

基于微生物群落结构相关的窖泥品质理化指标的筛选

刘梅¹, 邓杰¹, 谢军¹, 李觅², 吴树坤¹, 黄治国^{1,*}

(1.四川理工学院 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000;

2.四川省食品发酵工业研究设计院, 四川 温江 611130)

摘要: 为了解窖泥理化指标与微生物群落的相关性, 筛选能反映窖泥品质的理化指标, 通过高通量测序分析了不同品质窖泥微生物群落结构, 并与理化指标进行了相关性分析。结果发现: 水分质量分数、总氮和氨态氮含量随窖泥品质的提高而升高, pH值随窖泥品质的提高而接近于7; 主成分分析表明氨态氮、总氮、有效磷含量、pH值、腐殖酸质量分数和铁元素含量对窖泥品质影响较大。总氮含量分别和厚壁菌门(Firmicutes)、互养菌门(Synergistetes)、放线菌(Actinobacteria)比例呈正相关, 与绿弯菌门(Chlorflexi)、变形菌门(Proteobacteria)比例呈负相关。氨态氮含量分别和Firmicutes、Synergistetes、Actinobacteria比例呈正相关, 和Proteobacteria、螺旋体门(Spirochaetes)比例呈负相关。有效磷含量分别和Synergistetes和Actinobacteria比例呈正相关。腐殖酸质量分数和Proteobacteria比例呈正相关。pH值分别和Firmicutes、Actinobacteria比例呈正相关, 和Chlorflexi、Spirochaetes比例呈负相关。其相关性均达到了显著或极显著水平($P<0.05$, $P<0.01$)。从冗余分析图中可以看出氨态氮、总氮、有效磷含量和pH值对微生物群落的影响最大, 其次为水分质量分数、腐殖酸质量分数、钙和铁元素含量。综上所述, 从水分质量分数、总氮、氨态氮、有效磷、腐殖酸质量分数、pH值、钙和铁元素含量中初步筛选到总氮、氨态氮含量和pH值3个指标, 即在一定范围内, 窖泥品质越好, 总氮和氨态氮含量越高, pH值越接近于7, 其可作为窖泥质量的初步评定标准。

关键词: 窖泥; 品质; 理化; 高通量测序; 微生物群落; 差异

Screening of Physicochemical Quality Indexes of Pit Mud Based on Correlation with Microbial Community Structure

LIU Mei¹, DENG Jie¹, XIE Jun¹, LI Mi², WU Shukun¹, HUANG Zhiguo^{1,*}

(1. Liquor Making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China; 2. Sichuan Food Fermentation Industry Research and Design Institute, Wenjiang 611130, China)

Abstract: In order to understand the correlation between physicochemical indexes and microbial communities of pit mud and further to screen out the physicochemical indexes that reflect the quality of pit mud, the microbial community structures in pit muds with different qualities were investigated by high-throughput sequencing, and correlation analysis was carried out between microbial community structure and physicochemical indexes. The results showed that the contents of water, total nitrogen and ammonium nitrogen showed an increasing trend with improved quality of pit mud, and the pH approached 7. Principal component analysis of physicochemical indicators showed that the contents of ammonium nitrogen, total nitrogen, available phosphorus, humic acid, pH and Fe had great influence on pit mud quality. Total nitrogen was positively correlated with Firmicutes, Synergistetes and Actinobacteria, but negatively correlated with Chlorflexi and Proteobacteria. Ammonium nitrogen content was positively correlated with Firmicutes, Synergistetes and Actinobacteria, but negatively correlated with Proteobacteria and Spirochaetes. There was a positive correlation between available phosphorus and Synergistetes or Actinobacteria. Humic acid and Proteobacteria were positively correlated. pH was positively correlated with Firmicutes and Proteobacteria, but negatively correlated Chlorflexi with Spirochaetes. All correlations were statistically

收稿日期: 2017-08-24

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2016SZ0074); 四川省科技成果转化项目(2016CC0032);

固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金项目(2015GTY004);

国家固态酿造工程技术研究中心开放课题(2015K-246)

第一作者简介: 刘梅(1993—), 女, 硕士, 研究方向为发酵工程。E-mail: 784065645@qq.com

*通信作者简介: 黄治国(1978—), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: hzguo@suse.edu.cn

significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Redundancy analysis showed that ammonium nitrogen, total nitrogen, available phosphorus and pH had the greatest influence on microbial communities, followed by water, humic acid, calcium and iron contents. To sum up, total nitrogen, ammonium nitrogen and pH were screened out as quality indicators of pit mud. The better the quality of pit mud, the higher the contents of total nitrogen and ammonium nitrogen and the closer the pH was to 7.

