

浓香型白酒发酵过程中黄水细菌群落结构的演替规律

曾波¹, 郑佳², 冯政², 黄治国^{1,3}, 苏建², 邓杰^{1,3*}

¹四川轻化工大学 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室 四川宜宾 644000

²宜宾五粮液股份有限公司 四川宜宾 644000

³中国轻工业酿酒生物技术及智能制造重点实验室 四川宜宾 644000

摘要 在浓香型白酒发酵过程中不同层次的酒醅发酵过程存在差异,如底层酒醅会受黄水浸泡发酵的影响,而黄水中细菌群落结构对有机酸合成有很大影响。为明确黄水中细菌群落结构的演替规律及有机酸代谢情况,通过高通量测序技术解析黄水细菌群落的动态变化,分析发酵过程细菌群落结构与有机酸含量的相关性。采用 PICRUSt 分析对黄水中细菌群落的功能进行了预测。结果表明,依据发酵过程中黄水的细菌群落结构变化可将发酵过程分为 2 个阶段:发酵前期(5~20 d)与发酵后期(20~60 d),这 2 个阶段的细菌群落结构差异显著($P<0.05$)。发酵过程中乳酸杆菌属是黄水的绝对优势菌属,发酵 5~10 d 相对丰度在 97% 以上,产乙酸菌属、梭菌属、氢孢菌属、岩石单胞菌属、嗜蛋白菌属等 16 个细菌属的相对丰度在发酵后期明显增加。PICRUSt 分析表明,黄水细菌群落在发酵过程中可能主要参与糖酵解途径和酸代谢途径,与乳酸、乙酸、己酸和丁酸相关的功能酶相对丰度较高,说明黄水中细菌群落具有产香的能力,对浓香型白酒酒醅发酵具有重要影响。

关键词 浓香型白酒; 黄水; 细菌群落结构; 有机酸

文章编号 1009-7848(2024)11-0300-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.028

浓香型白酒是以粮谷为原料,采用浓香大曲为糖化发酵剂,经泥窖固态发酵,固态蒸馏、陈酿、勾调而成的,不直接或间接添加食用酒精及非自身发酵的白酒^[1]。黄水则是白酒发酵过程中的副产物,酒醅中未被利用的水以及微生物代谢产生的水沉到窖底,有机酸、可溶性淀粉、氨基酸、单宁、还原糖和香味前体物质等溶于其中,就形成了黄水^[2]。

黄水中富含的机酸、醇和酯类,是浓香型白酒的香气成分,王莉等^[3]在发酵后期的酒醅中渗入不同量的黄水,发现该处理虽然对白酒高级醇的含量无明显影响,但会显著提高有机酸混合酯类化合物的含量。尹倩倩等^[4]对浓香型白酒上、下层原酒风味特征的研究表明,下层酒醅中酸度、还原糖、有机酸的含量显著高于上层。下层酒醅由于黄水带来的糖类为产酸微生物的代谢提供了有利条件,助推了碳链的延伸,利于己酸的合成,有益于浓香型白酒品质的提高。黄水富含微生物生长代谢所需的营养物质,李可^[5]通过构建 SSU rRNA 文库解析黄水中微生物群落结构,发现黄水中功能

性微生物具有代谢酸、醇、酯、醛、酮等风味物质的能力,是浓香型白酒的风味来源之一。Gao 等^[6]发现窖泥与黄水的接触会增加黄水中与白酒风味物质相关的细菌,黄水中的微生物群落结构受窖泥微生物的影响显著。也有研究表明,黄水中富集了窖泥和酒醅中的营养物质,耐酸的厌氧细菌不断富集,细菌是真菌数量的 10 万倍^[7]。发酵过程的黄水中存在极其复杂的微生态体系,产己酸菌属(*Caproiciproducens*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)等细菌属对浓香型白酒风味有重大贡献,其中耐酸、耐酒精的细菌在黄水中的代谢会合成多种酸、酯、醇等重要物质,有利于白酒质量的提升^[8]。目前,对于浓香型白酒酒醅与窖泥微生物群落结构的研究颇多,而黄水中产酸细菌的代谢或许有利于浓香型白酒的风味形成。了解分析浓香型白酒酿造过程中黄水细菌群落结构的演替规律具有重要的意义。

本文研究浓香型白酒酿造过程中黄水有机酸、淀粉、还原糖与酸度的变化规律,通过高通量测序技术分析发酵过程中黄水细菌群落演替规律以及窖底泥细菌群落结构,同时探讨黄水中细菌群落与有机酸等理化指标的相关性。采用 PICRUSt 分析发酵过程中黄水细菌群落在中糖代谢

收稿日期: 2023-11-24

基金项目: 四川省科技创新创业苗子工程项目(23MZGC0042)

第一作者: 曾波,男,硕士生

通信作者: 邓杰 E-mail: 380553839@qq.com

途径、酸代谢途径的潜在作用,为阐明黄水细菌群落的产酸机理以及窖泥的养护提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄水样品,采集于宜宾地区某大型浓香型白酒厂;氢氧化钠、五水硫酸铜、酒石酸钾钠、亚铁氰化钾、次甲基蓝、浓盐酸、无水乙醇、甲基红、硫酸钠,以上试剂均为分析纯级,成都市科隆化学品有限公司;E.Z.N.A.[®] soil型DNA提取试剂盒,美国Omega Bio-tek公司。

