



厌氧产酸菌群培养技术在窖泥质量快速检测中的应用

朱晓军¹ 辜杨¹ 任聪^{1,2} 徐岩^{*1,2}

1 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122

2 江南大学教育部工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】窖泥质量决定了浓香型白酒品质的高低,窖泥中的产酸功能菌群显著影响着窖泥的质量及对应的浓香型白酒品质,但目前对窖泥质量的评价尚缺乏明确和完善的标准。【目的】建立一种快速、准确评价窖泥质量的方法,解析窖泥中参与己酸合成的重要微生物。【方法】通过窖泥产酸菌群培养和产酸代谢特征研究,构建厌氧产酸菌群发酵体系,根据窖泥中厌氧菌的己酸合成能力来评价相应窖泥的质量;利用高通量测序技术分析可培养发酵体系中产己酸功能微生物的群落组成。

【结果】葡萄糖碳源相比乳酸碳源可以更有效地富集窖泥中的产己酸菌群;采用毫升级别发酵体系、对窖底泥进行多点取样,产酸菌群发酵代谢产物稳定期的己酸产量、己酸/丁酸值可较准确地评价不同窖泥的质量。16S rRNA 基因测序结果表明,利用产酸菌群培养方法可以有效地富集未培养产己酸细菌(Uncultured bacterium *Caproiciproducens*)。【结论】基于产酸菌群培养的窖泥微生物发酵体系可用于实际生产中快速、准确地评价窖泥质量,并为窖泥微生物己酸合成代谢机制的研究提供参考。

关键词: 窖泥质量, 产酸菌群, 己酸, 浓香型白酒

Cultivating acidogenic microbiota from pit mud to rapidly evaluate the quality of pit mud

ZHU Xiao-Jun¹ GU Yang¹ REN Cong^{1,2} XU Yan^{*1,2}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

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

Abstract: [Background] Pit mud quality has a decisive effect on the quality of Chinese strong-aroma type liquor. Acidogenic microbiota from pit mud significantly influence pit mud quality together with quality of the liquor. However, the evaluation criteria of pit mud quality are not very clear and accurate so far.

[Objective] We aimed at establishing a quick and accurate method to evaluate pit mud quality in this study. Meanwhile, we analyzed functional microorganisms possibly participating in caproate production.

[Methods] A cultivation method was developed to culture acidogenic microbiota. The concentration and ratio of subsequent metabolites were used to evaluate the caproate-producing capability of pit mud bacteria, as well as the corresponding pit mud quality. High-throughput sequencing technique was used to

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21706097, 31530055); Open Foundation from the Key Light-industry Laboratory of Solid-state Fermentation for Strong-aroma Type Liquor (2017JJ019)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 25-03-2018; Accepted: 04-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(21706097, 31530055); 中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金(2017JJ019)

*通信作者: Tel: 0510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-03-25; 接受日期: 2018-06-04

analyze the microbiota composition in the cultivation system. **[Results]** Compared to lactate and acetate, using glucose as the carbon source could effectively enrich caproate-producing microbiota in pit mud, resulting in higher caproate production. Small volume culturing and statistical sampling were determined. The concentration of caproate and the ratio of caproate to butyrate at the stationary phase of microbiota fermentation, could be served as accurate and stable indicators to evaluate pit mud quality. 16S rRNA gene sequencing showed that Uncultured bacterium *Caproiciproducens* were effectively enriched in the cultivation system. **[Conclusion]** Model system based on pit mud cultivation could be used to quickly evaluate pit mud quality in factories, and provides an approach to analyze caproate formation mechanism with pit mud microbiota.

Keywords: Pit mud quality, Acidogenic microbiota, Caproate, Strong-aroma type liquor

窖泥在浓香型白酒生产中发挥基础性作用, 其质量优劣与浓香型白酒品质密切相关^[1-2]。窖泥中栖息着包括梭菌纲、芽孢杆菌纲、拟杆菌纲、甲烷微菌纲、甲烷杆菌纲等在内的许多厌氧微生物^[3]。窖泥中的酿造功能微生物通过利用营养底物, 代谢产生浓香型白酒中重要的风味物质或其前体, 包括丁酸、己酸及相应的乙酯, 其中的己酸乙酯被认为是浓香型白酒中最重要且典型的呈香物质^[4]。高丰度的己酸产生菌是表征窖泥成熟、可以生产优质浓香型白酒的重要微生物指标^[2,5]。如何快速、准确、简便地判定窖泥中己酸菌的丰度和代谢活力, 对于评价窖泥质量等级及其酿造功能具有重要的意义。

目前针对窖泥质量的研究较多, 但有关窖泥质量的评价方法以及评价技术体系还未形成十分完善的标准。之前的研究者多从窖泥的感官指标、理化指标和微生物菌群结构等方面进行评价^[2]。感官指标主要通过窖泥的颜色、手感、气味加以评价, 但对普通、优质窖泥进行区分时不够准确, 对退化过程中的窖泥缺乏质量跟踪的快速检测方法, 且感官指标的变化往往滞后于微生物的变化^[3]。理化指标包括窖泥的水分、pH 值、矿物元素、腐殖质等, 这些理化因素对窖泥微生物生长代谢具有重要影响^[2], 但目前仅明确了窖泥退化与 pH 值降低之间具有正相关性^[6]。微生物指标则是通过对窖泥中梭菌属、拟杆菌属、乳杆菌属、甲烷菌属等重要功能微生物类群的丰度进

行测定, 根据丰度比例判定窖泥质量等级, 例如梭菌属微生物在优质窖泥中丰度较高^[6-7]。但微生物丰度测定的方法需要提取窖泥微生物基因组 DNA, 通过高通量测序或荧光定量 PCR 进行酿造功能菌丰度检测, 检测过程较为繁琐, 且成本较高, 限制了这类方法的推广应用。