Keywords: pit mud; quality; physicochemical; high-throughput sequencing; microbial community; diversity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201819008

中图分类号: TS261.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 19-0044-07

引文格式:

刘梅, 邓杰, 谢军, 等. 基于微生物群落结构相关的窖泥品质理化指标的筛选[J]. 食品科学, 2018, 39(19): 44-50.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201819008. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Mei, DENG Jie, XIE Jun, et al. Screening of physicochemical quality indexes of pit mud based on correlation with microbial community structure[J]. Food Science, 2018, 39(19): 44-50. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201819008. <http://www.spkx.net.cn>

中国白酒是我国特有的一种蒸馏酒, 承载了中国悠久的历史与文化, 为世界六大蒸馏酒之一。中国白酒具有酒体透明、清澈纯净、口感协调、芳香四溢、入口爽净、饮后回味悠久等特点^[1]。随着白酒产业的发展, 窖泥作为企业的商品或者固定资产参与社会的各种经济活动, 窖泥品质的评价也越来越重要, 因此需要建立科学、客观的窖泥评定方法。目前窖泥品质的评价依旧以感官评价为主, 带有一定的主观性。与糟醅不同, 窖泥是一个空间位置相对固定的微生物的主要栖息地。通过对窖泥进行全面地研究有助于解释复杂的白酒酿造机理, 从而进一步提高白酒品质。目前, 并没有一套较为完整、精确的理化指标来对窖泥品质进行准确评判, 又由于窖泥是酿酒微生物的容器, 是酿造微生物的来源, 窖泥品质与窖泥微生物具有一定的规律性^[2], 所以窖泥微生物群落结构能较好地反映窖泥品质。窖泥中细菌和古菌群落结构与腐殖酸、有效磷含量呈正相关, 与总酸含量呈负相关^[3]; 细菌和古菌多样性与总酸含量总体呈极显著的负相关, 与总氮含量呈极显著的正相关; 腐殖酸质量分数与细菌多样性也有显著的正相关关系^[4], 可见窖泥微生物群落结构特征与部分理化指标存在一定的相关性。因此, 本研究通过测定理化指标与窖泥微生物群落的相关性, 了解窖泥中哪些微生物对窖泥品质的影响较大, 并得出与其相关性较高, 即能更好反映窖泥品质的理化指标, 与感官评定标准相结合, 对窖泥品质进行更准确、更低成本的评定。理化指标和微生物群落反映出的信息对窖泥维护、人工窖泥的研制有重要意义, 可进一步指导生产。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

根据表1窖泥感官评定标准, 有针对性地采集不同品质窖泥。窖泥样品均来自四川地区某白酒厂生产窖池,

且窖池连续生产使用5年以上, 取样部位为每口窖池窖底中心部位(窖泥样品编号为一级: 1、2、3号; 二级: 4、5、6号; 三级: 7、8、9号), 所取样品用塑封袋密封后迅速置于低温取样盒中, 冷藏运回实验室。

表1 窖泥样品感官评定标准
Table 1 Criteria for sensory evaluation of pit mud samples

指标	等级	描述
色泽	一级	灰褐色、灰黑色或灰白色, 无窖泥制作原料本色
	二级	黄褐色, 无窖泥制作原料本色
	三级	黄色, 带有窖泥制作原料本色
气味	一级	香气纯正, 有浓郁老窖泥香气, 窖香舒适, 香味持久
	二级	香气正, 稍有老窖泥香气, 带有明显的酯香、酒香, 香味较持久
	三级	稍有酯香和酒香, 有一定异杂味
质感	一级	表层柔软细腻、起悬或有明显黏稠感, 断面有气泡或呈疏松的颗粒状, 手感细滑
	二级	表层较柔软细腻, 有一定的黏稠感, 断面有气泡
	三级	柔软一般, 手感较硬, 断面板结

无水乙醇、碘化汞、碘化钾、氢氧化钠、酒石酸钠钾、氯化铵、钼酸铵、氟化铵、氯化亚锡、磷酸二氢钾、焦磷酸钠、腐殖酸钠、硫酸钾、硫酸铜(分析纯) 成都科龙化工试剂厂; 甲基红、溴甲酚绿(分析纯) 中国医药集团有限公司; 硝酸、氟化氢、盐酸、浓硫酸、硼酸(分析纯) 重庆川东化工集团; 土壤DNA提取试剂盒 美国MOBIO公司; QIAquick Gel Extraction胶回收试剂盒 中国康为世纪生物科技有限公司; Quant-iT PicoGreen定量试剂盒 美国Invitrogen公司; EX taq酶、dNTPs、DNA Marker 日本Takara公司; 正、反向引物 生工生物工程(上海)股份有限公司; 高通量测序试剂 美国Roche公司。

1.2 仪器与设备

Kjeltec 8400全自动凯氏定氮仪 丹麦FOSS公司; HD-4水分活度测定仪 无锡市华科仪表有限公司; Starter2100 pH计 奥豪斯仪器有限公司; Optima8000电感耦合等离子体发射光谱仪、LS55荧光分光光度计 美国

