

徐相辉, 常强, 孙伟, 等. 文王浓香型白酒不同深度新老窖泥理化性质与微生物演替分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 129-136. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020052

XU Xianghui, CHANG Qiang, SUN Wei, et al. Analysis of Physicochemical Properties and Microbial Succession of Wenwang Chinese Strong-flavor Baijiu at Different Depths in Old and New Pit Muds [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 129-136. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020052

· 生物工程 ·

文王浓香型白酒不同深度新老窖泥理化性质 与微生物演替分析

徐相辉¹, 常强², 孙伟², 许姗姗¹, 许博阳¹, 穆冬冬¹, 吴学凤¹, 李兴江^{1,*}

(1.合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230601;

2.安徽文王酿酒股份有限公司, 安徽临泉 236400)

摘要:目的: 本研究分析了新窖(3年)和老窖(30年)不同深度窖泥(Pit Mud, PM)的有机酸和微生物群落结构关联度, 以期了解窖泥在垂直维度的老化成熟规律。方法: 基于 Illumina MiSeq 高通量测序分析窖泥微生物群落结构演替规律, 结合相关性分析有机酸与微生物的作用规律。结果: 垂直维度窖泥深层(4~10 cm)和浅层(0~4 cm)存在明显差异, 老窖池浅层窖泥中的主要微生物属是 *Caproiciproducens*, 深层窖泥中 *Fastidiosipila* 和 *Hydrogenispora* 占据主导; 而在新窖泥中, 浅层和深层窖泥中占据主导的均是 *Lactobacillus*、*Bacillus* 和 *Clostridium sensu stricto* 12, 且相对丰度随窖泥深度的增加而增加。理化因子方面, 新老窖池浅层窖泥与水分、己酸、丁酸、乳酸、乙酸和腐殖质的含量呈正相关, 深层窖泥与氨态氮、有效磷和 pH 的含量呈正相关。有机酸和微生物的相关性分析发现, 老窖池中 *Caloramatoraceae* 与有机酸含量呈正相关, 新窖池中 *Lactobacillus* 和 *Hydrogenispora* 与有机酸含量呈正相关, *Caproiciproducens* 与新老窖池有机酸含量均呈正相关。结论: 本文探究了新老窖泥垂直维度的原核生物群落结构演替及其与理化因子的关联, 为窖泥养护和窖池微生物群落的成熟和稳定提供了参考。

关键词:窖泥, 垂直维度, 浓香型白酒, 有机酸, 窖泥养护, 微生物群落结构

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)21-0129-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020052



本文网刊:

Analysis of Physicochemical Properties and Microbial Succession of Wenwang Chinese Strong-flavor Baijiu at Different Depths in Old and New Pit Muds

XU Xianghui¹, CHANG Qiang², SUN Wei², XU Shanshan¹, XU Boyang¹, MU Dongdong¹,
WU Xuefeng¹, LI Xingjiang^{1,*}

(1.School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China;

2.Anhui Wenwang Brewery Co., Ltd., Linquan 236400, China)

Abstract: Objective: The correlation degree between organic acids and microbial community structure of pit mud (PM) with different depths in new PM (3 years old) and old PM (30 years old) was analyzed in order to understand the aging and maturation rule of PM in vertical dimension. Methods: Illumina MiSeq high-throughput sequencing was used to analyze the succession of microbial community structure in PM, and the interaction between organic acids and microorganisms was analyzed by correlation analysis. Results: There was a significant difference between the deep (4~10 cm) and shallow (0~4 cm) layers of pit mud in the vertical dimension. *Caproiciproducens* occupied the dominant position in shallow pit mud of old pit

收稿日期: 2022-02-11

基金项目: 安徽省重大科技专项(201903a06020034; 201903a06020007); 合肥工业大学“十四五”科技创新培育重点专项(PA2021KCPY0048); 安徽省自然科学基金(2108085MC123)。

作者简介: 徐相辉(1996-), 男, 硕士, 研究方向: 发酵工程, E-mail: xuxianghui1996@mail.hfut.edu.cn。

* 通信作者: 李兴江(1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品发酵, E-mail: lixingjiang1978@hfut.edu.cn。

cellar, while *Fastidiosipila* and *Hydrogenispora* occupied the dominant position in deep pit mud. In the new pit mud, *Lactobacillus* played a dominant role in both shallow and deep pit mud. The relative abundance of *Bacillus* and *Clostridium sensu stricto* 12 increased with the increase of pit mud depth. The shallow pit mud was positively correlated with water, acetic acid, hexanoic acid, lactic acid, butyric acid and humus, while the deep pit mud was positively correlated with NH_4^+ -N, available phosphorus and pH. Correlation analysis of organic acids and microorganisms showed that *Caloramatoraceae* was positively correlated with organic acid synthesis in the old pit cellar. *Lactobacillus* and *Hydrogenispora* in the new pit were positively correlated with organic acid synthesis. *Caproiciproducens* was positively correlated with organic acid content in new and old cellars. Conclusion: The results of this study can clarify the prokaryotic community structure and physicochemical factors of vertical dimension of pit mud in the bottom of new and old pit mud, and provide reference for guiding the maturation and stability of pit mud.