同时, 由于目前对窖泥厌氧微生物种属判定不够准确, 窖泥中重要风味物质产生菌也未得以完全鉴定。对窖泥样品直接测序所获得的微生物丰度难以有效、直接地反映窖泥具备的酿造功能, 在群落研究中通过测序信息对微生物相关功能表型的猜测仍需要可培养技术加以验证^[8]。厌氧微生物目前研究的难点在于, 大量具有重要代谢功能的微生物难以在实验室条件下培养, 而将难培养微生物可培养化需要寻找合适的培养条件^[3]。国际上对厌氧微生物菌群的研究主要集中于活性污泥厌氧消化反应器^[9-11]、肠道微生物^[12]等方面。通过相应的可培养技术, 一些难培养的微生物得到了纯培养并发现了新种^[13-14]。窖泥微生物与这些厌氧微生物体系具有一定的相似性, 均具有丰富而复杂的菌群结构, 但有关窖泥厌氧微生物菌群培养的新方法鲜有报道。

本文通过构建窖泥产酸菌群发酵体系, 建立了难培养产己酸菌群的快速富集方法和基于代谢产物检测的窖泥质量评价策略。这为快速、准确评价窖泥质量提供了一个新的思路, 并可为窖泥微生物己酸合成代谢机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 窖泥

研究中所用的窖泥分别来自不同地区典型浓香型酒厂窖池的窖底泥,窖泥样品取样后迅速放置于厌氧产气袋中,低温 4 °C 保存备用。

1.1.2 培养基

葡萄糖碳源培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 磷酸氢二钾 1.0, 磷酸二氢钾 0.5, 硫酸铵 2.0, 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 10.0, 七水合硫酸亚铁 0.015, 七水合硫酸镁 0.1, 氯化钙 0.01, 一水合硫酸锰 0.01, 硫酸锌 0.002, 氯化钴 0.002。培养基灭菌前调节 pH 至 7.0。

乳酸碳源培养基(g/L): 乳酸钠 18.0, 乙酸钠 5.0, 其余成分及条件与葡萄糖碳源培养基相同。

1.1.3 主要试剂和仪器

厌氧产气袋,日本三菱瓦斯化学株式会社;细菌基因组 DNA 提取试剂盒, Qiagen 公司;酵母浸粉和蛋白胨, Oxoid 公司;其他常规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、厌氧培养箱, Thermo Scientific 公司;精密 pH 计, Mettler-Toledo 公司;气相色谱仪 Agilent 6890B、高效液相色谱仪 Agilent 1200, Agilent 公司。

1.2 方法

1.2.1 窖泥产酸菌群的培养方法

用氮气对葡萄糖碳源、乳酸碳源培养基进行除氧后, 0.7×10^5 Pa 灭菌 30 min。灭菌后, 迅速将培养基拿出并转移到厌氧培养箱。培养基在冷却后, 用 50 mL 离心管进行分装, 每个离心管平均分装 30 mL。按需称取一定质量的窖泥样品直接接种于脱氧的培养基中, 同时加入 1% 灭菌的碳酸钙(防止发酵过程中酸度过低抑制产酸菌群的生长), 小心振荡使窖泥充分分散均匀, 37 °C 静置培养于厌氧培养箱(厌氧环境: 10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂)中。取样时通过厌氧手套箱进行操作, 每次取样 2 mL, 每隔 12 h 取样一次, 取样至发酵结

束。当不需要对发酵每个时间点都取样时, 培养基分装于 15 mL 玻璃试管中, 使用 8 mL 的小体系进行培养。

1.2.2 丁酸和己酸浓度测定

采用气相色谱法检测丁酸和己酸^[3], 色谱柱为 Agilent CP-Wax 57 CB。样品处理方法: 取 1 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 3 min, 随后吸取 200 μL 发酵上清液, 加入 50 μL 内标溶液(含有 12.5 g/L 叔戊酸, pH 2.5), 再小心加入 250 μL 乙醚进行萃取, 30 s 涡旋振荡, 随后 10 000 r/min 离心 5 min, 取上层 150 μL 有机相准备进样。升温程序如下: 60 °C 0.5 min; 20 °C/min 速率升至 190 °C, 保持 4.5 min; 分流比 30:1, 分析时间共计 11.5 min; 氢火焰离子检测器(FID)温度 220 °C; 进样口温度 220 °C; 空气流量 450 mL/min; 氢气流量 40 mL/min; 尾吹氮气流量 45 mL/min。

1.2.3 宏基因组 DNA 提取及微生物菌群结构组成分析

选用 DNA 提取试剂盒提取发酵液菌体总 DNA(选取窖泥微生物富集培养 3 d 样品)。通用引物选取 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 与 806R (5'-GACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区进行扩增^[15], 对上述样品送样测序(测序平台为 Illumina MiSeq, 测序由上海美吉生物技术有限公司完成), 并进行微生物菌群结构组成分析, 测序数据处理参考文献[16]。在 DNA Data Bank of Japan 中提交测序数据, 编号为 DRA006664。

1.2.4 葡萄糖含量测定

采用液相色谱法测定葡萄糖含量^[17]。样品处理: 1 mL 发酵液经过 12 000 r/min 离心 3 min, 用 0.22 μm 水系针头式滤器过滤 800 μL 上清液。

