

泸型酒生产中不同层糟醅微生物与白酒风味的关系

沈才萍¹, 李喆², 敖宗华^{1,2,3}, 邓波^{1,3}, 沈小娟^{1,3}, 王松涛^{1,3,4}

(1. 泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州 646000; 2. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000;

3. 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000; 4. 江南大学, 江苏 无锡 214000)

摘要:对泸型酒酿造过程中同一窖池不同层次糟醅中典型微生物(酵母、细菌和芽孢、霉菌)的生长情况进行跟踪测定,并结合酒质,探究微生物生长与白酒风味成分之间的关系。结果表明:同一窖池不同层次糟醅微生物生长状况存在差异,表现为不同层糟醅内同种微生物最大峰出现时间及峰值有差异;相同时期内典型微生物的组成结构不同,这些差异是不同层糟醅酒产量和风味不同的重要原因。

关键词:不同层次糟醅;典型糟醅微生物;平板计数法;风味成分

中图分类号:TQ920.1

文献标志码:A

浓香型白酒的典型糟醅微生物主要包括酵母、霉菌、细菌和芽孢^[1],主要来源于酿酒环境、大曲和窖泥。微生物在相对封闭的窖池内部进行物质和能量的交换转化,这个过程决定了浓香型白酒特有的成分结构和风味特征^[2]。不同季节,窖内各类微生物数量分布趋势无较大差别。窖内各类微生物数目在同一层不同位置上基本无差异,但不同层糟醅由于所处窖池位置不同,因而微生态环境不同,并且随着发酵过程的进行,微生态环境变化情况存在差异,在微生物区系的演变过程中产生代谢物质差异,导致不同层糟醅所产酒的酒质不同。

糟醅中主要优势真菌的菌群变化影响着发酵过程中大分子物质的降解,进而影响着白酒风味物质的形成^[3]。其中,霉菌主要产生糖化酶和代谢产物的前体物质,酵母利用还原糖发酵产酒^[4]。细菌产生酸类代谢产物,产物与醇反应生成酯。

本实验通过跟踪发酵过程中不同层次糟醅典型微生物数目消长情况和糟醅理化性质变化,并结合酒质,探讨窖池中不同层糟醅微生物数目和构成与酒质之间的联系,为浓香型白酒发酵机理的深入探讨提供基础

数据。

1 材料和方法

1.1 实验窖池

窖池选取地点:泸州老窖国窖工段实验窖池。

1.2 取样方式

发酵过程取样:用取样器分别在上、中、下三层取糟醅。取样时间按0、3、6、9、14、19、24、31、40天和开窖,取出样品后立即装入无菌袋,及时分析。

1.3 实验仪器及药品

实验仪器:恒温培养箱、恒温水浴锅、超净工作台、气相色谱仪、酸式滴定管、碱式滴定管。

实验药品:虎红琼脂培养基、营养琼脂培养基。

1.4 实验方法

1.4.1 微生物培养分离

1.4.1.1 培养分离方法

实验采用稀释平板计数法^[5,6]。

称取10 g糟醅样,加入90 mL无菌水,常温放于摇床20 r/min振荡20 min,静置。吸取0.5 mL菌液加入装有4.5 mL无菌水试管中,漩涡混匀,即为 10^{-2} 梯度,

收稿日期:2013-05-13

基金项目:四川科技支撑计划项目(2012FZ0068);四川省应用基础项目(2012JY0137)

作者简介:沈才萍(1968-),女,四川泸县人,高级工程师,主要从事酿酒微生物方面的研究,(E-mail)573273728@qq.com

依次逐步稀释至适宜梯度。取 0.5 mL 菌液加入平板, 倒入冷却(不烫手背)培养基约 20 mL, 凝固后倒置培养, 观察计数。

1.4.1.2 培养基及条件

微生物培养基^[7]及条件见表 1^[8]。

表 1 微生物培养基及条件

微生物种类	培养基	培养条件
细菌	营养琼脂培养基:	35~37℃ 恒温培养 2~3 d
芽孢		菌液热处理 10min 后, 倾注。35~37℃ 恒温培养 2~3 d
霉菌	虎红琼脂培养基:	30℃ 恒温培养 3 天
酵母		30℃ 恒温培养 2~3 天

