

专论与综述

窖泥群落结构及功能微生物研究进展

张应刚^{1,2} 许涛^{1,2} 郑蕾^{1,2} 杨阳^{1,2} 刘光钱^{1,2} 张芮^{1,2} 于惠^{1,2} 沈才洪^{1,3,4} 王松涛^{*1,3,4}

1 泸州老窖股份有限公司 四川 泸州 646000

2 泸州品创科技有限公司 四川 泸州 646000

3 国家固态酿造工程技术研究中心 四川 泸州 646000

4 泸州老窖酿酒有限责任公司 四川 泸州 646000

摘要: 窖泥是浓香型白酒的特征发酵载体, 包含多种功能微生物, 这些功能微生物对浓香型白酒的风格特征和品质有着重要的影响。本文对不同窖龄窖泥、不同浓香型白酒产地的窖泥及不同质量窖泥的窖泥微生物研究进展进行总结分析, 并在此基础上对窖泥主体微生物的功能进行阐述。以期窖泥微生物的研究提供思路, 为浓香型白酒的质量和香味成分研究提供思考, 促进窖泥微生物的研究, 加深对浓香型白酒窖泥的认知。

关键词: 浓香型白酒, 窖泥微生物, 窖龄, 浓香型白酒产区, 窖泥质量

Research progress on community structure and functional microorganisms of pit mud

ZHANG Yinggang^{1,2} XU Tao^{1,2} ZHENG Lei^{1,2} YANG Yang^{1,2} LIU Guangqian^{1,2}
ZHANG Rui^{1,2} YU Hui^{1,2} SHEN Caihong^{1,3,4} WANG Songtao^{*1,3,4}

1 Luzhou Laojiao Company Limited, Luzhou, Sichuan 646000, China

2 Luzhou Pinchuang Technology Company Limited, Luzhou, Sichuan 646000, China

3 National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou, Sichuan 646000, China

4 Luzhou Laojiao Niangjiu Company Limited, Luzhou, Sichuan 646000, China

Abstract: Pit mud is a characteristic fermentation carrier of Luzhou flavor liquor, which contains many kinds of flavor producing microorganisms that have an important influence on the style and quality of Luzhou flavor liquor. This study summarizes and compares the microbial activities of cellar mud of different ages, different flavor liquor producing areas and cellar mud microorganisms of different quality, and then analyzes the function of these microbes in pit mud. The purpose of this study is to provide a new thought for the research of cellar mud microorganisms, for improving the quality and flavor composition of Luzhou flavor liquor. It is helpful to promote the research of microbe in pit mud, and deepen the knowledge of pit mud.

Keywords: Luzhou flavor liquor, microbes in pit mud, pit age, Luzhou flavor liquor producing area, pit mud quality

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604104)

***Corresponding author:** Tel: 86-830-6138127; E-mail: wangst@lzlj.com

Received: 07-02-2021; **Accepted:** 11-04-2021; **Published online:** 07-06-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1604104)

***通信作者:** Tel: 0830-6138127; E-mail: wangst@lzlj.com

收稿日期: 2021-02-07; **接受日期:** 2021-04-11; **网络首发日期:** 2021-06-07

浓香型白酒受众广泛,在全国各省份都有生产基地,我国每年浓香型白酒的总产量超过了1 000万t,其产量占据了我国年白酒总产量的70%以上^[1]。不同地区的浓香型白酒的主体风味成分相同,但整体风格特征有地域性差异。造成这种风格特征不同的主要原因是生产工艺细节、原辅料及酿造微生物的差异,其中窖泥微生物和大曲微生物是酿造微生物的主要来源,对浓香型白酒的风味特征影响巨大,浓香型白酒风味中最重要且独特的窖香主要来源于窖泥微生物^[2]。老窖出好酒是数百年酿酒匠人的实践生产总结,连续不断的生产过程会促进窖泥的理化性质和营养成分发生变化^[3],窖泥微生物会发生一系列的演替、缓慢富集和淘汰,形成窖泥中特有的微生物区系。窖泥对于浓香型白酒的意义重大,其对浓香型白酒的风味和质量会产生巨大的影响,酿酒匠人根据经验总结出了一整套的窖泥养护工艺,从来没有放弃对窖泥质量的把控^[4]。由于窖泥对浓香型白酒的重要性,本文主要通过对窖泥的窖龄、地域和质量的差异对窖泥微生物的影响进行了综述,并对窖泥主体微生物进行了分析概述,以期对浓香型白酒的窖泥微生物的研究和浓香型白酒的质量提高和风味特征的加强提供思考和帮助。

1 不同窖泥微生物群落结构的差异

20世纪60年代开始对窖泥中的微生物进行分析研究发现,白酒的窖底香为梭状芽孢杆菌代谢产生的己酸乙酯^[5]。随后来自中国科学院、中国食品发酵工业研究院、江南大学和四川轻工业大学(原四川理工学院)等科研机构的科研人员开始了大量的窖泥微生物研究。前期主要利用传统微生物的分离培养方法对窖泥中的微生物进行分析,得到了产甲烷菌、梭杆菌、放线菌和己酸菌等多种微生物^[6-8],并将分离得到的窖泥微生物进行培养,用于新窖泥的制备、窖泥的养护及提高酒质的探索^[9-11]。后期四川大学率先把变性梯度凝胶电泳

(Denaturing Gel Gradient Electrophoresis, DGGE)技术引入窖泥微生物生态研究中,窖泥微生物的研究开始非培养的分子生物学技术与传统分离培养技术相结合^[12-14],近10年来组学技术的快速发展也极大地促进了窖泥微生物的研究。现已获得了大量的窖泥微生物的群落信息和丰富的菌种资源,发现了不同窖泥微生物的群落结构具有明显差异,这些微生物的差异可能是浓香型白酒风格多样的主要原因之一。对窖泥微生物的群落结构进行分析总结归纳,有助于找到窖泥微生物的代谢特性、香味成分的产生机理,为浓香型白酒的风味特征的研究提供思路。

1.1 不同窖龄窖泥微生物群落结构差异

窖池在生产过程中不间断地开窖、封窖,窖池窖泥中的营养成分、含氧量等在不断发生变化,微生物的群落结构也在不断发生演替,浓香型白酒发酵过程对窖泥微生物的种类和丰度进行了选择。“老窖出好酒”是千百年来酿酒艺人的经验总结,研究不同窖龄窖泥微生物的群落结构的变化有助于分析窖龄与窖泥微生物之间的关系,为“老窖出好酒”提供理论基础和研究方向。由表1可知,从时间维度上看,不同窖龄中窖泥微生物的群落结构存在明显的差异,窖泥微生物的多样性随窖龄的增加而逐渐递增,窖龄达到一定的年份后,窖泥中微生物群落结构保持相对稳定。窖泥中的优势微生物乳杆菌属(*Lactobacillus*)、理研菌属(*Petrimonas*)、甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)、甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)、*Candidatus_Methanoplasma*、*Ampullimonas*、己酸菌属(*Caproiciproducens*)、梭菌属(*Clostridium*)、氨杆菌属(*Aminobacterium*)、互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)和沉积菌属(*Sedimentibacter*)等随着窖龄的变化,相对丰度也不断发生着改变^[15-30];其中作为新窖泥中占绝对优势的乳杆菌属(*Lactobacillus*)随着窖龄的增加相对丰度不断降低,梭菌属(*Clostridium*)、氨杆菌属(*Aminobacterium*)、

表 1 不同窖龄窖泥微生物的变化趋势和优势物种

Table 1 Variation trend and dominant species of microbes in pit mud with different pit ages

