

晋湘宜, 胡咏梅, 彭楠, 等. 浓香型白酒窖泥己酸菌的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 121-132.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.014

## 浓香型白酒窖泥己酸菌的研究进展

晋湘宜, 胡咏梅, 彭楠, 赵述森

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 浓香型白酒是中国白酒的重要类型之一, 己酸乙酯是浓香型白酒特征风味物质, 该物质合成所需的前体己酸主要依靠发酵过程中的己酸菌代谢生成。己酸菌的分离、鉴定及代谢功能研究已成为白酒品质提升相关领域的研究热点之一。本文综述了窖泥中己酸菌的分离概况, 介绍了浓香型白酒发酵系统中常见的3种己酸菌及己酸的合成途径, 探讨了pH及底物组成对己酸产量的影响; 此外, 介绍了微生物群落中其他微生物对己酸菌的影响, 以期通过探讨浓香型白酒发酵体系中微生物驱动己酸形成的机制及其影响因素, 为提升浓香型白酒品质提供理论基础。

**关键词** 浓香型白酒; 己酸菌; 己酸合成途径; 泥窖固态发酵; 菌株互作

**中图分类号** TS262.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0121-12

白酒是中国独有的蒸馏酒, 白酒产业在国民经济中占据重要地位。国家统计局数据显示, 2022年全国规模以上企业白酒总产量达67.12亿L, 销售收入达6 626.5亿元<sup>[1]</sup>。浓香型、清香型、米香型、酱香型是白酒四大香型, 其中浓香型白酒占据了约50%的市场份额<sup>[2]</sup>。浓香型白酒以粮谷类为原料, 添加中高温大曲作为糖化发酵剂, 经泥窖固态发酵, 蒸馏、储存、勾调而成<sup>[3]</sup>。泥窖固态发酵是浓香型白酒独特的生产工艺, 形成了以己酸乙酯为主体的特征复合香气<sup>[4]</sup>。依据浓香型白酒质量要求(GB/T 10781.1-2021), 己酸及己酸乙酯含量是判定浓香型白酒质量等级的重要理化指标。高度(40%~68%, V/V)优级浓香型白酒在生产后1 a内己酸乙酯含量应不小于1.20 g/L, 生产1 a后己酸与己酸乙酯总和应不小于1.50 g/L<sup>[3]</sup>。

己酸乙酯主要由窖泥中产己酸微生物(统称为“己酸菌”)代谢生成的己酸与酵母代谢生成的乙醇经酯化作用形成。窖泥中己酸菌的丰度及其产己酸能力直接影响着浓香型白酒中己酸及己酸乙酯的含量, 从而影响浓香型白酒的品质<sup>[5]</sup>。对己酸菌进行筛选及研究有助于揭示浓香型白酒特征风味物质的形成机制, 并为浓香型白酒品质提升奠定基础。本文综述了窖泥中己酸菌的分离概况, 并介绍了浓香型

白酒发酵系统中常见的3种己酸菌; 此外, 从己酸的合成途径、pH及底物组成对己酸产量的影响、其他微生物对己酸菌的影响方面总结近期关于己酸菌的研究进展, 以期通过探讨浓香型白酒发酵体系中微生物驱动己酸形成的机制及其影响因素, 为提升浓香型白酒品质提供理论基础。

### 1 窖泥微生物菌群组成

窖泥是浓香型白酒生产中微生物的重要栖息地, 栖息着细菌、酵母、古菌等微生物, 其中以细菌为主<sup>[6]</sup>。研究显示, 窖泥中细菌生物量约为真菌生物量的10 000倍<sup>[7]</sup>。对不同地区、不同年份窖泥的测序结果均显示, 窖泥中细菌以厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidete)微生物为主<sup>[8]</sup>。在属水平上, 窖泥中的优势微生物主要包括梭菌属(*Clostridium*)、产己酸菌属(*Caproiciproducens*)、沉积微生物属(*Sedimentibacter*)、氨基酸杆菌属(*Aminobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)等微生物<sup>[9]</sup>。其中*Clostridium*和*Caproiciproducens*是目前已知窖泥中产己酸的重要微生物, 在窖泥中普遍存在并具有较高的丰度<sup>[10-12]</sup>。Qian等<sup>[7]</sup>证实酒醅与窖泥微生物协同完成有机酸的合成, 酒醅中以*Lactobacillus*为主的微生物主要负责乙酸和乳酸的形成, 窖泥中的梭菌

收稿日期: 2024-06-03

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2021BBA074)

晋湘宜, E-mail: 1813555435@qq.com

通信作者: 赵述森, E-mail: shumiao.zhao@mail.hzau.edu.cn

纲微生物 *Hydrogenispora*, *Sedimentibacter* 和 *Caproiciproducens* 主要负责丁酸及己酸的形成。吴浪涛<sup>[9]</sup>对比研究了江苏洋河酒厂 10 a 及 30 a 窖泥的细菌组成,结果显示,在 30 a 窖龄窖泥中 *Clostridium* 和 *Caproiciproducens* 含量较高。Chai 等<sup>[8]</sup>对四川泸州 30、100、300 a 窖壁泥及窖底泥细菌组成进行检测,结果显示在所有样品中 *Caproiciproducens* 是相对丰度最高的属。在 30 a 窖壁(窖底)泥样品中, *Caproiciproducens* 的相对丰度为 10.0%(15.5%),在 100 a 窖泥中升高至 21.4%(19.5%),在 300 a 窖泥中进一步升高为 43.0%(45.0%)<sup>[8]</sup>。

## 2 窖泥中己酸菌的分离

### 2.1 窖泥中己酸菌的分离概况

20 世纪 60 年代,原轻工业部实施的“茅台试点”工程研究发现,己酸乙酯是茅台酒(采用泥底石窖为发酵容器)的窖底香;随后验证得出己酸乙酯是泸州老窖酒(使用泥窖发酵)的主体风味物质<sup>[3]</sup>。自此,研究人员开展了窖泥样品中己酸菌的分离工作。1975 年,沈怡方<sup>[13]</sup>分离出己酸产量为 7 g/L 的 1 株己酸菌,并证实乙醇、乙酸是该菌株必不可少的营养成分。此后,科研人员广泛采用乙醇作为碳源,在厌氧条件下进行窖泥中己酸菌的分离培养工作<sup>[10, 12-13]</sup>。最初从窖泥中分离得到的几株己酸菌均具有产生芽孢的能力<sup>[13]</sup>。基于这一特性,科研人员在分离时通常采用 80 °C 热处理方式杀灭营养细胞。采用此种方法获得的己酸菌多属于梭菌属,例如克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)、速生梭菌(*Clostridium celerecrecens*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)等<sup>[10, 14-15]</sup>。

随着窖泥微生物分离工作的持续开展和测序技术的发展,对窖泥微生物进行了更深入的研究。研究人员采用葡萄糖、乳酸等作为碳源的培养基对窖泥微生物进行分离,并利用分子生物学方法对菌株进行鉴定,陆续获得了许多新型己酸菌<sup>[16-19]</sup>。目前从窖泥中分离到的以葡萄糖为碳源合成己酸的微生物包括解淀粉己小杆菌(*Caproicibacterium amylolyticum*)LBM18003<sup>T</sup><sup>[18, 20]</sup>、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)a57<sup>[21]</sup>、纺锤芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*)A17<sup>[21]</sup>、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)C78等<sup>[21]</sup>。以乳酸为碳源合成己酸的微生物包括瘤胃菌科(Ruminococcaceae)CPB6<sup>[16]</sup>和解乳酸己小杆菌(*Caproicibacterium lactatifermentans*)LBM19010<sup>T</sup>及 JNU-WLY1368<sup>[22]</sup>。

