

浓香型白酒窖泥的真核菌群结构分析

孟雅静, 张会敏, 王艳丽, 梁金辉, 周庆伍, 王银辉, 刘国英, 何宏魁, 李安军

(安徽省固态发酵工程技术研究中心, 安徽亳州 236820)

摘要: 本研究采用 Illumina 高通量测序分析浓香型白酒新老窖池池壁泥与池底泥真核菌群结构。老窖池底泥的 6 个样本中只有 1 个样本扩增并测序成功, 说明老窖池池底泥真菌含量非常少。门水平上, 窖泥的绝对优势门均为 Ascomycota (98.80%~63.14%), 新老池底泥真菌组成更相似, 新老池壁泥真菌组成更相似。属水平上, 新窖池底泥中 *Candida* 占绝对优势 (82.79%), 老窖池底泥中只有 *Candida* (97.24%), 新老池壁泥的真菌组成更接近且更丰富, 优势属包括 *Candida* (11.99% vs 3.72%), *Pichia* (3.69% vs 5.09%), *Aspergillus* (4.87% vs 4.41%) 等。老窖池底泥的 pH 值 (5.69)、铵态氮 (2.54 g/Kg)、乙酸 (689.97 mg/Kg) 和 K^+ (1252.19 mg/Kg) 含量最高; 新窖池底泥总酯 (7.12 mg/g) 最高。聚类分析显示池底泥真核菌群的聚类效果更集中。冗余分析 (RDA) 表明, Ca^{2+} 与池底泥真核菌群呈强烈正相关, 解释度最高 (45.9%), 具极显著贡献 ($p < 0.01$), 说明 Ca^{2+} 含量对池底泥的真核菌群组成具有重要作用。

关键词: 浓香型白酒; 池壁泥; 池底泥; 真核菌群; 理化性质

文章编号: 1673-9078(2020)05-96-103

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.014

Eukaryotic Community Structure of Strong Flavor Baijiu Mud

MENG Ya-jing, ZHANG Hui-min, WANG Yan-li, LIANG Jin-hui, ZHOU Qing-wu, WANG Yin-hui,

LIU Guo-ying, HE Hong-kui, LI An-jun

(The Center for Solid-state Fermentation Engineering of Anhui Province, Bozhou 236820, China)

Abstract: Illumina high-throughput sequencing was used in this study to analyze the eukaryotic community structure of bottom-pit-mud (BPM) and wall-pit-mud (WPM) of the young or old mud pits of Chinese strong-flavor Baijiu (CSFB). Only 1 of the 6 old BPM samples was successfully amplified and sequenced, indicating that the content of fungus was very low. At the phylum level, Ascomycota showed absolute predominance in pit mud (98.80%~63.14%), and the fungal composition of BPM in the new and old pits were very similar. At the genus level, *Candida* showed absolute predominance in young BPM (82.79%) and in old BPM (97.24%), with the WPM of the old and young pits having similar fungal composition and high fungal richness, with *Candida* (11.99% vs. 3.72%), *Pichia* (3.69% vs. 5.09%), *Aspergillus* (4.87% vs. 4.41%) as the dominant genera. The BPM of the old pits had the highest pH (5.69), ammonium nitrogen content (2.54 g/Kg), acetic acid content (689.97 mg/Kg) and K^+ content (1252.19 mg/Kg), while the total ester content (7.12 mg/g) was the highest in young BPM. Cluster analysis showed that the cluster effect of the fungal communities in BPM was greater. Redundancy analysis indicated that Ca^{2+} content had a strong and positive correlation with BPMs (45.9% explanation, significant contribution at $p < 0.01$), indicating the important role of Ca^{2+} content in eukaryotic community composition of BPM.

Key words: strong flavor Baijiu; bottom pit mud; wall pit mud; eukaryotic microbial communities; physicochemical properties

引文格式:

孟雅静,张会敏,王艳丽,等.浓香型白酒窖泥的真核菌群结构分析[J].现代食品科技,2020,36(5):96-103

MENG Ya-jing, ZHANG Hui-min, WANG Yan-li, et al. Eukaryotic community structure of strong flavor Baijiu mud [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 96-103

浓香型白酒的发酵是在窖池中进行的, 发酵的原材料包括粮食、大曲、水、辅料等等。其风味物质的形成是各种微生物共同作用的结果, 比如来自大曲、

投稿日期: 2019-11-07

作者简介: 孟雅静 (1991-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 发酵微生物及其应用

通讯作者: 李安军 (1970-), 男, 正高级工程师, 研究方向: 发酵工艺及食品微生物学

窖泥、水、空气中的菌群等^[1]。不过, 酒醅菌群是白酒发酵的主体, 现已知酒醅中的细菌主要来自于窖泥, 真菌主要来自于大曲^[2]。大曲中的真菌, 比如曲霉属是大曲中的优势属, 产酶能力比较强, 能够分泌葡萄糖氧化酶、糖化酶、蛋白酶; 假丝酵母是生香酵母, 可以产生酯化酶, 促进酯类物质的生成, 对白酒风味的形成具有重要作用^[3,4]。窖泥中真菌主要有假丝酵母、毕赤酵母属、曲霉属、丝孢酵母属、马拉色氏霉

