

## 浓香型白酒窖泥微生物群落结构及其选育应用研究进展

刘茂柯<sup>1,2,3</sup> 唐玉明<sup>2,3</sup> 赵珂<sup>1</sup> 辜运富<sup>1</sup> 任道群<sup>2,3</sup> 姚万春<sup>2,3</sup>

田新惠<sup>2,3</sup> 刘颖<sup>2,3</sup> 张小平<sup>1\*</sup>

(1. 四川农业大学资源学院 四川 成都 611130)

(2. 四川省农业科学院水稻高粱研究所 四川 德阳 618000)

(3. 四川省泸州市酿酒科学研究所 四川 泸州 646100)

**摘 要:** 窖池发酵是浓香型白酒酿造的工艺特征。窖泥是酒体生香功能微生物的繁殖载体,窖泥微生物对浓香型白酒风味的形成具有重要作用。近年来,我国学者对窖泥微生物展开了一系列理论和实践研究,取得了丰富的研究成果。本文结合文献资料和本课题组研究工作,介绍了窖泥微生物群落结构的多样性及演替、群落结构与窖泥质量的关系、窖泥微生物选育及应用等方面的研究进展,并针对研究存在的问题提出未来研究方向:系统开展窖泥微生物群落结构的差异化研究;进一步发掘窖泥微生物资源,提升功能微生物的应用潜力;深入研究窖泥培养菌剂的作用机理,实现品质控制。

**关键词:** 浓香型白酒, 窖泥, 微生物, 研究进展

## Recent advances in research on the community, isolation, and application of microbes in the pit mud used in manufacture of Chinese Strong-flavor *Baijiu*

LIU Mao-Ke<sup>1,2,3</sup> TANG Yu-Ming<sup>2,3</sup> ZHAO Ke<sup>1</sup> GU Yun-Fu<sup>1</sup> REN Dao-Qun<sup>2,3</sup>  
YAO Wan-Chun<sup>2,3</sup> TIAN Xin-Hui<sup>2,3</sup> LIU Ying<sup>2,3</sup> ZHANG Xiao-Ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Resource, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Institute of Rice and Sorghum Sciences, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Deyang, Sichuan 618000, China)

(3. Institute of Luzhou Liquor Making Science, Luzhou, Sichuan 646100, China)

**Abstract:** Chinese Strong-flavor *Baijiu* (CSFB) is a traditional Chinese fermented beverage with sales accounting for more than 70% of total *Baijiu* consumption in China. CSFB is produced by fermentation of grains in cellars lined with pit mud (PM). This PM, fermented clay, contains large amounts of functional microbes, which are of great importance in determining the production of aromatic compounds in CSFB. Because of this key role, many researches have been conducted in

**Foundation item:** Financial Innovation Ability Promotion Project of Sichuan Province (No. 2016QNJJ-019)

\***Corresponding author:** Tel: 86-835-2882710; E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

**Received:** August 01, 2016; **Accepted:** November 07, 2016; **Published online** (www.cnki.net): November 08, 2016  
基金项目: 四川省财政创新能力提升工程项目(No. 2016QNJJ-019)

\***通讯作者:** Tel: 86-835-2882710; E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

收稿日期: 2016-08-01; 接受日期: 2016-11-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-11-08

recent years to study the effect of PM microbial mechanisms on the CSFB production. In the present paper, we introduced the recent advances in research on the diversity and succession of PM microbial community, the relationship between microbial community structure and PM quality, and the breeding and application of PM functional microbes. Then, the main associated issues were analyzed and the research prospects were put forward. Firstly, the comparative study on PM microbial community structure should be developed to illustrate the relation between microbial community structure and CSFB quality, and improve the PM quality appraisal system. Secondly, the isolation and improvement of functional strains should be enhanced, and the metabolic pathways and its influence mechanism of isolates should be demonstrated to promote the potential application of PM microbes. Finally, the detail affecting function of microbial agents used in the manufacture of artificial PM should be investigated. When the mechanisms of complex microbial agents were demonstrated in the aspects of microbial community structure and metabolism, quality control on the microbial agents could be promoted.

**Keywords:** Strong-flavor *Baijiu*, Pit mud, Microbes, Research progress

浓香型白酒是指以高粱、大米、玉米等粮谷为原料,经固态发酵、蒸馏、陈酿、勾兑而成,具有以己酸乙酯为主体香的白酒<sup>[1]</sup>。因其具有“窖香浓郁、绵甜醇厚、香味协调、回味悠长”的风味特征而深受广大消费者喜爱,年销售额约占我国白酒总量的70%<sup>[1]</sup>。浓香型白酒风味特征的形成与酒体香味物质密切相关。酒体香味物质以酯类为主,并包括酸、醛、缩醛、酮、酚等,它们的含量和比例是影响酒质的直接原因<sup>[2]</sup>。窖池为浓香型白酒生产的特征容器<sup>[3]</sup>,窖泥是酒体生香功能微生物的繁殖载体。窖泥微生物协同发酵为酒体香味物质的形成提供反应底物,为浓香型白酒风味特征的形成奠定了基础<sup>[4]</sup>。