2 结果与分析

2.1 窖泥产酸菌群快速富集用于窖泥质量评价的培养条件探索

对窖泥厌氧产酸菌群的富集条件进行优化(包括碳源、接种量、培养时间等), 建立窖泥微生物

中产己酸功能菌群的快速富集方法。

2.1.1 碳源选择

首先考察了不同碳源培养条件下, 接种同种窖泥后丁酸和己酸累积浓度的差异。发酵 7 d, 不同碳源下丁酸、己酸的累积浓度如图 1 所示。以葡萄糖为碳源时, 丁酸累积浓度为 2.94 ± 0.10 g/L, 己酸累积浓度为 5.40 ± 0.10 g/L; 而以乳酸-乙酸作为碳源时, 丁酸、己酸的累积浓度分别为 3.92 ± 0.39 g/L 和 2.94 ± 0.10 g/L; 计算两种碳源下对应的己酸/丁酸值, 葡萄糖碳源和乳酸-乙酸碳源对应的己酸/丁酸值分别为 1.84 和 0.58。可见, 以葡萄糖为碳源时, 窖泥厌氧菌群发酵可以产生更高的己酸浓度和己酸/丁酸值, 即葡萄糖碳源更有利于实验中己酸菌的富集。因此, 选用葡萄糖作为产己酸菌群富集及可培养窖泥质量评价策略的碳源。

2.1.2 窖泥产酸菌群培养的丁酸与己酸生成动力学特征

选取典型窖泥, 分别以 5%、10%、15% (质量体积比) 的接种量接种至 30 mL 葡萄糖碳源培养基中, 研究发酵过程中丁酸、己酸的产物生成动力学特征, 以及不同接种量对发酵代谢产物的影

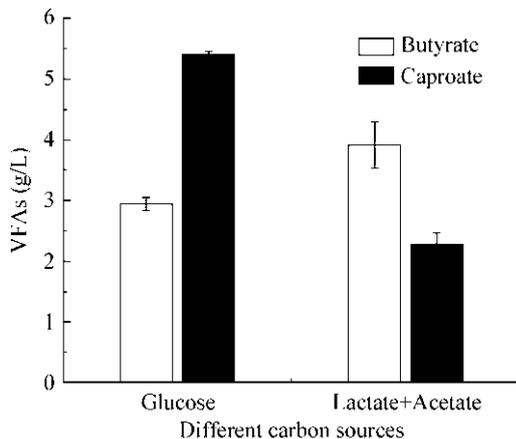


图 1 以葡萄糖或乳酸/乙酸作为碳源富集培养产酸菌群的丁酸、己酸含量

Figure 1 Concentration of butyrate and caproate in acidogenic microbiota cultures with glucose or lactate plus acetate as carbon sources

注: VFAs: 挥发性脂肪酸; 发酵至 7 d 取样检测。

Note: VFAs: Volatile fatty acids; The concentration of VFAs were determined at 7 d.

响。从代谢产物生成动力学特征来看, 各接种量下丁酸在发酵前期就迅速生成, 在发酵后期达到稳定(图 2A)。己酸则是在发酵前期(0-2 d)无显著生成, 发酵中后期(2 d 之后)快速累积(图 2B)。己酸/丁酸值随着己酸累积浓度的增加而增大(图 2C)。由

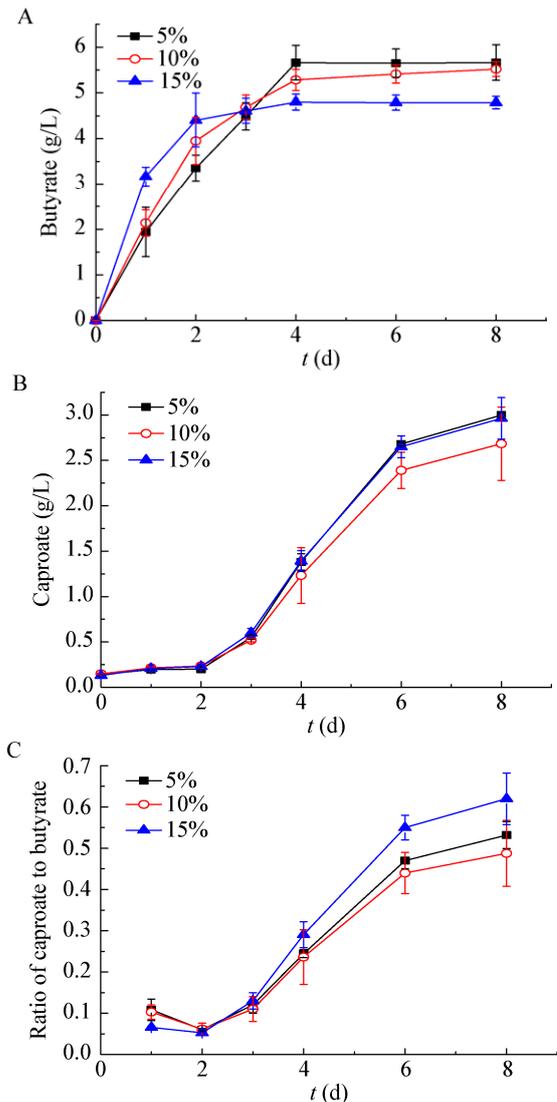


图 2 不同窖泥接种量下产酸菌群发酵过程中丁酸含量(A)、己酸含量(B)、己酸/丁酸值(C)变化情况

Figure 2 Metabolite profiles of butyrate (A), caproate (B), ratio of caproate to butyrate (C) in acidogenic microbiota cultures with different inoculation amounts of pit mud

注: 5%、10%、15% (质量体积比) 分别代表不同的窖泥接种量。

Note: 5%, 10%, 15% (W/V) represented different pit mud inoculation amounts.

