

窖泥来源产己酸精简菌群的生料发酵特性

秦昊¹, 刘志豪¹, 任聪^{1,2,3*}, 徐岩^{1,2,3*}

1 江南大学 生物工程学院, 酿造微生物学与应用酶学研究室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学, 工业生物技术教育部重点实验, 江苏 无锡 214122

3 中国轻工业微生物组学与生态酿造技术重点实验室, 江苏 无锡 214122

秦昊, 刘志豪, 任聪, 徐岩. 窖泥来源产己酸精简菌群的生料发酵特性[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4153-4170.

QIN Hao, LIU Zhihao, REN Cong, XU Yan. Fermentation characteristics of unsterilized feedstock with a simplified caproate-producing microbial consortium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4153-4170.

摘要:【目的】获得高效利用乳酸产己酸的稳定菌群, 以实现白酒酿造废水(黄水)的高值化碳回收处理。【方法】采用平板筛选法获得产己酸精简菌群, 评估菌群的底物利用类型, 优化菌群的发酵底物浓度、最适 pH 值和补料策略, 并运用基于纳米孔测序技术的宏基因组学分析产己酸精简菌群的结构和稳态特征。【结果】产己酸精简菌群 SimpCom1 在乳酸条件下具有比葡萄糖条件更优的己酸转化能力; 以生料黄水作为发酵原料时, 黄水浓度控制在 30%–50%、发酵起始 pH 5.50 的方式可实现菌群稳定生长与代谢; 以 50%黄水浓度、起始 pH 5.50 并在 48 h 后控制 pH (6.50≤pH≤7.00)的批次补料发酵方式, 四次批次发酵循环的平均己酸累积浓度为 16.83 g/L, 平均生产效率为 3.05 g/(L·d), 平均己酸选择性(己酸占产生总酸比值)为 67.27%, 乳酸向己酸的平均转化得率为 0.42 g/g; 宏基因组学分析表明, SimpCom1 菌群核心物种主要包括解乳酸己小杆菌(*Caproicibacterium lactatifermentans*)、酸鱼宿主关联乳杆菌(*Ligilactobacillus acidipiscis*)、酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)和‘*Butyriproducens baijiuensis* BJN0003’, 其中解乳酸己小杆菌和‘*B. baijiuensis* BJN0003’可在生料黄水中有效生长与稳定代谢, 在 50%稀释度黄水发酵终点的相对丰度分别为 45.3%和 6.7%。【结论】成功应用含解乳酸己小杆菌和‘*B. baijiuensis* BJN0003’的产己酸精简菌群发酵生料白酒酿造废水, 实现高值、高效、低成本碳回收。

关键词: 己酸菌; 生料发酵; 菌群精简; 酿造废水资源化

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD2101201)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2101201).

*Corresponding authors. E-mail: REN Cong, congren@jiangnan.edu.cn; XU Yan, yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-03-05; Accepted: 2024-05-28

Fermentation characteristics of unsterilized feedstock with a simplified caproate-producing microbial consortium

QIN Hao¹, LIU Zhihao¹, REN Cong^{1,2,3*}, XU Yan^{1,2,3*}

1 Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

3 Key Light-industry Laboratory of Microbiome Ecological Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To obtain a stable microbial consortium with a high yield of caproate and achieve high-value carbon recovery from *Baijiu*-making wastewater (*Huangshui*). [Methods] We used the plate screening approach to obtain a simplified caproate-producing microbial consortium, evaluated the preferred carbon source of the consortium, and optimized the substrate concentration, pH, and feeding strategy. The metagenomics based on nanopore sequencing was employed to determine the composition and stability characteristics of the simplified caproate-producing microbial consortium. [Results] SimpCom1, a simplified caproate-producing microbial consortium, demonstrated significantly higher conversion rate of lactate than glucose to caproate. When SimpCom1 was used to ferment unsterilized *Huangshui*, we controlled the working concentration of *Huangshui* between 30% and 50% and initial pH 5.50 to achieve stable growth and metabolism of the consortium for caproate production. The fermentation was carried out in a fed-batch manner with 50% *Huangshui*, initial pH 5.50, and pH 6.50–7.00 after 48 h. Within four fed-batch fermentation cycles, the average caproate titer, productivity, proportion of caproate in total acids, and conversion rate of lactate to caproate reached 16.83 g/L, 3.05 g/(L·d), 67.27%, and 0.42 g/g, respectively. The metagenomic analysis showed that *Caproicibacterium lactatifermentans*, *Ligilactobacillus acidipiscis*, *Clostridium tyrobutyricum*, and ‘*Butyriproducens baijiuensis* BJN0003’ were the core species of SimpCom1. *C. lactatifermentans* and ‘*B. baijiuensis* BJN0003’ remained stable growth and metabolism in the unsterilized *Huangshui*, with the relative abundance of 45.3% and 6.7%, respectively, at the end of fermentation with 50%-diluted *Huangshui*. [Conclusion] We successfully established an efficient and low-cost approach for producing caproate by fermentation of unsterilized *Baijiu*-making wastewater with a simplified microbial consortium containing *C. lactatifermentans* and ‘*B. baijiuensis* BJN0003’.

Keywords: caproate-producing bacteria; fermentation with unsterilized feedstock; microbial consortium simplification; carbon recycling of *Baijiu*-making wastewater

以酿造为代表的食品工业产生大量 pH 低至 3.00–4.00 的高化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)废水(COD 高达 150 g/L), 其生化组分主要包括以乳酸为代表的有机酸及乙醇,

厌氧消化产甲烷是处理此类高浓度食品工业废水的常用方式^[1-2]。然而, 厌氧消化产甲烷难以直接处理高浓度废水, 该技术的设备投资高昂、运行成本高^[3]。食品工业废水的高值化碳回收

近年来受到高度重视^[4], 目前国外新建起以餐厨和食品副产物为原料的中链脂肪酸(己酸、辛酸)生产示范工厂^[5]。因食品工业废水本身富含乳酸或极易酸化生成乳酸的特点, 近年来, 以乳酸为电子供体的中链脂肪酸碳链延长工艺逐渐受到重视^[6], 但仍存在自然富集菌群生长缓慢和纯培养菌株难以被应用于未灭菌废水生料发酵的挑战^[7]。

采用“自上而下”(top-down)或“自下而上”(bottom-up)的菌群构建策略, 快速获得高效己酸转化菌群, 成为从富含高浓度底物(例如乳酸)的有机废弃物中进行中链脂肪酸炼制的核心^[8]。自然界能够以乳酸为电子供体(即乳酸利用型)的微生物较为稀有, 当前已经发现的乳酸利用型厌氧菌如从绵羊瘤胃分离的埃氏巨球形菌(*Megasphaera elsdenii*), 虽然能够直接利用乳酸产生己酸, 但在糖类存在时, 乳酸会经丙烯酸途径优先转化为丙酸^[9], 造成乳酸-己酸转化过程中的碳流向的分流, 生产上难以利用此类微生物完成对己酸的连续高质量转化。Kucek 等研究表明采用菌群连续进行己酸高效转化的前提是要实现产己酸菌株对乳酸的高效利用, 避免因丙烯酸途径造成对乳酸碳流向的分流^[10]。因此, 寻找新型产己酸微生物, 将目前食品工业厌氧消化工艺中的产丁酸/丙酸模式升级为不产生丙酸的己酸碳链延长模式, 可有望提升食品工业高浓度废水的处理效率和资源化率。

当前已报道能够利用乳酸对己酸进行转化的微生物主要分布在梭菌纲(*Clostridia*)下的解乳酸己小杆菌(*Caproicibacterium lactatifermentans*)^[11-12]、*Ruminococcaceae* bacterium BL-6^[13]和阴性球菌纲(*Negativicutes*)下啤酒巨球形菌(*Megasphaera cerevisiae*)^[14]、产己酸巨球形菌(*Megasphaera hexanoica*)^[15]、埃氏巨球形菌(*Megasphaera*

elsdenii)^[16]。其中 *C. lactatifermentans* (建议中文译名: 解乳酸己小杆菌)为本研究团队近期从白酒酿造窖泥中筛选鉴定到的新种, 具有良好的乳酸-己酸转化能力, 但该菌为小基因组微生物(基因组大小 ≤ 2 Mb), 根据基因组注释结果推测其为多种氨基酸营养缺陷型微生物, 因此其纯菌株在培养过程中对营养需求过高, 菌株纯化难度大^[11]。根据解乳酸己小杆菌在筛选过程中表现出与其他微生物的伴生特性(如丁酸梭菌、酪丁酸梭菌), 筛选产己酸精简菌群应用于实际发酵, 是推广解乳酸己小杆菌(*C. lactatifermentans*)应用范围, 建立新型黄水高值化转化的一个重要策略。

最近, Wu 等^[17]和 Zhu 等^[18-19]等以开放式连续发酵的方式实现用黄水发酵产己酸, 己酸产量最高分别达到 12.3 g/L 和 25.4 g/L。采用上述发酵方式对黄水发酵虽可以得到产量较高的短、中链脂肪酸(主要为己酸), 但是从微生物整体变化以及短中链脂肪酸的产生情况来看, 使用结构复杂的微生物菌群进行发酵会导致发酵系统整体波动变大。稳定的菌群具有较纯培养菌株更好的发酵能力, 通过菌群中微生物之间的交叉喂养(cross-feeding)可以实现菌群结构和代谢稳定, 有望表现出优于纯培养菌株的抵抗外源污染^[20]和高效碳转化能力^[21-22]。因此采用精简菌群对高乳酸生料酿造废水实现高效产酸发酵, 是实现低成本、高效益碳回收的重要基础保障。