菌属、嗜热子囊菌属等^[5]。

目前对浓香型白酒风味的研究主要集中在窖泥原核菌群的研究^[6]。窖泥中含有大量的细菌,窖泥原核菌群的组成和多样性对窖泥质量起重要作用^[7]。不过,目前对窖泥真菌的研究很少,比如只有易彬等^[8]通过平板计数法研究了泸州老窖不同窖龄窖泥的霉菌与酵母菌变化,得到了不同窖龄的窖壁泥和窖底泥的霉菌数量均较少,其中窖底泥的霉菌数量略低于窖壁泥;而100年和40年窖龄的窖壁泥和窖底泥基本上检测不出酵母菌。根据窖泥和大曲主要菌群的组成可知,大曲中含有大量的霉菌和酵母菌等^[3],多数为好氧真菌和兼性厌氧真菌,主要在酒醅发酵过程的前期进行好氧呼吸^[9],而窖泥菌群中的芽孢杆菌^[10]和产甲烷菌^[11]等,为兼性厌氧细菌和绝对厌氧细菌,主要在发酵后期起作用^[12]。所以两者的生存条件不同,很难在一起生长。酒醅中含有大量的真菌,酒醅与窖泥又是相互影响的,窖泥中的真菌与细菌的共存很可能会影响窖泥质量。因此有必要了解,窖泥中真核菌群的分布情况,及其与理化性质之间的关系。

窖池的池壁泥和池底泥所处的理化环境差异很大。池底泥常年处于发酵过程所形成的黄水的浸泡中,更偏向为厌氧环境;而池壁泥中氧气的含量更多,其所处的环境直到发酵后期才有可能为厌氧状态。在实际生产环境中,可以发现池壁泥中更容易存在肉眼可见的霉菌,也说明了池壁泥与池底泥的差异。池壁泥与池底泥中真菌的分布规律,及其与理化性质之间的关系是一个很值得探讨的问题。

本研究从安徽省某知名浓香型白酒公司分别选取新老窖池的池壁泥和池底泥,研究了其理化性质、真菌菌群分布特征及其两者之间的关系,试图解释池壁泥与池底泥真核菌群组成差异与窖泥质量的关系,为窖泥的改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

窖泥样本取自安徽某知名浓香型白酒企业。两组新老窖泥样本分别取自6年窖龄的新窖池和50年以上窖龄的老窖池各6个。池底窖泥取样方法为三点取样法,在窖池底部的中心点、角点及两点连线的中点各取一块5 cm×5 cm×2 cm的窖泥混匀后作为一个窖池的池底泥样本。六个老窖池的池底泥标注为BPM-o1~BPM-o6;6个新窖池的池底泥标注为BPM-y1~BPM-y6。

池壁泥采取四点取样法,在4面池壁的最高黄水

水位线中心点各取一块5 cm×5 cm×2 cm的窖泥混匀后作为一个池壁泥的样本。六个老窖池的池壁泥标注为WPM-o1~WPM-o6;6个新窖池的池壁泥标注为WPM-y1~WPM-y6。

1.2 主要仪器与试剂

FE20 pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;TU-1901/UV-9000紫外-可见光分光光度计,上海元析仪器有限公司;Agilent6890气相色谱仪(配CP-WAX 57 CB色谱柱50 m×0.25 mm×0.2 μm),美国Agilent公司;Acquity UPLC液相色谱(配PDA二极管阵列检测器和Waters HSS T3色谱柱100 mm×2.1 mm×1.8 μm),美国Waters公司;ICS5000+离子色谱仪(配ICS-5000+-DC电导检测器),ThermoFisher公司;Omega土壤DNA提取试剂盒(D5625),Omega bio-tek公司;其他试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 窖泥理化性质

窖泥pH值采用pH计检测,窖泥与去离子水按1:5质量体积比混匀^[13];水分采用烘干法^[14];铵态氮采用紫外分光光度法检测^[15];总酯含量采用滴定法^[16]。

乙醇、有机酸和酯采用气相色谱标准曲线法检测,将新鲜窖泥与15%的甲醇按1:9质量体积比混匀,10000 r/min离心5 min,取上清液用0.22 μm针孔式滤膜过滤,取1 μL滤液,以1 mL/min的柱流速,在进样口温度为250 °C,分流比为30:1的条件下分流进样。

乳酸采用液相色谱标准曲线法检测,将新鲜窖泥与去离子水按1:9质量体积比混匀,10000 r/min离心5 min,取上清液用0.22 μm针孔式滤膜过滤,取1 μL滤液,流动相为KH₂PO₄ (0.02 M),0.1 mL/min的柱流速,在208 nm波长检测,柱温箱30 °C。

可溶性K⁺与Ca²⁺浓度采用离子色谱仪标准曲线法检测,将新鲜窖泥与去离子水按1:9质量体积比混匀,30 °C超声处理40 min,10000 r/min离心5 min,取上清液过0.22 μm滤膜。取25 μL进样,柱流速为1 mL/min,柱温为30 °C,甲基磺酸水溶液(20 mM)为流动相,等浓度洗脱。

1.3.2 DNA提取与Illumina高通量测序

使用Omega土壤DNA提取试剂盒(D5625)提取窖泥DNA。委托上海派森诺生物科技股份有限公司进行Illumina MiSeq高通量测序。引物为:ITS5F(5'-GGAAGAAAAGTTCGTAACAAGG-3')和ITS1R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'),扩增ITS1区。