1.2 主要仪器与设备

电子万用炉,优科实验设备有限公司;电泳仪、PCR仪,美国Bio-Rad公司;高速冷冻离心机,德国Hettich公司;NanoDrop2000 DNA含量测定仪,美国Illumina公司;安捷伦8890气相色谱、液相色谱仪,美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 黄水的取样方法 在投料前,在窖池内不同位置安装管道,并在管道出口配备单向阀,通过真空泵抽取黄水。选取正常连续生产(30年左右)窖池,从第5天开始取样,直到发酵结束,在同一时间从多个部位收集黄水,混合均匀立即分装于无菌瓶中,对样品编号(标号为:5 d、10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d),采样结束后立即进行DNA提取,剩余黄水样品保存在4℃冰箱,以供后续理化检测,每个样品的理化指标均进行3次测定,窖底泥取样采用五点取样法,从窖池窖底4个角和中心点取样混合,作为窖底泥样品,采集完后立即进行DNA提取。

1.3.2 黄水理化检测方法 酸度参考《酿酒分析与检测》中白酒的总酸测定方法进行测定,淀粉含量与还原糖的测定使用菲林试剂法^[9]进行测定。

1.3.3 黄水中丁酸和己酸的定量分析 样品前处理和检测方法参考黄治国等^[10]的方法,具体如下:吸取20 mL黄水样品于50 mL的离心管中,12 000 r/min离心10 min。取1 mL上清液加入9 mL超纯水稀释,用0.22 μm微孔滤膜过滤后超声脱气30 min备用。采用内标法进行定量分析,内标为2-乙基丁酸,采用毛细管柱为LZP-950(50 m×0.25 mm×0.25 μm,兰州东立龙),进样口温

度250℃;进样量1 μL;分流比20:1,起始柱温35℃,保持1 min后以3℃/min升至70℃,后以3.5℃/min升至180℃,再以15℃/min升至210℃保持6 min,总运行时间52.10 min,检测器为FID。

1.3.4 黄水中乙酸和乳酸的定量分析 样品前处理参考黄治国等^[10]的方法。采用Venusil MP(4.6 mm×250 mm×5 μm)色谱柱,以0.10 mol/L的磷酸二氢钾(KH₂PO₄)溶液(pH=2.5)和100%色谱甲醇为流动相,流动相比例为V_{磷酸二氢钾}:V_{甲醇}=19:1,流速1 mL/min,检测波长215 nm,柱温30℃,进样量5 μL。

1.3.5 黄水DNA的提取及PCR扩增 将5 mL黄水利用根据E.Z.N.A.[®] soil DNA试剂盒说明书进行黄水中细菌的DNA提取,利用NanoDrop2000检测DNA的浓度与纯度。1%琼脂糖凝胶电泳用于检测DNA提取的质量。PCR扩增程序参考曾波等^[11]的方法,具体如下:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,27个循环;72℃延伸10 min。扩增体系为20 μL,包含4 μL 5×FastPfu缓冲液,2 μL 2.5 mmol/L dNTPs,0.8 μL引物[5 μmol/L,338F(5'-ACTC-CTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3')],0.4 μL FastPfu聚合酶;10 ng DNA模板。每个样本3个重复,将同一样本的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测。参照电泳初步定量结果,将PCR产物送到上海美吉生物技术有限公司进行测序,用于后续分析。

1.4 数据处理

原始测序序列的处理参考邓杰等^[12]的方法。采用PICRUSt分析(<https://cloud.majorbio.com/>)对黄水中细菌群落的功能进行了预测,基于KEGG注释结果和KEGG数据库绘制代谢途径,根据酶的丰度信息绘制气泡图。利用Origin、R语言绘图,黄水理化数据采用平均数±标准误差($\bar{x} \pm s$)表示,细菌群落的差异性显著性分析通过软件SPSS实现。

2 结果

2.1 黄水中有机酸及理化指标的变化规律

浓香型白酒发酵过程中黄水的乙酸、乳酸、丁

酸和己酸含量如图1所示。黄水中乳酸含量在发酵过程中呈现先升后降的趋势。发酵20 d,黄水中的乳酸最高,高达94.5 g/L;乳酸在5 d含量最低。乙酸、己酸、丁酸含量前期处于快速增长阶段,其中己酸增加幅度最大,在10~20 d增加了2.06倍,丁酸在5~10 d增加了51%。通过对黄水理化指标

的检测发现,淀粉含量与还原糖含量在发酵过程中不断的减少,酸度呈现先上升后降低的趋势,发酵20 d,黄水酸度最高达47.36 g/L。出窖时乳酸含量比入窖时增加了22.75 g/L;出窖时乙酸、丁酸、己酸含量分别比入窖时增加了1.6 g/L,6.96 mg/L和52.33 mg/L。