随着组学技术的兴起,培养组学技术也被用于窖泥微生物的分离。培养组学是一种高通量的方法,通过倍增培养条件来获得更多种类的纯培养菌株<sup>[23]</sup>。Xu 等<sup>[23]</sup>采用多种培养条件结合 16S rRNA 基因测序对窖泥微生物进行了分离和鉴定;试验共使用了 27 种培养条件,主要包括 3 种培养基:普通商业培养基、原始环境培养基以及预测培养基,共分离鉴定出 215 株原核微生物,隶属于 4 个门、41 个属、66 个种以及 19 个潜在新种(表 1)。

### 2.2 窖泥中 3 种常见的己酸菌

1) 梭菌属。目前从窖泥中分离出的己酸菌主要为梭菌属(*Clostridium*)的 *Cl. kluyveri*。*Cl. kluyveri* 最早从淤泥中分离获得<sup>[29-30]</sup>,现已作为利用乙醇合成己酸的模式微生物。*Cl. kluyveri* 通过分解乙醇及短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸)来获得能量,但无法利用葡萄糖、丙酮酸等常见底物<sup>[29]</sup>。酵母提取物对 *Cl. kluyveri* 的生长至关重要,无法被蛋白胨、胰蛋白胨等物质代替<sup>[30]</sup>。

虽然窖泥中分离出的己酸菌多为 *Cl. kluyveri*,但测序结果显示,*Cl. kluyveri* 在窖泥中的相对丰度并不高,很可能并非窖泥中主要的产己酸微生物<sup>[31]</sup>。Wang 等<sup>[32]</sup>对来自安徽、江苏、四川、山东的 40 个窖泥样品 16S rRNA 基因序列进行扩增,将 *Cl. kluyveri* 16S rRNA 基因序列在窖泥样本 ASV 数据集进行检索,结果显示 *Cl. kluyveri* 在窖泥中的丰度较低,仅在 40 份样品中的 29 份里检测到,平均相对丰度为 0.18%。

2) 产己酸菌属。产己酸菌属(*Caproiciproducens*)是 2015 年建立的 1 个新属,目前仅包括 2 个微生物种,分别是 *Ca. galactitolivorans* 和 *Ca. faecalis*,它们的代谢产物均以己酸为主<sup>[33-36]</sup>。*Ca. galactitolivorans* 最早于 2015 年从厌氧污泥中分离并命名,以半乳糖醇为底物代谢生成己酸,经原位萃取发酵己酸产量可达 6.96 g/L<sup>[33, 35-36]</sup>。2023 年,从牛粪便中分离得到 *Ca. faecalis* AGMB10547,利用葡萄糖发酵的最终产物包括乙酸、丙酸和己酸<sup>[34]</sup>。

测序结果显示,*Caproiciproducens* 在窖泥中普遍存在<sup>[37-40]</sup>。2017 年,Liu 等<sup>[2]</sup>利用 Illumina MiSeq 技术探索了泸州老窖 40 a 和 400 a 窖泥微生物群落多样性,首次报道了 *Caproiciproducens* 作为白酒窖泥优势细菌,且在 400 a 窖龄窖泥中相对丰度显著增加。随后,四川、安徽、湖北、河南、河北等地窖泥的测序结果也显示 *Caproiciproducens* 为窖泥中的优势属,且

表 1 窖泥中己酸菌的分离情况

Table 1 The isolation of caproic acid-producing bacteria from pit mud

属名/科名 Genus/family name	菌株名称 Strain name	代谢底物及己酸产量 Substrate and caproic acid production	菌落形态 Colonial morphology	细胞形态 Cell morphology	参考文献 References
梭菌属 <i>Clostridium</i>	<i>Cl. kluyveri</i> JZZ	2% (V/V) 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 己酸产量 4.36 g/L	—	—	[14]
	<i>Cl. kluyveri</i> H588	乙醇 4.046% (V/V), 0.982% 乙酸钠, 初始 pH 6.41, 己酸产量 2.14 g/L	—	—	[24]
	<i>Cl. kluyveri</i> A-3	2% (V/V) 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 37 °C 培养 7 d, 己酸产量 9.77 g/L	白色圆形扁平状, 表面湿润光滑, 边缘较规则	杆状, 有芽孢	[25]
瘤胃菌科 Ruminococaceae	<i>Cl. celerecrescens</i> K-2	2% (V/V) 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 1:3 糟醅浸出液 50%, 35 °C 培养 10 d, 己酸产量 5.47 g/L	白色近透明圆形液滴状有光泽菌落	杆状	[26]
	<i>Cl. celerecrescens</i> E-6	2% (V/V) 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 34 °C 培养 10 d, 己酸产量 9.4 g/L	圆形, 中间凸起, 乳白色菌落	披针状, 有芽孢	[4]
Ruminococaceae	<i>Cl. butyricum</i> GK13	2% (V/V) 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 培养 14 d, 己酸产量 4.97 g/L	—	披针状, 有芽孢	[15]
	Ruminococaceae CPB6	分批补料发酵, 消耗 45.1 g/L 乳酸, 30 °C 培养, 生成 16.6 g/L 己酸	菌落呈白色, 圆形, 直径 1~2 mm	短杆状, 有芽孢	[16]
己小杆菌属 <i>Caproibacterium</i>	Ruminococaceae H2	20 g/L 葡萄糖, 133.2 mmol/L 丁酸钠, 37 °C 培养 96 h, 生成己酸 2.75 g/L	白色, 圆形, 有光泽	短杆状	[17]
	<i>Ca. amyloxyticum</i> LBM18003 <sup>T</sup>	40 g/L 淀粉, 3.66 g/L 丁酸钠, 4.53 g/L 三水合乙酸钠, 37 °C 发酵 48 h, 己酸产量 1.02 g/L	乳白色圆形	短杆状, 有芽孢	[18, 20]
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	<i>Ca. lactatifermentans</i> LBM19010 <sup>T</sup>	15 g/L 乳酸, 0.5% 乙酸钠, 37 °C 发酵 48 h, 己酸产量 8.13 g/L	—	杆状	[22]
	<i>Ca. lactatifermentans</i> JNU-WLX1368	—	—	—	[22]
副球菌属 <i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 11-5	3% 酒尾, 2% 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 厌氧培养 14 d, 己酸产量 1.26 g/L	不规则, 边缘不整齐	短杆状, 有芽孢	[27]
	<i>B. licheniformis</i> a57	25 g/L 葡萄糖, 37 °C 培养, 己酸产量 1.70 g/L	黄色, 不透明, 凸起	梭状, 有芽孢	[21]
棒状杆菌属 <i>Bacillus</i>	副球菌芽孢杆菌 <i>Bacillus paramycooides</i> 5-2	3% 酒尾, 2% 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 厌氧培养 14 d, 己酸产量 1.18 g/L	乳白色, 不透明, 边缘不规则	长杆状, 有芽孢	[27]
	<i>B. fusiformis</i> A17	25 g/L 葡萄糖, 37 °C 培养, 己酸产量 1.04 g/L	边缘浅黄, 中间红, 边缘不规则, 凸起, 表面粘稠	细短杆状, 有芽孢	[21]
棒状杆菌属 <i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> C78	25 g/L 葡萄糖, 37 °C 培养, 己酸产量 2.14 g/L	黄水, 圆形, 扁平, 不透明	粗短杆状, 有芽孢	[21]
	球形赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus sphaericus</i> 2-6	3% 酒尾, 2% 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 厌氧培养 14 d, 己酸产量 1.14 g/L	乳白色, 不透明, 不规则圆形	杆状, 有芽孢	[27]
棒状杆菌属 <i>Lysinibacillus</i>	长形赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus macrolides</i> 3-6	3% 酒尾, 2% 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 厌氧培养 14 d, 己酸产量 1.15 g/L	乳白色, 透明, 不规则圆形	杆状, 有芽孢	[27]
	耐硼赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> 12-1	3% 酒尾, 2% 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 厌氧培养 14 d, 己酸产量 1.03 g/L	乳白色, 透明, 不规则圆形	杆状, 有芽孢	[27]
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	嗜根寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> 8-8	3% 酒尾, 2% 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 厌氧培养 14 d, 己酸产量 1.35 g/L	乳白色, 边缘整齐, 凸起, 湿润	圆形	[27]
	普罗旺斯棒状杆菌 <i>Corynebacterium provincense</i> 3-4	3% 酒尾, 2% 乙醇, 0.5% 乙酸钠, 35 °C 厌氧培养 14 d, 己酸产量 1.8 g/L	圆形, 边缘整齐	长杆状	[27]
拉梅尔氏芽孢杆菌属 <i>Rammetibacillus</i>	<i>Rammetibacillus saccomensis</i> 3B-1	2% (V/V) 乙醇, 1.5% 乙酸钠为底物, 己酸产量 4.63 g/L	菌落较大, 规则, 圆形, 不透明, 具有浅黄色或乳白色的中间凸起	披针状, 有芽孢	[28]