本研究旨在运用解乳酸己小杆菌能够实现乳酸-己酸高效转化的特点, 基于以解乳酸己小杆菌为核心功能微生物的产己酸精简菌群, 在确定产己酸精简菌群最适底物类型的基础上进行发酵条件优化, 探索批次补料发酵工艺在黄水高效发酵制备己酸中的应用价值。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 窖泥和amp;黄水

本研究所使用的黄水和窖泥样本均来自于四川某酒厂。

1.1.2 主要试剂和amp;仪器

乙酸钠、丁酸钠、己酸钠, Solarbio 公司; 叔戊酸、乳酸钠, Sigma-Aldrich 公司; DNA 提取试剂盒 PowerSoil DNA Isolation Kit, QIAGENiagen 公司; 建库与amp;测序试剂, NEB 公司; 其余常规化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

NanoDrop 8000 蛋白核酸测定分光光度计、Qubit 荧光计、厌氧工作站, ThermoFisher Scientific 公司; 气相色谱仪 Agilent 7890B、高效液相色谱仪 Agilent 1260, Agilent 公司; 精密 pH 计, METTLER TOLEDO 公司; 有机酸柱 Aminex HPX-87H, Bio-Rad 公司; 气相色谱柱 CP-WAX 57 CB, Agilent 公司; 3 L 玻璃发酵罐, Eppendorf 公司; Oxford Nanopore GridON 测序仪, Oxford Nanopore Technologies 公司。

1.1.3 培养基

高氮源 mCGM 培养基(g/L): 乳酸 10.000 或葡萄糖 20.000, 乙酸钠 5.000, 酵母粉 10.000, 蛋白胨 10.000, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.000, NaH_2PO_4 1.000, K_2HPO_4 0.500, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.100, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.015, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.010, CaCl_2 0.010, CoCl_2 0.002, ZnSO_4 0.002。固体培养基添加终浓度为 1.5% 的琼脂糖。

低氮源 MM 培养基(g/L): 乳酸 10.0, 酵母粉 1.0, 乙酸钠 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, K_2HPO_4 0.5, 微量元素 300 μL 。微量元素的组成成分(mg/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 000.0, ZnCl_2 50.0, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 500.0, $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30.0, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50.0, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 000.0,

$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50.0, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100.0, H_3BO_3 50.0, EDTA 1 000.0, HCl ($\omega=36\%$) 1 mL。

1.2 产己酸精筒菌群的获取及amp;发酵性能的测试

1.2.1 精筒产己酸菌群的筛选及其产己酸能力测试

产己酸精筒菌群采用“富集-涂板”法进行筛选。具体而言, 以老窖泥作为菌群筛选源, 向初始 pH 5.50 且添加了体积分数为 20% 的黄水的 MM 培养基中, 以质量体积分数(窖泥质量: 发酵体系体积)为 5% 的比例接种老窖泥, 在 37 $^\circ\text{C}$ 下对窖泥中的微生物进行富集培养至 7 d。然后用乳酸 mCGM 培养基对富集菌液以 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释度进行稀释, 取 100 μL 菌液涂布于 mCGM 琼脂平板上, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 厌氧工作站中培养 3 d。然后挑取单个菌落接种至含乳酸碳源的 mCGM 液体培养基中培养 7 d, 培养液上清通过气相色谱测定己酸和丁酸产生量, 保留己酸浓度 > 1.00 g/L 的菌液, 并对上述保留菌液进行扩培放大培养与保藏。镜检和 Sanger 测序表明, 这种方法获得的菌落未经进一步纯化, 为含有解乳酸己小杆菌的菌群, 将之定义为产己酸精筒菌群。

采用 mCGM 液体培养基对产己酸精筒菌群进行发酵产己酸能力的判定。以白酒酿造过程中常见碳源——葡萄糖、乳酸分别作为发酵过程中的主要碳源, 在厌氧工作站内以发酵总体积 10% 的接种量将处于对数期的产己酸精筒菌群接种至 100 mL 新鲜除氧的 mCGM 培养基中, 初始 pH 设置为 5.50, 设置 3 个平行组, 于 37 $^\circ\text{C}$ 连续培养 5 d。发酵期间每天连续取样, 并将样品菌体和上清分离后分别冻存至 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱内, 以进行后续发酵指标的评定和分析。

1.2.2 使用黄水作为唯一碳源对产己酸精筒菌群进行生料发酵

本研究中所使用的黄水理化性质: pH 3.35

乳酸 74.21 g/L, 乙酸 8.13 g/L, 乙醇 53.99 g/L。设置 30%稀释、50%稀释和不稀释(原液) 3 个稀释度的黄水对菌群进行发酵, 并在发酵后使用终浓度为 5 mol/L 氢氧化钠调节黄水 pH 至 5.5。将处于对数期的产己酸精简菌群以发酵总体积 10%的接种量接种至 100 mL 上述 3 种稀释度的黄水中进行发酵, 每个条件设置 3 个平行组。发酵期间每天连续取样, 并将样品菌体和上清分离后分别冻存在-20 °C冰箱, 后续进行发酵指标的评定和分析。

1.2.3 产己酸精简菌群发酵产己酸的条件优化

采取补料发酵的方式, 考察补料后 pH 对己酸产量的影响。以初始 pH 5.50、稀释度为 50%的黄水对产己酸精简菌群进行生料发酵实验。在考察补料后的 pH 对菌群发酵产己酸的影响时, 使用 HCl 调节 pH 至不同浓度(pH 5.50、6.00、6.50、7.50)并将底物浓度统一调节至 40 g/L 后进行发酵实验。将处于对数期的高产己酸菌群以发酵总体积 10%的接种量接种至 100 mL 上述黄水中进行发酵, 每个条件设置 3 个平行组。发酵期间每天连续取样, 并将样品菌体和上清分离后分别冻存在-20 °C冰箱, 后续进行发酵指标的评定和分析。

1.2.4 采用批次补料发酵方式实现 SimpCom1 菌群对己酸的高效发酵

确定了 SimpCom1 菌群最适补料方式后, 采用批次补料的方式在 3 L 发酵罐中对发酵进行放大, 以评估己酸的最大产量。以初始 pH 5.50, 稀释度为 50%的黄水进行发酵实验, 当 pH 达到 6.50 时(发酵 48 h)开始控制发酵体系 pH 在 6.50-7.00 之间。

3 L 发酵罐控制条件: 在厌氧工作站(ThermoFisher Scientific 公司)内将 SimpCom1 菌群培养至对数期后, 以发酵总体积 10%的接种比例转接入 3 L 发酵罐中, 发酵温度控制在

37 °C, 采用 8 mol/L 的 HCl 控制调节 pH 值。每次取样后分别对发酵过程内的乳酸利用和挥发性脂肪酸(乙酸、丁酸、己酸)产生情况进行监测。当乳酸消耗接近完全时, 放出约 50%发酵体系体积的发酵液, 同时补加等体积、稀释度为 50%的黄水。发酵罐的转速设置在 200 r/min, 发酵过程中以 N₂ 维持罐内正压。

1.3 底物和产物测定

采用气相色谱仪器(Agilent 公司)对样本中的主要挥发性有机酸进行分析, 色谱柱型号为 CP-WAX 57 CB (Agilent 公司)。样本制备方法为: 添加 50 μL 叔戊酸内标(终浓度 12.5 g/L, 含终浓度 5%的浓盐酸)于 200 μL 发酵上清液中(提前使用 0.22 μm 水相滤膜过膜), 涡旋后取 200 μL 上清液进行主要挥发性有机酸的检测。升温程序: 初始温度 60 °C, 保持 0.5 min, 以 20 °C/min 升温到 180 °C, 保持 5.5 min。分流比为 5:1, 进样口温度为 220 °C, 氢离子火焰检测器温度为 220 °C。

采用高效液相色谱仪(Agilent 公司)对发酵体系的乳酸进行分析, 色谱柱为 Aminex HPX-87H (Bio-Rad 公司)。取 500 μL 发酵上清液, 使用 0.22 μm 水相滤膜过膜后上样, 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸溶液, 流速 0.5 mL/min, 柱温 60 °C, 采用示差检测器检测乳酸的含量。

1.4 DNA 提取和高通量测序

为了对微生物群落结构进行绝对定量, 在样本进行 DNA 提取之前添加内标菌。内标菌(丙酮丁醇梭菌)的制备、添加量及物种绝对丰度计算方法参考辜杨等的内标菌定量方法^[23]。DNA 提取前按照 5.2×10^7 cells/mL 添加内标菌。DNA 提取过程参照 Power Soil DNA Isolation Kit (Qiagen 公司)说明书进行提取, 在完成提取后经 NanoDrop 8000 分光光度计测定样品浓度, 后储存于-80 °C中待用。PCR 扩增引物为

338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')^[24],对细菌的16S rRNA基因V3-V4可变区进行扩增,扩增子的建库与测序在上海凌恩生物科技有限公司 Illumina MiSeq PE300 测序平台完成。选取在 mCGM 培养基发酵群落(乳酸碳源)与黄水发酵群落发酵终点的菌体进行 Nanopore 宏基因组测序。在进行测序前使用 Qubit 荧光计(ThermoFisher Scientific 公司)对基因组 DNA 浓度进行定量,然后在 Oxford Nanopore GridON 测序仪(Oxford Nanopore 公司)进行测序,测序芯片为 flowcell R9.4.1。16S rRNA 基因扩增子数据与 Nanopore 宏基因组测序原始数据已上传 NCBI, 登录号分别为 PRJNA1081667 和 PRJNA1081632。

1.5 生物信息学分析

16S rRNA 基因扩增子测序数据分析采用 QIIME 2^[25]完成,其中数据去噪方法为 DADA2^[26]。采用 vsearch^[27]对 ASV 进行 99%相似水平聚类,

