

# 稻花香窖泥微生物群落变化研究

汪江波<sup>1</sup>, 万 朕<sup>1</sup>, 李 莉<sup>2</sup>, 李祥太<sup>2</sup>, 陈茂彬<sup>1</sup>

(1.湖北工业大学生物工程学院,发酵工程省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430068;

2.湖北稻花香酒业股份有限公司,湖北 宜昌 443112)

**摘要:** 针对窖池开窖后窖泥微生态的变化,通过窖泥中微生物群落数量和理化指标来分析微生态的变化情况。

结果表明,开窖后窖池底部微生物群落数量和理化指标的变化较大,而窖池中部变化则相对较小。

**关键词:** 窖泥; 微生态; 微生物群落; 理化指标; 稻花香

中图分类号:TS262.3;TS261.4;Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2010)11-0036-04

## Study on the Change of Microflora in Pit Mud of Daohuaxiang

WANG Jiang-bo<sup>1</sup>, WAN Zhen<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>, LI Xiang-tai<sup>2</sup> and CHEN Mao-bin<sup>1</sup>

(1.Institute of Bioengineering, Hubei University of Technology, Key Lab of Fermentation Engineering (Ministry of Education),

Wuhan, Hubei 430068; 2.Hubei Daohuaxiang Liquor Industry Co.Ltd., Yichang, Hubei 443112, China)

**Abstract:** The change of microflora in pit mud of Daohuaxiang liquor after starting operation of the pits was analyzed by microflora quantity and physiochemical indexes. The results suggested that there was great change in microflora quantity and physiochemical indexes in pit mud at the bottom of the pits, however, such change was relatively weak in pit mud in the middle part of the pits.

**Key words:** pit mud; microecology; microflora; physiochemical indexes; Daohuaxiang liquor

窖泥与浓香型白酒质量的好坏有着密切联系,因此维护好窖池是保持优质浓香型白酒出酒率稳定的重要保证。窖泥是由多种微生物及其他物质组成的一个有机整体,一般主要通过微生物分布情况和理化指标两个方面来了解窖泥情况,以此来衡量窖泥的健康状况<sup>[1]</sup>。发酵期结束后打开的窖池会有一段空窖期,而此时是维护窖池的关键时期,这段时期窖泥由于暴露在空气中,随着时间的推移其微生态会有一些的变化,而通过对开窖后不同时间的窖池质量指标的对比分析,有助于了解开窖后窖泥微生态的变化情况,为窖池的养护提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 窖泥样品

在稻花香酒厂窖龄和优质酒出酒率相同的酿造二车间和酿造三车间各抽取有代表性窖池,取窖池中部及底层的窖壁泥。酿造三车间选取30号窖池,属于开窖窖池,其黄水被舀干,底糟基本上取出;酿造二车间选取177号窖池同样也属于开窖窖池,但底部还有黄水坑,且底糟还未完全取出。所选的2个窖池的窖龄均为10年左右。

取回的新鲜泥样应立即进行微生物的分离培养,以

及水分和氨态氮的测定,并对泥样进行风干处理,将风干后的泥样过40目筛后待用<sup>[2]</sup>。

#### 1.1.2 计数用培养基

细菌计数用培养基:牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[3]</sup>;  
丝状真菌计数用培养基:PDA培养基<sup>[3]</sup>;  
酵母计数用培养基:YPED培养基<sup>[3]</sup>;  
放线菌计数用培养基:高氏一号培养基<sup>[3]</sup>;  
兼性芽孢菌计数用培养基:巴氏合成培养基<sup>[4]</sup>。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 微生物分离计数<sup>[3]</sup>

泥样微生物分析采用稀释平板计数法。称取10.0g新鲜窖泥于90mL有玻璃珠的无菌水中,置于30℃的摇床中振荡30~40min。再从中吸取1mL菌液到盛有9mL无菌水的试管中,一直稀释至 $10^{-5}$ 梯度,各微生物分离采用的稀释度见表1,每个稀释度做2个平行样。

