

窖泥微生物群落的研究及其应用

胡 承 应 鸿 ,许德富 胡永松

(四川大学·泸州老窖股份有限公司食品与发酵工程研究所,四川 成都 610000)

摘 要: 窖泥微生态系统是由厌氧异养菌、甲烷菌、己酸菌、乳酸菌、硫酸盐还原菌和硝酸盐还原菌等多种微生物组成的微生物共生群落系统。在该微生物群落中随窖池层次分布顺序的不同和窖泥的化学生态的不同,菌类菌种呈现明显的区别。浓香型白酒的固态发酵过程就是一个典型的微生物群落的演替过程和各菌种间的共生、共酵、代谢调控过程。该过程不但对微生态群落中的菌种演替具有反馈抑制作用,而且直接影响白酒的产量和质量。研究和应用微生物生态学理论,对人工窖泥培养和提高白酒固态发酵质量具有指导意义。(孙悟)

关键词: 微生物; 窖泥; 微生物群落; 微生态系统; 研究; 应用

中图分类号:TS261.1;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)03-0034-05

Research on Microflora in Pit Mud and Its Application

HU Cheng, YING Hong, XU De-fu and HU Yong-song

(Food & Fermentation Engineering Research Institute of Sichuan University
and Luzhou Laojiao Co. Ltd., Chengdu, Sichuan 610000, China)

Abstract: Microflora in pit mud is composed of multiple microbes including anaerobe, methane bacteria, hexoic acid bacteria, lactic acid bacteria, sulfate reducing bacteria and nitrate reducing bacteria etc. Microbial species present distinct difference with the variation of pits layer distribution sequence and the change of chemical ecology of pit mud. Solid fermentation process of Luzhou-flavor liquor is actually the typical substitution process of microflora and the syngensis co-fermentation and metabolism process of all the microbial species. Such process not only has feedback and inhibition effects on microbial substitution but also directly influence liquor yield and liquor quality. Research on microecosystem and utilization of relative theories has positive effects on manmade pit mud culture and improvement of liquor quality by solid fermentation. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; pit mud; microflora; microecosystem; research; application

对窖泥微生物的研究是以微生物生态学为理论指导,去认识、了解、研究窖泥生态系统中微生物种群的相互依存、相互作用所形成的一个有机的整体——窖泥微生物群落^[1]。应用微生物生态学理论,指导我们对窖泥生态系统的研究以及人工窖泥的培养,以保证、提高浓香型大曲酒的质量。

1 窖泥微生物群落的组成、结构的初步研究

微生物群落中所包含的微生物种类称为种类组成,是微生物群落最基本的特征。现在人们对窖泥微生物群落的组成及其分布结构已有一些研究,见表 1。

由表 1 可见,不同窖龄窖泥厌氧微生物数量分布在以下特点:①厌氧异养菌:老窖泥中的厌氧异养菌数

量明显多于新窖,一般随窖池上、中、下层顺序而递增。

②甲烷菌:老窖泥中的甲烷菌数量随窖池上、中、下层顺序而递增。而新窖泥中未测出甲烷菌。③己酸菌:老窖泥中的己酸菌明显多于新窖,并随窖池上、中、下层顺序而递增。④乳酸菌:新、老窖泥中的乳酸菌数量分布无明显规律性。⑤硫酸盐还原菌:除 4 号窖外,老窖泥中硫酸盐还原菌数量多于新窖泥。⑥硝酸盐还原菌:新老窖泥中存在一定数量的硝酸盐还原菌。

同时,在不同窖龄窖泥中厌氧细菌数量垂直分布情况也有一定的区别,见表 2。

此外,还有一些报道介绍了放线菌也是窖泥微生物群落的组成成员,并在不同窖泥中分布数量也有一定特征,如在 10 年窖龄窖泥中为 7.2×10^4 个/g 干土;在百年

收稿日期:2004-11-02

作者简介:胡承(1968-),男,四川人,教授,硕士生导师,微生物学在读博士,发表论文多篇。

表 1 不同窖龄老窖厌氧菌群糟层分布特征 (个/g 干土)^[2]

