

研究报告

不同时期窖泥理化因子、风味物质和细菌组成的相关性

吴浪涛^{1,2,3,4}, 丁文骏^{1,2}, 谢专^{1,2}, 张钊远^{1,2}, 王芊婷^{1,2}, 周凤莲^{1,2}, 房峻^{1,2,3,4}, 方芳^{*1,2,3,4}

1 江南大学未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

2 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

3 食品合成生物技术教育部工程研究中心, 江苏 无锡 214122

4 江苏省食品合成生物技术工程研究中心, 江苏 无锡 214122

吴浪涛, 丁文骏, 谢专, 张钊远, 王芊婷, 周凤莲, 房峻, 方芳. 不同时期窖泥理化因子、风味物质和细菌组成的相关性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1030-1047

Wu Langtao, Ding Wenjun, Xie Zhuan, Zhang Zhaoyuan, Wang Qianting, Zhou Fenglian, Fang Jun, Fang Fang. Characterization and correlation analysis of the bacterial composition, physicochemical properties and volatiles in *Baijiu* fermentation pit mud of different ages[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1030-1047

摘要:【背景】窖泥品质是影响浓香型白酒质量的重要因素之一, 窖泥的理化特性、微生物群落结构和风味物质等与窖泥的品质有关。【目的】揭示不同时空浓香型白酒窖泥理化因子、细菌群落结构和挥发性风味物质三者之间的关系。【方法】比较演替期(10年)和成熟期(30年)的窖泥理化因子, 利用顶空固相微萃取-气相色谱质谱联用分析窖泥中挥发性风味物质, 采用 PacBio SMRT 高通量测序分析窖泥细菌组成, 通过 Spearman 相关性分析法分析三者间的相关性。【结果】成熟期窖泥的含水量、有效磷和有效钾及己酸、己酸乙酯、丁酸乙酯等关键风味物质含量均高于演替期窖泥, 乳酸和己醇等物质含量则低于演替期窖泥。演替期窖泥中丰度最高的是拟杆菌纲的嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)和理研菌属(*Petrimonas*), 而成熟期窖泥中丰度最高的是梭菌纲的己酸菌属(*Caproiciproducens*)和梭菌属(*Clostridium*)。梭菌纲微生物(*Caproiciproducens* 和 *Clostridium* 等)与窖泥中己酸和己酸乙酯等风味物质呈正相关, 与乳酸呈负相关。窖泥理化特性对关键风味物质和梭菌纲大多数菌属有直接或间接影响, 其中窖泥含水量、有效磷和有效钾与梭菌纲菌属呈正相关。【结论】窖泥含水量、有效磷和有效钾含量是影响窖泥中梭菌纲微生物组成和浓香型白酒特征风味物质己酸与己酸乙酯含量的关键因素。这些发现促进了对演替期和成熟期窖泥在菌群结构

基金项目: 国家自然科学基金(31771955); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(1012050205210170); 江南大学大学生创新训练计划(1015081501200640)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31771955); Jiangsu College Students' Innovative Entrepreneurial Training Plan Program (1012050205210170); Jiangnan University Students' Innovative Training Plan (1015081501200640)

*Corresponding author: E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

Received: 2021-08-23; Accepted: 2021-10-11; Published online: 2021-12-06

和风味物质组成演变的理解, 有助于促进浓香型白酒发酵调控和窖泥改良。

关键词: 窖泥; 理化因子; 挥发性风味物质; 微生物群落; 斯皮尔曼相关性

Characterization and correlation analysis of the bacterial composition, physicochemical properties and volatiles in *Baijiu* fermentation pit mud of different ages

WU Langtao^{1,2,3,4}, DING Wenjun^{1,2}, XIE Zhuan^{1,2}, ZHANG Zhaoyuan^{1,2},
WANG Qianting^{1,2}, ZHOU Fenglian^{1,2}, FANG Jun^{1,2,3,4}, FANG Fang^{*1,2,3,4}

1 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Engineering Research Center of Ministry of Education for Food Synthetic Biotechnology, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 Engineering Research Center of Food Synthetic Biotechnology of Jiangsu Province, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] The quality of pit mud (PM) is one of the critical factors affecting the quality of Luzhou-flavor *Baijiu*. The physicochemical properties, microbiome, and volatiles determine the quality of PM. **[Objective]** To reveal the relationship between physicochemical properties, microbiome, and volatiles of PM at different ages. **[Methods]** The physicochemical properties of growing PM (10 years) and mature PM (30 years) were compared. Volatiles were analyzed by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). PacBio SMRT high-throughput sequencing was conducted to analyze the microbiome. Spearman's correlation analysis was performed with the obtained data. **[Results]** Moisture, available phosphorus and potassium, and the key flavor volatiles (caproic acid, ethyl caproate, and ethyl butyrate) in mature PM were higher than those in growing PM, whereas lactic acid and hexanol showed the opposite trend. *Proteiniphilum* and *Petrimonas* (*Bacteroidia*) were most abundant in growing PM, whereas *Caproiciproducens* and *Clostridium* (*Clostridia*) were most abundant in mature PM. The relative abundance of *Clostridia* (*Caproiciproducens* and *Clostridium*) was positively correlated with the content of caproic acid and ethyl caproate, and negatively correlated with the content of lactic acid. The physicochemical properties of PM influenced most species of *Clostridia* in PM. Moisture and available phosphorus and potassium were positively correlated with the content of key volatiles and the relative abundance of *Clostridia*. **[Conclusion]** Moisture, available phosphorus and potassium are the key factors affecting both the composition of *Clostridia* and the content of key volatiles (caproic acid and ethyl caproate) in Luzhou-flavor *Baijiu*. These findings improve our understanding of the microbial succession and volatile profile in PM, which facilitates the fermentation regulation and PM quality improvement of Luzhou-flavor *Baijiu*.

Keywords: pit mud; physicochemical properties; volatiles; microbial community; Spearman correlation

浓香型白酒窖香浓郁、绵甜醇厚、香味协调,是深受消费者喜爱的白酒类型^[1]。长期的生产实践发现,不同窖池生产的浓香型白酒存在品质差异,而白酒品质与窖池的窖龄具有显著的相关性^[2]。窖池差别主要体现在窖泥的差异性,窖龄实际为窖泥的年份。窖泥中的微生物是一个特殊的群体,它们之间存在着复杂的相互作用,这些微生物通过生长、代谢和群落演替对酿造的浓香型白酒特征风味产生显著影响^[3-4]。因此,对窖泥微生物多样性的解析就显得极为重要。以 PacBio SMRT 为代表的三代测序技术具有读长长、通量高和精度高等优点,可使样品中微生物的“种”和“属”水平分析更加精准^[5]。随着窖龄的增长,窖泥的理化指标逐渐发生变化,它们决定着窖泥品质(窖泥中风味物质种类与含量)也直接影响微生物群落结构。揭示三者间的相互关系和它们间的关键影响因素,对客观与全面评价窖泥品质和系统阐明窖泥微生物对浓香型白酒品质的影响具有重要理论意义。

窖泥达到老熟之前,其菌群结构会随窖龄的增加存在一个演替的过程。研究发现,演替期(窖龄 1 年到 25 年)窖泥菌群丰度随窖龄增加逐渐增加,成熟期(25 年到 50 年)窖泥的菌群结构基本无明显变化^[6],更长窖龄(400 年)窖泥菌群的结构也并未观察到明显的差距^[7]。这是一个在长期的往复发酵过程中衍生出更多的群体最终使菌群结构达到稳定的老熟状态,从而代谢产生多种风味物质,如酯类、酸类和醇类,产生更高质量的白酒^[8-10]。老熟窖泥中通常含有更高丰度的己酸菌(*Caproiciproducens*)和梭菌(*Clostridium*),它们是人工窖泥中强化的细菌,可以合成浓香型白酒主体香味物质己酸乙酯的前体己酸^[11-12]。窖泥也会因所处的环境不同(如窖底泥长期浸泡在黄水中,上层窖壁

泥则不会接触到黄水)而具有不同的微生物群落结构。对不同位置(窖壁上、中、下层和窖底)窖泥的微生物群落多样性解析发现,不同位置窖泥的微生物群落结构存在一定差异^[13]。研究发现,窖泥的理化因子对功能微生物的生存有一定影响,如窖泥的含水量可影响土壤的酸碱度和微生物的生长^[14];适宜的 pH 环境不仅能促进酒精发酵,还能促进白酒中香气前体物质的形成,提高原酒的质量^[15];窖泥中的铵态氮是微生物生长和合成各种蛋白质与酶所必需的,适量的铵态氮对维持窖泥质量和提高白酒品质起着重要作用^[16];窖泥中的磷和钾同样有利于微生物的生长^[15,17]。研究发现,随着窖龄的增加,窖泥含水量、有效钾和有机质含量也随之增加,铵态氮含量呈先增加后减少再增加的波动变化^[18]。有研究证实,pH 值、铵态氮和乙酸含量等与老窖泥的菌群呈正相关,而乳酸、乙醇和丙酸含量与新窖泥的菌群呈正相关^[19]。此外,窖泥对白酒的影响还与窖泥本身的风味有关,窖泥中的部分风味物质会丰富白酒的风味进而提高白酒的品质^[20]。窖泥中风味物质种类与含量一方面与陈酿过程中积累的微生物群落结构有关^[21],另一方面与其在窖池空间位置和窖龄存在一定的相关性^[20,22-23]。因此,目前的研究热点在于从窖龄、窖泥微生物和窖泥品质的特性中寻找与浓香型白酒品质及其重要特征风味物质相关的信息,期望为全面和系统解释老窖出好酒的内在原因和阐明可能存在的机制。