1.4.2 糟醅理化分析

实验中糟醅水分含量测定采用电热烘箱干燥法, 糟醅酸度测定采用滴定法, 糟醅酒精含量采用气相色谱法。

1.4.3 产酒分析

(1) 总酸总酯分析

实验对产酒总酸总酯检测采用中和滴定(指示剂)法^[9]。

(2) 香味成分分析

实验特征香味成分采用 GC-MS 分析测定。

2 结果与讨论

2.1 不同层糟醅微生物变化

同一口窖池中, 不同层糟醅所处位置不同, 导致微

生态环境存在差异。主要体现在下层糟醅接触窖底泥, 上层糟醅接触窖皮泥。孔隙度上层 > 中层 > 下层, 因而氧气含量上层 > 中层 > 下层。这些差异影响微生物生长代谢, 并随着发酵过程进一步改变不同层糟醅的理化性质, 从而改变微生态环境, 影响物质和能量交换过程, 最终导致不同层糟醅所产酒的酒质差异。

发酵过程中, 同一窖池不同层糟醅典型微生物消长变化见表 2。由表 2 可知, 霉菌数目变化主要在前 14 天, 随后基本消失。酵母在发酵过程中出现两个生长峰, 分别对应有氧环境下和厌氧环境下的群落构成。细菌和芽孢先增加后减少, 发酵中期有小幅回升, 最后维持在较低水平。整个发酵过程中, 酵母都是优势菌, 这与蒲岚等人的研究类似^[10]。其中, 上层糟醅微生物数目最多。不同层间, 酵母和霉菌数目上层 > 下层 > 中层, 霉菌和细菌优势存在更替。从入窖到第 9 天, 上层霉菌的数目都要高于细菌; 中层入窖到第 6 天, 霉菌数目高于细菌, 在第 6 天到 14 天, 细菌数目要高于霉菌; 下层前 3 天细菌数目高于霉菌, 6 天到第 9 天霉菌高于细菌。而在后期(14 天以后), 三层糟醅都是以酵母为优势菌, 次优为细菌。发酵结束后, 下层糟醅几乎不能检测出微生物, 上层和中层糟醅尚能检测出酵母和细菌(包括芽孢)。霉菌的差异使得物质积累情况不同, 主要是糖化酶和次级代谢产物差异。酵母的差异主要影响糟醅酒精含量, 而细菌的差异是造成酸类代谢产物差异的主要因素。这些差异的共同作用, 最终导致了不同层糟醅酒质的差异。

表 2 发酵过程中不同层糟醅微生物数目统计($\times 10^4$ 个/g 糟醅)

	霉菌			酵母			细菌			芽孢		
	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
入窖		34				34				7		0.9
3	2300	1000	700	60000	9000	36000	30	400	2400	20	20	20
6	9600	800	1800	55400	8500	1800	1500	800	400	200	700	40
9	57	60	200	850	3000	1800	20	1170	40	30	400	130
14	0	0	0	121	173	270	2	12	101	0	0	72
19	20	2	0	1350	590	620	7	14	80	3	9	80
24	0.2	0	0	1080	480	100	40	3	10	5	10	14
31	0	0.6	0	210	20	0	17	1.5	8	0.9	0.9	8
40	0	0	0	100	10	0	15	1	0	0.7	0.6	1
开窖	1.4	0.11	0	33	0.55	0	7	6	0	3	5	0

2.2 不同层糟醅理化分析

2.2.1 不同层糟醅水分含量分析

发酵过程中不同层糟醅水分变化如图 1 所示。水分含量呈逐渐增加的趋势。发酵前期, 水分含量迅速增加, 19 天至 31 天, 微生物主要进行厌氧呼吸, 因而水分含量增长幅度较少, 而下层基本维持稳定, 31 天以后, 水