1.3.3 测序数据处理与统计学分析

通过 QIIME 软件 (v1.8.0) 检查和剔除嵌合体的序列。按 97% 的相似度进行 OTU 划分, 每个 OTU 中丰度最高的序列为代表序列。采用 UNITE 数据库 (Release 5.0) 对 OTU 代表序列进行注释, 然后进行序列量拉平处理。使用 QIIME 软件分别对每个样本计算 Coverage、Shannon、Chao1 等多多样性指数。使用 R 软件对 Weighted UniFrac 距离矩阵进行 NMDS 分析, 使用 QIIME 软件, 对 Weighted UniFrac 距离矩阵进行 UPGMA 聚类分析, 并使用 R 软件进行可视化。使用 SPSS(25.0) 对窖泥理化因子进行方差分析 (ANOVA)。通过 Canoco 5 分析窖泥理化因子与其菌群组成之间的 RDA (Redundancy Analysis) 相关性。

2 结果与讨论

2.1 窖泥样本的理化性质分析

四组窖泥样本中, 老窖池池底泥 (BPM-old) 的 pH 值、铵态氮和 K^+ 含量显著高于其它三组窖泥, 甄攀^[17]对不同窖龄的窖泥生态因子研究表明 100 年窖龄窖泥的 pH 值、铵态氮和 K^+ 含量均高于 20 年窖龄的窖泥, 与本研究的趋势一致。本研究中 BPM-old 的 pH 值高于 BPM-young, WPM-old 的 pH 值高于 WPM-young, 且池底泥 pH 值 > 池壁泥 pH 值, 与任道群等^[18]研究的不同窖龄窖壁泥的 pH 值均低于窖底泥的结果相一致。

表 1 新老窖池池底泥和池壁泥的理化性质

Table 1 The physicochemical properties of BPM and WPM from old and young pits

参数	BPM-old	BPM-young	WPM-old	WPM-young
pH	5.69±0.45 ^A	4.65±0.52 ^C	4.35±0.36 ^D	3.93±0.32 ^E
水分/%	42.51±0.019 ^A	39.42±0.023 ^C	40.69±3.38 ^B	42.80±1.65 ^A
铵态氮/(g/kg)	2.54±0.39 ^A	1.26±0.18 ^C	1.24±0.16 ^D	1.00±0.15 ^F
乙醇/(mL/kg)	8.26±3.31 ^A	20.07±5.08 ^C	19.70±3.23 ^C	17.83±4.82 ^C
己酸/(g/kg)	6.86±2.26 ^A	6.44±3.58 ^B	2.84±0.36 ^D	3.33±0.54 ^C
乙酸/(mg/kg)	689.97±106.64 ^A	247.04±64.72 ^C	483.64±90.02 ^E	249.33±56.19 ^C
丁酸/(g/kg)	1.88±0.30 ^D	1.13±0.34 ^B	1.29±0.58 ^C	2.39±0.92 ^E
乳酸/(g/kg)	10.72±5.71 ^A	28.80±13.90 ^C	26.41±6.99 ^C	27.28±7.15 ^C
己酸乙酯/(mg/kg)	63.60±20.37 ^B	172.43±153.00 ^B	54.69±19.17 ^A	116.27±64.53 ^C
乳酸乙酯/(mg/kg)	11.38±8.10 ^A	26.46±20.86 ^B	16.19±9.54 ^B	28.14±13.51 ^C
乙酸乙酯/(mg/kg)	113.31±136.81 ^A	72.92±33.86 ^A	101.36±26.24 ^A	148.77±120.25 ^A
K^+ /(mg/kg)	1252.19±113.41 ^A	978.75±136.75 ^C	118.55±19.19 ^E	96.00±18.55 ^E
Ca^{2+} /(mg/kg)	1171.77±414.85 ^A	1742.96±835.71 ^A	337.04±200.87 ^C	442.69±280.44 ^C
总酯/(mg/g)	3.57±1.32 ^A	7.12±3.25 ^E	2.19±0.49 ^C	2.86±0.91 ^B

注: 同行数据标注不同大写英文字母的表明具有显著差异, $p < 0.05$, 下同。

BPM-old 的水分显著高于 BPM-young, 而与两组池壁泥的水分相比不具有显著性差异, 除了 BPM-young 的水分 < 40%, 其它三组均 > 40%, 与廖作敏等^[19]研究成熟窖泥的水分一般在 40% 以上的结果一致。老窖泥的水分含量高于新窖泥可能与窖泥在循环发酵过程中泥土的颗粒细度发生变化、窖泥中亲水性物质的含量升高等有关^[20]。BPM-old 的铵态氮含量显著高于 BPM-young, WPM-old 的铵态氮含量显著高于 WPM-young, 且池底泥中铵态氮含量 > 池壁泥中铵态氮含量。四组窖泥样本相比, WPM-young 中乙酸乙酯的含量较其它三组最高, 但不具有显著性差异。BPM-old 中己酸含量高于 BPM-young, WPM-old 中己酸含量高于 WPM-young, 且新老窖池池底泥的己酸含量均高于新老窖池的池壁泥。BPM-old 中乙酸含

量显著高于其它组, 而乙醇和乳酸显著低于其它组; BPM-young 中总酯含量显著高于其它组, 且乙醇、乳酸、己酸乙酯和乳酸乙酯也相对较高。WPM-young 中丁酸显著高于 WPM-old, 而新老窖池池底泥中丁酸不具有显著性差异。池底泥中可溶性 K^+ 和 Ca^{2+} 浓度均显著高于池壁泥, 这与唐玉明等^[21]研究泸州老窖的窖泥特性结果一致。发酵过程中产生的黄水会渗透进池底窖泥中, 黄水中的乳酸与池底泥中的钙反应形成可溶性 Ca^{2+} , 池壁泥中的 Ca^{2+} 也会随着黄水一起流入池底泥中, 导致池底泥中的 Ca^{2+} 含量显著高于池壁泥。而有研究表明新窖壁泥的 Ca^{2+} 含量显著低于 40 年窖龄窖壁泥 ($p < 0.05$), 新窖底泥的 Ca^{2+} 含量显著低于 40 年及以上窖龄窖底泥 ($p < 0.05$)^[18], 这与本研究结果相反。这可能与不同地区地理环境不同, 窖池窖泥

