

浓香型白酒窖池主要功能性微生物的研究进展

侯小歌¹, 王俊英¹, 李学思², 胡炳义¹, 李绍亮², 高应运¹

(1.周口师范学院生命科学系,河南 周口 466001;2.河南省宋河酒业股份有限公司,河南 鹿邑 477265)

摘要: 窖池微生物对中国白酒风味物质的形成起重要作用。综述了浓香型白酒发酵窖池中主要产香功能性微生物的组成、鉴定方法、功能特性、相互关系及其在浓香型白酒生产过程中的应用等方面的研究进展,旨在为浓香型白酒重要微生物的研究提供思路,为其发酵过程的控制提供理论依据。

关键词: 浓香型白酒; 窖池; 产香菌; 研究进展

中图分类号: TS262.31; TS261.1; Q93-33; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2013)02-0096-06

Research Progress in Main Functional Microbes in Nong-flavor Liquor Pits

HOU Xiaoge¹, WANG Junying¹, LI Xuesi², HU Bingyi¹, LI Shaoliang² and GAO Yingyun¹

(1. Department of Life Science, Zhoukou Normal College, Zhoukou, Henan 466001;

2. Henan Songhe Distillery Co. Ltd., Luyi, Henan 477265, China)

Abstract: Microbes in pits play important roles in the formation of liquor flavoring substances. In this paper, the compositions, the identification, the functional properties, the correlations, and the roles of main functional microbes in Nong-flavor liquor pits were reviewed in order to provide new approaches to the research on important Nong-flavor liquor microbes and to provide theoretical evidences for the control of the fermentation of Nong-flavor liquor.

Key words: Nong-flavor liquor; pits; aroma-producing bacteria; research progress

浓香型白酒在中国所有香型白酒的生产及销售比例中占首位,且主要分布在四川和苏鲁豫皖地区,其产量和品质明显影响着中国白酒行业的发展^[1]。浓香型白酒是以中高温大曲作为主要糖化发酵剂,采用混蒸续糟、泥窖固态发酵、固态蒸馏的酿造工艺,此独特的酿造工艺赋予其独特的酒体风味特征。随着色谱和质谱技术在白酒风味物检测中的应用和发展,研究表明^[2],浓香型白酒香气成分中,酯类占绝对含量,己酸乙酯为主体香,它和乳酸乙酯、乙酸乙酯、丁酸乙酯被称为四大酯类,相对应香气前体物己酸、丁酸、乳酸、乙酸具有明显的定味作用,且四大酯类含量高低和比例关系决定了浓香型白酒的质量和风格。由此可见,要提高浓香型白酒的风格品质尤其是优质酒率,四大酯类及其前体物的形成与控制是首要需解决的问题。

浓香型白酒香气的形成变化主要来源于发酵、蒸馏和陈酿过程,尤其是发酵过程中原料在窖池和酒曲微生物及酶作用下的分解产物、微生物的代谢产物、代谢物之间的相互转化^[2-4]。且现已公认:主体香己酸乙酯主要来

源于泥窖微生物中的己酸菌^[3],其他酯类及其前体物则是伴随发酵过程中酒曲、窖泥中庞大微生物区系以糟醅为载体,在固液气三相发生复杂的物质能量代谢、微生物的有序消长和物质形态变化中而形成^[1,5]。故酿造微生物尤其是产香菌的种群结构及其代谢活动是制约浓香型白酒酿造技术的关键,而酿造微生物又复杂多样,因此微生物在白酒发酵过程中的种群结构、相互作用及其与产物之间的关系一直是白酒研究中重要的理论核心问题,同时也是相关领域中的研究热点,弄清有益微生物对中国浓香型白酒酿造技术改进及白酒产业的发展具有积极的推动作用。

所谓“产香功能菌”并没有严格的界定,本文中的产香功能菌主要包括两大部分,即香气及其前体物产生菌和酯化酶产生菌,因为有关专家把酯化酵母归为生香酵母^[6,7]。本文就以浓香型白酒发酵窖池中的主要产香功能菌的组成、鉴定方法、功能特性、相互关系及其生产应用五个方面的研究进展加以综述,以期对白酒微生物研究及其发酵过程控制提供理论依据。

基金项目 河南省教育厅自然科学研究项目(项目编号 2011B180058);周口师范学院科研成果孵化专项基金资助项目(项目编号 2011-zknufh-01)。

收稿日期:2012-10-08

作者简介:侯小歌(1977-),女,讲师,主要从事微生物发酵工程方向的研究与教学工作。

通讯作者:胡炳义(1962-),男,教授,研究方向为生物技术。E-mail:bingyih@126.com。

优先数字出版时间 2013-01-16;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130116.1534.003.html>。