近年来,得益于分子生物学和微生物学等学科的迅速发展,现代分子生物学技术与传统分离培养技术有机结合,成为了研究窖泥微生物的有力武器。相关研究在窖泥微生物群落结构和功能菌株选育及应用等方面取得了丰富的研究进展,极大提升了对浓香型白酒发酵机理的认识水平。本文结合文献资料和本课题组的研究工作,对相关研究取得的主要进展进行总结,并提出未来研究方向,以期对窖泥微生物研究的深入有所帮助。

## 1 窖泥微生物群落结构的研究进展

窖泥微生物群落结构是指窖泥所有微生物种类及遗传变异和生态系统的复杂性总称。揭示窖泥微生物群落结构是发掘功能微生物资源的基础。由

于酿酒生态系统的复杂性,加之绝大多数微生物不可培养<sup>[5]</sup>,近年的报道主要是基于分子生物学研究手段的免培养技术<sup>[5]</sup>,如变性梯度凝胶电泳(Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)<sup>[6-11]</sup>、基因文库<sup>[12-16]</sup>和 Illumina/454 测序<sup>[17-21]</sup>等对窖泥微生物群落结构展开研究。

### 1.1 窖泥微生物群落多样性

**1.1.1 窖泥细菌群落多样性:**细菌是酿造生产的主要参与者。虽然相关研究采用的窖泥样本和技术方法不同,但所报道的细菌群落结构具有明显相似性。真细菌主要分类于硬壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和互养菌门(Synergistetes),优势属有梭菌属(*Clostridium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、互营单胞菌属(*Syntrophomonas*)、*Sedimentibacter*和*Petrimonas*<sup>[6-8,10,17-18,21-23]</sup>。古菌主要分类于广古菌门(Euryarchaeota),优势属为甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷鬃菌属(*Methanosaeta*)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)和甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*)<sup>[8,11,17,22,24]</sup>。此外,Liu等<sup>[9]</sup>从种水平研究优势类群梭菌属的多样性,表明克氏梭菌(*C. kluyveri*)、永达尔梭菌(*C. ljungdahlii*)、*C. ragsdalei*和*C. autoethanogenum*为窖泥细菌基本成员,为菌株选育提供了一个方向。

另一方面,通过比较 Zheng 等<sup>[7]</sup>、Ding 等<sup>[22]</sup>和汤斌等<sup>[12]</sup>的报道看出,不同企业窖泥细菌群落结构可能存在显著差异。如泸州老窖窖泥细菌分类为 8 个科,包括梭菌科(Clostridiaceae)、乳杆菌科(Lactobacillaceae)、互养菌科(Synergistaceae)、鞘氨醇单胞菌科(Sphingomonadaceae)、瘤胃菌科(Ruminococcaceae)、Clostridiales Incertae Sedis XI、Lanchnospiraceae 和 Planococcaceae<sup>[7]</sup>;叙府酒业窖泥细菌归属于 5 个科,包括乳杆菌科、梭菌科、互养菌科、紫单胞菌科(Porphyromonadaceae)和醋杆菌科(Acetobacteraceae)<sup>[22]</sup>;而古井贡酒窖泥细菌仅被精确分类于真杆菌(*Eubacterium*)、梭菌、乳杆菌和互营单胞菌 4 个属<sup>[12]</sup>。虽然研究方法不同可能造成结果出现偏差,但应注意的是,窖泥微生物群落结构差异可能是造成我国浓香型白酒风味多样化的主要原因。近年来,将酿酒微生物用于培养人工窖泥已成为主要的生产实践<sup>[25]</sup>。以上研究提示,系统研究企业间窖泥菌群结构的差异,合理搭配和利用微生物资源是保持产品特色的关键。

**1.1.2 窖泥真菌群落多样性:** 真菌是窖泥微生物的重要组成部分,具有较高生物量<sup>[26]</sup>。但研究显示,窖泥真菌多样性较低,仅分类为威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、毕赤氏酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)、曲霉属(*Aspergillus*)、白地霉属(*Galactomyces*)和地霉属(*Geotrichum*)<sup>[7,22]</sup>。研究者认为,这可能是由于真菌多为好氧微生物,窖池厌氧环境不利于其生长所造成<sup>[7]</sup>。近期,本课题组利用 DGGE 和 Illumina 测序技术研究窖泥 ITS 基因多样性,发现窖泥真菌分类为 111 个属并归于子囊菌门(Ascomycota)、接合菌门(Zygomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota),其中大部分优势属与所报道的酒曲真菌群落一致。重要的是,低龄和百年窖泥优势菌群结构存在显著差异,并且百年窖泥的假丝酵母属丰度显著较高( $P<0.05$ )<sup>[27]</sup>。因此,虽然厌氧环境会抑制真菌生长,但酒曲丰富的真菌资源可维持窖泥真菌群落稳定