理化性质存在差异有关，也可能与制作窖泥所使用的粘土材料差异有关。

2.2 窖泥真核微生物群落的 α 多样性

通过 Illumina Miseq 高通量测序，得到 678501 条平均长度为 164 bp 的优质序列，平均 26775~47828 条/样本。对所有样本十次抽平 (subsample) 取平均四舍五入后，得到 23834~23904 条序列/样本。OTU 聚类 (97%相似度) 得到 3907 个 OTU，平均 88~265 个 OTU/样本。每个样本的测序覆盖率 (Coverage) 大于 99%，说明测序数目足够，测序序列可以代表其菌群组成。平均 95.4% (92.6%~99.9%，未包括两个极低值 70.4%和 70.6%) /样本的序列得到注释 (门、纲、

目、科、属)，只有 4.6%的序列无法得到注释。与池底泥相比，池壁泥中真菌的 Chao1 指数和 OUT 数目更高，说明池壁泥中的真菌的菌种数更高；新老窖池相比，新窖池窖泥中的真菌丰度更高；四组窖泥样本相比，老窖池的池底泥中真菌丰度最低，老窖池的 6 个池底泥样本中只有一个样本高通量测序成功，其余 5 个样本根本无法正常扩增出 ITS1 序列 (表 2 备注)，进一步说明老窖池池底泥的真菌非常稀少，老窖池池底泥的理化环境不适宜真菌生存。新老窖池的池壁泥真核菌群的 Shannon 指数相当，两者显著大于池底泥，说明池壁泥中真菌菌群的丰度和多样性远远大于池底泥。

表 2 4 组窖泥样本的真核微生物群落丰度和多样性参数

Table 2 The eukaryotic community richness and diversity indices of 4 groups of PM samples

参数	BPM-old*	BPM-young	WPM-old	WPM-young
优质序列数目	43914	38261±4928	37640±6450	29864±2921
Coverage/%	99.41	99.53±0.15	99.72±0.12	99.67±0.17
OTUs 数目	88	183.83±22.75 ^A	211.17±42.66 ^B	241.50±19.41 ^C
Chao1 index	238.18	362.48±36.08 ^A	687.79±122.30 ^C	718.13±52.68 ^D
Shannon index	0.58	1.63±0.45 ^A	4.75±0.36 ^C	4.92±0.42 ^D

注：*表示此组样本量为 1。

2.3 窖泥真核微生物群落的 β 多样性

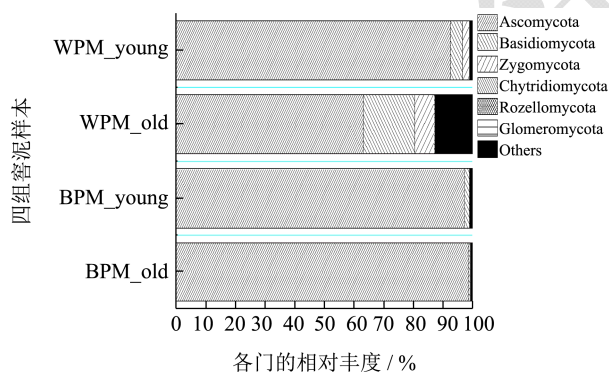


图 1 四组窖泥样本中 6 个门的相对含量

Fig.1 Relative abundances of the 6 phyla in 4 groups of PM.

注：“Others”包括其余门和未注释到门的 OTU，BPM-old 的样本量为 1。

对 OTU 注释，共得到 6 个门，如图 1 所示。定义 >1% 的门为优势菌门。Ascomycota (子囊菌门) 在四组窖泥中均为优势菌门，两组池底泥中 Ascomycota 的比例相当 (98.80% vs 97.33%)，两组池壁泥中相比，老窖池池壁泥的含量 (63.14%) 显著低于新窖池的池壁泥 (92.59%)。Basidiomycota (担子菌门) 和 Zygomycota (接合菌门) 在老窖池池壁泥中的相对含量最高 (17.37%，6.55%)，新窖池池壁泥次之 (4.05%，

2.32%)，两组池底泥中最少 (BPM-old (0.44%，0.02%)，BPM-young (1.67%，0.02%)。以上 3 种门在泸州老窖窖泥中也同样存在，且 Ascomycota 为优势菌门^[5]。Chytridiomycota、Rozellomycota、Glomeromycota 在四组窖泥中含量为 0~0.32%，为稀有菌门。