于丁酸累积的最高浓度早于己酸,因此发酵后期的己酸/丁酸值主要受己酸累积浓度的影响。在5%–15%窖泥接种范围内,虽然丁酸累积具有微弱的差异,但己酸累积浓度和己酸/丁酸值在4 d及之后各检测时间点差异不显著,可见发酵后期的产酸表型受初始接种量影响较小。窖泥产酸菌群发酵显示出丁酸先生成而己酸后生成的特征。

2.2 产酸菌群培养用于检测窖泥质量的参数与可行性评价

选取同一酒厂、同一车间、采用相同酿造工艺的2个不同窖池进行窖泥取样。由于窖池不同区域的窖泥具有一定的不均一性,因此对2个窖池的窖底泥均采用多点取样,对各样品分别进行可培养发酵,并以实际生产中发酵末期的黄水作对照(发酵过程中酒醅向下层渗漏的黄色淋浆水,窖泥微生物从窖泥迁移到黄水中生长,因此黄水在一定程度上可以反映窖泥的质量),研究不同取样点对可培养发酵产酸含量、稳定性的影响,并体现不同窖池窖泥质量的差异性。所选取的两个窖池来源于同一工厂的同一车间,执行的是相同的酿造工艺,以尽量排除生产工艺、原料对窖泥微生物发酵的影响。实际生产中HB2窖池发酵末期黄水较HB1窖池产生了更多的己酸,而产生的丁酸较低,因此具有更高己酸/丁酸值(图3A、B、C, Yellow water组),说明窖池质量差异较为显著。产酸菌群发酵结果显示,接种HB2窖池来源窖泥的发酵体系产生的己酸显著高于HB1窖池,丁酸则呈现出相反的趋势,因此HB2窖池窖泥培养体系的己酸/丁酸值高于HB1窖池(图3A、B、C, Culture组),说明己酸/丁酸值的差异以及对应窖池窖泥质量差异极显著。可见,不同窖池窖泥产酸菌群发酵代谢产物的量比关系可以在一定程度上反映出不同窖池之间窖泥质量的差异,并且不同窖池窖泥产酸菌群的差异在富集培养过程中得到放大,因此其产酸含量呈现出的差异相比黄水也更加显著。

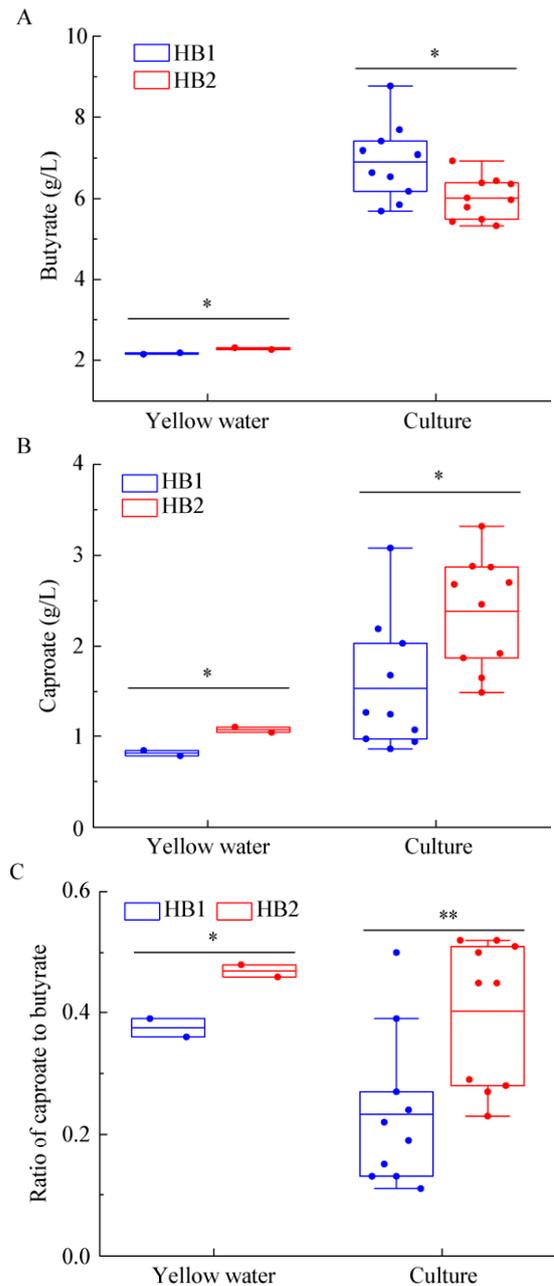


图3 同一酒厂两个典型窖池发酵黄水及其窖泥产酸菌群发酵的丁酸(A)、己酸(B)和己酸/丁酸值(C)比较

Figure 3 Comparison of butyrate (A), caproate (B) and the ratio of caproate to butyrate (C) of yellow water and acidogenic microbiota cultures between two typical pits

注: HB1、HB2表示同一酒厂的2个不同窖池;窖底泥采取5点取样,每个点2个平行;同一窖池黄水样品因较为均一,选取2个样品;*t*检验(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

Note: HB1, HB2 represented two different pits from the same liquor factory; Five sampling points were used from pit bottom, two replicates each point; Two homogenous yellow water samples were taken from the same pit; *t*-test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$).

需要指出的是,虽然黄水的丁酸和己酸含量在一定程度上可以反映窖泥中丁酸和己酸产生微生物的代谢活力,但黄水是窖泥微生物与酒醅微生物共同发酵的结果,当酿酒工艺不同时,难以通过黄水中丁酸和己酸的含量和比例对窖泥产酸微生物丰度和代谢活力进行直接评价。不同酒厂,甚至同一酒厂不同班组,因大曲、酒醅入池水分、发酵时间均不同,因此也难以完全通过黄水中己酸和丁酸的绝对含量与相对比例来判定窖泥质量。

此外,从同一个窖池多点取样的检测数据来看,即使是同一个窖池的窖泥,混菌发酵的己酸或丁酸终浓度也在一定范围内变化,但仍较为集中。因此,通过产酸菌群发酵评价窖泥质量时,对窖池窖泥样品应采取多点取样,以己酸和己酸/丁酸值作为评价指标来反映窖泥微生物的产己酸能力,可以使评价结果更加准确可靠,进而也反映出不同窖池窖泥质量的差异。