Perkin Elmer公司; UNIVERSAL 32R高速冷冻离心机 德国Hettich公司; Minisubcell电泳仪 美国Bio-Rad公司; Bio-Best 200E凝胶成像系统 美国SIM公司; SCIOGEX MX-S型可调均质机 美国赛洛捷克公司; GS junior高通量测序仪 美国Roche公司。

1.3 方法

1.3.1 理化指标测定

参考文献[5]中方法, 采用烘干法测定窖泥中的水分质量分数, 纳氏试剂比色法测定氨态氮含量, 油浴法测定腐殖酸质量分数, 酸性氯化铵浸提-酸性钼酸铵和氯化亚锡溶液比色法测定有效磷含量。采用全自动凯氏定氮仪测定窖泥样品总氮含量^[4]; 用pH计测定窖泥样品pH值^[3]; 利用电感耦合等离子体发射光谱仪检测窖泥中的铁、钙元素含量^[6]。

1.3.2 窖泥总DNA提取、PCR扩增及定量测定

采用PowerSoil DNA Isolation Kit提取窖泥微生物总DNA, DNA样品于-20℃保存。对提取后的各样品DNA进行扩增, 扩增后的产物取5 μL用质量分数1%琼脂糖凝胶检测。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)中反向引物为1401RMID1。程序为: 94℃维持3 min; 30个循环: 94℃维持15 s, 56℃维持30 s, 72℃维持90 s; 72℃维持10 min; 4℃保温。采用QIAquick Gel Extraction胶回收试剂盒对PCR扩增目的产物进行回收纯化, 使用Quant-iT PicoGreen定量试剂盒对纯化后的PCR产物进行定量测定。

1.3.3 高通量测序

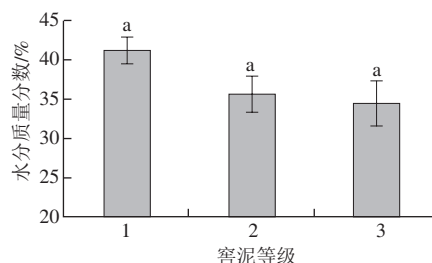
将经过定量测定的DNA文库样本进行扩增子质量浓度计算, 设计emPCR体系^[7], emPCR程序为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 58℃ 4.5 min, 68℃ 30 s, 50个循环; 10℃保存, 扩增完成后检测emPCR扩增结果。按上机要求稀释扩增子, 确定上样量, 进行测序。

1.4 数据处理

通过Mothur软件处理测序数据^[8], 对窖泥样品中细菌进行操作分类单位(operational taxonomic unit, OTU)分类, 进行进一步分析处理, 获得微生物不同的分类。理化指标检测结果显示为 $\bar{x} \pm s$, 采用SPSS 20软件对理化指标测定数据进行降维后的因子分析; 将窖泥微生物群落分析数据与理化指标数据进行Pearson相关性分析, 研究窖泥微生物群落结构与各理化指标的关系, 以 $P < 0.05$ 表示相关性显著; 对数据使用统计学分析方法进行方差分析, 观测样本群落结构^[9], 在Excel软件中编辑作图; 将窖泥样品中和细菌群落相关性达到显著或者极显著水平的理化指标, 及理化指标主成分分析所得的综合理化指标的数据标准化, 使用Ward方法对窖泥的各指标进行聚类分析^[10], 验证结论的可靠性。利用R软件^[11-13]对细菌群落和理化指标的相关性进行进一步的印证。

2 结果与分析

2.1 不同等级窖泥理化指标的差异分析

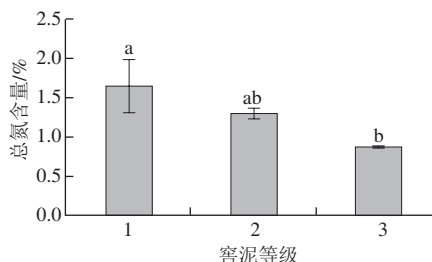


小写字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 下同。

图1 不同等级窖泥的水分质量分数

Fig. 1 Water content in pit mud

由图1可见, 一级窖泥的水分质量分数平均值略高于二级、三级窖泥, 但不同等级窖泥的水分质量分数差异不显著 ($P > 0.05$)。



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

图2 不同等级窖泥的总氮含量

Fig. 2 Total nitrogen content in pit mud

由图2可见, 在样品范围内, 窖泥总氮含量平均值随窖泥品质的提高而呈上升趋势, 一级窖泥总氮含量显著高于三级窖泥 ($P < 0.05$), 但与二级窖泥差异不显著 ($P > 0.05$)。

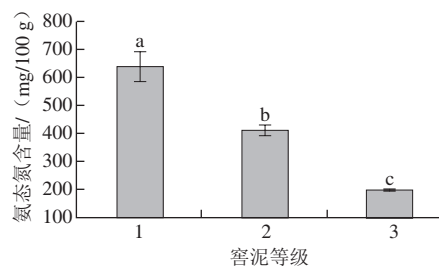


图3 不同等级窖泥的氨态氮含量

Fig. 3 Ammonium nitrogen content in pit mud

由图3可见, 作为总氮的主要组成部分, 窖泥氨态氮含量与不同等级窖泥总氮含量呈现出类似规律, 不同等级窖泥中氨态氮含量平均值差异显著 ($P < 0.05$), 即氨态氮含量随窖泥品质的提高而上升。