样品 Samples	优势物种 Dominate bacteria	变化趋势 Changing trend	参考文献 References
泸州老窖 40 年、 100 年窖龄窖泥 Different aged pit muds of Luzhou Laojiao (40-year and 100-year)	<i>Sporosarcina</i> , <i>Thermoplasmatales</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanoculleus</i> <i>Syntrophomonas</i> , <i>Sedimentibacter</i> , <i>Ruminococcaceae</i>	窖泥中的细菌随着窖龄的增加而使微生物更加集中, 古菌随着窖龄的增 加, 古菌类群的比例也相应增加, 特别是产甲烷菌不仅数量增加, 种类 也有所增加 With the increase of cellar age, the diversity of bacterial community decreased, but the relative abundance of archaeal community increased in pit mud, especially methanogens in abundance and diversity	[14-15]
新窖泥、趋老熟窖 泥和老熟窖泥 New pit mud, mature pit mud and old mature pit mud	<i>Clostridiales</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Aminobacterium</i>	老熟窖泥的细菌多样性指数及均匀度指数高于新窖泥和趋老熟窖泥, 新 窖泥和趋老熟窖泥的窖龄与乳球菌属(<i>Lactococcus</i>)、乳杆菌 (<i>Lactobacillus</i>)、乳酸、乳酸乙酯含量正相关 The bacterial diversity index and uniformity index of old mature pit mud are higher than that of new pit mud and mature pit mud. The age of new pit mud and mature pit mud are positively correlated with the contents of <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , lactic acid and ethyl lactate	[16]
1 年、6 年、 10 年窖龄窖泥 Different aged cellarmud (1-year, 6-year and 10-year)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Caloramator</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Aminobacterium</i>	窖龄与乳杆菌(<i>Lactobacillus</i>)和喜热菌属(<i>Caloramator</i>)的相对丰度呈负相 关, 与甲烷八叠球菌(<i>Methanosarcina</i>)、甲烷杆菌属(<i>Methanobacterium</i>) 和甲烷短杆菌属(<i>Methanobrevibacter</i>)的相对丰度呈正相关关系 The pit age is negatively correlated with the relative abundance of <i>Lactobacillus</i> and <i>Caloramator</i> , and is positively correlated with the relative abundance of <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanobacterium</i> , and <i>Methanobrevibacter</i>	[17]
1 年、10 年、25 年 和 50 年窖龄窖泥 Different aged cellarmud (1-year, 10-year, 25-year and 50-year)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Petrimonas</i> , <i>Clostridium</i> IV, <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanobacterium</i>	窖泥微生物多样性在 1-5 年时间段随着窖龄的增加而呈升高趋势, 在 25-50 年间保持相对稳定 The diversity of microbial community increased with cellar age from 1-year-old to 5-year-old pit mud, and it became constant in the 25-year-old to 50-year-old pit mud	[18]
5 年、25 年、70 年 窖龄窖泥 Different aged cellarmud (5-year, 25-year and 70-year)	<i>Candidatus</i> <i>Methanoplasma</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Ampullimonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Caproiciproducens</i>	随着窖龄的增加, 优势微生物从 <i>Ampullimonas</i> 和乳杆菌(<i>Lactobacillus</i>) 变为具有产己酸能力的己酸菌属(<i>Caproiciproducens</i>)。窖泥中主要都是利 用 H ₂ 、甲酸、甲醇的产甲烷古菌 With the increase of cellar age, the dominant microorganisms have changed from <i>Ampullimonas</i> and <i>Lactobacillus</i> to <i>Caproiciproducens</i> with the ability to produce caproic acid. The dominant microbiota in pit mud was archaea that was mainly to produce methane by using hydrogen, formic acid and methanol	[19]
6 年、16 年窖龄 窖泥 Different aged cellarmud (6-year and 16-year)	<i>Clostridium</i> , <i>Aminobacterium</i> , <i>Petrimonas</i> , <i>Syntrophomonas</i> and <i>Sedimentibacter</i>	梭菌属、理研菌属(<i>Petrimonas</i>)和氨杆菌属(<i>Aminobacterium</i>)则是随着窖 龄正相关, 与乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)呈负相关 The succession of <i>Clostridium</i> , <i>Petrimonas</i> and <i>Aminobacterium</i> are positively correlated with pit age and negatively correlated with <i>Lactobacillus</i> succession	[20]
6 年、>50 年 窖龄窖泥 Different aged cellarmud (6-year and >50-year)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Syntrophomonas</i> , <i>Fermentimonas</i> , <i>Proteiniphilum</i> , <i>Hydrogenispora</i> , <i>Caldicoprobacter</i> , <i>Haloplasma</i> and <i>Lutispora</i>	6 年表层窖泥中乳杆菌(<i>Lactobacillus</i>)含量最高(12.80%~42.72%), 其次为 <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> 、贪铜菌(<i>Cupriavidus</i>)等; >50 年表层窖泥乳 杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)大量减少(1.0%), 优势菌属变为己酸菌属 (<i>Caproiciproducens</i>)(34.79%)、甲烷囊菌属(<i>Methanoculleus</i>)和互营单胞菌 属(<i>Syntrophomonas</i>)等 Genera <i>Lactobacillus</i> , <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> and <i>Cupriavidus</i> were dominant bacteria in the surface of 6-year-old pit mud, and the relative abundance of <i>Lactobacillus</i> were the highest (12.80%~42.72%); however, the relative abundance of <i>Lactobacillus</i> dramatically decreased to 1.0%, and the dominant genera were <i>Caproiciproducens</i> , <i>Methanoculleus</i> and <i>Syntrophomonas</i> in the surface of pit mud that the age were over 50 years	[21]

理研菌属 (*Petrimonas*)、互营单胞菌属 (*Syntrophomonas*)、沉积菌属 (*Sedimentibacter*)、己酸菌属 (*Caproiciproducens*) 则随着窖龄的增加相对丰度逐渐增加, 成为窖泥中的优势微生物。

1.2 不同地域窖泥微生物群落结构差异

从空间维度看, 我国浓香型白酒的生产企业虽遍布全国, 但生产规模较大的浓香型白酒企业主要分布在四川白酒金三角和江淮一带。不同产区的浓香型白酒的酒体具有较明显差异。造成这些差异的原因与当地所处的自然环境、生产工艺及酿造微生物等多种因素有关。窖泥微生物作为酿造微生物中的重要组成部分, 对浓香型白酒的风味产生了巨大的影响。表 2 列举了主要产地的窖泥优势微生物的组成。

作为浓香型白酒主要大产区的四川、湖北、江苏和安徽, 窖泥微生物具有一定的相似性, 也具有明显的差异。从微生物物种来看, 产甲烷菌属

(*Methanogenium*)、杆菌纲 (*Bacilli*)、梭菌纲 (*Clostridia*)、互营单胞菌属 (*Syntrophomonas*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 等微生物为窖泥环境的共有微生物, 并且在所分析窖泥样本中, 这些微生物都为主要的优势菌, 这些菌株代谢产生的己酸、乳酸、乙酸、丁酸等短链脂肪酸及各种醇、醛、酮和酯等物质是浓香型白酒的重要香气成分。然而不同产区的优势窖泥微生物种类则同样具有明显的差异性, 四川产区的球菌属 (*Sporosarcina*)、*Ampullimonas*、*Curvibacter* 和湖北产区的 *Caloramator*、江苏产区的真杆菌属 (*Eubacterium*) 及安徽产区的 *Haloplasma*、*Lutispora*、*Fastidiosipila* 都是其产区较为特殊的优势微生物^[15,21-39]。这些微生物的不同可能是由地区所处的环境、生产工艺及其使用的窖泥原料的不同等多个原因造成。然而这些微生物的差异可能是同样为浓香型白酒产区的浓香型白酒但产品风格具有明显差异的重要原因。

表 2 不同地域窖泥优势微生物群落结构的组成

Table 2 Composition of dominant microbial community structure in pit mud from different regions

产区 Regions	优势物种 Dominate bacteria	参考文献 References
四川绵阳 Mianyang, Sichuan	<i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Syntrophomonadaceae</i> , <i>Peptococcaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Gracilibacteraceae</i> , <i>Porphyrimonadaceae</i> , <i>Marinilabiaceae</i> , <i>Synergistaceae</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanocorpusculum</i> , <i>Thermoplasmatales</i>	[15]
四川成都 Chengdu, Sichuan	<i>Caproiciproducens</i> , <i>Ampullimonas</i> , <i>Petrimonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Anaerocella</i> , <i>Proteiniphilum</i> , <i>Curvibacter</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanocorpusculum</i> , <i>Methanosaeta</i> and <i>Methanocella</i>	[19]
四川泸州 Luzhou, Sichuan	<i>Methanobrevibacter</i> , <i>Bacilli</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Sporosarcina</i> , <i>Thermoplasmatales</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Syntrophomonas</i> , <i>Sedimentibacter</i> , <i>Ruminococcaceae</i>	[22-24]
四川宜宾 Yibin, Sichuan	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanocorpusculum</i> , <i>Methanobrevibacter</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Petrimonas</i> , <i>Syntrophomonas</i> , <i>Caloramator</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Caloribacterium</i> , <i>Garciella</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Sedimentibacter</i> , <i>Sporanaerobacter</i> , <i>Tissierella</i> , <i>Methanosarcina</i>	[25-26]
河南 Henan	<i>Clostridium</i> , <i>Aminobacterium</i> , <i>Petrimonas</i> , <i>Syntrophomonas</i> , <i>Sedimentibacter</i> and <i>Lactobacillus</i>	[20]
江苏 Jiangsu	<i>Clostridiaceae</i> , <i>Anaerobrancaceae</i> , <i>Tissierellaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Mogibacteriaceae</i> , <i>Sedimentibacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Caloramator</i> , <i>Syntrophomonas</i> and <i>Eubacterium</i>	[27]
湖北 Hubei	<i>Clostridium</i> IV, <i>Caloramator</i> , <i>Syntrophomonas</i> , <i>Petrimonas</i> , <i>Actobacillus</i> , <i>Aminobacterium</i> , <i>Sedimentibacter</i>	[31]
安徽 Anhui	<i>Caproiciproducens</i> , <i>Caldicoprobacter</i> , <i>Haloplasma</i> , <i>Sporanaerobacter</i> , <i>Lutispora</i> , <i>Christensenellaceae</i> _R-7_group, <i>Syntrophomonas</i> , <i>Sedimentibacter</i> , <i>Fastidiosipila</i> , <i>Pseudomonas</i> and <i>Aminobacterium</i>	[39]

在同一个产区, 由于生产工艺、生产原料及相对位置的差异, 窖泥微生物同样具有相似性和独特性。以四川为例, 四川作为浓香型白酒最主要的产地, 包含了多个名优酒企。这些酒企的窖池窖泥中的主要微生物同样具有相似性, 都包含瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)、乳酸杆菌科(*Lactobacillaceae*)、梭菌科(*Clostridiaceae*)、毛螺旋菌科(*Lachnospiraceae*)、单胞菌科(*Syntrophomonadaceae*)等微生物, 但这些主要优势微生物的含量具有较大差异^[22-26]。不仅如此, 在四川产区的不同酒企的窖泥优势微生物也具有明显的独特性, 例如泸州产区八叠球菌属(*Sporosarcina*)、*Thermoplasmatales*^[15,22-24], 绵阳产区消化球菌科(*Peptococcaceae*)、肠球菌科(*Enterococcaceae*)、*Gracilbacteraceae*等^[15], 宜宾产区 *Garciella*、真杆菌属(*Eubacterium*)、沉积菌属(*Sedimentbacter*)、*Sporanaerobacter*、*Tissierella*^[25-26], 成都产区 *Ampullimonas*、*Anaerocella*、*Curvibacter*^[19]。主要优势微生物相对丰度的不同及地区独特窖泥微生物的差异, 可能是四川产区不同浓香型白酒酒体和风格迥异的重要原因。

