

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250408002

引用格式: 叶青青, 范宏筠, 税梁扬, 等. 浓香型白酒窖泥中己酸菌分离鉴定和混菌代谢分析研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(14): 160–168.

YE QQ, FAN HJ, SHUI LY, *et al.* Isolation and identification of caproate bacteria and metabolic analysis of mixed bacteria in cellar mud of strong-flavor Baijiu [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(14): 160–168. (in Chinese with English abstract).

浓香型白酒窖泥中己酸菌分离鉴定和混菌 代谢分析研究

叶青青^{1,2}, 范宏筠^{1*}, 税梁扬², 周帅², 王浩杰², 张峰华², 李恩浩²

(1. 四川轻化工大学生物工程学院, 宜宾 644000; 2. 泸州国之荣耀酒业有限公司, 泸州 646000)

摘要: **目的** 分析研究浓香型白酒窖泥中己酸菌分离鉴定和混菌代谢。**方法** 本研究以川南某酒厂的窖泥为研究对象。在厌氧工作站中分离和筛选己酸菌试验, 最终获得了 120 株试验菌株。通过菌体形态观察、革兰染色、芽孢染色、生理生化试验分析, 并结合气相色谱-质谱技术和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析技术, 对菌株进行了系统的筛选。**结果** 经过富集和划线筛选, 最终筛选出 8 株目标细菌, 分别命名为 SY1 至 SY8。经进分析鉴定 SY4 株细菌为克鲁维氏梭菌、SY1~SY3 是贝莱森芽孢杆菌、SY5~SY8 暹罗芽孢杆菌, 再将 8 株菌扩培后, 其发酵产物被检测含己酸, 这是种对白酒风味有重要影响的有机酸核心成分。研究表明, 这 8 株菌是浓香型白酒芳香物质骨架中有机酸的核心产生菌。研究发现, SY4 的最佳发酵温度为 34 °C, 初始 pH 为 6.0, 乙醇含量为 2.0%, 发酵时间为 14 d, 接种比例 5.0%, 己酸产量达 10.1 g/L。在混菌发酵中, 紫红曲霉混菌较纯己酸菌发酵液多加检测出 10 种醇类、21 种酯类、9 种酸类、3 种醛类。**结论** 本研究结果不仅为浓香型白酒生产中高产己酸菌株的筛选和混菌发酵协同增香的应用提供了科学依据, 也为白酒挥发型风味物质研发工作提供新方向。

关键词: 浓香型白酒; 己酸菌; 混菌; 代谢分析

Isolation and identification of caproate bacteria and metabolic analysis of mixed bacteria in cellar mud of strong-flavor Baijiu

YE Qing-Qing^{1,2}, FAN Hong-Jun^{1*}, SHUI Liang-Yang², ZHOU Shuai²,
WANG Hao-Jie², ZHANG Feng-Hua², LI En-Hao²

(1. School of Bioengineering, Sichuan Light Chemical Engineering University, Yibin 644000, China;
2. Luzhou Guozhi Glory Wine Co., Ltd., Luzhou 646000, China)

ABSTRACT: Objective To isolation and identification of caproate bacteria and metabolic analysis of mixed

收稿日期: 2025-04-08

基金项目: 四川省重点实验室基金项目(NJ-2022-05)

第一作者: 叶青青(1992—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: 13688328144@qq.com