注: -表示文献中未提供。- indicates that it is not provided in the literature.

其相对丰度随窖龄的增加而增加<sup>[37-40]</sup>。Chai等<sup>[8]</sup>对30、100、300 a窖泥原核微生物群落进行研究,结果显示,在窖壁泥和窖底泥中*Caproiciproducens*原核微生物群落的平均相对丰度均随年份的增加而增加。

目前仅有1株分离自窖泥的纯培养菌株*Caproiciproducens* sp. YR-4<sup>[41]</sup>,与*Ca. galactitolivorans*的相似性为97.19%,但其糖发酵产物己酸产量仅为0.06 g/L,该菌是否利用其他物质生成己酸并不清楚。也不清楚窖泥中的*Caproiciproducens*与分离自其他体系的*Ca. galactitolivorans*和*Ca. faecalis*是否具有相同的生长及代谢特性。

虽然窖泥中*Caproiciproducens*纯培养菌株的生长及发酵特性尚不清楚,但已有许多研究通过混菌发酵揭示了*Caproiciproducens*为窖泥中产己酸的重要微生物。Gao等<sup>[42]</sup>将窖泥接种至含有20%(V/V)黄水的培养基(初始pH 5.5)进行传代富集,得到了简化的以*Caproiciproducens*为主的微生物群落。在发酵过程中,微生物消耗黄水中的乳酸,2 d内生成了4.75 g/L的己酸,此时发酵液中*Caproiciproducens*的相对丰度显著增加(平均相对丰度达到50%左右)<sup>[42]</sup>。邓星成等<sup>[43]</sup>使用高粱为原料探究了两步厌氧发酵法生产己酸的工艺,第1步接种己酸菌复合菌液、乳酸菌、酿酒酵母制得丁酸发酵液、乳酸发酵液、乙醇发酵液,第2步将3种发酵液混合接种己酸复合菌液进行己酸发酵;结果显示,当乙醇与乳酸共同作为电子供体,且质量浓度比例为2:1时,己酸产量最高(6.65 g/L)<sup>[43]</sup>。相关性分析显示发酵过程中*Caproiciproducens*与己酸含量呈正相关,且*Caproiciproducens*在发酵过程中不断富集,发酵后期相对丰度达37.81%<sup>[43]</sup>。

虽然目前通过混菌发酵及窖泥测序结果揭示了*Caproiciproducens*为窖泥中合成己酸的重要微生物,但目前关于窖泥中*Caproiciproducens*的认识仍非常有限。因此,需对窖泥中*Caproiciproducens*微生物进一步进行资源挖掘或利用多组学手段进行深入研究。

3) 己小杆菌属。2021年,Gu等<sup>[18,20]</sup>从窖泥中分离出1株可以利用淀粉和葡萄糖产己酸的微生物,全基因组测序结果分析显示该微生物隶属于颤螺菌科(Oscillospiraceae)1个新属、新种,将其命名为解淀粉己小杆菌*Caproicibacterium amylolyticum* LBM18003T。随后,Wang等<sup>[22]</sup>从窖泥中分离出该属的另外1种新型己酸菌*Ca. lactatifermentans*的2

株菌LBM19010<sup>T</sup>及JNU-WLY1368,该物种能够以乳酸和葡萄糖为碳源生产己酸。

分离自窖泥的1株利用乳酸为底物合成己酸的微生物Ruminococcaceae CPB6经比较基因组学鉴定也属于*Ca. lactatifermentans*。菌株间的平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI)显示,Ruminococcaceae CPB6与解乳酸己小杆菌LBM19010<sup>T</sup>、JNU-WLY1368的ANI值分别为98.5%及99.3%(相同物种ANI值95%~96%),3个菌株归属于同一个种<sup>[32]</sup>。菌株CPB6于2017年从窖泥中分离出来,该菌株以含乳酸的废水为原料分批补料发酵,己酸产量可达16.60 g/L<sup>[16,44]</sup>。测序结果显示,以菌株CPB6为代表的微生物在窖泥中广泛存在<sup>[31,32]</sup>。任聪等<sup>[31]</sup>对新、老窖泥差异物种进行了进化分析,发现部分窖泥中可能至少存在3种不同来源的己酸菌,其中与菌株CPB6相似的己酸菌在老窖泥中的相对丰度在6%~75%。Wang等<sup>[32]</sup>对安徽、四川、江苏、山东4个产区窖泥进行16S基因扩增序列鉴定,结果显示40份窖泥中有39份可检测到与菌株CPB6相似的物种,其平均相对丰度为11.4%。2024年,Zeng等<sup>[45]</sup>从窖泥中分离出己小杆菌属又一新种,*Caproicibacterium argilliputei* ZCY20-5。

### 3 己酸的合成途径

目前从窖泥中分离得到的微生物主要利用乙醇、乳酸、葡萄糖合成己酸。己酸的生成主要包括2个连续的过程,电子供体(乙醇、乳酸、葡萄糖)的氧化及逆 $\beta$ 氧化循环过程<sup>[46-47]</sup>(图1)。以乙醇为电子供体时,乙醇在乙醇脱氢酶的作用下转化为乙醛,然后在乙醛脱氢酶的作用下转化乙酰辅酶A。部分乙酰辅酶A被氧化生成乙酸,其余的乙酰辅酶A进入逆 $\beta$ 氧化过程进行碳链的延伸。乙酰辅酶A在硫解酶的作用下自我缩合生成乙酰乙酰辅酶A,随后酮酰辅酶A还原酶利用1分子NADH将其还原为3-羟丁酰辅酶A。3-羟丁酰辅酶A经羟基酰辅酶A脱水酶作用脱去1分子水生成2-丁烯酰基辅酶A,然后在烯丙基辅酶A还原酶作用下还原为丁酰辅酶A。部分丁酰辅酶A与乙酸结合形成丁酸,其余丁酰辅酶A继续与乙酰辅酶A结合生成3-酮基己酰辅酶A,然后通过类似的途径经加氢、脱水、还原生成己酸。