获得代表性 ASV 序列。ASV 代表序列的物种注释首先使用 Greengene2 分类学数据库^[28]进行比对,再经 NCBI 16S rRNA 基因数据库和 nt 数据库进行精确注释。

宏基因组测序数据经 metaFlye^[29]进行从头组装,采用 Nanoplane^[30]内置的 Metabat2、Maxbin2 和 SemiBin2 进行分箱,内置的 MetaWrap 进行分箱的提纯。组装基因组所代表物种的丰度计算使用 CoverM 完成(<https://github.com/wwood/CoverM>)。基因组共线性分析及可视化使用 Mauve^[31]完成。

2 结果与分析

2.1 产己酸精简菌群的筛选及其利用不同碳源产己酸发酵能力评估

如图 1 所示,经过多轮“富集-涂板”法筛选,最终得到 12 个己酸产生能力>1 g/L 的产己酸精简菌群,后续选择己酸产量较高的 SimpCom1 (己酸产量为 5.52 g/L)进行发酵能力测试。

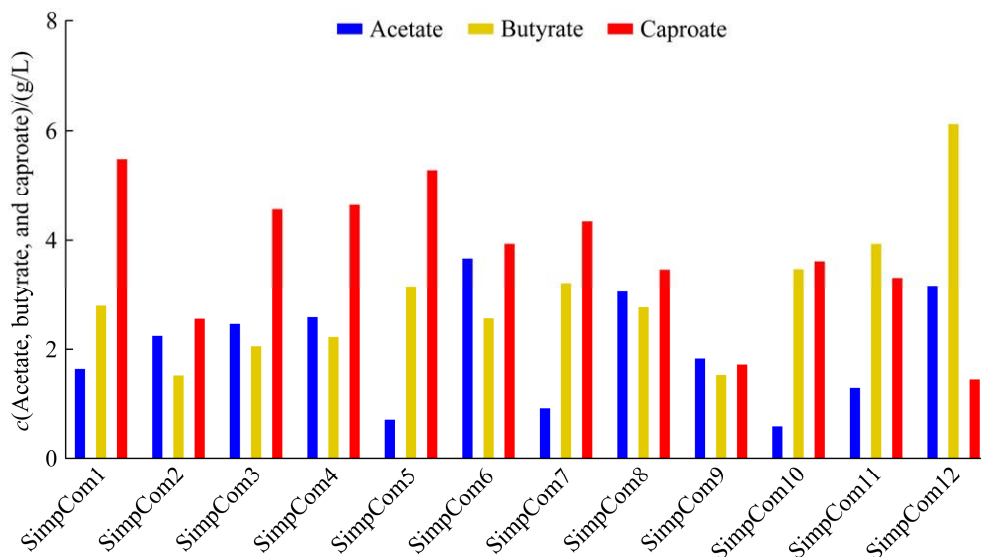


图 1 “富集-涂板”法获得的不同产己酸精简菌群利用乳酸产短、中链脂肪酸情况

Figure 1 The metabolism of different simplified consortia obtained by the method of “enrichment-spread plate” under lactate conditions.

如图 2A 所示, 获得的产己酸精简菌群 *SimpCom1* 在乳酸条件下呈现出“升 pH 式”的发酵方式, pH 从 5.53 上升至 6.86。底物测定表明, 该菌群具有较强的乳酸利用能力, 最大乳酸利用速率可达 5.8 g/(L·d) (发酵 2–3 d)。己酸的产生与乳酸的消耗相耦联, 在 11 g/L 的乳酸下, 己酸的最大产量为 4.49 g/L, 转化率为 40% (理论转化率为 43%), 该过程中还伴随产生了 2.65 g/L 的丁酸。乙酸和丁酸均可以作为己酸合成的电子受体, 在己酸快速生成时期(发酵 2–3 d), 伴随着乙酸的降低, 最大降幅为 0.77 g/L, 同时丁酸的合成速率减缓, 此时发酵过程中的碳流向主要流向逆向 β -氧化途径进行己酸的合成。

如图 2B 所示, 在葡萄糖为底物的条件下 *SimpCom1* 菌群对葡萄糖的消耗贯穿在整个发酵过程中, 并且发酵方式变为“降 pH 式”的发酵。与初始 pH 相比, pH 值从 5.42 降至 4.90。短中链脂肪酸的产生情况表明, 在 21 g/L 葡萄糖下, 己酸的最大产量为 4.74 g/L, 转化率为 22.4%。对比乳酸条件, 葡萄糖条件下己酸的转化率下降了 17.6%。

乳酸和葡萄糖两种底物的发酵测试表明, 在乳酸碳源下, *SimpCom1* 菌群具有更优的己酸产生能力。产生 4.49 g/L 己酸和 2.65 g/L 丁酸理论上共需要 15.90 g/L 的乳酸, 大于发酵过程中乳酸总消耗量(8.81 g/L), 这表明 *SimpCom1* 菌群中可能含有提供电子供体(如乳酸)的微生物。同时考虑到酿造黄水具有一定的葡萄糖、麦芽糖等糖类物质^[32], *SimpCom1* 菌群的糖类利用能力表明其可以兼容富含可溶性糖的黄水。以上结果表明, 在进行 *SimpCom1* 菌群精简的过程中, 核心微生物具有一定的自组装性, 这使得该菌群获得了一定抵御碳饥饿的能力, 该互生关系可能是持续维持 *SimpCom1* 菌群具备乳酸-己酸转化能力的重要原因。

2.2 *SimpCom1* 菌群发酵酿造副产物黄水产己酸条件的优化

浓香型白酒酿造工艺的稳定性保证了黄水质量的整体稳定性, 但不同来源的黄水会因酿造工艺的不同造成黄水质量产生一定的波动。由于生料黄水需同时提供发酵过程中的底物(乳酸)和其他满足菌群生长的营养物质, 黄水被

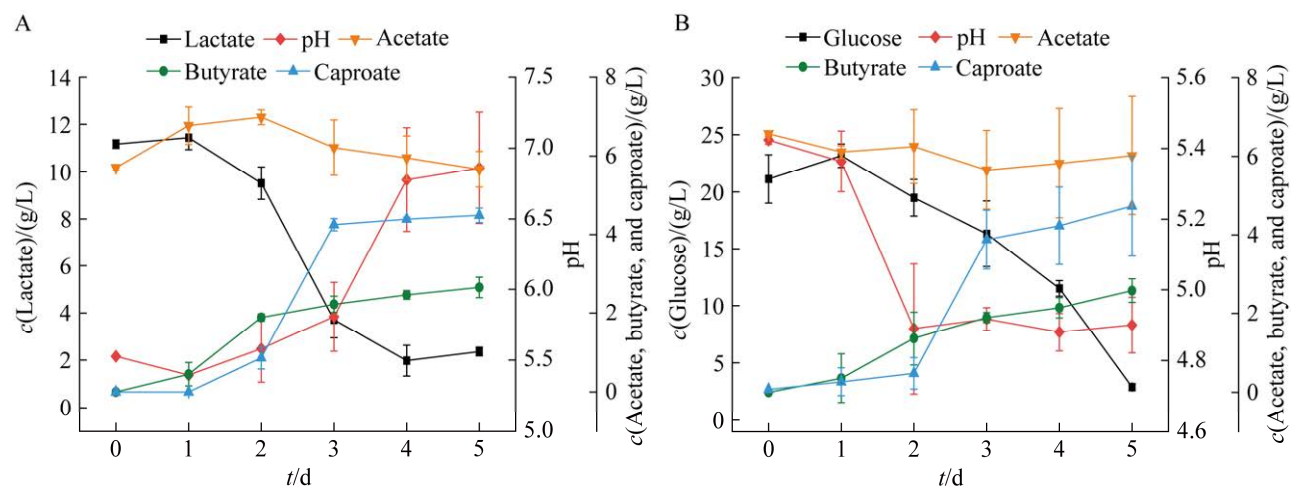


图 2 *SimpCom1* 菌群在乳酸(A)和葡萄糖(B)作为碳源的整体代谢情况

Figure 2 The metabolism of consortium *SimpCom1* under lactate (A) and glucose (B) conditions.

过度稀释不利于菌群生长，但过高的浓度(乳酸 >40 g/L)菌群无法将乳酸完全利用。为探究 SimpCom1 菌群在未灭菌的黄水中进行乳酸-己酸发酵转化的最适稀释度，将该菌群接种到仅调节 pH、不添加其他任何外源成分、不同稀释度的黄水中进行发酵，黄水使用终浓度为 30%、50%和 100%。

如图 3 所示，在 30%和 50%浓度的黄水中，SimpCom1 菌群均表现出良好的乳酸利用和己酸产生能力，50%浓度黄水更有利于累积更高浓度的己酸(最高 10.37 g/L)。100%浓度的黄水对 SimpCom1 菌群的底物利用具有较强的抑制作用，“升 pH 值”发酵现象并不明显，最终仅产生了 2.92 g/L 的己酸。不同于在 mCGM 培养基中的发酵，SimpCom1 菌群在黄水培养基中展现出丁酸“先产生，后利用”的特性，乙酸始终为上升趋势，未观测到乙酸的表现利用。

由于黄水中存在大量由 Pta-Ack 途径产生乙酸的微生物，如丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、鸡盲肠丁酸球菌(*Butyricoccus pullicaecorum*)等微生物，推测生料黄水发酵时乙酸和丁酸的增加可能由黄水中这些产酸菌的生长引起。此外，在上述 3 种稀释度的黄水下，均未检测到大量丙酸产生(丙酸产量最高为 0.56 g/L)，表明 SimpCom1 菌群在发酵黄水时，大部分碳流量并未经丙烯酸途径产生丙酸。综上所述，50%浓度的黄水为发酵较合适的工作浓度。