发展。窖泥真菌之间、真菌与细菌之间是否存在相互作用以及由此可能对酒质存在的影响值得进一步研究。

## 1.2 窖泥微生物群落的演替

窖泥微生物演替是指随窖龄的推移,窖泥微生物群落和生态环境定向有序的发展过程。演替的主要标志是群落在物种组成上发生了改变。生产实践表明,窖泥越老,其发酵白酒的酒质越好。因此,研究窖泥微生物的演替有利于深入认识酿酒微生物发酵机理,揭示“老窖产好酒”的秘密。

2014 年,Tao 等<sup>[17]</sup>利用 454 测序技术首次系统研究了窖泥细菌在 1–50 年间的演替。该研究将演替分为 3 个阶段:起始驯化期(1 年)、演替期(1–25 年)、成熟期(25 年后)。3 个阶段均以优势菌群和化学成分의 显著变化为特征。结果显示,窖泥 pH、 $\text{NH}_4^+$  和乳酸的含量是影响细菌演替的主要因素。起始驯化期,窖泥富含乳杆菌属,乳酸的积累形成高酸度环境,使适应性低的菌群被淘汰。演替期,窖泥 pH 值随乳杆菌的衰亡和  $\text{NH}_4^+$  含量的增加而上升,细菌多样性增加,拟杆菌门和螺旋体门(Spirochaetes)大量繁殖;有机酸、 $\text{H}_2$  和  $\text{CO}_2$  的含量也有所增加,促进了能促己酸生成的产甲烷菌(Methanogens)的生长。成熟期,细菌群落相对稳定,梭菌属 IV 簇、梭菌科和 Anaerobrancaceae 的丰度提高并与窖泥己酸含量呈显著正相关( $P<0.01$ ),说明它们对己酸乙酯的生成具有积极作用。随后,Guo 等<sup>[19]</sup>的研究显示 50 年后的窖泥细菌群落结构与 Tao 等<sup>[17]</sup>的报道基本一致,但拟杆菌门在 50–440 年仍大量增长,说明演替是非常漫长的过程。以上研究为解释“老窖产好酒”提供了理论基础,为功能菌株的分离提供了有利线索。此前虽有大量关于不同窖龄窖泥微生物群落结构的比较研究,但受样品规模的限制,绝大多数报道未能提供演替的详细信息。

## 1.3 窖泥微生物群落结构与窖泥质量的关系

近年来,并购整合、兼并重组已成为白酒行业发展的主旋律。建立科学的窖泥质量评价体系可为企业在征地拆迁、并购重组、窖池抵押参保等过程

中对窖池价值的客观评估提供依据。长期以来,窖泥质量主要依靠其感官特征和化学成分进行判定<sup>[28]</sup>。近期研究显示,窖泥质量与其菌群结构存在密切联系。Liang 等<sup>[10]</sup>发现正常窖泥细菌 DGGE 的多样性和均匀度均高于退化窖泥;qPCR 结果显示,正常窖泥放线菌门的丰度也显著较高。Hu 等<sup>[20]</sup>利用 Illumina 测序技术对不同质量等级(退化、正常和高质量)窖泥群落及其与环境因子的关系开展系统研究,发现梭菌纲(Clostridia)、拟杆菌纲(Bacteroidia)和产甲烷菌是维持窖泥生态平衡的主要类群,丰度与窖泥质量正相关,较高的 pH 值、 $\text{NH}_4^+$ 和有效磷含量利于它们的生长;乳杆菌属、片球菌属(*Pediococcus*)和链球菌属(*Streptococcus*)的大量繁殖不利于窖泥生态平衡的保持。以上研究展示了不同菌群和窖泥质量存在的潜在联系,将来若能建立不同质量等级窖泥微生物群落丰度的置信区间,将有利于窖泥质量鉴定体系的完善。另外,Tao 等<sup>[17]</sup>和 Hu 等<sup>[20]</sup>的研究均显示,优质窖泥以梭菌纲、拟杆菌门和产甲烷菌为优势菌群,近中性酸度和较高水平的  $\text{NH}_4^+$ 含量利于酿酒有益微生物生长,这对人工窖泥的培养具有指导意义。

## 2 窖泥微生物分离选育及应用研究进展

### 2.1 窖泥微生物的分离选育

浓香型白酒香味成分以酯类,尤其是四大酯(己酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯)为主。其中,己酸乙酯是主体香,其含量是衡量优质品率的关键指标<sup>[1]</sup>。由于酒体酯类物质是在发酵后期由乙醇和酸类经酯化作用生成。所以,根据主要代谢产物与香味成分的关系,窖泥微生物可分为各类产酸菌(己酸、丁酸、乙酸、乳酸等)和酯化菌<sup>[4]</sup>。