在逆 $\beta$ 氧化循环过程中,微生物通过底物水平磷酸化及电子传递磷酸化的方式合成ATP来提供能量<sup>[47]</sup>。底物水平磷酸化发生于乙酰辅酶A氧化为乙



表2 不同己酸菌的最适 pH  
Table 2 The optimum pH of different  
caproic acid-producing bacteria

菌株名称 Strain name	pH范围(最适 pH) pH (optimum pH)	参考文献 References
<i>Cl. kluyveri</i> K1, K2	6.0~7.5(6.8)	[30]
<i>Cl. kluyveri</i> 3231B	4.88~8.20(7.6)	[57]
<i>Cl. kluyveri</i> A-3	3.0~11.0(7.0)	
<i>R. suwonensis</i> 3B-1	1.0~10.0(7.0)	[28]
Ruminococcaceae CPB6	(5.0~6.5)	[16]
Ruminococcaceae H2	6.0~7.0	[17]
<i>Ca. amylolyticum</i> LBM18003 <sup>T</sup>	4.5~9.5(6.5~7.0)	[18, 20]
<i>Ca. lactatifermentans</i> LBM19010 <sup>T</sup>	4.5~7.5(5.0~5.5)	[22]
<i>Ca. lactatifermentans</i> JNU-WLY1368	4.5~7.0	[22]

#### 4.2 乙醇浓度

目前关于乙醇浓度对微生物产己酸的影响研究较多。乙醇是己酸菌合成己酸的关键底物,浓度低时会影响碳链延伸的效率,浓度高时对微生物存在抑制作用,一般来说,己酸合成的最适乙醇浓度在2%~3%<sup>[25, 54, 58-59]</sup>。崔世亮等<sup>[54]</sup>报道,当乙醇添加量为1%或4%时己酸的产量会减少。Lonkar等<sup>[60]</sup>的研究表明,当乙醇浓度高于40 g/L时,碳链延伸被阻断。

#### 4.3 糖类

浓香型白酒的生产是利用高粱等谷物原料边糖化边发酵的过程,谷物原料经蒸煮糊化后拌曲入窖池密封发酵<sup>[61-63]</sup>。随着发酵过程的进行,酒醅中的淀粉、葡萄糖、乙醇、有机酸等丰富的营养物质渗入窖泥,为窖泥中的微生物补充生长所需的营养成分<sup>[64-65]</sup>。探究不同糖类对己酸菌的影响有助于解析己酸菌在窖池中真实的代谢活动。

戴群等<sup>[66]</sup>对窖泥中分离出的1株克氏梭菌J7进行研究,发现克氏梭菌J7除了可以利用乙醇合成己酸,也可以利用葡萄糖生成少量的己酸。任静等<sup>[67]</sup>在乙醇乙酸钠培养基的基础上额外添加了木糖、蔗糖、葡萄糖等单糖,发现添加一定量的木糖、蔗糖、葡萄糖时,己酸的产量有所提高。王耀等<sup>[68]</sup>在乙醇乙酸钠培养基的基础上额外添加葡萄糖、蔗糖、乳糖和淀粉,发现加入葡萄糖时,己酸的代谢受到了抑制,代谢向丁酸方向进行;而加入蔗糖、乳糖和淀粉可以提高己酸的产量。沈怡芳<sup>[13]</sup>曾指出乙醇乙酸钠培养基中淀粉类物质的加入不利于己酸的生成,反应会向丁酸方向进行。Wang等<sup>[44]</sup>对Ruminococcaceae CPB6的研究发现在乳酸培养基中添加蔗糖可以显

著提高己酸的产量。

Jin等<sup>[69]</sup>对以乙醇为底物合成己酸的*Lacrimispora celerecrescens* JSJ-1(与*C. celerecrescens* E-6为同一个菌株)研究发现:菌株利用葡萄糖、淀粉、蔗糖时生物量增加,但不产己酸;葡萄糖与乙醇共存时,微生物优先利用葡萄糖生成乳酸导致环境酸化(6.45下降至4.68)抑制微生物对乙醇的利用,乳酸被消耗后(与碳酸钙反应及被菌株利用,使pH值回升至5.8)菌株开始利用乙醇,从而使己酸的生成时间延迟。在*Ca. lactatifermentans*中也存在葡萄糖抑制乳酸利用的现象,*Ca. lactatifermentans*经葡萄糖驯化后,会优先利用葡萄糖,而对乳酸的利用不会在葡萄糖耗尽后立刻恢复。分子生物学研究表明,*Ca. lactatifermentans*中葡萄糖通过转录抑制因子LldR负向调节乳酸的利用<sup>[19]</sup>。

#### 4.4 电子受体

电子受体的种类会影响己酸菌产物的组成。San-Valero等<sup>[55]</sup>研究证实,在pH恒定时,乙酸和丁酸共同作为电子供体存在有利于克氏梭菌合成己酸。Wang等<sup>[44]</sup>对以乳酸作为电子供体合成己酸的Ruminococcaceae CPB6进行研究,发现向培养基中添加乙酸钠或丁酸钠有助于细胞生长,提高了己酸产量;并且当丁酸钠作为电子受体时己酸产量和生成速率明显高于乙酸钠作为电子受体;添加丙酸钠作为电子受体时戊酸成为主要产物,同时会生成少量己酸和正庚酸;向培养基中加入戊酸盐和己酸钠都会抑制CPB6的生长,戊酸盐作为电子受体时,生成了少量己酸和庚酸;己酸钠作为电子受体时,培养基中未观察到其他酸的生成。

此外,电子供体与电子受体的比例也会影响己酸的合成。Spirito等<sup>[46]</sup>研究指出己酸的合成在乙醇与乙酸的物质的量比较高时发生。当乙醇与乙酸的物质的量比低于2:1,反应倾向于生成丁酸;当乙醇与乙酸的物质的量比高于2:1,过量的乙醇提供能量以满足丁酸到己酸的延伸。Wang等<sup>[19]</sup>研究发现:不添加乙酸时,*Ca. lactatifermentans*只利用少量的葡萄糖和乳酸;随着乙酸浓度的增加,底物与乙酸的物质的量比小于15时,葡萄糖和乳酸的利用效率提高;乙酸过量时,只产生少量的丁酸和己酸。

### 5 其他微生物对己酸菌的影响

浓香型白酒的酿造是在密闭容器中进行的、多种微生物参与的发酵过程。来自环境及大曲的微生物

物利用原料中的营养成分(发酵后的原料成为酒醅),代谢生成大量的水、乙醇、乙酸、乳酸等物质,这些物质在重力作用下逐渐下沉,溶解了大量还原糖、蛋白质、可溶性淀粉、有机质等,在窖池底部形成一种带有明显酸涩味的棕色粘稠液体,称为黄水<sup>[6, 70-72]</sup>。黄水是连接酒醅及窖泥的枢纽,酒醅及窖泥可以通过黄水进行微生物及与代谢代谢产物的交换<sup>[7]</sup>。Wang等<sup>[73]</sup>对浓香型白酒发酵酒醅原核微生物来源进行追踪,发现窖泥中的厌氧菌不断迁移到酒醅中。Gao等<sup>[42]</sup>试验发现,*Caproiciproducens*、*Caloramator*、*Sedimentibacter*和*Caldicoproacter*等微生物会迁移进入酒醅。酒醅及窖泥这2个体系中的微生物可以通过菌体直接接触或代谢产物接触相互影响。