*通信作者: 范宏筠(1970—), 男, 副教授, 主要研究方向为酿酒工程。E-mail: 491964423@qq.com

bacteria in cellar mud of strong-aroma white wine. **Methods** In this study, cellar mud from a winery in southern Sichuan was used as the research object. In the experiments of isolation and screening of caproic acid bacteria in an anaerobic workstation, 120 experimental strains were finally obtained. These strains were screened using bacterial morphology analysis, gram staining, spore staining, physiological and biochemical tests, gas chromatography-mass spectrometry, and agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction products. **Results** Followed enrichment and streaking screening, 8 target bacteria were selected and designated as SY1 to SY8. Further analysis identified SY4 as *Clostridium kluyverii*, SY1–SY3 as *Bacillus Belesenii*, and SY5–SY8 as *Bacillus siamicus*. Subsequent cultivation revealed that the fermentation products of these 8 strains contained caproic acid, a key organic acid component that significantly influences the flavor of liquor. The results demonstrated that these 8 strains were core producers of organic acids in the aromatic substance skeleton of strong-flavor liquor. Optimal fermentation conditions for SY4 were determined to be 34 °C, initial pH 6.0, ethanol concentration 2%, fermentation time 14 days, inoculation ratio 5%, with a caproic acid yield reaching up to 10.1 g/L. In co-culture fermentation experiments, the co-culture of *Aspergillus fuchsiniensis* produced higher levels of volatile compounds compared to pure caproic acid-producing bacterial fermentation broth, including 10 kinds of alcohols, 21 kinds of esters, 9 kinds of acids and 3 kinds of aldehydes. **Conclusion** These findings not only provide a scientific basis for the screening of high-yield caproic acid-producing strains and the application of co-culture fermentation to enhance the flavor of strong-flavor liquor but also offer new insights into the research and development of volatile flavor compounds in liquor.

KEY WORDS: strong-flavor Baijiu; caproic acid bacteria; mixed bacteria; metabolic analysis

0 引言

白酒文化承载着中国千百年的文化史。不同地域因地理、气候及历史背景的不同,造就了各具特色的白酒文化。在众多香型中,浓香型白酒^[1]作为市场上重要香型之一,以其浓郁香气和绵柔味道深受消费者喜爱。浓香型白酒的酿造以泥窖发酵为核心^[2],窖泥中的微生物菌落通过系统的生化交替的过程,对浓香白酒的微量芳香风味形成起到了决定性的作用。窖泥不仅是浓香型白酒微生物菌群生长繁殖的主要载体,更是白酒独特风味的“发酵室”^[3-4]。在这个微生态系统中,各类微生物如酵母菌、乳酸菌及梭形杆菌等,在厌氧的环境下协同作用,通过其代谢活动不断产生有机酸、酯类、醇类等多种复合的风味物质,此类物质是形成浓香型白酒特有“窖香”的基础。研究显示,窖泥中微生物的菌群结构与丰度直接决定了白酒的风味特性^[5-6]。

窖泥发酵的独特之处在于其封闭的厌氧条件,为研究厌氧微生物提供了理想的自然试验室^[7]。厌氧菌如梭菌在此环境中的代谢活动尤为关键,它们能够在无氧条件下生存并发挥作用,通过分解窖泥中的有机物质,产生系列复杂的、具有生物活性的代谢产物^[8]。这些产物不仅丰富了白酒的风味,还可能对白酒的抗氧化性、口感和芳香持久性有所贡献。因此,深入探究浓香型白酒窖泥中厌氧菌特别是梭菌的生物代谢机制,对于优化白酒的生产工艺、提升产品品质和深化白酒风味理论具有重要的实践意义和科学价值^[9]。通过现代生物技术与分子生物学方法,对这

些微生物及其代谢途径进行系统的分析和鉴定,将进一步揭示其在白酒风味形成中的作用机制,为白酒产业的创新与发展提供科学依据。

己酸菌,属于梭菌科,是窖泥微生态环境中的关键组成部分^[10]。多项研究表明,这类细菌在特定的窖泥样本中扮演着主导角色,对浓香型白酒的窖香形成具有决定性的影响。杨将^[11]发现,己酸菌在酿造过程中所产生的己酸,不仅增强了酒的香气,减少了其刺激性,而且能与酿酒酵母发酵生成的乙醇发生酯化反应,形成己酸乙酯。杜元粉^[12]研究发现该风味物质是浓香型白酒中的非常关键的芳香成分,显著丰富了浓香白酒的绵柔口感,从而直接影响到浓香型白酒的整体风格和品质。舒孟^[13]研究红曲霉混菌协同发酵时提升代谢产物的含量。本次研究以上海生物保藏中心的紫红曲霉菌作为协同菌株。