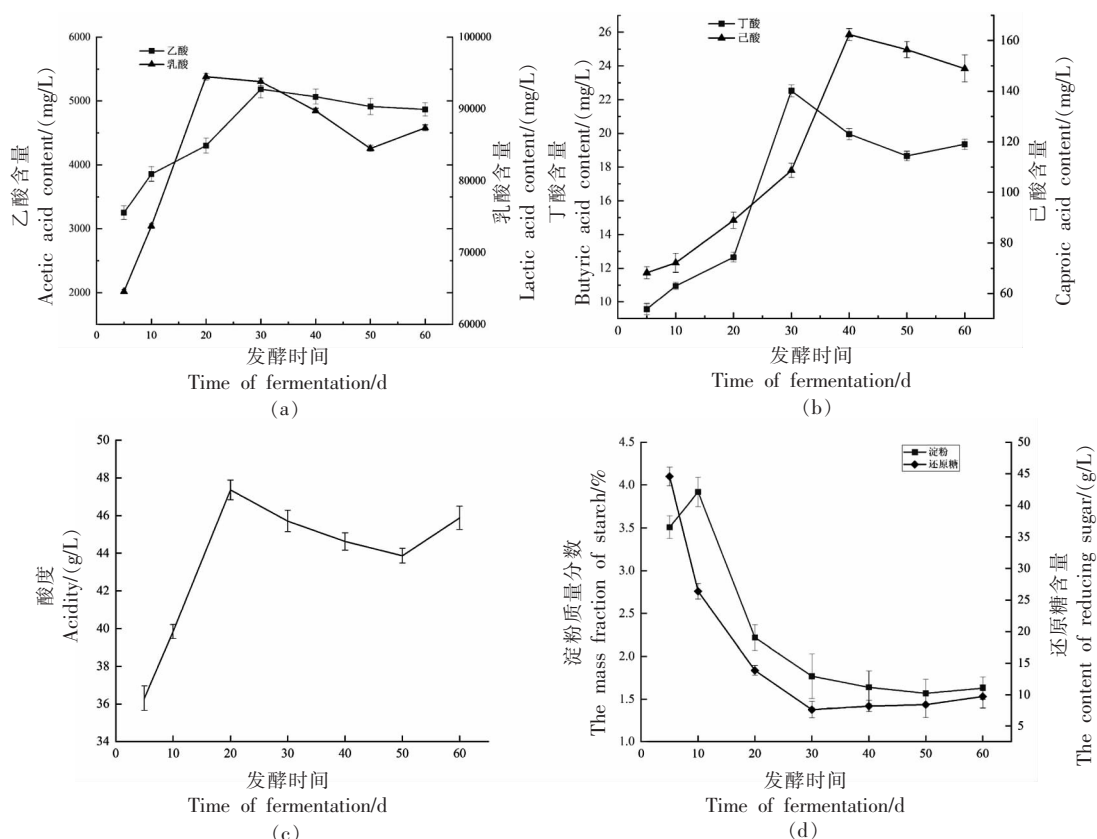


图1 发酵过程中黄水4种酸含量及理化指标的变化

Fig.1 Changes of four kinds of acids content and physicochemical indicators of Huangshui during fermentation

2.2 黄水细菌群落的 α -多样性分析

经过对测序数据的处理如表1,黄水样品共得到395 956条有效序列,所有样品的覆盖率(Coverage)均达到99.65%以上,表明样品的测序

结果深度满足黄水细菌群落全部信息的要求,发酵过程中5~50 d的黄水样品,操作分类单元(OTU)、Chao指数、Shannon指数持续增高。

表1 黄水中细菌的 α -多样性

Table 1 The α -diversity of bacteria in Huangshui

发酵时间/d	有效序列/条	OTU	Chao 指数	Shannon 指数	覆盖率/%
5	32 616	114	212.08	0.17	99.84
10	47 902	133	188.04	0.22	99.89
20	61 663	299	509.89	1.36	99.79
30	62 847	468	583.01	2.33	99.78
40	70 573	540	677.61	3.31	99.77
50	65 111	593	819.82	3.14	99.67
60	55 244	566	780.37	2.72	99.65

2.3 黄水细菌群落结构分析

如图 2a 所示,黄水在整个发酵过程中共检测到 17 个优势细菌属(相对丰度>1%),分别为乳杆菌属、醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、产己酸菌属、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭菌属、岩石单胞菌属(*Petrimonas*)等。其中乳杆菌属的相对丰度从初始的 98.33%(5 d)降低至 68.24%(20 d),在发酵 40 d 之前,乳杆菌属的相对丰度一直下降,40 d 之后增加,乳杆菌属是浓香型白酒整个发酵过程中黄水的优势菌属,其丰度保持在 20%以上;醋酸杆菌属的相对丰度从初始的 0.07%(5 d)提高至 19.12%(20 d),随着发酵过程缓慢降低。

黄水与窖底泥直接接触可能存在着微生物的迁移以及物质能量的交换,通过对窖底泥与黄水的细菌群落结构比较,黄水中产己酸菌属的相对丰度从初始的 0.04%(5 d)提高至 14.13%(40 d),

而梭菌属、岩石单胞菌属在发酵初期基本检测不到,在发酵后期,梭菌属、岩石单胞菌属、产己酸菌属逐渐成为黄水中的优势菌属;芽孢杆菌属(*Bacillus*)的相对丰度在发酵 40 d 达到最大值(4.25%),在发酵后期保持较低丰度(<1%)。高通量测序结果如图 2b 表明,窖底泥中排名前 10 的菌属有 8 种细菌属在发酵 20~60 d 的黄水中也能检测到,分别是产己酸菌属、乳杆菌属、氨基酸杆菌属(*Aminobacterium*)、互营球菌属(*Syntrophaceticus*)、梭菌属、嗜蛋白菌属(*Proteiniphilum*)、氢孢菌属、岩石单胞菌属,Zheng 等^[13]发现窖池微生物可以通过酒醅与窖泥的接触面相互迁移,因此在白酒发酵过程中,窖底泥中的细菌可能会往黄水中迁移;在窖底泥的醋酸菌属相对丰度较低,可能是醋酸菌属主要来源于大曲,窖底主要受窖泥微生物影响较大^[14]。