分逐渐下沉, 因而上层水分下降, 而中层先小幅下降后增加, 下层水分增加。下层微生物含量较高, 但氧气含量最低, 因而前期水分含量高, 最先趋于稳定。在发酵中期, 上层糟醅微生物多, 前期物质积累多, 因而水分逐步增加, 最后高于中下层。后期水分逐渐下沉, 最终表现为下层 > 中层 > 上层。

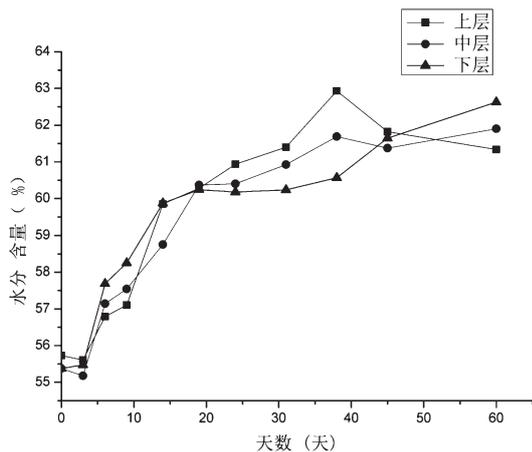


图1 发酵过程中不同层糟醅水分含量变化

2.2.2 不同层糟醅酸度分析

不同层糟醅酸度变化如图2所示。酸度呈现先增加,后略下降,中期以后迅速增加的规律。在发酵前期,细菌大量繁殖,因而酸度迅速增加。随后由于细菌数目下降,水分含量增加,起到一定的稀释作用,导致酸度略有下降,19天以后,随着细菌数目回升进一步产酸,水分和乙醇含量上升幅度较慢,因而稀释作用和酯化作用小,酸迅速积累导致酸度迅速增加,直至开窖。由于微生物构成(主要是细菌影响)不同,因此酸度变化情况不同。从第19天至31天可知,糟醅酸度增长幅度上层>下层>中层,这与厌氧环境下,细菌数目回升情况是一致的。

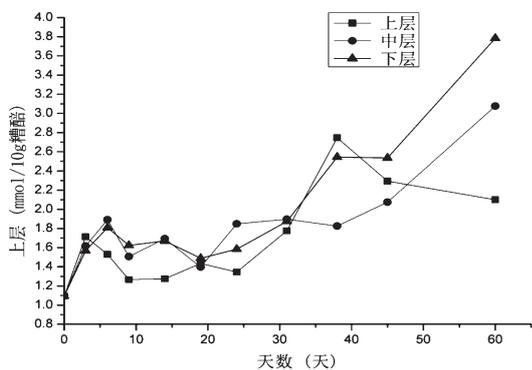


图2 发酵过程中不同层糟醅酸度含量变化

2.2.3 不同层糟醅酒精含量分析

发酵过程中不同层糟醅酒精含量变化如图3所示。有报道,主要是由霉菌和酵母产生酒精。前三天,窖内糟醅氧气含量高,微生物主要进行有氧呼吸,因而酒精含量低。发酵第3至14天,酒精含量持续迅速增加,这是由于氧气逐渐被消耗,微生物逐渐由厌氧发酵逐渐替代有氧呼吸。糟醅含氧量上层>中层>下层,因而下层

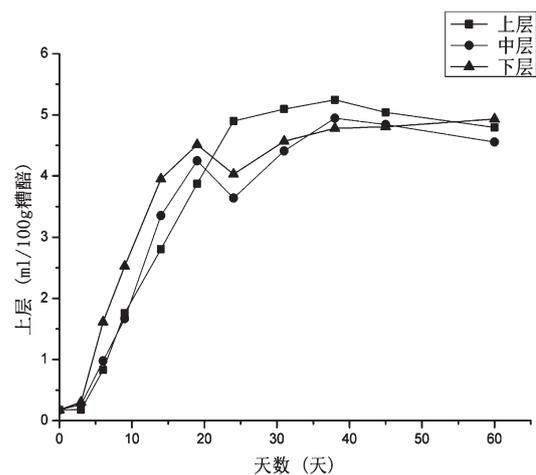


图3 发酵过程中不同层糟醅酒精含量变化

先进入厌氧状态,其次是中层,最后是上层,出现酒精含量下层>中层>上层的现象。随后,由于霉菌消失,可直接利用糖类降低,好氧酵母群落更替,中层和下层酒精含量有所下降,上层由于前期物质积累丰富,因而保持增长。随后,随着厌氧环境下酵母数目回升,各层糟醅乙醇含量出现增长,但由于可直接利用糖浓度低以及产物抑制作用,增幅较小,后期乙醇在细菌作用以及化学反应下酯化生香,含量有所降低。下层糟醅由于黄水作用而有所增加。