在白酒生产中,梭菌科的己酸菌因而在窖泥产香细菌群中占据了核心地位。己酸菌通过其发酵液在酿酒的多个关键环节中发挥作用,包括灌窖、窖池维护、人工窖泥的培养及酯化液的制备等^[14],都体现了其作为功能菌的重要性。本研究的混菌发酵体系^[15]通过模拟自然生态系统,构建人工微生物群落,为微生物代谢途径的优化和次级代谢产物的合成提供了新的思路。相比单一菌株培养,混菌发酵能够激活生物合成基因簇,提高代谢产物的种类和产量。因此,深入探索窖泥中的厌氧细菌,特别是己酸菌的生物学特性及其在浓香型白酒生产中的作用,将己酸菌与其他微生物协同发酵,混菌工艺提升对白酒酿造工艺和基酒品质具有重要的科研意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品采集

从泸州石洞某酒厂 10 年窖龄窖池采集窖底泥, 采用传统五点法取样, 用真空式厌氧袋和冰盒迅速运回酿酒技术实验室, 于 4 °C 冰箱保存^[16]。

1.1.2 仪器、试剂与材料

SW-CJ-1G 超净工作台(浙江创舟仪器设备有限公司); PCR-96 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增仪(BBI 生命科学有限公司); G508009 高速微量离心机(中科试验仪器公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一公司); FR980 凝胶成像系统、LC-20A 气相色谱仪(瑞士万通公司); SMA4000 紫外分光光度计(美林恒通公司); 3730XL 测序仪(美国 ABI 公司); HPX-9082MBE 便携式 pH 计(上海博迅实业有限公司); CX31 显微镜(北京 OLYMPUS 公司); LS-100HG 立式内循环蒸汽灭菌锅(沧州拓研试验仪器有限公司); HWS-350 恒温恒湿培养箱(绍兴尚诚仪器有限公司); DHR-21000 台式高速冷冻离心机(澳洲 KEWLAB 公司); FA2004A 高精度电子天平(德力西公司); ZWM-UT1-10 超纯水机(湖南中沃水务环保科技有限公司)。

十二烷基硫酸钠、苯酚(北京陆桥技术股份有限公司); 2-羟基乙醇(西陇科学股份有限公司); MES、L-半胱氨酸盐酸盐(北京奥博星生物技术有限公司); 琼脂糖、无水乙醚、异戊醇、可溶性淀粉(天津市致远化学试剂有限公司); 针式滤膜过滤器(0.22 μm 水系, 天津领航试验设备有限公司); 细菌 DNA 提取试剂(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

紫红曲霉菌株(AS3)保藏于中国上海生物保藏管理中心(CICC, 保藏编号 D11634)。

1.1.3 培养基

富集培养基: MES 0.5 g, 蛋白胨 10.0 g, 牛肉粉 10.0 g, 酵母粉 3.0 g, 葡萄糖 5.0 g, 可溶性淀粉 1.0 g, 氯化钠 5.0 g, 乙酸钠 3.0 g, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 琼脂 0.5 g, 树脂天青(刃天青)3 mg, 超纯水 1000 mL, pH 6.5±0.1, 温度 25 °C。

筛选培养基: 磷酸二氢钾 0.5 g, 硫酸钠 0.2 g, 氯化钠 1 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.2 g, 乳酸钠 3 g, 酵母浸粉 1 g, 琼脂粉 20 g, 蛋白胨 1.5 g, 葡萄糖 0.5 g, 乙酸钠 3 g, 淀粉 5 g, 碳酸氢钠 0.3 g, 碳酸钙(倒平板前加)10 g, 超纯水 1000 mL, pH 6.5±0.1, 温度 25 °C, 1% 溴甲酚蓝 0.1 g^[17]。

扩培培养基(同上筛选培养基液体): 添加 MES(防止过酸的缓冲剂)0.5 g, L-半胱氨酸盐酸盐(抗氧化剂)0.25 g, 刃天青钠盐(厌氧指示剂)0.03 g, 不添加琼脂粉^[18], 温度 25 °C。