表1 微生物分离计数采用的稀释度

分离微生物	细菌	放线菌	酵母	丝状真菌
稀释度	$10^{-3} \sim 10^{-5}$	$10^{-1} \sim 10^{-2}$	$10^{-1} \sim 10^{-3}$	$10^{-1} \sim 10^{-5}$

从适度的稀释液中吸取0.2mL菌液到已倒好的平板上,然后涂匀。将涂布好的培养皿倒置放于培养箱中。

收稿日期:2010-08-19

作者简介:汪江波(1962-),男,湖北武汉人,副教授,研究方向:发酵过程优化与放大。

通讯作者:陈茂彬(1965-),男,湖北麻城人,博士,教授,主要从事工业微生物、酿酒生物技术研究,E-mail:hgchenmaobin@163.com。

细菌在 35 °C 下培养 1~2 d, 酵母和霉菌在 28 °C 下培养 2~3 d, 而放线菌和霉菌在 28 °C 下需培养 3~4 d。

同时对细菌做兼气厌氧培养, 在真空干燥箱中抽真空至 0.04 MPa, 在 35 °C 条件下培养 3~4 d。稀释度为  $10^{-2} \sim 10^{-4}$ 。

根据芽孢菌的耐热性, 称取 10 g 泥样放于 90 mL 的无菌生理盐水中, 然后在 80 °C 的水浴中加热 3 min, 再振荡 30 min, 将菌液涂布于凝固好的巴氏合成培养基上, 置于真空干燥箱中抽真空, 在 35 °C 的条件下培养 3~4 d。稀释度为  $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 。

### 1.2.2 理化性质测定方法

水分: 烘干法<sup>[2]</sup>; pH: 电位法<sup>[2]</sup>; 氨态氮: 纳氏试剂比色法<sup>[2]</sup>; 有效磷: 氯化亚锡还原钼蓝比色法<sup>[2]</sup>; 速效钾: 四苯硼钠比色法<sup>[5]</sup>; 腐殖质: 焦磷酸钠-水合重铬酸钾氧化法<sup>[5]</sup>。

### 1.2.3 优势菌株的初步鉴定

细菌按《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[6]</sup>进行种属归类。酵母菌按《酵母菌的特征与鉴定手册》<sup>[7]</sup>进行种属归类。霉菌根据个体和群体学特征, 结合《真菌鉴定手册》<sup>[8]</sup>进行种属归类。放线菌根据个体和群体学特征, 按《放线菌的分类和鉴定》<sup>[9]</sup>进行种属归类。

## 2 结果与分析

### 2.1 窖池微生物的分布情况

通过对分离得到的菌落进行计数, 可以大致了解样品中的微生物的数量分布情况, 其统计分析结果见表 2。

表 2 窖泥样品微生物分布情况 (cfu/g 窖泥)

样品	好氧细菌	放线菌	兼性厌氧细菌	兼性芽孢菌	霉菌
1	$3.6 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	$1.2 \times 10^5$	$1.2 \times 10^3$	$0.5 \times 10^2$
2	$8.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^2$	$8.0 \times 10^4$	$3.1 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
3	$4.2 \times 10^4$	$2.3 \times 10^2$	$3.1 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	$0.5 \times 10^2$
4	$8.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^2$	$4.9 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$0.5 \times 10^2$

注: 1 号样品为酿三车间 30 号窖池中部壁上的窖泥; 2 号样品为酿三车间 30 号窖池底部壁上的窖泥; 3 号样品为酿二车间 177 号窖池中部壁上的窖泥; 4 号样品为酿二车间 177 号窖池底部壁上的窖泥。