Key words: pit mud; vertical dimension; Chinese strong-flavor baijiu; organic acids; pit mud maintenance; microbial community structure

白酒根据风味特点的不同可分为12种香型,其中浓香型白酒的产量占酒类行业的70%以上,是中国主要的白酒消费品^[1-2]。浓香型白酒采用传统的固态发酵工艺,以高粱、小麦、玉米、糯米和大米为原料,稻壳为疏松剂,以中温大曲为发酵剂在泥窖中发酵60~90 d后蒸馏制得^[3]。酒窖底部和侧面均覆盖有窖泥,独特的泥窖发酵工艺赋予了浓香型白酒窖香浓郁,绵甜爽净的特点。大量研究表明,窖泥的稳定和成熟度与浓香型白酒的品质和特征紧密相关,实际生产中也发现“老窖产好酒”。窖泥的成熟是一个长期驯化的过程,新窖泥到成熟稳定状态的老窖泥要经历初驯期、过渡期和成熟期三个阶段,需要较长的时间才能完成成熟转换^[4]。

浓香型白酒的发酵过程涉及大曲、环境和窖泥多种微生物^[5-6],也是微生物群落的演替以及各种微生物共生、共酵的过程。通过对糟醅微生物进行溯源分析发现,糟醅中的原核微生物主要来自窖泥。窖泥被认为是原核微生物的持续释放源,同时糟醅中的原核微生物在窖泥成熟和稳定中也扮演了重要角色^[7]。郑佳等^[8]研究发现,靠近窖泥的糟醅蒸馏得到的原酒挥发性风味物质含量更加丰富,窖池边缘的糟醅中己酸、丁酸以及它们对应的己酸乙酯、丁酸乙酯含量也高于同期窖池中间的糟醅。乳酸菌、芽孢杆菌等原核微生物产生己酸、丁酸、乙酸和乳酸等各种有机酸,作为酯类化合物的底物,参与了糟醅中风味化合物的形成^[9]。

相比于池壁,池底窖泥所处环境氧气更少,并长期浸泡在酸性的黄水中,窖泥微生物所处环境更为恶劣,因此对于窖泥理化与微生物的关联分析有助于进一步指导新老窖泥的养护。同时,窖泥的成熟是一个连续动态的过程,伴随着各类微生物的此消彼长。当前,连续的发酵以及不合理的养护容易造成窖泥板结和窖泥微生物衰亡,最终导致窖泥退化,生产出的白酒品质不佳。目前已有关于大曲和糟醅群落演替的研究^[10-11],也有对新窖泥前四轮次发酵的窖泥微生物演替分析^[12],而对于窖池垂直维度的微生物群落结构的解析和演替鲜有报道。本研究通过对安徽文王贡酒新老窖池不同深度的窖泥细菌微生物进行分析,理

清窖泥深度与其理化性质、有机酸含量和窖泥微生物菌群结构的相关关系,为窖泥的稳定成熟及窖池的养护提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本实验所用窖泥样品来自正常生产的安徽文王酿酒股份有限公司3年(new)和30年(old)窖池,采样点经纬度33°04'N; 115°15'E,采样时间为2020年12月。取样示意图如图1所示,从池底3个位置取样混合在一起进行分析,每个采样点分为0~2、2~4、4~6、6~8、8~10 cm 5层,新窖泥标注为new_02~new_810;老窖泥标注为old_02~old_810。将采集样品于均质袋中充分混匀后置于4℃和-80℃冰箱,分别用于理化测定和高通量测序分析。

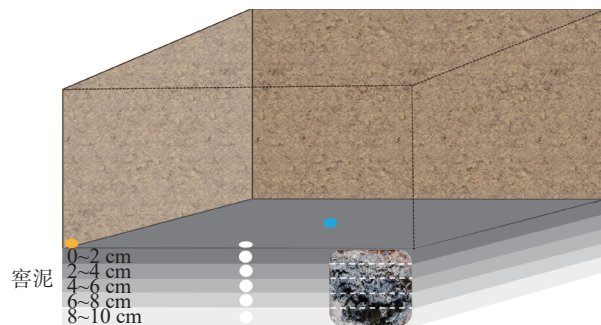


图1 窖泥样品取样位置示意图

Fig.1 Schematic diagram of sampling location of pit mud samples

氟化铵、盐酸、磷酸二氢钾、氯化铵、重铬酸钾、硫酸亚铁、酒石酸钾钠、抗坏血酸(均为分析纯)

国药集团化学试剂有限公司; 纳氏试剂 上海源叶生物有限公司; 氯化亚锡、钼酸铵 上海麦克林生化科技有限公司; 2-乙基丁酸 梯希爱(上海)化成发展有限公司; Fast DNA™ SPIN 试剂盒 美国 MP Biomedicals。

PHS-25 pH计 海力辰邦西仪器科技有限公司; UV-500 PC 紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司; 7890 A 气相色谱仪 安捷伦科技(中国)有限公司; 1525 型液相色谱仪 沃特世科技(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 窖泥理化性质分析 窖泥水分参考国标 GB 5009.3-2016 采用烘干法; pH 是将新鲜窖泥与去离子水按照 1:5 g/mL 混匀静置后用 pH 计检测^[13];有效磷参考地标 DB 34T 2266-2014, 采用氟化铵-盐酸比色法测定; 铵态氮根据纳氏试剂比色原理, 采用紫外分光光度法^[14]; 腐殖质参考地标 DB 34T 2265-2014, 采用重铬酸钾氧化法测定。

有机酸的测定均采用相同的前处理方法, 将新鲜窖泥与 15% 甲醇按照 1:9 g/mL 混匀, 超声处理 20 min 再次混匀, 8000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μm 有机滤膜过滤后测定有机酸。丁酸与己酸采用气相色谱内标法定量, 将前处理样品加 2-乙基丁酸作为内标, 色谱柱采用 DB-Wax(Agilent 30 m×0.25 mm), 进样量 1 μL, 柱流速 1 mL/min, 进样口温度 250 °C, 分流比 30:1。升温条件: 初始温度 35 °C, 2 °C/min 升温至 60 °C, 保持 4 min; 6 °C/min 升温至 195 °C, 保持 20 min。氢火焰离子检测器温度 250 °C^[13]。乙酸与乳酸的测定采用高效液相色谱法, 色谱柱采用 Ultimate LP-C₁₈(Welch 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 检测器采用 Waters 2996 二极管阵列检测器, 进样量 15 μL, 检测波长 210 nm。流动相: 磷酸二氢钾缓冲液(0.01 mol/L, pH2.50): 甲醇=95:5, 流速 0.6 mL/min。