窖龄	层次	厌氧异氧菌	甲烷菌	己酸菌	乳酸菌	硫酸盐还原菌	硝酸盐还原菌
100 年	上层	2.76×10^4	3.40×10^2	4.00×10^2	2.10×10^5 (混样)	8.10×10^5	9.30×10^2
	中层	1.33×10^4	1.60×10^3	1.90×10^3		8.90×10^5	6.10×10
	下层	7.57×10^4	3.80×10^3	1.90×10^3		2.00×10^4	5.20×10
200 年	上层	1.10×10^4	0.00×10	0.00×10	1.24×10^4	9.30×10^2	2.10×10^2
	中层	1.70×10^6	6.19×10^2	4.50×10^3	6.00×10^6	4.40×10^2	6.20×10^3
	下层	6.19×10^6	—	6.50×10^4	1.30×10^5	3.90×10^4	3.80×10^3
300 年	上层	1.38×10^5	0.00×10	6.41×10^2	2.00×10^8	2.00×10^5	8.60×10
	中层	3.62×10^5	1.30×10^2	7.24×10^2	8.90×10^7	8.00×10^4	8.60×10^3
	下层	3.97×10^5	2.50×10^5	7.94×10^4	1.40×10^7	3.40×10^4	3.30×10^3
400 年	上层	4.48×10^4	1.30×10	1.20×10^2	8.70×10^5	7.90×10^6	7.20×10^3
	中层	8.59×10^5	8.35×10^3	1.88×10^4	2.00×10^4	1.90×10^6	7.60×10^4
	下层	4.88×10^5	1.71×10^4	8.10×10^4	3.00×10	2.30×10^5	9.00×10^4
500 年	上层	3.67×10^3	0.30×10	1.30×10	5.13×10^5	2.30×10^3	1.80×10^6
	中层	1.14×10^5	2.03×10^3	4.50×10^2	1.02×10^5	3.18×10^5	1.00×10^7
	下层	2.64×10^5	5.74×10^4	9.88×10^5	3.17×10^9	5.80×10^5	1.20×10^5
2 年 (新窖)	上层	4.40×10^3	0.00×10	6.20×10	2.00×10^8	6.50×10^5	2.01×10^4
	中层	3.90×10^3	0.00×10	1.10×10^2	1.10×10^5	1.44×10^3	7.50×10^2
	下层	4.38×10^3	0.00×10	2.00×10^3	1.30×10^7	1.20×10^3	1.49×10^3

们进一步认识、研究窖泥微生物群落变化、分布及对比认识这些微生物群落同产酒(质量)效应均有一定意义。

2 窖泥微生物群落中甲烷菌与己酸菌的相互关系

在窖泥生态系统中微生物种群间相互依存、相互作用,使窖泥形成一个有机整体^[1],保证其正常的微生物代谢活动的进行。甲烷菌与己酸菌在新老窖中的分布现象及其发酵状况见表 3、表 4。

2.1 甲烷菌与己酸菌在老窖中的数量分布

从表 3、表 4 可知,新老窖泥中两类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的存在。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。

2.2 甲烷菌与己酸菌混合发酵对产己酸和产甲烷的促进效应

在专性己酸菌生长培养基中加入甲烷菌所需的碳源,在专性甲烷菌生长培养基中加入己酸菌生长所需的碳源,分别接种甲烷菌和己酸菌。在发酵旺盛期测得的数据表明两菌混合发酵产己酸比对照高 8.69%,产甲烷比对照高 22.2%。

3 窖泥的化学生态环境的组成

窖泥的化学组分是其生态系统中重要的组成部分,也是窖泥微生物生态环境和生长繁殖的重要基质,其在不同程度上影响窖泥微生物群落的组成、分布及菌群演替。因此,认识、了解窖泥的本质和特性也是便于我们更好认识窖泥微生物群落的重要前提之一。老窖、新窖的化学生态中各成分分布情况见表 5^[2]。

由表 5 可见,窖泥化学生态环境存在多样性。表 5 还表明老窖的窖泥含水量平均为 32.2%,新窖为 24.76%,一般随窖池上、中、下层顺序而递增。老窖泥 pH 值平均为 5.41,新窖为 6.15。老窖有机碳平均含量为 7.97%,新窖为 4.42%。老窖泥腐植酸平均含量为 2.39%,新窖为 0.36%。老窖泥全氮平均含量为 1.152%,新窖为 0.532%。老窖泥

表 2 厌氧微生物数量在不同窖龄窖泥中的垂直分布^[2] (个/g 干土)