2.3 基于窖泥产酸菌群培养方法评价不同来源窖泥的质量

考查建立的窖泥产酸菌群培养方法是否可用于评价不同来源的窖泥质量。选取不同地区浓香型酒厂的典型窖泥样品,将其接种到葡萄糖碳源培养基中,对其中的窖泥产酸菌群进行富集培养,并比较发酵过程中各样品丁酸、己酸含量的变化情况。发酵 3 d,各样品丁酸含量普遍较高,均大于 4 g/L,最高为 7.80 g/L (AH4);所有样品在此时己酸产量均较低,但仍有 3 个样品(AH1、AH2、SC1)的己酸产量大于 1.2 g/L,可见在发酵前期不同窖泥就显示出己酸合成能力的差异(图 4A)。

窖泥发酵培养 7 d 之后,代谢产物中丁酸、己酸含量已基本稳定,每个样品己酸产量较 3 d 时均有一定程度的增加,而在所有样品中 SC1 的己酸产量最高,达到 5.60 g/L(图 4B)。有趣的是,各样品此时丁酸浓度除 SD1 外均不同程度降低,这说明此过程中己酸菌产酸增加,并可能利用丁酸作

为己酸合成的前体物质。将不同窖泥发酵培养 7 d 的己酸产量、己酸/丁酸值进行对比,结果显示不同样品均有明显的区分(表 1)。AH1、AH2、SC1 样品己酸/丁酸值较高,均在 1.0 以上;AH3、AH4、AH5 样品己酸/丁酸值次之,在 0.5–1.0 之间;SD1 样品己酸/丁酸值最低,处于 0.5 以下。结合各

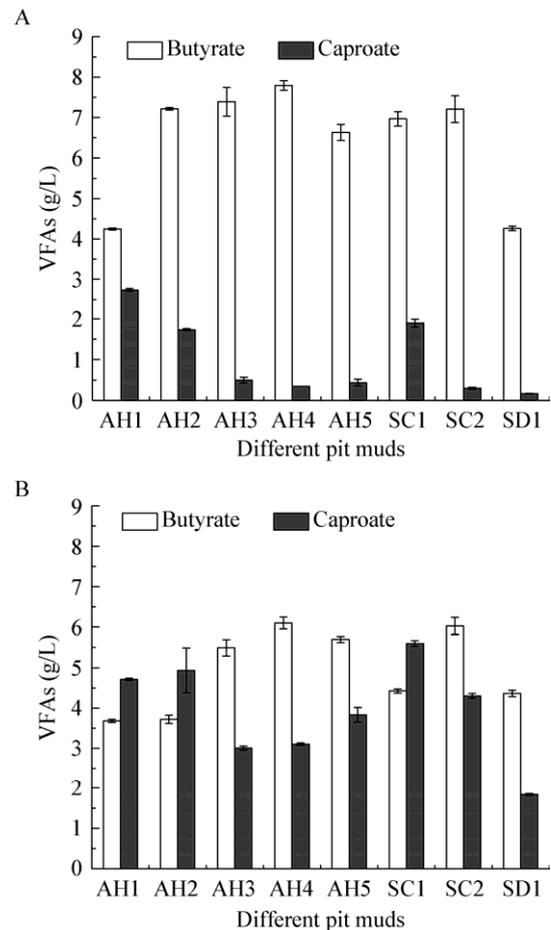


图 4 不同来源窖泥产酸菌群富集培养 3 d (A)、7 d (B) 代谢产物丁酸和己酸含量比较

Figure 4 Butyrate and caproate comparison in acidogenic microbiota cultures of 3 d (A) and 7 d (B) when inoculating pit muds from different distilleries

注: AH、SC、SD 分别代表 3 家不同的浓香型酒厂,序号表示对应酒厂不同窖池窖泥编号(后同);窖底泥采取 5 点取样,经混匀作为同一个样品;同一样品发酵设置 3 个平行。

Note: AH, SC, SD represent codes of three different liquor factories; Numbers after each code represent different pit muds from that factory; Five sampling points were used from pit bottom and mixed as one pit mud sample; Fermentation of each sample was performed in triplicate.

表 1 不同酒厂窖泥样品信息及对应产酸菌群发酵终点的己酸/丁酸值

Table 1 Pit mud information from different liquor factories and corresponding ratio of caproate to butyrate in acidogenic microbiota cultures

| 样品名称 Sample name | 窖泥信息 Pit mud information | 己酸/丁酸值 Ratio of caproate to butyrate |
|---------------------|-----------------------------|---|
| AH1 | Aged pit mud (~20 years) | 1.28 |
| AH2 | Aged pit mud (~20 years) | 1.33 |
| SC1 | Aged pit mud (~200 years) | 1.27 |
| AH3 | New pit mud (~3 years) | 0.55 |
| AH4 | New pit mud (~3 years) | 0.51 |
| AH5 | New pit mud (~3 years) | 0.67 |
| SD1 | Fresh pit mud (~1 year) | 0.42 |

注：窖泥信息为各酒厂生产中正常使用的窖泥窖龄；己酸/丁酸值基于本实验的发酵结果。

Note: The pit mud information showed pit mud age with normal use; The ratios of caproate to butyrate were derived from fermentation results in this study.