对 OTU 注释，共得到 210 个属，其中含量 >1% 的属共 18 个，为优势菌属，如图 2 所示。其余非优势菌属和未知菌归为“Others”，“Others”含量的多少与属水平上的注释度直接相关。四组窖泥样本相比，老窖池池底泥 (BPM-old) 的注释度最高 (97.24%)，然后依次为新窖池池底泥 (BPM-young, 94.92%)、老窖池池壁泥 (WPM-old, 61.00%) 和新窖池池壁泥 (WPM-young, 37.02%)。以上说明新窖池池壁泥中未知真菌最多，老窖池池底泥中未知真菌最少。四组窖泥相比，老窖池池底泥的真菌非常稀少，其真菌组成与新窖池池底泥比较接近；两组池壁泥的真菌组成更接近；池壁泥的真菌多样性远远大于池底泥。两组新老池底泥的真菌组成相对单一，假丝酵母属 (*Candida*) 的含量最高 (97.24% vs 82.79%)；老窖池的池底泥中只有极少量的假丝酵母属 (6 个老窖池池底泥样本只有一个样本高通量测序成功)，而新窖池的池底泥中含有更高丰度的毕赤酵母属 (*Pichia*, 7.04%)、生丝毕赤酵母属 (*Hyphopichia*, 3.90%)、掷

孢酵母属 (*Bullera*, 1.19%)。两组新老窖池的池壁泥菌群组成相对更丰富,老窖池的池壁泥中马拉色氏霉菌属 (*Malassezia*, 7.66%) 的丰度更高,其次为嗜热子囊菌属 (*Thermoascus*, 6.60%)、毕赤酵母属 (*Pichia*, 5.09%)、曲霉属 (*Aspergillus*, 4.41%)、假丝酵母属 (*Candida*, 3.72%) 等等;而新窖池的池壁泥中假丝酵母属 (*Candida*, 11.99%) 的丰度更高,其次为青霉菌属 (*Penicillium*, 5.41%)、曲霉属 (*Aspergillus*, 4.87%)、毕赤酵母属 (*Pichia*, 3.69%) 等等。

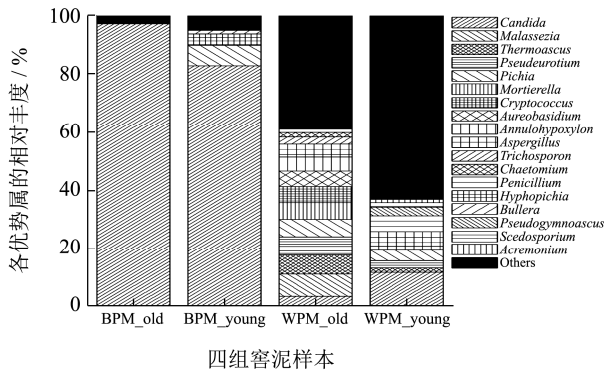


图2 四组窖泥样本中18个优势属的相对含量

Fig.2 Relative abundances of the 18 dominant genera in 4 groups of PM.

注:“Others”包括其余属和未注释到属的 OTU, BPM-old 的样本量为 1。

浓香型白酒酿造主要微生物为酵母菌、霉菌和细菌。霉菌在白酒生产发酵中能够产生大量的葡萄糖淀粉酶^[22],可以将原料中的淀粉降解为还原糖供酵母菌直接利用,促进酵母菌的生长繁殖,进而产生更多的酒精。四组窖泥样本中老窖池池壁泥的真核菌群相对丰度最高,霉菌与酵母菌的种类最多,因此产生的乙醇相对较多;而新池底泥中相对丰度超过1%的均为酵母菌属,因此产生的乙醇相较其他组最多。假丝酵母 (*Candida* sp.) 是一类能形成假菌丝、不产生子囊孢子的酵母,在发酵过程中假丝酵母产酒精能力低于酿酒酵母^[3],所以老池底泥中乙醇量也是最少的。白酒发酵过程中,产酯能力强的酵母有:汉逊酵母、毕赤酵母、假丝酵母。已有研究表明产酯酵母能以有机酸为养料,在酯酶参与下合成酯类^[1]。假丝酵母在发酵过程中能够产生脂肪酶^[23],是合成己酸乙酯和乙酸乙酯的关键^[24,25]。四组窖泥样本中新池底泥的毕赤酵母属和假丝酵母属相对丰度较高,且乙醇、己酸和乳酸含量也较高,所以己酸乙酯与乳酸乙酯的含量相对较高;老池底泥中假丝酵母属的相对丰度最高,且乙醇含量最高,所以产乙酸乙酯的含量也相对较高。

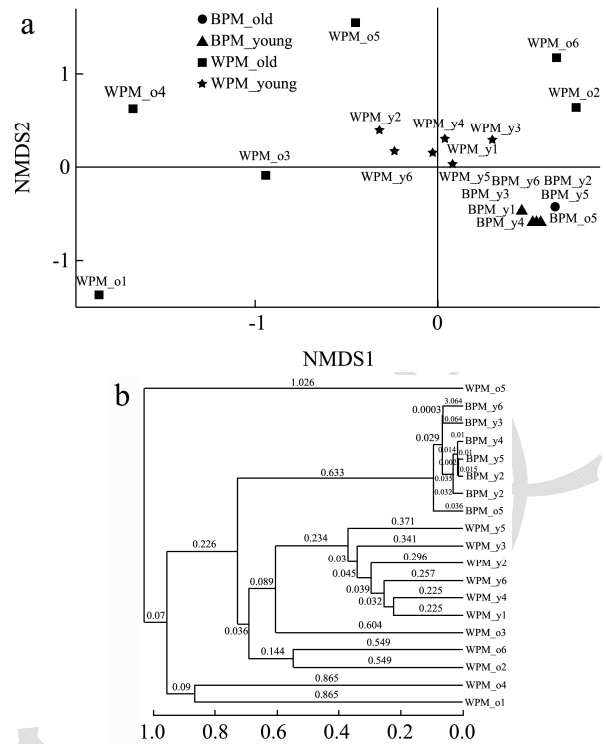


图3 新老窖池池底泥和池壁泥样本菌群 weighted unifracs NMDS (a) 和 weighted unifracs distance UPGMA (b) 分析图