1.2.2 窖泥微生物基因组的提取与高通量测序 将采集到的样品用自封袋分装后采用干冰转运, 委托上海美吉生物医药科技有限公司进行 Illumina MiSeq 高通量测序。窖泥微生物总基因组 DNA 采用 Fast-DNA™SPIN 试剂盒进行提取, 338F_(5'-ACTCCTAC GGGAGGCAGCAG-3') 与 806R_(5'-GGACTACH VGGGTWTCTAAT-3'), 扩增微生物 16S rRNA 基因的 V3~V4 区。

1.3 数据处理

原始测序数据采用 Flash(1.2.11)和 Fastp(0.19.6) 进行拼接和质控, 采用 Mothur(1.30.2)进行 α 多样性分析, 采用 QIIME 软件(V1.9.1)生成各分类学水平丰度表, β 多样性距离计算, 窖泥理化与样本和微生物

物之间的冗余分析(RDA)分析借助美吉生信云平台进行分析, 采用 SPSS 25 进行单因素方差显著性分析。

2 结果与分析

2.1 新老窖池窖泥理化性质分析

窖泥的理化如表 1 所示, 新老窖泥的含水量均随窖泥深度增加而降低, pH 随窖泥深度增加而升高, 除 new_02 窖泥含水量高于 old_02 外, 同一深度的老窖泥中水分含量和 pH 高于新窖泥, 该结果与前人研究相一致^[13]。表层窖泥含水量高、pH 低的原因可能是此部分窖泥与呈酸性的黄水直接接触, 含水量高的窖泥致密性更强, 厌氧效果也更好。老窖泥中的有效磷含量高于新窖泥, 老窖池中有效磷含量随窖泥深度增加先上升后下降, 新窖池中的有效磷含量随窖泥深度增加而增加。有效磷是微生物生长繁殖和代谢的必要元素, 但含量控制在一定范围(1.5~3.0 g/kg), 过高的浓度可能会导致窖泥板结, 影响窖泥微生物活动致使窖泥退化^[15], 本次检测的老窖池中有效磷含量适宜, 新窖池中含量偏低, 在新窖泥养护中应适量添加含磷介质。氨态氮的含量与窖泥质量呈明显正相关^[16], 在本文研究中发现老窖池中氨态氮含量远高于新窖泥, 老窖池不同深度的窖泥中含量差异不明显, 在新窖池中随窖泥深度增加而增加, 新窖泥在深层质量更好。腐殖质是由微生物分解有机质产生的, 其含量可以用于判断窖泥质量, 有学者对不同腐殖质含量的窖泥在实际生产中进行了验证, 发现窖泥腐殖质含量高低与所产的原酒中己酸乙酯含量有相关性^[17], 但在本研究中发现新老窖泥中腐殖质含量均随窖泥深度的增加而降低, 并且各层之间差异显著($P<0.05$)。这可能是由于表层窖泥微生物与有机质含量高糟醅直接接触, 代谢旺盛产生的, 而深层窖泥有机质含量较低。

窖泥中原核微生物可以产生各种有机酸。有机酸作为酯类物质的底物, 参与了糟醅中风味化合物的形成^[18]。己酸、丁酸、乳酸和乙酸是浓香型白酒典型风味物质己酸乙酯、丁酸乙酯、乳酸乙酯和乙酸乙酯的前体物质^[19]。随窖泥深度的增加, 有机酸的含量均

表 1 新老窖池池底窖泥理化性质

Table 1 Physicochemical properties of bottom pit mud from old and new pit cellar

样品名称	水分(%)	pH	有效磷(g/kg)	氨态氮(mg/kg)	腐殖质(%)	己酸(g/kg)	丁酸(g/kg)	乳酸(g/kg)	乙酸(g/kg)
old_02	35.58±2.99 ^a	5.25±0.66 ^c	2.00±0.46 ^b	12.67±2.88 ^{ab}	14.46±3.51 ^a	2.91±0.78 ^a	4.25±0.40 ^a	1.98±0.86 ^a	1.18±0.58 ^a
old_24	33.62±1.28 ^{ab}	8.41±0.53 ^b	2.68±0.86 ^{ab}	14.02±3.51 ^a	9.16±0.95 ^b	2.47±0.94 ^a	4.12±0.60 ^a	0.73±0.12 ^b	0.44±0.15 ^b
old_46	32.05±1.13 ^{bc}	9.1±0.22 ^a	3.52±1.31 ^a	12.85±1.17 ^{ab}	7.60±1.31 ^{bc}	1.71±0.34 ^b	3.70±0.24 ^b	0.43±0.04 ^b	0.17±0.02 ^b
old_68	31.74±2.96 ^{bc}	9.06±0.08 ^a	3.14±0.92 ^a	11.37±1.74 ^b	7.05±0.58 ^c	1.51±0.27 ^b	3.69±0.24 ^b	0.39±0.05 ^b	0.18±0.04 ^b
old_810	29.72±2.85 ^c	8.95±0.08 ^a	1.82±0.91 ^b	12.00±1.52 ^{ab}	4.93±1.25 ^d	1.37±0.22 ^b	3.60±0.19 ^b	0.32±0.04 ^b	0.15±0.03 ^b
new_02	35.86±1.69 ^a	3.92±0.10 ^c	0.56±0.09 ^d	4.62±0.18 ^{bc}	15.69±2.28 ^a	1.65±0.29 ^a	3.86±0.25 ^a	23.07±1.25 ^a	9.11±1.34 ^a
new_24	31.35±1.81 ^b	3.99±0.10 ^{bc}	0.64±0.05 ^{cd}	4.16±0.33 ^c	11.03±1.69 ^b	1.49±0.29 ^{ab}	3.91±0.25 ^a	18.22±1.95 ^{bc}	7.04±0.96 ^b
new_46	29.72±1.99 ^{bc}	4.04±0.09 ^b	0.71±0.07 ^{bc}	4.21±0.62 ^c	9.607±0.97 ^{bc}	1.37±0.36 ^{ab}	3.89±0.28 ^a	19.91±4.85 ^{ab}	7.34±1.79 ^b
new_68	28.37±2.62 ^c	4.06±0.10 ^b	0.76±0.05 ^b	5.45±1.50 ^{ab}	8.861±0.87 ^{cd}	1.29±0.30 ^b	3.78±0.21 ^a	14.73±4.10 ^{cd}	6.25±1.51 ^{bc}
new_810	28.43±2.19 ^c	4.22±0.12 ^a	0.87±0.16 ^a	5.92±0.77 ^a	7.882±1.19 ^d	1.32±0.26 ^{ab}	3.97±0.33 ^a	12.64±4.10 ^d	5.36±0.87 ^c