本研究应用 PacBio SMRT 高通量测序对同时空窖泥微生物群落结构、理化因子及挥发性风味物质进行分析和比较,通过深入解析三者之间相关性揭示三者间的内在联系,以期阐明老窖的优势及窖泥微生物的功能和影响因素提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

窖泥样品由江苏某浓香型白酒企业提供。氢氧化钠、酚酞、浓硫酸、苯酚、氯化铵、钼酸铵、EDTA 二钠盐、酒石酸锑钾、醋酸钠、硫酸铵、四苯硼钠、磷酸氢二钠、重铬酸钾, 国药集团化学试剂有限公司; 土壤微生物 DNA 提取试剂盒(PowerSoil[®] Pro Kit), 天根生化科技(北京)有限公司。

高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计, Thermo Fisher 公司; 紫外分光光度计, 岛津公司; 凯氏定氮仪, OMNILAB 公司; 气相色谱质谱联用仪, LECO 公司。

1.2 方法

1.2.1 窖泥的采集

采用多点取样法^[24]采集演替期(1–25 年)窖泥和成熟期(25–50 年)窖泥^[6]共 12 个样品。其中包括 10 年窖壁泥样品 10B 和窖底泥样品 10D 各 3 个, 30 年窖壁泥样品 30B 和窖底泥样品 30D 各 3 个。取样后立即置于装有厌氧产气袋的无菌袋中, 于–80 °C 贮存待用。

1.2.2 窖泥理化性质分析

采用烘干法和电位法分别测定窖泥含水量及 pH 值^[25]。采用酸、碱中和滴定法测定总酸含量^[26]。总氮通过凯氏定氮法检测, 铵态氮利用紫外-可见光分光光度法测定^[25]。还原糖采用二硝基水杨酸法测定, 有效钾采用四苯硼钠比浊法测定^[27], 有效磷测定采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗比色法^[28]。乳酸、乙酸、丁酸和己酸通过高效液相色谱法测定^[26]。

1.2.3 窖泥中挥发性风味物质的测定

称取窖泥样品 2 g 加入 8 mL 盐溶液(0.85% NaCl, 1.00% CaCl₂), 再加入 10 μ L 2-辛醇标准品, 通过顶空固相微萃取(HS-SPME) (固相

CAR/PDMS: 75 μ m CAR/PDMS, 碳分子筛/聚二甲基硅烷萃取头), 于 50 °C 顶空萃取吸附 30 min, 在 250 °C 解吸 1 min 后^[23]利用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)进行分析。化合物的定性与定量参考 NIST 和 Willey 标准谱库, 检索出相似指数(similarity index, SI)大于 800 的挥发性化合物, 根据内标 2-辛醇与样品中挥发性物质峰面积之比计算出物质含量^[26]。

GC 条件^[26]: 进样口温度为 250 °C, 色谱柱规格为 TG-WAMS (60 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, Thermo), 以氦气为载气, 不分流进样; 升温程序为: 40 °C 恒温 2 min, 以 3 °C/min 速率升温至 130 °C, 以 6 °C/min 速率升温至 200 °C, 再以 8 °C/min 速率升温至 230 °C 维持 8 min。MS 条件: EI 电离源, 离子源温度为 260 °C, 界面温度为 200 °C, 离子源能量为 70 eV, 电子源扫描范围为 33–450 amu。

1.2.4 窖泥细菌基因组 DNA 的提取与文库制备

将窖泥从–80 °C 冰箱取出并用液氮冷冻, 在低温下研磨成粉。准确称取窖泥粉末 3 g, 参照土壤微生物 DNA 提取试剂盒说明书提取微生物宏基因组。使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, 将达到测序要求的 DNA 样品送至北京百迈客生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因全长三代测序分析。

采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGRGTTTGATYNTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TASGGHTACCTTGTTASGACTT-3') 进行 PCR 扩增^[29]。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times Ex Taq Mix (0.1 U/ μ L) 12.5 μ L, ddH₂O 11 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 模板 DNA (10 ng/ μ L) 0.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物纯化后, 用 SMRT Bell Express Template Prep Kit 2.0 制备 SMRT

Bell 待测序 DNA 文库。

1.2.5 高通量测序数据分析

将 PacBio SMRT 下机数据导出, 用 Lima V1.7.0 软件通过 barcode 对 CCS 进行识别, 得到 barcode-CCS 序列数据。然后对 barcode-CCS 进行过滤得到有效序列; 最后使用 UCHIME V4.2 软件鉴定并去除嵌合体序列, 得到 optimization-CCS 序列。利用 USEARCH 软件对所有样品的全部有效序列进行聚类, 在 97% 的相似条件下将序列聚类成为操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 同时选取最丰富序列 (most abundant) 为 OTU 代表序列^[30]。以 SILVA 132 为参考数据库使用朴素贝叶斯分类器结合比对的方法对序列进行分类学注释, 置信阈值为 70%^[31]。使用 Mothur V1.30 软件, 对样品 α 多样性指数进行评估。使用 QIIME 软件进行 β 多样性分析, 比较不同样品在物种多样性方面存在的相似程度^[32]。

1.2.6 相关性分析

对窖泥样品中相对丰度大于 1% 且具有差异或关键的菌属分别与窖泥理化因子和主要挥发性风味物质进行斯皮尔曼 (Spearman) 相关性分析, 计算相关系数 R 值和显著性差异 P 值, 使用 GraphPad Prism 7.0 和 R 语言等软件进行分析和绘图^[26]。

2 结果与讨论

2.1 窖泥理化指标分析

窖泥理化因子是与其微生物群落结构相关并影响白酒发酵的重要因素, 也是窖泥品质好坏的直观表现。乳酸、乙酸、丁酸和己酸是浓香型白酒中的主要有机酸, 对浓香型白酒的风味和品质具有重要影响^[33]。对不同窖龄和空间窖泥中 4 种主要有机酸的分析表明, 10 年窖泥的乳酸含量显著高于 30 年窖泥, 而己酸含量

则显著低于 30 年窖泥; 同一窖龄的窖壁泥和窖底泥中己酸含量无显著差异 (表 1)。乙酸和丁酸在 30 年和 10 年窖泥中的含量无显著差异。在白酒酿造过程中产生的各种有机酸会影响窖泥中总酸的含量并使窖泥呈酸性, 不仅关系到窖泥微生物的生长, 而且对产酒质量有着重要影响。本研究发现窖壁泥总酸含量显著高于窖底泥, 其中 30 年窖壁泥总酸含量最高; pH 值与总酸结果一致, 窖壁泥的 pH 值低于窖底泥。窖泥水分对白酒的酿造过程也有重要影响, 水分过高会导致窖泥难挂壁、垮窖; 水分过低则会使窖泥板结, 从而导致窖泥中微生物死亡。优质窖泥的含水量在 46%–55% 范围为宜^[18]。在本实验窖泥样品中, 除了 10 年窖底泥外 (含水量为 44.14%), 其他样品含水量都在优质窖泥范围内。总氮、铵态氮和还原糖是窖泥功能微生物生长的重要因素。由表 1 可以看出, 30 年窖底泥的总氮和铵态氮含量均高于 10 年窖底泥, 而窖壁泥两者含量差异不大; 10 年窖壁泥还原糖含量显著高于窖底泥, 30 年窖泥则与之相反。有效磷是合成蛋白质的重要物质并参与己酸的合成, 因此窖泥中有效磷的含量对己酸菌数量和己酸及己酸乙酯的含量均有影响^[18]。窖泥中的有效磷和有效钾含量与窖泥质量具有正相关性^[34–35]。本研究中 30 年窖泥的有效磷和有效钾含量都显著高于 10 年窖泥, 而且窖壁泥中的含量高于窖底泥。通过比较窖泥常规理化指标发现, 30 年窖泥与 10 年窖泥存在较大差异, 但同窖龄的壁泥和底泥之间差异较小。

2.2 窖泥挥发性风味物质分析

窖泥中所含有的风味物质与微生物的代谢和酒醅中风味物质组成密切相关, 对白酒的风味组成具有重要意义。对不同窖泥中的挥发性风味物质的分析表明, 在不同的窖泥样品中共

表 1 不同窖泥样品的理化指标

Table 1 Physicochemical properties of different pit mud samples

Physicochemical properties	30B	30D	10B	10D
Acetic acid (g/kg)	3.36±0.52ab	2.73±0.33b	3.54±0.23a	2.76±0.28b
Butyric acid (g/kg)	2.55±0.30a	2.58±0.08a	2.55±0.12a	2.25±0.13b
Lactic acid (g/kg)	20.25±1.26c	13.56±1.56d	30.67±2.54a	22.04±0.45b
Caproic acid (g/kg)	1.82±0.43a	1.83±0.23a	0.73±0.03b	0.67±0.14b
pH	5.11±0.34b	6.29±0.39a	5.21±0.26b	5.80±0.42a
Moisture (%)	51.11±3.06a	52.31±4.24a	50.25±2.64a	44.14±3.28b
Total nitrogen (g/kg)	18.59±1.29a	24.10±2.37a	20.00±1.20a	18.04±1.01a
Ammonium (g/kg)	1.04±0.06b	1.45±0.15a	1.10±0.12b	0.91±0.09b
Total acid (g/kg)	11.70±0.80a	4.03±0.24c	8.66±1.32b	4.35±0.05c
Reducing sugar (g/kg)	1.44±0.08b	2.71±0.24a	2.45±0.78ab	1.58±0.55b
Available-P (g/kg)	1.87±0.11a	1.46±0.28a	1.21±0.19b	0.88±0.05b
Available-K (g/kg)	1.20±0.12a	1.10±0.23a	0.88±0.10b	0.78±0.13b