紫红曲霉菌种子液培养基: 葡萄糖 60 g、蛋白胨提取粉 20 g, 可溶性淀粉 20 g, 蒸馏水 1000 mL 的比例进行配制, pH 自然, 于 121 °C 灭菌 20 min 备用。

己酸菌种子液培养基: 酵母粉 5 g、蛋白胨 10 g、葡萄糖 5 g、K₂HPO₄ · 12H₂O 5 g、NaCl 0.8 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, 蒸馏水 1000 mL 的比例进行配制, pH 6.8, 于 121 °C 灭菌 20 min 备用。

混菌发酵培养基: 大米粉 7 g, 葡萄糖 50 g, 蛋白胨 9 g, 酵母粉 5 g, MgSO₄ · 7H₂O 1 g, ZnSO₄ · 2H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CaCl₂ 0.1 g, 蒸馏水 1000 mL 的比例进行配制, pH 6.8, 于 121 °C 灭菌 20 min 备用。

1.2 富集与分离纯化

1.2.1 富 集

取酒厂 10 g 窖泥加 100 mL 无菌蒸馏水于无菌锥形瓶中, 使用磁力搅拌器将混合物搅拌 10 min, 使窖泥和蒸馏水充分混合, 形成均匀的悬浮液, 悬浮液在 80 °C 恒温水浴设备中保持 10 min 以杀死非芽孢菌后冷却至常温, 按 0.5% 接种量接种到已除氧灭菌的富集培养基后, 放置于 36 °C 厌氧工作站中富集培养 10 d^[19]。

1.2.2 菌株分离纯化

将富集菌液于 80 °C 恒温水浴处理 10 min 后, 吸取 1 mL 至 9 mL 的无菌水中, 采用稀释平板法依次稀释菌液, 吸取 0.2 mL 涂布至筛选平板培养基上, 在 34 °C 真空厌氧工作站培养 10 d, 挑选有显色反应的菌落, 再通过多次划线法得到纯化菌种。

1.3 菌株形态和生理生化特征分析

1.3.1 菌株的形态

将分离纯化后的菌株放置在 34 °C 恒温厌氧培养箱中继续培养 5 d, 肉眼观察菌体静态形状颜色大小, 取培养后的菌株样本, 进行革兰氏染色和芽孢染色, 制备显微镜观察用的载玻片。在革兰氏染色下, 使用带油镜的光学显微镜观察菌株的形态特征, 记录其形态、排列方式以及染色结果, 确定其革兰氏阳性或阴性特性。在芽孢染色下, 观察菌株芽孢的形成情况, 包括芽孢的数量、位置及大小, 记录芽孢的显微特征^[20]。

1.3.2 生理生化试验

根据《常见细菌与古菌系统分类鉴定手册》文献中关于细菌形态和生理生化反应及鉴定方法, 此次需进行生理生化指标测定包括: 甲基红试验、Voges-Proskauer 试验、接触酶试验(氧化酶试验)、硝酸盐还原试验、淀粉水解试验、乳糖消耗、蔗糖消耗等生理生化试验, 每个生理生化试验重复进行 5 次, 确保结果的准确性和可靠性^[21]。

1.4 菌株的 DNA 基因序列提取、PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳反应

根据 tiangen 细菌基因组 DNA 提取试剂操作步骤, 提取微生物群落 DNA^[22], 利用提取试剂盒提取分离己酸菌株 DNA, 并采用细菌通用引物 27F-1492R 进行扩增, PCR

反应体系^[23]为 20 μL , 体系包括 DNA 0.5 μL , 2xTaq PCR Mastermix 10 μL , PrimerF 0.5 μL , PrimerR 0.5 μL , 双纯水补至 20 μL 。PCR 温度与时间条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min/kb, 循环 30~35 次; 延伸 5 min。扩增产物取 2.5 μL 与吖啶橙荧光染料混合, 用 1% 浓度的琼脂糖凝胶块进行 15 min 电泳试验, 对比 Trans2Kplus DNA Marker, 并用 Quantus Fluorometer (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量^[24]。