注: 同列不同小写字母表示同种窖池间显著性差异($P<0.05$); 表2同。

降低。相比于乳酸和乙酸,新老窖池中不同深度窖泥中己酸和丁酸含量差异不明显。根据 Zhou 等^[20]的研究,老窖池中有有机酸代谢的途径更为活跃,但新窖池中乳酸和乙酸含量明显高于老窖池,这可能与新窖池中 *Lactobacillus* 占据主导相关^[4],乳酸含量的高低可以作为窖泥成熟的判断标准。

2.2 窖泥中原核微生物 α 多样性指数分析

对所有测序序列进行过滤,30 个窖泥样品的平均长度为 416 bp。每个样本的读取次数从 33172 到 68678。在 97% 的水平,所有优质序列分成 4838 OTUs。样本中优质序列的覆盖率均大于 99%,说明细菌微生物群落具有较好的代表性。

如表 2 所示,Shannon 指数随窖泥深度增加而增加,Simpson 指数随窖泥深度降低,表明越深层窖泥微生物多样性越高;对比新老窖池发现,老窖池的微生物多样性更高。老窖池物种丰富度(Chao 指数、Ace 指数和 Sobs 指数)随窖泥深度增加,表层 0~4 cm 与深层 4~10 cm 存在显著差异($P < 0.05$);而新窖池表层 0~2 cm 物种丰富度最大,总体呈现先下降后上升的趋势,但各层间无显著性差异($P > 0.05$)。对比新老窖池的微生物丰富度可以看出,老窖池的层次较为分明,老窖池微生物丰度低于新窖池,这可能是超过 30 年的窖泥存在退化的原因^[21-22]。

从 α 多样性可以看出,窖泥微生物的多样性和丰度呈现出层次差异。如图 2 所示,对新老窖池不同深度窖泥微生物的物种多样性进行组间非度量多维排列(NMDS)比较分析表明,老窖池 0~4 cm 和 4~10 cm 深度的窖泥微生物更紧密地聚集在一起;新窖池呈现相似的规律,但新窖池 4~6 cm 更趋向于过渡阶段,在两个分组中均有出现。

2.3 窖泥中原核微生物门层面分析

如图 3A 所示,在老窖泥样品中微生物共检出 35 个门,有 18 个门在所有深度中均存在。如图 3B 所示,在新窖池中检测到 43 个门,有 21 个门在所有深度中均存在。如图 4 所示,老窖泥中占比最高的是厚壁菌门(Firmicutes, 78.25%),其次是拟杆菌门(Bacteroidota, 10.06%),占比超过 1% 的还有互养菌门(Synergistota, 4.02%)、Patescibacteria(2.4%)、

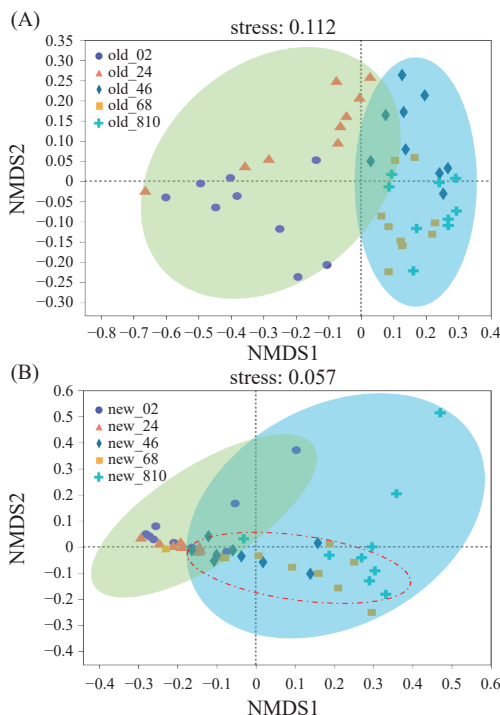


图 2 基于新老窖泥细菌群落 Bray-Curtis 相似性的 NMDS 排序

Fig.2 NMDS ordination based on Bray-Curtis similarities of bacterial communities at old and new PM

注: A 老窖池; B 新窖池。

Caldatribacteriota(1.45%)和放线菌门(Actinobacteriota, 1.31%)。新窖泥中占比最高的也是厚壁菌门(Firmicutes, 95.22%),其次是变形菌门(Proteobacteria, 2.43%)和放线菌门(Actinobacteriota, 1.75%)。随窖泥深度的增加,微生物的门类也相应增加。无论是老窖泥还是新窖泥,厚壁菌门始终在窖泥微生物群落中占据主导地位,该发现与前人研究相似^[7]。

2.4 窖泥中原核微生物属层面分析

对老窖池的 α 多样性检测发现,相比于新窖池,老窖池的微生物多样性更高。进一步对窖泥微生物群落属层面的分析也进一步验证了这一结论,丰度占比超过 0.01% 的微生物有 37 种,而新窖池相对丰度占比 0.01% 只有 16 种。如图 5A 所示,通过对比老窖泥不同深度的微生物占比发现, *Caproiciproducens*