注: 不同小写字母代表窖泥样品的理化因子存在显著性差异($P<0.05$)

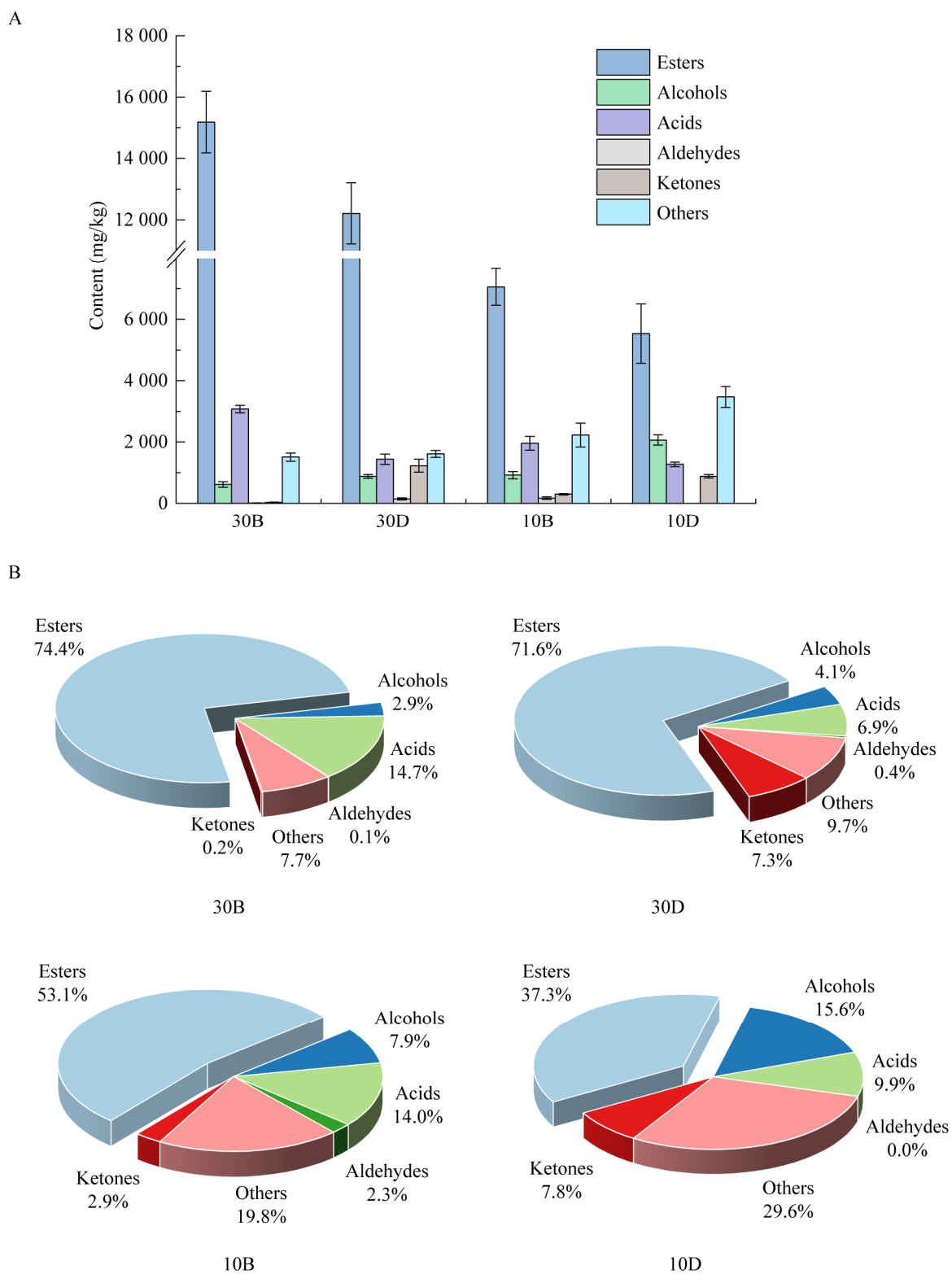
Note: Different lowercase letters represent significant differences in physicochemical properties of pit mud samples ($P<0.05$).

检测到包括酯类、醇类、酸类、醛类、酮类及其他化合物在内的 101 种风味物质。其中 30 年窖泥挥发性风味物质总量显著高于 10 年窖泥, 窖壁泥风味物质总量高于窖底泥但并不显著(图 1A)。通过比较发现, 30 年窖泥中酯类化合物含量(71.6%–74.4%)显著高于 10 年窖泥的含量(37.3%–53.1%) (图 1B)。由图 1C 可以看出, 乙酸乙酯、丁酸乙酯、庚酸乙酯、癸酸乙酯、己酸己酯、己酸戊酯等主要酯类在 30 年窖泥中的含量都高于 10 年窖泥。其中 30 年窖泥中己酸乙酯和辛酸乙酯的含量分别是 10 年窖泥的 4.4 倍和 3.7 倍。己酸乙酯是浓香型白酒的主要香气成分, 其含量对浓香型白酒的品质有重要的影响^[36]。辛酸乙酯的香气强度仅次于己酸乙酯, 对浓香型白酒的风味同样具有重要贡献^[37]。

酸类化合物在 30 年和 10 年窖泥中的含量无显著差距, 其中窖壁泥含量(14.0%–14.7%)高于窖底泥含量(6.9%–9.9%)。酸类化合物主要由己酸、辛酸、乙酸、丁酸、庚酸构成, 其中己酸在新老窖泥中的分布存在显著区别, 30 年

窖泥中己酸的含量是 10 年窖泥的 2.62 倍。辛酸、乙酸、丁酸、庚酸在 30 年窖泥中的含量都高于 10 年窖泥(图 1C)。这些有机酸不仅与其对应的酯相关, 而且 30 年窖泥中相对较高的有机酸能够起到协调白酒口味的作用^[38]。

窖泥中醇类化合物主要由乙醇和一些高级醇构成(正己醇、正丁醇、正庚醇、正癸醇等)。由图 1B 可知, 10 年窖泥的醇类化合物含量(7.9%–15.6%)高于 30 年窖泥(2.9%–4.1%)。醇类化合物含量随窖龄增加而减少可能是在陈酿过程中转化成了相应的酯类化合物。醛酮类化合物主要由苯甲醛、己醛、辛醛、2-庚酮、2-己酮、2-壬酮等高级醛酮化合物构成。其中窖底泥中酮类化合物的含量(7.3%–7.8%)显著高于窖壁泥(0.2%–2.9%)。其他的挥发性物质主要包括烯烃类、烷烃类和酚类化合物等, 这些对白酒风味也有贡献的物质在窖泥中含量较低, 在演替期(10 年)和成熟期(30 年)窖泥中的含量无明显差异。对甲酚在这 3 类物质中含量最高, 其具有一种特殊的烟熏味, 对增加白酒的后味有一定的贡献^[39–40]。