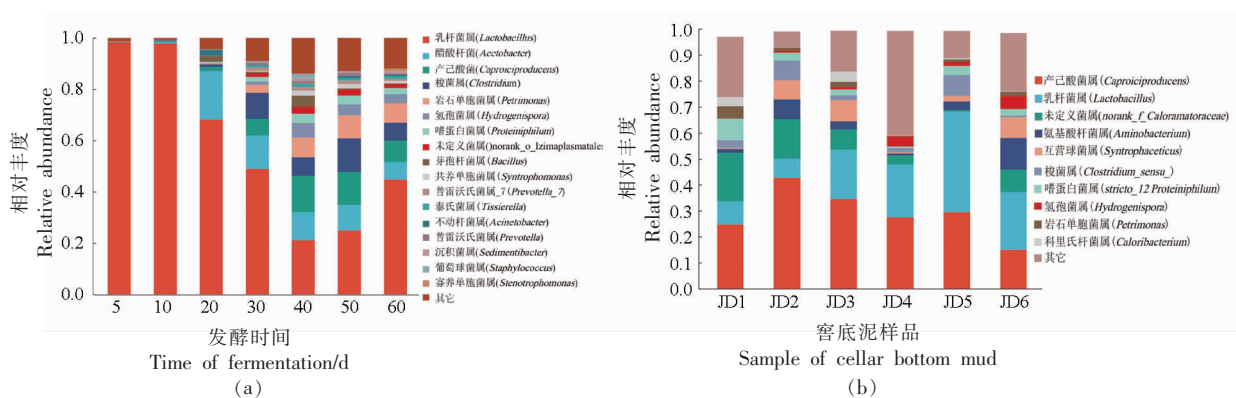


图 2 黄水与窖底泥细菌属水平群落结构

Fig.2 Bacteria community structure of Huangshui and pit mud on genus level

2.4 黄水细菌群落结构的比较分析

由图 2 可知,不同发酵阶段黄水细菌群落具有明显的差异。10~20 d 是黄水细菌群落的剧烈变化时期,该时期营养物质淀粉、还原糖的快速消耗,产酸细菌醋酸菌、产己酸菌属、梭菌属显著增加,酸度也快速升高。将不同发酵阶段的黄水样品进行 PCoA 分析(图 3),在 95%的置信区间内,提取到的主成分 1 和主成分 2 的解释度为 93.11%,5~20 d 的黄水样品分布在 2、3 象限,30~60 d 的样品分布在 1、4 象限;基于黄水中细菌群落丰度数据,选取细菌群落属水平丰度前 13 个菌属,评估不同发酵阶段物种差异的显著性。图 4 结果表明,

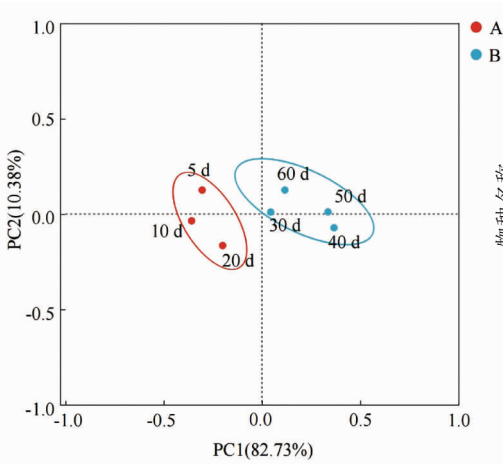
5~20 d 的黄水中乳杆菌属相对丰度显著高于 30~60 d($0.001 < P \leq 0.01$);30~60 d 的黄水中嗜蛋白菌属、产己酸菌属、梭菌属、岩石单胞菌属相对丰度显著高于 5~20 d($0.001 < P \leq 0.01$)。黄水发酵是一种可循环的持续发酵过程,后续研究将分阶段讨论细菌群落的演替规律。

2.5 理化指标与细菌群落的相关性

为进一步认识发酵过程中黄水的细菌群落结构,提取图 4 中的细菌属与有机酸绘制相关性网络图。由图 5 可以看出,黄水发酵 5~20 d,细菌群落与 4 种酸有 24 对相关性连接,包括 18 对正相关连接与 6 对负相关连接;而在黄水发酵 20~60