近期研究分离的纯培养以己酸菌和丁酸菌为主。因以己酸乙酯的前体为主产物,己酸菌被视为最重要的酿酒功能菌。从 1964 年“茅台试点”至今,有很多关于己酸菌的报道,但几乎均被鉴定为克氏梭菌<sup>[29-30]</sup>。因此,以前的研究普遍认为,己酸主要是以乙醇和乙酸为底物,由梭菌属为核心的菌群催化合成<sup>[1,30]</sup>。近年研究表明,窖泥己酸菌具有丰富

的遗传多样性,集中于芽孢杆菌属、梭菌属和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。高产菌株有 *C. celerecrescens*、克氏梭菌、谰诈梭菌(*C. fallax*)和巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)<sup>[18,31-34]</sup>。其中 *C. celerecrescens* 的己酸产量达 5.47 g/L<sup>[32]</sup>,与本课题组选育的 *Bacillus* sp. LJ-1 相当(GenBank 登录号: KJ786449)<sup>[35]</sup>,极具应用潜力。代谢途径研究方面,Zhu 等<sup>[36]</sup>以窖泥为接种物催化乳酸发酵,提出了己酸合成新机制,即乳酸氧化偶联脂肪酸  $\beta$  氧化逆循环,对窖泥微生物发酵机理作出了重要补充。

丁酸是丁酸乙酯的前体,也是己酸合成的中间产物<sup>[1]</sup>。近年来,窖泥丁酸菌研究逐渐受到学者们的重视<sup>[37-42]</sup>。万朕等<sup>[42]</sup>发现将丁酸菌 BTL-B02 和己酸菌按适当比例混合培养,可使己酸产量提高 50%。胡小红等<sup>[39]</sup>和 Tao 等<sup>[40]</sup>分别报道了能利用乳酸产丁酸的 *Clostridium* sp. BEY8 和 *Clostridium* sp. BPY5。其中 *Clostridium* sp. BEY8 能在 pH 5.5–6.0 条件下,4 d 内将 66.56 mmol/L 乳酸完成转化生成 16.63 mmol/L 丁酸。此外,以上菌株在低 pH 条件下出现的乳酸转化抑制均可通过外加乙酸解除。研究者认为,乙酸可能作为电子受体参与乳酸转化丁酸的过程<sup>[39]</sup>,提示乙酸菌很可能对此代谢过程具有促进作用。因此,系统研究各类功能菌的协同机理、构建稳定的复合菌系将是提升窖泥微生物应用潜力的有效途径。

### 2.2 窖泥微生物的应用

研发以己酸菌为核心的窖泥培养菌剂是窖泥微生物应用研究的热点。窖泥培养菌剂是利用微生物生态学基本原理,将己酸菌在含有糟醅、大曲或窖泥等成分的培养基中富集驯化而制成的复合微生物制剂。将其接种于精心筛选的窖泥原料,可使酿酒有益微生物迅速富集,促进窖泥老熟,提高酒质。此过程称人工窖泥培养<sup>[25]</sup>。如本课题组利用百年窖泥己酸菌 *Bacillus* sp. LJ-1 开发的窖泥培养菌剂和配套技术,使新窖白酒的己酸乙酯含量提高 50%,优质品率提高 6 个百分点<sup>[35,43-45]</sup>。陈翔等<sup>[46]</sup>利用洋河老窖己酸菌 YH-L001 制成复合菌剂,使新窖白酒

优质品率达到 15.21%，出酒率达 35%。此外，吴三多等<sup>[47]</sup>、吴亦波等<sup>[48]</sup>和熊翔等<sup>[49]</sup>学者的研究也取得了良好的效果。除酿酒生产领域，窖泥微生物在化工和农业等领域也具有广泛的应用前景。例如，己酸是生物燃料的合成前体，可作为新兴能源物质。Zhu 等<sup>[36]</sup>以窖泥微生物组催化乳酸实现了己酸的高效合成，积累浓度超 23 g/L，合成率达 2.97 g/(L·d)，极具工业应用潜力。此外，钟正丹等<sup>[50]</sup>分离的乳酸菌具有较高的细菌素产率，能显著抑制致病微生物的生长，为生防制剂的开发奠定了基础。

### 3 窖泥微生物研究方向

进入 21 世纪，白酒产业经历了被誉为“黄金十年”的高速发展期。在此期间，窖泥微生物研究经历了学科的快速融合与生产实践的检验，取得了显著成绩。探讨已有成果及存在问题，明确未来研究方向对于指导我国酿酒微生物的研究和利用具有重要意义。