Fig.3 Analysis of the OTU composition of old/young BPM and WPM based on weighted unifracs NMDS (a) and weighted unifracs distance UPGMA (b)

采用基于 weighted unifracs 的距离矩阵对 19 个窖泥样本的真核菌群进行 Nonmetric Multidimensional Scaling (NMDS) 聚类分析,如图 3a 所示。四组窖泥共 19 个样本的真核菌群的聚类结果显示,新老窖池池底泥的真核菌群聚类在一起,非常集中;新老窖池池壁泥的真核菌群相对聚类更分散,新窖池池壁泥的真核菌群聚类相对集中。表明新老窖池池底泥的真核菌群结构差异性最小,而老窖池池壁泥的真核菌群结构差异性最大。对 19 个窖泥样本基于 weighted unifracs 距离矩阵进行 Unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) 聚类分析,如图 3b 所示。新老窖池池底泥的真核菌群聚类最集中,新窖池池壁泥次之,老窖池池壁泥的聚类最分散,与 NMDS 聚类结果一致。两种分析结果均表明池壁泥的真核菌群的丰度和多样性要高于池底泥(图 2)。众所周知,窖泥中栖息着大量的厌氧菌^[2],其环境处于缺氧状态,是不利于好养型的真菌生存的,池壁泥要比池底泥接触的氧气多,因此,池壁泥的真核菌群相对丰度要高于池底泥。

2.4 窖泥理化性质与真核菌群的冗余分析

(RDA, Redundancy Analysis)

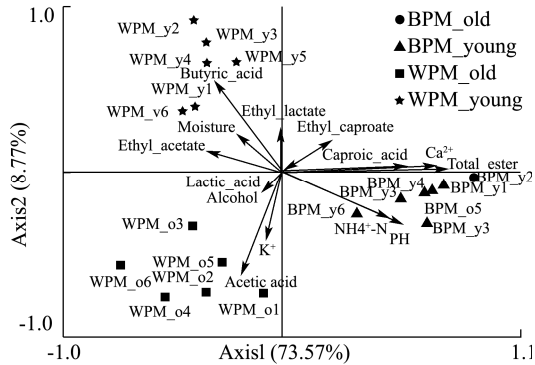


图4 RDA (Redundancy Analysis) 关联分析窖泥理化因子与真核菌群之间的关系图 (箭头表示理化因子与微生物群落结构之间关联性的方向与大小)

Fig.4 Redundancy analysis of the PM physicochemical factors and PM eukaryotic communities. (The arrows indicate the direction and magnitude of the correlation)

如图4所示为窖泥样本中的理化因子与窖泥真核菌群 OTU 之间的 RDA 关联分析图。图中箭头的长度代表相关性的大小，中心点和窖泥菌群点之间的连线与箭头的夹角，锐角表示窖泥菌群与相应的理化因子呈正相关，钝角表示负相关。图中两个主成分的总解释度为 82.34%，但是两个坐标轴上的解释度相差悬殊，主要集中在坐标轴 1 (73.57%)。以横轴为分界点，左侧主要为新老窖池的池壁泥，右侧主要为新老窖池的池底泥。BPM-old 与 BPM-young 分布最集中，进一步说明其组内差异很小，均一度比较高，与图3结论一致。由图4可知 Ca^{2+} 、己酸和总酯的值与池底泥的真核菌群呈强烈正相关，说明 Ca^{2+} 、己酸和总酯对池底泥的真核菌群组成影响最大。使用互动向前选择 (Interactive Forward Selection procedure) 程序验收表 1 中理化因子 (共 14 个因素)，发现 Ca^{2+} (45.9%) 对相关性的解释度最高，具有极显著贡献 ($p < 0.01$)。参数 pH (11.2%)、 K^+ (5.4%) 对相关性具有显著贡献 ($p < 0.05$)。其余 11 个理化因子对相关性的贡献率均不具显著性。本研究的结果表明 Ca^{2+} 的值与池底泥真核菌群组成的相关性最强，目前已知，钙元素对窖泥 pH 具有一定调节作用^[17]，而酒醅发酵酵母菌的最适生长 pH 范围为 5.0~6.0^[26]，白酒发酵过程中产生的黄水 pH 值相对更低 (3.2~3.5)，尤其是其中的乳酸^[27]对窖泥 pH 值有直接影响，而窖泥中的非游离钙可以与乳酸通过生成乳酸钙 (结晶)^[28]在一定程度上升高窖泥 pH 值，从而提高窖泥中真菌生存的可能性。另

外，真菌属于好氧菌，乳酸钙等结晶颗粒的形成，导致新窖泥更加松散，有利于氧气的存在，从而更有利于真菌的生存。所以，与池壁泥相比，pH 值更接近 5.0~6.0 的池底泥中，假丝酵母等酵母菌更容易生存。