鉴于 SimpCom1 菌群在利用乳酸时 pH 呈现上升趋势，乳酸初始浓度和发酵初始 pH 值对最终己酸产量均有较大影响。为了进一步提升己酸产量，采取补料后调节发酵 pH 的方式，同时探索在底物充足和不同补料后的 pH 值这两种情况下对菌群产己酸效率的影响。如图 4A 所示，补料后的初始 pH 值分别调节至 5.50、6.00、

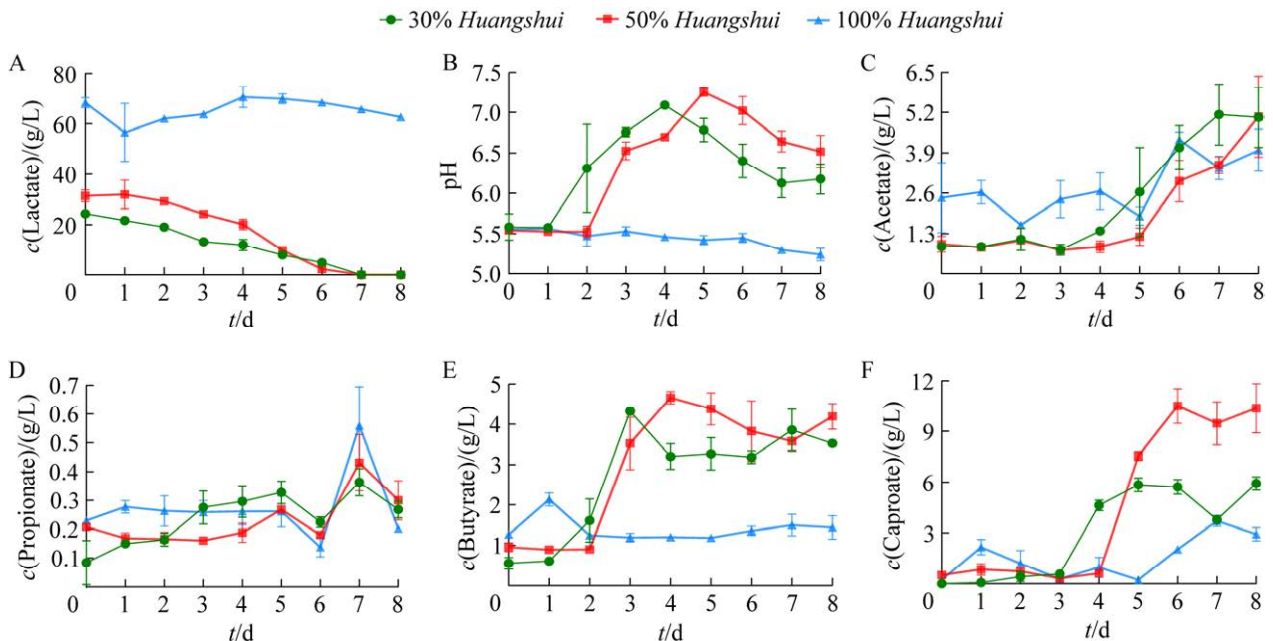


图 3 黄水使用比例对 SimpCom1 菌群发酵产己酸的影响

Figure 3 Effect of Huangshui ratio on the production of caproate by the consortium SimpCom1. A: Lactate. B: pH. C: Acetate. D: Propionate. E: Butyrate. F: Caproate.

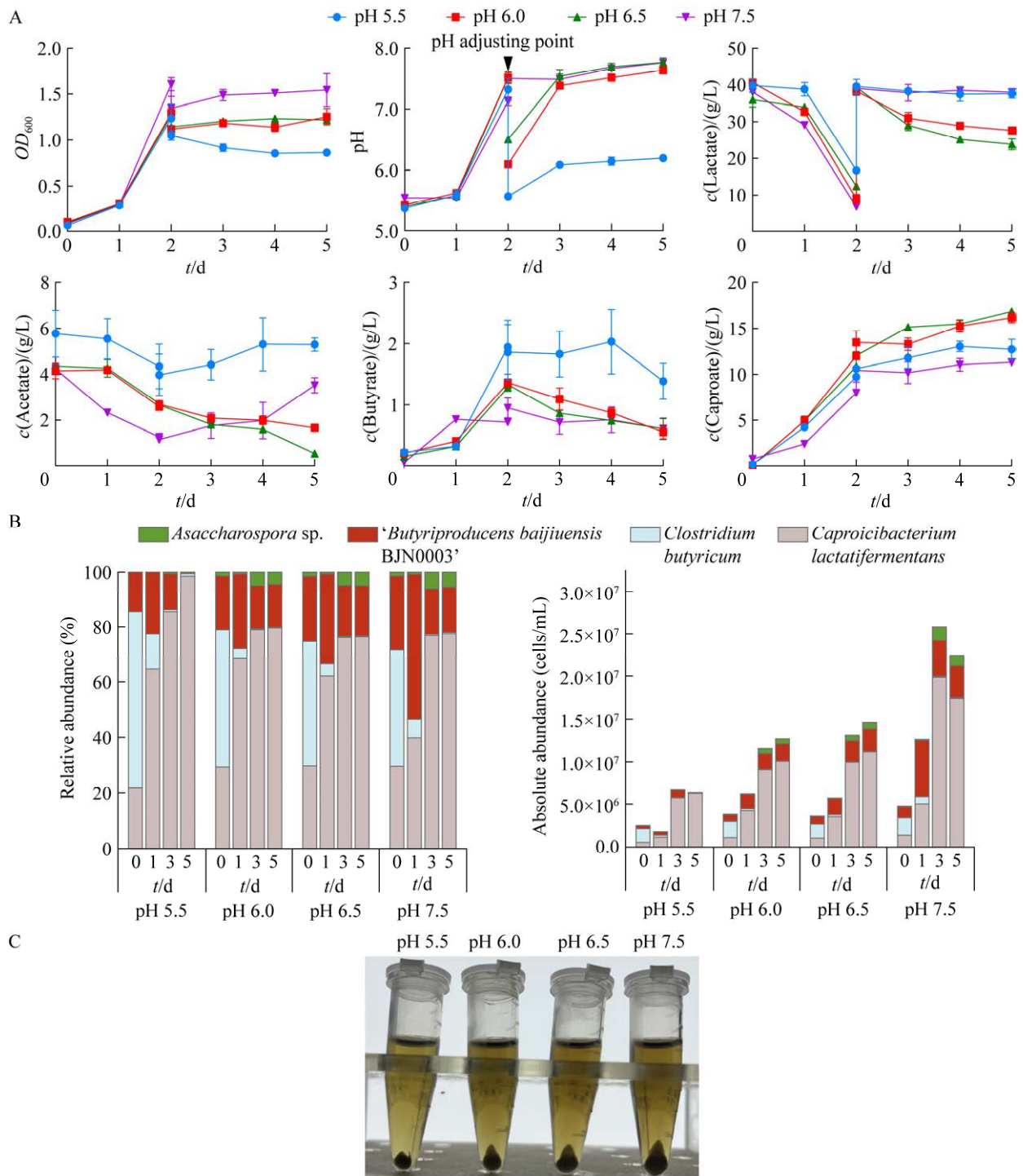


图 4 发酵过程 pH 调控方式对 *SimpCom1* 菌群发酵产己酸(A)和菌群结构(B)影响 图 B 左: 菌群相对定量; 图 B 右: 菌群绝对定量. C: 不同发酵初始 pH 条件下发酵终点菌群的生物量
Figure 4 Effect of pH regulation during fermentation process on caproate production (A) and community structures by fermentation of *SimpCom1*. B (left): Relative abundance; B (right): Absolute abundance. The black arrow in the growth panel indicates the pH controlling at 2 d. C: Biomass of end-of-fermentation flora under different pH conditions.

6.50、7.50。当己酸含量达到 10 g/L 以上时(发酵 2 d),若 pH 维持在酸性条件(pH 5.50),继续补料会由于酸抑制效应导致体系内乳酸-己酸的转换变缓(调节后己酸增加量仅 2.29 g/L);而当补料后 pH 提升至 6.00–6.50 后,酸抑制效应削弱,微生物能够继续进行己酸的合成。与 pH 5.50 时相比, pH 升至 6.00 和 6.50 后,发酵体系的己酸再累积量分别提高了 39%和 101% (分别为 4.15 g/L 和 6.01 g/L)。然而,当 pH 控制到 7.50 后,己酸产量再次下降,表明当 pH 升至 7.50 后不利于 *SimpCom1* 菌群的乳酸-己酸的转化。从代谢过程中的碳流向来看, *SimpCom1* 菌群在 4 种发酵优化方式中均未检测到丙酸的产生,这说明利用 *SimpCom1* 菌群可以直接将乳酸转化为己酸,未出现乳酸经丙烯酸途径产生丙酸的情况。综上所述,最优的补料后 pH 为 6.50,在此 pH 下, *SimpCom1* 菌群在批次发酵整个周期中对黄水中的乳酸最大利用量约为 21.46 g/(L·d) (发酵 1–2 d),己酸产量最高达到 16.87 g/L。黄水发酵过程中,解乳酸己小杆菌(*C. lactatifermentans*)为绝对优势微生物,其发酵终点的相对丰度占物种总丰度的 76.50%–98.52% (图 4B 左)。