1.3 不同质量窖泥微生物群落结构差异

好窖才能产好酒是长期实践生产中得到的窖泥质量与白酒品质密切相关的最好诠释。在实际生产过程中, 不当操作会使窖泥的质量发生退化, 进而影响浓香型白酒的酒质, 给酒厂带来巨大的经济损失。目前虽未对窖泥质量做出明确的标准, 但各个厂家的技术人员根据多年的经验总结结合窖泥的表观性状及酿造出的白酒的质量判断窖泥的优劣。随着窖泥质量与微生物的相关性的研究不断深入, 窖泥的微生物生态系统不断得到解析, 有利于窖泥质量的快速检测、窖泥的养护以及人工窖泥的培养等, 表3简述了不同质量窖泥与微生物的相关性。

众多的研究表明, 窖泥质量与窖泥微生物的多样性有极大的相关性。窖泥变质前后, 优势菌株发生显著变化, 窖泥中的优势菌群从动球菌属(*Planococcus*) (22.63%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)

(12.95%)、紫单胞菌科(*Porphyromonadaceae*) (12.45%)、芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*) (10.60%)、甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*) (35.66%)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*) (10.25%)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*) (3.27%)等变化为芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*) (61.34%)、嗜冷杆菌属(*Psychrophile*) (10.42%)、未分类菌属(5.45%)、子单胞菌属(5.02%)、产甲烷袋菌属(*Methanoculleus*) (38.18%)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*) (34.21%)等^[44]。随着窖泥质量的提高, 微生物群落的Shannon多样性指数及Chao1丰度指数显著增加^[45]。窖泥中梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)、类杆菌(*Prevolla*)、甲烷杆菌科(*Methanobacteriaceae*)、己酸菌、孢杆菌属(*Sporobacter*)、*Coriobacterineae*及主要的代谢产物己酸和丁酸与窖泥质量有着正相关的关系, 而乳杆菌属(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、雷尔氏菌属(*Ralstonia*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)及其代谢产生的乳酸和乙酸与窖泥质量则呈现明显的负相关^[41]。然而窖泥的理化性质pH、 NH_4^+ 和有效磷水平、溶解有机碳的水平、钙、铁、镁等也与窖泥的质量存在一定的相关性, 其中pH、 NH_4^+ 和有效磷水平与窖泥质量呈正相关, 溶解有机碳的水平、钙、铁、镁则与窖泥质量呈负相关^[23]。不仅如此, 窖泥中的蛋白酶、酸性磷酸酶、过氧化氢酶的活性也随窖泥品质的提升而升高^[41]。由于窖泥微生物对窖泥环境变化快速响应, 对以理化指标判断窖泥质量的方法进行了补充, 弥补了窖泥理化指标检测的滞后性, 能够缩短窖泥质量判断周期, 有效监控窖泥质量, 进而指导生产。

2 窖泥主体微生物

浓香型白酒在生产发酵过程前期, 生产环境中存在的好氧微生物大量生长繁殖, 并产生大量酯酶、淀粉酶、糖化酶及液化酶等多种酶, 促进环境中复杂有机物的降解。随着发酵时间的延长, 窖池中逐渐形成厌氧环境。此时, 在窖泥中主要为厌氧发酵(图1), 窖泥微生物将窖泥中存在的

表 3 不同窖泥质量理化特征和窖泥微生物的变化趋势

Table 3 Physicochemical information of pit mud quality and variation trend of microorganism in pit mud

样品 Samples	变化趋势 Changing trend	参考文献 References
不同质量窖泥 Pit mud of different quality	随着窖泥质量的提高,梭状芽孢杆菌(<i>Clostridium</i>)、<i>kluveri</i> 梭状芽孢杆菌(<i>Clostridium kluveri</i>)、类杆菌和甲烷杆菌(<i>Methanobacteriaceae</i>)的物种丰富度、生物多样性和相对丰度显著增加, pH、NH₄⁺和有效磷水平也相应增加,同时乳杆菌、溶解有机碳的水平,乳酸显著降低 The pit mud microbial community was correlated with its quality and environmental factors. Species richness, biodiversity, and relative and/or absolute abundances of <i>Clostridia</i>, <i>Clostridium kluveri</i>, <i>Bacteroidia</i>, and <i>Methanobacteria</i> significantly increased, with corresponding increases in levels of pH, NH₄⁺, and available phosphorus, from degraded to high-quality pit muds, while levels of <i>Lactobacillus</i>, dissolved organic carbon, and lactate significantly decreased, with normal samples in between 钙和铁与窖泥细菌负相关性很强,镁含量对窖泥细菌总量存在一定的负相关 The amount of bacteria showed strong negative correlation with the content of calcium and iron, and it also showed negative correlation with the content of magnesium 退化窖泥中梭菌属(<i>Clostridium</i>)、<i>Syntrophaceticus</i>、互营单胞菌属(<i>Syntrophomonas</i>)、理研菌属(<i>Petrimonas</i>)、沉积菌属(<i>Sedimentibacter</i>)、氨杆菌属(<i>Aminobacterium</i>)的相对含量显著高于正常窖泥 The relative contents of <i>Clostridium</i>, <i>Syntrophaceticus</i>, <i>Syntrophomonas</i>, <i>Petrimonas</i>, <i>Sedimentibacter</i> and <i>Aminobacterium</i> in degenerated pit mud were significantly higher than those in normal pit mud 孢杆菌属(<i>Sporobacter</i>)、<i>Coriobacterineae</i> 等菌属所占比例与窖泥品质呈现出一定的正相关关系 The proportion of <i>Sporobacter</i>, <i>Coriobacterineae</i> and other genera showed a positive correlation with the quality of pit mud 随着窖泥质量提高,微生物群落的 Shannon 多样性指数及 Chao1 丰度指数显著增加趋势,优势原核微生物群落组成从单一的 <i>Firmicutes</i> 逐渐变为 <i>Firmicutes</i>、<i>Euryarchaeota</i> 和 <i>Bacteroidetes</i> 这 3 个门;窖泥中核心属数目从 2 个属增加至 15 个属,主要集中于 <i>Clostridia</i>、<i>Bacteroidia</i>、<i>Methanobacteria</i>、<i>Methanomicrobia</i> 这 4 个纲,尤其是 <i>Clostridia</i> (7 个属) Microbial community alpha-diversity showed that Shannon and Chao 1 indices were significantly correlated with fermentation pit mud quality. The dominant phyla <i>Firmicutes</i> was replaced by <i>Firmicutes</i>, <i>Euryarchaeota</i> and <i>Bacteroidetes</i> with fermentation pit mud quality-improving, and the number of core genera increased from 2 to 15 genera, which were mainly assigned into four classes including <i>Clostridia</i>, <i>Bacteroidia</i>, <i>Methanobacteria</i>, <i>Methanomicrobia</i>, especially <i>Clostridia</i> (7 genera) 质量较好的老熟、趋老熟窖泥中,梭菌属(<i>Clostridium</i>)为主要优势菌群。然而质量一般或者质量较差的新泥、趋老化窖泥、老化窖泥中假单胞菌属含量较高 The predominant genus in maturing and matured pit mud was <i>Clostridium</i>, while that was <i>Pseudomonas</i> in fresh, degenerated pit muds 优势菌株发生显著变化,从动球菌属(<i>Planococcus</i>) (22.63%)、芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>) (12.95%)、紫单胞菌科(<i>Porphyromonadaceae</i>) (12.45%)、芽孢八叠球菌属(<i>Sporosarcina</i>) (10.60%)、甲烷短杆菌属(<i>Methanobrevibacter</i>) (35.66%)、甲烷杆菌属(<i>Methanobacterium</i>) (10.25%)、甲烷八叠球菌属(<i>Methanosarcina</i>) (3.27%)等变为芽孢八叠球菌属(<i>Sporosarcina</i>) (61.34%)、嗜冷杆菌属(<i>Psychrophile</i>) (10.42%)、未分类菌属(5.45%)、子单胞菌属(5.02%)、产甲烷袋菌属(<i>Methanoculleus</i>) (38.18%)、甲烷杆菌属(<i>Methanobacterium</i>) (34.21%)等 With the degeneration of pit mud, the dominant species were changed significantly, genera <i>Planococcus</i> (22.63%), <i>Bacillus</i> (12.95%), <i>Porphyromonadaceae</i> (12.45%), <i>Sporosarcina</i> (10.60%), <i>Methanobrevibacter</i> (35.66%), <i>Methanobacterium</i> (10.25%), <i>Methanosarcina</i> (3.27%) were replaced by genera <i>Sporosarcina</i> (61.34%), <i>Psychrobacter</i> (10.42 %), unclassified bacteria (5.45%), <i>Proteiniphilum</i> (5.02%), <i>Methanoculleus</i> (38.18%), and <i>Methanobacterium</i> (34.21%)	[38] [39] [40] [41] [42] [43] [44]
不同质量人工窖泥 Artificial pit mud-starter cultures of different qualities	正常人工窖泥样品的细菌物种多样性(Shannon 指数和 Chao1)显著高于劣质人工窖泥样品,正常人工窖泥中占有丰富的己酸菌和梭菌属(<i>Clostridium</i>),己酸和丁酸的含量较高。然而劣质人工窖泥中则主要是乳酸菌和芽孢杆菌(<i>Bacillus</i>),乳酸和乙酸含量较高 A significant higher bacterial species diversity (Shannon index and Chao1) was detected in the normal compared to the inferior artificial pit mud samples. The normal artificial pit mud was characterized by abundant <i>Caproiciproducens</i> and <i>Clostridium</i> and high caproic and butyric acid contents. In contrast, the inferior artificial pit mud was overrepresented by <i>Lactobacillus</i> and <i>Bacillus</i> and lactic and acetic acids	[45]