3 结论

3.1 本研究通过分析新老窖池池壁泥与池底泥的理化性质和真核菌群结构，发现：(1) 新老池壁泥的理化性质差异不显著；新老池底泥的理化性质差异显著。老窖池池底泥的 pH 值 (5.69)、铵态氮 (2.54 g/Kg)、乙酸 (689.97 mg/Kg) 和 K^+ (1252.19 mg/Kg) 的含量最高 ($p < 0.05$)；新窖池池底泥的总酯 (7.12 mg/g) 含量最高 ($p < 0.05$)，乙醇 (20.07 mL/Kg)、乳酸 (28.80 g/Kg)、己酸乙酯 (172.43 mg/Kg)、可溶性 Ca^{2+} (1742.96 mg/Kg) 的值相对较高。(2) 老窖池的 6 个池底泥样本只有 1 个样本扩增成功并完成高通量测序，其他 5 个样本均没有扩增出 ITS1 序列。在门水平上，新老池底泥的菌群组成相对较接近，新老池壁泥的菌群组成相对较接近。四组窖泥的优势菌门 (相对丰度 > 1%) 均为 Ascomycota，相对含量为 98.80%~63.14%。在属水平上，池底泥与池壁泥的优势真核菌属 (相对丰度 > 1%) 组成差异明显。新老池底泥中的真核菌群组成比较单一，*Candida* 占绝对优势 (82.79% vs 97.24%)；两组池壁泥的真核菌群组成更丰富，老窖池池壁泥的优势真核菌属有 *Malassezia* (7.66%)、*Thermoascus* (6.60%)、*Pichia* (5.09%)、*Aspergillus* (4.41%)、*Candida* (3.72%) 等，新窖池池壁泥的优势真核菌属有 *Candida* (11.99%)、*Penicillium* (5.41%)、*Aspergillus* (4.87%)、*Pichia* (3.69%) 等。说明与池底泥相比，池壁泥更适合真菌生存。(3) 新老池底泥的聚类比较集中，而池壁泥的真核菌群聚类比较分散，进一步表明池壁泥的真核菌群的丰度和多样性要高于池底泥。(4) 通过 RDA 相关性分析得到 Ca^{2+} 含量对相关性的解释度最高 (45.9%)，具极显著贡献 ($p < 0.01$)， Ca^{2+} 与池底泥的真核菌群组成呈强烈正相关，说明 Ca^{2+} 对池底泥的真核菌群组成具有重要作用。

3.2 综上，新老窖池池壁泥的理化性质差异不明显，真核菌群组成丰富，相似度更高；新老窖池池底泥的理化性质差异显著，而唯一一个老窖池池底泥样本的真核菌群与新窖池池底泥的真核菌群组成比例很相似，有可能与池底泥的厌氧环境对真核菌群的影响更大有关。通过 RDA 相关性分析， Ca^{2+} 与池底泥的真核菌群组成的相关性最强。与池底泥相比，池壁泥更适合真核菌群生存，随着窖泥的老熟，池底泥中真核菌群的数量和种类都在不断减少，直至消失。

参考文献

- [1] 程伟,吴丽华,徐亚磊,等.浓香型白酒酿造微生物研究进展[J].中国酿造,2014,33(3):1-4
CHEN Wei, WU Li-hua, XU Ya-lei, et al. Research progress on brewing microbes in the production process of Luzhou-flavor liquor [J]. China Brewing, 2014, 33(3): 1-4
- [2] Wang X, Du H, Xu Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 244: 27-35
- [3] 李兵,张超,王玉霞,等.白酒大曲功能微生物与酶系研究进展[J].中国酿造,2019,38(6):7-12
LI Bing, ZHANG Chao, WANG Yu-xia, et al. Research progress on functional microbes and enzymes in Daqu of Baijiu [J]. China Brewing, 2019, 38(6): 7-12
- [4] 周庆伍,汤斌,李安军,等.基于纯种分离技术对古井贡酒桃花曲微生物进行分离鉴定的研究[J].酿酒科技,2016,3: 37-41
ZHOU Qing-wu, TANA Bing, LI An-jun, et al. Isolation and identification of microbes in Gujing Daqu based on purebred separation technology [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2016, 3: 37-41
- [5] Liu M, Tang Y, Zhao K, et al. Determination of the fungal community of pit mud in fermentation cellars for Chinese strong-flavor liquor, using DGGE and Illumina MiSeq sequencing [J]. Food Research International, 2017, 91: 80-87
- [6] 李芳莉.浓香型白酒窖泥微生物群落结构分析及其对原酒风味物质的影响[D].郑州:郑州轻工业学院, 2017
LI Fang-li. Analysis of microbial communities and its effect on flavor substance of raw in Chinese strong-flavor liquor pit muds [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2017
- [7] 胡晓龙.浓香型白酒窖泥中梭菌群落多样性与窖泥质量关联性研究[D].无锡:江南大学,2015
HU Xiao-long. Illuminating the correlation between anaerobic clostridial community diversity and quality of pit mud used for the production of Chinese strong-flavor liquor [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015
- [8] 易彬,任道群,唐玉明,等.不同窖龄窖泥微生态变化研究[J].酿酒科技,2011,6:32-34
YI Bin, REN Dao-qun, TANG Yu-ming, et al. Study on the change of microbes in pit mud of different pit age [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011, 6: 32-34
- [9] 蒲岚,李璐,谢善慈,等.浓香型白酒窖池中糟醅微生物的變化趋势研究[J].酿酒科技,2011,1:17-19
PU Lan, LI Lu, XIE Shan-ci, et al. Study on the change trend of microbes in fermented grains in Luzhou-flavor liquor pits [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011, 1: 17-19
- [10] 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
YUE Yuan-yuan, ZHANG Wen-xue, LIU Xia, et al. Isolation and identification of facultative anaerobes in the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. Microbiology China, 2007, 34(2): 251-255
- [11] 王保玉,刘建民,韩作颖,等.产甲烷菌的分类及研究进展[J].基因组学与应用生物学,2014,33(2):418-425
WANG Bao-yu, LIU Jian-min, HAN Zuo-ying, et al. Recent progress and classification of methanogens [J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(2): 418-425
- [12] 汪文鹏,王艳丽,吴树坤,等.浓香型白酒窖泥中3株厌氧菌的分离鉴定及代谢产物分析[J].食品科技,2018,43(2):15-20
WANG Wen-peng, WANG Yan-li, WU Shu-kun, et al. Isolation and identification of three anaerobic bacteria strains in Luzhou-flavor liquor and metabolites analysis [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 15-20
- [13] Ao 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]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(7): 2254-2260
- [14] 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(9): 68-76
- [15] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社, 2007:642-650
SHEN Yi-fang. Whole Book of Liquor Production Technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2017: 642-650
- [16] 李锋,董彩军,李建华,等.窖泥中总酸,总酯和总醛测定方法的研究[J].中国酿造,2015,34(3):95-97
LI Feng, DONG Cai-jun, LI Jian-hua, et al. Determination method of total acid, total ester and total aldehyde of pit mud [J]. China Brewing, 2015, 34(3): 95-97
- [17] 甄攀.窖泥微生态研究[D].自贡:四川理工学院,2010
ZHEN Pan. Study on microecology of pit mud [D]. Zigong: Sichuan University of Science & Engineering, 2010
- [18] 任道群,刘茂柯,唐玉明,等.浓香型酒窖泥理化特性的研究[J].中国酿造,2014,33(10):55-57
REN Dao-qun, LIU Mao-ke, TANG Yu-ming, et al. Analysis