根据己酸的合成途径不难看出,乙醇、乳酸、葡萄糖等物质作为电子供体,乙酸、丁酸等短链脂肪酸作为电子受体参与己酸的合成<sup>[12]</sup>。而浓香型白酒是多种微生物协同发酵的过程,微生物可以通过底物交换与己酸菌协同作用调节己酸的合成。己酸菌多为厌氧微生物,霉菌、酵母菌等好氧、兼性厌氧微生物的生长可以消耗氧气,也可以为己酸菌提供良好的生长环境,从而促进己酸的合成<sup>[10]</sup>。由于pH是影响己酸菌生长代谢的重要因素,其他微生物也会通过代谢调控微环境的pH影响己酸菌的生长及代谢。例如,窖池中乳酸菌丰度过高时,乳酸菌代谢生产乳酸会引起pH下降,使己酸菌无法进行正常生长代谢<sup>[11]</sup>。此外,部分己酸菌合成己酸受葡萄糖等糖类物质的抑制,其他微生物与己酸菌竞争葡萄糖有助于促进己酸的合成<sup>[68-69, 74]</sup>。

目前已有研究人员通过己酸菌-酵母菌、己酸菌-丁酸菌、己酸菌-放线菌共培养实验探究微生物对己酸合成的影响。

1)酵母菌与己酸菌共培养。酵母菌为浓香型白酒酿造过程酒醅中的优势真菌,在发酵过程中酵母菌会优先生长消耗窖池中的氧气,为窖池中厌氧己酸菌的生长及代谢创造良好的条件。嵇翔等<sup>[75]</sup>将克氏梭菌8022与酿酒酵母共同接种到乙醇乙酸钠培养基进行培养,发现与酿酒酵母共培养降低培养体系中的氧水平,使己酸产量提高了12.5%。

在浓香型白酒酿造过程中,酵母菌代谢生成的乙醇会通过重力作用进入窖泥,从而为己酸菌提供合成己酸的底物。葡萄糖的存在会抑制部分己酸菌合成己酸,酵母菌生长速度较快,可以通过优先利用

葡萄糖促进己酸的合成。在速生梭菌JSJ-1与酿酒酵母的共培养实验中,酿酒酵母通过优先生长缓解葡萄糖对速生梭菌JSJ-1对己酸合成的抑制作用,此外酿酒酵母利用葡萄糖代谢生成的乙醇为己酸的合成提供了底物<sup>[74]</sup>。

2)丁酸菌与己酸菌共培养。丁酸菌是窖泥中重要的产酸微生物,丁酸菌代谢生成的丁酸可以作为底物参与己酸的合成。Kim等<sup>[76]</sup>将1株可产丁酸的酪丁酸梭菌与可产己酸的*Megasphaera hexanoica*分别接种在2个浸没式中空纤维膜生物反应器内,酪丁酸梭菌使用蔗糖为底物生产丁酸,发酵液经膜过滤后通过泵转移到*M. hexanoica*培养基中用于生产己酸,己酸的产量达到10.08 g/L。

丁酸梭菌与葡萄糖抑制产己酸型己酸菌共培养可以促进己酸的合成。陈茂彬等<sup>[77]</sup>研究发现酪丁酸梭菌与速生梭菌JSJ-1共培养时,酪丁酸梭菌可以通过优先利用葡萄糖缓解葡萄糖对JSJ-1己酸合成的抑制作用;此外,酪丁酸梭菌生成的丁酸可以直接参与逆 $\beta$ 氧化反应促进己酸的合成。

3)放线菌与己酸菌共培养。放线菌是一类具有分支状菌丝体的革兰氏阳性菌,代谢产物丰富,在窖泥中有大量放线菌存在<sup>[78]</sup>。郭威等<sup>[79]</sup>研究发现放线菌(*Streptomyces avicenniae* GW01)所产黑色素对己酸菌(*Cl. butyricum* GK15)产己酸具有促进作用。但目前关于窖泥中放线菌的研究相对较少,尚不清楚窖泥中其他放线菌是否可产黑色素及其他放线菌所产黑色素是否对己酸的合成也具有促进作用。

## 6 结语与展望

目前,关于己酸菌的研究主要集中于微生物的筛选、单菌发酵特性研究以及两两共培养探究微生物对己酸菌生长及代谢的影响。浓香型白酒的生产是一个复杂的体系,存在多种营养物质及庞大的微生物群落。窖池中利用乳酸、乙醇、葡萄糖等物质合成己酸的微生物直接影响着己酸的产量。此外,其他微生物也会通过营养竞争、代谢产物交换等方式影响己酸的合成。窖泥中己酸的合成机制相对复杂,要全面了解在窖池中的己酸合成机制,还需要通过多组学技术相结合的手段,深入探究不同营养条件及微生物间的相互作用对己酸合成的影响。在更接近浓香型白酒发酵体系下探究己酸菌与其他微生物之间的相互作用、不同代谢类型己酸菌间的相互

作用有助于解析浓香型白酒发酵过程中己酸的形成机制,为生产过程中己酸的调控提供理论基础。

分离获得纯种微生物菌株是对微生物代谢特性进行研究以及应用的前提。许多基于窖泥的高通量测序结果均显示 *Caproiciproducens* 等属微生物在窖泥中大量存在,并可能在己酸合成方面发挥着重要作用。但目前分离得到的 *Caproiciproducens* 菌株较少,对其了解仍较为欠缺,仍需继续对该属微生物进行分离。笔者所在团队在对窖泥中微生物进行分离的过程中,同样发现许多高通量测序结果显示高丰度存在的微生物却很难从固体培养基上分离得到单菌株,可能由于这类微生物在固体培养基中难以或较晚形成单菌落。在对己酸菌的分离中,可以考虑更多更新的分离手段,如借助流式细胞仪、微流控分选系统等从液体中直接分离获得单细胞或克隆后进行基因组测序,结合生物信息学手段挖掘己酸菌资源。