d, 细菌群落与4种酸有36对相关性连接, 包括14对正相关连接与22对负相关连接, 可见细菌

群落对黄水中有机酸的产生密切相关。



注: A. 发酵 5, 10, 20 d 的黄水样品; B. 发酵 30, 40, 50, 60 d 的黄水样品; 下同。

图3 细菌群落多样性 PCoA 图

Fig.3 Bacterial community diversity PCoA plot

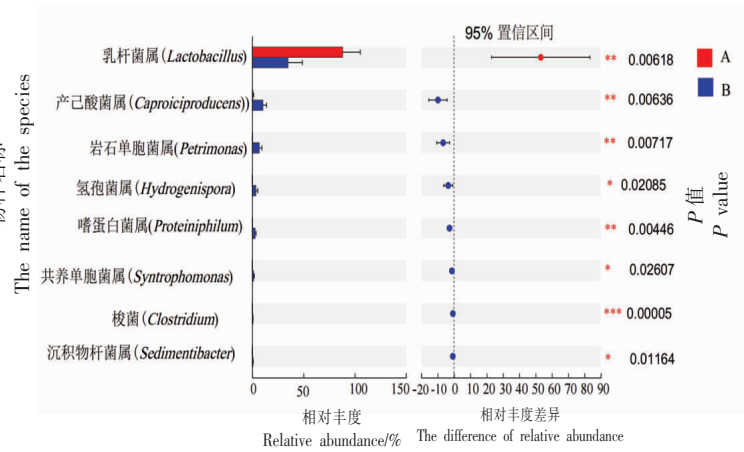


图4 物种差异比较分析

Fig.4 Comparative analysis of species differ

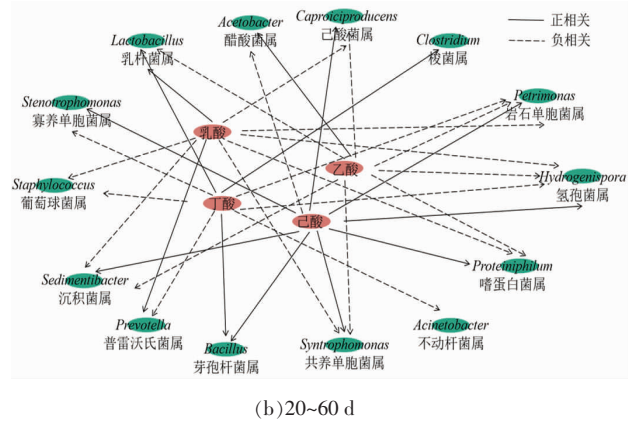
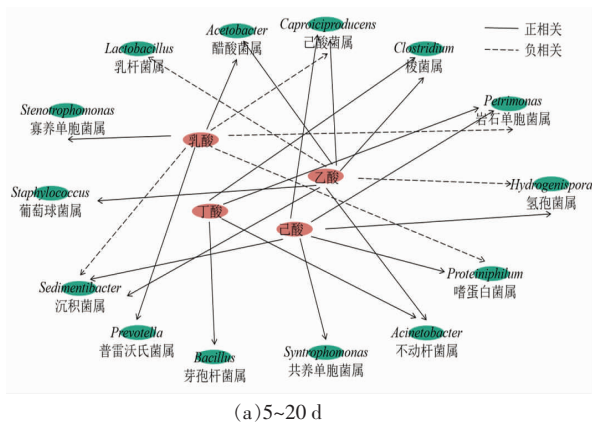


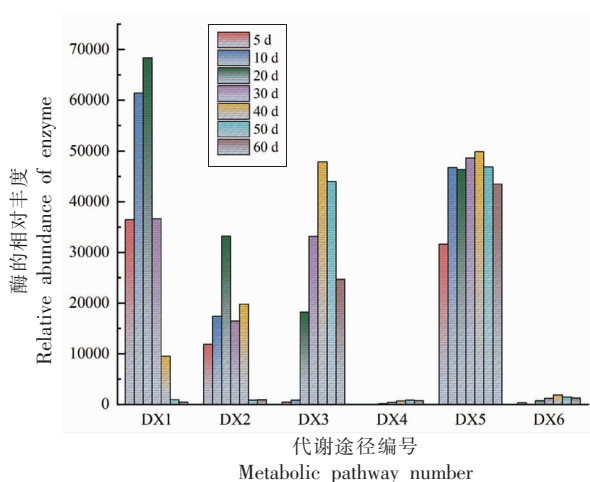
图5 黄水中优势细菌属与4种酸的相关性网络分析

Fig.5 Correlation network analysis of dominant bacterial genera and four acids in Huangshui

2.6 细菌群落的功能预测

发酵过程黄水中的细菌群落的代谢, 伴随着糖类物质以及淀粉的消耗, 由图6所示, 细菌群落的功能基因在6个碳水化合物代谢途径上的丰度信息, 氨糖与核糖代谢是细菌群落参与最多的, 此外还涉及多种糖代谢, 包括糖酵解、淀粉与蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢, 很少参与半乳糖代谢和乙醛酸盐代谢。由图6可知, 大部分代谢途径的预测基因丰度呈现先上升后下降的趋势。

细菌群落是黄水中的产酸优势微生物, 解析其在发酵过程中的潜在功能有利于黄水的生物治理, 为筛选黄水中产酸优势菌提供理论方向。通过PICRUSt分析预测不同发酵阶段黄水细菌群落的功能酶及其丰度信息。如图7a所示, 丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase) 以及磷酸丙酮酸水合酶 (Phosphopyruvate hydratase) 的相对丰度较高, 能够将葡糖糖转化为丙酮酸, 而丙酮酸是糖代谢途径中的重要中间体, 更是酸代谢途径中的重要底物, 能在



注:DX1~DX6 为 KEGG 数据库中关于碳水化合物代谢的途径,其中 DX1. 糖酵解,DX2. 淀粉与蔗糖代谢,DX3. 果糖代谢,DX4. 半乳糖代谢,DX5. 氨糖与核糖代谢,DX6. 乙醛酸盐代谢。

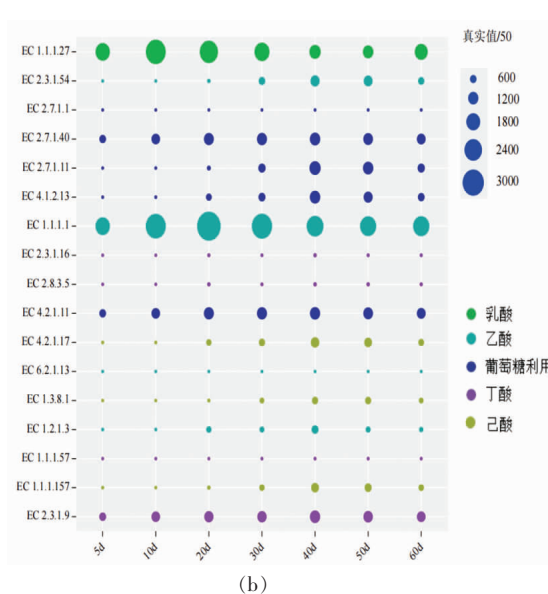
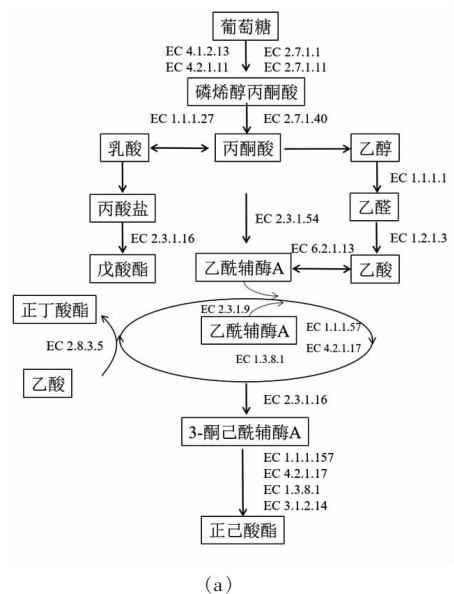
图 6 细菌群落在碳水化合物代谢途径中的功能预测
Fig.6 Functional prediction of bacteria community in carbohydrate metabolism pathway

乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase)催化作用下生成乳酸,在乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase)、醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenase)的作用下生成乙酸,在乙酰辅酶 A(Acetyl-CoA)、烯酰辅酶 A 水合酶(Enoyl-CoA hydratase)、短链酰基辅酶 A 脱氢酶(Short-chain acyl-CoA dehydrogenase)等的

作用下生成己酸与丁酸。由图 7b 可知,细菌群落参与乳酸合成和乙醇脱氢是黄水发酵过程中主要的代谢,发酵后期醛脱氢酶(EC1.2.1.3)、烯酰辅酶 A 水合酶 (EC4.2.1.17)、短链酰基辅酶 A 脱氢酶 (EC1.3.8.1)等酶相对丰度的提高,使得酸代谢更加完整,说明可能黄水中香味物质的合成主要在发酵后期,功能预测结果表明黄水中的细菌群落具有产香的巨大潜力。

3 讨论

通过检测浓香型白酒发酵过程中黄水的理化指标,分析黄水细菌群落结构,发现浓香型白酒发酵过程黄水中的细菌群落的演替规律可分为两个阶段。在第 I 阶段(5~20 d),还原糖含量迅速下降,乳杆菌属是黄水细菌群落的绝对优势菌属,具备较强的碳水化合物代谢以及产酸能力,能将代谢糖类物质生成乳酸,乳酸不仅能作为合成其它脂肪酸的底物,还能与乙醇酯化形成乳酸乙酯,增强浓香型白酒的独特风味^[15],而肖辰等^[16]在研究酒醅细菌群落的发酵演替规律中发现,乳杆菌属在前期的发酵阶段相对丰度较低,发酵后期逐渐升高,说明酒醅与黄水在发酵过程中可能存在乳杆菌属的迁移,同时由于重力作用酒醅中微生物代



注:图中酶的 EC 编号来源于 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)。

图 7 酸代谢途径及酶相对丰度气泡图

Fig.7 Acid metabolism pathway and bubble plot of relative abundance of enzymes

谢水对上层酒醅中有机酸的运移,也是黄水中有机酸富余的原因之一。随着发酵进行到第Ⅱ阶段(20~60 d),细菌群落多样性增高,醋酸杆菌属、产己酸菌属、梭菌属、岩石单胞菌属等产酸细菌逐渐成为优势微生物(相对丰度>1%),醋酸杆菌属具有较强的将乙醇氧化成乙酸的能力并且耐乙酸性较高^[17];产己酸菌属在40 d时相对丰度最高,该类菌在厌氧条件下,以果糖为底物代谢乙酸酯、乳酸酯、丁酸脂和己酸酯,同时还能以半乳糖为碳源,代谢合成乙酸、丁酸和己酸,主要通过逆 β -氧化途径^[18-20];梭菌属在60 d时相对丰度最高,该菌具有分解有机物生成乙酸、丁酸的能力^[21];发酵过程中产酸细菌增加,乳杆菌属相对丰度下降,酸度也有所下降,这可能与黄水微生物降解乳酸的代谢有关^[15]。沉积菌属(*Sedimentibacter*)^[22]、共养单胞菌属的相对丰度在发酵30 d逐渐增加,其降解氨基酸生成铵态氮和乙酸的功能,可以为菌群提供氮源(铵态氮),还能促进以乙酸为生长因子的甲烷菌的繁殖^[23]。沉积菌属、共养单胞菌属对窖泥老熟具有重要的作用,说明浓香型白酒发酵后期黄水中存在大量促进窖泥老熟的菌种,且黄水可以提供这些菌种在厌氧条件下生长所需的营养物质^[24],黄水的发酵是否会促进窖泥的老熟还需进一步验证;而葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、共养单胞菌属则在发酵过程丰度较低。酒醅发酵过程中,黄水中的有机酸也可能来自于发酵的累积,其对白酒品质的影响是否与细菌群落代谢有机酸相关还需进一步研究。同时,本研究发现发酵后期黄水中增加的菌属,在黄水发酵前期的窖底泥中相对丰度较高,说明黄水与窖底泥之间可能存在微生物的迁移,同时窖池底层黄水中的微生物多样性也会受到上层酒醅的影响,目前对于窖池内微生物在黄水、酒醅、窖泥之间的迁移还不清晰,后期的研究重点将放在微生物在窖池中的定殖迁移规律。

通过PICRUST技术对黄水中细菌群落进行了酸代谢途径中功能酶的丰度预测以及碳水化合物代谢相关途径的功能预测,发现参与乳酸与乙酸合成的功能酶在整个发酵阶段丰度最高,这可能也是黄水中乳酸与乙酸含量保持较高的原因,其中乳酸脱氢酶是一种胞质酶,主要参与厌氧和

