

# 新老窖泥细菌群落结构差异及其对基酒主要香味成分的影响

郭莹<sup>1</sup>, 惠明<sup>1</sup>, 田青<sup>1</sup>, 黄继红<sup>1</sup>, 王洪照<sup>2</sup>

(1.河南工业大学 生物工程学院, 郑州 450001;

2.河南豫坡酒业有限责任公司, 河南 驻马店 463900)

**摘要:**探究新窖(3年)和老窖(50年)所产基酒的主要香味成分,以了解窖泥细菌群落结构差异对基酒主要香味成分的影响.采用气相色谱法检测河南豫坡酒厂新窖池和老窖池所产基酒的主要香味物质;扩增细菌 16S rRNA V3-V4 高变区基因并进行高通量测序,研究新老窖泥细菌群落结构.结果表明,老窖所产基酒的己酸乙酯、乙酸乙酯等酯类物质及助香的高级醇类含量均高于新窖;新窖泥中芽孢杆菌纲(Bacilli,  $P \leq 0.01$ )、乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.,  $P \leq 0.01$ )显著高于老窖泥,老窖泥中梭菌纲(Clostridia, 44.44%)、产己酸菌属(*Caiproiciproducens* sp., 31.45%)、产乙酸嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum* sp., 28.12%)、及氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp., 16.08%)具有显著优势,其中 *Limnochordia* ( $P \leq 0.05$ )、氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp.,  $P \leq 0.05$ )显著高于新窖泥,分析得出老窖泥中与白酒增香有关的细菌菌群多样性和丰度较高.因此,窖泥的高质量微生物群落结构是影响白酒质量的决定性因素.

**关键词:**基酒;气相色谱;高通量测序;窖泥;细菌群落

**中图分类号:**TS201.3

**文献标志码:**A

我国浓香型白酒的酿造是采用典型的天然固体发酵和固态蒸馏工艺,人们常说“老窖产好酒”,是指老窖的窖泥具有复杂的微生物群落,这些微生物可以代谢产生决定白酒质量的微量香味化合物.目前常用的微生物生态学研究方法有:16S rRNA 基因克隆文库分析法、磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)分析法、高通量测序法、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)法等.其中,高通量测序法可以在较短时间内产生大量数据,并且能够全面反映出所测样品中微生物群落信息<sup>[1]</sup>.窖泥微生物群落是影响白酒品质的关键因素,研究窖泥微生物群落可以为白酒生产和品质改善提供理论依据.目前已有一些报道关于窖泥中细菌、古菌、真菌微生物群落的研究, TAN 等<sup>[2]</sup>利用 DGGE、高通量测序和实时荧光定量 PCR(qPCR)技术对枝江白酒酒厂 10、20 和 30 年的窖泥中的细菌群落进行首次分析;邓杰等<sup>[3]</sup>利用高通量测序技术解析四川某酒厂 5 年、30 年及 100 年窖泥中古生菌的群落结构并进行差异分析,发现古生菌的多样性与窖龄呈负相关,广古菌门是窖泥中的优势菌群;LIU 等<sup>[4]</sup>采用 DGGE 和 Illumina MiSeq 测序法测定浓香型白酒发酵窖泥中的真菌群落,两种方法均表明,5 年窖龄和 100 年窖龄窖泥中真菌物种多样性差异不显著( $p > 0.05$ ).尽管这些分子方法已经研究了窖泥中各种微生物种群,但细菌是窖泥中主要的微生物菌群,细菌菌群多样性对基酒主要香味成分的影响仍待探索.本文是以地方特色酒“豫坡老基酒”为对象,解析了豫坡酒酿造中窖泥细菌群落组成对豫坡酒主要风味物质的影响,为企业酒质提升和维持稳定提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

位于同一生产车间的 3 个新窖池(3 年)窖泥及对应窖池所产基酒;位于不同生产车间的 3 个老窖池(50 年)

收稿日期:2020-07-03;修回日期:2020-10-15.

基金项目:河南省重大科技专项课题(181100211400-8-2)

作者简介:郭莹(1996—),女,河南南阳人,河南工业大学硕士研究生,研究方向为微生物学.

通信作者:惠明,河南工业大学教授,E-mail:huiming@haut.edu.cn.