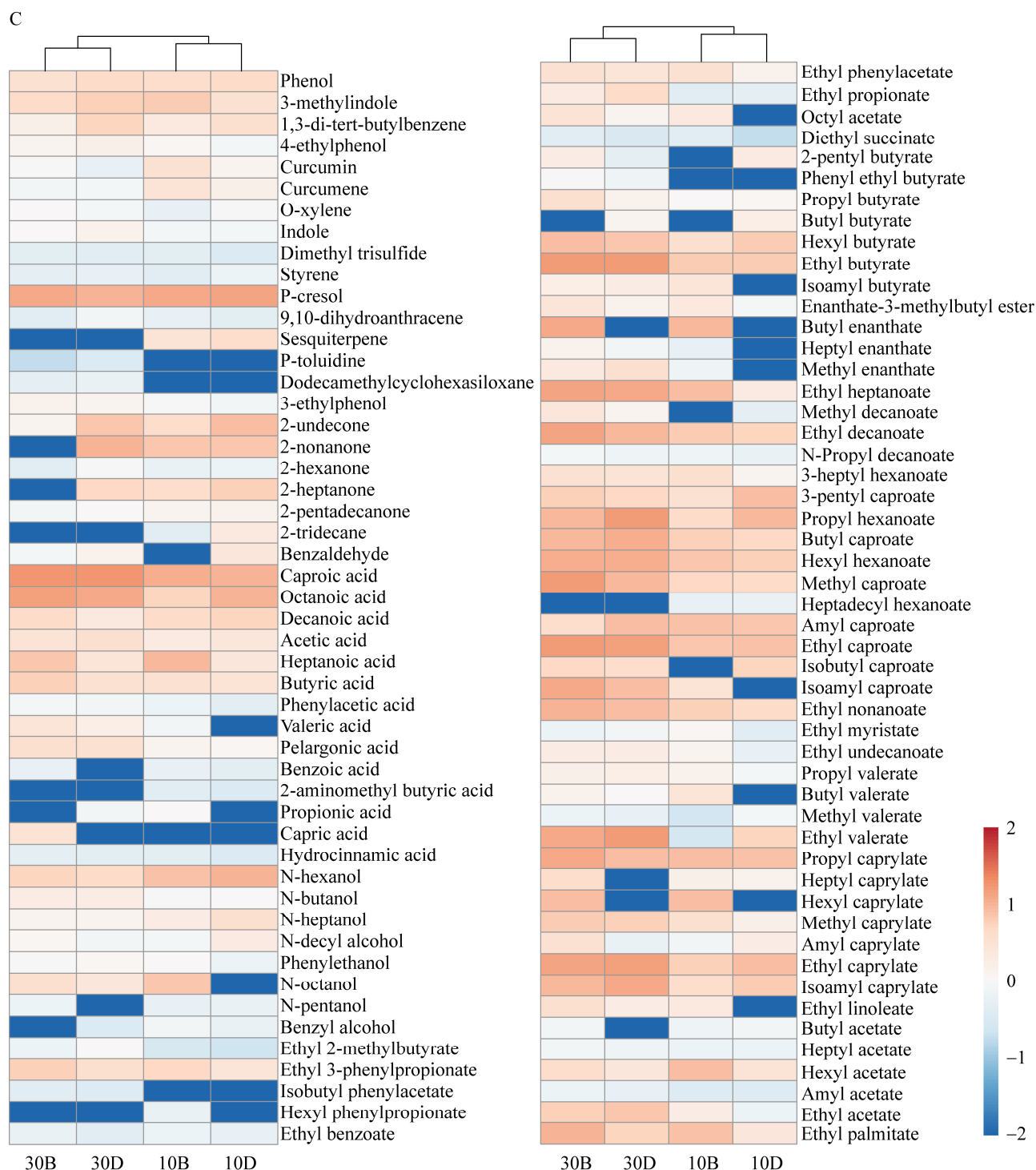


图 1 窖泥中挥发性风味物质组成比较 A: 窖泥中挥发性风味物质总量; B: 主要风味物质占比; C: 主要风味物质含量

Figure 1 Comparison of volatiles in PM. Total amount (A), proportion (B) and content (C) of volatiles in PM.

2.3 窖泥细菌群落结构分析

2.3.1 窖泥细菌群落的 α 多样性

窖泥对白酒发酵的一个重要影响是窖泥功能微生物参与白酒的发酵。为了解不同窖龄和不同位置窖泥的细菌组成多样性,本研究通过高通量测序比较了10年和30年窖壁泥及窖底泥中的细菌组成。由 Chao1 指数和 ACE 指数可知,30年窖泥微生物物种丰度高于10年窖泥样品,窖壁泥物种丰度略高于窖底泥(表2)。根据多样性指数 Shannon 指数和 Simpson 指数可知,10年窖泥微生物多样性高于30年窖泥,30年窖壁泥微生物多样性低于窖底泥,10年窖泥与之相反。上述结果表明窖泥中微生物随着窖龄的增长群落种类数呈现下降的趋势,这可能是微生物对窖泥环境(富含有机物、酸性、缺氧)逐步适应的结果。通过不断驯化和菌群动态更替,能够适应窖泥环境的微生物逐渐丰富并形成优势种,最终发展成稳定的群落结构^[41]。

2.3.2 窖泥细菌群落的 β 多样性

对窖泥微生物群落的组成分析表明,窖泥中检测到的细菌分布于13个门。其中厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)含量之和占窖泥细菌总量的87.44%–97.09%,是窖泥中的优势细菌门(图2A)。30年窖泥中厚壁菌门含量(壁94.69%、底86.01%)显著高于10年窖泥(壁42.83%、底38.71%);10年窖泥中拟杆菌门含量(壁50.69%、底58.74%)显著高于

30年窖泥(壁2.4%、底10.7%)。窖泥细菌群落主要分布于22个纲,其中梭菌纲和拟杆菌纲是窖泥中含量较高的优势菌纲,两者之和占全部细菌的86.16%–94.44%(图2B)。30年窖泥中梭菌纲细菌含量较高,而10年窖泥中拟杆菌纲细菌含量较高。通过对窖泥细菌群落进行主成分分析(principal components analysis, PCA)发现,成熟期窖泥(30年)细菌组成与演替期窖泥(10年)各自聚为一簇,存在显著不同(图2C)。此外,成熟期不同空间位置窖泥细菌组成较为接近,而演替期不同空间位置窖泥细菌组差异较大。

窖泥微生物组成在窖泥时空分布的差异为进行微生物组成与窖泥其他因素(理化和风味)间的相关性分析提供了可能。对窖泥中主要微生物菌属分析发现,窖泥中检测到包括己酸菌属(*Caproiciproducens*)、嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)、理研菌属(*Petrimonas*)、梭菌科未知属(*uncultured_bacterium_f_Clostridiaceae* 1)、贫油菌属(*Anaerocella*)和 *Fastidiosipila* 等优势菌属在内的共计113个菌属。30年窖泥和10年窖泥中的优势菌属(含量前40)存在明显差异,分别聚为2个簇(图3)。其中白酒酿造的重要功能菌梭菌属和己酸菌属在成熟期(30年)窖泥中含量较高,它们对己酸和丁酸的合成有主要贡献^[6,25,42]。此外,沉积微生物属(*Sedimentibacter*)、氨基酸杆菌属(*Aminobacterium*)、假支杆菌属

表2 不同窖泥中细菌群落 α 多样性

Table 2 The alpha diversity of microbial community in different pit mud samples

Alpha diversity index	30B	30D	10B	10D
Coverage (%)	0.99±0.00a	0.99±0.00a	0.99±0.00a	0.98±0.00a
Chao1	209.83±11.37a	197.20±12.92a	168.35±7.37b	143.78±7.61c
ACE	207.41±10.90a	197.20±12.90a	168.13±2.70b	159.72±11.50b
Simpson	0.72±0.09a	0.80±0.21a	0.90±0.03a	0.85±0.11a
Shannon	3.69±0.62b	4.12±1.33ab	4.55±0.63a	4.02±1.00ab

注:不同小写字母代表窖泥样品的微生物群落多样性指数存在显著性差异($P<0.05$)

Note: Different lowercase letters represent significant differences in microbial community index of pit mud samples ($P<0.05$).

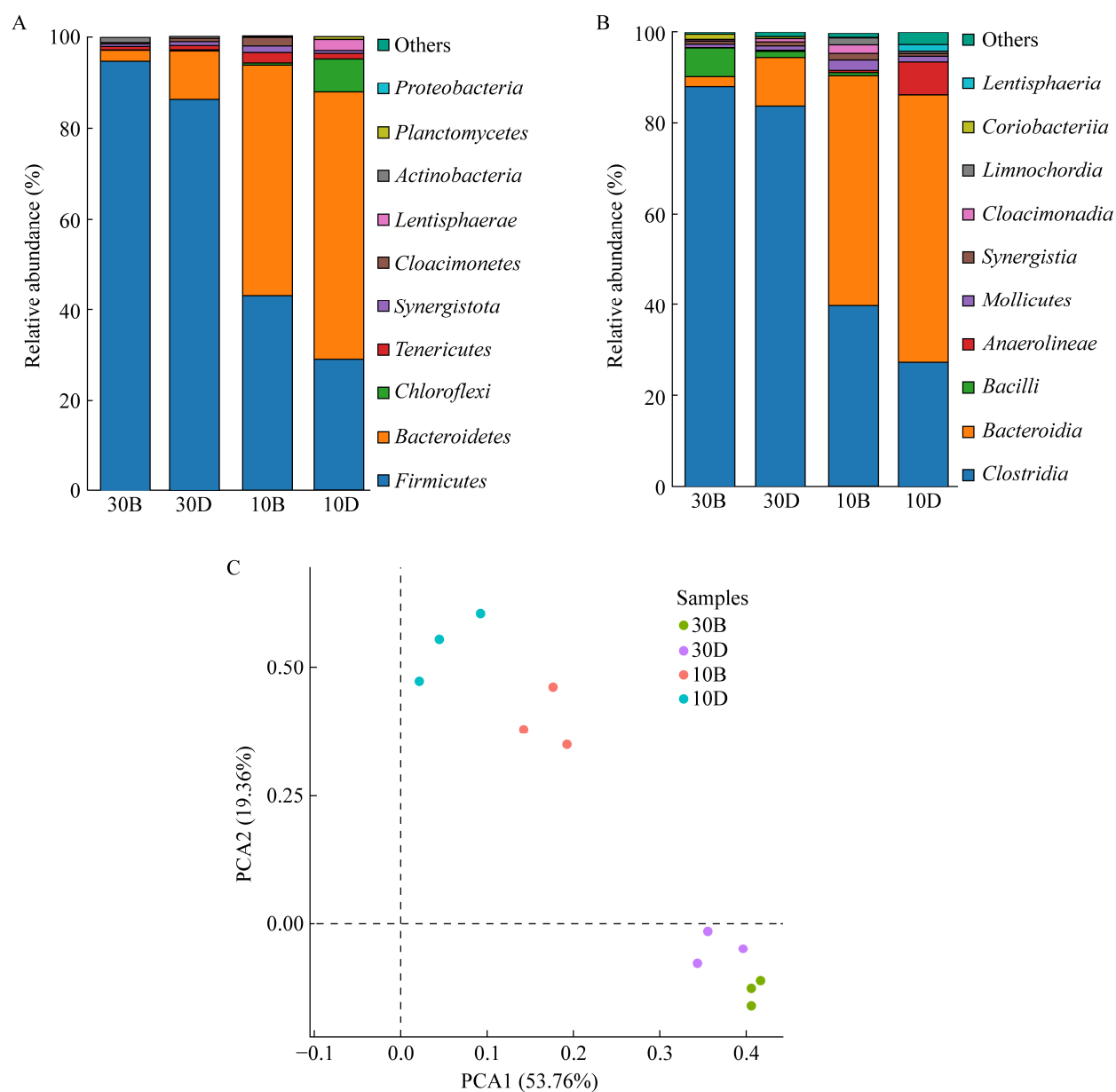


图2 不同时空窖泥的细菌组成分析 A: 门水平组成; B: 纲水平组成; C: 主成分分析

Figure 2 Analysis of bacterial composition of PM in different time and spaces. Bacterial composition of PM at the phylum (A) and class (B) levels; C: Principal component analysis of PM based on the bacterial composition.