#### 2.1.1 好氧细菌的分布情况

窖池中好氧细菌分布是中上部的数量较底部壁上多, 30 号窖池的分布情况正是如此, 而 177 号窖池的情况则相反, 底部微生物的数量较多。177 号窖池中的分布情况, 可能受底部黄水的影响较大, 黄水中溶有大量的微生物和营养物质, 该窖池底部壁上窖泥仍有部分浸于黄水中, 因此微生物含量较丰富。30 号窖池由于底部黄水已经舀干, 且已空窖一段时间, 窖池底部没有黄水的影响, 因此中部壁上的好氧细菌要比底部的多。

#### 2.1.2 放线菌的分布情况

放线菌是窖泥中比较重要的一类微生物, 有除臭的作用, 对于己酸菌产酸有一定的促进作用<sup>[10]</sup>。根据计数情况可以看出, 2 个窖池中放线菌的数量接近, 且在同一个窖池里也分布均匀。可以看出黄水对放线菌没太大的影响, 其数量能够保持在一个稳定的状态。

#### 2.1.3 兼性厌氧细菌和兼性芽孢菌的分布情况

这两类微生物的分布仍在一定程度上受黄水的影响, 177 号窖池底部壁上窖泥中兼性微生物的分布依然较丰富, 其窖池中部壁上窖泥的数量则相对要少得多。30 号窖池底部壁上窖泥兼性微生物的数量相对于 177 号窖池要少, 中部壁上窖泥兼性厌氧细菌的数量要比前者多。在 30 号窖池里, 中部壁上窖泥兼性厌氧细菌的数量较底部壁上的多, 这在一定程度上反映出兼性厌氧细菌有一部分是偏好氧。由于芽孢菌的耐受性较强, 因此其在 30 号窖池中的分布较均匀, 30 号窖池中部壁上的数量分布与 177 号窖池也相差不大, 均在同一个数量级上。177 号窖池底部由于还有黄水, 较多的含水量对氧气有一定的隔绝作用, 所以 177 号窖池底部厌氧菌的数量较 30 号要多。

#### 2.1.4 酵母与霉菌

对于开窖的窖池, 其中酵母和霉菌的数量都相当少, 尤其是酵母菌在开窖的窖池中难以检出, 而对于霉菌其分离到得菌落也是很少, 基本上一个培养基在  $10^{-1}$  稀释度的菌液中只能分离得到 1~2 个菌落, 数量级在  $10 \sim 100$  之间, 且分离得到的种类单一, 多为米曲霉。

### 2.2 不同种类细菌分布情况

对窖泥中的几种类型优势菌进行数量统计分析, 大致了解其在窖池中的分布情况, 基本情况见表 3。

表 3 窖泥样品中不同细菌分布情况 (cfu/g 窖泥)

项目	细菌分类			
	1	2	3	4
好氧芽孢杆菌	$2.7 \times 10^4$	$4.0 \times 10^3$	$3.4 \times 10^4$	$4.5 \times 10^5$
兼性厌氧芽孢杆菌	$12.0 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	$13.0 \times 10^4$
兼性梭状芽孢杆菌	$0.7 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$0.8 \times 10^3$	$5.0 \times 10^4$
链球菌	$8.5 \times 10^3$	—	$4.8 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$
短杆菌	$1.5 \times 10^2$	$2.5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$5.8 \times 10^4$

注: 1 号样品为酿三车间 30 号窖池中部壁上的窖泥; 2 号样品为酿三车间 30 号窖池底部壁上的窖泥; 3 号样品为酿二车间 177 号窖池中部壁上的窖泥; 4 号样品为酿二车间 177 号窖池底部壁上的窖泥。

芽孢菌的数量在窖池中占有较大的比例, 而且芽孢菌有较好的耐受性, 因此不论是窖池的中上部, 还是底部的壁泥中都能分离出较多的芽孢菌, 根据不同培养条件下分离出来的芽孢菌进行计数统计, 可以初步了解芽孢菌的分布情况; 另外, 分离得到的数量种类较多的两类好