#### 3.1 系统开展窖泥微生物群落结构的差异化研究

研究显示，窖泥微生物具有丰富的遗传多样性，其群落结构可能因地域、企业、窖龄和质量等不同而存在差异。但由于相关研究大多缺乏窖泥样本的生物学重复，且采用的研究方法不同，本文难以总结出微生物群落差异的具体细节及形成机理。窖泥样本的采集常受客观因素影响。以高龄窖池为例，四川省 50 年以上窖池仅占窖池总量的 5%–10%，且集中于大型名优企业，部分百年窖池如“1573 国宝窖池”还被列入国家级重点文物保护单位。此外，大规模采集窖泥样本是否会影响正常生产也是企业管理者担忧的问题。

然而，酿造工艺的技术创新需要行业参与者共同为之努力。为提高行业整体研究水平，使之成为高端生物技术产业。将来可由政府或名优酒企牵头，组织实施以全面解析基因及其功能多样性为目标的酿酒微生物基因组计划。该计划可针对我国各地具有代表性的名优酒企进行统一采样，系统分析，建立窖泥微生物基因库。通过比较群落的基因组，揭示不同来源窖泥微生物群落的差异及其形成

机理。这有利于阐明窖泥微生物与窖泥质量及酿造酒质间的关系，为人工窖泥配方的优化改良、窖泥质量鉴定体系的完善提供依据，这也是进一步开发窖泥微生物资源的重要途径。

#### 3.2 进一步发掘窖泥微生物资源，提升功能微生物的应用潜力

近年研究报道了许多窖泥微生物新种<sup>[37,51-53]</sup>。分子生物学研究进一步揭示，窖泥存在大量未培养的微生物(Uncultured microorganisms)<sup>[17,22]</sup>，为开发新的生物资源奠定了基础。因此，不断分离高效功能菌是今后研究的重要方向。提高功能菌株分离效率的关键是尽量将培养条件模拟为自然状态，并特异添加生长必需的营养成分，前提是对菌株特性有所了解<sup>[54]</sup>。随着生物信息学的发展，研究者可利用分子生物学技术获得窖泥微生物群落的基因序列，再通过比较基因组学的方法鉴定基因，得到微生物遗传发育和生理功能等信息，为准确设计培养条件提供基础。王保军等<sup>[55]</sup>综述了近年出现的一些新颖独特的环境微生物培养技术和方法，为开发窖泥微生物资源提供了重要的参考资料。此外，改进选育方法构建或改良高效功能菌也是提升窖泥微生物应用前景的有效途径。近年来，我国学者在酿酒微生物诱变选育和基因改良方面取得了一定进展<sup>[56-58]</sup>。如熊俐等<sup>[56]</sup>通过紫外诱变使己酸菌 GS<sub>5</sub> 的己酸产量提高 12%。Chen 等<sup>[57]</sup>利用基因敲除技术构建酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*，该菌在液态和固态发酵中的己酸乙酯产量分别提高 2.97 和 2.80 倍，辛酸乙酯和癸酸乙酯含量明显增加。

值得提出的是，分离选育是获得高效功能菌的主要手段，全面研究菌株代谢产物及其功效则是保证其科学应用的重要前提。研究揭示，菌株代谢产物对酿造生产的影响可能具有两面性。刘博等<sup>[21]</sup>发现，除能产生酯类等酒体香味物质，氨基戊酸梭菌(*C. aminovalericum*)、突那梭菌(*C. ultunense*)和 *C. purinilyticum* 的代谢产物 4-甲基苯酚很可能导致窖泥发臭。这也提示选育改良应对菌株各种功效有所兼顾，全局优化。

### 3.3 深入研究窖泥培养菌剂的作用机理, 实现品质控制

目前, 窖泥培养菌剂研究大多取得了良好的应用效果, 但存在的普遍问题是缺乏对其作用机理的系统研究, 对应用效果的解释仅限于概念性阐述。由于缺少强有力的理论证据支持菌剂质量鉴定标准的制定, 常导致实际生产对培养原料的选用具有随机性。如在规模化生产中, 很可能因为优质老窖泥不足而采用低龄窖泥作替代, 为菌剂功效带来不确定性, 严重阻碍产业化推广。长期以来, 国内外复合菌剂研发面临相同的难点, 即菌株在单独和混合培养条件下的各项参数最佳值均存在较大差异, 并且在混合菌系中, 微生物群落结构及相互作用易受环境因素影响, 从而导致产品功效不稳定<sup>[59]</sup>。相对而言, 要实现窖泥培养菌剂的品质控制更为困难。除己酸菌外, 菌剂配方还包括老窖泥、酒糟和曲药, 此三者本就是庞大的酿酒微生物区系, 其中还蕴藏很多未被发掘、未知功能的微生物。此外, 不同来源窖泥、酒糟<sup>[60]</sup>和曲药<sup>[61]</sup>的微生物群落结构均存在差异, 为菌剂功效的稳定性带来诸多不确定因素。