窖泥及对应窖池所产基酒,编号分别为  $L_1, L_2, L_3$  和  $H_1, H_2, H_3$ . 样品取自河南豫坡酒厂,以 5 点取样法<sup>[5]</sup>进行取样,共计 6 个代表样品,置于无菌密封袋,贮存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  备用. 15 组分白酒混合标液;内标物:2% 乙酸正丁酯(兰州东立龙公司);

主要仪器:GC9720Plus 福立气相色谱仪(浙江福立分析仪器股份有限公司).

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 样品溶液的制备

吸取 5 mL 基酒置于 10 mL 容量瓶内,用移液枪准确加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  ( $0.353\text{ }0\text{ g/L}$ ) 色谱纯 2% 乙酸正丁酯,基酒样品定容至 10 mL 后摇匀,待上机检测.

### 1.2.2 色谱条件

色谱柱:AT.LZP-930 白酒专用柱( $18\text{ m}\times 0.53\text{ mm}\times 1\text{ }\mu\text{m}$ );检测器:氢火焰离子化检测器;色谱柱温度: $50\text{ }^\circ\text{C}$  保持 5 min,以  $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升到  $140\text{ }^\circ\text{C}$ ;进样口温度: $200\text{ }^\circ\text{C}$ ;检测器温度: $200\text{ }^\circ\text{C}$ ;载气(高纯氮气)流量: $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;进样量: $1.0\text{ }\mu\text{L}$ ;分流比:20:1.

### 1.2.3 DNA 提取与高通量测序

用 FastDNA®SPIN Kit for Soil 土壤 DNA 快速提取试剂盒(MP Biomedicals, USA)提取河南豫坡酒厂的 6 个窖泥代表样品的总 DNA,PCR 扩增细菌 16S V3-V4 高变区基因,采用的引物为细菌的 338F 和 806R.PCR 扩增条件参照杨小丽等<sup>[6]</sup>的方法.PCR 扩增完成后产物纯化回收,依托上海美吉生物医药科技有限公司通过 Illumina Miseq 平台完成高通量测序.生物信息学分析基于上海美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)进行.

## 2 结果与分析

### 2.1 气相色谱检测基酒主要风味物质

气相色谱法测白酒主要风味物质采用的 15 组分白酒混标色谱图如图 1 所示.

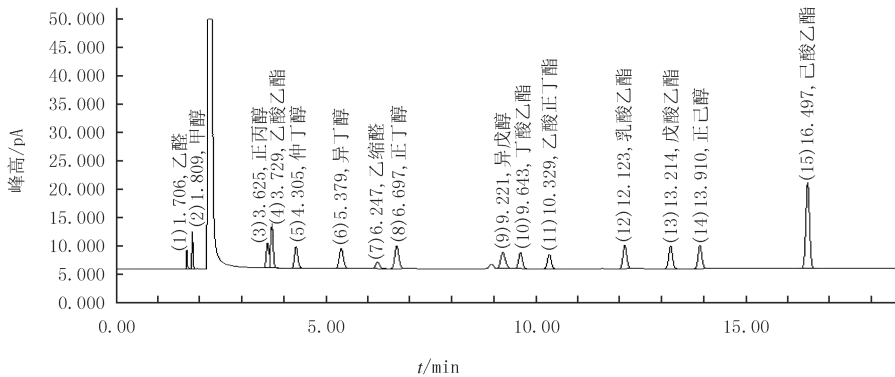


图1 15组分白酒混合标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatogram of 15-component liquor mixed standard solution

浓香型风格的白酒中己酸、乳酸、乙酸、丁酸这四大酸的乙酯类物质是其主要的酯类香味物质,这些乙酯类化合物使白酒具有花果香和甜味,它们在酒体中的质量浓度及比例关系决定了白酒的品质和风格.四大乙酯类化合物中,低阈值的己酸乙酯质量浓度越高,浓香型风格越突出,其前提物己酸是具有六个碳和一个羧基的一种饱和脂肪酸,己酸的产生和调节对提高浓香型白酒质量至关重要.表 1 分析得到整体上老窖池组基酒的己酸乙酯质量浓度高于新窖池组,香味更浓郁醇厚.白酒中醇类作为助香成分的重要来源,老窖池组基酒中含量较高的高级醇类有正丙醇、仲丁醇、正己醇、正丁醇,酒中的高级醇通常通过发酵过程中氨基酸的降解以及经 EMP 途径转化为葡萄糖而产生<sup>[7]</sup>.白酒中香味物质的含量受到许多因素的影响,窖泥微生物群落的影响至为重要.

