

酱香型白酒发酵过程微生物生态调控及品质提升关键技术与应用

摘要:创制基于工艺优化和酿造微生物生态调控的关键发酵技术,从而提升基酒品质、提高生产的稳定性和效率,对推动酱香型白酒高品质酿造具有极为重大的应用意义和价值。
关键词:酱香型白酒、堆积发酵、体系构建、推广应用

贵州国台酒业集团股份有限公司 天津科技大学

尽管当前酱香型白酒在酿造过程中微生物多样性、演替动态规律、功能解析等方面已取得了显著的研究成果,但是,复杂的关联分析不等于白酒酿造实际发生过程,缺乏从分子生态学的角度对菌群中微生物间互作网络关系及主要代谢产物关联机制的研究,无法全面、精准、科学地阐明酱香型白酒高品质酿造背后的科学机制。

因此,利用微生物多样性分析、宏代谢组、宏基因组、宏转录组联用技术,从基因-微生物-菌群-微生物多个尺度阐明传统自然生态酿造的菌群互作机制、协同发酵的内在推动力及关键控制要素,挖掘高品质酿造过程中的核心功能微生物菌种资源。

在此基础上,创制基于工艺优化和酿造微生物生态调控的关键发酵技术,从而提升基酒品质、提高生产的稳定性和效率,对推动酱香型白酒高品质酿造具有重大意义和价值。

1. 项目目标与考核指标

以出产酱香典型体的四轮次发酵过程为研究对象,选取基酒品质具有显著差异的车间,联合微生物多样性分析、代谢组学、宏基因组学、宏转录组学技术,研究各阶段微生物及其代谢产物组成及变化动态特征,从基因水平和转录水平研究整个发酵过程核心微生物的代谢通路,并利用统计学及生物信息学手段构建基因-微生物-功能代谢产物-环境因子的网络关系模型,揭示功能微生物代谢途径与主体风味、重要功能物质产生和累积之间的关联机制。

通过对比分析,剖析优质酒率较高车间与普通车间酿造过程中微生物生态变化的异同点,进而阐明造成基酒品质差异的微生物基础,建立酱香型白酒酿酒过程微生物生态标准评价体系。探究封窖泥隔离工艺对酱香型白酒酿造微生物生态和基酒风味的影响,进而为改进封窖工艺提供理论支撑。在此研究基础上,对发酵各阶段的优势功能微生物进行特异性筛选,并全面分析其生理代谢特性,建立基于工艺优化和微生物生态调控的关键发酵调控技术,实现稳产提质的目标。

2. 项目进展情况

2.1 主要完成研究内容

2.1.1 不同品质酱香型基酒酿造微生物生态演替规律差异解析

通过微生物多样性及宏组学分析,阐明酱香型白酒四轮次发酵过程中微生物种群动态演替变化规律是由堆积

发酵阶段以酵母菌主导,逐渐转变为窖池发酵阶段以乳杆菌为主导的协同自然发酵过程。堆积阶段,酿酒酵母、库德里亚兹毕赤酵母、拜尔结合酵母、粟酒裂殖酵母、乳杆菌和芽孢菌是主要微生物,这些微生物在不同品质车间的组成情况差异显著。在优质酒得率更高的车间,库德里亚兹毕赤酵母、拜尔结合酵母、酿酒酵母、粟酒裂殖酵母是堆积发酵微生物的主体优势菌群,而在普通车间,堆积发酵微生物中的乳杆菌、芽孢菌占据绝对主体优势地位。窖池发酵阶段初期,优势菌群种类没有变化,但是丰度比例发生改变,酵母菌丰度减少,乳杆菌丰度增加,这一阶段,不同品质车间差异物种为拜尔接合酵母和粟酒裂殖酵母,它们在优质酒率更高的车间丰度显著高于普通车间。

虽然在窖池发酵结束时乳杆菌和粟酒裂殖酵母成为绝对优势物种,但优质酒率更高车间的粟酒裂殖酵母丰度远高于普通车间。酿造微生物“菌系”差异特征表明,堆积发酵结束是不同品质车间物种差异最大的发酵关键节点,是调控发酵品质的切入点。

利用GC-MS的代谢组学分析手段明晰了酯类物质是发酵过程的主要微量挥发性风味化合物,其中,棕榈酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯、己酸乙酯、乳酸乙酯是主要的酯类物质。基于18种“标签”微量挥发性风味化合物建立了品质差异区分模型,己酸己酯、己酸戊酯、己酸己酯、己酸丙酯等己酸酯在优质酒得率更高车间丰度较高,而长链脂肪酸酯,如油酸乙酯、棕榈酸乙酯等在普通车间含量突出。因此,中短链脂肪酸酯和长链脂肪酸酯是基于风味导向的关键调控靶点。