在 pH 值分别为 5.50、6.00、6.50、7.50 的条件下,解乳酸己小杆菌的绝对生物量与接种零时刻相比分别增加了 11.3、8.92、10.3、12.3 倍(图 4B 右)。虽然 pH 6.50 为产己酸的最优初始 pH 条件,但 pH 7.50 时解乳酸己小杆菌的绝对生物量(1.74×10^7 cells/mL),较 pH 6.50 时发酵终点对应值(1.11×10^7 cells/mL)高 56.75%。在收集等体积发酵液离心后,发现聚集到试管底部的菌体量与补料至不同 pH 条件下的 OD_{600} 值及绝对生物量的整体变化趋势相符(图 4C)。综上所述,采用 50%浓度的黄水基质发酵时,补料后 pH 6.50 为最适产己酸发酵条件,而产己酸

菌群菌剂制备的最适 pH 为 7.50。

2.3 基于 *SimpCom1* 菌群的半连续批次补料发酵方式实现己酸高效发酵制备

基于优化后的发酵实验条件,在 3 L 发酵罐中采用控制过程 pH ($6.50 \leq \text{pH} \leq 7.00$)和批次补料循环发酵的策略对 *SimpCom1* 菌群发酵体系进行放大。为高效处理黄水,尽可能削弱产物酸抑制效应,在乳酸接近消耗完全时,放出约 50% 体积的发酵液,同时补加相同体积的 50% 稀释度生料黄水。如图 5 所示,根据补料周期和底物消耗的情况,本测试含 4 个“放料-补料”循环: I 期, 0–66 h; II 期, 67–138 h; III 期, 139–204 h; IV 期, 205–302 h。在 4 个周期内,己酸的产生速率维持在 2.68–3.92 g/(L·d) (表 1),发酵终点己酸的最大产量达到了 21.39 g/L。在发酵前 3 个阶段,乙酸累积量维持在 3.57–7.28 g/L 之间,丁酸和己酸在每次补料后迅速累积,第 198 h 分别达到 10.74 g/L 和 18.53 g/L。补料后,乳酸快速被利用,利用量 0.32 g/(L·d) (发酵 154–198 h)。进入发酵 IV 期,乳酸利用率降至 0.26 g/(L·d),乙酸和丁酸开始缓慢利用,发酵体系内的碳流量逐步汇集至己酸合成途径,发酵终点己酸缓慢累积至 21.39 g/L。此外,虽然丙酸在发酵 III 期开始累积,但发酵终点丙酸累积量仅为 3.89 g/L,表明发酵体系内的碳流并未大量流入丙烯酸途径。

综上所述,批次补料发酵测试表明,以 50% 稀释度的生料黄水进行批次循环补料,同时维持发酵 pH 在 6.50–7.00 之间的半连续循环发酵的方式,可获得平均己酸累积浓度为 (16.83 ± 3.48) g/L,每批次发酵己酸的平均净产生量为 (9.43 ± 1.75) g/L,平均己酸生产效率为 (3.05 ± 0.50) g/(L·d),平均己酸选择性(己酸占产生总酸比值)为 $(67.27 \pm 9.95)\%$,乳酸向己酸的平均转化得率为 (0.42 ± 0.03) g/g (表 1)。

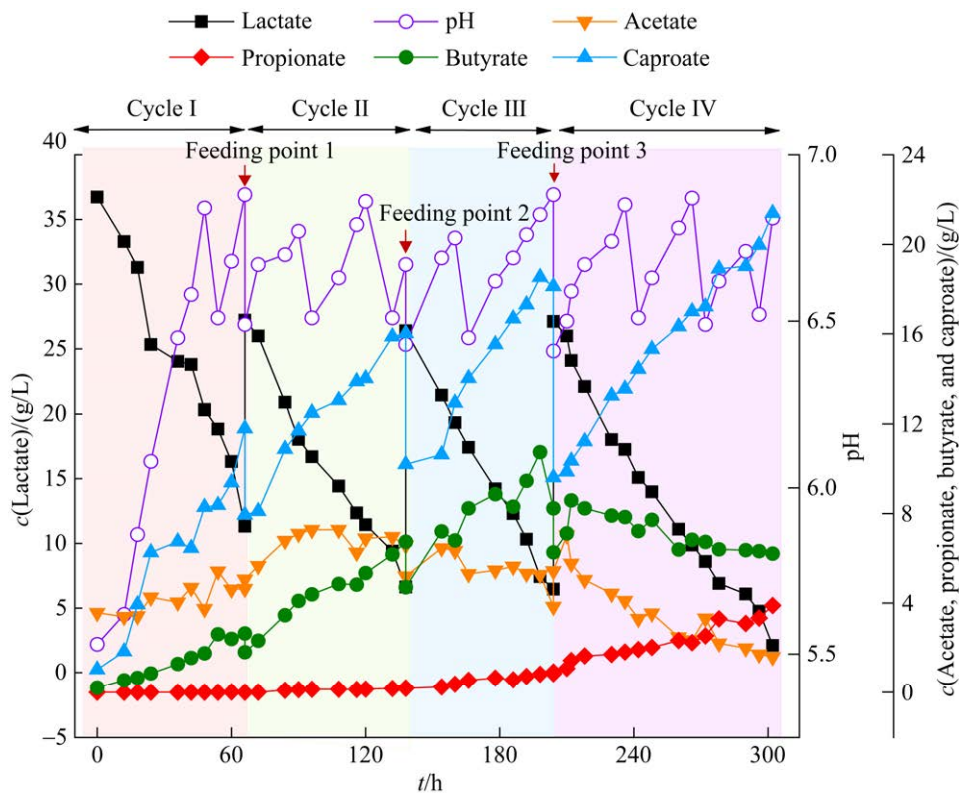


图 5 接种 SimpCom1 菌群以稀释黄水为底物的半连续批次补料循环发酵

Figure 5 Fed-batch semi-continuous fermentation by inoculating consortium SimpCom1 with diluted Huangshui as feedstock. The red arrows represent the feeding points.

表 1 四个批次补料循环发酵的己酸发酵参数表征

Table 1 Fermentation parameters for caproate within four fed-batch semi-continuous fermentation cycles

Cycle	t/h	Accumulated titer (g/L)	Net titer (g/L)	Productivity [§] (g/(L·d))	Yield [£] (g/g)	Selectivity [¶] (%)
I	0–66	11.79	10.77	3.92	0.43	75.43
II	67–138	16.02	7.92	2.68	0.40	53.71
III	139–204	18.12	7.49	2.76	0.38	61.85
IV	205–302	21.39	11.52	2.85	0.46	78.06
Mean±SD (I–IV)	0–302	16.83±3.48	9.43±1.75	3.05±0.50	0.42±0.03	67.27±9.95

[§]: The productivity was calculated by using the net titer divided by the fermentation time of each cycle. [£]: The maximum theoretical yield of lactate to caproate is 0.43 based on the formula of 3 lactate→1 caproate. [¶]: The selectivity was calculated by using the amount (M/V) of caproate divided by the total amount (M/V) of acetate, propionate, butyrate and caproate.

2.4 纳米孔长读长宏基因组学分析产己酸菌群 SimpCom1 的物种组成及其接种于黄水发酵后的菌群结构

如表 2 所示, 采用基于牛津纳米孔长读长测序的宏基因组学分析 SimpCom1 菌群(培养于

mCGM 乳酸培养基中)的物种组成情况, 以及分析该菌群接种到黄水中的微生物群落组成结构。分别从 mCGM 培养基发酵群落(即 SimpCom1 菌群)和黄水发酵群落(即 SimpCom1 菌群接种至黄水中形成的群落)中获得 31.54 Gb 和 21.04 Gb 的

表 2 纳米孔长读长宏基因组学分析 **SimpCom1** 菌群的物种组成及其接种于黄水发酵后的物种组成情况
Table 2 The species compositions of consortium **SimpCom1** and the fermented-*Huangshui* broth inoculating with **SimpCom1** by using Nanopore long-read-only metagenomics

Microbial consortium	MAG No.	Completeness (%)	Contamination (%)	Genome size (Mb)	N50 number (bp)	Contig number	Species annotation
SimpCom1 in mCGM medium (10 g/L lactate)	bin1	99.04	1.83	2.45	2 450 064	1	<i>Ligilactobacillus acidipiscis</i>
	bin2	97.99	0.00	2.36	2 360 188	1	' <i>Butyrifroducens baijiuensis</i> BJN0003'
	bin3	99.78	4.37	3.42	478 913	37	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Culture in 50% <i>Huangshui</i> inoculated with SimpCom1	bin4	97.65	0.34	1.97	1 970 109	1	<i>Caproicibacterium lactatifermentans</i>
	bin5	90.60	0.67	2.14	327 753	7	<i>Metalachnospira</i> sp.
	bin6	78.36	4.59	1.54	1 129 997	5	<i>Caproicibacterium lactatifermentans</i>
SimpCom1	bin7	98.02	2.36	3.90	618 581	11	<i>Clostridium</i> sp.
	bin8	97.17	0.00	3.10	338 638	12	<i>Thomasclavelia ramosa</i>
	bin9	94.41	2.80	3.40	559 207	7	<i>Tepidimicrobiaceae</i> sp.
	bin10	98.39	0.67	2.74	1 265 736	3	<i>Agathobaculum</i> sp.
	bin11	82.73	4.49	1.99	498 745	4	<i>Rubeoparvulum</i> sp.
	bin12	98.82	0.00	2.97	453 691	10	<i>Clostridium</i> sp.
	bin13	82.76	0.00	2.19	467 186	6	<i>Clostridium cochlearium</i>
	bin14	95.30	0.00	2.70	340 219	11	' <i>Butyrifroducens baijiuensis</i> BJN0003'
	bin15	70.75	0.00	3.53	233 177	33	<i>Anaerocolumna</i> sp.
	bin16	98.66	0.34	2.52	2 201 813	2	<i>Caproicibacterium amylolyticum</i>
	bin17	86.39	1.90	3.96	290 143	35	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i>
	bin18	98.81	0.92	3.02	2 988 172	6	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
	bin19	96.97	0.65	1.51	758 254	8	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>
	bin20	83.63	1.85	2.50	407 264	9	<i>Muricomes</i> sp.
	bin21	54.75	0.67	1.49	225 976	6	<i>Caproicibacter</i> sp.
	bin22	93.62	1.34	2.27	239 957	15	<i>Caproicibacter</i> sp.
	bin23	65.52	0.00	2.97	267 615	19	<i>Haloimpatiens</i> sp.
	bin24	52.23	0.00	1.59	34 738	63	<i>Levilactobacillus</i> sp.
	bin25	54.31	0.00	2.06	86 894	34	<i>Garciella</i> sp.
	bin26	54.83	1.72	1.91	48 412	67	<i>Sedimentibacter</i> sp.
	bin27	92.45	3.24	2.60	199 173	19	<i>Pseudoflavonifractor</i> sp.
	bin28	91.61	0.00	3.23	599 354	7	<i>Blautia liquoris</i>
	bin29	78.89	0.70	2.45	309 006	10	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>
	bin30	81.43	1.34	2.52	198 979	16	<i>Mobilitalea</i> sp.
	bin31	94.06	4.55	2.46	171 378	17	<i>Methanolobus chelungpuianus</i>
	bin32	73.49	8.17	1.42	104 497	19	<i>Intestinibacillus</i> sp.
	bin33	52.75	4.03	2.85	49 831	96	<i>Intestinibacillus</i> sp.
	bin34	65.50	0.00	2.48	142 325	21	<i>Clostridia</i> sp.
	bin35	86.35	0.89	3.34	580 906	9	<i>Anaerocolumna</i> sp.