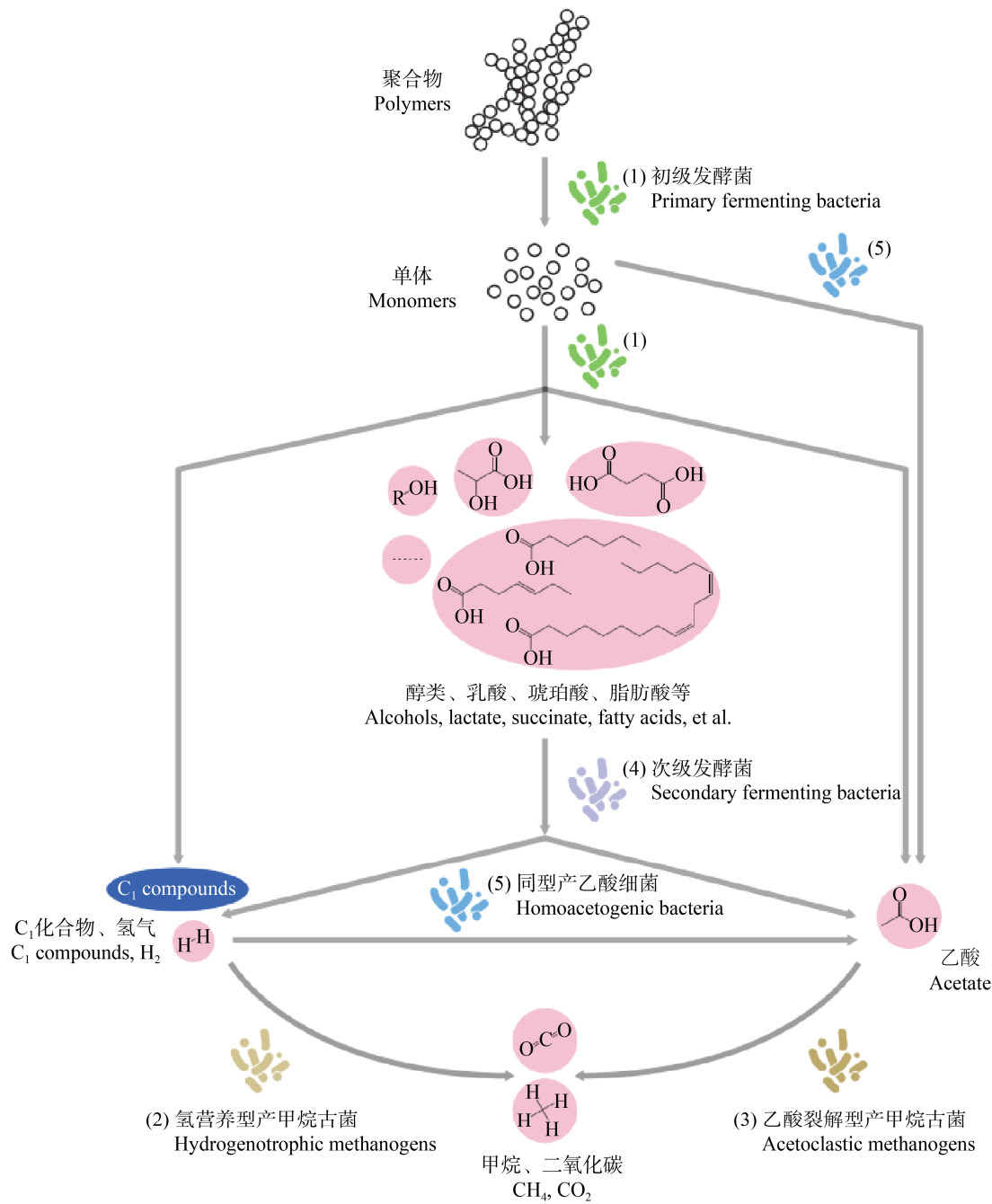


图 1 窖泥厌氧微生物代谢情况
Figure 1 Anaerobic microbial metabolism of pit mud

有机物质在微生物的相互作用下进行厌氧消化,代谢的最终产物为甲烷和二氧化碳,而在该过程中,代谢产生的中间产物乙酸、丙酸、乳酸、己酸、丁酸等挥发性脂肪酸及醇类物质、醛类物质和酯类物

质等是浓香型白酒的重要香味物质。分析窖泥功能微生物的代谢情况及微生物的相互作用关系,有助于明确香气成分产生机理,调节和定向改变窖泥微生物的代谢,提高浓香型白酒的品质,获得符合需

求的香味成分。

通过对窖泥微生物的群落结构进行分析,发现不同窖泥中的微生物具有较高相似性但也有明显的差异,对不同窖泥中的主要优势窖泥微生物进行整理(表 4)。其中 *Lactobacillus*、*Clostridium*、*Caproiciproducens*、*Bacillus* 和 *Methanogens* 是不同窖泥中共有的优势细菌。乳酸菌是白酒发酵后期过程中糟醅的主要微生物,在窖泥中也含有较高丰度,在某些新窖池池壁泥的含量可以达到 80%以上^[46],并且乳酸菌代谢产生的乳酸是浓香型白酒中的重要香味成分之一,乳酸菌还被认为是新窖泥中的典型微生物,对窖泥的质量有着重要的影响。梭菌属一直被认为是窖泥中主要的典型微生物,是影响窖泥质量的重要功能菌,在老窖泥的相对丰度明显要大于新窖泥中的含量,代谢产生的己酸、丁酸和乙酸等短链脂肪酸对浓香型白酒的香味成分有着极其重要的贡献^[18]。己酸菌属是随着微生物系统分类学的发展才被认定为新菌属的微生物。目前在窖泥中发现了大量的己酸菌属,丰度甚至可达细菌相对丰度的 40%^[19]。窖泥中含量如此丰富的

产己酸菌,可能是浓香型白酒以己酸乙酯为主体风格特征的主要原因。芽孢杆菌属在某些新窖泥中含量可超过 20%^[47],基本上在所有窖泥中的相对含量都超过了 1%,并且芽孢杆菌属种类繁多,不同代谢类型和代谢产物也是浓香型白酒风味多样性的原因之一,芽孢杆菌属还被认为是窖泥中可分离培养的主要微生物。由于产甲烷菌是厌氧发酵的末端微生物,因此,浓香型白酒发酵后期窖池中的厌氧环境极有利于这类古菌的生长。目前,多个研究表明窖泥中含有很高丰度的产甲烷菌^[36,44,48],并且产甲烷菌代谢活跃,虽然其本身的代谢产物并不会对浓香型白酒的风味产生直接的影响,但其与其他微生物的互营关系可能对浓香型白酒的质量产生重大影响,近些年关于窖泥的宏基因组学和宏转录组学的研究也为这一观点提供了证据。

2.1 乳酸菌

乳酸菌在自然界中分布广泛,早在 1873 年就分离出乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)^[50],开启了乳酸菌的研究,目前已经得到了 23 个属的乳酸菌。浓香型白酒生产为开放式操作,大量的乳酸菌从不

表 4 不同窖泥优势微生物种类及其相对丰度
Table 4 Dominant microbial species and relative abundance in different pit mud

样品 Samples	优势微生物及其相对丰度 Dominant microorganisms and relative abundance	参考文献 References
窖泥 Pit mud	<i>Lactobacillus</i> (6.97%), <i>Clostridium</i> (1.84%), <i>Syntrophomonas</i> (2.52%), <i>Methanosarcina</i> (3.5%), <i>Methanobacterium</i> (3.37%)	[17]
窖泥 Pit mud	<i>Clostridium</i> (12.15%), <i>Lactobacillus</i> (3.49), <i>Bacillus</i> (1.23%), <i>Methanogens</i> (19%)	[18]
窖泥 Pit mud	<i>Caproiciproducens</i> (40.40%), <i>Petrimonas</i> (12.70%), <i>Lactobacillus</i> (1.17%), <i>Anaerocella</i> (3.97%), <i>Proteiniphilum</i> (5.06%)	[19]
窖泥 Pit mud	<i>Clostridium</i> IV (47.4%), <i>Caloramator</i> (4.2%), <i>Lactobacillus</i> (1.1%), <i>Aminobacterium</i> (4.4%)	[31]
窖泥 Pit mud	<i>Lactobacillus</i> (55.79%), <i>Ruminococcus</i> (9.88%), <i>Caloramator</i> (2.26%), <i>Clostridium</i> (2.01%), <i>Aminobacterium</i> (1.66%), <i>Klebsiella</i> (1.23%), <i>Syntrophomonas</i> (1.22%), <i>Methanoculleus</i> (1.22%), <i>Sedimentibacter</i> (1.14%)	[36]
窖泥 Pit mud	<i>Lactobacillus</i> (85.59%), <i>Caproiciproducens</i> (5.63%)	[46]
窖泥 Pit mud	<i>Bacillus</i> (22.74%), <i>Clostridium</i> IV (12.12%), <i>Petrimonas</i> (12.08%), <i>Proteiniphilum</i> (5.15%), <i>Syntrophomonas</i> (3.21%)	[47]
窖泥 Pit mud	<i>Lactobacillus</i> (6.45%), <i>Caloramator</i> (2.74%), <i>Clostridium</i> (2.23%), <i>Methanobrevibacter</i> (25.68%), <i>Methanosarcina</i> (19.89%)	[48]
窖泥 Pit mud	<i>Lactobacillus</i> (77.16%), <i>Clostridium</i> (3.70%), <i>Bacillus</i> (1.64%)	[49]