菌类	窖类	窖泥土壤层次与厌氧细菌数量(cm)				
		0~4	4~8	8~12	12~16	16~20
己酸菌	新	3.93×10^3	5.3×10^3	3.7×10^2	6.0×10	0
	中	7.3×10^5	4.6×10^5	8.6×10^4	3.8×10^2	—
	老	8.1×10^7	8.1×10^7	7.8×10^7	3.3×10^7	8.5×10^6
丁酸菌	新	2.2×10^4	1.4×10^4	8.2×10^5	3.7×10^4	1.4×10^3
	中	1.2×10^4	2.5×10^4	3.6×10^4	8.3×10^4	—
	老	6.7×10^4	5.8×10^4	8.3×10^5	7.4×10^5	2.3×10^4
乳酸菌	新	6.0×10^5	8.7×10^5	6.8×10^5	5.2×10^4	6.0×10^3
	中	4.8×10^5	6.4×10^6	5.2×10^5	1.8×10^5	—
	老	3.6×10^6	6.2×10^5	6.1×10^5	2.3×10^6	7.4×10^6
甲烷菌	新	0.2×10	1.2×10	0.1×10	0	0
	中	2.2×10	9.4×10	0.9×10	0.6×10	—
	老	3.3×10^4	5.8×10^4	2.9×10^4	3.6×10^4	2.6×10^3
硫酸还原菌	新	7.0×10^4	9.2×10^4	7.6×10^3	2.1×10	0.9×10
	中	1.1×10^3	3.7×10^3	8.4×10^3	1.6×10^2	—
	老	1.8×10^5	2.7×10^6	7.7×10^5	8.4×10^5	2.8×10^4
硝酸还原菌	新	3.2×10^2	5.3×10^3	1.2×10	0.3×10	0
	中	5.8×10^3	7.2×10^3	2.7×10^2	3.9×10	—
	老	2.8×10^5	2.2×10^5	1.0×10^4	6.1×10^5	9.3×10^4

窖龄窖泥中为 2.106×10^6 个/g 干土;在优质人工窖泥中为 5.23×10^5 个/g 干土。

表 1、表 2 还表明了窖池中微生物群落在不同窖龄的不同糟层以及窖壁土壤垂直栖息分布的规律,对于我

表 3 老窖、新窖中甲烷菌和己酸菌的分布特征^[2]

窖号	(个/g 土)	
	甲烷菌	己酸菌
新窖	0.00×10	5.15×10 ¹
老窖 7	6.67×10 ²	1.20×10 ⁴
老窖 4	2.22×10 ²	2.32×10 ⁴
老窖 26	8.34×10 ⁴	2.88×10 ⁴
老窖 20	6.49×10 ¹	3.33×10 ⁴
老窖 21	1.98×10 ⁴	3.29×10 ⁵

表 4 甲烷菌和己酸菌混合发酵对产物的影响

项目	己酸量 (mg/kg)	甲烷量 (%)
己酸菌发酵	8355.38	
甲烷菌发酵		21.87
甲烷菌己酸菌混合发酵	9081.9	26.73
比对照增加 (%)	8.69	22.22

全磷平均含量为 2.187 % ,新窖为 0.288 %。老窖与新窖差异明显。老窖泥含氨态氮平均为 250.77 mg/100 g ,新窖为 99.80 mg/100 g ,老窖比新窖增加 151.27 %。老窖泥含速效磷平均为 240.45 mg/100 g ,新窖为 65.64 mg/100 g ,老窖比新窖增加 266.32 %。

此外 ,还有专家对窖泥酶活进行了一系列的比较分析和研究^[4] ,其初步结果如下 ①酸性磷酸酶与碱性磷酸酶活性变化规律为窖泥表层>中层>深层 ,且变化明显。而中性磷酸酶虽然呈相同变化趋势 ,但活性明显偏低。这可能与表层速效磷含量较高导致的反馈抑制有关。②窖泥中蛋白酶活性也是呈现表层>中层>深层 ,与理化分析中的全氮、速效氮变化规律呈对应性。③脲酶活性也呈现相同规律。④过氧化氢酶活性则呈现相反规律 ,即表层<中层<深层。若有氧条件下可以产生过氧化氢 ,它对微生物繁殖代谢是不利的。所以诱导产生过氧化氢酶以分解过氧化氢。己酸菌是在厌氧条件下繁殖发酵的 ,生成过氧化氢的可能性很少 ,依次呈现相反规律。⑤蔗糖酶活性不高 ,己酸菌的碳源主要是乙醇和醋酸 ,窖泥中蔗糖含量极少 ,蔗糖酶相应就少。

从上述对窖泥化学生态环境及其部分酶活的研究 ,表明它们也是窖泥生态系统的重要组成部分 ,同时不难看出窖泥既有一般土壤的共性 ,又有其自身独特的个性 ,其中最重要的就是它们长期与糟醅接触而富集了大量特殊的酿酒功能微生物种群 ,以及这些种群对窖泥生态环境的作用而导致窖泥的老熟。由此可见 ,对窖泥微生物群落的认识、了解、研究乃至应用都有重要的意义。