1 香气及其前体物产生菌的组成

浓香型白酒产香功能菌的研究,是从酵母生香认识到细菌生香。对于细菌产香最早的研究者是我国白酒酿造专家沈怡方,他采用传统的分离手段对窖泥中的己酸菌进行了分离、培养及应用实验,该研究给酿造微生物学填补了一项空白^[8]。此后,又有研究者发现参与产香细菌类主要包括厌氧异养菌、甲烷菌、己酸菌、乳酸菌、硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌等,并认为这些微生物在特殊的环境中进行生长繁殖及代谢,各种代谢物在酶的作用下发生酯化反应而产生白酒的香气物质^[9]。由此可知,香气及其前体物产生菌主要表现为细菌类群。随着微生物学的发展和运用,我国对浓香型白酒产香功能菌的认识越发细致。张肖克^[10]等人研究了以上几类细菌在糟醅中的分布情况,认为窖池糟醅取样部位不同其分布存在差异;张丽莺研究了泸州老窖糟醅中细菌区系,鉴定到的细菌种类有肠杆菌、醋酸杆菌、乳杆菌、芽孢杆菌、芽孢乳杆菌5个属,并发现以芽孢杆菌和芽孢乳杆菌为主要类群^[11];熊昌绪探索了新疆“八一”特曲糟醅中的微生物变化,认为细菌在发酵过程中数量变化较小,但种类较多,多为G-杆菌^[12];罗志腾发现在西安大曲糟醅中存在15种细菌,优势菌主要为芽孢菌、节杆菌和醋酸杆菌^[13];施安辉研究了山东兰菱美大曲和崑崙酒厂发酵糟醅中的细菌类群,鉴定出9个属,分别为短杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属、乳酸杆菌属、丁酸杆菌属、芽孢杆菌属、芽孢梭菌属、微球菌属、甲烷杆菌属等,优势菌为芽孢菌属^[14]。由以上研究可知,浓香型白酒窖池中的产香细菌均以芽孢菌为主。但也有研究表明,对浓香型白酒香气贡献最大的是梭状芽孢杆菌,其主要代谢产物是己酸、丁酸和氢,并指出己酸菌和甲烷菌共生时能促进己酸生成,该研究对人工窖泥的改造培养、复合功能菌的营养提供了重要理论指导^[2,15]。

乳酸菌也是浓香型白酒产香菌中的重要一种,多数为兼性厌氧菌。王葳^[16]等人从黑龙江省某浓香型酒厂老窖中分离出3株乳酸菌,分别将其鉴定为玉米乳杆菌、戊糖乳杆菌、乳酸片球菌;姚惟琦^[17]等人从浓香型糟醅中分离得到21株产乳酸菌株,其中16株为芽孢杆菌,采用梅里埃微生物鉴定仪分别将其鉴定为干燥棒杆菌、耳葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、腊状芽孢杆菌、浸麻芽孢杆菌6个种;Limeng Liu^[18]等人从窖池壁样中分离得到乳酸菌新种,采用分子学手段将其鉴定为乳酸片球菌,并提出该菌的代谢物可能与白酒香气物密切相关。

也有研究发现放线菌在糟醅及窖泥中有少量存在,放线菌可有效解除窖泥产生不愉快的泥臭味,张丽莺在泸州老窖糟醅中检测到的放线菌为链霉菌属^[11],但目前

对于酿酒放线菌的研究报道并不多见。

总之,新的产香功能菌会随着研究的深入而不断出现。从上述研究可知,我国南方、北方及西部产地环境不同,故糟醅中的产香细菌的种类组成也存在一定差异。

2 酯化酶产生菌的组成

酯类物质是酸与醇在产香功能菌代谢酯化酶的作用下而产生。浓香型白酒发酵糟醅及窖泥中,产酯功能菌区系主要有己酸菌、乳酸菌、酵母菌和霉菌等^[15]。对酯化酶生香功能菌认识最早的是酯化酵母,主要种群为汉逊酵母属、产朊酵母属、假丝酵母属、球拟酵母属和酒香酵母属等^[19]。球拟酵母属主要表现为白色球拟酵母、球形球拟酵母和食用球拟酵母等,其中白色球拟酵母的酯酶活性较高,此后发现红曲霉、根霉等均有产酯能力,并认为酯化酵母产胞内酯酶,而红曲霉、根霉产胞外酯酶^[20]。在浓香型白酒酿造过程中,红曲霉属在白酒发酵过程中代谢的酶类起重要作用,除酯化酶外,还代谢糖化酶、液化酶、果胶酶、蛋白酶、纤维素分解酶、酒化酶等^[21]。

浓香型白酒中浓郁的香气主要来自于发酵中后期的酯化增香过程。发酵中后期,芽孢杆菌会大量增殖,成为酒醅中的优势菌体,是重要的酯化产香菌之一,但发酵糟醅中细菌产酯酶的研究并不多。黄丹从浓香型大曲中分离得到1株产酯化酶细菌,采用Biolog微生物自动分析系统将其鉴定为血红鞘氨醇单胞菌^[21],但国外的R.Gupta提出细菌也是酯酶的一大类产生菌^[22],因此对于糟醅中产酯细菌有待于进一步的研究和探索。

目前,鉴于浓香型白酒产地、风格的差别和微生物鉴定技术的制约,对于产香功能菌的认识仅仅停留在少数的种属上,对有代表产区的功能菌的种群认识仍不全面。

3 产香功能菌种群鉴定方法的研究

要想清楚糟醅及窖泥中功能菌的种属结构及其变化规律,必须构建科学的分析鉴定手段。目前,对浓香型白酒产香功能菌的鉴定主要方法有:传统的微生物分类学鉴定方法,美国Biolog公司的Biolog微生物自动分析系统鉴定方法和现代分子生物学鉴定方法。前者是借助微生物形态学和生理生化分析手段的一种鉴定方法,在实验室中普遍使用,但该方法局限性较大,后两种可以对微生物的种类做到比较精确的鉴定,但成本较高。