同的环境中被带入了浓香型白酒的生产过程中,成为浓香型白酒酿造过程中的重要微生物,是白酒科研工作者的研究对象。窖池中共检出 6 科 16 属乳酸菌,含量占细菌的 5%不到,并且存在时空异质性^[51]。乳酸菌代谢产生的乳酸和乙酸不仅是白酒风味的主要成分之一,也是浓香型白酒中四大酯之一的乳酸乙酯的重要前体物质。近年来,窖泥中乳酸菌的分离培养和代谢研究都取得了很大的进展。戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、玉米乳杆菌(*Lactobacillus zeae*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、酒窖片球菌(*Pediococcus cellicola* sp. nov.)和耐乙醇片球菌(*Pediococcus ethanoltolerans* sp. nov.)等多株乳酸菌从窖泥中被分离得到,通过食品风味化学对白酒中的乳酸进行分析,发现适当含量的乳酸是浓香型白酒中的重要香气成分,并且乳酸菌还可以利用糖类生成乙醛(果香)、3-羟基-2-丁酮(奶油、脂肪香味)和 2,3-丁二酮(奶油味)等香味物质^[52]。乳酸菌作为发酵过程中的重要产风味功能菌,不仅在新窖泥中含量异常丰富,而且还可能在窖泥中作为杀菌剂抑制杂菌的生长,维持窖池中良好环境;其还可能是窖池中的酸碱度调节剂,维持窖池环境的偏酸性,促进酿酒酶的糖化和发酵能力^[53]。目前,我国白酒生产企业大多都面临着乳酸乙酯含量过高、香气成分比例严重失调的问题,增己降乳是现阶段白酒科研人员面临的重要问题。目前通过组学和分离培养的方法对窖泥中乳酸菌进行分析,了解窖泥中乳酸菌的种类和丰度能够有效促进对窖泥中乳酸代谢网络的了解,调节乳酸的含量,进而对窖泥微生物进行扰动,达到增己降乳的目的。

2.2 梭菌属

梭菌属(*Clostridium*)分布广泛,主要分布在土壤^[54]、河流^[55]等多种自然环境及厌氧反应器^[56]发酵体系中,由于其底物的广谱性和代谢产物的多样

性^[57-59],被认为是环境的调节者和重要的微生物资源。在窖泥环境中,梭菌属(*Clostridium*)一直被认为是主要的优势物种,也是目前研究得最多的物种之一,梭菌属(*Clostridium*)利用淀粉等有机物代谢产生的己酸、乙酸、丁酸等是浓香型白酒的重要香味物质^[65]。目前,利用可培养方法从窖泥中分离得到了多株梭菌,包括 *Clostridium celerecrescens*、*C. cochlearium*、*C. sporogenes*、*C. sartagoforme*、*C. kluyveri*^[60]、*C. aurantibutyricum*^[33]及新菌株 *C. liquoris*^[61]、*Clostridium* sp. BPY5^[62]、*C. swellfunianum*^[63]、*C. fermenticellae*^[64]等。窖泥中的梭菌具有多种代谢产物,如己酸、丁酸、乙酸等多种酸类及醇、醛、酮、甲基化合物等^[65]。胡晓龙^[42]对窖泥中的主要梭菌 *C. kluyveri* N6 进行了系统的分析, *C. kluyveri* N6 的挥发性代谢物中含有脂肪酸类化合物(己酸,辛酸,丁酸)、醇类化合物(1-丁醇, 1-己醇, 1-辛醇)和乙酯类化合物(丁酸乙酯,己酸乙酯,辛酸乙酯)。有研究表明, *C. kluyveri* N6 代谢产生己酸是产氢的过程,这可能与氢营养型的微生物有相互作用关系^[66]。值得注意的是目前研究表明, *C. butyricum* 在代谢过程中能产生多种酶将环境中多糖物质分解为低聚糖,并产生丁酸梭菌素(抗菌肽)、丁酸、乙酸和维生素等多种次级代谢产物,能够抑制有害菌繁殖^[67]。窖泥中的梭菌属不仅代谢产生己酸、丁酸和乙酸等重要的浓香型白酒的香气成分,并且某些菌属还能够代谢产生一些次级代谢产物。梭菌属及其代谢产物对窖泥中的相关微生物有相互作用关系和调节作用,进而对浓香型白酒的香气成分产生影响。对窖泥中的梭菌属进行分析,有助于分析窖泥微生物的代谢情况和微生物的相互作用关系,促进对浓香型白酒风味特征产生的机理的研究,能够为窖泥的维护、白酒质量的改善等诸多方面提供理论基础和技术支撑。

2.3 己酸菌属

己酸菌属(*Caproiciproducens*)是梭菌科下新归

类的微生物菌属,近年来被发现广泛存在于窖泥中。有研究表明,己酸菌属是某些窖泥样本中的主要优势属,其相对丰度随着窖龄的增加而升高^[19,46],因此,这类微生物有着成为窖泥窖龄鉴定指标的潜力,可作为“窖龄老,酒才好”的重要依据。己酸菌属在改良肉汤培养基中发酵后能得到 0.11 g/L 的乙醇,0.58 g/L 的乙酸,0.39 g/L 的丁酸和 0.69 g/L 的己酸,具有明显的产己酸作用^[68]。Gao 等也发现己酸菌属是窖泥和黄水中的重要微生物,与己酸的产生有着密切的关系^[69]。乙酸、丁酸和己酸均为浓香型白酒的重要香气成分和相关酯的前体物质。己酸菌由于其丰度和代谢特性,越来越受到白酒研究人员的重视,是未来窖泥微生物研究的一个重要热点。

2.4 芽孢杆菌属

芽孢杆菌属(*Bacillus*)在自然界中分布广泛,*Bacillus* 大量用于发酵食品中,在用于水解豆类等原料产生食品过程中会产生大量的风味化合物^[70]。在自然发酵的浓香型白酒中,*Bacillus* 同样为浓香型白酒的风味化合物的产生贡献巨大的力量。窖泥作为浓香型白酒发酵微生物的主要栖息地,窖泥中分离得到了短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、耐硼赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus boronitolerans*)、栗褐芽孢杆菌(*B. badius*)、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、类球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)、尘埃类芽孢杆菌(*B. pulvifaciens*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)等多种芽孢杆菌^[71]。分离得到的芽孢杆菌都能代谢产生 3-羟基-2-丁酮、2,3-丁二醇、C₄ 化合物、吡嗪和挥发酸等浓香型白酒中重要的香味成分,对浓香型白酒的风味有调节作用^[72]。芽孢杆菌代谢产生的某些化合物存在有群体效应的调控过程,可能对整个微生物群体的运动进行调控^[73]。众多的研究结果都表明了芽孢杆菌对浓香型白酒的香味成分有着

巨大的贡献,芽孢杆菌的次级代谢产物还可能与窖泥中其他微生物有相互作用关系,维持着窖泥中环境的相对稳定。

2.5 产甲烷菌

在厌氧发酵阶段中产生的中间产物醇、乳酸和脂肪酸等是浓香型白酒的重要香味成分。有研究表明脂肪酸的降解是厌氧消化过程的限速步骤^[74]。一旦出现脂肪酸累积的现象,则会造成厌氧消化反应的失衡,环境的 pH 降低,发酵型微生物代谢受到抑制^[75]。文献报道,较高的氢分压或较高的氢气产率是引起厌氧消化系统中脂肪酸累积的主要原因^[76]。在厌氧消化体系中,产甲烷菌是解决脂肪酸积累问题的有力措施^[75]。然而在浓香型发酵过程中,封窖后窖池中进行的也是一个厌氧消化的过程,对窖泥中的主要微生物进行分析发现,窖泥中的大多微生物生长代谢的最适条件为偏中性。pH 的变化会导致窖泥中的微生物受到不同程度的影响,进而影响浓香型白酒的风味特征和质量。窖泥中含有丰富的产甲烷菌,而且窖泥中的产甲烷菌与多数细菌呈正相关^[77]。这些产甲烷菌的存在或许是窖泥中维持 pH 稳定和整个厌氧消化体系稳定的重要因素。窖泥中主要的产甲烷菌为甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)、甲烷囊菌属(*Methanoculleus*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)和甲烷杆菌属(*Methanobacterium*),理化信息见表 5。这些产甲烷菌能够很好地利用发酵型细菌代谢产生的氢气产生甲烷,避免氢气的积累,抑制脂肪酸的降解。甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)还以乙酸作为底物代谢产生甲烷。由于甲烷菌的作用,调节了窖池环境中的氢气和乙酸的含量,维持了窖泥中的脂肪酸降解和 pH 环境,促进了浓香型白酒的香味物质的产生^[77]。

有研究表明,某些梭菌和己酸菌属能够利用乳酸和乙醇代谢产生白酒中重要的香味物质己酸和丁酸。通过利用宏转录组对窖泥微生物进行分析

表 5 窖泥中主要产甲烷菌的理化信息

Table 5 Physical and chemical information of main methanogens in pit mud

产甲烷菌种类 Types of Methanogens	通用底物 Common substrates	温度生长范围(最适) Temperature growth range (optimum) (°C)	pH 生长范围(最适) pH growth range (optimum)	NaCl 生长范围(最适) NaCl growth range (optimum) (%)
<i>Methanobrevibacter</i>	氢气、甲酸 H ₂ , formic acid	30–39 (36)	6.0–7.8 (7.1)	0.45–0.50 (0.48)
<i>Methanoculleus</i>	氢气、甲酸、二氧化碳/二级醇 H ₂ , formic acid, CO ₂ /secondary alcohol	23–55 (39)	6.5–8.1 (7.0)	0.54–1.50 (1.06)
<i>Methanobacterium</i>	氢气、一氧化碳、甲醇、二甲基硫醚、 二甲胺、三甲胺、甲胺、丙酮酸、乙酸 H ₂ , CO, methanol, dimethyl sulfide, dimethylamine, trimethylamine, methylamine, pyruvic acid, acetic acid	28–65 (38)	5.6–8.6 (7.1)	0.25–1.40 (0.69)
<i>Methanosarcina</i>	乙酸、氢气、甲酸、甲醇 Acetic acid, H ₂ , formic acid, methanol	25–50 (35)	6.5–7.9 (6.9)	0.35–1.20 (0.85)