4 窖泥微生物的代谢与窖泥的产酒效应

窖泥生态系统中微生物种群间的相互依存、相互作用共生性 ,其与窖泥微生物群落中菌类菌种间的代谢活动密切相关。因此 ,对其代谢活动进行探索、分析 ,有利于对窖泥微生物群落及其生态系统的认识、了解、研究及应用。

4.1 泥中微生物及其代谢特征^[3]

窖泥中的微生物主要有乳酸菌、丁酸菌、己酸菌、甲烷菌、硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌等。乳酸菌报道较多 ,在此不必赘述。

从浓香型白酒厂中分离出的己酸菌 ,发酵乙醇和乙酸盐 ,产生己酸、丁酸及少量乙酸 ,发酵葡萄糖产微量己酸 ,与巴克氏己酸菌不同。但是 ,不管哪一类己酸菌 ,窖泥中的多种有机酸代谢过程中产生氢 ,存在着微生物代谢控制的底物抑制现象。

硝酸盐还原菌 ,如大肠杆菌 ,只能将硝酸盐还原为亚硝酸盐 ;而另外一些菌 ,如地衣芽孢杆菌还能进一步将亚硝酸盐还原为一氧化氮、氧化二氮和氮。

有机物氧化时产生的 NADH₂ [还原型辅酶Ⅱ]和 FADH₂ [还原型黄素腺嘌呤二核苷酸]中的氢 ,通过硝酸盐还原菌的电子呼吸链 ,将电子传递给硝酸根、亚硝酸根、一氧化氮和氮 ,使相应的化学物质还原 ,最后都还原为氮。这就是窖池中氮气的来源。

窖泥中观察到多种甲烷菌 ,其形态有长杆菌、小球

表 5 老窖、新窖的水分、有机质及营养成分分析^[2]

老窖窖号	层次	水分 (%)	pH	有机碳 (%)	腐植酸 (%)	全氮 (%)	全磷 (%)	氨基氮 (mg/100g)	有效磷 (mg/100g)
7	混样	31.00	4.53	5.80	3.39	1.045	0.802	205.50	146.00
	上	24.30	7.25	6.00	0.07	1.141	4.804	324.50	137.20
	中	43.50	7.00	6.41	1.30	0.668	1.023	200.20	146.60
	下	43.80	5.19	10.10	1.98	0.663	2.546	140.40	216.55
	平均	37.20	6.48	7.50	1.38	0.824	1.458	221.70	166.78
4	上	22.00	4.79	5.66	1.39	0.980	3.403	194.00	208.00
	中	31.00	5.05	8.77	2.81	1.356	2.380	254.00	310.00
	下	37.00	5.02	8.46	2.96	1.308	2.192	252.50	183.30
	平均	30.00	4.95	7.63	2.55	1.214	2.703	236.80	235.40
	上	27.00	5.90	7.27	1.04	0.930	2.498	171.90	165.50
20	中	31.65	6.05	7.96	1.56	1.120	2.242	314.50	219.70
	下	37.40	4.25	16.09	3.45	1.665	2.070	250.30	204.20
	平均	32.01	5.40	13.44	2.02	1.236	2.103	245.55	196.46
	上	31.77	5.85	7.50	2.46	1.320	5.476	278.00	371.00
	中	21.30	5.92	5.42	1.57	1.104	3.311	356.00	428.00
21	下	39.35	5.30	12.16	3.78	1.891	2.816	399.00	574.00
	平均	30.81	5.69	8.49	2.60	1.438	3.867	344.30	457.60
老窖	平均	32.18	5.41	7.97	2.39	1.152	2.187	250.77	240.45
新窖	平均	24.76	6.15	4.42	0.36	0.532	0.288	99.80	65.64

表 8 老窖、新窖的酒质分析^[2] (mg/100 mL)