原始序列数据, 使用 metaFlye 组装后获得的组装序列 (Contig) 总长度分别为 11.52 Mb 和 144.86 Mb。从 mCGM 培养基发酵群落和黄水发酵群落中分别得到 4 个和 31 个中等质量和高质量组装基因组 (metagenome-assembled genomes,

MAGs), 其 Contig 序列总长度为 10.2 Mb 和 79.36 Mb, 分别占组装 Contig 数据量的 88.54% 和 54.78%。获得的 3 个完整成环 MAGs 均来自 mCGM 培养基发酵群落。研究表明, 长读长宏基因组测序在获得 **SimpCom1** 菌群物种的完整

基因组方面具有较强的优势(表 2)。

基于基因组分类数据库(genome taxonomy database, GTDB)和典型菌株基因组服务器(the type (strain) genome server, TYGS)对 MAG 进行物种注释, SimpCom1 菌群的 4 个 MAGs (bin1–bin4)全部被注释到; 黄水发酵群落下, 31 个 MAGs (bin5–bin35)中能被准确注释到已知物种的数量为 12 个, 未分类物种 19 个。如表 2、图 6 所示, 从 mCGM 培养基发酵群落中共获得了 4 个组装基因组, 分别为解乳酸己小杆菌(*Caproicibacterium lactatifermentans*, 相对丰度为 36.7%)、酸鱼乳杆菌(*Ligilactobacillus acidipiscis*, 相对丰度为 52.4%)、‘*Butyriproducens baijiuensis* BJN0003’ (相对丰度为 7.1%)和酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*, 相对丰度为 1.3%)。上述 4 种菌合计丰度为 97.5%, 表明 SimpCom1 菌群主要由这 4 种微生物组成。在黄水发酵群落中, 解乳酸己小杆菌和‘*B. baijiuensis*

BJN0003’的相对丰度分别为 45.3%和 6.7%, 是 SimpCom1 菌群在黄水发酵中的第一和第二高丰度微生物, 为核心乳酸-己酸转化的功能物种。此外还检测到解淀粉产己酸小杆菌(*Caproicibacterium amylolyticum*)、鸡盲肠丁酸球菌(*Butyricoccus pullicaecorum*)、泰氏艾森贝格氏菌(*Eisenbergiella tayi*)、耐醋乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*), 推测这些菌主要为生料黄水中的本土微生物, 可能在发酵过程中为核心微生物解乳酸己小杆菌提供电子受体或电子供体, 如 *C. amylolyticum*、*B. pullicaecorum* 分别具有生成乳酸、乙酸和丁酸的能力^[33-34]。

值得注意的是, SimpCom1 菌群在经过黄水发酵后, 并未检出原本作为 mCGM 培养基发酵条件下的第一高丰度物种 *L. acidipiscis*, 而且 *C. tyrobutyricum* 的相对丰度也由 1.3% (mCGM 培养基组)降至 0.4% (黄水发酵组)。这表明 *L. acidipiscis* 与 *C. tyrobutyricum* 在 SimpCom1

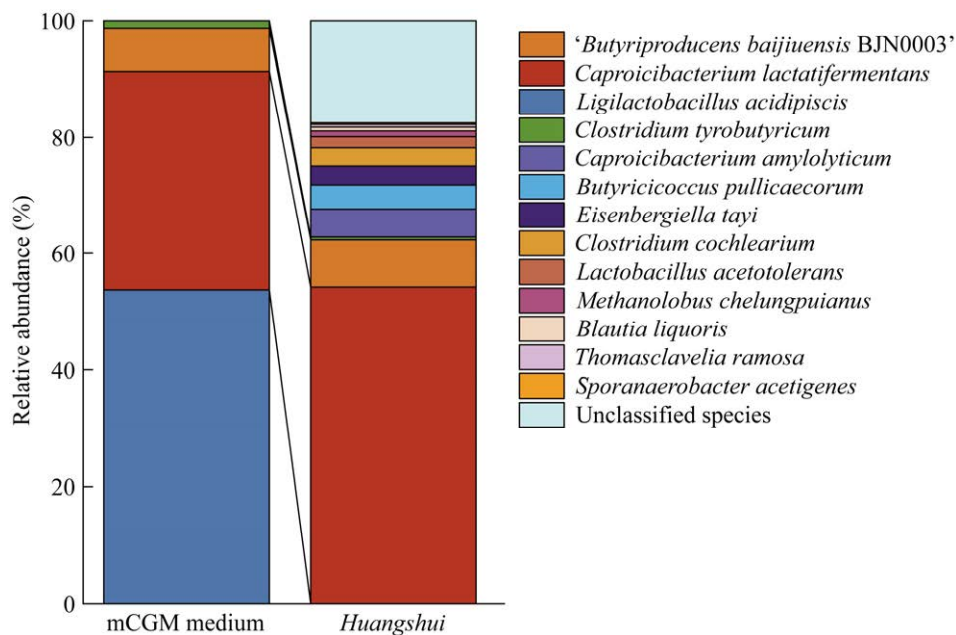


图 6 接种于 mCGM 培养基的 SimpCom1 菌群结构及该菌群接种于黄水发酵后的群落组成

Figure 6 The microbial structures of consortium SimpCom1 in mCGM medium and the fermented-Huangshui broth inoculating with SimpCom1.

菌群发酵黄水产生己酸的过程中并非核心功能物种。需要强调的是, *L. acidipiscis* 在黄水发酵群落中虽然并非核心功能物种, 但在低乳酸(10 g/L)、高氮源(20 g/L)的 mCGM 培养基发酵群落中表现出了较强的供电子(乳酸)潜力(具体表型见 2.1 节)。Ulčar 等的研究同样表明乳酸菌在有效生长后, 能够与 *C. lactatifermentans* 建立起以乳酸代谢为基础的良好互养关系(cross-feeding)^[35]。上述结果表明, 乳酸碳源是形成以解乳酸己小杆菌、‘*B. baijiuensis* BJN0003’为核心产酸功能物种的稳定菌群的重要驱动力。黄水中虽然存在诸如 *B. pullicaecorum*、*L. acetotolerans* 在内的多种微生物, 但 SimpCom1 菌群中的核心物种解乳酸己小杆菌和‘*B. baijiuensis* BJN0003’仍然可以在黄水本土微生物存在的情况下维持较高的丰度, 使得 SimpCom1 菌群的核心产酸物种在未灭菌的生料黄水中仍然可以维持较好生长与代谢。

基因共线性分析表明, SimpCom1 菌群中的解乳酸己小杆菌 bin4 与解乳酸己小杆菌 JNU-WLY1368 菌株具有较大的差异, 而与解乳酸己小杆菌 LBM19010 菌株的基因组结构更为接近(图 7A)。解乳酸己小杆菌 bin4 与纯培养菌株 LBM19010 仍然存在多处菌株特异性序列(图 7B 箭头所指处), 表明解乳酸己小杆菌具有较高的菌株多样性, 推测不同酿造环境中的解乳酸己小杆菌菌株存在独立进化的可能。

3 讨论与结论

本团队近期研究表明, 解乳酸己小杆菌(*C. lactatifermentans*)为土壤中的稀有厌氧菌^[36], 作为一种小基因组微生物(编码基因<2 000 个), 该菌不能从头合成诸如丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸在内的多种氨基酸, 但却成为白酒酿造窖泥