2.3 代谢产物分析

2.3.1 不同层糟醅产酒分析

分层蒸酒,并对酒质进行理化分析和感官评价,不同层糟醅蒸酒后分析结果见表3。

表3 不同层糟醅产酒分析

	总酸 (g/L)	总酯 (g/L)	产酒率 (%)	感官 评分	描述
上层	0.9950	3.65270	20.2	87	香甜,略杂
中层	0.573594	3.84469	18.7	90	香、甜、净
下层	2.329494	6.17104	21.8	93	甜净,酸大, 窖香突出

结合微生物生长状况可知,上层糟醅产酒率较高,但感官尝评分数低。分析原因主要是上层糟醅各类微生物数目多,发酵前期酵母和霉菌占优,利于糖化,淀粉糖化产物主要转化为酒精和产酸,总酸总酯含量高。但由于与窖皮泥接触,既有微生物迁移也有微量物质引入,并且上层糟醅霉菌代谢产物积累较多,因而口感较杂。中层糟醅产率低但口感较好,中层微生物数目较低,底物转化率较低,因此产率较低。但发酵前期霉菌占优,利于淀粉糖化,随后,细菌较霉菌占优,利于产酸及酯化,因而质量较好。下层糟醅前期细菌数目较

多,边发酵边酯化反应,后期由于黄水作用,使得下层糟醅香味成分进一步增加,由于靠近窖底泥,在窖底泥微生物作用下产生窖香。并且下层最早进入厌氧发酵,发酵时间相对较长,可能是下层产率高且质量好的原因。

2.3.2 不同层糟醅产酒风味成分分析

浓香型白酒中,主要香味物质含量高低以及相互比例决定了浓香型白酒的质量和风格。四大酸和四大酯是浓香型白酒的主体风味成分,醇类则是白酒中醇甜和助香剂的主要物质。

不同层糟醅醇酯和有机酸成分分析见表4。下层糟醅风味成分含量都较高,因而口感最为丰富。上层糟醅醇类和酸类较中层含量高,四大酯含量则与中层糟醅中含量相差不大,这说明上层糟醅微生物生长复杂,代谢产物较多,但口感比较杂的原因可能是由于窖皮泥中微量物质引入。另外,窖泥中主要微生物为细菌和芽孢,迁移进入糟醅,细菌主要产酸,因而上层和下层酸类含量高,酸含量高则推动酯化反应,四大酯含量高。但由于窖皮泥和窖底泥微生物种群差异,导致口感不同。

表4 不同层糟醅产酒风味成分分析

组份	上层	中层	下层
正丙醇	0.165365	0.087733	0.122962
异丁醇	0.115072	0.097705	0.10157
正丁醇	0.165844	0.02879	0.273559
正戊醇	0.022569	0.021570	0.053693
正己醇	0.028792	0.015426	0.264343
乙酸乙酯	1.398748	1.365914	1.108587
丁酸乙酯	0.570509	0.14576	0.388047
己酸乙酯	0.736432	0.771569	2.513401
乳酸乙酯	2.316972	2.288545	3.943231
乙酸	0.485582	0.269565	0.53487
正丁酸	0.241034	0.059804	0.598765
己酸	0.121521	0.148161	1.55381

3 讨论

在同一口窖中,上中下层糟醅典型微生物生长状况存在显著差异。主要表现在两个方面:同种微生物最大峰出现时间以及数目,发酵过程中不同种微生物之间优势的差别。这些差别导致底物转化效率、代谢产物积累情况不同,同时不同层糟醅微生物消长差异造成糟醅理化性质差异,导致微生态环境进一步改变,最终影响微生物代谢而影响酒的产量及质量。