酒厂提供的窖泥信息，发现己酸/丁酸值与正常使用的窖泥窖龄及窖泥质量呈现一致的对应关系，再次验证了基于可培养的窖泥评价策略的可行性。

2.4 典型优质窖泥产酸菌群底物利用、产物生成情况及菌群结构分析

本研究中产酸菌群的生长代谢利用了葡萄糖作为碳源和能源，产酸菌群对底物葡萄糖的消耗情况值得关注。这里选取AH1、SC1优质窖泥作为典型样品，对窖泥产酸菌群在发酵过程中消耗葡萄糖的情况进行了测定。发酵72 h，两个混菌样品中葡萄糖已基本耗尽(图5)。虽然葡萄糖在72 h时基本耗尽，但前述己酸在3 d后仍出现一定幅度增加。结合丁酸被部分利用的现象，发酵过程中生成的丁酸可能也参与到了窖泥产酸菌群的己酸合成过程中，并发挥重要作用。

根据发酵所取不同时间点的样品，测定和分析优质窖泥AH1、SC1产酸菌群发酵0–96 h过程中丁酸、己酸含量更加具体的变化特征。样品AH1在发酵48 h之后，样品SC1在发酵72 h之

后，丁酸的含量均出现降低(图5)，而已酸含量对应继续升高，表明发酵体系中的己酸菌可能利用了丁酸。AH1发酵36–60 h、SC1发酵48–72 h期间，己酸生成速率较快，己酸均处于对数增长期，表明此时窖泥产酸菌群中己酸菌处于生长代谢活跃阶段；发酵72 h以后，己酸生成趋向缓慢，己酸菌仍可使己酸含量增加，但代谢活跃程度已经开始降低(图5)。另外，结合图4、5中样品AH1、SC1在不同发酵时间的己酸含量情况，通过计算得知：AH1样品2–3 d内己酸平均生成速率达到2.02 g/(L·d)，3–7 d内己酸平均生成速率为0.49 g/(L·d)；SC1样品2–3 d内己酸平均生成速率达到1.75 g/(L·d)，3–7 d内己酸平均生成速率为0.93 g/(L·d)。这2个样品己酸的平均生成速率在2–3 d内均较快，而在3–7 d内趋向缓慢。

为进一步探究发酵过程中优质窖泥样品AH1、SC1对应发酵产酸菌群的群落结构分布，通过16S rRNA基因测序对其混菌样品进行群落组成的测定与分析。考虑到前述样品发酵3 d后己酸含量虽仍有增长，但增幅已经有限，对应的己酸平均生成速率也较低，因此测序样品选择己酸代谢较为活跃的3 d的混菌。如图6所示，不同窖泥对应的发酵产酸菌群显示出不同的菌群分布特征，2个样品在种水平上共有的微生物分别是丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、未分类梭菌属1 (Unclassified *Clostridium* 1)、未培养产己酸细菌 (Uncultured bacterium *Caproiciproducens*)、未分类梭菌属12 (Unclassified *Clostridium* 12)。AH1、SC1发酵产酸混菌中这些微生物的相对丰度分别占到81.75%和96.06%，是富集混菌样品中的优势种属。其中Uncultured bacterium *Caproiciproducens*在AH1和SC1发酵产酸混菌中的相对丰度分别达到38.85%和20.34%，表明本研究中使用的葡萄糖碳源培养基可以对未培养产己酸细菌进行有效的富集。对于富集到的多种未培养微生物的酿造功能和代谢特征，仍需做深入的研究。

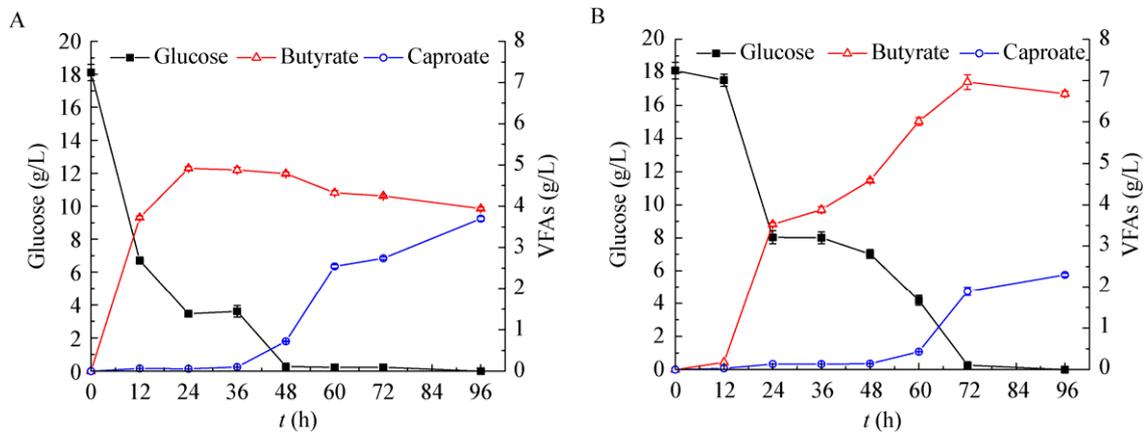


图5 典型优质窖泥 AH1 (A)、SC1 (B)产酸菌群发酵 96 h 过程中葡萄糖消耗及丁酸、己酸含量变化情况
 Figure 5 Glucose consumption, butyrate and caproate production in acidogenic microbiota cultures within 96 h inoculated with typical high-quality pit mud AH1 (A) and SC1 (B)