## 参考文献 References

- [1] QIN D, LV S L, SHEN Y, et al. Decoding the key compounds responsible for the empty cup aroma of soy sauce aroma type Baijiu [J/OL]. *Food chemistry*, 2024, 434: 137466 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137466>.
- [2] LIU M K, TANG Y M, GUO X J, et al. 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.
- [3] 胡景辉, 陈禹琦, 薛新新, 等. 浓香型白酒发展概述 [J]. *中国酿造*, 2022, 41(6): 24-30. HU J H, CHEN Y Q, XUE X X, et al. Overview of development of strong-flavor Baijiu [J]. *China brewing*, 2022, 41(6): 24-30 (in Chinese with English abstract).
- [4] 晋湘宜, 凌荔, 毛豪, 等. 己酸菌的筛选及发酵特性研究 [J]. *酿酒科技*, 2021(10): 106-111. JIN X Y, LING L, MAO H, et al. Screening of a caproic acid-producing bacteria strain and study on its fermentation characteristics [J]. *Liquor-making science & technology*, 2021(10): 106-111 (in Chinese with English abstract).
- [5] GAO J J, LIU G Y, LI A J, et al. Domination of pit mud microbes in the formation of diverse flavour compounds during Chinese strong aroma-type Baijiu fermentation [J/OL]. *LWT*, 2021, 137: 110442 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110442>.
- [6] 陈国伟. 城固酒窖泥微生物区系研究及产己酸细菌的筛选与应用 [D]. 汉中: 陕西理工大学, 2022. CHEN G W. Study on microflora and screening and application of caproic acid-producing bacteria in pit mud of Chenggu Baijiu [D]. Hanzhong: Shaanxi University of Technology, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [7] QIAN W, LU Z M, CHAI L J, et al. Cooperation within the microbial consortia of fermented grains and pit mud drives organic acid synthesis in strong-flavor Baijiu production [J/OL]. *Food research international*, 2021, 147: 110449 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110449>.
- [8] CHAI L J, QIAN W, ZHONG X Z, et al. Mining the factors driving the evolution of the pit mud microbiome under the impact of long-term production of strong-flavor Baijiu [J/OL]. *Applied and environmental microbiology*, 2021, 87(17): e0088521 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1128/AEM.00885-21>.
- [9] 吴浪涛. 浓香型白酒窖泥梭菌的趋化性与代谢特性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2022. WU L T. Chemotaxis and metabolic characteristics of *Clostridium* strains isolated from strong aroma Baijiu pit mud [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [10] 李超, 王金晓, 冯鹏鹏, 等. 己酸菌选育及在浓香型白酒生产中的应用 [J]. *中国酿造*, 2020, 39(8): 1-6. LI C, WANG J X, FENG P P, et al. Breeding of caproic acid-producing bacteria and application in strong-flavor Baijiu production [J]. *China brewing*, 2020, 39(8): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [11] 张晓宇, 郭子贤, 吕育财, 等. 浓香型白酒生态系统中己酸菌研究进展 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(12): 302-308. ZHANG X Y, GUO Z X, LÜ Y C, et al. Research progress of caproic acid-producing bacteria in strong-flavor Baijiu ecosystem [J]. *Food and fermentation industries*, 2021, 47(12): 302-308 (in Chinese with English abstract).
- [12] 张会敏, 邢新会, 王越, 等. 浓香型白酒发酵体系中己酸菌的研究进展 [J]. *食品科学*, 2024, 45(9): 314-321. ZHANG H M, XING X H, WANG Y, et al. Research progress on caproic acid-producing bacteria in Chinese strong-flavor Baijiu fermentation ecosystem [J]. *Food science*, 2024, 45(9): 314-321 (in Chinese with English abstract).
- [13] 沈怡方. 关于己酸菌的培养及其应用 [J]. *酿酒科技*, 1998(4): 15-23. SHEN Y F. On the culture and application of caproic acid bacteria [J]. *Liquor-making science & technology*, 1998(4): 15-23 (in Chinese).
- [14] 程伟, 李娜, 张杰, 等. 金种子优质窖泥高产己酸菌的筛选鉴定及其应用性能分析 [J]. *酿酒科技*, 2020(1): 89-95. CHENG W, LI N, ZHANG J, et al. Screening and identification of a caproic acid bacteria strain from Jinzhongzi high-quality pit mud and analysis of its application performance [J]. *Liquor-making science & technology*, 2020(1): 89-95 (in Chinese).
- [15] 郭艺山, 苏江滨, 陈茂彬. 利用 16s rDNA 测序对 1 株高产己酸菌株的鉴定 [J]. *酿酒*, 2013, 40(4): 72-75. GUO Y S, SU J B, CHEN M B. The identification of an high-yielding caproic acid bacteria by using the 16s rDNA sequences [J]. *Liquor*

- making, 2013, 40 (4) : 72-75 (in Chinese with English abstract).
- [16] ZHU X Y, 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/OL]. *Biotechnology for biofuels*, 2017, 10: 102 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0788-y>.
- [17] 朱晓军. 浓香型白酒窖泥产酸菌群培养及新型己酸合成菌的鉴定与特性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2018. ZHU X J. Culture of acid-producing bacteria in Luzhou-flavor liquor pit mud and identification and characteristics analysis of new caproic acid-producing bacteria[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [18] GU Y, ZHU X J, LIN F, et al. *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/OL]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2021, 71(4): 004789 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004789>.
- [19] WANG H L, ZHOU W C, GAO J J, et al. Revealing the characteristics of glucose- and lactate-based chain elongation for caproate production by *Caproicibacterium lactatifermentans* through transcriptomic, bioenergetic, and regulatory analyses [J/OL]. *mSystems*, 2022, 7 (5) : e0053422 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00534-22>.
- [20] 辜杨. 中国浓香型白酒酿造窖泥微生物多样性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021. GU Y. The characteristics of microbial diversity in pit clay for making Chinese strong aroma-type liquor [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [21] 赵辉, 敞颜, 王葳, 等. 浓香型白酒窖泥中高产己酸兼性厌氧细菌的分离鉴定[J]. *食品科学*, 2012, 33(5): 177-182. ZHAO H, CHANG Y, WANG W, et al. Isolation and identification of facultative anaerobic strains with high yield of hexanoic acid from Luzhou-flavor liquor pit mud[J]. *Food science*, 2012, 33 (5): 177-182 (in Chinese with English abstract).
- [22] WANG H L, GU Y, ZHAO D, et al. *Caproicibacterium lactatifermentans* sp. nov., isolated from pit clay used for the production of Chinese strong aroma-type liquor [J/OL]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2022, 72 (1) : 5206. [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005206>.
- [23] XU J L, SUN L P, XING X, et al. Culturing bacteria from fermentation pit muds of Baijiu with culturomics and amplicon-based metagenomic approaches [J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 1223 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01223>.
- [24] YAN S B, WANG S C, QIU Z F, et al. Optimization of caproic acid production from *Clostridium kluyveri* H588 and its application in Chinese Luzhou-flavor liquor brewing [J]. *Advance journal of food science and technology*, 2015, 7: 614-626.
- [25] 赵晨婕, 刘念, 王超凯, 等. 窖泥高产己酸菌的分离筛选及发酵性能测试[J]. *中国酿造*, 2020, 39(1): 114-118. ZHAO C J, LIU N, WANG C K, et al. Isolation, screening and fermentation performance test of high-yield caproic acid bacteria from pit mud [J]. *China brewing*, 2020, 39(1): 114-118 (in Chinese with English abstract).
- [26] 薛正楷, 薛原. 1株窖泥己酸菌株的多相鉴定及产酸研究[J]. *酿酒科技*, 2016 (6) : 65-71. XUE Z K, XUE Y. Polyphasic identification of a hexanoic acid bacteria strain from the pit mud and study on its acid producing ability [J]. *Liquor-making science & technology*, 2016 (6) : 65-71 (in Chinese with English abstract).
- [27] 张惠芳, 张婉莹, 周索, 等. 陈店老酒窖池中产己酸菌分离鉴定及产酸条件研究[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(2): 188-196. ZHANG H F, ZHANG W Y, ZHOU S, et al. Isolation and screening of caproic acid-producing bacteria from shedian Laojiu cellar and acid production conditions [J]. *Modern food science and technology*, 2023, 39(2) : 188-196 (in Chinese with English abstract).
- [28] LIU C J, DU Y F, ZHENG J, et al. Production of caproic acid by *Rummeliibacillus suwonensis* 3B-1 isolated from the pit mud of strong-flavor Baijiu [J]. *Journal of biotechnology*, 2022, 358: 33-40.
- [29] BORNSTEIN B T, BARKER H A. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri* and the synthesis of fatty acids [J]. *Journal of biological chemistry*, 1948, 172(2) : 659-669.
- [30] BARKER H A, TAHA S M. *Clostridium kluyverii*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol [J]. *Journal of bacteriology*, 1942, 43(3) : 347-363.
- [31] 任聪, 辜杨, 杜海, 等. 基于新老窖泥的微生物菌群结构判定浓香型白酒生产中的主体己酸菌[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44 (12) : 8-14. REN C, GU Y, DU H, et al. Predicting dominant caproate-producing microbes by comparing the microbiotas between new-and aged-pit muds [J]. *Food and fermentation industries*, 2018, 44 (12) : 8-14 (in Chinese with English abstract).
- [32] WANG H L, GU Y, ZHOU W C, et al. Adaptability of a caproate-producing bacterium contributes to its dominance in an anaerobic fermentation system [J/OL]. *Applied and environmental microbiology*, 2021, 87 (20) : e0120321 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1128/AEM.01203-21>.
- [33] KIM B C, SEUNG JEON B, KIM S, et al. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant [J]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2015, 65(Pt12): 4902-4908.
- [34] CHOI J Y, CHO G, PARK J E, et al. *Caproiciproducens faecalis* sp. nov., isolated from Cow Faeces [J/OL]. *Current microbiology*, 2023, 80 (2) : 65 [2024-06-03]. <https://doi.org/>