- of physicochemical characteristic in pit mud of Luzhou-flavor liquor [J]. China Brewing, 2014, 33(10): 55-57
- [19] 廖作敏,罗雯,代金凤,等.浓香型白酒窖泥理化电化特性分析[J].中国酿造,2018,37(5):92-96
LIAO Zuo-min, LUO Wen, DAI Jin-feng, et al. Characteristics of physicochemical properties and electrochemical properties in strong-flavor Baijiu pit mud [J]. China Brewing, 2018, 37(5): 92-96
- [20] 李民.白酒窖泥中微生态因子的研究[D].济南:齐鲁工业大学,2015
LI Min. Study mud of the cellar microflora factor [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2015
- [21] 唐玉明,沈才洪,任道群,等.老窖池窖泥特性研究[J].酿酒, 2005,32(5):24-28
TANG Yu-ming, SHEN Cai-hong, REN Dao-qun, et al. Study on characteristics of aged cellar mud [J]. Liquor Making, 2005, 32(5): 24-28
- [22] Lv X C, Huang Z Q, Zhang W, et al. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing [J]. The Journal of General Applied Microbiology, 2012, 58(1): 33-42
- [23] Treichel H, De Oliveira D, Mazutti M A, et al. A review on microbial lipases production [J].Food Bioprocess Technology, 2010, 3(2): 182-196
- [24] Christen P, Domenech F, Páca J, et al. Evaluation of four *Candida utilis* strains for biomass, acetic acid and ethyl acetate production from ethanol [J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 193-195
- [25] Zeng J, Zhou X, Zhang J, et al. Study on enzymatic synthesis of ethyl caproate in organic medium [J]. Food Science, 2009, 30(6): 123-127
- [26] 王琛.白酒酒醅中酵母菌的分离鉴定及特性研究[D].成都:四川农业大学,2013
WANG Chen. Identification and characterization of yeasts isolated from liquor fermentations [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2013
- [27] 冯兴垚,邓杰,谢军,等.白酒酿造副产物黄水综合利用现状浅析[J].中国酿造,2017,36(2):6-9
FENG Xing-yao, DENG Jie, XIE Jun, et al. Brief analysis on current situation of comprehensive utilization of by products yellow water from Baijiu-making [J]. China Brewing, 2017, 36(2): 6-9
- [28] 陈彬,闫寅卓,王德良,等.浓香型白酒窖泥钙化成因及缓解措施的初步探究[J].中国酿造,2016,35(10):36-40
CHEN Bin, YAN Yin-zhuo, WANG De-liang, et al. Preliminary research on the calcification causes and mitigation measures of Luzhou-flavour Baijiu pit mud [J]. China Brewing, 2016, 35(10): 36-40

(上接第 336 页)

- [68] Huang Zhenyao, Xu Bo, Huang Xiaomin, et al. Metabolomics reveals the role of acetyl- γ -carnitine metabolism in γ -Fe₂O₃ NP-induced embryonic development toxicity via mitochondria damage [J]. Nanotoxicology, 2019, 13(2): 204-220
- [69] 宋月.基于组学技术研究布洛芬对斑马鱼成鱼的选择性毒性[D].北京:中国农业科学院,2018
SONG Yue. Study on the selective toxicity of ibuprofen to zebrafish adult fish based on omics technology [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018
- [70] Fu Jing, Gong Zhiyuan, Barry C Kelly. Metabolomic profiling of zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to the antibacterial agent triclosan [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2019, 38(1): 240-249
- [71] Jia Ming, Wang Yao, Teng Miaomiao, et al. Toxicity and metabolomics study of isocarboxiphos in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 163: 1-6