发现，窖泥中含有大量关于己酸合成的基因，并且这些基因在窖泥环境中是活跃表达的。对编码己酸的相关基因进行了微生物的溯源，也表明这些基因主要来源于瘤胃梭菌属(*Lachnoclostridium*)和梭菌属(*Clostridium*)。梭菌属(*Clostridium*)和己酸菌属(*Caproiciproducens*)在厌氧和相关酶的作用下代谢产生己酸和氢气。氢气的积累对己酸的合成会有一定的抑制作用。Tao 等认为在窖泥中，梭菌属与产甲烷菌可能存在相互作用关系,通过种间氢转移的过程,氢营养型产甲烷菌对己酸合成过程中产生的氢气的消耗，促进了己酸的合成^[62]。柴丽娟等推测产甲烷古菌与产酸菌之间的互作解除了氢抑制，实现了发酵过程的酸积累，促进了浓香型白酒典型风味的形成^[78]。

张应刚^[77]通过对窖泥的宏基因组和宏转录组分析，认为窖泥中的产甲烷菌与其他功能微生物有着丰富的相互作用关系。窖泥中的优势菌株互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)是一类典型的互营菌，通过与产甲烷菌互营促进脂肪酸的降解。*Syntrophomonas*^[79]与氢营养型产甲烷古菌共培养能够产生乙酸和丙酸,能够以丁酸和更多碳的脂肪酸作为电子供体还原质子进行能量代谢,并且还能够降解长链脂肪酸。此外 *Syntrophomonas*^[80]还可以将前异辛酸降解为前异己酸,前异己酸为己酸的重要前体物质。窖泥中发现的各种短链脂肪酸的合

成基因也为产甲烷菌与其他微生物的相互作用提供了有力证据。

3 总结和思考

随着测序技术的快速发展,窖泥微生物群落结构被很好地解析出来,并且建立了窖泥中梭菌、乳酸菌、芽孢杆菌、甲烷菌的定量分析方法^[81],通过对不同窖泥的微生物群落结构及主要功能菌的含量差异的总结,明确了不同窖泥的窖泥微生物群落结构差异。这些研究为“老窖出好酒”和“窖泥的老熟”提供了理论基础和技术支持。不同产区的窖泥优势微生物的差异很好地解释了不同产区浓香型白酒风味特点的差异。同时对窖泥中主要微生物的解析和研究,有助于为窖泥年代的判断提供新的视角,江南大学联合泸州老窖结合不同质量窖泥优势微生物的差异,构建了相关的微生物菌剂用于人工窖泥的制作和退化窖泥的养护,为人工窖泥的发展和窖泥的养护提供了新的思路^[82-83]。

目前对窖泥微生物的研究主要集中在微生物多样性分析、宏基因组学分析及基于微生物群落结构的微生物分离培养,尽管有通过使用绝对定量测序分析肠道微生物的群落结构,但由于方法及样本的原因，并没有广泛应用于窖泥微生物的研究当中，目前缺乏对窖泥微生物绝对丰度、窖泥微生物相互作用关系及由此特殊生境下微生物的代谢产物的分析和研究手段。此外由于厌氧微生物生长及

代谢的特殊性,极大地限制了窖泥中厌氧微生物的分离培养,窖泥中相对丰度超过 10%的绝对厌氧菌产甲烷菌只有极少数被分离出来。现有的研究结果表明,窖泥中的产甲烷菌与其他窖泥微生物的相互作用可能对浓香型白酒的香味成分有较大贡献,并且产甲烷菌能够维持整个窖泥环境的稳定。因此窖泥中的产甲烷菌分离培养以及与窖泥其他微生物的相互作用的研究还需加强。

浓香型白酒作为中国传统酒文化的重要组成部分,在历史长河中不断发展,形成了其自身独特的以泥窖为发酵容器的生产工艺。随着科学水平的提高和消费者对品质的追求,窖泥的神秘面纱逐渐被揭开。要想明确窖泥在白酒酿造过程中的作用,使生产更符合消费要求的浓香型白酒,必须要利用先进的分析检测仪器和生物技术,特别是现在快速发展的组学、酶工程和代谢工程等,解析窖泥中功能菌的相互作用关系、功能菌的代谢途径和代谢过程。功能菌之间相互作用的了解及对香味物质产生关系的分析和探究,有助于为提高窖泥质量、促进白酒中有利香味成分的产生、为增加名优酒的产量奠定理论和技术基础。

REFERENCES

- [1] 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)
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
- [2] Zhang YY, Zhu XY, Li XZ, Tao Y, Jia J, He XH. The process-related dynamics of microbial community during a simulated fermentation of Chinese strong-flavored liquor[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 1-10
- [3] Tang YM, Shen CH, Ren DQ, Ying H, Xu DF, Yao WC, Zhang L, Fan L. Study on characteristics of aged cellar mud[J]. *Liquor-making*, 2005, 32(5): 24-28 (in Chinese)
唐玉明, 沈才洪, 任道群, 应鸿, 许德富, 姚万春, 张良, 樊林. 老窖池窖泥特性研究[J]. *酿酒*, 2005, 32(5): 24-28
- [4] Wu SD, Lai DY, Wen KH, Chen GZ. Study on the reasons for pit mud degradation in North China and the maintenance of pit mud[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2014(9): 71-74 (in Chinese)
吴三多, 赖登辉, 温宽和, 陈果忠. 北方地区窖泥退化原因及管理养护的研究[J]. *酿酒科技*, 2014(9): 71-74
- [5] Zhou HG. Review of caproic acid bacteria and pit mud culture before 1980s[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 1997(4): 17-22 (in Chinese)
周恒刚. 80 年代前己酸菌及窖泥培养的回顾[J]. *酿酒科技*, 1997(4): 17-22
- [6] Sun HL. Isolation of actinomycetes from pit mud[J]. *China Brewing*, 1987, 6(6): 33-35 (in Chinese)
孙惠兰. 对窖泥中放线菌的分离研究[J]. *中国酿造*, 1987, 6(6): 33-35
- [7] Liu GY, Zhao YZ, Wu YY. Isolation and characterization of *Methanobacter brucei* from old pit mud of Luzhou liquor[J]. *Microbiology*, 1987, 14(4): 156-160 (in Chinese)
刘光烨, 赵一章, 吴衍庸. 泸州老窖泥中布氏甲烷杆菌的分离和特性[J]. *微生物学通报*, 1987, 14(4): 156-160
- [8] Cao WT, Liao ZM. Study on separation & purification and acid-production of hexanoate bacteria in pit mud[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2001(4): 42-43, 41 (in Chinese)
曹文涛, 廖忠明. 窖泥中己酸菌的分离纯化及产酸的初步研究[J]. *酿酒科技*, 2001(4): 42-43, 41
- [9] Sun QJ, Guan QC, Tian YQ, Chen WD. Study on microorganism and formula of pit mud[J]. *Liquor Making*, 1992, 19(4): 19-22 (in Chinese)
孙前聚, 关其才, 田以清, 陈卫东. 窖泥微生物及窖泥配方应用研究[J]. *酿酒*, 1992, 19(4): 19-22
- [10] Wu YY, Lu SH, Liu GY, Xue TR, Jiang YL. A study of enhancing the quality of Luzhou type qujiu by using simultaneous fermentation of Caproic acid bacteria and methane bacteria[J]. *Food and Fermentation Industries*, 1990, 16(6): 1-6 (in Chinese)
吴衍庸, 卢世珩, 刘光烨, 薛堂荣, 江跃林. 利用窖泥甲烷菌与己酸菌二元发酵技术提高泸型曲酒质量的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1990, 16(6): 1-6
- [11] Su FG. Application of liquid pit mud to improve the quality of Luzhou flavor liquor[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 1996(2): 28-30 (in Chinese)
苏富贵. 应用液体窖泥提高浓香型曲酒质量[J]. *酿酒科技*, 1996(2): 28-30
- [12] Qiao ZW, Zhang WX, Zhang LY, Zhang QS, Yue YY. Analysis on microbes in brewing mass of strong aromatic spirits during fermentation[J]. *Liquor-making*, 2005, 32(1): 18-22 (in Chinese)
乔宗伟, 张文学, 张丽莺, 张其圣, 岳元媛. 浓香型白酒