- 10.1007/s00284-022-03169-w.
- [35] JEON B S, MOON C, KIM B C, et al. *In situ* extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by *Clostridium* sp. BS-1[J]. *Enzyme and microbial technology*, 2013, 53(3): 143-151.
- [36] JEON B S, KIM B C, UM Y, et al. Production of hexanoic acid from *D*-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 88(5): 1161-1167.
- [37] TAN G X, ZHOU R, ZHANG W Q, et al. Detection of viable and total bacterial community in the pit mud of Chinese strong-flavor liquor using propidium monoazide combined with quantitative PCR and 16S rRNA gene sequencing[J/OL]. *Frontiers in microbiology*, 2020, 11: 896[2024-06-03]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00896>.
- [38] ZHANG H M, MENG Y J, WANG Y L, et al. Prokaryotic communities in multidimensional bottom-pit-mud from old and young pits used for the production of Chinese Strong-Flavor Baijiu[J/OL]. *Food chemistry*, 2020, 312: 126084[2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126084>.
- [39] LIU Y B, SUN M X, HOU P, et al. Analysis of microbial community structure and volatile compounds in pit mud used for manufacturing Taorong-type Baijiu based on high-throughput sequencing[J/OL]. *Scientific reports*, 2022, 12(1): 7347[2024-06-03]. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10412-8>.
- [40] CHEN L, LI Y Z, JIN L, et al. Analyzing bacterial community in pit mud of Yibin Baijiu in China using high throughput sequencing[J/OL]. *PeerJ*, 2020, 8: e9122[2024-06-03]. <https://doi.org/10.7717/peerj.9122>.
- [41] 林世刚. 不同碳源组合下窖泥富集液比较及己酸菌的分离、鉴定[D]. 宜宾: 四川轻化工大学, 2022. LIN S G. Comparison of pit mud enrichment solutions under different carbon source combinations and isolation and identification of caproic acid bacteria[D]. Yibing: Sichuan University of Science and Engineering, 2022(in Chinese with English abstract).
- [42] GAO J J, QIN J J, YE F P, et al. Constructing simplified microbial consortia to improve the key flavour compounds during strong aroma-type Baijiu fermentation[J/OL]. *International journal of food microbiology*, 2022, 369: 109594[2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109594>.
- [43] 邓星成, 任志强, 曾波, 等. 高粱两步法厌氧发酵产己酸研究[J]. *食品科学技术学报*, 2024, 42(1): 164-176. DENG X C, REN Z Q, ZENG B, et al. Study on caproic acid production by two-step anaerobic fermentation of *Sorghum*[J]. *Journal of food science and technology*, 2024, 42(1): 164-176(in Chinese with English abstract).
- [44] WANG H, LI X Z, WANG Y, et al. Improvement of *n*-caproic acid production with Ruminococcaceae bacterium CPB6: selection of electron acceptors and carbon sources and optimization of the culture medium[J/OL]. *Microbial cell factories*, 2018, 17(1): 99[2024-06-03]. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0946-3>.
- [45] ZENG C Y, ZENG X, XIA S C, et al. *Caproicibacterium argiliputei* sp. nov., a novel caproic acid producing anaerobic bacterium isolated from pit clay[J/OL]. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2024, 74(1): 06246[2024-06-03]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006246>.
- [46] SPIRITO C M, 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.
- [47] 马鸿志, 武文字, 于子强, 等. 微生物合成己酸的基本原理: 能量代谢及影响因素[J]. *工程科学学报*, 2023, 45(4): 681-692. MA H Z, WU W Y, YU Z Q, et al. Mechanism of caproic acid biosynthesis: energy metabolism and influencing factors[J]. *Chinese journal of engineering*, 2023, 45(4): 681-692(in Chinese with English abstract).
- [48] LU S W, JIN H, WANG Y, et al. Genome-wide transcriptomic analysis of *n*-caproic acid production in Ruminococcaceae bacterium CPB6 with lactate supplementation[J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2021, 31(11): 1533-1544.
- [49] 高小朋, 何猛超, 许可, 等. 工业微生物发酵过程中pH调控研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(6): 93-99. GAO X P, HE M C, XU K, et al. Research progress on pH regulation in the process of industrial microbial fermentation[J]. *China biotechnology*, 2020, 40(6): 93-99(in Chinese with English abstract).
- [50] KRULWICH T A, SACHS G, PADAN E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis[J]. *Nature reviews. microbiology*, 2011, 9(5): 330-343.
- [51] 张宗奇, 姚继承. 己酸菌生长代谢因素与培养应用[J]. *中国食品添加剂*, 2008(S1): 268-272. ZHANG Z Q, YAO J C. The growth ingredient and culture application about the caproic acid bacteria[J]. *China food additives*, 2008(S1): 268-272(in Chinese).
- [52] GILDEMYN S, MOLITOR B, USACK J G, et al. Upgrading syngas fermentation effluent using *Clostridium kluyveri* in a continuous fermentation[J/OL]. *Biotechnology for biofuels*, 2017, 10: 83[2024-06-03]. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0764-6>.
- [53] KENEALY W R, CAO Y, WEIMER P J. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 1995, 44(3/4): 507-513.
- [54] 崔世亮, 杨玉珍, 节秀娟. 己酸菌的选育与应用研究[J]. *酿酒科技*, 2003(4): 38-39. CUI S L, YANG Y Z, JIE X J. Breeding selection of caproic acid bacteria and its application[J]. *Liquor-making science & technology*, 2003(4): 38-39(in Chinese with English abstract).