好氧糖酵解,将丙酮酸转化成乳酸^[25-26];乙醇脱氢酶在葡萄糖发酵过程中参与伯醇和醛之间的可逆反应^[27],可以促进乙酸的合成,乳酸与乙酸都是浓香型白酒重要的风味物质。参与己酸、丁酸合成的酶类在发酵过程中丰度不断增加,己酸是浓香型白酒典型风格己酸乙酯的前体物,有研究表明,窖泥中存在以乳酸为前体生成己酸的菌种,窖泥微生物对浓香型白酒特征风味有重要影响,因此,对白酒发酵过程中微生物的群落结构、相互作用及其与产物之间关系的研究一直是理论研究的核心与热点^[28]。梭状芽孢杆菌属、丙酸杆菌属具备代谢丁酸的能力,丁酸是浓香型白酒发酵过程中的重要风味物质,该酸的含量在黄水中呈现先升高后趋于平稳的趋势,与预测的相关功能酶丰度的变化一致。由图6、图7a可以看出,细菌群落参与多种糖类的代谢,其中最主要的是糖酵解,葡萄糖通过糖酵解生成丙酮酸,并在厌氧条件下被还原成乳酸与乙醇,而黄水中乳杆菌属是绝对优势菌属,其主要代谢产物为乳酸,同时,对菌群的酸代谢功能酶丰度的预测结果与有机酸含量的变化基本一致,说明黄水中细菌群落与有机酸密切相关,本研究通过功能预测了解到黄水中不同发酵阶段功能酶的丰度变化以及主要参与的是糖代谢途径,提示黄水具有较强的产香潜力,并且可能在发酵后期为浓香型白酒提供主体香味物质。

4 结论

本文利用高通量测序技术研究浓香型白酒窖底泥与发酵过程黄水中的细菌群落结构,发现发酵第Ⅰ阶段乳杆菌属是黄水中的绝对优势菌属,当发酵进入第Ⅱ阶段,醋酸杆菌属、产己酸菌属、梭菌属等菌属的相对丰度增加,黄水的细菌群落多样性更加丰富,通过与窖底泥细菌群落结构的对比,推测黄水后期的细菌属可能来自于窖泥的迁移;功能预测发现黄水中细菌群落主要参与发酵过程中的糖酵解途径,而且提供了丰富的乳酸、己酸、乙酸、丁酸等酸代谢相关的功能酶,能够为浓香型白酒提供主体香味物质的前体物质,为进一步定向控制浓香型白酒发酵过程的有机酸含量奠定研究基础。

参 考 文 献

- [1] 张卜升, 袁丛丛, 李汶轩, 等. 浓香、酱香、清香型白酒挥发性风味的特征与差异研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(24): 8058-8067.
ZHANG B S, YUAN C C, LI W X, et al. Study on the characteristics and differences of volatile flavors of strong-, sauce-and light-flavor Baijiu[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(24): 8058-8067.
- [2] ZOU W, ZHAO C, LUO H. Diversity and function of microbial community in Chinese strong-flavor Baijiu ecosystem: A review[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 671.
- [3] 王莉, 袁宁, 管桂坤, 等. 黄水对浓香型白酒酒质的影响[J]. 酿酒科技, 2020(10): 83-86.
WANG L, YUAN N, GUAN G K, et al. Effect of yellow water on the quality of nongxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2020(10): 83-86.
- [4] 尹倩倩, 刘双平, 秦辉, 等. 浓香型白酒上下层原酒风味特征及影响因子分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(18): 53-59.
YIN Q Q, LIU S P, QIN H, et al. Flavor characteristics and its influencing factors of original liquor of Luzhou-flavor Baijiu in the upper and lower layers of the cellar[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(18): 53-59.
- [5] 李可. 中国浓香型白酒发酵黄水中微生物群落结构及多样性解析[D]. 成都: 西华大学, 2014.
LI K. Microbial community and diversity of fermented yellow water in Chinese intense flavor liquor cellar[D]. Chengdu: Xihua University, 2014.
- [6] GAO Z, WU Z, ZHANG W. Effect of pit mud on bacterial community and aroma components in yellow water and their changes during the fermentation of chinese strong-flavor liquor[J]. Foods, 9(3): 372.
- [7] HUANG Y L, SUN W, SU Q Q. Environmental issues for the Chinese strong aromatic liquor industry: An assessment for the brewing system[J]. Environmental Modeling & Assessment, 2014, 19(2): 153-165.
- [8] 徐亚超, 盛杰, 刘安军. 白酒发酵副产物黄水抑菌特性及稳定性研究[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 122-126.
XU Y C, SHENG J, LIU A J. Antimicrobial properties and stability of yellow water, a byproduct of Chinese liquor fermentation[J]. Food Science, 2017, 38(15): 122-126.
- [9] 胡晓龙, 冯大鸿, 张勇, 等. 浓香型酒醅中梭菌群落演替及其与理化性质的相关性分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 94-100.
HU X L, FENG D H, ZHANG Y, et al. Dynamic clostridial community succession and its correlation with physicochemical factors in Jiupai for strong flavor Baijiu production[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(5): 94-100.
- [10] 黄治国, 江科, 乔宗伟, 等. 五粮浓香型白酒发酵过程中黄水变化规律探究[J]. 现代食品科技, 2023, 39(5): 210-216.
HUANG Z G, JIANG K, QIAO Z W, et al. Study on the variable rules of Huangshui of five grain nongxiangxing baijiu during fermentation process[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 210-216.
- [11] WANG X J, ZHU H M, REN Z Q, et al. Characterization of microbial diversity and community structure in fermentation pit mud of different ages for production of strong-aroma Baijiu[J]. Polish Journal of Microbiology, 2020, 69(2): 151-164.
- [12] DENG J, ZHENG J N, HUANG D, et al. Characterization of physicochemical properties, volatile compounds and microbial community structure in four types of Daqu[J]. LWT, 2023, 184: 115046.
- [13] ZHENG J, LIANG R, ZHANG L Q, et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses[J]. Food Research International, 2013, 54(1): 660-666.
- [14] HEO J, SOMBOLESTANI A S, LAUREYS D, et al. *Acetobacter vaccinii* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.)[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2022, 72(11): 005614.
- [15] 曾波, 邹永芳, 饶家权, 等. 浓香型白酒窖底泥和窖壁泥细菌群落结构差异性分析[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 223-230.
ZENG B, ZOU Y F, RAO J Q, et al. Difference analysis of bacterial community in bottom pit mud and wall pit mud[J]. Food Science, 2023, 44(18):