氧微生物为链球菌和短杆菌。对不同种类的细菌进行计数统计,有助于初步了解细菌在窖池中的分布情况。

### 2.2.1 芽孢杆菌的分布情况

不论是好氧还是兼性厌氧芽孢杆菌,在30号窖池中芽孢杆菌在窖池中部壁上的分布数量相比于底部窖壁上要多,而177号窖池底部窖壁上的数量相对中部壁泥要多。这种分布情况反映出窖泥中较多芽孢杆菌偏向好氧,在没有黄水的窖池里,中部壁上的数量较底部壁上的多,而黄水中溶有的大量微生物使177号底部窖壁泥样中微生物含量要多。

### 2.2.2 兼性梭状芽孢杆菌

梭状芽孢杆菌的分布情况在2个窖池中的分布情况一致,均为窖池底部壁泥的分布数量要多于窖池中部壁泥,其中177号窖池的底壁泥的分布数量仍远高于其他泥样。从数据上来看梭状芽孢杆菌多偏向厌氧,2个窖池中部壁泥的数量相差不大,而底部壁泥则有较大的差距。这一情况一方面是因为黄水中丰富的微生物含量和较好的对氧气隔绝,另一方面开窖时间较长也对这类偏向厌氧的芽孢菌有一定影响。

### 2.2.3 链球菌和短杆菌

链球菌在2个窖池中均为窖壁泥要高于窖底泥,而30号窖池底壁泥没有检出;短杆菌在30号窖池里分布均匀,177号窖池中壁泥分布数量与30号相差不大,而底壁泥中数量却相对较多。

## 2.3 理化性质

通过对两个酿造车间的窖泥进行理化分析,并进行对比,分析结果见表4。

表4 酿造车间窖泥理化指标

项目	泥样			
	1	2	3	4
新鲜土壤水分(%)	36.4	32.5	37.1	39.8
pH	4.81	3.91	4.17	3.47
氨态氮(mg/100g干泥)	263.9	361.9	231.2	311.3
有效磷(mg/100g干泥)	288.8	203.6	290.1	502.5
速效钾(mg/100g干泥)	90.3	68.7	75.9	35.1
腐殖质(%)	10.8	11.8	10.3	9.4

注:1号样品为酿三车间30号窖池中部壁上的窖泥;2号样品为酿三车间30号窖池底部壁上的窖泥;3号样品为酿二车间177号窖池中部壁上的窖泥;4号样品为酿二车间177号窖池底部壁上的窖泥。

### 2.3.1 水分

177号窖池的含水量整体要高于30号窖池,且窖池底部壁上的水分相比于30号窖池要高,对于中部壁上的水分含量,2个窖池差不多。根据数据可以看出,30号窖池在取出底糟后,在空窖期间水分的散失较大,所以相对于仍有黄水的177号窖池,其底部壁上的含水量要低。在

开窖后,定期会用酒尾泼洒窖池的窖壁,用于阻止有害霉菌在窖池上部的生长,这对于保持窖池中部壁上窖泥的水分的保持起到了一定作用,因此2个窖池的中部壁上的含水量相近。

### 2.3.2 pH值

177号窖池的pH值较30号要低,同一窖池中部壁上窖泥的pH值则要比底部壁上的窖泥要高。在窖池中,黄水一般都沉积在底部,而黄水本身的酸度较大,根据数据可以看出,黄水对窖池底部的酸度有一定影响,在有黄水的177号窖池,其窖池底部的pH值要低于30号窖池,且同一窖池的底部pH值也较中部低。30号窖池的pH值较177号窖池要高,除了微生物的作用外,适当的酒尾泼洒窖池也可以对pH值进行缓冲,尤其是30号窖壁上的窖泥pH值高,因此窖池经过适当的养窖操作后,其pH值会逐渐回升至稳定状态。

