酸发酵过程中酒精体积分数和总酸含量的变化

从图 8 可知，随着发酵时间的延长，总酸含量也在逐渐增加，8 ~ 13 d 增加明显，13 ~ 14 d 增加缓慢，可能是由于醋酸被过度氧化产生  $CO_2$  使得总酸含量增加幅度变小。因此选控好总酸含量积累的最佳时间点对生产有重大意义。另外，随着发酵时间的延长，酒精体积分数呈现下降趋势，14 d 降到最小值，初步判断醋酸发酵停止。

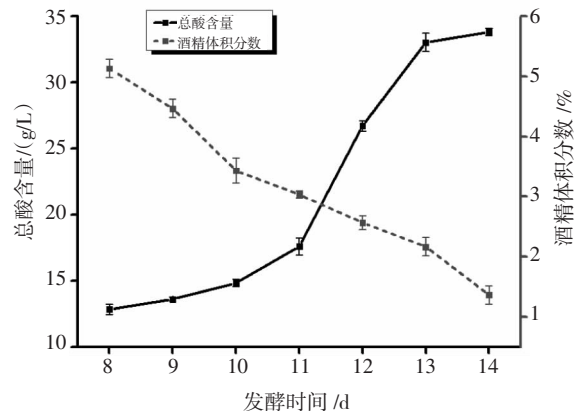


图 8 醋酸发酵过程中酒精体积分数和总酸含量的变化

### 3 结论

本研究以废弃的新鲜苹果渣为主要原料,通过果胶酶法对苹果渣发酵工艺进行研究,获得了预期的苹果渣固态发酵的关键技术参数。苹果渣酒精发酵的最优技术参数为胶酶添加量 0.06%、酵母接种量 8%、初始糖度 16 °Brix,此组合的酒精体积分数高达 7.2%。苹果渣醋酸发酵的最优技术参数为湿苹果渣的配料比是 1:10、醋酸菌接种量为 15%、发酵温度 32 °C,此组合的总酸含量增长到 38.267 6 g/L。

### 参考文献:

- [1] 孟宪军,刘乃侨,毕金峰.基于主成分与聚类分析的苹果加工品质评价[J].农业工程学报,2014,30(13):276-284.
- [2] 聂继云,吕德国,李静,等.苹果果实中类黄酮化合物的研究进展[J].园艺学报,2009,36(9):1390-1397.
- [3] 聂继云,李志霞,李海飞,等.苹果理化品质评价指标研究[J].中国农业科学,2012,45(14):2895-2903.
- [4] 廖小军,胡小松.我国苹果生产、加工现状与发展对策[J].中国农业导报,2001,3(6):13-16.
- [5] 公丽艳.不同品种苹果加工脆片适宜性评价研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2014.
- [6] 姜心,陈伟,周波.正交试验三层次分析法对苹果渣固态发酵产果胶酶培养基优化的研[J].饲料工业,2009,30(24):38-41.
- [7] HOSSAM M A, MAHA M S, ENAS H A, et al. Antidiabetic activity of phenolic compounds from pecan bark in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Phytochemistry Letters, 2011(4): 337-341.
- [8] RANA S, GUPTA S, RANA A, et al. Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient[J]. Food Science and Human Wellness, 2015, 4(4): 180-187.
- [9] 刘永青,任琳,张子锋,等.苹果渣中多酚类物质的抑菌作用[J].浙江农业科学,2015,56(12):2018-2020.
- [10] 赵松.枣渣果醋发酵工艺研究及营养成分分析[D].保定:河北农业大学,2013.
- [11] 葛蕾.苹果渣多酚对高脂大鼠减肥降脂影响[J].食品研究与开发,2013,34(9):95-97.
- [12] 何金麟.苹果皮的综合利用及其他加工技术[J].现代食品,2016(15):38-39.
- [13] 殷涌光,樊向东,刘凤霞,等.用高压脉冲电场技术快速提取苹果渣果胶[J].吉林大学学报:工学版,2009,39(5):1224-1229.
- [14] WIKIERA A, MIKA M, STARZYŃSKA-JANISZEWSKA A, et al. Endo-xylanase and endo-cellulase assisted extraction of pectin from apple pomace[J]. Carbohydr Polym, 2016, 142: 199-205.
- [15] 翟丹丹.苹果罐头生产果渣中果胶提取工艺研究[J].农产品加工,2016(6):26-27.
- [16] 杨本华,要晓丽.苹果果胶提取工艺研究[J].山东化工,2015,44(22):45-51.
- [17] 陶令霞,王浩,常慧萍,等.苹果皮渣中苹果多酚的超声辅助提取工艺优化及其抗脂质氧化活性研究[J].河南工业大学学报,2008(1):32-36.
- [18] 王丽,李化,张钟.微波辅助提取苹果皮中的多酚类物质[J].饮料工业,2007(6):42-45.
- [19] 彭凯,张燕,王似锦,等.微波干燥预处理对苹果渣提取果胶的影响[J].农业工程学报,2008,24(7):222-226.
- [20] 葛邦国,宋焯.苹果渣中苹果多酚柱层析分离工艺研究[J].中国果菜,2016,36(2):20-24.
- [21] 王艳华,张庆华,陈顺,等.以苹果皮渣为主料生产生物饲料的研究[J].中国饲料,2004(8):35-36.
- [22] 朱新强,魏清伟,王永刚,等.固态发酵豆渣、葡萄渣和苹果渣复合蛋白饲料的研究[J].饲料研究,2016(4):54-59.
- [23] PACHAPUR V L, SARMA S J, BRAR S K, et al. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum* [J]. Bioresour Technol, 2015, 193: 297-306.
- [24] HANC A, CHADIMOVA Z. Nutrient recovery from apple pomace waste by vermicomposting technology [J]. Bioresour Technol, 2014, 168: 240-244.
- [25] JIANG J, HUANG Y, LIU X, et al. The effects of apple pomace, bentonite and calcium superphosphate on swine manure aerobic composting[J]. Waste Manag., 2014, 34(9): 1595-1602.
- [26] 张占军,王富花,曾晓雄.果胶酶在食品工业中的应用的研究进展[J].中国酿造,2010(10):4-6.
- [27] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 15038-2006 葡萄酒、果酒通用分析方法[S].北京:中国标准出版社,2006.
- [28] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 12456-2008 食品中总酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2008.

(本文责编:陈珩)