- 223–230.
- [16] 肖辰, 陆震鸣, 张晓娟, 等. 泸型酒酒醅细菌群落的发酵演替规律[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 195–204.
- XIAO C, LU Z M, ZHANG X J, et al. Bacterial community succession in fermented grains of Luzhou-flavor baijiu[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(1): 195–204.
- [17] NAKANO S, FUKAYA M. Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 125(1): 54–59.
- [18] FLAIZ M, BAUR T, BRAHNER S, et al. *Caproicibacter fermentans* gen. nov., sp. nov., a new caproate-producing bacterium and emended description of the genus *Caproiciproducens*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(7): 4269–4279.
- [19] KIM B C, SEUNG JEON B, KIM S, et al. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2015, 65(12): 4902–4908.
- [20] GUAN Z, GARRETT T A, GOLDFINE H. Lipidomic analysis of *Clostridium cadaveris* and *Clostridium fallax*[J]. Lipids, 2019, 54(8): 423–431.
- [21] 孟雅静, 王艳丽, 丁峰, 等. 浓香型白酒新、老窖池分层池底窖泥菌群总氢代谢与乳酸含量之间的关系[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 171–177.
- MENG Y J, WANG Y L, DING F, et al. Relationship between microbial total hydrogen metabolism and lactic acid content in layered bottom pit muds from old and young pits used for the production of strong-flavor Baijiu [J]. Food Science, 2021, 42(18): 171–177.
- [22] IMACHI H, SAKAI S, KUBOTA T, et al. *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(3): 1293–1300.
- [23] ZHANG H M, MENG Y J, WANG Y L, et al. Prokaryotic communities in multidimensional bottom-pit-mud from old and young pits used for the production of Chinese strong-flavor Baijiu [J]. Food Chem, 2020, 312: 126084.
- [24] 张会敏, 王艳丽, 孟雅静, 等. 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 H M, WANG Y L, MENG Y J, et al. 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.
- [25] VALVONA C J, FILLMORE H L, NUNN P B, et al. The regulation and function of lactate dehydrogenase A: Therapeutic potential in brain tumor [J]. Brain Pathol, 2016, 26(1): 3–17.
- [26] FENG Y, XIONG Y, QIAO T, et al. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy[J]. Cancer Med, 2018, 7(12): 6124–6136.
- [27] KOESOEMA A A, STANDLEY D M, SENDA T, et al. Impact and relevance of alcohol dehydrogenase enantioselectivities on biotechnological applications[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(7): 2897–2909.
- [28] 勾文君, 田源, 孔小勇, 等. 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 W J, TIAN Y, KONG X Y, et al. Bacterial composition in pit mud of Yanghe liquor and identification of acid producing bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 47(6): 1651–1661.

Succession of Bacterial Community Structure in Huangshui during Fermentation Process of Strong Aromatic Chinese Spirit

Zeng Bo¹, Zheng Jia², Feng Zheng², Huang Zhiguo^{1,3}, Su Jian², Deng Jie^{1,3*}

(¹Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Brewing Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, Sichuan

²Wuliangye Yibin Co., Ltd., Yibin 644000, Sichuan

³Liquor Brewing Biotechnology and Intelligent Manufacturing Key Laboratory of China Light Industry, Yibin 644000, Sichuan)

Abstract In the fermentation process of strong aromatic Chinese spirit, the different levels of fermented grains was uneven, the bottom fermented grains was affected by Huangshui immersion fermentation, and the bacterial community structure from Huangshui had a great contribution to organic acid metabolism. To identify the succession and potential function of bacterial community structure in Huangshui during the fermentation process, high-throughput sequencing was borrowed to reveal the succession of bacterial community structure, the relationship between bacterial community structure and the content of organic acid content was analyzed in different fermentation stages. PICRUSt analyse was used to predict the potential function of bacterial community in Huangshui. The results showed that the changes of bacterial community structure in Huangshui could be divided into two stages during the fermentation process, 5–20 d and 20–60 d, respectively. *Lactobacillus* was the absolute dominant bacterial genus in Huangshui, with a relative abundance of more than 97% at 5–10 d. The relative abundance of *Caproiciproducensz*, *Clostridium*, *Petrimonas*, *Hydrogenispora*, *Proteiniphilum* increased significantly in late fermentation stages. PICRUSt analysis showed that Huangshui bacterial communities may mainly participate in glycolytic pathways during fermentation. The relative abundance of functional enzymes related to lactic acid, acetic acid, caproic acid, and butyric acid was relatively high. The results showed that the bacterial community in Huangshui has great potential for aroma-producing and an important impact on the fermentation of strong aromatic Chinese spirit fermented grains.

Keywords strong aromatic Chinese spirit; Huangshui; bacterial community structure; organic acid