表 2 新老窖池池底窖泥原核微生物群落 α 多样性指数

Table 2 α-Diversity index of prokaryotic community in pit mud from old and new pit cellar

样品名称	Sobs	Shannon	Simpson	Ace	Chao
old_02	178.33±26.95 ^b	1.91±0.08 ^b	0.39±0.02 ^a	222.64±46.92 ^b	229.74±46.96 ^c
old_24	176.33±49.46 ^b	2.44±1.24 ^{ab}	0.21±0.05 ^a	222.82±24.07 ^b	211.78±40.47 ^{bc}
old_46	255.67±16.34 ^a	3.11±0.54 ^{ab}	0.17±0.11 ^a	305.44±22.35 ^a	302.48±28.32 ^{ab}
old_68	266.00±17.80 ^a	3.62±0.23 ^a	0.07±0.02 ^a	360.51±23.93 ^a	330.10±17.20 ^a
old_810	294.67±13.10 ^a	3.88±0.03 ^a	0.05±0.01 ^a	355.05±17.86 ^a	353.38±27.86 ^a
new_02	306.11±53.75 ^a	1.76±0.64 ^{bc}	0.51±0.16 ^a	346.11±53.27 ^a	347.88±49.15 ^a
new_24	258.55±14.93 ^a	1.46±0.27 ^c	0.57±0.09 ^a	292.98±12.70 ^a	292.87±10.45 ^a
new_46	264.00±4.01 ^a	2.27±0.36 ^{abc}	0.33±0.10 ^{ab}	287.13±10.15 ^a	290.90±12.12 ^a
new_68	285.33±33.02 ^a	2.71±0.49 ^{ab}	0.22±0.12 ^b	303.55±36.15 ^a	305.92±35.01 ^a
new_810	306.78±18.04 ^a	3.02±0.36 ^a	0.17±0.10 ^b	331.19±18.38 ^a	333.47±15.13 ^a

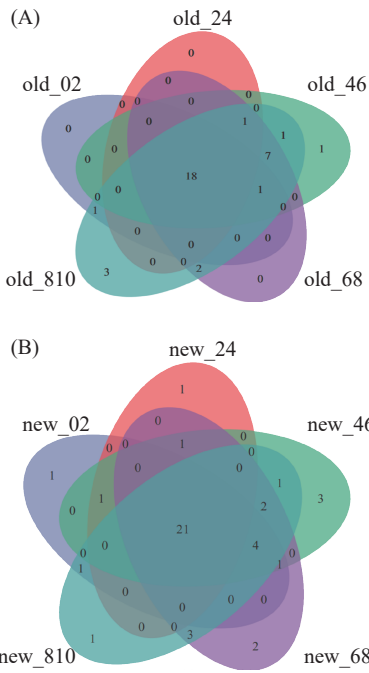


图 3 新老窖池不同深度窖泥微生物门水平 Venn 图
Fig.3 Venn diagram of different depths new and old PM at phylum level
注: A 老窖池; B 新窖池。

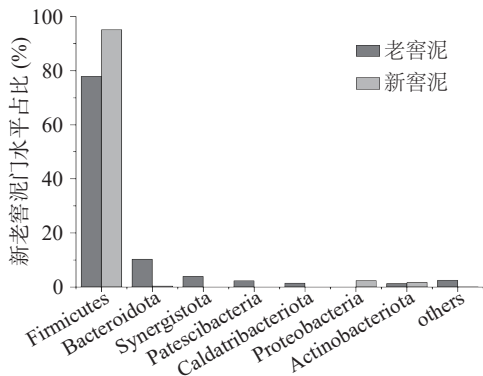


图 4 新老窖泥门水平物种占比情况
Fig.4 The proportion of microbial in old and new PM at phylum level

在浅层窖泥中占据主导地位, 深层窖泥中 *Fastidiosipila* 和 *Hydrogenispora* 占据主导。 *Caproiciproducens* 和 *Hydrogenispora* 是重要的酿造功能菌^[23]。 *Caproiciproducens* 占比随窖泥深度的增加而降低, 在表面 0~2 cm 的窖泥中占比最高为 41.29%, 而深层窖泥中占比却低于 1%, 与前人研究一致^[24]。 *Fastidiosipila* 属的微生物占比随窖泥深度增加先上升后下降, 在 4~6 cm 的中层占比最高为 23.9%。 *Hydrogenispora* 在 6~8 cm 窖泥中占比最高, 为 18.71%。 根据前人的研究, *Caproiciproducens* 和 *Hydrogenispora* 在窖泥成熟稳定中扮演重要的角色, 与乳酸呈负相关^[25]。 新窖池占比超过 0.01% 的微生物有 16 个属, 如图 5B 所示, 乳酸菌 (*Lactobacillus*) 在窖泥各个深度中所占比例最高, 在表层 2~4 cm 窖泥中所占比例最高 (74.7%), 但其占比随着窖泥深度的增加而下降。 芽孢杆菌 (*Bacillus*)、梭菌 (*Clostridium*

sensu stricto 12) 和 *Kroppenstedtia* 的随着深度的增加占比增加, 成为深层窖泥微生物的优势菌群, 这可能与深层窖泥的厌氧环境有关, 有利于芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌等专性厌氧微生物的生存。 在属水平上, 不同深度的微生物群落演替存在显著差异, 说明微生物群落在垂直方向上演替显著。