3.1 传统的微生物分类学鉴定方法

传统微生物分类学鉴定方法常用来分离纯化及鉴定酿酒功能菌、分析白酒糟醅及窖泥微生物种群结构、探索功能菌在发酵过程中的消长变化。杨恩超从酿酒糟醅中分离出1株高产己酸乙酯的酯化菌,采用该方法初步将其鉴定为紫色红曲霉^[23];我国部分研究者均采用该手段

分别对不同酒厂窖泥或糟醅中的己酸菌进行了分离、筛选、鉴定及培养应用等方面的研究^[24-28],为浓香型白酒主体香产生菌的研究及应用提供了可靠的参考资料。岳媛媛采用该手段对泸州老窖不同窖龄泥样中的参与产香的可培养兼性厌氧细菌进行了分类计数,并初步鉴定到属,基本明确了兼性厌氧细菌的种群结构,根据纯菌种的发酵特性,发现芽孢杆菌属和芽孢乳杆菌属为窖池优势菌,其中的大多菌株能产生丁酸和己酸等有机酸,确定其为重要的产酸和产香菌^[29]。乔宗伟^[30]等人采用该方法细致分析了全兴酒厂糟醅发酵过程中微生物种群结构及其变化,共分离到113株细菌,将其鉴定为芽孢杆菌属、芽孢乳杆菌属、乳酸杆菌属、乳球菌属、醋杆菌属、链球菌属等6个属,以芽孢杆菌属、乳杆菌属为优势类群;并得到92株酵母菌,鉴定为卵孢酵母属、固囊酵母属、酒香酵母属、汉逊酵母属、管囊酵母属、德克酵母属等6个属,并发现酵母类的构成、优势菌群与施安辉的研究结果不一致,同时采用传统的培养手段明确了不同酒醅位置的各类菌群在发酵过程中的变化规律。

目前,窖池中产香或参与产香功能菌的种群鉴定,主要依据常规的鉴定手段,但该方法存在耗时费力、带有一定的主观性、不能分析不可培养微生物等缺点。随着微生物分类学的发展,PCR技术、克隆分析、梯度凝胶电泳等分子生物学手段已经应用于酿酒功能菌的准确鉴定。

3.2 分子生物学鉴定方法

从20世纪90年代起,PCR技术开始广泛应用于微生物生态学研究方面,使其对环境中的微量微生物的检测成为可能,为不可培养或难以培养的微生物分析提供了一条有效途径。

分子生物学鉴定手段应用于浓香型白酒产香功能菌鉴定的研究报道并不多,仅2006年我国Limeng Liu^[18]等从窖池壁样中分离到了乳酸菌并采用该手段将其鉴定为乳酸片球菌,获得了2个新种,其他研究大多用来分析窖池中微生物区系及其分布情况。如张文学,乔宗伟^[5,30,31]等采用分子生物学手段分别对泸州老窖不同发酵时期糟醅中的细菌、霉菌及酵母菌种类及分布做了细致的研究,结果鉴定了11个以上的细菌分类属,并发现了4个新的细菌属;通过比较18S rDNA序列片段的同源性,获得了分别属于Eurotiales、Trichosporonales、Aphyllphorales和Saccharomycetales等霉菌的4个分类目,首次报道了白酒糟醅中存在的一些种属即Eurotiales类群中的Eurotium、Aspergillus和Talaromyces,Trichosporonales类群中的Trichosporon属,Aphyllphorales类群中的Fomitopsis属,同时还发现在糟醅发酵中后期存在较大数量的Aspergillus属霉菌。在Saccharomycetales类群,检出了属

于Saccharomycopsis和Issatchenkia 2个属的酵母菌,发现白酒糟醅中的主要优势菌为Issatchenkia属酵母,且在发酵前期大量存在,认为Issatchenkia属在发酵前期是糟醅发酵产生乙醇的主要酵母菌。

3.3 Biolog微生物自动分析系统鉴定方法

美国Biolog公司的Biolog微生物自动分析系统,是在传统微生物分类学的基础上所建立的快速分类鉴定技术。它能利用计算机进行数据分析,因其自动化和标准化程度高,鉴定范围大、速度快,目前已成为微生物分类鉴定常用的技术手段。该技术在产香功能菌的鉴定方面已有应用。黄丹^[21,32]等人从浓香型白酒生产中分离得到1株产己酸乙酯酯化酶霉菌,经Biolog微生物自动分析系统鉴定为黄曲霉,此后又获得1株产酯化酶细菌,经Biolog微生物自动分析系统鉴定为血红鞘氨醇单胞菌;王世宽^[33]等人从泸州老窖伏曲中分离纯化出7株酵母菌,利用该技术将其鉴定为自吉利丝孢酵母、无名假丝酵母菌、汉逊德巴利酵母、海隐球酵母菌、东方伊萨酵母菌、解脂耶罗威亚酵母菌、皱落假丝酵母菌,还鉴定了原料和空气中的酵母菌种类,为认识产香功能性酵母菌提供了基础资料,同时也为白酒窖池功能菌的鉴定提供了一种有效的鉴定手段。

4 产香功能菌的功能特性

浓香型白酒发酵糟醅及窖泥产香功能菌的产香和产酶特性受酿造工艺、环境、原料、菌群结构、发酵条件等因素的影响,探索功能菌的发酵特性有利于白酒发酵过程的控制,提高生产效率。