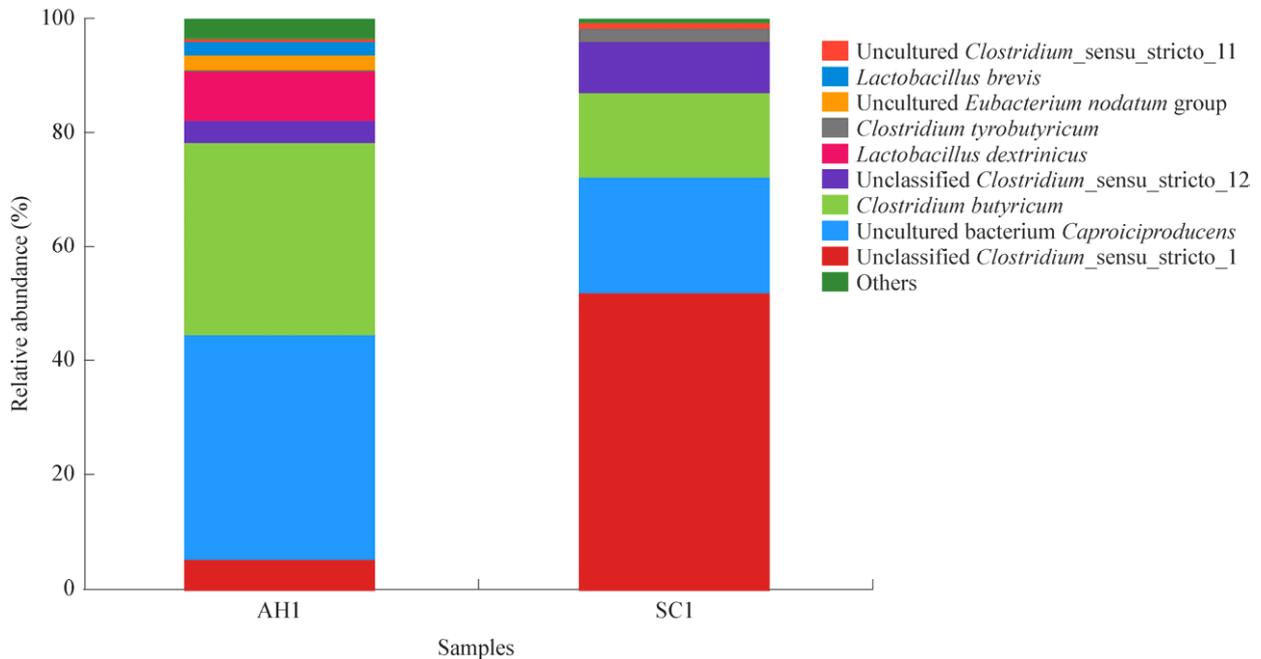


图6 典型优质窖泥 AH1 与 SC1 发酵产酸菌群培养中微生物结构分析(种水平)
 Figure 6 Microbial community structure of acidogenic microbiota cultured from high-quality pit mud AH1 and SC1 (species level)

注: 相对丰度低于 0.1% 的微生物归为 Others.

Note: Species whose relative abundances were less than 0.1% were classified as others.

3 讨论与结论

以往研究者尝试通过多种方式评价窖泥质量, 目前采用的评价方法主要为感官评价、理化指标评价和微生物菌群结构评价^[18-25], 但窖泥质

量评价标准仍有待明确和完善。本研究建立了以葡萄糖为碳源的己酸菌群快速富集方法, 在此基础上初步建立以窖泥可培养产酸菌群的代谢特征(己酸产生能力和己酸丁酸比值)来评价窖

泥质量的新策略。表 2 对本研究的方法与常用的窖泥质量评价方法进行了比较。基于高通量测序的窖泥质量评价, 需要提取窖泥微生物宏基因组 DNA、测序及数据分析, 耗时 1 个月左右, 且成本较高。本文发酵法的周期约 10 d, 因此使用发酵法可以较为快速、简便和准确地评价窖泥产酸微生物的代谢活力以及相应的窖泥质量, 成本也相对较低。

近年来, Zhu 等报道了利用乳酸为碳源, 通过厌氧反应器连续培养可以富集窖泥产己酸菌群, 但稳定产己酸菌群的获得经历了较长时间(30 d)的驯化过程^[11]。本研究发现, 相较于以乳酸和乙酸为碳源, 在窖泥产酸菌群富集过程中使用葡萄糖碳源可以更有效地富集窖泥产己酸菌群, 并快速生成己酸。在代谢产物趋向于稳定的发酵后期进行检测, 可以更准确地比较不同质量窖泥对应产己酸菌群的己酸产量和己酸合成能力。推测不同质量的窖泥, 因其初始己酸菌丰度及产酸菌群结构的不同, 在窖泥菌群培养代谢产物达到稳定的过程中, 己酸菌的丰度和己酸合成能力也呈现出明显的差异。同一窖池多个窖底泥取样点可培养发酵的己酸产量及己酸/丁酸值较为一致, 检测结果具有一定的稳定性。同时, 基于可培养

发酵体系, 选用不同浓香型酒厂的窖泥对该窖泥质量评价策略进行验证, 发现窖泥产酸菌群发酵富集过程中的己酸产量和己酸/丁酸值与实际的窖泥质量呈现较好的一致性。因此, 该窖泥质量评价策略可快速、简便地在实际生产中加以应用。

对两种优质窖泥在可培养发酵中的葡萄糖消耗、产物生成及群落组成进行研究, 发现窖泥产酸菌群可以快速利用葡萄糖, 且葡萄糖在 3 d 基本耗尽。窖泥微生物中丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、未分类梭菌属 1 (Unclassified *Clostridium* 1)、未培养产己酸细菌(Uncultured bacterium *Caproiciproducens*)具有较高的丰度, 得到了较好的富集。其中 Uncultured bacterium *Caproiciproducens* 在 AH1 和 SC1 混菌样品中的相对丰度分别达到 38.85% 和 20.34%, 推测该类己酸菌在发酵体系的己酸合成中具有重要作用。

本研究建立的窖泥产酸菌群培养方法及其代谢产物评价参数可以用于快速、准确、经济地评价窖泥的己酸菌群代谢活力, 并在一定程度上反映窖泥质量。该方法也可为后续窖泥微生物己酸合成代谢机制的研究提供参考, 以进一步阐明浓香型白酒窖泥微生物的产己酸机理及其与窖泥质量的关系。