### 2.2 窖泥细菌群落 $\alpha$ -多样性分析

在本次测序中共获得了 299 812 条高质量序列,每个窖泥样品为 37 236 条至 69 512 条.对 6 个窖泥样品

进行序列抽平后为 35 145 条序列,以进行后续数据分析.表 2 老窖泥中 Sobs 指数和 Chao 指数均低于新窖泥,说明老窖泥中细菌物种丰富度低于新窖泥,并且老窖泥中反映细菌群落多样性的指数包括香农指数(Shannon)和辛普森指数(Simpson)均低于新窖泥.老窖泥中细菌多样性较低的原因可能是在窖泥老熟、菌群结构驯化过程中,杂菌逐渐减少,窖泥微生物群落之间实现融合.

表 1 新窖池和老窖池所产基酒的主要香气成分测定

Tab. 1 Determination of the main aroma components of the base wine produced in the new and old cellars

组分名	质量浓度/(mg · L <sup>-1</sup> )					
	L <sub>1</sub> 基酒	L <sub>2</sub> 基酒	L <sub>3</sub> 基酒	H <sub>1</sub> 基酒	H <sub>2</sub> 基酒	H <sub>3</sub> 基酒
乙醛	153.65±7.74	135.02±2.67	309.46±6.93	170.24±19.78	173.75±22.64	230.86±27.94
甲醇	86.64±3.19	76.58±2.43	64±2.80	128.03±5.25	246.24±7.47	195.84±5.26
正丙醇	226.17±5.94c	259.95±6.62c	221.41±5.67c	406.83±14.14a	338.18±22.20b	235.49±18.47c
乙酸乙酯	918.08±22.87b	3 568.50±162a	4 019.90±135a	3 063.05±191.82a	2 585.77±23.51a	3 559.32±71.88a
仲丁醇	84.32±2.39b	17.81±1.83d	17.35±1.61d	82.14±2.99b	73.64±2.68c	111.28±3.40a
异丁醇	82.63±4.14	229.14±4.76	246.66±8.67	179.03±5.35	118.82±8.39	134.21±4.15
乙缩醛	254.00±11.93	225.87±11.36	603.93±22.64	318.09±22.57	236.26±9.74	276.83±13.27
正丁醇	365.58±14.39b	211.29±5.26c	134.98±7.68d	499.9±7.95a	475.01±22.55a	329.46±12.07b
异戊醇	137.48±6.00	509.52±7.27	624.93±24.79	471.65±8.11	261.71±12.64	258.78±9.32
丁酸乙酯	362.08±10.10	453.62±15.74	285.56±5.98	554.15±27.92	247.77±3.05	172.78±15.58
乳酸乙酯	506.16±17.74e	3 125.58±78.76b	2 293.59±113.33c	1 667.82±67.33d	2 047.71±165.33c	3 729.82±175.16a
戊酸乙酯	76.87±2.19	59.78±4.98	45.59±6.12	107.49±2.37	36.31±0.63	39.07±1.38
正己醇	110.87±4.66d	60.82±1.57e	99.42±7.26d	178.26±1.63b	161.52±5.06c	212.17±4.49a
己酸乙酯	931.65±42.11c	765.83±30.75d	1 609.82±49.62b	2 419.92±107.23a	1 646.85±25.60b	1 678.43±35.69b

注:数据表示为  $\bar{x} \pm s$ , a, b, c, d, e 表示显著性差异,  $p < 0.05$ .

表 2 窖泥样品细菌多样性指数表

Tab. 2 Bacterial diversity index of pit mud samples

窖泥样品	优质序列数目	覆盖率/%	Sobs	Chao	Shannon	Simpson
新窖泥	41 499±3 943	99.70±0.03	560±87.16	628.60±82.14	3.39±0.31	0.13±0.06
老窖泥	58 438±11 426	99.74±0.06	367±17.04	450.03±36.02	3.06±0.40	0.11±0.04

注:数据表示为  $\bar{x} \pm s$ .