中的绝对优势微生物^[11,37-39]。解乳酸己小杆菌往往与其他微生物如丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum*)处于伴生状态, 较难纯化, 目前已报道的相关纯培养菌株仅有 3 株^[12,40]。本研究采用“自上而下”(top-down)的菌群精简策略, 通过特点碳源(乳酸)富集和平板法筛选, 快速获得了以解乳酸己小杆菌、‘*Butyriproducens baijiuensis* BJN0003’为核心物种的产己酸功能菌群 SimpCom1, 该菌群在酿造黄水生料发酵中发酵性能优秀。理解核心功能微生物在实际生境中的生理代谢特征, 是成功获得所需功能菌群的重要因素。黄水为窖泥微生物的生存提供了所有营养物质^[41-42], 基于解乳酸己小杆菌的生长和代谢特性^[11,35], 即其生长依赖于其他微生物和具有独特的乳酸利用能力, 不必进行纯培养菌株分离, 即可获得在黄水中能够稳定生长与进行酸转化的产己酸精简菌群。

白酒酿造产生的废水量在轻工行业排名第二, 仅次于造纸^[2]。黄水及其蒸馏后的底锅水是白酒生产废水 COD 的主要来源, 仅浓香型白酒厂每年产生的黄水就在 100 万 t 以上, 其中所含乳酸在 6 万 t 以上。此外, 乳酸也是厨余垃圾发酵的重要产物^[43]。然而, 从黄水和厨余垃圾发酵制备的食品级乳酸均存在工艺复杂、纯化困难、成本无法与淀粉发酵法竞争等问题。Contreras-Dávila 等采用从颗粒污泥获得富集菌群发酵餐厨垃圾, 产生 C3-C6 的短中链脂肪酸, 而且产生的丁酸远高于己酸, 其中未分类鉴定的 *Caproiciproducens* spp. 可能是该系统的主要微生物^[44], 将乳酸转化为价值更高的己酸具有重要的应用价值。含解乳酸己小杆菌、‘*Butyriproducens baijiuensis* BJN0003’的产己酸精简菌群在基于乳酸的中链脂肪酸碳链延伸发酵方面具有重要

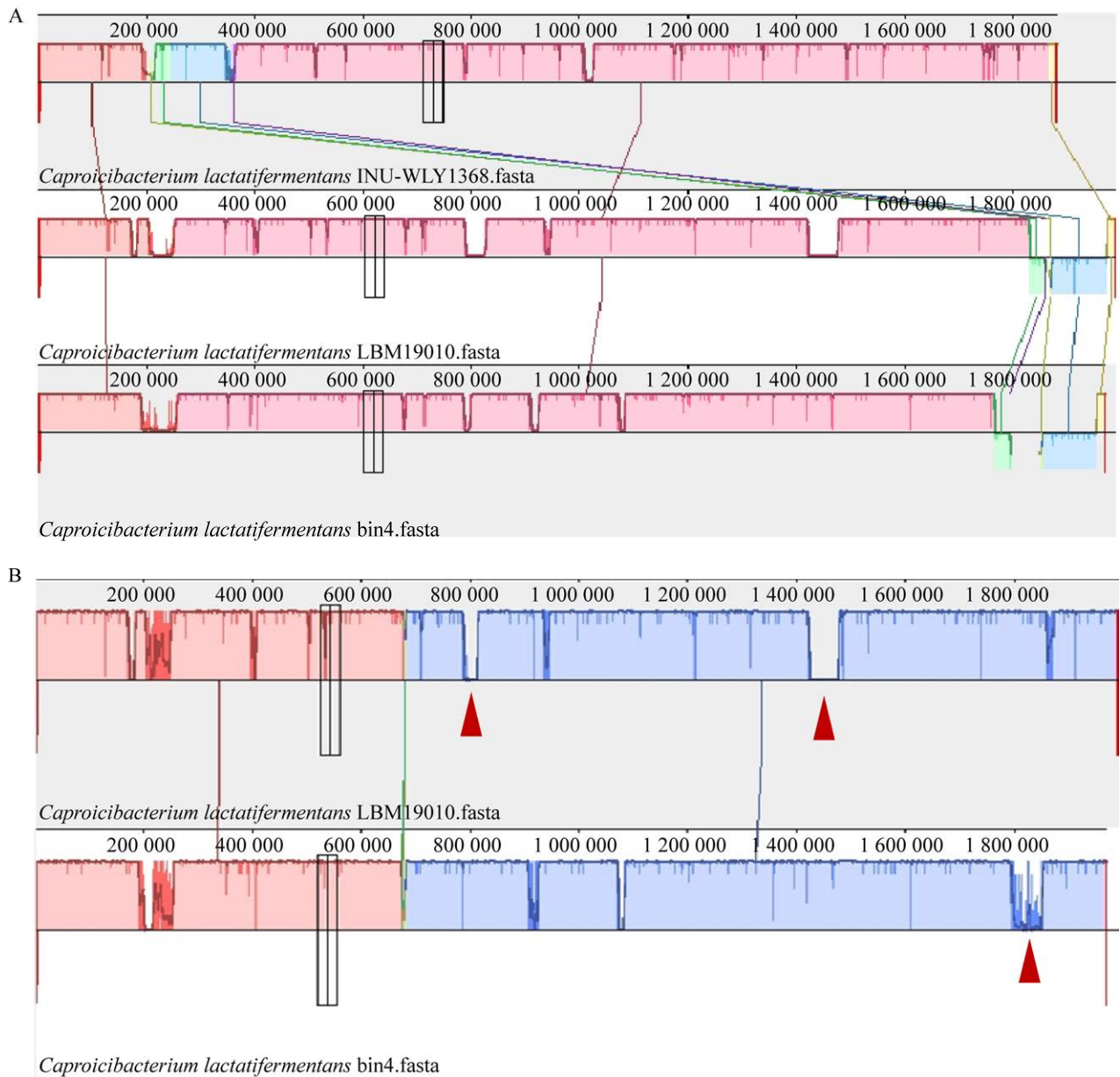


图7 **SimpCom1** 菌群来源组装基因组 **bin4** 与解乳酸己小杆菌 **LBM19010**、解乳酸己小杆菌 **JNU-WLY1368** 的共线性分析 A: 从 **SimpCom1** 中组装出来的解乳酸己小杆菌 **bin4** 的 MAG 与当前已报道的两株解乳酸己小杆菌 **LBM19010** 和 **JNU-WLY1368** 三株全基因组共线性分析的结果. B: **bin4** 与 **LBM19010** 两株全基因组进一步共线性分析的结果. 红色箭头表示未匹配区域

Figure 7 The genomic synteny analysis of *Caproicibacterium lactatifermentans* bin4 from **SimpCom1** with *Caproicibacterium lactatifermentans* LBM19010 and *Caproicibacterium lactatifermentans* JNU-WLY1368. A: The results of a genome-wide covariance analysis of bin4, which has been assembled from **SimpCom1** with two previously reported triple genome-wide covariance analyses of the LBM19010 and JNU-WLY1368; B: Further genome-wide analysis of bin4 and LBM19010 in both groups. The red arrows indicate the unmatched regions.

的应用潜力,可避免传统废水处理过程中乳酸经丙烯酸途径对碳流向的分流,提高更容易分离产品——己酸的比例和终产物浓度。

综上所述,本研究对以菌群精简的方式获得了以解乳酸己小杆菌(*C. lactatifermentans*)、‘*Butyriproducens baijiuensis* BJN0003’为最重要核心功能微生物的菌群 SimpCom1。基于补料批次生料发酵工艺, SimpCom1 菌群在富含乳酸的稀释黄水中具有高效的乳酸-己酸转化能力,产生的己酸浓度>20 g/L,生产效率 3.05 g/(L·d)。该乳酸-己酸发酵转化技术除仅需进行 pH 调节外,不必添加其他外源培养基组分,其本质为优质窖泥微生物菌群的窖池外转化。此外,发酵获得的菌泥还可以应用于白酒酿造的窖泥制作和窖池养护。本研究通过“自上而下”的菌群精简方法,为基于乳酸的中链脂肪酸转化提供了研究思路,为富含乳酸基质的低成本、高价值碳回收提供了重要理论基础和发酵工艺参考。

参考文献

- [1] 环境保护部. 酿造工业废水治理工程技术规范: HJ 575—2010[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2011. Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Technical specifications for brewing industry wastewater treatment: HJ 575—2010[S]. Beijing: China Environmental Publishing Group, 2011 (in Chinese).
- [2] 中国沼气学会. 中国沼气行业“双碳”发展报告[EB/OL]. [2024-02-20]. <https://bookh.yunzhan365.com/zjsx/mtdn/mobile/index.html?hyztg=1>. China Biogas Society. The China biogas industry development report: peaking carbon emissions 2030 and carbon neutrality 2060[EB/OL]. [2024-02-20]. <https://bookh.yunzhan365.com/zjsx/mtdn/mobile/index.html?hyztg=1> (in Chinese).
- [3] 王曦, 朱羽廷, 梁郡. 贵州大规模集中处理酱香型白酒废水处理厂设计及运行[J]. 中国给水排水, 2023, 39(18): 61-66. WANG X, ZHU YT, LIANG J. Design and operation of the large-scale centralized sauce-flavor liquor brewing wastewater treatment plant in Guizhou[J]. *China Water & Wastewater*, 2023, 39(18): 61-66 (in Chinese).
- [4] COSTA CFFA, AMORIM CL, DUQUE AF, REIS MAM, CASTRO PML. Valorization of wastewater from food industry: moving to a circular bioeconomy[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2022, 21(1): 269-295.
- [5] STRIK DPBTB, GANIGUÉ R, ANGENENT LT. Editorial: microbial chain elongation-close the carbon loop by connecting-communities[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 894490.
- [6] TANG JL, PU YH, HUANG J, PAN SW, WANG XC, HU YS, NGO HH, LI YY, ABOMOHR A. Caproic acid production through lactate-based chain elongation: effect of lactate-to-acetate ratio and substrate loading[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2022, 28: 102918.
- [7] WU QL, JIANG Y, CHEN Y, LIU M, BAO X, GUO WQ. Opportunities and challenges in microbial medium chain fatty acids production from waste biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125633.
- [8] KIM BC, MOON C, JEON BS, ANGENENT LT, CHOI Y, NAM K. Shaping a reactor microbiome generating stable n-caproate productivity through Design-Build-Test-Learn approach[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 425: 131587.
- [9] NELSON R, PETERSON D, KARP E, BECKHAM G, SALVACHÚA D. Mixed carboxylic acid production by *Megasphaera elsdenii* from glucose and lignocellulosic hydrolysate[J]. *Fermentation*, 2017, 3(1): 10.
- [10] KUČEK LA, NGUYEN M, ANGENENT LT. Conversion of L-lactate into n-caproate by a continuously fed reactor microbiome[J]. *Water Research*, 2016, 93: 163-171.
- [11] WANG HL, GU Y, ZHOU WC, ZHAO D, QIAO ZW, ZHENG J, GAO JJ, CHEN X, REN C, XU Y. Adaptability of a caproate-producing bacterium contributes to its dominance in an anaerobic fermentation system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(20): e0120321.
- [12] TAO Y, ZHU XY, WANG H, WANG Y, LI XZ, JIN H, RUI JP. Complete genome sequence of *Ruminococcaceae* bacterium CPB6: a newly isolated culture for efficient n-caproic acid production from lactate[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 259: 91-94.