表 2 不同窖泥质量评价方法的比较

Table 2 Comparison of different approaches for pit mud quality evaluation

| 评价方法 Evaluation approach | 对应评价指标 Corresponding evaluation index | 方法特点 Characteristics |
|--|---|--|
| Traditional sensory evaluation ^[2] | Color, aroma | Convenient, not accurate, with subjectivity |
| Evaluation based on chemical properties of pit mud ^[2,21] | Moisture, humic matter, pH, mineral substances, organic acids | The correlation between pit mud quality and chemical properties was not well established |
| Microbial community structure ^[6-7] | Caproate-producing microbes and methanogens detection by high-throughput sequencing | Relatively accurate, high cost, time-consuming (~1 month) |
| Multi-indexes combined evaluation ^[18-19,25] | Sensory indexes, chemical properties and microbial indexes combined | Accurate but complicated (20–30 d) |
| Acidogenic microbiota cultivating (This study) | Caproate production, the ratio of caproate to butyrate | Quick (~10 d), convenient, accurate, low cost, can be used to evaluate metabolic activity of caproate-producing microbes |

REFERENCES

- [1] Wen CB, Li GH, Qiu SQ, et al. Study on the improvement of pit mud quality[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2009(4): 68-70 (in Chinese)
文成兵, 李光辉, 邱声强, 等. 提高窖泥质量的研究[J]. *酿酒科技*, 2009(4): 68-70
- [2] Zhang Q, Shen CH, Liu QB, et al. Research progress in the evaluation of pit mud quality[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2013(7): 84-86 (in Chinese)
张强, 沈才洪, 刘清斌, 等. 窖泥质量评价研究进展[J]. *酿酒科技*, 2013(7): 84-86
- [3] Hu XL. Illuminating the correlation between anaerobic clostridial community diversity and quality of pit mud used for the production of Chinese strong-flavor liquor[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
胡晓龙. 浓香型白酒窖泥中梭菌群落多样性与窖泥质量关联性研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2015
- [4] Fan WL, Xu Y. Volatile compounds of fermented-mud in Baijiu (Chinese Liquor) [J]. *Liquor Making*, 2010, 37(3): 24-31 (in Chinese)
范文来, 徐岩. 白酒窖泥挥发性成分研究[J]. *酿酒*, 2010, 37(3): 24-31
- [5] Cai XD, Liu GR, Qi YZ, et al. The degradation cause of manmade aged pit mud in northern China & the related prevention measures[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2009(6): 67-69 (in Chinese)
才向东, 刘贵荣, 齐玉珍, 等. 北方人工老窖窖泥衰退的原因及预防措施[J]. *酿酒科技*, 2009(6): 67-69
- [6] Hu XL, Du H, Ren C, et al. 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
- [7] Tao Y, Rui JP, Li JB, et al. Microbial community compositions and diversity in pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor[J]. *CIESC Journal*, 2014, 65(5): 1800-1807 (in Chinese)
陶勇, 芮俊鹏, 李家宝, 等. 浓香型白酒窖泥中细菌和古菌的组成与多样性[J]. *化工学报*, 2014, 65(5): 1800-1807
- [8] Marx V. Microbiology: the return of culture[J]. *Nature Methods*, 2016, 14(1): 37-40
- [9] Angenent LT, Richter H, Buckel W, et al. Chain elongation with reactor microbiomes: open-culture biotechnology to produce biochemicals[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(6): 2796-2810
- [10] Spirito CM, Richter H, Rabaey K, et al. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 27: 115-122
- [11] Zhu XY, Tao Y, Liang C, et al. The synthesis of *n*-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14360
- [12] David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome[J]. *Nature*, 2014, 505(7484): 559-563
- [13] Browne HP, Forster SC, Anonye BO, et al. Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation[J]. *Nature*, 2016, 533(7604): 543-546
- [14] Zhu XY, Zhou Y, Wang Y, et al. Production of high-concentration *n*-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae* bacterium CPB6[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 102-113
- [15] Zhang XL, Tian XQ, Ma LY, et al. Biodiversity of the symbiotic bacteria associated with toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2015, 3(6): 23-28
- [16] Li Z, Dong L, Huang Q, et al. Bacterial communities and volatile compounds in Doubanjiang, a Chinese traditional red pepper paste[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 120(6): 1585-1594
- [17] Ren C, Gu Y, Hu SY, et al. Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(5): 446-454
- [18] Zhao CQ, Yang QH, Deng J, et al. Detection of evaluated indexes for pit mud[J]. *Current Biotechnology*, 2012, 2(3): 212-216 (in Chinese)
赵长青, 杨秦欢, 邓静, 等. 窖泥的评定指标检测[J]. *生物技术进展*, 2012, 2(3): 212-216
- [19] Zhang Q, Shen CH, Liu QB, et al. Determination of the evaluating indexes and their weights for pit mud quality evaluation based on analytic hierarchy process[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014(5): 20-24 (in Chinese)
张强, 沈才洪, 刘清斌, 等. 基于层次分析法的窖泥质量评价指标及其权重的确定[J]. *酿酒科技*, 2014(5): 20-24
- [20] Zheng J, Liang R, Wu CD, et al. Development of a rapid discrimination tool for *Luzhou-flavor* pit mud classification by the Kohonen artificial neural network Model[J]. *Food Analytical Methods*, 2015, 8(7): 1734-1738
- [21] Cai XM, Liu YC, Zhao RS, et al. Judgment of pit mud quality through quantitative analysis of organic acids[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2016(8): 65-67 (in Chinese)
蔡雪梅, 刘宇驰, 赵荣寿, 等. 利用有机酸判别窖泥质量的比较分析[J]. *酿酒科技*, 2016(8): 65-67
- [22] Zheng J, Liang R, Zhang LQ, 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
- [23] Zhao JS, Zheng J, Zhou RQ, et al. Microbial community structure of pit mud in a Chinese strong aromatic liquor fermentation pit[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 118(4): 356-360
- [24] Tao Y, Li JB, Rui JP, et al. 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
- [25] Zhang QY, Yuan YJ, Liao ZM, et al. Use of microbial indicators combined with environmental factors coupled with metrology tools for discrimination and classification of *Luzhou*-flavoured pit muds[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(4): 933-943