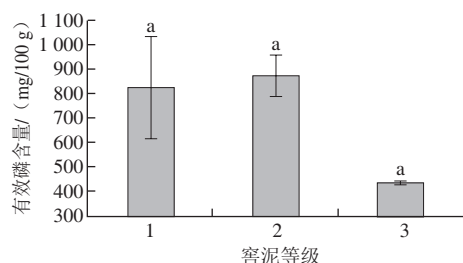


图4 不同等级窖泥的有效磷含量

Fig. 4 Available phosphorus content in pit mud

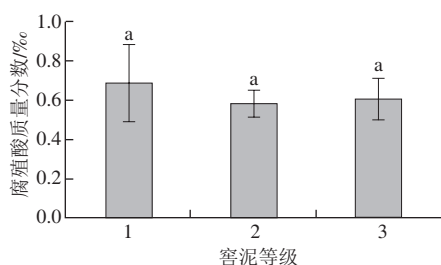


图5 不同等级窖泥的窖泥腐殖酸质量分数

Fig. 5 Humic acid content in pit mud

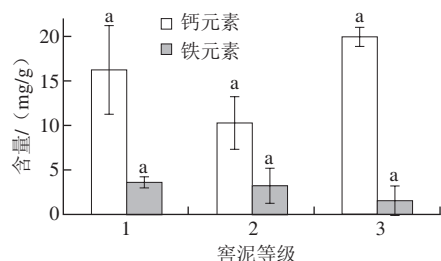


图6 不同等级窖泥钙、铁元素含量

Fig. 6 Calcium and iron contents in pit mud

由图4~6可见,在样品范围内,不同等级窖泥中有效磷含量、腐殖酸质量分数、钙和铁元素含量平均值差异都不显著($P>0.05$)。磷元素是微生物重要组成成分,窖泥中的微生物在死亡分解后,细胞中的磷元素会增加窖泥中有效磷的含量^[14]。因此,有效磷含量只能说明窖龄的长短,但不能说明窖泥质量的好坏。腐殖酸能为窖泥内部部分微生物提供有益的生存环境,是窖泥丰富微生物组成的一种特殊培养基,可起到缓冲作用和离子交换作用,同时具有良好的保水作用^[15],能够缓解乳酸钙、乳酸铁的形成,避免窖泥板结退化^[16]。因此腐殖酸虽需要达到一定质量分数,但其与窖泥品质的变化并不存在规律性。实验结果表明有效磷含量、腐殖酸质量分数、钙和铁元素含量并不能体现窖泥品质的优劣。

由图7可见,不同等级窖泥的pH值平均值差异显著($P<0.05$),窖泥质量越好,其pH值更接近于7。白酒的发酵过程中微生物的代谢会产生一定量的有机酸,品质较好的窖泥pH值接近于中性有两种可能,一是窖泥有

一定的酸缓冲能力,二是窖池内部发生的某些反应转化有机酸的能力较强。窖泥pH值能反映窖池发酵是否正常,影响着酿酒微生物自身的繁殖及其参与的生化反应。

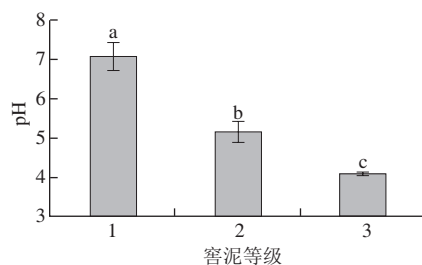


图7 不同等级窖泥的pH值

Fig. 7 pH of pit mud

2.2 不同等级窖泥样品中细菌OTU分类的差异分析

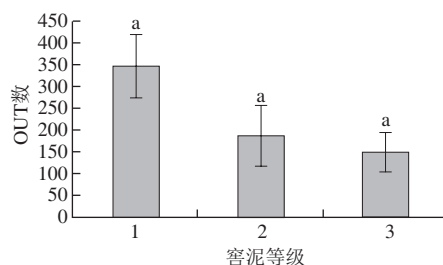


图8 窖泥样品OUT分布

Fig. 8 OUT distribution of pit mud samples

由图8可见,通过Mothur软件对测序数据进行处理,在基于3%的非相似度条件下,一共分成了2 050个OTU分类,其中一级窖泥获得的OTU数占总OTU数的50.6%,超过了二级、三级窖泥OTU数的总和,其中二级窖泥的OTU数占总OTU数的27.4%,三级窖泥的OTU数占总OTU数的22.0%。不难发现,虽然不同等级窖泥之间的OUT数目差异不显著($P>0.05$),但总体上窖泥中细菌OTU数随着窖泥品质的提升而呈现出上升趋势。