(*Pseudoramibacter*)、*Caldicoprobacter*、*Eubacterium fissicatena* group 在成熟期(30 年)窖泥中含量也高于演替期(10 年)窖泥。*Caldicoprobacter* 能够利用葡萄糖、半乳糖和果糖等产生乳酸和乙酸^[43], *Eubacterium fissicatena* group 代谢

葡萄糖主要产生丁酸和乙酸^[44], 它们对己酸前体的合成具有重要作用。演替期(10 年)窖泥中 *Petrimonas*、*Fermentimonas*、uncultured_bacterium_o_DTU014、*Proteiniphilum*、*Lactobacillus* 等菌属含量较高。其中 *Proteiniphilum* 和

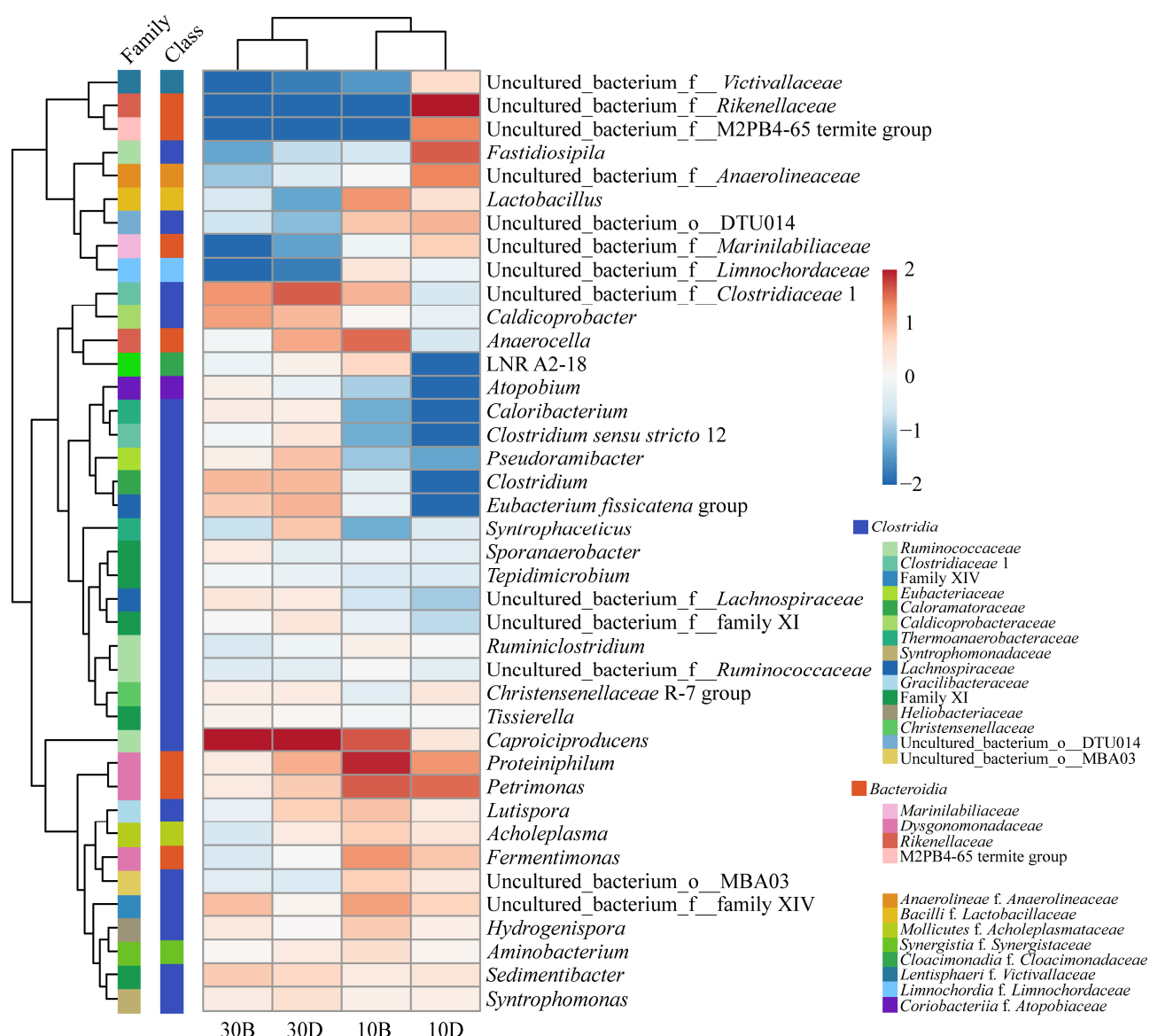


图3 窖泥中优势细菌属的相对丰度

Figure 3 Relative abundance of dominant bacteria in PM.

Petrimonas 可合成乙酸和丙酸^[45-46], *Fermentimonas* 可产生棕榈酸和十八烯酸^[47]。不同窖池空间位置的属也存在一定差异, 如 *uncultured_bacterium_f_Rikenellaceae*、*uncultured_bacterium_f_Victivallaceae*、*uncultured_bacterium_f_M2PB4-65 termite group*、*Fastidiosipila*、*uncultured_bacterium_f_Anaerolineaceae* 等在演替期(10年)

窖底泥中含量显著高于其他组窖泥, *Caproiciproducens* 在演替期(10年)窖壁泥中含量显著高于窖底泥。成熟期(30年)窖泥微生物群落结构更为稳定, 而且梭菌纲功能微生物丰度较高。

2.4 微生物和窖泥理化因子的相关性

不同窖龄和空间窖泥之间的理化因子的差

异可能是影响窖泥功能微生物的因素或其生长代谢的结果。对窖泥理化因子和相对丰度前40中的30种关键或差异菌属进行斯皮尔曼(Spearman)的相关性分析表明,梭菌纲细菌(*Caproiciproducens*、*Clostridium*、*Caldicoprobacter*等)相对丰度与除乳酸外的其他理化指标均存在普遍的正相关性;大多数不可培养微生物、*Fastidiosipila*和*Petrimonas*的相对丰度与除乳酸外的指标呈负相关(图4)。己酸、有效磷和有效钾的含量都与*Caproiciproducens*、

Clostridium、*uncultured_bacterium_f_Lachnospiraceae*、*Sedimentibacter*、*Caldicoprobacter*和*Tepidimicrobium*的相对丰度呈显著正相关,与*Petrimonas*、*uncultured_bacterium_o_DTU014*的相对丰度呈显著负相关。其中*Caproiciproducens*和*Clostridium*的某些种(如*C. kluyveri*和*C. tyrobutyricum*)是窖泥中产己酸的重要菌株^[6,25]。*Sedimentibacter*、*Caldicoprobacter*、*Tepidimicrobium*能够提供己酸的前体乙酸和丁酸^[44,48-49]。乳酸与大部分梭菌纲微生物都呈负