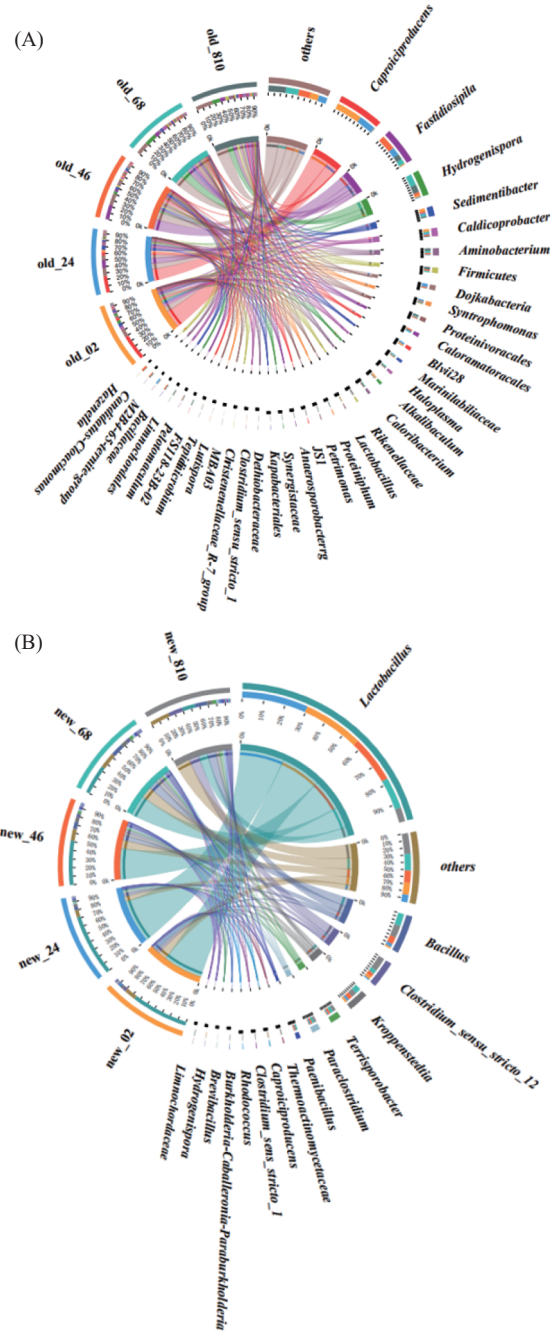


图 5 新老窖池窖泥样本与微生物菌群属水平 Circos 图
Fig.5 Circos diagram for microflora structure in PM samples of old and new pit cellar at genus level
注: A 老窖池; B 新窖池。

2.5 窖泥理化性质与微生物样本冗余分析

如图 6 所示, RDA 的结果分别解释了老窖池 54.00% 和新窖池 57.21% 样本与微生物理化的关系, 新老窖池不同深度样品对应的理化具有相似分布情况。 新老窖池中浅层窖泥 (0~4 cm) 与理化因子

水分、己酸、丁酸、乳酸和乙酸和腐殖质正相关, 深层窖泥(4~10 cm)与理化因子氨态氮、有效磷和 pH 正相关。这一发现与陶勇^[26]对 2~50 年不同窖龄窖泥与理化因子的相关性中有效磷、pH 和氨态氮对微生物群落结构影响相同。不同的是, 老窖池浅层窖泥与微生物 *Caproiciproducens* 正相关, 能够促进己酸的产生。有研究表明, *Caproiciproducens* 随窖龄增加其相对丰度增加^[19, 27]。深层与微生物 *Fastidiosipila* 和 *Hydrogenispora* 正相关。新窖池浅层窖泥与微生物 *Lactobacillus* 正相关, 深层窖泥与微生物 *Bacillus* 和 *Clostridium sensu stricto* 12 正相关。根据对窖泥微生物的研究, 这两类微生物参与窖泥的老化成熟^[28]。

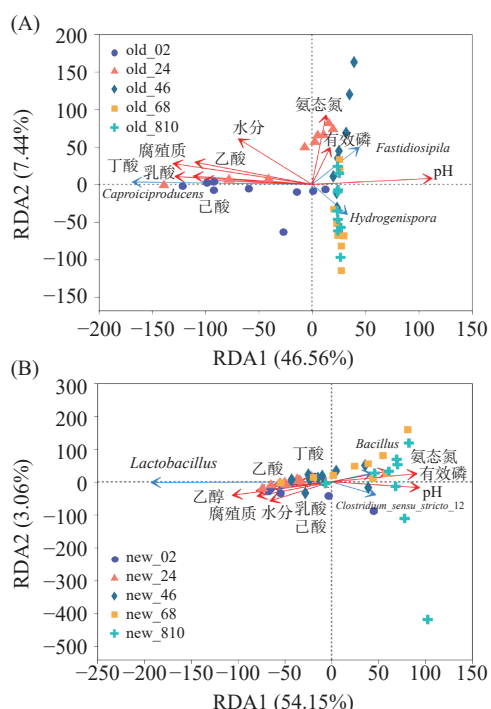


图6 窖泥理化指标和微生物群落样本冗余分析
Fig.6 Redundancy analysis of physicochemical indexes and microbial community in pit mud
注: A: 老窖池; B: 新窖池。

2.6 有机酸与窖泥微生物相关性分析

浓香型白酒有机酸中, 己酸、丁酸、乳酸和乙酸构成总酸的 90% 以上^[29]。窖池中产生有机酸的微生物主要来自窖泥, 为了揭示窖泥中产生有机酸微生物, 本文用热图展现了有机酸与相对丰度排名前 20 的微生物属间的 Spearman 相关系数。从图 7A 可以看出, 老窖池中微生物聚为 2 类, 其中 *Caproiciproducens*、*Caloramatoraceae* 与四种有机酸呈正相关, 为老窖池中有有机酸合成关键微生物。与己酸合成正相关的微生物有 4 种, 分别是 *Caproiciproducens*、*Caloramatoraceae*、*Caldicoprobacter* 和 *Caloribacterium*。如图 7B 所示, 新窖池中与有机酸相关的微生物同样聚为 2 类, 其中 *Lactobacillus*、*Caproiciproducens* 和 *Hydrogenispora* 与除丁酸外的有机酸呈正相关, 是新窖池中主要有机酸合成的关键微生物。