- [13] LIU B, POPP D, MÜLLER N, STRÄUBER H, HARMS H, KLEINSTEUBER S. Three novel *Clostridia* isolates produce *n*-caproate and *iso*-butyrate from lactate: comparative genomics of chain-elongating bacteria[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 1970.
- [14] ENGELMANN U, WEISS N. *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: a new Gram-negative obligately anaerobic *Coccus* isolated from spoiled beer[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1985, 6(3): 287-290.
- [15] JEON BS, CHOI O, UM Y, SANG BI. Production of medium-chain carboxylic acids by *Megasphaera* sp. MH with supplemental electron acceptors[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 129.
- [16] PRABHU R, ALTMAN E, EITEMAN MA. Lactate and acrylate metabolism by *Megasphaera elsdenii* under batch and steady-state conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(24): 8564-8570.
- [17] WU QL, GUO WQ, BAO X, MENG XB, YIN RL, DU JS, ZHENG HS, FENG XC, LUO HC, REN NQ. Upgrading liquor-making wastewater into medium chain fatty acid: insights into co-electron donors, key microflora, and energy harvest[J]. *Water Research*, 2018, 145: 650-659.
- [18] ZHU XY, HUANG HH, HE Y, WANG XY, JIA J, FENG X, LI D, LI HX. A preliminary study on the feasibility of industrialization for *n*-caproic acid recovery from food wastewater: from lab to pilot[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 366: 128154.
- [19] ZHU XY, TAO Y, LIANG C, LI XZ, WEI N, ZHANG WJ, ZHOU Y, YANG YF, BO T. The synthesis of *n*-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14360.
- [20] GE ZB, ZHAI ZQ, XIE WY, DAI J, HUANG K, JOHNSON DR, ZHAO FJ, WANG P. Two-tiered mutualism improves survival and competitiveness of cross-feeding soil bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17(11): 2090-2102.
- [21] PONTRELLI S, SZABO R, POLLAK S, SCHWARTZMAN J, LEDEZMA-TEJEIDA D, CORDERO OX, SAUER U. Metabolic cross-feeding structures the assembly of polysaccharide degrading communities[J]. *Science Advances*, 2022, 8(8): eabk3076.
- [22] LENG L, NOBU MK, NARIHIRO T, YANG PX, TAN GY A, LEE PH. Shaping microbial consortia in coupling glycerol fermentation and carboxylate chain elongation for co-production of 1,3-propanediol and caproate: pathways and mechanisms[J]. *Water Research*, 2019, 148: 281-291.
- [23] 辜杨, 项兴本, 王少磊, 曹荣升, 任聪, 范文来, 徐岩. 基于窖泥微生物相对定量与绝对定量联用的窖泥老熟特征分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3444-3457.
- GU Y, XIANG XB, WANG SL, CAO RS, REN C, FAN WL, XU Y. Profiling the community structure of pit clay during aging process with the combination of relative and absolute quantitative approaches[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3444-3457 (in Chinese).
- [24] CLAESON MJ, WANG Q, O'SULLIVAN O, GREENE-DINIZ R, COLE JR, ROSS RP, O'TOOLE PW. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(22): e200.
- [25] BOLYEN E, RIDEOUT JR, DILLON MR, BOKULICH NA, ABNET CC, AL-GHALITH GA, ALEXANDER H, ALM EJ, ARUMUGAM M, ASNICAR F, BAI Y, BISANZ JE, BITTINGER K, BREJNROD A, BRISLAWN CJ, BROWN CT, CALLAHAN BJ, CARABALLO-RODRÍGUEZ AM, CHASE J, COPE EK, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37: 852-857.
- [26] 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: 581-583.
- [27] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, QUINCE C, MAHÉ F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [28] McDONALD D, JIANG YY, BALABAN M, CANTRELL K, ZHU QY, GONZALEZ A, MORTON JT, NICOLAOU G, PARKS DH, KARST SM, ALBERTSEN M, HUGENHOLTZ P, DeSANTIS T, SONG SJ, BARTKO A, HAVULINNA AS, JOUSILAHTI P, CHENG SS, INOUE M, NIIRANEN T, et al. Greengenes2 unifies microbial data in a single reference tree[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 42(5): 1-4.
- [29] KOLMOGOROV M, BICKHART DM, BEHSAZ B, GUREVICH A, RAYKO M, SHIN SB, KUHN K, YUAN J, POLEVIKOV E, SMITH TPL, PEVZNER

- PA. metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs[J]. *Nature Methods*, 2020, 17: 1103-1110.
- [30] LIU L, YANG Y, DENG Y, ZHANG T. Nanopore long-read-only metagenomics enables complete and high-quality genome reconstruction from mock and complex metagenomes[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 209.
- [31] DARLING ACE, MAU B, BLATTNER FR, PERNA NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394-1403.
- [32] KANG JM, SUN YT, HUANG XN, YE L, CHEN YH, CHEN XX, ZHENG XW, HAN BZ. Unraveling the microbial compositions, metabolic functions, and antibacterial properties of Huangshui, a byproduct of Baijiu fermentation[J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111320.
- [33] GEIRNAERT A, STEYAERT A, EECKHAUT V, DEBRUYNE B, ARENDS JBA, van IMMERSEEL F, BOON N, van de WIELE T. *Butyricoccus pullicaecorum*, a butyrate producer with probiotic potential, is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions[J]. *Anaerobe*, 2014, 30: 70-74.
- [34] GU Y, ZHU XJ, LIN F, SHEN CH, LI Y, AO L, FAN WL, REN C, XU Y. *Caproicibacterium amylolyticum* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Oscillospiraceae* isolated from pit clay used for making Chinese strong aroma-type liquor[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021, 71(4): 004789.
- [35] ULČAR B, REGUEIRA A, PODOJSTERŠEK M, BOON N, GANIGUÉ R. Why do lactic acid bacteria thrive in chain elongation microbiomes?[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1291007.
- [36] ZHOU ZH, LIU ZH, WEN SY, OUYANG GW, SHEN YX, YANG Q, REN C, XU Y. Rare short- and medium-chain fatty acid-producing anaerobes from raw soil play vital roles in formation of diverse flavour compounds of Jiangxiangxing Baijiu[J]. *Food Microbiology*, 2023, 112: 104247.
- [37] ANTCZAK M, MICHAELIS M, WASS MN. Environmental conditions shape the nature of a minimal bacterial genome[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3100.
- [38] MORRIS JJ, LENSKI RE, ZINSER ER. The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss[J]. *mBio*, 2012, 3(2): e00036-12.
- [39] JOHNSON WM, ALEXANDER H, BIER RL, MILLER DR, MUSCARELLA ME, PITZ KJ, SMITH H. Auxotrophic interactions: a stabilizing attribute of aquatic microbial communities?[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96(11): fiaa115.
- [40] WANG HL, GU Y, ZHAO D, QIAO ZW, ZHENG J, GAO JJ, REN C, XU Y. *Caproicibacterium lactatifermentans* sp. nov., isolated from pit clay used for the production of Chinese strong aroma-type liquor[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2022, 72(1): 005206.
- [41] GAO JJ, LIU GY, LI AJ, LIANG CC, REN C, XU Y. Domination of pit mud microbes in the formation of diverse flavour compounds during Chinese strong aroma-type Baijiu fermentation[J]. *LWT*, 2021, 137: 110442.
- [42] 高江婧, 任聪, 刘国英, 葛向阳, 王慧琳, 叶方平, 徐岩. 浓香型白酒酒醅风味物质和微生物菌群结构随发酵时间的变化规律[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(20): 1-6.
- GAO JJ, REN C, LIU GY, GE XY, WANG HL, YE FP, XU Y. Dynamic changes of flavor compounds and microbial community in fermented grains of Chinese strong aroma-type Baijiu during fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(20): 1-6 (in Chinese).
- [43] LI X, CHEN YG, ZHAO S, CHEN H, ZHENG X, LUO JY, LIU YN. Efficient production of optically pure L-lactic acid from food waste at ambient temperature by regulating key enzyme activity[J]. *Water Research*, 2015, 70: 148-157.
- [44] CONTRERAS-DÁVILA CA, CARRIÓN VJ, VONK VR, BUISMAN CNJ, STRIK DPBTB. Consecutive lactate formation and chain elongation to reduce exogenous chemicals input in repeated-batch food waste fermentation[J]. *Water Research*, 2020, 169: 115215.