### 2.3 窖泥细菌群落 $\beta$ -多样性分析

使用样本层级聚类分析了窖泥样品中细菌群落之间的相似性,如图 2(a),6 个窖泥样品中的细菌群落形成两个簇, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> 和 L<sub>3</sub> 聚为一簇, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> 和 H<sub>3</sub> 聚为另一簇. PCoA 分析进一步支持了聚类图谱,如图 2(b). 但是,通过样本层级聚类分析或主坐标分析,位于不同生产车间但窖龄相同的 3 个老窖泥样品聚集相对分散,表明老窖的 3 个窖泥样品间细菌菌群结构差异较大.有关文献表明<sup>[8]</sup>,窖泥微生物群落结构会随地理位置改变而改变,推测老窖泥样品聚集相对分散是由窖池生产车间不同、位置差异引起的.

### 2.4 窖泥细菌群落门/纲/属水平组成

经 OTU 注释,所有样品中共检测到 14 个可鉴定门.如图 3(a)所示,4 个优势菌门分别为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、放线菌门(Actinobacteriota)、变形菌门(Proteobacteria)(数量分数均 > 1%的门),占每个样品总含量的 99.9% 以上.分析细菌门水平物种,厚壁菌门(Firmicutes)在新窖泥及老窖泥中均为优势类群,与新窖泥相比,老窖泥中拟杆菌门(Bacteroidota, 32.48% vs 0.03%)具有显著优势.

在纲水平上,共 41 个可鉴定纲,10 个优势纲(数量分数均 > 1%的纲,图 3(b)),分别为梭菌纲(Clostrid-ia)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、拟杆菌纲(Bacteroidia)、Limnochordia、单孢菌纲(Syntrophomonadia)、放线菌纲(Actinobacteria)、变形菌纲(Gammaproteobacteria)、Symbiobacteriia、红椿菌纲(Coriobacteriia)、 $\alpha$ -变形菌

纲(Alphaproteobacteria).新窖泥中芽孢杆菌纲(Bacilli, 53.85%)和梭菌纲(Clostridia, 41.31%)的数量分数均在2%以上,占每个样品的93.01%~96.25%;老窖泥中梭菌纲(Clostridia, 44.44%)、拟杆菌纲(Bacteroidia, 32.48%)、Limnochordia(16.58%)的含量均在2%以上,占每个样品的93.55%~96.78%.

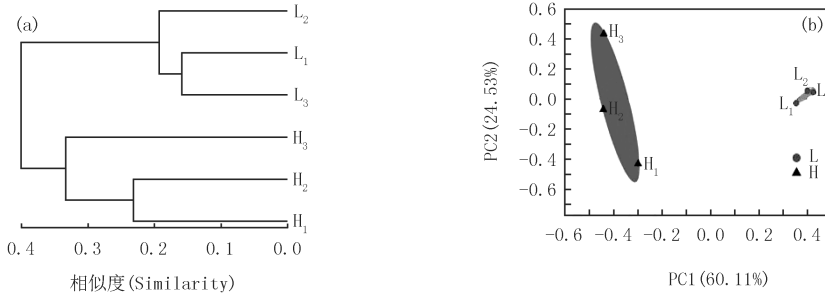


图2 不同窖泥样品的层级聚类分析(a)和主坐标分析(b)

Fig.2 Hierarchical cluster analysis (a) and Principal coordinate analysis (b) of different pit mud samples