老窖窖号	层次	己酸 乙酯	乳酸 乙酯	异戊醇	丁酸 乙酯	正丁醇	异丁醇	乙缩醛	正丙醇	乙酸 乙酯	乙醛
18 和 26	上	103.24	196.76	53.17	18.94	9.74	14.16	30.96	24.29	142.93	26.13
	中	207.31	227.15	116.21	22.18	5.11	3.93	22.24	7.27	106.52	18.29
	下	374.71	244.00	66.36	23.58	7.70	15.06	36.97	14.56	105.96	17.90
	平均	224.32	222.64	56.22	21.57	7.58	11.75	24.34	14.88	118.47	20.99
20 和 22	上	140.03	113.13	35.74	16.26	25.52	3.88	22.32	9.58	76.91	44.11
	中	187.32	129.03	37.13	43.79	5.24	6.22	43.66	8.52	157.27	57.14
	下	359.32	222.89	45.08	22.66	4.83	19.55	35.56	13.38	128.05	27.29
	平均	246.25	155.02	43.07	27.57	16.24	9.41	36.12	11.32	120.50	45.44
21	上	187.04	117.69	33.15	28.35	3.51	3.94	13.41	8.89	116.82	57.09
	中	191.33	142.36	22.09	34.19	7.05	2.81	10.58	5.84	66.47	54.78
	下	299.06	248.39	10.47	61.99	42.14	1.80	41.83	12.78	154.58	18.16
	平均	216.33	159.29	23.44	38.86	14.39	2.98	15.75	6.59	107.13	46.60
新窖 1	混样	93.83	296.94	63.41	7.23	4.43	2.84	20.31	9.95	81.53	15.62
新窖 2	混样	97.29	215.39	29.64	25.67	20.49	4.95	32.67	20.41	105.36	15.91

泥黄水中主要功能菌的富集培养——固定化技术在浓香型大曲酒生产中的应用。

5.2 窖泥微生物群落的生态化学环境的模拟——人工窖泥配方

5.2.1 主要原料

优质黄泥 :选粘性强的黄泥 ,黄泥颜色以偏浅为宜 ,以免铁离子偏多。窖皮泥 :窖皮泥长期与母糟、窖边接触 ,含有大量酿酒功能菌 ,起到接种的作用。老窖泥 :老窖泥中含有大量驯化的梭状芽孢杆菌。优质黄水 :优质黄水中含有丰富的微生物种群及营养物质 ,有利于窖泥中的有益微生物生长和利于新窖泥老熟。曲粉 :曲药含有酵母菌、霉菌、细菌 ,提供了酿酒所需要的多种微生物混合体系和微生物生长繁殖的营养物质。优质酒糟 :以正常发酵的底糟或双轮底糟为宜 ,对微生物适应窖内生长起引导作用和引入酿酒优势功能种群的作用。泥炭 :提供窖泥微生物群落生存环境及保持水分。

5.2.2 人工窖泥的培养条件

水分控制在 40 %左右 ,温度控制在 30~37 ℃ ,冬季可增加保温措施 ,最好选在夏季为宜 ,pH 值 6.5~7.0。营造和维护厌氧微生物生长的厌氧环境。培养时间 30 d 左右。

5.2.3 (人工)窖泥质量标准(见表 9 ,表 10)

由于新建泥窖中的微生物群落需要新的生态化学环境中驯化和适应 ,也就是一个自然老熟过程 ,因此一般需要一定年限以上才能生产优质白酒。这仅就窖泥而论 ,而就中国白酒产业而言 ,应属于地域资源型产业 ,

表 9 感官指标

项目	指标要求
色泽	灰褐色 (或灰黑色) ,无黄泥色
气味	有酯香 ,有较浓的老窖泥气味且持久
手感	柔熟细腻 ,无刺手感 ,均匀

表 10 窖泥理化及微生物指标

项目	指标要求
水分 (%)	38~42
腐植酸	>14
氨基氮 (mg/100g 干土)	>140
有效磷 (mg/100g 干土)	>800
细菌 (万个/g)	≥60
芽孢杆菌 (万个/g)	≥60

天赋的地域资源即水、土、气(候)(空)气、生(物)组成的生态系统以及当地祖祖辈辈所形成的传统技艺 ,才是中国白酒形成自己独特风格的重要基石。

参考文献 :

[1] 张全屯 ,等.应用生态学(第 1 版)[M].北京 :科技出版社 ,2004.

[2] 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.

[3] 杨鹏举.窖泥微生物菌群及其代谢模式[J]酿酒科技 ,1995 , (2) :14~15.

[4] 詹炳跃.窖泥的分析和窖泥质量的评定[J]酿酒 ,1986 (3) :33~34.

[5] 胡永松 ,等.微生物与浓香型大曲酒生产技术[M].四川省科委星火培训教材 ,1985.

[6] 胡永松 ,等.固定化技术在浓香型大曲酒生产技术中的应用[Z]四川省科委鉴定成果 ,1994.