为构建高效、稳定的窖泥培养菌剂, 将来应加强探索其作用机理, 关键是明确维持菌剂生态平衡和功能效应的主要菌群。由于菌剂微生物主要源于原料, 所以, 品质控制的根本是制定原料质量的鉴定标准。因此, 将来可首先从基因组和代谢组两个方面研究己酸菌、窖泥、酒糟和曲药等原料对菌剂菌群结构和代谢产物的影响, 揭示出质量控制的关键指标, 为进一步优化原料配方奠定基础。

### 参 考 文 献

- [1] Xu Y, Wang D, Fan WL, et al. Traditional Chinese biotechnology[A]//Tsao GT, Ouyang PK, Chen J. Biotechnology in China II[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2010, 122: 189-233
- [2] Fan WL, Qian MC. Characterization of aroma compounds of Chinese "Wuliangye" and "Jiannanchun" liquors by aroma extract dilution analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(7): 2695-2704
- [3] Zheng XF, Han BZ. Baijiu (白酒), Chinese liquor: history, classification and manufacture[J]. Journal of Ethnic Foods, 2016, 3(1): 19-25
- [4] Hou XG, Wang JY, Li XS, et al. The research progress on functional aroma-producing microorganisms in Zaopei and pit mud of Chinese strong-flavor liquor[J]. Microbiology China, 2013, 40(7): 1257-1265 (in Chinese)
- [5] 侯小歌, 王俊英, 李学思, 等. 浓香型白酒糟醅及窖泥产香功能菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1257-1265
- [6] Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, et al. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities[J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15(1): 25-36
- [7] Liang HP, Li WF, Luo QC, et al. 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
- [8] 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
- [9] Ding XF, Wu CD, Zhang LQ, et al. Characterization of eubacterial and archaeal community diversity in the pit mud of Chinese Luzhou-flavour liquor by nested PCR-DGGE[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(2): 605-612
- [10] Liu MK, Zhao K, Tang YM, et al. Analysis of Clostridium cluster I community diversity in pit mud used in manufacture of Chinese Luzhou-flavour liquor[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(3): 995-1000
- [11] Liang HP, Luo QC, Zhang A, et al. Comparison of bacterial community in matured and degenerated pit mud from Chinese Luzhou-flavour liquor distillery in different regions[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2016, 122(1): 48-54
- [12] Liu MK, Tang YM, Zou L, et al. 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)
- [13] 刘茂柯, 唐玉明, 邹兰, 等. 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
- [14] Tang B, Liu JY, Zhou QW, et al. Phylogenetic diversity analysis of bacteria in Gujing-flavor liquor pit mud using culture independent method[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(7): 43-47 (in Chinese)
- [15] 汤斌, 刘金英, 周庆武, 等. 浓香型白酒窖泥中细菌多样性的免培养技术分析[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 43-47
- [16] Wang T, Tian SP, Zhao D, et al. Bacterial diversity of mud samples from fermentation pits of multi-grain strong-flavor liquor factories in Yibin, Sichuan Province, China[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(10): 11-18 (in Chinese)
- [17] 王涛, 田时平, 赵东, 等. 宜宾浓香型白酒窖泥中细菌的系统发育多样性[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(10): 11-18
- [18] Luo QC, Liu CL, Wu ZY, et al. Monitoring of the prokaryotic diversity in pit mud from a Luzhou-flavour liquor distillery and evaluation of two predominant archaea using qPCR assays[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2014, 120(3): 253-261
- [19] Wang MY, Zhang WX. Analysis of microbial community structure in pit mud from two Chinese Luzhou-flavour liquor producing areas[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1498-1506 (in Chinese)
- [20] 王明跃, 张文学. 浓香型白酒两个产区窖泥微生物群落结构分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1498-1506
- [21] Ye GB, Luo HB, Yang XD, et al. 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)
- [22] 叶光斌, 罗惠波, 杨晓东, 等. 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
- [23] 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
- [18] Wang CD, Chen Q, Wang Q, et al. Long-term batch brewing accumulates adaptive microbes, which comprehensively produce more flavorful Chinese liquors[J]. Food Research International, 2014, 62: 894-901
- [19] Guo MY, Huo DQ, Ghai R, et al. Metagenomics of ancient fermentation pits used for the production of Chinese strong-aroma liquor[J]. Genome Announcements, 2014, 2(5): e01045-14
- [20] 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
- [21] Liu B, Du H, Wang XS, et al. Analyze the source of *p*-cresol in strong aroma type Chinese liquor by high-throughput sequencing technology[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 108-117 (in Chinese)  