Caproiciproducens 主要代谢产物为己酸、丁酸、乙酸和氢气^[27, 30], 在老窖池中均参与有机酸的生成。

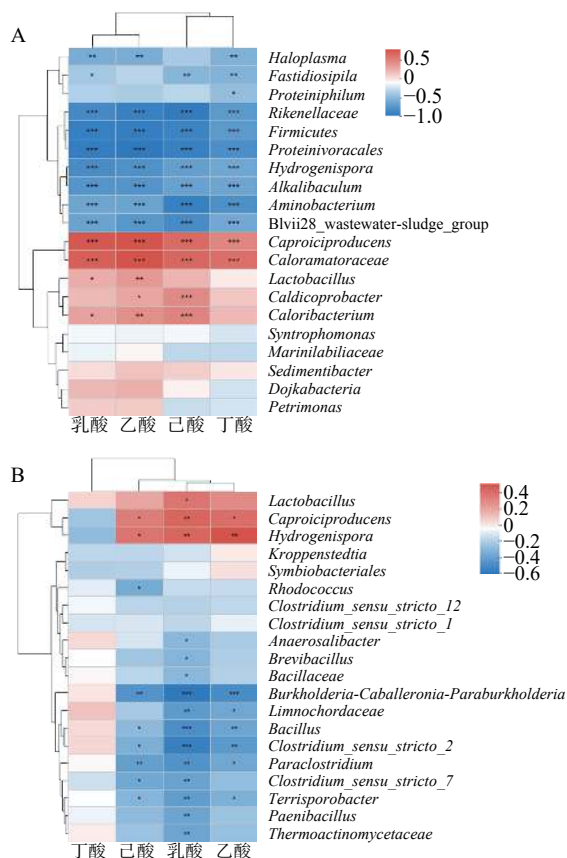


图7 窖泥有机酸与微生物相关性热图
Fig.7 Heatmap of correlation between pit mud organic acid and microorganism
注: A: 老窖池; B: 新窖池。

3 结论

本研究采用 Illumina MiSeq 高通量测序分析了 3、30 年新老窖池不同深度窖泥的原核微生物群落演替, 结合理化相关性分析, 得出结论: 新老窖池理化存在显著差异, 老窖池中水分、pH、有效磷、氨态氮含量普遍高于新窖池; 新窖泥中乳酸和乙酸含量明显高于老窖泥, 乳酸含量的高低可以成为成熟窖泥的评价指标。新老窖池微生物存在显著差异, 老窖池的微生物多样性更高而丰富度低, *Caproiciproducens*、*Fastidiosipila* 和 *Hydrogenispora* 是老窖泥中的优势微生物, *Lactobacillus*、*Bacillus* 和 *Clostridium sensu stricto* 12 是新窖泥的优势微生物。垂直维度存在明显群落演替。深度 4 cm 是区分表层深层的分界线; 随窖泥深度的增加, *Fastidiosipila* 和 *Hydrogenispora* 成为老窖泥中优势微生物, *Bacillus* 和 *Clostridium sensu stricto* 12 成为新窖泥的优势微生物。新老窖池理化关联分析具有相似性, 新老窖池深层窖泥与理化因子氨态氮、有效磷和 pH 均呈正相关; 新老窖池有机酸关联分析具有差异性, *Caproiciproducens*、*Caloramatoraceae* 是老窖池中有有机酸合成关键微生物, *Lactobacillus*、*Caproiciproducens* 和 *Hydrogenispora* 是新窖池中主要有机酸合成的关键微生物。

综上,本研究系统测定了垂直维度不同深度新老窖池池底窖泥的理化与微生物菌群结构,首次提出 4 cm 是区分窖泥深浅的分界线,并通过冗余分析阐明了不同深度样本与理化因子的相关性,并与有机酸进行关联,找出了与有机酸生成相关的微生物,丰富了新老窖泥在垂直维度上的研究,对于指导窖泥养护和科学研究采样具有一定现实意义。