依照微生物的消长变化,可以将发酵过程分为3个时期,好氧生长阶段、厌氧发酵阶段和后期维持阶段。入窖至第9天为好氧阶段,这个阶段主要是好氧微生物大量繁殖,底物转化及物质积累阶段,这个阶段中微生物构成差异导致积累物质的差异,从而影响后续阶段。厌氧阶段霉菌已经消失,主要是酵母进一步发酵生成乙醇,厌氧细菌利用前体物质进行产酸并酯化作用的阶段。后期维持阶段是酵母和细菌进一步代谢产生风味物质,窖内的醇和酯进行化学作用的阶段,进一步提升风味成分含量。糟醅的酒精含量可以验证这个过程的发生。正是由于微生物构成的不同,物质积累的差异,第19天上层糟醅酒精含量没有降低而持续上升,而中下层下降。

浓香型白酒酿造过程中乙醇和风味成分是微生物的代谢产物,因而微生物的生长状况对发酵产物有直接影响。微生物的消长状况能够体现发酵状况,不同层微生物生长规律为:上层和下层微生物数目较中层多,好氧微生物更替为厌氧微生物的时间为下层<中层<上层,这与氧气含量相关。不同层糟醅产酒规律为:上层产酒率高但质量较差,中层产酒率低质量较好,下层产酒率高且质量好。

参考文献:

- [1] 张宿义,许德富.泸型酒技艺大全[M].北京:中国轻工业出版社,2011.
- [2] 蒲岚,李璐,谢善慈,等.浓香型白酒窖池中糟醅微生物的变化趋势研究[J].酿酒科技,2011(1):17-19.
- [3] 敞颜,赵辉,凌宏志.传统白酒发酵微生物研究进展[J].食品工业科技,2010(9):425-431.
- [4] 吕辉,张宿义,冯治平,等.浓香型白酒发酵过程中微生物消长与香味物质变化研究[J].食品与发酵科技,2010(3):37-59.
- [5] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [6] 吕辉,张宿义,冯治平,等.浓香型白酒发酵过程中微生物消长与香味物质变化研究[J].食品与发酵科技,2010(3):37-59.
- [7] 冉艳红,黄雪松,于淑娟.自然发酵泡菜汁中主要成分的变化[J].中国调味品,2002(8):17-21.
- [8] 游剑,陈茂彬,方尚玲,等.浓香型白酒窖池微生物分离培养基的选择研究[J].酿酒,2009(1):62-64.

- [9] 沈怡方.酿酒技艺大全[M].北京:中国轻工业出版社,2007.
- [10] 易彬,任道群,唐玉明.不同窖龄窖泥微生物生态变化研究[J].酿酒科技,2011(6):32-34.

Relationship Between Liquor Flavor and Fermented Grain Microbes in Different Depths in the Same Pit in Luzhou Laojiao

*SHEN Cai-ping*¹, *LI Zhe*², *AO Zong-hua*^{1,2,3}, *DENG Bo*^{1,3}, *SHEN Xiao-juan*^{1,3}, *WANG Song-tao*^{1,3,4}

(1. Luzhou Laojiao Co. Ltd, Luzhou 646000, China; 2. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000; 3. National Solid Brewing Engineering Technology Research Center, Luzhou 646000, China; 4. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

Abstract: In the brewing process of Luzhou-flavor liquor, the relation between microbial succession and liqueur aromas is studied by considering liquor quality, coupled with tracking measurement of the growth of typical microbes (yeast, bacteria, spore and mould) in fermented grains in different depths in the same pit. Results show that diversities are occurred in the growth of microorganisms in different depths in the same pit. The differences include the distinction of level and occurrence time of maximum peak of the same microbe, and the difference of the construction of typical microorganisms in the same period. These differences are important reasons of diversity in yield and flavor of liquor which is brewed through fermented grains of different layers.

Key words: fermented grains of different layers; typical fermented grain microbes; plate count method; flavor substances