4.1 香气及其前体物产生菌的功能特性

发酵糟醅及窖泥中的主要香气前体物产生菌多为厌氧或兼性厌氧菌,其中研究最多的是己酸菌。现已公认,己酸乙酯为浓香型白酒的主体香,其前体物己酸的产生与控制对浓香型白酒优质品率的提高具有重要意义。徐军^[25]等人从枝江酒业优质老窖泥中分离纯化了2株己酸菌株,探索了产酸最好的培养条件,认为在热处理温度80℃,酒精浓度2.5%,pH值为6,培养温度35℃的条件下产己酸效果最好;黄芳对老窖泥多次富集培养,多次分离纯化,对得到的己酸菌进行发酵试验,探索了产香规律,确定了己酸菌的生产周期、产气旺盛期、产酸期^[24]。己酸菌功能特性的研究为实际生产应用提供了可靠的理论指导。

糟醅中的乳酸菌多为芽孢杆菌属,兼性厌氧,是常见的环境携带细菌,数量最多,极易生长繁殖。在浓香型白酒发酵过程中,乳酸菌不仅代谢乳酸、乙酸、乙醇、二氧化碳等产物,而且可为丙酸菌、丁酸菌等提供乳酸碳源以此

合成丙酸、丁酸等香气前体物,以乳酸为前体物质,可生成白酒的多种香味物质^[34]。乳酸菌的主要作用是由它代谢产生的乳酸与酵母菌产生的酒精发生酯化反应合成乳酸乙酯,乳酸乙酯的含量在一定程度上决定了浓香型大曲酒的质量^[17]。在发酵中后期,糟醅中的乳酸菌占据微生物的主体地位,通过代谢活动产生大量的乳酸,促使窖内酒醅的酸度迅速升高,可有效地抑制部分杂菌的代谢活动,从该方面讲,乳酸菌可被认为是有益菌^[34]。赵东,李维青^[35,36]等人认为在发酵中后期,如果糟醅中的乳酸菌过多,且环境条件适宜,会产生过多的乳酸,进而生成较多的乳酸乙酯,导致白酒的口感较差,此时的乳酸菌可能被列入有害细菌。在浓香型白酒酿造过程中,“增己降乳”的问题很早就被提出,也有不少研究者认识了乳酸菌,同时从不同角度分析了糟醅中纯种乳酸菌的发酵特性及其应用^[16,17,36],但一直未能得到很好的解决。如何正确看待白酒发酵过程中乳酸菌的作用及正确控制乳酸菌的协同发酵,则是该领域值得研究的课题。

丙酸菌为兼性厌氧杆菌,可以降解乳酸,又称嗜乳酸菌。在窖泥中,最适生长条件为 30~32 °C 和 pH4.5~7.0,厌氧条件下,它可利用乳酸、葡萄糖等基质生成丙酸、乙酸和二氧化碳,降乳率有的可高达 90% 以上,同时代谢产生的丙酸又是生成己酸乙酯的前体物^[36,37]。在 20 世纪 90 年代,李大和,徐希望^[37-39]等分别对丙酸菌的分布,特性及应用等方面做了深入研究,在“增己降乳”的问题上取得了一定的研究成果。

丁酸菌大多存在于老窖泥中,为厌氧或兼性厌氧菌,部分代谢产物可导致窖泥产生泥臭味,但浓香型白酒主要香气物中的丁酸乙酯一部分来自于丁酸菌代谢产生的丁酸与乙醇酯化而形成。万朕^[40]等人从稻花香酒厂的老窖泥中分离出 1 株产丁酸菌,并研究了该菌株在液态培养条件下的发酵特性,发现接种量为 5%、培养温度 36 °C、pH7.0 时有较弱产己酸能力,但该菌株与己酸菌混合接种比例为 1:1 时,可使己酸产量提高 50% 左右,说明丁酸菌可有效促进己酸的生成。

醋酸菌是好氧性细菌,具有很强的氧化性,它可以将乙醇氧化成乙酸,而乙酸是白酒主要香味成分之一,但乙酸含量过多会使白酒呈刺激性酸味。仅侯小歌从浓香型酒曲中分离到 7 株醋酸菌,并对其产酸性能进行了分析,发现该醋酸菌产酸快,具有一定的耐酒精能力^[41],但发酵糟醅中的醋酸菌是否主要来源于大曲,是否具有相似的产酸特性,值得进一步的探索和研究。目前,对于糟醅中醋酸菌发酵特性的细致研究还未见相关报道。

4.2 酯化菌的产酯特性

在浓香型白酒酿造中,酯化酶增香技术常用来合成

己酸乙酯主体香气及其他酯类物质,用于调整生产工艺和生产调味酒^[42]。酯化酶产生菌主要表现为真菌类,也有部分细菌类,但目前我国对酿酒酯化菌的研究及应用大多集中在真菌类群方面。

酵母菌是产酒与生香的关键功能菌,直接影响酿酒过程,进而影响白酒的出品率及其香气和香味成分。浓香型白酒生产中,产酯酵母菌应用最多是汉逊酵母,其次是球拟酵母和假丝酵母。它们能以乙醇为碳源,产生较多的酯类,同时具备酒精发酵能力和乙酸发酵的能力,一般低温(25~30 °C)培养时,较适宜产酯,培养温度升至 34 °C 以上时,产酯量则急剧下降,甚至不产酯^[43];产酯培养适宜在较低的 pH 值范围内,当 pH 值接近中性时将会分解生成的酯而导致乙酸乙酯总量下降,且产酯酵母在繁殖及产酯时均需要一定量的氧气,但不管是液态或固态培养,其供氧量也不宜过大,否则会影响产酯作用^[44]。产酯酵母一般既适合液态培养又适于半固态和固态培养。液态培养时,产酯条件为 28 °C、pH4.0 左右时,总酯含量可达到最高,且酒精含量为 3%vol~5%vol 时可促进酵母产酯,低温利于产酯^[45-46]。