- [55] SAN-VALERO P, FERNÁNDEZ-NAVEIRA Á, VEIGA M C, et al. Influence of electron acceptors on hexanoic acid production by *Clostridium kluyveri* [J]. Journal of environmental management, 2019, 242: 515-521.
- [56] SAN-VALERO P, ABUBACKAR H N, VEIGA M C, et al. Effect of pH, yeast extract and inorganic carbon on chain elongation for hexanoic acid production [J/OL]. Bioresource technology, 2020, 300: 122659 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122659>.
- [57] WEIMER P J, STEVENSON D M. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2012, 94(2): 461-466.
- [58] 吴根福, 陈佩华. 己酸菌的自然选育及其生物学特性的初步研究 [J]. 杭州大学学报(自然科学版), 1996, 23(3): 269-274. WU G F, CHEN P. Screening of bacteria producing higher content of hexanoic acid and preliminary research on the biological characteristics [J]. Journal of Hangzhou University (nature science), 1996, 23(3): 269-274 (in Chinese with English abstract).
- [59] 刘宏媛, 李春旭, 张锦涛, 等. 津酒老窖泥己酸菌的筛选及培养条件的优化 [J]. 酿酒科技, 2020(1): 42-45. LIU H Y, LI C X, ZHANG J T, et al. Screening of caproic acid bacteria strains from aged pit mud of Jinjiu and optimization of their culture conditions [J]. Liquor-making science & technology, 2020(1): 42-45 (in Chinese with English abstract).
- [60] LONKAR S, FU Z H, HOLTZAPPLE M. Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate [J]. Biotechnology and bioengineering, 2016, 113(12): 2597-2604.
- [61] ZHENG X W, TABRIZI M R, ROBERT NOUT M J, et al. Daqu: a traditional Chinese liquor fermentation starter [J]. Journal of the institute of brewing, 2011, 117(1): 82-90.
- [62] ZHAO J S, ZHENG J, ZHOU R Q, 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.
- [63] ZHANG W X, QIAO Z W, SHIGEMATSU T, et al. Analysis of the bacterial community in Zaopei during production of Chinese Luzhou-flavor liquor [J]. Journal of the institute of brewing, 2005, 111(2): 215-222.
- [64] 张会敏, 王艳丽, 孟雅静, 等. 浓香型白酒新、老窖池池壁泥与池底泥原核菌群结构分析 [J]. 食品科学, 2020, 41(18): 180-187. ZHANG H M, WANG Y L, MENG Y J, et al. Analysis of prokaryotic community structures in bottom and wall muds from old and young pits used for production of strong-flavor Baijiu [J]. Food science, 2020, 41(18): 180-187 (in Chinese with English abstract).
- [65] WANG B W, WU Q, XU Y, et al. Multiple sugars promote microbial interactions in Chinese Baijiu fermentation [J/OL]. LWT, 2021, 138: 110631 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110631>.
- [66] 戴群, 赵光鳌, 王宁波. 己酸菌发酵条件研究 [J]. 南京师范大学学报(工程技术版), 2005, 5(3): 76-78. DAI Q, ZHAO G A, WANG N B. Study on the fermentation of *Cl. kluyveri* [J]. Journal of Nanjing Normal University (engineering and technology), 2005, 5(3): 76-78 (in Chinese with English abstract).
- [67] 任静, 马荣山, 关卫, 等. 窖泥己酸菌产酸能力的研究 [J]. 酿酒, 2006, 33(1): 41-43. REN J, MA R S, GUAN W, et al. Studies on acid-producing ability of cellar mud caproic acid-producing bacteria [J]. Liquor making, 2006, 33(1): 41-43 (in Chinese with English abstract).
- [68] 王耀, 李喆, 甘广东, 等. 窖泥中产酸功能菌筛选及发酵条件初探 [J]. 酿酒, 2015, 42(1): 52-56. WANG Y, LI Z, GAN G D, et al. Screening of acid production functional bacteria in pit mud and preliminary study on fermentation conditions [J]. Liquor making, 2015, 42(1): 52-56 (in Chinese with English abstract).
- [69] JIN X Y, YIN X X, LING L, et al. Adding glucose delays the conversion of ethanol and acetic acid to caproic acid in *Lacrimispora celerecrescens* JSJ-1 [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2023, 107(4): 1453-1463.
- [70] KANG J M, SUN Y T, HUANG X N, et al. Unraveling the microbial compositions, metabolic functions, and antibacterial properties of Huangshui, a byproduct of Baijiu fermentation [J/OL]. Food research international, 2022, 157: 111320 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111320>.
- [71] HUO J Y, WU J H, HUANG M Q, et al. Structural characterization and immuno-stimulating activities of a novel polysaccharide from Huangshui, a byproduct of Chinese Baijiu [J/OL]. Food research international, 2020, 136: 109493 [2024-06-03]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109493>.
- [72] HUO J Y, WU J H, SUN B G, et al. Isolation, purification, structure characterization of a novel glucan from Huangshui, a byproduct of Chinese Baijiu, and its immunomodulatory activity in LPS-stimulated THP-1 cells [J]. International journal of biological macromolecules, 2020, 161: 406-416.
- [73] WANG X S, DU H, XU Y. Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor [J]. International journal of food microbiology, 2017, 244: 27-35.
- [74] 晋湘宜, 赵婷, 王家胜, 等. 共培养时酿酒酵母对速生梭菌己酸代谢的影响及其机理 [J]. 食品科学, 2022, 43(18): 121-126. JIN X Y, ZHAO T, WANG J S, et al. Effect and mechanism of Co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* on the metabolism of caproic acid by *Clostridium celerecrescens* [J]. Food science, 2022, 43(18): 121-126 (in Chinese with English abstract).
- [75] 嵇翔, 徐岩, 穆晓清, 等. 克氏梭菌和酿酒酵母混合培养提高

- 己酸产量[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(9): 922-926. JI X, XU Y, MU X Q, et al. Improvement of caproic acid production in the mixed culture of *Clostridium kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of food science and biotechnology, 2017, 36(9): 922-926 (in Chinese with English abstract).
- [76] KIM H, JEON B S, PANDEY A, et al. New coculture system of *Clostridium* spp. and *Megasphaera hexanoica* using submerged hollow-fiber membrane bioreactors for caproic acid production[J]. Bioresource technology, 2018, 270: 498-503.
- [77] 陈茂彬, 殷想想, 郭志豪, 等. 酪丁酸梭菌共培养对速生梭菌己酸代谢的影响及机理探讨[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 158-164. CHEN M B, YIN X X, GUO Z H, et al. Effect and mechanism of co-culture with *Clostridium tyrobutyricum* on caproic acid mechanism in *Clostridium celerecrescens*[J]. Food science, 2023, 44(10): 158-164 (in Chinese with English abstract).
- [78] 刘茂柯, 唐玉明, 赵珂, 等. 浓香型白酒窖泥放线菌的群落结构及其多样性[J]. 生态学报, 2015, 35(3): 858-864. LIU M K, TANG Y M, ZHAO K, et al. Analysis of *Actinobacteria* community and diversity in the pit mud of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. Acta ecologica sinica, 2015, 35(3): 858-864 (in Chinese with English abstract).
- [79] 郭威, 管健, 陈茂彬, 等. 放线菌促己酸菌产己酸的促进因子探究[J]. 酿酒科技, 2016(10): 48-52. GUO W, GUAN J, CHEN M B, et al. Mechanism of actinomycetes promoting caproic acid bacteria to produce caproic acid[J]. Liquor-making science & technology, 2016(10): 48-52 (in Chinese with English abstract).

## Progress in studying caproic acid-producing bacteria in pit mud of strong-flavor Baijiu

JIN Xiangyi, HU Yongmei, PENG Nan, ZHAO Shumiao

National Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology,  
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Strong-flavor Baijiu is one of the important types of Chinese liquor. The ethyl caproate is the characteristic flavor compound in strong-flavor Baijiu. The precursor caproic acid required for the synthesis of ethyl caproate mainly relies on the metabolism of caproic acid-producing bacteria (CPBs) during the process of fermentation. Studies on the isolation, identification and metabolic functions of CPBs have become one of the hotspots in improving the quality of Baijiu. This article reviewed the isolation of CPBs from pit mud. Three types of CPBs commonly used in the fermentation system of strong-flavor Baijiu and the pathway of synthesizing caproic acid were introduced. The effects of pH and the composition of substrate on the yield of caproic acid were discussed. The impacts of other microorganisms in the microbial community on CPBs were introduced as well. It will provide a theoretical basis for improving the quality of strong-flavor by investigating the mechanism and affecting factors of producing caproic acid driven by microorganisms in the fermentation system of strong-flavor Baijiu.

**Keywords** strong-flavor Baijiu; caproic acid-producing bacteria (CPBs); the pathway of synthesizing caproic acid; solid fermentation in pit mud; interactions between strains

(责任编辑: 张志钰)