参考文献

- [1] XU Y, SUN B, FAN G, et al. The brewing process and microbial diversity of strong flavour Chinese spirits: A review[J]. *Institute of Brewing & Distilling*, 2017, 123(1): 5–12.
- [2] XU Y, WANG D, FAN W L, et al. Traditional Chinese biotechnology[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2010, 122: 189–233.
- [3] JIN G, ZHU Y, XU Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 63: 18–28.
- [4] TAO Y, LI J, RUI J, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2254–2260.
- [5] WANG X, DU H, ZHANG Y, et al. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(4): e02369–17.
- [6] ZOU W, ZHAO C, LUO H. Diversity and function of microbial community in Chinese strong-flavor baijiu ecosystem: A review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 671.
- [7] TAO Y, WANG X, LI X, et al. The functional potential and active populations of the pit mud microbiome for the production of Chinese strong-flavour liquor[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1603–1615.
- [8] 郑佳, 杨康卓, 张建敏, 等. 浓香型白酒窖泥香气成分的空间分布规律[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(1): 11–15. [ZHENG J, YANG K Z, ZHANG J M, et al. Spatial distribution of aroma compounds in pit mud of strong-flavor baijiu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(1): 11–15.]
- [9] 刘凡, 周新虎, 陈翔, 等. 洋河浓香型白酒发酵过程酒醅微生物群落结构解析及其与有机酸合成的相关性[J]. *微生物学报*, 2018, 58(12): 2087–2099. [LIU F, ZHOU X H, CHEN X, et al. Analysis of microbial community structure in fermented grains and its correlation with organic acid synthesis during fermentation of Yanghe Luzhou-flavor liquor[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(12): 2087–2099.]
- [10] XIAO C, LU Z M, ZHANG X J, et al. Bio-heat is a key environmental driver shaping the microbial community of medium-temperature Daqu[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(23): 01550–01557.
- [11] TAN Y, ZHONG H, ZHAO D, et al. Succession rate of microbial community causes flavor difference in strong-aroma Baijiu making process[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 311: 108350.
- [12] LIU M K, TANG Y M, GUO X J, et al. Structural and functional changes in prokaryotic communities in artificial pit mud during Chinese Baijiu production[J]. *Msystems*, 2020, 5(2): e0082919.
- [13] 张会敏, 孟雅静, 王艳丽, 等. 浓香型白酒窖池分层分位点池底窖泥 pH 值、主要有机酸与钙、镁离子之间的相关性分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(19): 90–97. [ZHANG H M, MENG Y J, WANG Y L, et al. Correlation analysis between pH, major organic acids, calcium and magnesium ions of stratified bottom-pit-mud from Chinese strong-flavor Baijiu pit[J]. *Food Science*, 2020, 41(19): 90–97.]
- [14] 沈怡方. 白酒生产技术全书 [B]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. [SHEN Y F. Complete book of liquor production technology[B]. Beijing: China Light Industry Press, 1998.]
- [15] 李学思, 李绍亮, 曹振华, 等. 宋河酒业不同窖龄窖泥中理化指标的变化及其相关性分析[J]. *酿酒*, 2018, 45(5): 38–42. [LI X S, LI S L, CAO Z H, et al. Changes and correlation analysis of physical and chemical indexes in pit mud of different ages in songhe wine industry[J]. *Wine Making*, 2018, 45(5): 38–42.]
- [16] 朱莉莉, 罗惠波, 黄治国, 等. 浓香型白酒窖泥质量评价理化指标的筛选[J]. *中国酿造*, 2018, 37(12): 33–39. [ZHU L L, LUO H B, HUANG Z G, et al. Selection of physicochemical indexes for quality evaluation of luzhou-flavor white wine cellar mud[J]. *China Brewing*, 2018, 37(12): 33–39.]
- [17] 赵荣寿, 卓毓崇, 邓林, 等. 不同腐殖质含量窖泥在浓香白酒的应用研究[J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(1): 79–82. [ZHAO R S, ZHUO Y C, DENG L, et al. Application of cellar mud with different humus contents in Luzhou-flavor liquor[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2021, 57(1): 79–82.]
- [18] QIAN W, LU Z M, CHAI L J, et al. Cooperation within the microbial consortia of fermented grains and pit mud drives organic acid synthesis in strong-flavor Baijiu production[J]. *Food Research International*, 2021, 147: 110449.
- [19] CHAI L J, QIAN W, ZHONG X Z, et al. Mining the factors driving the evolution of the pit mud microbiome under the impact of long-term production of strong-flavor baijiu[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(17): e008821.
- [20] ZHOU W, LIAO Z, WU Z, et al. Analysis of the difference between aged and degenerated pit mud microbiome in fermentation cellars for Chinese Luzhou-flavor Baijiu by metatranscriptomics[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(11): 4621–4631.
- [21] WANG X J, ZHU H M, REN Z Q, et al. Characterization of microbial diversity and community structure in fermentation pit mud of different ages for production of strong-aroma Baijiu[J]. *Pol J Microbiol*, 2020, 69: 1–14.
- [22] 郭壮, 葛东颖, 尚雪娇, 等. 退化和正常窖泥微生物多样性的比较分析[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(22): 93–98,106. [GUO Z, GE D Y, SHANG X J, et al. Comparative analysis of microbial diversity between degraded and normal pit mud[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(22): 93–98,106.]
- [23] 柴丽娟, 钱玮, 钟小忠, 等. 浓香型白酒发酵过程中窖内古菌群落分布特征[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(12): 2635–2643. [CHAI L J, QIAN W, ZHONG X Z, et al. Distribution of archaeal community in the mud pit during strong-flavor baijiu fermentation[J]. *Chin J Biotech*, 2020, 36(12): 2635–2643.]
- [24] ZHANG H, MENG Y, WANG Y, et al. Prokaryotic commu-

- nities in multidimensional bottom-pit-mud from old and young pits used for the production of Chinese strong-flavor Baijiu[J]. *Food Chemistry*, 2020, 312(126084): 0308–8146.
- [25] 孟雅静, 王艳丽, 丁峰, 等. 浓香型白酒新、老窖池分层池底窖泥菌群总氮代谢与乳酸含量之间的关系[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 171–177. [MENG Y J, WANG Y L, DING F, et al. Relationship between total hydrogen metabolism and lactic acid content of Luzhou-flavor liquor sludge in new and old cellars[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 171–177.]
- [26] 陶勇. 窖泥细菌群落结构演替及其与环境因子的相关性[J]. *酿酒科技*, 2011(9): 42–46. [TAO Y. Bacterial community structure succession and its correlation with environmental factors in pit mud[J]. *Brewing Technology*, 2011(9): 42–46.]
- [27] LIU M K, TANG Y M, GUO X J, et al. Deep sequencing reveals high bacterial diversity and phylogenetic novelty in pit mud from Luzhou Laojiao cellars for Chinese strong-flavor Baijiu[J]. *Food Research International*, 2017, 102: 68–76.
- [28] ZOU W, YE G, ZHANG K. Diversity, function, and application of clostridium in Chinese strong flavor Baijiu ecosystem: A review[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(5): 1193–1199.
- [29] 张方, 张宿义, 苏占元, 等. 有机酸对浓香型白酒品质及其酿造过程影响的研究进展[J]. *酿酒科技*, 2016(1): 94–97, 102. [ZHANG F, ZHANG S Y, SU Z Y, et al. Research progress on effects of organic acids on quality and brewing process of Luzhou-flavor liquor[J]. *Wine Science and Technology*, 2016(1): 94–97, 102.]
- [30] KIM B C, SEUNG JEON B, KIM S, et al. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(12): 4902–4908.