霉菌是浓香型白酒酿造重要的产酯菌之一,其中研究和应用最多的是红曲霉菌。糟醅中的红曲霉主要来源于大曲、酯化曲及红曲霉的扩培液,不少研究者对红曲霉的产酯特性、培养应用条件及酯酶特性进行了细致研究,如吴根福等通过对窖泥、大曲、米曲、黑曲及红曲中微生物的分离、筛选,获得 2 株己酸乙酯合成能力较强的曲霉菌,两菌株均在 30 °C、pH5 的麸皮培养基中培养 60 h 后产酯最高,酯化酶在适宜条件下(以 2%vol 乙醇和 0.25% 己酸作底物,pH4.0、30 °C),酶活力可达 20 U/g^[47];泸州市酿酒科研所任道群等对红曲霉、根霉菌等酯化菌对单一酸和混合酸的酯化效果进行了研究,研究发现,红曲霉能促进己酸、丁酸及混合酸与乙醇的酯化作用,生成酯类物质均为己酸乙酯,而且酯化能力极强;根霉菌能促进己酸和混合酸与乙醇的酯化作用,生成少量的己酸乙酸和乳酸乙酯^[48]。红曲菌的应用还可降低乳酸乙酯含量,改善浓香型白酒的口感较差的缺点,并能有效地抑制杂菌的滋生,防止夏季掉排现象。黄丹等从浓香型大曲中分离到 1 株产己酸乙酯酯化酶的黄曲霉菌,以摇瓶培养条件为 36 °C、150 r/min 恒温振荡、培养 72 h,发酵液酯化酶活可达 6.75 U/mL,当该菌株以黄豆粉为 N 源,淀粉为 C 源,初始 pH6.0,36 °C 下培养 72 h 时,酯化酶活可达 9.16 U/mL^[32]。

酯化酵母、酯化红曲霉、根霉菌及曲霉菌等产酯菌的产香特性为浓香型白酒的生产工艺及技术改进提供了方向。

5 产香功能菌在浓香型白酒发酵过程中的相互关系

窖池生态系统中微生物种群间相互依存,相互作用,使窖池形成一个有机整体,保证其微生物代谢活动的正常进行。胡承的研究表明,新老两类窖池主要厌氧功能菌分布有明显差异,甲烷菌和己酸菌数量以老窖为多,新窖中未测出甲烷菌;同一窖池中,甲烷菌与己酸菌的数量有同步增长的特征趋势,己酸菌和甲烷菌存在共生关系;丁酸菌在代谢过程中产生的氢,被甲烷菌及硝酸盐还原菌利用,解除其代谢产物的氢抑制现象;丁酸的累积又有利于己酸菌将丁酸转化为己酸;甲烷菌、硝酸盐还原菌与产酸、产氢菌相互耦联,实现“种间氢转移”关系,且甲烷菌代谢的甲烷有刺激产酸的效应,黄水中若含有大量的乳酸,被硫酸盐还原菌利用,就消除了黄水中营养物的不平衡^[49]。李维青提出乳酸菌是窖池主要的微生物之一,常与丁酸菌、己酸菌、甲烷菌、硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌等功能性微生物共存“共生”^[36]。还有研究表明,乳酸菌和酵母菌之间有协同作用,同时又有拮抗作用,酵母菌初始发酵酒精时,会利用其他营养物质产生代谢产物如半乳糖,半乳糖的积累会促进乳酸菌的生长,同时,乳酸菌产生的化合物如苯乳酸,会抑制酵母菌的生长;而某些酵母菌,如假丝酵母则会抑制乳酸菌的生长^[50,51];醋酸菌能够影响酒精发酵过程中酵母菌的生长,并且影响乳酸发酵过程中乳酸菌的生长^[52];李大和指出产酯酵母和窖泥功能菌按适当的比例混合共酵,才能产生己酸乙酯,若共酵比例不当、条件不适很难产生己酸乙酯,说明只有酵母菌和己酸菌共酵时,才能更好地促进己酸乙酯的产生^[53];郭霞从酒糟中分离出酵母菌8株、细菌3株和霉菌4株,并分别选取10株和15株进行混菌发酵试验,认为在浓香型白酒发酵过程中,菌株在15株以上较为适宜^[54]。

窖池生态系统中微生物丰富多样,相互间关系复杂。在认识重要微生物相互作用、相互关系的基础上,在生产过程中做到合理科学控制,充分发挥有益微生物的正常代谢,对提高白酒产率及优质酒率具有积极意义。

6 产香功能菌在浓香型白酒生产中的应用

20世纪80年代,我国吴衍庸教授对泸州老窖微生物进行了深入的研究,发现并分离了利用甲醇的生丝微生物,其培养应用降低了白酒中的甲醇含量,并再利用了水中的硝酸盐,又从老窖中分离出1株产甲烷杆菌,开发出甲烷细菌与己酸菌共酵的二元发酵技术,从泸州老窖泥中分离出产己酸的细菌,为推广人工老窖发酵浓香型白酒作出了重要贡献^[42]。后来,也有相关研究者逐步从窖泥、糟醅中分离纯化出己酸菌,通过选育、扩大培养,已成功应用于窖泥生产、窖池养护、翻沙材料、灌窖、制取酯化