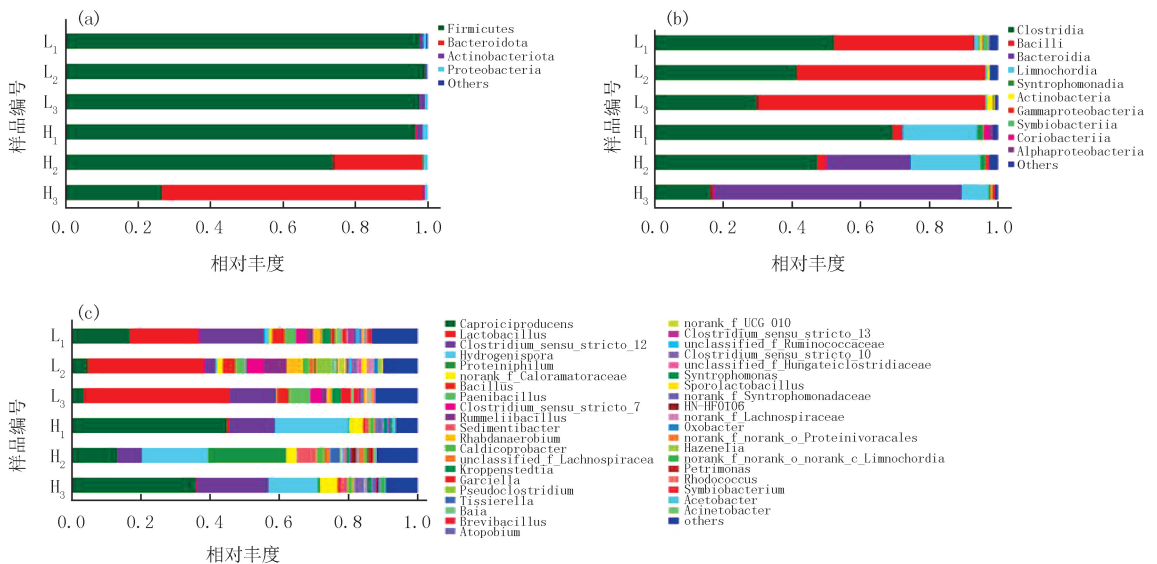


图3 窖泥样品细菌门(a)、纲(b)和属(c)水平丰度比例

Fig.3 Proportion of bacterial abundance at the phylum(a), class (b) and genus (c) level in pit muds

在属水平上,共检测出353个可鉴定属,40个优势属(含量均>1%的属,图3(c)).其中含量>2%的属分别为乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)、产己酸菌属(*Caproiciproducens* sp.)、产乙酸嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum* sp.)、*Clostridium\_sensu\_stricto\_12*、氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.)、沉积菌属(*Sedimentibacter* sp.)*Clostridium\_sensu\_stricto\_7*(*Clostridium\_thermopalmarium*)、*Rummeliibacillus* sp.,*norank\_f\_Caloramatoraceae*、*Rhabdanaerobium* sp.、三角菌属(*Petrimonas* sp.)、克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia* sp.)、*norank\_f\_Marinilabiliaceae*、*Garciella* sp.、*Pseudoclostridium* sp.、*Christensenellaceae\_R-7\_group*、泰氏菌属(*Tissierella* sp.)、*Clostridium\_sensu\_stricto\_13*、*norank\_f\_UCG-010*、*norank\_f\_norank\_o\_Proteinivoracales*.与老窖泥相比,新窖泥中乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)具有显著优势,乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)在新窖泥和老窖泥中的丰度分别为31.82%,0.3%.据文献报道可知<sup>[9]</sup>,乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)在窖龄小的窖泥中丰度较大,为优势菌属,在窖龄大的窖泥(≥20年)中其丰度相对较低(<14%),乳酸在窖泥中积累过多,不仅会使窖泥钙化板结,加快窖泥退化速度,且会导致己酸与乳酸的乙酯类物质质量比关系不协调,使白酒口感上酸涩,大大降低白酒品质;与新窖泥相比,老窖泥中产己酸菌属(*Caproiciproducens* sp.)、产乙酸嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*

sp.)、氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp.)具有显著优势,产己酸菌属(*Caproiciproducens* sp.)在老窖泥和新窖泥中的丰度分别为 31.45%,8.59%,产乙酸嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum* sp.)在老窖泥和新窖泥中的丰度分别为 28.12%,0.01%,氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp.)在老窖泥和新窖泥中的丰度分别为 16.08%,0.62%。在这些微生物中,产生己酸的细菌是整个发酵过程中最重要的细菌,由于己酸与乙醇在产酯酵母代谢产生的酯化酶催化反应下生成己酸衍生物己酸乙酯,己酸产生菌还可产生丁酸、戊酸等微量元素,其代谢将极大地影响最终酒的质量<sup>[10]</sup>。己酸菌通常与产甲烷菌共生,并通过物种之间的“氢转移”效应有效地增加浓香型白酒中己酸乙酯的含量<sup>[11]</sup>。生产高品质的白酒,一些特殊的菌群必须在窖泥中培养 20 年以上<sup>[12]</sup>。新老窖泥细菌菌群结构存在差异,老窖泥经过 50 年的长期驯化,使得老窖泥中存在较高丰度的与白酒增香有关的关键菌群。这些关键菌群使老窖产出高品质的白酒,浓香型风格更突出,香味更浓郁醇厚。这也是“老窖产好酒”的根本原因。