- 发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J]. 酿酒, 2005, 32(1): 18-22
- [13] Zhang WX, Qiao ZW, Hu C, Wang ZY. Analysis of bacterial community in fermented grains during the production of Chinese strong aromatic spirits by PCR technique[J]. Journal of Sichuan University: Engineering Science Edition, 2005, 37(5): 82-87 (in Chinese)
张文学, 乔宗伟, 胡承, 王忠彦. PCR 技术对浓香型白酒糟醅细菌菌群的解析[J]. 四川大学学报(工程科学版), 2005, 37(5): 82-87
- [14] He CR, Wu DM, Zheng J, Wu CD, Zhou RQ. Investigation on bacteria and archaea communities in the fermentation pits of nong-flavor liquor as pit age goes by[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2013(1): 27-30,38 (in Chinese)
何翠容, 吴冬梅, 郑佳, 吴重德, 周荣清. 浓香型白酒窖池细菌与古菌随窖龄变化的特征[J]. 酿酒科技, 2013(1): 27-30,38
- [15] Deng J. Study on microbial community structure of put mid from Luzhou-flavor liquor based on high throughput sequencing[D]. Zigong: Master's Thesis of Sichuan University of Science & Engineering, 2015 (in Chinese)
邓杰. 基于高通量测序的浓香型白酒窖泥微生物群落结构研究[D]. 自贡: 四川理工学院硕士学位论文, 2015
- [16] Yuan YJ, Zhang QY, Zeng LY, Zhang WX. Analysis of bacterial community and acid, ester contents in pit mud with different characteristics[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(1): 44-48 (in Chinese)
袁玉菊, 张倩颖, 曾丽云, 张文学. 不同性状窖泥的细菌群落结构与酸酯含量分析[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 44-48
- [17] Li FL. Analysis of microbial communities and its effect on flavor substance of raw in Chinese strong-flavor liquor pit muds[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University of Light Industry, 2017 (in Chinese)
李芳莉. 浓香型白酒窖泥微生物群落结构分析及其对原酒风味物质的影响[D]. 郑州: 郑州轻工业学院硕士学位论文, 2017
- [18] Tao Y, Rui JP, Li JB, Xu ZC, Li DP, Tang QL, Wei Y, Li XZ. 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, 徐占成, 李大平, 唐清兰, 魏勇, 李香真. 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
- [19] Zhang YG, Deng Y. Microbial structure and diversity of cellar mud at different winery cellar age based on high-throughput sequencing[J]. China Biogas, 2019, 37(3): 3-8 (in Chinese)
- 张应刚, 邓宇. 基于高通量测序的不同窖龄窖泥微生物结构与多样性分析[J]. 中国沼气, 2019, 37(3): 3-8
- [20] Wang CY, Song JY, Lv HX, Zhang YM, Fan YP, Li XS, Guo SX. Analysis of bacterial community structure in strong-flavor Baijiu pit mud with different cellar ages from Songhe distillery based on high-throughput sequencing[J]. China Brewing, 2019, 38(9): 163-166 (in Chinese)
王春艳, 宋建阳, 吕慧鑫, 张玉梅, 范玉璞, 李学思, 郭书贤. 基于高通量测序的宋河浓香型白酒不同窖龄窖泥细菌群落结构分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(9): 163-166
- [21] Zhang HM, Meng YJ, Wang YL, Zhou QW, Li AJ, Liu GY, Li JX, Xing XH. Prokaryotic communities in multidimensional bottom-pit-mud from old and young pits used for the production of Chinese strong-flavor baijiu[J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126084
- [22] Deng J, Wei CH, Bian MH, Huang ZG. Archaeal community analysis of pit mud from cellars of different ages for Luzhou-flavor liquor[J]. Food Science, 2017, 38(8): 37-42 (in Chinese)
邓杰, 卫春会, 边名鸿, 黄治国. 浓香型白酒不同窖龄窖池窖泥中古菌群落结构分析[J]. 食品科学, 2017, 38(8): 37-42
- [23] Ye GB, Luo HB, Yang XD, Li DY, Wang Y, Ni B. Community structure of prokaryotes in pit mud of Lu-flavor liquor from Luzhou prefecture based on culture-independent approach[J]. Food Science, 2013, 34(17): 176-181 (in Chinese)
叶光斌, 罗惠波, 杨晓东, 李丹宇, 王毅, 倪斌. 基于免培养法研究泸州地区浓香型白酒窖泥原核微生物群落结构[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 176-181
- [24] Xiong Y. Population diversity and phylogeny of bacteria and archaea in different aged pit muds of Luzhou Laojiao cellar[D]. Yaan: Doctoral Dissertation of Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese)
熊亚. 泸州老窖不同窖龄窖泥中细菌及古菌种群多样性和系统发育研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士学位论文, 2014
- [25] Zhai L, Yu XJ, Feng HJ, Zhang CW, Zhou LG, Qiu SQ, Yao S. Study on bacterial community structure in the brewing habitats of strong flavour Chinese Baijiu from Yibin region[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 18-24 (in Chinese)
翟磊, 于学健, 冯慧军, 张彩文, 周立光, 邱声强, 姚粟. 宜宾产区浓香型白酒酿造生境中细菌的群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(2): 18-24
- [26] Zhao D, Zheng J, Peng ZY, Lyu XL, Yang KZ, Zhang JM. Prokaryotic microbial community in Wuliangye pit mud using NextSeq high-throughput sequencing technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(9): 1-8 (in Chinese)

- Chinese)
赵东, 郑佳, 彭志云, 吕学兰, 杨康卓, 张建敏. 高通量测序技术解析五粮液窖泥原核微生物群落结构[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 1-8
- [27] Hu XL, Wang KL, Yu M, Niu GJ, Meng SJ, Ma AY, Li H, Fan JH, He PX. Spatial distribution of prokaryotic microbial community of strong-flavor pit mud based on high-throughput sequencing[J]. China Brewing, 2020, 39(6): 167-172 (in Chinese)
胡晓龙, 王康丽, 余苗, 牛广杰, 孟书剑, 马安银, 李红, 樊建辉, 何培新. 基于高通量测序的浓香型窖泥原核微生物群落的窖池空间分布[J]. 中国酿造, 2020, 39(6): 167-172
- [28] 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
- [29] Zhong SX, Deng J, Wei CH, Luo HB, Wan SL, Huang ZG. Correlations between microbial community and physicochemical indexes in pit mud of different ages[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(7): 119-125 (in Chinese)
钟妹霞, 邓杰, 卫春会, 罗惠波, 万世旅, 黄治国. 不同窖龄窖泥微生物群落结构与理化指标的相关分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(7): 119-125
- [30] Hu B, Chen Y, Zhang WX, Li KY, Chen B, Hu C. Relationship between pit age and the abundance of main microbes in pit mud[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(3): 389-394 (in Chinese)
胡贝, 陈瑶, 张文学, 李克亚, 陈兵, 胡承. 几种主要窖泥微生物丰度与窖龄的关系[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(3): 389-394
- [31] Huang YN. Analysis of microbial community and diversity in pit mud of Zhijiang liquor[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese)
黄莹娜. 枝江大曲酒窖泥微生物群落结构与多样性分析[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016
- [32] Zheng J, Liang R, Zhang LQ, Wu CD, Zhou RQ, Liao XP. 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
- [33] Wang MY, Zhang WX, Wang HY, Liu CL. Analysis of bacterial phylogenetic diversity of pit muds with different cellar ages[J]. Food Science, 2013, 34(11): 177-181 (in Chinese)
王明跃, 张文学, 王海英, 刘超兰. 不同窖龄窖泥细菌的系统发育多样性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 177-181
- [34] 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
- [35] Liang HP, Li WF, Luo QC, Liu CL, Wu ZY, Zhang WX. Analysis of the bacterial community in aged and aging pit mud of Chinese Luzhou-flavour liquor by combined PCR-DGGE and quantitative PCR assay[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(13): 2729-2735
- [36] Zhang HM. Study on gujingtribute microbial community structure and its association with liquor flavor molecules[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2017 (in Chinese)
张会敏. 古井贡酒微生物群落结构及其与主要风味物质的关联研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2017
- [37] 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)
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
- [38] 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
- [39] Wang YL, Meng YJ, He HK, Zhang HM, Liu GY, Wang L, Liu L, Li JX. Correlation between physicochemical factors and total bacterial count in different grades of nongxiang flavored pit mud[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(3): 89-94 (in Chinese)
王艳丽, 孟雅静, 何宏魁, 张会敏, 刘国英, 王录, 刘露, 李静心. 不同品质浓香型窖泥理化因子与细菌总量的相关性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(3): 89-94
- [40] Guo Z, Ge DY, Shang XJ, Liu WH, Yang SY, Zhang ZD. Comparative analysis on the diversity of bacterial microflora in degenerated and normal pit mud[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 93-98, 106 (in Chinese)
郭壮, 葛东颖, 尚雪娇, 刘文汇, 杨少勇, 张振东. 退化 and 正常窖泥微生物多样性的比较分析[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 93-98, 106
- [41] Wu SK, Liu M, Deng J, Wei CH, Huang ZG. Relation of microbial composition and enzyme activity index with different grades of Luzhou flavored clay[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(1): 19-24 (in Chinese)
吴树坤, 刘梅, 邓杰, 卫春会, 黄治国. 不同品质浓香型窖泥的酶活与微生物群落的相关性[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 19-24