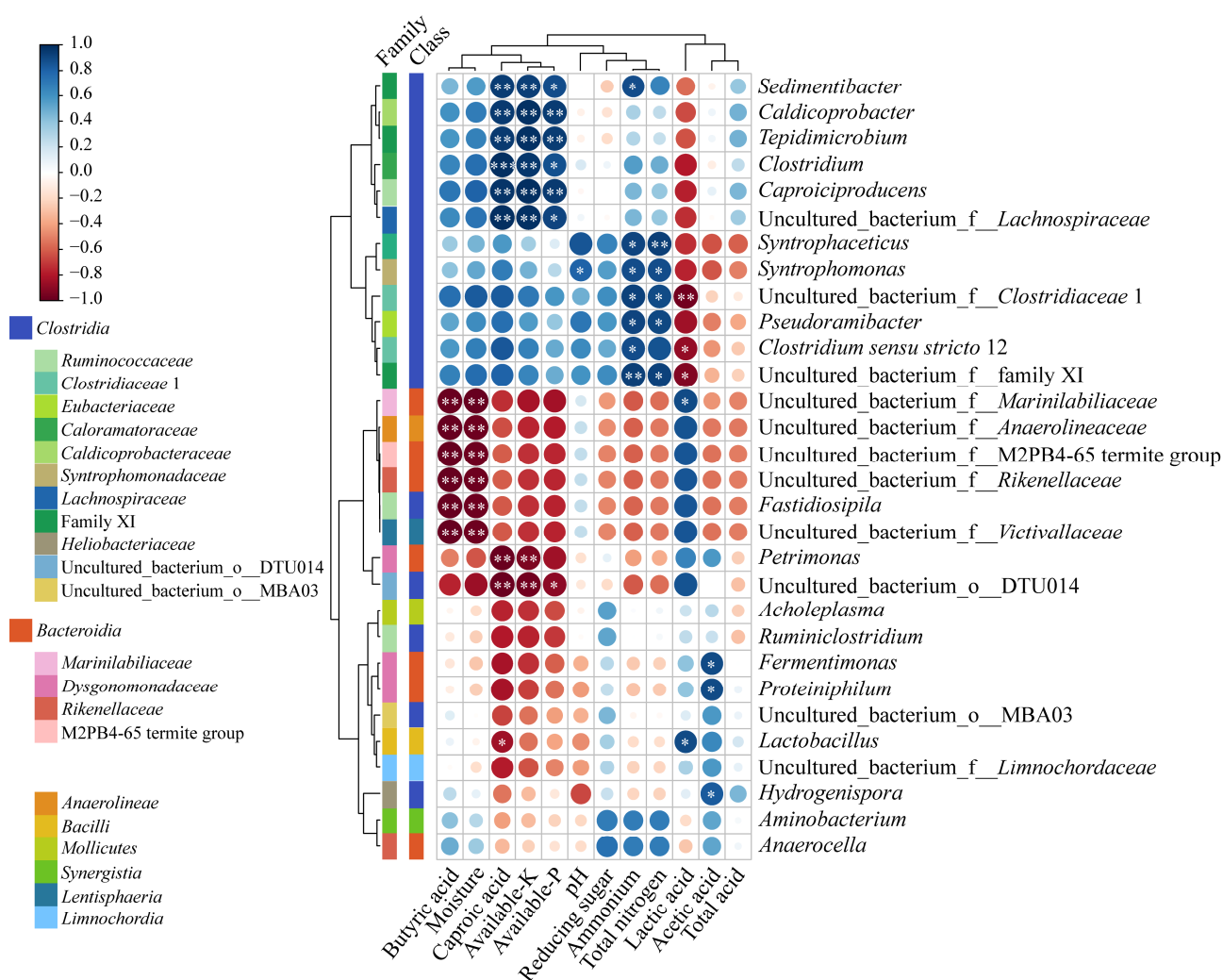


图4 窖泥微生物与理化因子相关性分析

Figure 4 Correlation analysis of microorganism with the physicochemical factors of PM.

相关, 与 *uncultured_bacterium_f_Marinilabiliaceae*、*uncultured_bacterium_f_Anaerolineaceae*、*Fastidiosipila*、*Lactobacillus* 等呈正相关, pH 与菌群的相关性大致相反。总氮和铵态氮含量与菌群的相关性一致, 都与 *Sedimentibacter*、*Pseudoramibacter*、*uncultured_bacterium_f_family XI*、*Syntrophomonas*、*Syntrophaceticus* 等的相对丰度呈显著正相关。其中 *Sedimentibacter* 具有降解氨基酸的功能, 这很可能与窖泥中铵态氮的增加有关^[50]。含水量和丁酸与窖泥菌群都与大部分梭菌纲微生物的相对丰度呈正相关, 与大部分拟杆菌纲微生物(如 *uncultured_bacterium_f_Rikenellaceae*、*uncultured_bacterium_f_M2PB4-65 termite group*、*uncultured_bacterium_f_Anaerolineaceae*、*uncultured_bacterium_f_Marinilabiliaceae*、*uncultured_bacterium_f_Victivallaceae*、*Fastidiosipila*) 的相对丰度呈显著负相关。乙酸和还原糖含量与窖泥微生物相对丰度的相关性较弱, 只有 *Hydrogenispora*、拟杆菌纲的 *Proteiniphilum* 和 *Fermentimonas* 等可合成乙酸的菌株与乙酸含量存在显著正相关性^[29,45,50]。

2.5 微生物和窖泥风味物质的相关性

细菌群落结构的差异在一定程度上也会影响窖泥风味物质的种类与含量。由图 5 可知, 梭菌纲中的 *Caproiciproducens*、*Clostridium*、*Sedimentibacter*、*Caldicoprobacter*、*Tepidimicrobium*、*Caloribacterium* 等属的相对丰度与部分关键挥发性风味物质的相关性几乎相同: 如己酸菌和梭菌的相对丰度与大多数酯类化合物的含量(己酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸乙酯、丁酸乙酯、辛酸乙酯、戊酸乙酯)显著正相关, 也与壬酸、己酸、苯乙酸、氢化肉桂酸、正丁醇、3-乙基苯酚等的含量显著正相关; 这些菌属与正癸酸、正癸醇、正己醇、对

甲酚、倍半萜烯等的含量则有较强的负相关性。梭菌纲微生物也被证明是窖泥中产丁酸和己酸的主要细菌^[51], 其中 *Clostridium kluyveri* 等主要产生己酸、己酸乙酯, 而 *Clostridium cadaveris* 的含量与乙酸乙酯、丁酸乙酯的合成呈正相关^[52]。拟杆菌纲的 *Petrimonas*、*uncultured_bacterium_f_Marinilabiliaceae*、*uncultured_bacterium_f_M2PB4-65 termite group*、*uncultured_bacterium_f_Rikenellaceae* 的相对丰度与大部分挥发性风味物质含量呈负相关。有报道称, 拟杆菌纲可能是萜烯类化合物合成的主要贡献者^[53], 本实验相关性结果也证明了两者的正相关性(图 5)。窖泥中相对丰度较低的 *Acholeplasma*、*Lactobacillus*、*uncultured_bacterium_f_Limnochordaceae*、*Aminobacterium* 与梭菌纲的 *Ruminiclostridium*、*uncultured_bacterium_o_MBA03* 及拟杆菌纲的 *Proteiniphilum*、*Fermentimonas*、*Anaerocella* 则与大多数酯类含量(己酸乙酯、乙酸乙酯、丁酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸异丁酯、辛酸等)呈负相关, 与 3-甲基吡啶、姜黄烯、姜黄素、乙酸己酯、正辛醇、庚酸等的含量呈正相关。

3 结论

窖泥的质量对浓香型白酒的风味和品质有重要的影响, 窖泥质量又与关键功能微生物(如己酸菌、梭菌)、风味物质组成和理化因子相关。本研究在解析不同时空窖泥理化因子和风味物质差异的基础上, 利用 PacBio SMRT 高通量三代测序对微生物群落结构进行了分析, 并对三者之间的联系进行了分析。研究发现成熟期(30 年)窖泥的含水量、有效磷和有效钾及己酸、己酸乙酯、丁酸乙酯等浓香型白酒特征风味物质含量均高于演替期(10 年)窖泥, 乳酸和己醇