2.3 不同等级窖泥中细菌的分类差异分析

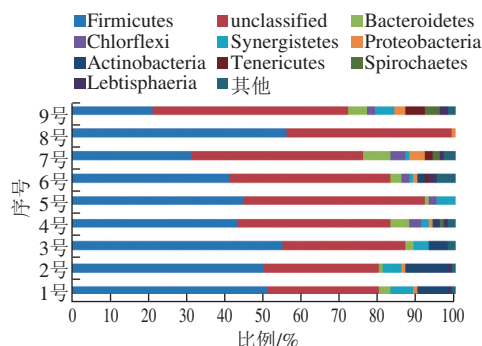


图9 不同品质窖泥微生物群落分类

Fig. 9 Phylum-level classification of microbial communities in pit mud with different qualities

将窖泥样品的OTU用Mothur软件进一步分析处理,获得微生物不同的分类(图9)。在9个窖泥样品中一共划分出了9类细菌,分别是厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chlorflexi)、互养菌门(Synergistetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌(Actinobacteria)、无壁菌门(Tenericutes)、螺旋体门(Spirochaetes)、Lebtisphaeria。其中一级窖泥包括6类,二级窖泥包括9类,三级窖泥包括8类。在所有对比出的细菌序列中(除去unclassified)可以发现,每个窖泥样品细菌群落中,占主导地位的都是Firmicutes,这类细菌具有细胞壁结构,并且大多数能够产生内生孢子抵抗极端环境。其中一级窖泥样品(1、2、3号)中Firmicutes占50%~55%,二级窖泥样品(4、6号)中Firmicutes占41%~43%,三级窖泥样品(7、9号)中Firmicutes占21%~31%。Bacteroidetes的大多数细菌寄生在动物肠道内,有部分属于病原菌。其中一级窖泥样品中Bacteroidetes占1%~3%,二级窖泥中Bacteroidetes占3%~5%,三级窖泥中Bacteroidetes占5%~7%。一级窖泥和二级窖泥中Proteobacteria都只占1%左右,而三级窖泥中Proteobacteria占3%~4%。一级窖泥中Actinobacteria所占比例为5%~11%,二级窖泥中Actinobacteria占2%左右,三级窖泥中未发现Actinobacteria存在。Tenericutes和Spirochaetes在不同品质窖泥中所占比例基本相同,一级窖泥中未发现两种菌的存在,二级窖泥中两种菌占1%左右,三级窖泥中两种菌分别占2%~5%和2%~4%。Lebtisphaeria在不同品质窖泥中所占比例比较一致,都在1%左右。可见,不同品质的窖泥中微生物群落结构存在较大差异,与胡晓龙^[17]的结论类似。

2.4 窖泥理化指标主成分分析结果

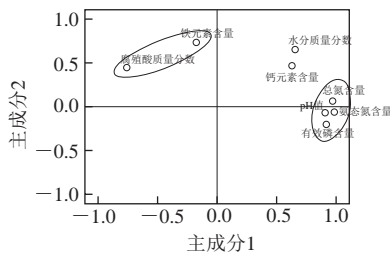


图10 窖泥样品理化指标主成分分布图

Fig. 10 Principal component analysis plot of PC1 versus PC2 for physicochemical indexes

窖泥样品理化指标提取到的主成分1和主成分2特征值分别是5.091和2.278,均大于1,且累积方差占81.883%,说明成分划分合理。按照主成分1和主成分2的划分,氨态氮含量、总氮含量、有效磷含量、pH值在同一区域(图10)。氨态氮、总氮、有效磷为微生物提供营养,pH值是微生物生长代谢的重要环境因素,这个区域的理化指标都是影响微生物生长的重要因素,因此可将主成分1命名为微生物生长相关因子。腐殖酸质量分数

和铁元素含量在同一个区域,腐殖酸和铁元素是窖泥老熟的参考指标,二者的含量和窖龄有一定的关联,因此可将主成分2命名为窖龄指示因子。按照主成分1和主成分2划分出的理化指标具有一定的科学性。

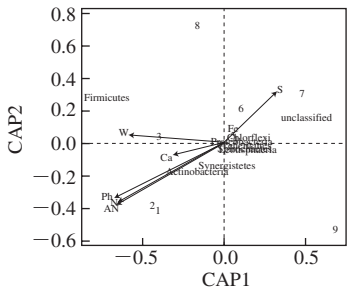
2.5 窖泥微生物群落指标与理化相关性分析结果

表2 窖泥微生物群落比例与理化指标相关性分析
Table 2 Correlation analysis between microbial community and physicochemical indicators of pit mud