- [42] 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
- [43] Luo W, Zhang QY, Liao ZM, Zhang WX. Research on microbial composition of pit mud with different traits using high-throughput sequencing[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(9): 9-14 (in Chinese)
罗雯, 张倩颖, 廖作敏, 张文学. 基于高通量测序技术的不同性状窖泥微生物组成研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 9-14
- [44] Yu CT, Liu C. Analysis of bacterial diversity in different areas of strong aromatic Chinese spirit in pit mud[J]. Food Research and Development, 2016, 37(24): 148-151 (in Chinese)
于春涛, 刘超. 不同产区浓香型白酒窖泥中细菌多样性分析[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(24): 148-151
- [45] Liu MK, Tang YM, Zhao K, Liu Y, Guo XJ, Tian XH, Ren DQ, Yao WC. Contrasting bacterial community structure in artificial pit mud-starter cultures of different qualities: a complex biological mixture for Chinese strong-flavor baijiu production[J]. 3 Biotech, 2019, 9(3): 1-9
- [46] 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)
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
- [47] Zeng LY, Yuan YJ, Zhang QY, Luo W, Wu ZY, Zhang WX. The relationship of bacterial community structure in pit mud and volatile components of liquor[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(2): 9-13 (in Chinese)
曾丽云, 袁玉菊, 张倩颖, 罗雯, 吴正云, 张文学. 窖泥细菌群落结构与基酒挥发性组分相关性分析[J]. 食品科技, 2017, 42(2): 9-13
- [48] 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)
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
- [49] Yang XL, Shang XJ, Yu HZ, Liu WH, Yang SY, Guo Z. Bacterial diversity in pit mud of Guxiangyang Baijiu analyzed by Miseq high-throughput sequencing[J]. China Brewing, 2018, 37(7): 26-30 (in Chinese)
杨小丽, 尚雪娇, 余海忠, 刘文汇, 杨少勇, 郭壮. 基于Miseq高通量测序技术的古襄阳酒窖泥细菌多样性评价[J]. 中国酿造, 2018, 37(7): 26-30
- [50] Zhang G. Foundation, Technology and Application of Lactic Acid Bacteria[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007 (in Chinese)
张刚. 乳酸细菌: 基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
- [51] Qian W, Lu ZM, Chai LJ, Zhang XJ, Li Q, Wang ST, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. Differences in the lactic acid bacterial community structure between Jiupei and pit mud during the fermentation of Luzhou-flavour baijiu[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(4): 760-765 (in Chinese)
钱玮, 陆震鸣, 柴丽娟, 张晓娟, 李崎, 王松涛, 沈才洪, 史劲松, 许正宏. 泸型酒酒醅与窖泥中乳酸菌群落结构差异[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 760-765
- [52] Wang W, Zhao H, Chen FG. Isolation & preliminary identification of lactic acid bacteria in Luzhou-flavor pit mud[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2006(4): 29-31 (in Chinese)
王葳, 赵辉, 陈凤阁. 浓香型白酒窖泥中乳酸菌的分离与初步鉴定[J]. 酿酒科技, 2006(4): 29-31
- [53] Li LH. Diversity and metabolic characteristics of lactic acid bacteria and lactate-degrading bacteria in fermented grains of Luzhou-flavor liquor[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2016 (in Chinese)
栗连会. 泸型酒酒醅中乳酸菌和乳酸降解菌的多样性和代谢特性[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2016
- [54] Dharmasena M, Jiang XP. Isolation of toxigenic *Clostridium difficile* from animal manure and composts being used as biological soil amendments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(16): 00738-18
- [55] Zidaric V, Beigot S, Lapajne S, Rupnik M. The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers[J]. Anaerobe, 2010, 16(4): 371-375
- [56] Horiuchi JI, Shimizu T, Tada K, Kanno T, Kobayashi M. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control[J]. Bioresource Technology, 2002, 82(3): 209-213
- [57] Tracy BP, Jones SW, Fast AG, Indurthi DC, Papoutsakis ET. Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery

- applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 364-381
- [58] Steinbusch KJJ, Hamelers HVM, Plugge CM, Buisman CJN. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass[J]. *Energy Environ Sci*, 2011, 4(1): 216-224
- [59] Zhao W, Zhang YF, Du B, Wei D, Wei Q, Zhao YF. Enhancement effect of silver nanoparticles on fermentative biohydrogen production using mixed bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 240-245
- [60] Zheng Q, Lin BR, Wang YB, Zhang QP, He XX, Yang P, Zhou J, Guan X, Huang XH. Proteomic and high-throughput analysis of protein expression and microbial diversity of microbes from 30- and 300-year pit muds of Chinese Luzhou-flavor liquor[J]. *Food Research International*, 2015, 75: 305-314
- [61] Yin Q, Tao Y, Zhu XY, Zhou Y, He XH, Cheng L, Huang Y, Li DP. *Clostridium liquoris* sp. nov., isolated from a fermentation pit used for the production of Chinese strong-flavoured liquor[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 749-754
- [62] Tao Y, Hu XH, Zhu XY, Jin H, Xu ZC, Tang QL, Li XZ. Production of butyrate from lactate by a newly isolated *Clostridium* sp. BPY₅[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179(3): 361-374
- [63] Liu CL, Huang D, Liu LY, Zhang J, Deng Y, Chen L, Zhang WX, Wu ZY, Fan A, Lai DY, et al. *Clostridium swelfunianum* sp. nov., a novel anaerobic bacterium isolated from the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor production[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 106(4): 817-825
- [64] Xu PX, Chai LJ, Qiu T, Zhang XJ, Lu ZM, Xiao C, Wang ST, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. *Clostridium fermenticellae* sp. nov., isolated from the mud in a fermentation cellar for the production of the Chinese liquor, baijiu[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(3): 859-865
- [65] Liu MK, Tang YM, Zou L, Ren DQ, Yao WC, Tian XH, Yi B, Deng B. Archaea community and diversity in the pit mud of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2013, 39(10): 22-28 (in Chinese)
刘茂柯, 唐玉明, 邹兰, 任道群, 姚万春, 田新惠, 易彬, 邓波. 浓香型白酒窖泥古菌群落结构及其多样性[J]. *食品与发酵工业*, 2013, 39(10): 22-28
- [66] Ding HB, Tan GYA, Wang JY. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(24): 9550-9559
- [67] Wu TF, Xie XL, Chen MB, Zhou L, Chen M, Deng MR, Yao Q, Zhu HH. Research progress on anaerobic fermentation mechanism and high-density anaerobic fermentation of *Clostridium butyrate*[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(1): 222-229 (in Chinese)
吴天福, 谢小林, 陈美标, 周莲, 陈猛, 邓名荣, 姚青, 朱红惠. 丁酸梭菌厌氧发酵机制及高密度厌氧发酵方式研究进展[J]. *食品与机械*, 2020, 36(1): 222-229
- [68] Kim BC, Seung Jeon B, Kim S, Kim H, Um Y, Sang BI. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt_12): 4902-4908
- [69] Gao ZZ, Wu ZY, Zhang WX. 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*, 2020, 9(3): 372
- [70] Samanya M, Yamauchi KE. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(1): 95-104
- [71] Liu YM, Wang YL, Wang WP, Li YB, Wu SK, Liu M, Huang ZG. Screening, identification and metabolites analyses of *Bacillus* in pit mud of Luzhou-flavor baijiu[J]. *China Brewing*, 2017, 36(7): 76-79 (in Chinese)
刘燕梅, 王艳丽, 汪文鹏, 李永博, 吴树坤, 刘梅, 黄治国. 浓香型白酒窖泥中芽孢杆菌的分离鉴定及代谢产物分析[J]. *中国酿造*, 2017, 36(7): 76-79
- [72] Wu WR, Liu FX, Fang SP, Pu SC. Flavor compounds produced by *Paenibacillus* from pit mud in northern Anhui[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(10): 274-279 (in Chinese)
吴文睿, 刘飞翔, 方颂平, 蒲顺昌. 皖北地区窖泥类芽孢杆菌发酵风味物质的研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(10): 274-279
- [73] Zhang R. The influence of lichenysin and aroma-active compounds by *Bacillus licheniformis* in solid-state fermentation on quality of Chinese liquor[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)
张荣. 地衣芽孢杆菌固态发酵产地衣素及风味活性物质对白酒品质的影响[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2014
- [74] Tatara M, Makiuchi T, Ueno Y, Goto M, Sode K. Methanogenesis from acetate and propionate by thermophilic down-flow anaerobic packed-bed reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4786-4795
- [75] Fan H. Research on regulation of volatile fatty acid accumulation by syntrophic propionate-oxidizing consortium during anaerobic digestion process[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese)
凡慧. 丙酸互营氧化菌群对厌氧消化过程中挥发性脂肪

- 酸累积的调控研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2017
- [76] Zhao JH, Zhang B, Cai WM. Research progress on propionic acid accumulation and control in anaerobic digestion system[J]. China Water & Wastewater, 2005, 21(3): 25-27 (in Chinese)
- 赵杰红, 张波, 蔡伟民. 厌氧消化系统中丙酸积累及控制研究进展[J]. 中国给水排水, 2005, 21(3): 25-27
- [77] Zhang YG. The effect of methanogens on the flavor compounds in the pit mud[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- 张应刚. 产甲烷菌对窖泥中香味成分的影响[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2019
- [78] Chai LJ, Qian W, Zhong XZ, Lu ZM, Zhang XJ, Wang ST, Shen CH, Shi JS, Xu ZH. Distribution of archaeal community in the mud pit during strong-flavor baijiu fermentation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(12): 2635-2643 (in Chinese)
- 柴丽娟, 钱玮, 钟小忠, 陆震鸣, 张晓娟, 王松涛, 沈才洪, 史劲松, 许正宏. 浓香型白酒发酵过程中窖内古菌群落分布特征[J]. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2635-2643
- [79] Hatamoto M, Imachi H, Fukayo S, Ohashi A, Harada H. *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(9): 2137-2142
- [80] Zhang CY, Liu XL, Dong XZ. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(3): 969-973
- [81] Xu ZH, Shi JS, Lu ZM, Xiao C, Wang ST. Method for quantitatively analyzing *Clostridia*, *Lactobacilli*, *Bacilli* and *Methanobacteria* in pit mud: CN103834744B[P]. 2016-03-23 (in Chinese)
- 许正宏, 史劲松, 陆震鸣, 肖辰, 王松涛. 窖泥中梭菌, 乳酸菌, 芽孢杆菌, 甲烷菌的定量分析方法: CN103834744B[P]. 2016-03-23
- [82] Xu ZH, Shen CH, Lu ZM, Shi JS, Wang ST, Qian W, Ma J. Method for rapidly preparing man-made pit mud through functional microbial group of high-yield butyric acid and caproic acid: CN105400652B[P]. 2016-03-16 (in Chinese)
- 许正宏, 沈才洪, 陆震鸣, 史劲松, 王松涛, 钱玮, 马箭. 利用高产丁酸和己酸的功能微生物菌群快速制备人工窖泥的方法: CN105400652B[P]. 2016-03-16
- [83] Lu ZM, Shen CH, Xu ZH, Shi JS, Wang ST, Ma J, Qian W. Functional microbial agent for synthesizing caproic acid by degrading lactic acid and application thereof to pit mud curing: CN105385644B[P]. 2016-03-09 (in Chinese)
- 陆震鸣, 沈才洪, 许正宏, 史劲松, 王松涛, 马箭, 钱玮. 降解乳酸合成己酸的功能微生物菌剂及其在窖泥养护中的应用: CN105385644B[P]. 2016-03-09