## 2.5 窖泥细菌群落属水平的 Heatmap 图分析

群落热图是基于物种丰富度的相似性来进行聚类和分析,对分类学水平上丰度前 30 的细菌属水平物种进行热图分析(图 4),奇异菌属(*Atopobium* sp.)、产乙酸嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum* sp.)在新窖的 3 个窖池中相对丰度均极低,*Pseudoclostridium* sp.、*Baia* sp.、芽孢杆菌属(*Sporolactobacillus* sp.)在老窖的 3 个窖池中相对丰度均极低;乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.)在新窖的 3 个窖池中均为优势菌属,氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp.)、产己酸菌属(*Caproiciproducens* sp.)、*Clostridium\_sensu\_stricto\_12* 在老窖的 3 个窖池中均为优势菌属,体现出新窖及老窖窖泥组内细菌属水平物种的相似性。

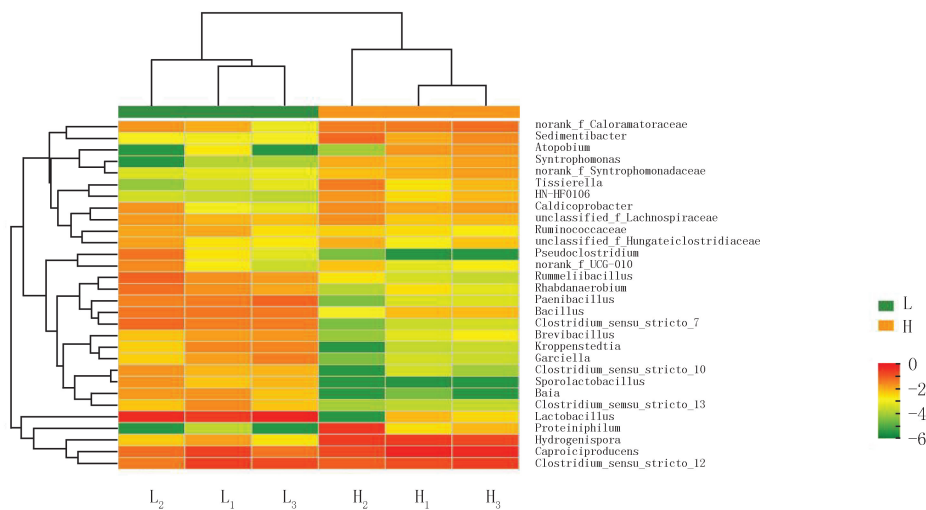


图4 基于优势属的热图分析

Fig.4 Heatmap analysis based on dominant genera

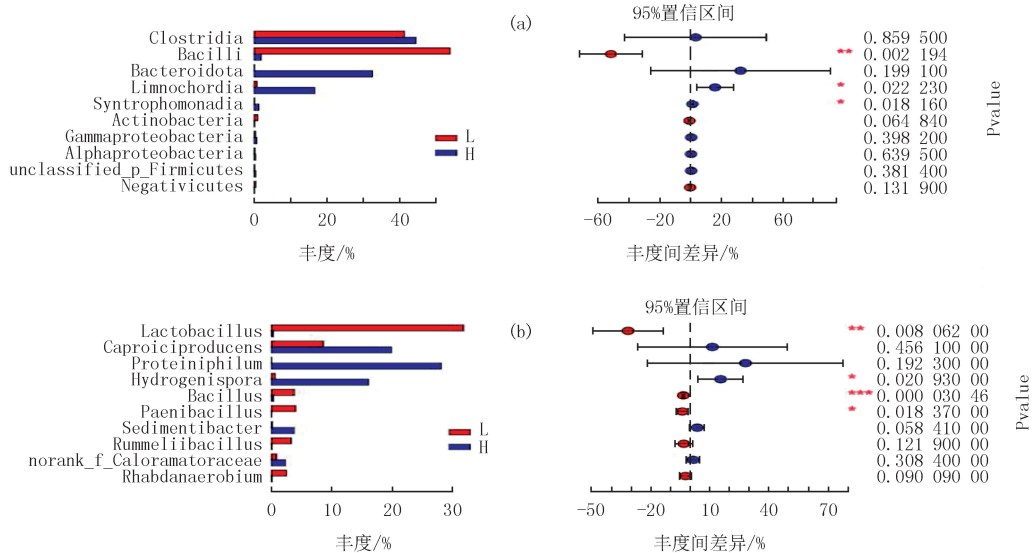
## 2.6 新窖和老窖窖泥纲/属水平菌群差异分析

通过物种差异分析揭示新窖和老窖窖泥之间在纲(图 5(a))及属(图 5(b))水平上具有显著差异的细菌类群。结果表明,新窖窖泥中芽孢杆菌纲(*Bacilli*,  $P \leq 0.01$ )、乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.,  $P \leq 0.01$ )、芽孢杆菌属(*Bacilli* sp.,  $P \leq 0.001$ )、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.,  $P \leq 0.05$ )丰度显著高于老窖窖泥组, *Limnochordia* ( $P \leq 0.05$ )、氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp.,  $P \leq 0.05$ )丰度显著低于老窖窖泥组。其中乳酸产生菌可以抑制己酸的生产<sup>[13]</sup>。这可能也是导致新窖所产基酒主体香成分己酸乙酯含量较低的原因。这些在新窖泥及老窖泥中具有显著差异的菌群可能是在窖泥老熟过程中不断驯化形成的,研究新窖及老窖窖泥的差异菌群对培养人工窖泥、缩短窖泥老熟时间具有积极意义。

## 3 结 论

试验通过气相色谱法分析检测了 3 年和 50 年各 3 个不同窖池所产基酒的主要香味物质成分,结果发

现,老窖所产基酒的己酸、乙酸的乙酯类物质含量均高于新窖,且助香的高级醇类含量较高;新窖泥中芽孢杆菌纲(*Bacilli*,  $P \leq 0.01$ )、乳酸菌属(*Lactobacillus* sp.,  $P \leq 0.01$ )显著高于老窖泥,老窖泥中梭菌纲(*Clostridia*, 44.44%)、产己酸菌属(*Caproiciproducens* sp., 31.45%)、产乙酸嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum* sp., 28.12%)、及氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp., 16.08%)具有显著优势,其中 *Limnochordia* ( $P \leq 0.05$ )、氢孢菌属(*Hydrogenispora* sp.,  $P \leq 0.05$ )显著高于新窖泥,综合分析得出老窖泥中与白酒增香有关的细菌菌群多样性和丰度较高。本研究证实了老窖池可以产出品质较好的白酒,窖泥的微生物菌群结构是影响白酒品质的关键因素。因此,养护窖泥,保持窖泥高质量菌群结构的稳定对白酒品质提升非常重要。



注:  $0.01 < P \leq 0.05$  标记为\*,  $0.001 < P \leq 0.01$  标记为\*\*,  $P \leq 0.001$  标记为\*\*\*,  $n=3$ 。