刘博, 杜海, 王雪山, 等. 基于高通量测序技术解析浓香型白酒中窖泥臭味物质 4-甲基苯酚的来源[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 108-117
- [22] Ding XF, Wu CD, Huang J, et al. Interphase microbial community characteristics in the fermentation cellar of Chinese *Luzhou-flavor* liquor determined by PLFA and DGGE profiles[J]. Food Research International, 2015, 72: 16-24
- [23] Zheng Q, Lin BR, Wang YB, et al. 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
- [24] Wu CD, Ding XF, Huang J, et al. Characterization of archaeal community in *Luzhou-flavour* pit mud[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2015, 121(4): 597-602
- [25] Jing XW, Tang YM, Ren DQ, et al. Development and present research status of manmade pit mud[J]. Liquor-making Science & Technology, 2010(9): 77-80 (in Chinese)  
景晓卫, 唐玉明, 任道群, 等. 人工老窖发展及其研究现状[J]. 酿酒科技, 2010(9): 77-80
- [26] 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
- [27] Liu MK, Tang YM, Zhao K, et al. Determination of the fungal community of pit mud in fermentation cellars for Chinese strong-flavor liquor, using DGGE and Illumina MiSeq sequencing[J]. Food Research International, 2017, 91: 80-87
- [28] 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
- [29] Shen YF. The cultivation and application of caproic acid bacteria[J]. Liquor-making Science & Technology, 1998(4): 15-23 (in Chinese)  
沈怡芳. 关于己酸菌的培养及其应用[J]. 酿酒科技, 1998(4): 15-23
- [30] Ding XS, Zhao H. Research progress in *Clostridium kluyveri*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(15): 401-405 (in Chinese)  
丁雪松, 赵辉. 克鲁氏梭状芽孢杆菌的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(15): 401-405
- [31] Hu XL, Du H, Xu Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 214: 116-122
- [32] Xue ZK, 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)  
薛正楷, 薛原. 一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
- [33] Yang JJ, Tang X, Yang XC, et al. Genetic diversity and phylogeny of caproic acid bacteria in different aged LuzhouLaojiao pit mud[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2015, 33(2): 181-188 (in Chinese)  
杨菁瑾, 唐雪, 杨先超, 等. 泸州老窖不同窖龄窖泥中己酸菌遗传多样性及系统发育[J]. 四川农业大学学报, 2015, 33(2): 181-188
- [34] 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)  
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
- [35] Yao WC, Tang YM, Ren DQ, et al. Screening of quality functional bacteria in pit mud and study of its biological properties[J]. Liquor-making Science & Technology, 2010(11): 33-35 (in Chinese)  
姚万春, 唐玉明, 任道群, 等. 优良窖泥功能菌的筛选及其生物学特性的初步研究[J]. 酿酒科技, 2010(11): 33-35
- [36] 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
- [37] Zhou Y, Zhu XY, Tao Y, et al. Isolation and identification of a new *Lachnospiraceae* bacterium BTY6[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2016, 53(3): 645-651 (in Chinese)  
周艳, 朱晓宇, 陶勇, 等. 一株新的毛螺旋菌-BTY6 的分离与鉴定[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2016, 53(3): 645-651
- [38] Huang D, Liu CL, Zhang WX, et al. Isolation of a H<sub>2</sub>-producing bacterial strain and study on its fermenting characteristics[J]. Liquor-making Science & Technology, 2013(12): 21-24 (in Chinese)  
黄丹, 刘超兰, 张文学, 等. 白酒发酵窖泥中一株产氢细菌的分离及其代谢特性分析[J]. 酿酒科技, 2013(12): 21-24
- [39] Hu XH, Zhou Y, Tao Y, et al. Identification and characterization of a *Clostridium* BEY8 to produce butyrate from lactate[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2016, 53(2): 459-464 (in Chinese)  
胡小红, 周艳, 陶勇, 等. 一株利用乳酸产丁酸梭菌 BEY8 的鉴定及其特性[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2016, 53(2): 459-464
- [40] Tao Y, Hu XH, Zhu XY, et al. Production of butyrate from lactate by a newly isolated *Clostridium* sp. BPY5[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 179(3): 361-374
- [41] Li CR, Wang YS, Xie GP, et al. Complete genome sequence of *Clostridium butyricum* JKY6D1 isolated from the pit mud of a Chinese flavor liquor-making factory[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 220: 23-24
- [42] Wan Z, Li L, Zheng P, et al. Study on isolation & purification and acid-production of butyric acid bacteria[J]. Liquor Making, 2011, 38(1): 26-29 (in Chinese)  
万朕, 李莉, 郑裴, 等. 一株产丁酸菌的分离、纯化及产酸研究[J]. 酿酒, 2011, 38(1): 26-29
- [43] Yao WC, Tang YM, Ren DQ, et al. Cultivation of high quality manmade pit mud and its application[J]. Liquor Making, 2013, 40(6): 43-46 (in Chinese)  
姚万春, 唐玉明, 任道群, 等. 优质人工窖泥的研制与应用[J]. 酿酒, 2013, 40(6): 43-46
- [44] Yao WC, Tang YM, Ren DQ, et al. Research on formula screening of functional man-made pit mud[J]. China Brewing,