细菌比例	总氮含量	氨态氮含量	有效磷含量	腐殖酸质量分数	pH值	铁元素含量
Firmicutes比例	0.758*	0.771*	0.546	-0.425	0.685*	-0.083
Bacteroidetes比例	-0.390	-0.408	-0.386	0.291	-0.349	0.267
Chlorflexi比例	-0.707*	-0.576	-0.528	0.330	-0.694*	-0.136
Synergistetes比例	0.752*	0.736*	0.696*	-0.389	0.500	-0.167
Proteobacteria比例	-0.883**	-0.792*	-0.589	0.764*	-0.593	0.487
Actinobacteria比例	0.952**	0.924**	0.902**	-0.471	0.785*	0.024
Tenericutes比例	-0.538	-0.574	-0.574	0.477	-0.526	0.244
Spirochaetes比例	-0.596	-0.684*	-0.555	0.503	-0.681*	0.201
Lebtisphaeria比例	-0.061	-0.088	-0.178	-0.017	-0.18	0.259

注: *.相关性显著($P<0.05$); **.相关性极显著($P<0.01$)。

由表2可见,总氮含量分别和Firmicutes、Synergistetes比例呈显著正相关($P<0.05$),和Chlorflexi比例呈显著负相关($P<0.05$),和Proteobacteria比例呈极显著负相关($P<0.01$),和Actinobacteria比例呈极显著正相关($P<0.01$)。氨态氮含量分别和Firmicutes、Synergistetes比例呈显著正相关($P<0.05$),和Proteobacteria、Spirochaetes比例呈显著负相关($P<0.05$),和Actinobacteria比例呈极显著正相关($P<0.01$)。有效磷含量和Synergistetes比例呈显著正相关($P<0.05$),和Actinobacteria比例呈极显著正相关($P<0.01$)。腐殖酸质量分数和Proteobacteria比例呈显著正相关。pH值和Firmicutes、Actinobacteria比例呈显著正相关($P<0.05$),和Chlorflexi、Spirochaetes比例呈显著负相关($P<0.05$) (表2)。所有微生物群落中,Actinobacteria对理化指标变化最敏感,另外Firmicutes、Synergistetes、Proteobacteria对理化指标变化也较为敏感。



1~9.分别为1~9号样品; W.水分质量分数; N.总氮含量; AN.氨态氮含量; Ph. pH值; S.腐殖酸含量; Ca.钙元素含量; Fe.铁元素含量。

图11 窖泥理化指标和微生物群落冗余分析结果

Fig. 11 Redundancy analysis of physicochemical indexes and bacterial community of pit mud

从图11可以看出, 样品理化指标中氨态氮、总氮、有效磷含量和pH值对微生物群落的影响力非常相似, 并且影响力度最大, 其次分别为水分质量分数、腐殖酸质量分数、钙和铁元素含量。对于Synergistetes和Actinobacteria, 氨态氮、总氮、有效磷含量和pH值与其比例存在较高的相关性; 对于Firmicutes, 可以看出水分质量分数与其比例有相关性; 而腐殖酸质量分数与unclassified比例存在相关性。本实验结果印证了理化指标中的氨态氮、总氮、有效磷含量和pH值对细菌存在较大的相关性, 可以反映不同质量窖泥中细菌微生物群落的差异性, 从而可作为侧面反映窖泥品质的质量指标。

2.6 窖泥理化指标聚类分析结果

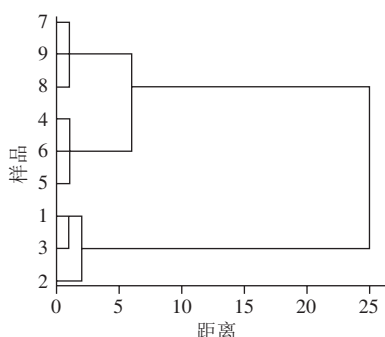


图12 窖泥按理化指标聚类分析树

Fig. 12 Cluster analysis dendrogram for pit mud samples based on three selected physicochemical indexes

通过SPSS 20软件中Ward法对各个窖泥样品中的总氮、氨态氮含量和pH值进行聚类分析。从图12可以看出, 窖泥分成了3类, 1、2、3号窖泥聚为一类, 4、5、6号窖泥聚为一类, 7、8、9号窖泥聚为一类, 聚类情况和窖泥品质划分一致, 可见这几种理化指标作为窖泥品质的划分标准是合理的。

3 讨论

不同品质窖泥的理化指标存在显著差异^[18]。本实验研究了部分不同品质窖泥主要理化指标的差异并进行主成分分析。高品质窖泥的水分质量分数略高, 与感官评定结果比较符合。窖泥中的水分除了起物质输送作用外, 还对窖泥中的微生物生长、代谢起着重要的作用^[19], 若水分质量分数过低会表现出不同程度的板结现象, 造成微生物生长繁殖困难, 导致部分微生物失活, 从而影响到窖泥质量, 因此窖泥中的水分必须要达到一定的质量分数才能保障微生物进行正常的生理代谢。