2.1.2 传统酱香型白酒酿造微生物标准体系构建

传统发酵酒醅微生物生态研究表明,从堆积发酵到窖池发酵过程中,主体优势菌群的切换是提高优质酒得率的必要保障。四轮次堆积结束时,酵母菌与细菌比例应不低于10:1,随着发酵进行,入窖7天后完成优势菌群转换,细菌与酵母菌比例不低于2:1,出窖时,细菌以乳杆菌为主,真菌以粟酒裂殖酵母为主,且两者比例相当。

菌群的共生网络分析表明,酵母菌与乳杆菌之间存在协同发酵关系,但是与其他细菌竞争繁殖。此外,“菌系”与“物系”的关联分析表明,酵母菌、乳杆菌与中、短链脂肪酸酯正相关,而其他细菌对长链脂肪酸酯有贡献作用。因此,要提高优质酒率,就要确保堆积阶段酵母菌群的大量繁殖,控制细菌比例,特别是芽孢菌的丰度。发酵因子对菌群的驱动分析表明,芽孢菌生长繁殖受到水分和还原糖的正向调控,而总酸

和总氨基酸对酵母菌和乳杆菌有正向驱动作用。因此,可以通过调控酒醅水分和酸度来实现对菌群比例的定向调控,从而实现特异性靶向调控酿造微生物生态,提高基酒品质。

2.1.3 阐明竹席隔离封窖工艺对酿造微生物生态和窖面酒品质的影响

采用封窖泥隔离工艺后,酒醅细菌群落仍是由耐高温细菌逐渐演替为乳杆菌为绝对优势的组成体系,芽孢菌作为发酵前期主要的细菌。而真菌群落依旧是由霉菌逐渐演替为毕赤酵母为绝对优势的组成体系,嗜热子囊菌属、曲霉属、红曲霉是发酵前期主要的霉菌。由此可见,竹席隔离窖泥工艺不会显著影响酿酒过程微生物菌群结构和演替变化规律,但发酵酒醅中泥臭味潜在来源物质4-甲基苯酚被消除且基酒中丁酸含量显著下降,提高了基酒酒体的纯净度与品质。

2.1.4 酱香型白酒酿造微生物菌种资源库的建立及功能微生物发酵性能评估

从酱香型白酒制曲和酿酒过程中,共筛选、鉴定到240株酵母、25株乳酸菌和112株芽孢杆菌,通过生长特性、产酶性能、产香特征以及模拟发酵分析,获得4株产酒、产香、耐受性好的功能酵母菌、3株产酸能力突出的乳酸菌,和4株产酶、产四甲基吡嗪能力优异的芽孢菌。该菌库的建立丰富了对白酒酿造微生物的认识,为基于功能菌剂的微生物生态调控关键技术的创制提供了资源保障。

2.1.5 酱香型白酒重要功能酵母耐酸机制分子基础解析

宏基因组和宏转录组证实粟酒裂殖酵母是酿酒过程中重要的功能酵母,在酿酒协同发酵过程中发挥着主导作用,而粟酒裂殖酵母的耐酸发酵性能是其行使主导功能的基础。本项目通过比较组学重点解析了粟酒裂殖酵母的耐酸调控机制,阐明了其对酒醅中乙酸、乳酸胁迫的特征性响应,鉴定了3个新型耐酸调控元件,并首次阐明细胞膜微结构对细胞耐酸性能的调控机制。

2.1.6 提质稳产关键发酵调控技术的创建与应用

竹席隔离窖泥的封窖工艺应用于窖面酒生产过程,2019年~2021年累计新增窖面酒产能253.3吨,为封窖工艺的改进提供了实践和理论支撑。利用构建的酱香型白酒酿造微生物菌种库,基于酱香型白酒酿造微生物评价体系,通过工艺优化和“本土”菌剂的联合应用,建立了基于功能菌剂的微生物生态调控关键技术,如枯草芽孢杆菌M2分别以菌种强化(与传统大曲协同发酵)、工艺优化(用头尾酒浸提后串蒸)、菌种强化结合工艺优化这三种方式应用于五

轮次窖面酒的生产中,四甲基吡嗪含量分别提高了160%、86%、203%,基酒在曲香特征和整体风格上均优于传统生产的基酒。高耐受性粟酒裂殖酵母和库德里阿兹威氏毕赤酵母应用于七轮次基酒发酵过程中,原料利用率提升了12%~15%,基酒中乙醇含量提升13%~21%,风味酯含量提高了20%~27%,高级醇降低53%~65%。功能菌剂的应用可以达到稳定生产,提升基酒产量和品质的目的。