- 2014, 33(8): 63-66 (in Chinese)  
姚万春, 唐玉明, 任道群, 等. 功能性人工窖泥培养配方筛选研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(8): 63-66
- [45] Liu M, Yao WC, Tang YM, et al. Culture of functional manmade pit mud and its application[J]. Liquor-making Science & Technology, 2014(6): 80-83 (in Chinese)  
刘森, 姚万春, 唐玉明, 等. 功能性人工窖泥的培养和应用[J]. 酿酒科技, 2014(6): 80-83
- [46] Chen X, Wang YQ, Shao HY. Application of pure and mixed culture technologies for caproic acid bacteria[J]. Liquor Making, 2009, 36(3): 35-37 (in Chinese)  
陈翔, 王亚庆, 邵海燕. 己酸菌纯种培养与混合培养技术在窖泥生产中的应用[J]. 酿酒, 2009, 36(3): 35-37
- [47] Wu SD, Lai DY, Li JX, et al. Pit construction & pit mud culture in Gansu[J]. Liquor-making Science & Technology, 2014(10): 68-71 (in Chinese)  
吴三多, 赖登辉, 李金祥, 等. 甘肃地区窖池的建造与窖泥培养的研究[J]. 酿酒科技, 2014(10): 68-71
- [48] Wu YB, Wang ZH, Fang YJ, et al. Use of modern biotechnology culture pit mud improve the quality of base liquor in new pit rapidly[J]. China Brewing, 2012, 31(5): 172-175 (in Chinese)  
吴亦波, 王振环, 方跃进, 等. 利用现代生物技术科学培养窖泥快速提高新建窖池基酒品质[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 172-175
- [49] Xiong X, Yang ZL, Fang YJ, et al. Application of hyperconcentrated compound caproic acid bacteria liquid in the culture of pit mud in Xiangjiao liquor industry Co.Ltd.[J]. Liquor-making Science & Technology, 2011(9): 62-64 (in Chinese)  
熊翔, 杨志龙, 方跃进, 等. 超浓缩复合己酸菌液在湘窖酒业窖泥培养中的应用[J]. 酿酒科技, 2011(9): 62-64
- [50] Zhong ZD, He YG, Zhao XX, et al. Screening and medium optimization of the bacteria producing lactic acid bacteria (LAB) from pit mud[J]. China Food Additives, 2016(5): 53-59 (in Chinese)  
钟正丹, 何义国, 赵兴秀, 等. 窖泥中产细菌素乳酸菌的筛选及其培养基优化[J]. 中国食品添加剂, 2016(5): 53-59
- [51] Ma KD, Chen XR, Guo X, et al. *Bacillus vini* sp. nov. isolated from alcohol fermentation pit mud[J]. Archives of Microbiology, 2016, 198(6): 559-564
- [52] Chen XR, Shao CB, Wang YW, et al. *Paenibacillusvini* sp. nov., isolated from alcohol fermentation pit mud in Sichuan Province, China[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 107(6): 1429-1436
- [53] Liu CL, Huang D, Liu LY, et al. *Clostridium swellfunianum* 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
- [54] Lan XQ, Zhou ZY. Perspectives on uncultured microorganisms[J]. Microbiology China, 2005, 32(6): 116-119 (in Chinese)  
蓝希钊, 周泽扬. 未培养的微生物研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 116-119
- [55] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [56] Xiong L, Hu Y, Liu J, et al. Research on caproic acid bacteria isolation from fermentation pit mud and its induced mutation breeding[J]. Journal of Sichuan University of Science & Engineering (Natural Science Edition), 2010, 23(3): 324-327 (in Chinese)  
熊俐, 胡洋, 刘俊, 等. 窖泥己酸菌的分离培养与诱变选育[J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2010, 23(3): 324-327
- [57] Chen YF, Li F, Guo J, et al. Enhanced ethyl caproate production of Chinese liquor yeast by overexpressing *EHT1* with deleted *FAA1*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(3): 563-572
- [58] Chen YF, Luo WW, Gong R, et al. Improved ethyl caproate production of Chinese liquor yeast by overexpressing fatty acid synthesis genes with *OPII* deletion[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(9): 1261-1270
- [59] Wen Y, Zhao GZ, Zhou CB, et al. Research progress of microbial agents in ecological engineering[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(20): 6287-6294 (in Chinese)  
文娅, 赵国柱, 周传斌, 等. 生态工程领域微生物菌剂研究进展[J]. 生态学报, 2011, 31(20): 6287-6294
- [60] Sun WN, Xiao HZ, Peng Q, et al. Analysis of bacterial diversity of Chinese Luzhou-flavor liquor brewed in different seasons by Illumina Miseq sequencing[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1293-1301
- [61] Zheng XW, Tabrizi MR, Nout MJR, et al. *Daqu*- a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90