图5 新窖和老窖窖泥纲(a)和属(b)水平物种差异显著性检验图

Fig. 5 Student's t-test bar plot on class (a) and genus (b) level between the new and old pit mud

## 参 考 文 献

- [1] KLINDWORTH A, PRUESSE E, SCHWEER T, et al. Evaluation of genera 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): 1-11.
- [2] TAN G, HU Y, HUANG Y, et al. Analysis of bacterial communities in pit mud from Zhijiang Baijiu distillery using denaturing gradient gel electrophoresis and high-throughput sequencing[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2019, 126(1): 90-97.
- [3] 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.
- [4] DENG J, WEI C H, BIAN M H, et al. Archaeal community analysis of pit mud from cellars of different ages for Luzhou-flavor liquor[J]. *Food Science*, 2017, 38(8): 37-42.
- [5] LIU M K, TANG Y M, 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] 黄莹娜, 熊小毛, 胡远亮, 等. 基于 PCR-DGGE 和高通量测序分析白云边窖泥细菌群落结构与多样性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 375-383.
- [7] HUANG Y N, XIONG X M, HU Y L, et al. Bacterial community and diversity in pit mud of Baiyunbian liquor analyzed by PCR-DGGE and high-throughput sequencing[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 375-383.
- [8] 杨小丽, 尚雪娇, 余海忠, 等. 基于 Miseq 高通量测序技术的古襄阳窖泥细菌多样性评价[J]. *中国酿造*, 2018, 37(7): 26-30.
- [9] YANG X L, SHANG X J, YU H Z, et al. Bacterial diversity in pit mud of Guxiangyang Baijiu analyzed by Miseq high-throughput sequencing[J]. *China Brewing*, 2018, 37(7): 26-30.
- [10] 齐晓茹, 严超, 宋春华, 等. OAV 法分析河北地区 3 种白酒香气成分[J]. *酿酒科技*, 2018(9): 95-100.
- [11] QI X R, YAN C, SONG C H, et al. OAV analysis of the flavoring components in 3 liquor products from Hebei[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2018(9): 95-100.
- [12] 黄治国, 王艳丽, 卫春会, 等. 不同地域窖泥细菌群落结构差异及其与理化因子相关分析[J]. *酿酒科技*, 2015(11): 18-21.
- [13] HUANG Z G, WANG Y L, WEI C H, et al. Diversity of bacteria community structure in pit mud from different regions and analysis of its