### 2.3.3 氨态氮

氨态氮作为微生物能最优先利用的氮源,对于微生物的初级生长力有着至关重要的作用。根据数据来看,在同一个窖池,窖底壁上窖泥氨态氮含量要高于中部壁上窖泥,而177号窖池的氨态氮含量相对偏低。一般是因为底部窖泥长期接触黄水,并且有“双轮底”的影响,底部的有机物质较上部窖泥的多,从而使得底部壁上窖泥氨态氮的含量要高。2个窖池中氨态氮的含量都比较丰富,177号窖池相对偏低,有可能是其微生物的数量较多,氨态氮的消耗较大,且开窖时间不长被消耗的氨态氮还没有得到即时的补充,但随着有机质慢慢分解,氨态氮的含量会得到适当补充,含量也会缓慢上升。

### 2.3.4 有效磷

根据数据分析可以看出,177号窖池,尤其是窖底泥中有效磷的含量相当丰富,而30号窖池则略少。2个窖池中部窖壁窖泥有效磷的含量接近,而底部差距较大,推测是由于黄水中溶解有一定的磷盐,177号窖池底部窖泥吸附了一定的黄水,所以其检测结果相对其他样品要高得多。另外,根据数据可以看出30号窖池中、底部壁上窖泥有效磷含量相对中部壁上窖泥偏低。

### 2.3.5 速效钾

速效钾是指水溶性的可交换钾,它是微生物生长、繁殖所必需的一类速效元素。由表4可以看出,2个窖池中部壁上窖泥的含量较底部壁上窖泥要低,且177号窖池的含量相对于30号窖池偏低。177号窖池窖底壁上窖泥钾含量较低,可能是由于目前177号窖池底部窖泥的微生物数量相对于30号要多,因此钾的消耗要多于30号,且177号窖池开窖时间短,其速效钾的含量没有得到补充,但随着黄水被舀干,底部微生物的数量也会下降,一

部分非交换性钾的缓慢释放和“双轮底”的补充,速效钾的含量则会上升。

### 2.3.6 腐殖质

对于腐殖质,在 30 号窖池中底部壁上窖泥的腐殖质含量要高于中部壁上的窖泥,但在 177 号窖池中情况则相反,且含量相对于 30 号窖池偏低。根据数据可以看出,刚开窖不久且还有黄水坑的 177 号窖池,底部壁上窖泥的腐殖质含量相对其他泥样要低,这有可能是因为腐殖质是微生物生长、繁殖所需的 C、N、P 等营养物质的重要来源,在发酵过程中被消耗。随着黄水被舀干,黄水中微生物和溶解的有机质会部分残留在底部窖泥中,微生物的死亡可以转换为有机质,因此黄水舀干后,随着时间的推移,其中腐殖质的含量会缓慢上升,另外在开窖后的“双轮底”也可以为窖底泥补充腐殖质等营养物质。

## 3 结论

2 个相同窖龄的窖池,虽然均为开窖窖池,但处于开窖后不同的时间,其微生物的数量和分布情况也略有不同,通过对比分析可以大致了解开窖后,随着时间的推移,窖池底部细菌分布有较大的减少,而中部壁上的细菌变化则相对较小,仅芽孢杆菌的数量有一定的增加。

开窖时间的长短对窖泥的理化性质的影响也较大。开窖后一段时间里,窖池底部的水分和有效磷的含量减少,而 pH 值、速效钾、腐殖质等理化指标则逐步回升;

窖池中部壁上窖泥理化性质变化相对较小,其 pH 值、氨态氮、速效钾的变化稍大,且开窖后呈上升趋势。

通过对窖泥的变化情况的分析,可以为养窖操作提供一定的参考依据,使窖池经过发酵之后在开窖的空隙可以得到较好的养护,使窖池的微生物处于一个较好的水平,保证窖泥中微生物可以得到较好的生长繁殖。只有科学合理的养窖操作才能使窖池处于最佳状态,这样才能使稻花香“窖香浓郁”的浓香型特征得到更好的呈现。