2.2 解决的关键问题及创新点

本研究解决的关键问题如下:

本项目针对酱香型白酒酿酒过程中微生物判定标准不清、不同车间生产品质不稳定等共性问题,有针对性地完成了以下关键技术研究:

(1)利用微生物多样性分析,明确了菌群组成、多样性、演替速率对基酒品质的影响。利用多组学联用技术,建立传统酱香型白酒酿造微生物生态标准评价体系,确定了菌群比例控制参数。明确了堆积发酵结束是不同品质车间物种差异最大的发酵关键节点,是调控发酵品质的切入点。阐明了酵母菌菌群组成比例差异是基酒品质不同的主要微生物因素,明确了粟酒裂殖酵母是关键生物调控因子。

(2)通过比较代谢组技术,基于不同品质酿造车间酿酒过程中微量挥发性物质差异特点,建立了品质差异区分模型,有助于酿酒过程中发酵品质的科学评判。同时,通过溯源分析,确定了影响差异微量挥发性物质积累的微生物种群,为特异性靶向风味调控提供了理论依据。

(3)明确了酿酒过程中酵母菌、乳杆菌、芽孢菌等重要功能菌群生长、演替的发酵环境驱动因子,为调控酱香型白酒酿酒过程微生物生态提供了理论依据。

(4)明确了竹席隔离封窖泥不会对酿造微生物组成及演替规律造成显著影响,却可以有效降低酒醅和基酒中泥臭味物质的浓度,可显著提升基酒品质和合格率,为封窖工艺的优化革新提供了理论支持和实践证明。

(5)建立了酱香型白酒微生物生态调控关键发酵技术,遵循“内寻外加、自然强化”的设计原则,核心功能微生物适度干预白酒酿造过程,一方面加强酿造体系对外界环境变化的抗干扰性能,一方面强化风味物质含量,优化其组成,从而提升基酒生产的稳定性和品质。

本研究的创新点如下:

(1)采用分子生态学分析技术,解析了酱香型白酒不同品质酿造车间微生物演替变化规律特征差异,利用多组学联用技术全面系统地阐明了不同车间酿酒过程中微生物菌群组成种类、含量变化规律以及差异特征。基于基因-细胞-环境多个维度的关联分析,解析了造成不同车间基酒品质差异的微生物基础,阐明了粟酒裂殖酵母和醋酸乳杆菌是协同发酵过程中的主导微生物,是重要的微生物监控指标,可用于科学评价发酵过程品质,为酱香型白酒品质控制提供了新的微生物监控指标。

(2)鉴定获得18种造成酿造品质差异的关键挥发性微量风味物质,剖析了差异性挥发性微量成分随发酵进程的变化规律,阐明了其与酿造微生物种群中的微生物种群的关联机制,解析了差异微量挥发性风味物质对酱香型白酒发酵品质的影响规律,为酱香型白酒酿造过程品质控制提供了新的判定依据。

(3)筛选获得一株能够耐受20g/L乙酸的粟酒裂殖酵母(保藏编号CGMCC No.21791),为目前报道乙酸耐受能力最高的酵母菌株,并首次阐明其细胞膜亚结构Eisosome与细胞耐酸性能的关联机制,丰富了对酿造功能微生物耐酸调控机制的认识。

(4)基于粟酒裂殖酵母、库德里阿兹威氏毕赤酵母、枯草芽孢杆菌等功能微生物,建立了微生物生态调控关键发酵技术,在提高原料利用率和基酒产量的同时,增加基酒有益成分,减少了基酒中的有害成分,为酱香型白酒品质的提升提供了新策略。

3. 成果推广应用前景

本项目全面、系统地阐明了酱香型白酒不同酿造品质车间的微生物协同发酵机制及差异特征,确定了影响基酒品质的差异风味物质和协同发酵中的主导微生物,建立了酱香型白酒酿造微生物生态标准评价体系的科学化、数字化品质表达奠定了理论基础。同时,阐明了封窖泥隔离技术对酿造微生物生态及窖面酒品质的影响,为封窖工艺的优化升级提供了理论基础和实践证明。

本项目所建立的竹席隔离封窖工艺可显著提升窖面酒产量(合格率),近3年累计新增窖面酒产能253.30吨,新增产值2263.76万元;基于酱香型白酒酿造微生物菌种资源库建立的微生物生态调控关键技术,可以显著提高原料利用率12%~20%,基酒中乙醇含量提高20%以上,高级醇含量降低46%~53%,风味酯含量提升8%~21%,不仅提升了原料的利用率,还提高了优质品率。

此外,所开发的基于耐酸酵母的关键发酵调控技术,还可以作为应急储备技术,应对外界异常天气变化对生产的影响,对企业具有重要的应用价值。