- correlations with physicochemical factors[J].Liquor-Making Science and Technology,2015(11):18-21.
- [9] ZHENG Y,HU X,JIA Z,et al.Co-occurrence patterns among prokaryotes across an age gradient in pit mud of Chinese strong-flavor liquor[J].Canadian Journal of Microbiology,2020,66(9):495-504.
- [10] YAN S B,DONG D.Improvement of caproic acid production in a *Clostridium kluyveri* H068 and Methanogen 166 co-culture fermentation system[J].Amb Express,2018,8(1):175.
- [11] 赵东,郑佳,彭志云,等.高通量测序技术解析五粮液窖泥原核微生物群落结构[J].食品与发酵工业,2017,43(9):1-8.  
ZHAO D,ZHENG J,PENG Z Y,et al.Prokaryotic microbial community in Wuliangye pit mud using NextSeq high-throughput sequencing technology[J].Food and Fermentation Industries,2017,43(9):1-8.
- [12] DING X F,WU C D,HUANG J,et al.Eubacterial and archaeal community characteristics in the man-made pit mud revealed by PCR-DEEG and FISH analyses[J].Food Research International,2014,62:1047-1053.
- [13] YAO W,CHEN M,ZHEN D,et al.Isolation of lactate-producing microbes from fermented grains of Luzhou-flavor liquor and their effect on simulative solid-state fermentation[J].Liquor Making,2010,37(3):37-41.

## The effect of the bacterial community structure of new and old pit mud on its flavor substance of base wine

Guo Ying<sup>1</sup>, Hui Ming<sup>1</sup>, Tian Qing<sup>1</sup>, Huang Jihong<sup>1</sup>, Wang Hongzhao<sup>2</sup>

(1. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Yupo Distillery Co.Ltd., Zhumadian 463900, China)

**Abstract:** This research is aimed to investigate the effect of the bacterial community structure in pit mud on the main aroma components in base liquor fermented in the new cellar pool(three years old)and the old cellar pool(fifty years old), respectively. The main aroma components and bacterial community structure of the samples from Chinese Yupo Distillery were analyzed by Gas Chromatography(GC) and 16S rRNA V3-V4 region for high-throughput sequencing, respectively. Results manifested that the base liquor from the old cellar contains higher content of flavoring substances such as ethyl caproate, ethyl acetate, and fatty alcohols than that of the new cellar. The content of Bacilli( $P \leq 0.01$ ), *Lactobacillus* sp. ( $P \leq 0.01$ )in the new cellar mud were significantly higher than that of the old cellar mud. Clostridia(44.44%), *Caproiciproducens* sp. (31.45%), *Proteiniphilum* sp. (28.12%), and *Hydrogenospora* sp. (16.08%)were predominant in bacterial community in the old cellar mud, and Limnochordia( $P \leq 0.05$ ), *Hydrogenospora* sp. ( $P \leq 0.05$ )in the old cellar mud were significantly higher than that of the new cellar mud. The analysis of bacterial community revealed that both the diversity and the abundance of bacterial community related to liquor flavour compounds were higher in the old cellar mud compared with that of the new mud. This study highlighted that the excellent microbial community structure in pit mud is the decisive factor affecting the quality of liquor.

**Keywords:** base wine; gas chromatography; high-throughput sequencing; pit mud; bacterial community

[责任编辑 刘洋 杨浦]