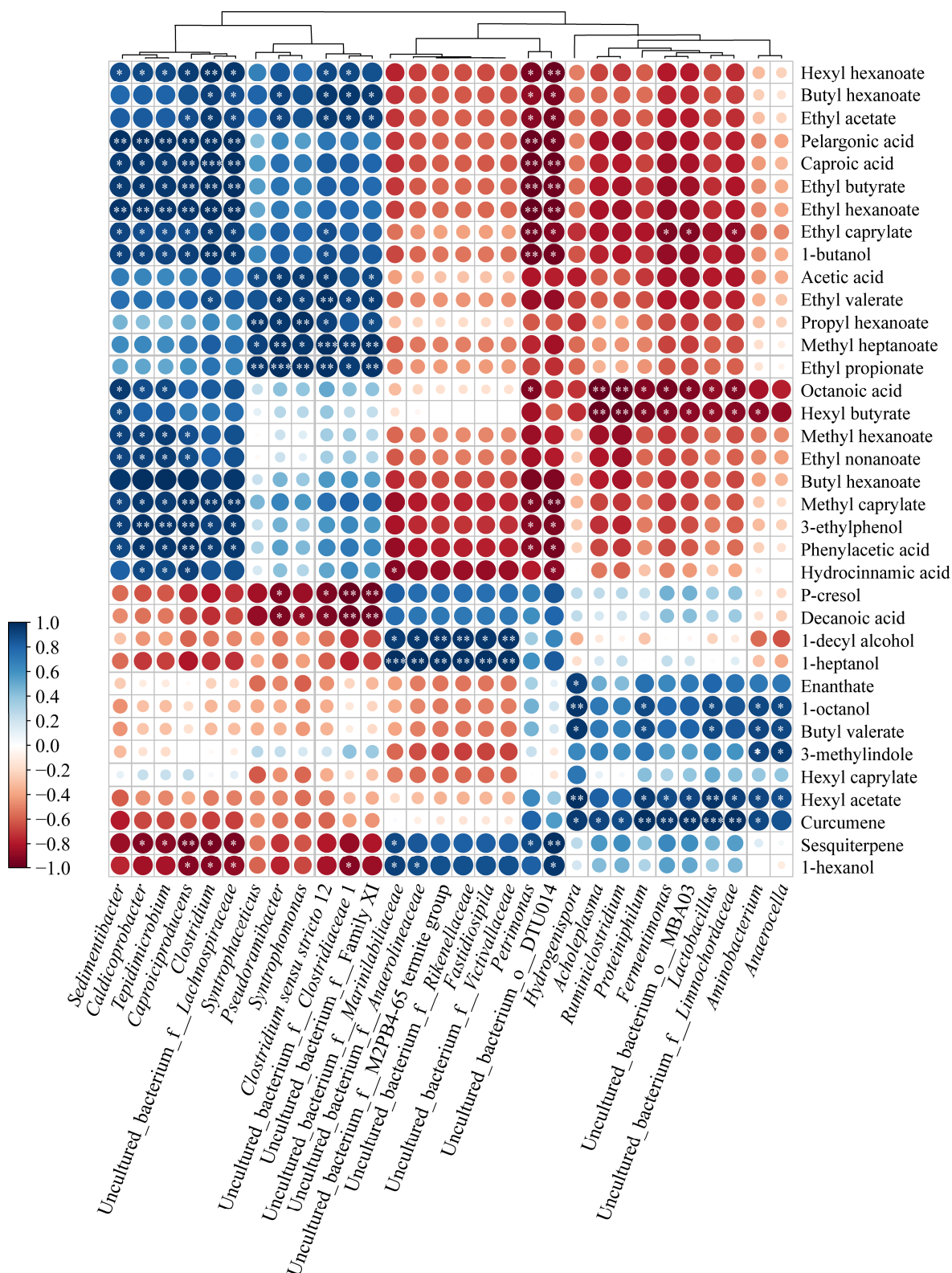


图5 窖泥风味物质与微生物的相关性分析

Figure 5 Correlation analysis of volatiles with microorganisms in PM.

等物质含量则低于演替期(10年)窖泥;相同窖龄的窖壁泥和窖底泥的这些指标水平则比较接近。虽然窖泥中微生物主要分布于梭菌纲和拟杆菌纲,但演替期窖泥中丰度最高的是拟杆菌纲的嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)和理研菌属(*Petrimonas*),而成熟期窖泥中丰度最高的是梭菌纲的己酸菌属(*Caproiciproducens*)和梭菌属(*Clostridium*)。对窖泥理化因子、细菌群落结构和窖泥风味物质间的相关性分析发现,梭菌纲主要微生物(*Caproiciproducens*和*Clostridium*等)相对丰度与窖泥中己酸和己酸乙酯等风味物质的含量呈正相关,与乳酸含量呈负相关;窖泥理化因子中的含水量、有效磷和钾含量与梭菌纲菌属相对丰度(*Caproiciproducens*和*Clostridium*等)均呈正相关。这些结果说明,窖泥理化因子、关键风味物质和窖泥功能微生物(梭菌纲微生物)之间有着直接或间接的联系,在窖内循环周期性发酵的作用下,三者相互影响、共同转变或互为条件。这为理解仅通过强化窖泥功能菌(人工窖泥)并不能立即达到成熟窖泥/老窖泥发酵效果提供了理论参考。

REFERENCES

- [1] 刘茂柯,唐玉明,赵珂,辜运富,任道群,姚万春,田新惠,刘颖,张小平. 浓香型白酒窖泥微生物群落结构及其选育应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1222-1229
Liu MK, Tang YM, Zhao K, Gu YF, Ren DQ, Yao WC, Tian XH, Liu Y, Zhang XP. Recent advances in research on the community, isolation, and application of microbes in the pit mud used in manufacture of Chinese strong-flavor *Baijiu*[J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1222-1229 (in Chinese)
- [2] Liu H, Sun B. Effect of fermentation processing on the flavor of baijiu[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(22): 5425-5432
- [3] Zhang QY, Yuan YJ, Luo W, Zeng LY, Wu ZY, Zhang WX. Characterization of prokaryotic community diversity in new and aged pit muds from Chinese Luzhou-flavor liquor distillery[J]. Food Science and Technology Research, 2017, 23(2): 213-220
- [4] Luo QC, Liu CL, Wu ZY, Wang HY, Li WF, Zhang KZ, Huang D, Zhang J, Zhang WX. Monitoring of the prokaryotic diversity in pit mud from a Luzhou-flavour liquor distillery and evaluation of two predominant archaea using qPCR assays[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2014, 120(3): 253-261
- [5] 刘文俊,多拉娜,刘亚华,任冬艳,张和平,孟和毕力格. 基于纯培养方法和 PacBio 三代测序技术研究蒙古国传统酸马奶中乳酸菌多样性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 27-37
Liu WJ, Duolana, Liu YH, Ren DY, Zhang HP, Menghebilige. Lactic acid bacteria diversity in Mongolia traditional koumiss based on culture-dependent and PacBio sequencing technology[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(4): 27-37 (in Chinese)
- [6] Tao Y, Li JB, Rui JP, Xu ZC, Zhou Y, Hu XH, Wang X, Liu MH, Li DP, Li XZ. 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
- [7] Liu MK, Tang YM, Guo XJ, Zhao K, Tian XH, Liu Y, Yao WC, Deng B, Ren DQ, Zhang XP. 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
- [8] Wu Q, Xu Y, Chen L. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavour liquor making[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(4): 301-307
- [9] Wang HY, Xu Y. Effect of temperature on microbial composition of starter culture for Chinese light aroma style liquor fermentation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 60(1): 85-91
- [10] Hu XL, Du H, Xu Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 214: 116-122
- [11] 任聪,辜杨,杜海,徐岩. 基于新老窖泥的微生物菌群结构判定浓香型白酒生产中的主体己酸菌[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 8-14
Ren C, Gu Y, Du H, Xu Y. Predicting dominant caproate-producing microbes by comparing the microbiotas between new- and aged-pit muds[J]. Food

- and Fermentation Industries, 2018, 44(12): 8-14 (in Chinese)
- [12] 蒲秀鑫, 柴丽娟, 徐鹏翔, 张晓娟, 陆震鸣, 王松涛, 沈才洪, 史劲松, 许正宏. 泸州酒窖泥中梭菌的分离及代谢产物分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2427-2436
- Pu XX, Chai LJ, Xu PX, Zhang XJ, Lu ZM, Wang ST, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. Isolation and metabolic characters of *Clostridium* strains from pit mud of Luzhou-flavor baijiu[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(12): 2427-2436 (in Chinese)
- [13] 胡晓龙, 王康丽, 余苗, 田瑞杰, 范海报, 孙继祥, 张军, 杨旭, 马歌丽, 魏涛. 浓香型窖泥原核微生物群落多样性及其在窖池中的空间异质性[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(11): 77-84
- Hu XL, Wang KL, Yu M, Tian RJ, Fan HB, Sun JX, Zhang J, Yang X, Ma GL, Wei T. Biodiversity and spatial heterogeneity of prokaryote community in strong-flavor *Baijiu* fermentation pit muds[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(11): 77-84 (in Chinese)
- [14] 向祖祥, 刘明, 陈明学, 谭力, 李红, 黄玉莲, 张文学. 浓香型白酒窖泥与土壤几种理化指标的对比分析[J]. 酿酒科技, 2009(5): 81-83
- Xiang ZX, Liu M, Chen MX, Tan L, Li H, Huang YL, Zhang WX. Comparison of several physiochemical indexes between in pit mud and in soil of Luzhou-flavor liquor[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2009(5): 81-83 (in Chinese)
- [15] 廖昶, 吴生文, 黄小晖, 肖美兰, 曾婷婷, 徐小明. 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
- Liao C, Wu SW, Huang XH, Xiao ML, Zeng TT, Xu XM. Comparative analysis of physiochemical indexes between in functional pit mud of site liquor and in common pit mud[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2010(2): 86-90 (in Chinese)
- [16] 胡晓龙, 余苗, 王康丽, 田瑞杰, 杨旭, 王永亮, 张治刚, 赵西民, 何培新. 浓香型白酒窖泥微生物群落多样性及理化因素对其影响[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(2): 178-185, 204
- Hu XL, Yu M, Wang KL, Tian RJ, Yang X, Wang YL, Zhang ZG, Zhao XM, He PX. Diversity of microbial community and its correlation with physicochemical factors in Luzhou-flavor liquor pit mud[J]. Food Research and Development, 2021, 42(2): 178-185, 204 (in Chinese)
- [17] 李学思, 李绍亮, 曹振华, 闫培勋, 郭淑平, 孙金涛. 窖池自然老熟过程中窖泥理化指标及产酒质量变化规律的研究[J]. 酿酒, 2019, 46(3): 31-35
- Li XS, Li SL, Cao ZH, Yan PX, Guo SP, Sun JT. Study on the change of physicochemical indexes and quality of wine produced in pit mud during natural aging[J]. Liquor Making, 2019, 46(3): 31-35 (in Chinese)
- [18] 李学思, 李绍亮, 曹振华, 李富强, 闫培勋, 宋瑞, 郭淑平. 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 XS, Li SL, Cao ZH, Li FQ, Yan PX, Song R, Guo SP. Study on the change of physicochemical indexes in different aged songhe distillery pit muds and their correlation analysis[J]. Liquor Making, 2018, 45(5): 38-42 (in Chinese)
- [19] 张会敏, 王艳丽, 孟雅静, 王银辉, 李安军, 王志强, 张治洲, 邢新会. 浓香型白酒发酵新老窖泥理化因子和原核微生物群落结构差异分析[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 207-214
- Zhang HM, Wang YL, Meng YJ, Wang YH, Li AJ, Wang ZQ, Zhang ZZ, Xing XH. Differences in physicochemical properties and prokaryotic microbial communities between young and old pit mud from Chinese strong-flavor *Baijiu* brewing[J]. Food Science, 2020, 41(6): 207-214 (in Chinese)
- [20] 马蓉, 姚万春, 唐玉明, 易彬, 任道群, 卢中明, 杨甲平. 不同窖龄窖泥微量挥发性成份研究[J]. 酿酒, 2011, 38(3): 46-49
- Ma R, Yao WC, Tang YM, Yi B, Ren DQ, Ru ZM, Yang JP. Research on different age pit mud trace volatile constituents[J]. Liquor Making, 2011, 38(3): 46-49 (in Chinese)
- [21] 陶 Y, 王 X, 李 XZ, 魏 N, 金 H, 徐 ZC, 唐 QL, 朱 XY. 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
- [22] 郑佳, 杨康卓, 张建敏, 刘芳, 何张兰, 彭志云, 赵东. 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 KZ, Zhang JM, Liu F, He ZL, Peng ZY, Zhao D. Spatial distribution of aroma compounds in pit mud of strong-flavor *Baijiu*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 11-15 (in Chinese)
- [23] 李恒, 孙夏冰, 陆震鸣, 王松涛, 沈才洪, 许正宏, 史劲松. 白酒窖池中不同部位窖泥挥发性化合物的差异性分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(3): 158-162
- Li H, Sun XB, Lu ZM, Wang ST, Shen CH, Xu ZH, Shi JS. Differentiation analysis of volatile constituents in