液等浓香型白酒生产过程中,并取得了很好的效果^[26]。丙酸菌的扩大培养应用于浓香型糟醅发酵,在“增己降乳”方面起了很大作用^[37-39,55]。

20世纪60年代起,产酯酵母已合理应用于浓香型白酒的生产,弥补了白酒香气不足及后味较淡的缺点,最为主要的是产酯酵母的应用可提高酒中主体香的含量即己酸乙酯,同时也可提高乙酸乙酯、乳酸乙酯和乙酸甲酯、辛酸乙酯等次要香气物质^[21]。李大和、李学思^[56,57]等研究了酯化酵母的扩培条件,且成功应用于白酒生产,提高了浓香型白酒的产率和效率。

20世纪90年代开始,我国的相关研究单位对酯化霉菌应用于浓香型白酒的生产进行了多方面的研究。中国科学院成都生物所吴衍庸^[58]等对红曲霉、根霉、曲霉、白地霉、毛霉等进行了脂肪酶活力和合成己酸乙酯能力的测定,为酯化菌的应用提供了可靠的理论依据。目前,在浓香型白酒生产中应用最多的是酯化菌红曲霉,通过窖外可控发酵获得红曲霉酯化液,用于直接蒸馏做调味酒、泼入酒醅上甑蒸馏、加入底锅串蒸、灌窖等,也可用于配制复合红曲菌种制取强化大曲,或制备帘子曲,直接用于大糟发酵、双轮底发酵等。目前,红曲霉广泛应用于浓香型酒厂,如江苏洋河酒厂、河南宋河酒厂、河南仰韶酒厂、河南杜康酒厂、四川泸州老窖酒厂、湖北武当酒厂、山东泰山生力源酒厂、天津渔阳酒厂、甘肃陇西酒业集团、江苏双沟酒厂、陕西西凤酒厂等^[15,59]。

在从事浓香型白酒的生产过程中,经过坚持不懈的努力,已探索、研究、总结出许多诸如“回酒发酵”、“回泥发酵”、“人工培养老窖泥”、“延长发酵周期”等有利于提高浓香型大曲酒质的生香技术措施,并在实际生产中取得了良好的效果。但是这些技术措施在实际生产中,也存在一定的现实问题,如发酵周期长、设备利用率低、粮耗高、出酒率低等缺陷。

浓香型白酒生产率及优质品率的提高,除了与生产工艺外,还与发酵窖池微生物直接相关,所以要利用好产香功能菌,以便更好的养护窖池,提供生产效率。

7 总结

尽管我们对浓香型白酒糟醅及窖泥中的功能菌已经做了大量的研究,但也存在以下问题:首先,对发酵过程中的微生物分布及鉴定研究较多,但对具体的某种或某类功能菌鉴定及产生变化研究还远远不够;其次,功能菌研究区域有一定的局限性,目前主要集中在四川、江苏等南方产地,而河南、山东、河北等北方产地功能菌的研究是零散的;再次,从研究手段上来看,基本上还处于传统微生物研究阶段,借助于分子生物学等先进方法的相对

较少;最后,对于产香功能菌的认识仍不系统,其开发应用有待更进一步的研究和探索。

浓香型白酒作为多菌种混合固态静止自然发酵技术,具有独特的魅力,对于其中微生物特别是功能性微生物的研究具有很高的理论和应用价值。但对于白酒微生物的研究多停留于传统的研究手段,要想真正的弄清白酒微生物的本质,必须借助于先进的理论和方法,如引入微生物工程、基因工程、代谢工程、发酵工程及环境微生物生态学等理论以及分子生物学的方法,以便更好的促进酒业发展,使白酒生产实现质的提高。

参考文献:

- [1] Yan Xu, Dong Wang, Wenlai Fan, et al. Traditional chinese biotechnology[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2010, 122: 189-233.
- [2] Wenlai Fan, Michael C. Qian. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged chinese "Yanghe Daqu" liquors[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 7931-7938.
- [3] 庄名扬.中国白酒香味物质形成机理及酿酒工艺的调控[J]. *酿酒*, 2007, 34(2): 109-113.
- [4] 沈怡方.白酒风味质量形成的主要因素[J]. *酿酒科技*, 2005(11): 30-34.
- [5] Wenxue Zhang, Zongwei Qiao, Toru Shigematsu, et al. Analysis of the bacterial community in zaopei during production of chinese Luzhou-flavor liquor[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2005, 111(2): 215-222.
- [6] 俞学峰.生香活性干酵母在白酒生产过程中的应用[J]. *无锡轻工大学学报*, 1999, 18(9): 138-140.
- [7] 王国良, 宋俊梅, 曲静然.产香微生物的应用现状[J]. *食品研究与开发*, 2007, 128(7): 157-160.
- [8] 沈怡方.白酒中四大乙酯在酿造发酵中形成的探讨[J]. *酿酒科技*, 2003(5): 28-31.
- [9] 胡承, 应鸿, 许德富, 等.窖泥微生物群落的研究及其应用[J]. *酿酒科技*, 2005(3): 34-38.
- [10] 张肖克, 黄永光, 胡晓喻.窖泥糟醅发酵过程中微生物多态性特征[J]. *酿酒科技*, 2006(1): 65-69.
- [11] 张丽莺.窖池微生物生态资源库的建立、管理及菌种保藏[D].成都: 四川大学, 2006: 1-120.
- [12] 熊昌绪.浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物消长物质变化的研究[J]. *酿酒科技*, 1994(2): 25.
- [13] 罗志腾.大曲发酵酒醅微生物区系的初步研究[J]. *微生物学通报*, 1986(2): 59-60.
- [14] 施安辉.浓香型白酒发酵过程窖中微生物区系的分析[J]. *酿酒*, 1986(4): 24-29.
- [15] 李大和, 刘念, 李国红.浓香型大曲酒酿造中酯化菌研究的现状与展望[J]. *酿酒科技*, 2008(2): 92-98.
- [16] 王葳, 赵辉, 陈凤阁.浓香型白酒窖泥中乳酸菌的分离与初步鉴定[J]. *酿酒科技*, 2006(6): 29-31.
- [17] 姚惟琦, 陈茂彬, 镇达, 等.浓香型白酒酒醅中乳酸菌分离及其对模拟固态发酵的影响[J]. *酿酒*, 2010, 37(3): 37-40.
- [18] Limeng Liu, Bin Zhang, Huichun Tong, et al. *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 2405-2408.
- [19] 王治国, 夏明星, 管清先, 等.应用产酯酵母提高浓香型白酒质量的研究[J]. *酿酒科技*, 1994(4): 13-15.
- [20] 范文来, 徐岩.大曲酶系研究的回顾与展望[J]. *酿酒*, 2000(5): 21-23.
- [21] 黄丹, 张强, 严芳, 等.浓香型大曲中酯化酶细菌的分离鉴定及产酶条件研究[J]. *中国酿造*, 2009, 209(8): 57-59.
- [22] R.Gupta, N.Gupta, P.Rathi. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2004, (64): 763-781.
- [23] 杨恩超, 程世春, 刘光焯.己酸乙酯酯化菌分离筛选及鉴定[J]. *食品与发酵科技*, 2010, 46(3): 33-36.
- [24] 黄芳.己酸菌的分离纯化及生长规律的研究[J]. *酿酒*, 2008, 4(35): 41-43.
- [25] 徐军, 谭崇尧.枝江老窖泥中己酸菌的分离纯化及培养条件的研究[J]. *酿酒科技*, 2010(5): 42-43.
- [26] 罗维, 相玉珍, 崔世亮, 等.己酸菌的选育、培养和应用研究[J]. *酿酒*, 2003, 5(30): 28-30.
- [27] 崔世亮, 杨玉珍, 节秀娟.己酸菌的选育与应用研究[J]. *酿酒科技*, 2003(4): 38-39.
- [28] 熊俐, 胡洋, 刘俊, 等.窖泥己酸菌的分离培养与诱变选育[J]. *四川理工学院学报: 自然科学版*, 2010, 23(3): 325-327.
- [29] 岳元媛, 张文学, 刘霞, 等.浓香型白酒窖泥中兼性厌氧细菌的分离鉴定[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 251-255.
- [30] 乔宗伟, 张文学, 张丽莺, 等.浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J]. *酿酒*, 2005, 32(1): 18-21.
- [31] Wenxue Zhang, Zongwei Qiao, Yueqin Tang, et al. Analysis of the fungal community in zaopei during the production of chinese Luzhou-flavour liquor[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2007, 133(1): 21-27.
- [32] 黄丹, 刘清斌, 刘达玉, 等.一株产己酸乙酯酯化酶霉菌的分离鉴定及产酶条件研究[J]. *酿酒科技*, 2008(2): 27-33.
- [33] 王世宽, 潘明, 侯华, 等.伏曲酵母菌的分类鉴定及来源分析的研究[J]. *生物技术*, 2010, 20(2): 37-39.
- [34] 谢玉球, 钟雨, 谢旭, 等.乳酸菌在固态法白酒生产中的地位与作用[J]. *酿酒科技*, 2008, 273(11): 83-86.
- [35] 赵东, 乔宗伟, 彭志云, 等.浓香型白酒发酵过程中酒醅微生物区系及其生态因子演变研究[J]. *酿酒科技*, 2005(7): 37-39.
- [36] 李维青.浓香型白酒与乳酸菌、乳酸、乳酸乙酯[J]. *酿酒*, 2010, 37(3): 90-93.
- [37] 李大和.浓香型曲酒酿造过程中丙酸菌的研究[J]. *酿酒科技*, 1993(1): 6-12.
- [38] 李大和.浓香型曲酒酿造过程中丙酸菌的生态分布[J]. *酿酒科技*

(下转第 106 页)

范围内,方法具有良好的重复性、回收率,操作简便,灵敏度高。本方法的建立对白酒行业健康发展及维护白酒食品的安全具有一定的促进作用。

参考文献:

- [1] 黄永辉. SPE-GC-MS法同时测定奶粉中18种邻苯二甲酸酯迁移量[J]. 食品研究与开发, 2011, 31(11): 167-171.
- [2] P Wang, SL Wang, C Q Fan. Atmospheric distribution of particulate- and gas-phase phthalic esters (PAEs) in a Metropolitan City, Nanjing, East China[J]. Chemosphere, 2008(72): 1567-1752.
- [3] 郑文芝, 周勇强, 张霖霖. PVC塑料制品中增塑剂邻苯二甲酸酯在水环境中迁移规律的研究[J]. 广东化工, 2006, 33(155): 29-30.
- [4] 张蕴晖, 陈秉衡, 郑力行, 等. 人体生物样品中邻苯二甲酸酯类的含量[J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37(6): 429-434.
- [5] 彭学伟. 单体同位素分析技术在邻苯二甲酸酯降解中的应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [6] Mariko Matsumoto, Mutsuko Hirata-Koizumi, Makoto Ema. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2008(50): 37-49.
- [7] 郭永梅. 邻苯二甲酸酯的毒性及相关限制法规[J]. 广州化学, 2012, 37(2): 75-79.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 卫生部办公厅关于通报食品及食品添加剂中邻苯二甲酸酯类物质最大残留量的函(卫办监督函〔2011〕511号)[Z]. 2011.
- [9] 李钟宝, 蔡晨露, 刘秀梅. 邻苯二甲酸酯类增塑剂合成与应用研究进展[J]. 塑料助剂, 2010(82): 8-15.
- [10] GB/T 21911—2008, 食品中邻苯二甲酸酯的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [11] 邵栋梁. GC-MS法测定白酒中邻苯二甲酸酯残留量[J]. 化学分析计量, 2010, 19(6): 33-35.
- [12] 蔡冠梁. 气相色谱-质谱仪离子源灯丝的修复[J]. 分析仪器, 1995(4): 53-54.

(上接第101页)

- 技, 1992(5): 18.
- [39] 徐希望, 徐世江, 谢恩举. 利用丙、己酸菌液双喷雾实现增己降乳的研究[J]. 酿酒科技, 1996(6): 43-44.
- [40] 万朕, 李莉, 郑裴, 等. 一株产丁酸菌的分离、纯化及产酸研究[J]. 酿酒科技, 2011(1): 26-29.
- [41] 侯小歌, 杜红阳, 李学思, 等. 宋河大曲中醋酸菌的分离鉴定及产酸特性[J]. 中国酿造, 2011, 229(4): 112-115.
- [42] 吴衍庸. 酯化酶技术与白酒增香[J]. 酿酒科技, 1999(5): 24-26.
- [43] 赵华, 赵树欣, 张维邹, 等. 耐高温型产酯酵母的选育[J]. 酿酒, 1997, 120(3): 17-19.
- [44] 隋延铎. 产酯酵母在白酒生产过程中的应用[J]. 酿酒, 2004, 31(3): 17-19.
- [45] 吴思方, 孙灿, 潘立慧, 等. 产酯酵母产酯条件的研究[J]. 武汉食品工业学院学报, 1996, (1): 25-29.
- [46] 徐开成, 李强, 邵熔. 酵母产酯正交试验[J]. 酿酒科技, 1999(2): 29-30.
- [47] 吴根福, 陈佩华, 彭晓国. 己酸乙酯酯化酶产生菌的自然选育及其酶学特性的初步研究[J]. 科技通报, 2006, 32(6): 25-27.
- [48] 任道群, 唐玉明, 姚万春, 等. 酯化酶动力学研究[J]. 酿酒科技, 2006(6): 39-40.
- [49] 胡承, 应鸿, 许德富, 等. 窖泥微生物群落的研究及其应用[J]. 酿酒科技, 2005(3): 34-38.
- [50] 杜礼泉, 饶家权, 唐聪, 等. 窖泥功能菌在浓香型大曲酒生产中的应用[J]. 酿酒, 2010, 12(6): 16-18.
- [51] 姚万春, 唐玉明, 任道群, 等. 优良窖泥功能菌的筛选及其生物学特性的初步研究[J]. 酿酒科技, 2010(11): 36-39.
- [52] 李大和, 李国洪. 浓香型曲酒酿造生产工艺要素[J]. 酿酒, 2010, 12(5): 1-4.
- [53] 李大和, 李家顺, 李天道. 产酯酵母在浓香型曲酒生产中的应用[J]. 酿酒, 1990(6): 17-20.
- [54] 郭霞. 浓香型白酒酒糟微生物分离及发酵试验[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2005, 22(1): 50-52.
- [55] 吴生文, 辛秀明, 邓丹霞, 等. 丙酸菌的分离鉴定及对特型酒风格风味的影响[J]. 中国食品添加剂, 2011(4): 130-134.
- [56] 李学思, 丁竟超. 中高酒曲中有益功能菌的分离及生产中的应用研究[J]. 酿酒, 2006, 33(2): 29-30.
- [57] 李大和, 李国洪. 浓香型曲酒酿造生产工艺要素[J]. 酿酒, 2010, 12(5): 1-4.
- [58] 吴衍庸. 白酒工业微生物资源的发掘与应用[J]. 酿酒科技, 2006(11): 111-113.
- [59] 李绍亮, 刘子红, 李学思. 红曲酯化酶生产及应用[J]. 酿酒科技, 2010(2): 42-45.

习酒公司董事长张德芹当选 2012 年度酒业风云人物

本刊讯 近日,在糖酒快讯公布的《2012 中国酒业风云榜》中,习酒公司董事长张德芹当选 2012 年中国酒业风云榜十大年度人物。颁奖词:在白酒“多灾多难”的 2012 年,他带领着习酒逆势飞扬,提前实现了 2012 年 30 亿元的销售目标,同比增长 68%!其中重点战略品牌窖藏系列产品销售额 14.7 亿元,同比增长 172.2%!敢想、敢拼、敢做——凭着这三点,他带领着习酒——这个赤水河边的老酒厂翻开了崭新的一页!(胡建锋)