总氮、氨态氮含量随窖泥品质的提高而上升, 微生物可有效利用氮元素, 并促进速效养分的释放及转运, 加快对有毒有害物质的降解^[20], 从而直接影响常作为窖

泥品质鉴定标准之一的微生物多样性及其丰富度。作为总氮的组成部分, 氨态氮可以被窖泥微生物直接利用, 其含量在一定程度上体现了窖泥对微生物生长代谢所需氮源的供给能力^[21]。因此总氮含量以及氨态氮含量与窖泥品质具有一定的相关性。

不同品质窖泥样品有效磷、矿质元素含量和腐殖酸质量分数与窖泥品质没有明显相关性, 研究表明有效磷含量与土壤中微生物的生物量及代谢物量呈正相关^[22]。腐殖酸作为腐殖质的主要成分, 由微生物代谢物日积月累而形成, 在土壤学中, 其含量能够反应窖泥肥力^[23]。腐殖质能为部分微生物营造良好的生长环境, 提供相应的营养成分, 具有一定的保水作用, 可避免窖泥快速板结退化, 因此腐殖质必须要达到一定的含量。但本实验中不同品质窖泥的有效磷含量与窖泥品质没有明显的相关性, 这可能与本实验中材料的采集时间为后阶段有较大关系。钙、铁元素的含量与窖泥的年份呈现出一定的相关性^[24-25], 从侧面说明“老窖泥”不一定是“好窖泥”, 可能是因为老窖泥的多次使用导致污染, 以及随着窖泥年份的增加其中部分有益菌退化。由此可见, 本实验中有效磷含量、腐殖酸质量分数、钙和铁元素含量并不能体现不同等级窖泥的差异性。

窖泥品质越好, 其pH值越接近于7, 与文献^[26]的结论相似。弱酸性环境是窖泥微生物正常代谢繁殖的必要条件, 在发酵过程中对产酸有较大作用^[27], 酸作为酯产物的前体物质更是不可或缺的成分。若酸度太高, 不耐酸微生物无法进行正常的生化作用, 达不到产酯产香的生态平衡。因此, 品质较好的窖泥pH值接近中性, 可能是窖泥有一定的酸缓冲能力, 或者窖池内部发生的某些反应转化有机酸的能力较强。窖泥pH值能反映窖池发酵是否正常, 影响着酿酒微生物自身的繁殖及其参与的生化反应。因此企业一直把pH值作为重要的测定指标, 以了解发酵是否正常, 从而进一步调整工艺, 保障生产正常进行。对本实验中所涉及的理化指标进行主成分分析, 得出氨态氮、总氮、有效磷含量、pH值、腐殖酸质量分数、铁元素含量对窖泥品质的影响比较大。

窖泥作为微生物的主要栖息场所, 对白酒质量有重要影响。本实验对9个窖泥样品中的细菌进行分类, 一共划分出了9类, 分别是Firmicutes、Bacteroidetes、Chlorflexi、Synergistetes、Proteobacteria、Actinobacteria、Tenericutes、Spirochaetes、Leptisphaeria。随着窖泥品质的提升, Firmicutes、Actinobacteria所占比例有所增大。芽孢杆菌纲和梭菌纲为Firmicutes的主体^[28], 窖泥中含有较多的梭菌^[29], 其对浓香型白酒香气的形成起着非常重要的作用, 其主要代谢产物是己酸、丁酸和氢气^[30]。Weimer等^[31]得到的*Clostridium kluyveri*的产己酸质量浓度更是达到了

12.9 g/L。因此, Firmicutes比例较高可能是优质窖泥酿酒口感优于其他窖泥酒的主要原因之一。Bacteroidetes、Proteobacteria所占比例随着窖泥品质的提升有一定程度减少。Chlorflexi和Synergistetes比例无明显变化趋势。

对窖泥样品微生物群落与理化指标进行相关性分析,表明理化指标中总氮、氨态氮作为主要营养物质对窖泥微生物群落影响较大。窖泥中的养分并不是越高越好,微生物对养分的响应不同,需要靠工艺去调整营养物质的含量,从而平衡微生物的群落结构,保障发酵正常进行。pH值对窖泥微生物群落的影响也较大,因此白酒酿造工艺中很注重对发酵pH值的控制,如控制投粮的淀粉含量、糟醅的入窖温度等。

本研究结果提示了在样品范围内,总氮、氨态氮含量与pH值可作为表征窖泥品质的理化指标,即存在一部分窖泥,在本实验所测数据范围内,窖泥品质越好,总氮和氨态氮的含量越高,pH值越接近于7,为窖泥的质量评价提供了相应的数据参考。但由于样品仅来源于一个工厂,且样品量较少,仅仅考虑了部分不同品质窖泥的差异,因此本研究结果还有待进一步检验和完善。

参考文献:

- [1] 张宿义. 泸型酒技艺大全[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 1-2.
- [2] 吴树坤, 刘梅, 邓杰, 等. 不同品质浓香型窖泥的酶活与微生物群落的相关性[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 19-24. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.015418.
- [3] 钟姝霞, 邓杰, 卫春会, 等. 不同窖龄窖泥微生物群落结构与理化指标的相关分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(7): 119-125. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2016.07.018.
- [4] 邓杰. 基于高通量测序的浓香型白酒窖泥微生物群落结构研究[D]. 自贡: 四川理工学院, 2015: 54-56.
- [5] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 25.
- [6] 刘晔, 柳小明, 胡兆初, 等. ICP-MS测定地质样品中37个元素的准确度和长期稳定性分析[J]. 岩石学报, 2007(5): 1203-1210. DOI:10.3969/j.issn.1000-0569.2007.05.034.
- [7] MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN W E, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. Nature, 2005, 437: 376-380. DOI:10.1038/nature03959.
- [8] XU C L, SUN R, QIAO X J, et al. Protective effect of glutamine on intestinal injury and bacterial community in rats exposed to hypobaric hypoxia environment[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(16): 4662-4674. DOI:10.3748/wjg.v20.i16.4662.
- [9] OBERAUNER L, ZACHOW C, LACKNER S, et al. The ignored diversity: complex bacterial communities in intensive care units revealed by 16S pyrosequencing[J]. Scientific Reports, 2013, 3: 1413. DOI:10.1038/srep01413.
- [10] 邓杰, 卫春会, 边名鸿, 等. 浓香型白酒不同窖龄窖池窖泥中古菌群落结构分析[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 37-42. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201708007.
- [11] VENABLES W N, SMITH D M. An introduction to R: a programming environment for data analysis and graphics[J]. Economic Journal, 2009, 401: 650-652.
- [12] WILLIAMS G J. Rattle: a data mining GUI for R[J]. The R Journal, 2009, 1(2): 45-55.
- [13] 闫朝晖. R软件在多元统计分析教学中的应用研究[J]. 科技创新导报, 2011(1): 157-158. DOI:10.16660/j.cnki.1674-098x.2011.01.122.
- [14] 韩光, 张宿义, 卢中明. 窖泥微生物、窖泥酶活性与窖泥养分相关性研究[J]. 酿酒科技, 2011(3): 48-51; 54. DOI:10.13746/j.njkj.2011.03.023.
- [15] 张强, 沈才洪, 刘清斌, 等. 窖泥质量评价研究进展[J]. 酿酒科技, 2013(7): 84-86. DOI:10.13746/j.njkj.2013.07.051.
- [16] 景晓卫, 唐玉明, 任道群, 等. 人工老窖发展及其研究现状[J]. 酿酒科技, 2010(9): 77-80. DOI:10.13746/j.njkj.2010.09.018.
- [17] 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: 23-24.
- [18] 廖昶, 吴生文, 黄小晖, 等. 特香型酒功能窖泥和普通窖泥理化指标对比分析[J]. 酿酒科技, 2010(2): 86-90. DOI:10.13746/j.njkj.2010.02.021.
- [19] 景晓卫, 唐玉明, 任道群, 等. 人工老窖发展及其研究现状[J]. 酿酒科技, 2010(9): 77-80. DOI:10.13746/j.njkj.2010.09.018.
- [20] 张世伟. 酿酒葡萄微生物群落多样性及其氮代谢通量研究[D]. 北京: 中国矿业大学, 2018: 19.
- [21] 王春阳, 周建斌, 董燕婕, 等. 黄土区六种植物凋落物与不同形态氮素对土壤微生物量碳氮含量的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(24): 7092-7100.
- [22] 程伟. 土壤有效磷含量对土壤微生物量及代谢活性的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013: 22-25.
- [23] 宋海燕, 尹友谊, 宋建中. 不同来源腐殖酸的化学组成与结构研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2009(1): 61-66.
- [24] 陶勇, 徐占成, 刘孟华, 等. 剑南春窖泥理化特性及矿质元素变化趋势研究[J]. 酿酒科技, 2011(7): 51-54. DOI:10.13746/j.njkj.2011.07.029.
- [25] 张艳, 刘弘, 刘中利, 等. 诗仙太白窖泥矿质元素变化趋势研究[J]. 食品工业, 2015, 36(3): 262-265.
- [26] 赵长青, 杨秦欢, 邓静, 等. 窖泥的评定指标检测[J]. 生物技术进展, 2012, 2(3): 212-216. DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2012.03.10.
- [27] PINDER R S, PATTERSON J A. Growth of acetogenic bacteria in response to varying pH, acetate or carbohydrate concentration. agriculture[J]. Food and Analytical Bacteriology, 2013(3): 6-16.
- [28] WOLF M, MÜLLER T, DANDEKAR T, et al. Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 871-875. DOI:10.1099/ijs.0.02868-0.
- [29] 熊亚. 泸州老窖不同窖龄窖泥中细菌及古菌种群多样性和系统发育研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014: 93-99.
- [30] 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. DOI:10.13746/j.njkj.2008.02.022.
- [31] WEIMER P J, STEVENSON D M. Isolation, characterization, and quantification of Clostridium kluyveri from the bovine rumen[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012, 94(2): 461-466. DOI:10.1007/s00253-011-3751-z.