- the pit muds from different parts of Chinese liquor cellar[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(3): 158-162 (in Chinese)
- [24] Wang XS, Du H, Zhang Y, Xu Y. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(4): e02369-17
- [25] Hu XL, Du H, Ren C, Xu Y. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(8): 2506-2515
- [26] 蒲秀鑫. 泸型酒窖泥中梭菌的分离鉴定及代谢特性分析[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019
- Pu XX. Isolation of clostridium from pit mud of Luzhou-flavor liquor and their metabolic profiles[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)
- [27] 郭玲玲, 吴红艳, 宗玉丽, 徐冲, 柴林山, 张疏雨. 土壤中钾细菌的筛选及筛选底物加入量对其数量的影响[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(1): 91-94
- Guo LL, Wu HY, Zong YL, Xu C, Chai LS, Zhang SY. Initial screening of potassium-decomposable bacteria and the effects of the adding amount of substrate on their amount in soil[J]. Journal of Microbiology, 2019, 39(1): 91-94 (in Chinese)
- [28] Olsen SR. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate[EB/OL]. 1954
- [29] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. Nature Methods, 2016, 13(7): 581-583
- [30] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998
- [31] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596
- [32] Evan B, Jai RR, Matthew RD, Nicholas AB, Christian CA, Gabriel AA, Harriet A, Eric JA, Manimozhiyan A, Francesco A. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 852-857
- [33] 张方, 张宿义, 苏占元, 黄婷, 丁海龙, 王超, 李德林, 杨艳, 罗杰. 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 SY, Su ZY, Huang T, Ding HL, Wang C, Li DL, Yang Y, Luo J. Research progress in the effects of organic acids on the quality of nongxiang baijiu and its production process[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2016(1): 94-97, 102 (in Chinese)
- [34] 朱莉莉, 罗惠波, 黄治国, 卫春会, 邓杰, 谢军. 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 LL, Luo HB, Huang ZG, Wei CH, Deng J, Xie J. Screening of physicochemical indicators for pit mud quality evaluation in strong-flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2018, 37(12): 33-39 (in Chinese)
- [35] 任道群, 刘茂柯, 唐玉明, 刘向阳, 姚万春, 任剑波, 田新惠, 张星宇. 浓香型酒窖泥理化特性的研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(10): 55-57
- Ren DQ, Liu MK, Tang YM, Liu XY, Yao WC, Ren JB, Tian XH, Zhang XY. Analysis of physicochemical characteristic in pit mud of Luzhou-flavor liquor[J]. China Brewing, 2014, 33(10): 55-57 (in Chinese)
- [36] 侯小歌, 王俊英, 李学思, 胡炳义, 李绍亮, 高应运. 浓香型白酒糟醅及窖泥产香功能菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1257-1265
- Hou XG, Wang JY, Li XS, Hu BY, Li SL, Gao YY. The research progress on functional aroma-producing microorganisms in Zaopei and pit mud of Chinese strong-flavor liquor[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1257-1265 (in Chinese)
- [37] 李志斌, 李净. 浓香型白酒中的重要物质: 辛酸乙酯含量及其贡献分析[J]. 酿酒, 2013, 40(3): 33-36
- Li ZB, Li J. An important component in Luzhou flavor liquor-analysis of ethyl caprylate content and its contribution[J]. Liquor Making, 2013, 40(3): 33-36 (in Chinese)
- [38] Zheng Y, Sun BG, Zhao MM, Zheng FP, Huang MQ, Sun JY, Sun XT, Li HH. Characterization of the key odorants in Chinese Zhima aroma-type Baijiu by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(26): 5367-5374
- [39] 张宿义, 许德富. 泸型酒技艺大全[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 171-178
- Zhang SY, Xu DF. The Brewing Technique Pandect of LU-Type Liquor[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011: 171-178 (in Chinese)

- [40] 傅国城. 西凤酒微量物质组分与质量关系的研究[J]. 酿酒, 2015, 42(3): 10-14
Fu GC. Research on the relationship between trace element and quality of Xifeng liquor[J]. Liquor Making, 2015, 42(3): 10-14 (in Chinese)
- [41] 黄莹娜, 熊小毛, 胡远亮, 梁运祥, 赵述森. 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
Huang YN, Xiong XM, Hu YL, Liang YX, Zhao SM. 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 (in Chinese)
- [42] 王明跃, 张文学. 浓香型白酒两个产区窖泥微生物群落结构分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1498-1506
Wang MY, Zhang WX. Analysis of microbial community structure in pit mud from two Chinese Luzhou-flavor liquor producing areas[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1498-1506 (in Chinese)
- [43] Yokoyama H, Wagner ID, Wiegel J. *Caldicoprobacter oshimai* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, xylanolytic, extremely thermophilic bacterium isolated from sheep faeces, and proposal of *Caldicoprobacteraceae* fam. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(1): 67-71
- [44] 吴思琪. 植物乳杆菌 Zhang-LL 对 DSS 诱导大鼠慢性溃疡性结肠炎预防效果评价[D]. 北京: 北京农学院硕士学位论文, 2018
Wu SQ. Effect on DSS-induced chronic ulcerative colitis in rats of *Lactobacillus plantarum* Zhang-LL[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Agriculture, 2018 (in Chinese)
- [45] Hahnke S, Langer T, Koeck DE, Klocke M. Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1466-1475
- [46] 何琴, 李蕾, 赵小飞, 伍迪, 瞿莉, 彭绪亚. R-PFR 与 CSTR 厌氧消化餐厨垃圾运行效率及微生物群落结构对比[J]. 环境科学学报, 2018, 38(2): 587-598
He Q, Li L, Zhao XF, Wu D, Qu L, Peng XY. Comparison of R-PFR and CSTR performance and microbial community structure during anaerobic digestion of food waste[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, 38(2): 587-598 (in Chinese)
- [47] Beye M, Bakour S, Traore SI, Rathored J, Labas N, Raoult D, Fournier PE. Draft genome sequence of *Fermentimonas caenicola* strain SIT8, isolated from the human gut[J]. Standards in Genomic Sciences, 2018, 13: 8
- [48] Niu L, Song L, Liu X, Dong X. *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(11): 2698-2701
- [49] Imachi H, Sakai S, Kubota T, Miyazaki M, Saito Y, Ken TK. *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1293-1300
- [50] 张会敏, 王艳丽, 孟雅静, 李安军, 周庆伍, 胡心行, 刘国英, 李兰, 黄艳, 邢新会. 浓香型白酒新、老窖池池壁泥与池底泥原核菌群结构分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 180-187
Zhang HM, Wang YL, Meng YJ, Li AJ, Zhou QW, Hu XH, Liu GY, Li L, Huang Y, Xing XH. Analysis of prokaryotic community structures in bottom and wall muds from old and young pits used for production of strong-flavor baijiu[J]. Food Science, 2020, 41(18): 180-187 (in Chinese)
- [51] 勾文君, 田源, 孔小勇, 吴菲菲, 方芳. 洋河酒窖泥细菌群落结构与菌株产酸能力分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1651-1661
Gou WJ, Tian Y, Kong XY, Wu FF, Fang F. Bacterial composition in pit mud of Yanghe liquor and identification of acid producing bacteria[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1651-1661 (in Chinese)
- [52] 何培新, 李芳莉, 郑燕, 张勇, 胡晓龙, 孙西玉, 郭福利. 浓香型白酒窖泥梭菌的分离及其挥发性代谢产物分析[J]. 中国酿造, 2017, 36(4): 45-49
He PX, Li FL, Zheng Y, Zhang Y, Hu XL, Sun XY, Guo FL. Isolation and volatile metabolites of *Clostridium* spp. in pit mud of strong-flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2017, 36(4): 45-49 (in Chinese)
- [53] Fu JX, Chen L, Yang SZ, Li YZ, Jin L, He XP, He L, Ao XL, Liu SL, Liu AP, et al. Metagenome and analysis of metabolic potential of the microbial community in pit mud used for Chinese strong-flavor liquor production[J]. Food Research International, 2021, 143: 110294