### 参考文献:

- [1] 胡承,应鸿,许德福,等.窖泥微生物群落的研究及其应用[J].酿酒科技,2005,(3):34-38.
- [2] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2007.
- [3] 沈萍.微生物实验(4版)[M].北京:高等教育出版社,2008.
- [4] 吴衍庸,等.五粮液老窖厌氧菌群的分布及其作用的研究[J].微生物学报,1992,31(4):299-307.
- [5] 刘光崧.土壤理化分析与剖面描述[M].北京:中国标准出版社,1997.
- [6] R.E.布坎南,N.E.吉本斯.伯杰细菌鉴定手册[M].山东:科学出版社,1984.
- [7] J.A.罗尼特,R.W.佩恩.酵母菌的特征与鉴定手册[M].山东:青岛大学出版社,1991.
- [8] 中国科学院微生物研究所.常见与常用真菌[M].北京:科学出版社,1973.
- [9] 阎述初.放线菌的分类与鉴定[M].北京:科学出版社,1992.
- [10] 周恒刚.老窖泥讲座(三)[J].酿酒,1988,(5):59-63.

# “十一五”国家科技支撑计划“优势传统白酒、黄酒类制造业关键技术与应用”项目通过专家验收

本刊讯 2010 年 10 月 16 日,中国轻工业联合会组织专家委员会在浙江绍兴、上海金枫和四川宜宾对江南大学、中国食品发酵工业研究院、中国绍兴黄酒集团有限公司、上海金枫酒业股份有限公司和宜宾五粮液股份有限公司共同完成的“十一五”国家科技支撑计划“我国优势传统食品关键技术与应用”项目的“优势传统白酒、黄酒类制造业关键技术与应用”(2007BAK36B02)课题中黄酒、白酒生产示范线进行现场考核,并同时由江南大学酿酒科学与酶技术中心、中国绍兴黄酒集团有限公司、上海金枫酒业股份有限公司共同研发的“黄酒液化法新工艺的开发”及“中国黄酒和麦曲挥发性香气物质剖析平台技术建立与研究”项目进行鉴定。

黄酒液化法新工艺省去了浸米与蒸饭工序,实现浸米废水零排放,比传统工艺节能 30% 以上,节能减排效果显著,为黄酒生产增添了低碳生产的新工艺,符合国家产业政策,对我国黄酒产业的改造和技术进步具有重要的意义,其推广应用前景广大。鉴定委员会专家一致认为该研究成果达到了“国际先进水平”。

应用气相色谱-闻香技术(GC-O)结合气质联用技术(GC-MS),系统分析检测出我国代表性黄酒中的风味化合物 70 种,其中重要的有 5 种,麦曲中的香气化合物 49 种,其中重要的有 7 种。加曲发酵黄酒含有更多芳香族化合物和酚类化合物,愈创木酚和乙酰基苯对不同加曲量酿造的原酒香气贡献有非常明显的区别。鉴定委员会专家一致认为该成果达到了“国际同类研究的领先水平”。

专家委员会先后在中国绍兴黄酒集团有限公司、上海石库门酿酒有限公司和宜宾五粮液股份有限公司现场考核了中国绍兴黄酒集团有限公司年产 2 万 kL 黄酒生产示范线、上海石库门酿酒有限公司年产 4 万 kL 黄酒生产示范线和宜宾五粮液股份有限公司白酒生产示范线,并现场品评了 3 个公司开发的新产品。专家委员会一致同意通过了这 3 个企业生产示范线与新产品的成果考核。

鉴定和产业现场验收标志着,在“十一五”期间,这些项目的开展完成对我国传统优势白酒、黄酒的关键共性问题的解决起了重要作用,其研究成果的推广应用将进一步推动我国传统产业的升级和持续发展。(范文来,刘俊)