1.5 己酸菌株发酵性能的测试

1.5.1 发酵温度对己酸菌产酸的影响

将筛选出的己酸菌种子液按 2% (V/V)、pH 6 的接种量接入到培养基内分别于 30、32、34、36、38 $^{\circ}\text{C}$ 下进行厌氧培养, 己酸菌发酵 14 d 后测定发酵液中的产己酸含量。

1.5.2 pH 对己酸菌产酸的影响

将筛选出的己酸菌种子液按 2% (V/V) 接种量在 34 $^{\circ}\text{C}$ 接入到培养基内, 分别于 pH 5.5、6.0、6.5、7.0 进行厌氧培养, 己酸菌发酵 14 d 后测定发酵液中的产己酸含量。

1.5.3 乙醇对己酸菌产酸的影响

在己酸菌培养基中乙醇的加入量分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的情况下, 各自加入 2% (V/V) 的己酸菌种子液, PH 6.5、34 $^{\circ}\text{C}$ 进行厌氧培养, 己酸菌发酵 14 d 后测定发酵液中的产己酸含量。

1.5.4 接种量对己酸菌产酸的影响

在培养基中己酸菌接种量分别为 2.0%、3.5%、5.0%、6.5%、7.0% (V/V) 的情况下, 发酵液的其他培养条件分别是: pH 6.5、34 $^{\circ}\text{C}$ 、乙醇 2% 进行厌氧培养, 己酸菌发酵 14 d 后测定发酵液中的产己酸含量。

1.6 发酵液己酸成分分析方法

1.6.1 发酵液样品预处理方法

将扩培的发酵液取 20 mL 进行盐酸酸化处理, 加无水乙醇至 50 mL, 在 12000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行冷冻离心 5 min, 取上清液, 吸取上清液, 用一次性针式滤膜过滤器(混合纤维素)0.22 μm 过滤, 混合内标测定(叔戊醇、乙酸戊酯、2-乙基丁酸), 氮吹浓缩至 0.5 mL 于进样瓶中, 取 10 μL 用于气相色谱-质谱技术分析^[25]。

1.6.2 气相色谱分析条件

将样品置于 4 $^{\circ}\text{C}$, 在 12000 r/min 的条件下离心 5 min, 收集上清液。用一次性针式滤膜过滤器(水系混合纤维素)进行 0.22 μm 过滤, 以去除杂质和固体颗粒。

混合标准溶液的配制: 首先, 使用移液枪吸取 100 μL 的丁酸、己酸和 2-乙基丁酸, 加入 60% 乙醇溶液中稀释至 100 mL。然后, 从该溶液中取 2.5 mL, 进一步稀释至 25 mL, 此时丁酸、己酸和 2-乙基丁酸的体积分数均为 0.01%。

内标溶液的配制: 分别吸取适量叔戊醇、乙酸戊酯、2-乙基丁酸标准品 1 mL 于 50 mL 容量瓶中, 用 60% 乙醇

溶液定容至 50 mL, 配制成体积分数为 2% 的内标溶液。

气相色谱条件: 使用日本岛津 DB-WAX 色谱柱(60 m \times 320 μm , 0.25 μm)。进样口温度设置为 240 $^{\circ}\text{C}$, FID 检测器温度设置为 250 $^{\circ}\text{C}$, 载气为高纯度氢气(99.999%), 流速为 1 mL/min, 采取分流进样形式, 分流比设定为 10:1。升温程序为: 初始温度设 40 $^{\circ}\text{C}$, 稳定 4 min; 然后以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度逐步升至 180 $^{\circ}\text{C}$, 180 $^{\circ}\text{C}$ 稳定 2 min, 接着以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升至 230 $^{\circ}\text{C}$, 230 $^{\circ}\text{C}$ 稳定 9 min。

MS 条件: 电离方式 EI; 电子能量 70 eV; 电子倍增器电压: 1086 V; 离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$; 四极杆温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 质谱扫描范围 45~550 m/z 。

1.7 己酸菌与紫红曲霉不同比例混菌发酵方法

按 10⁶ CFU/mL 浓度己酸菌扩培液与 10⁶ CFU/mL 浓度紫红曲霉扩培液于混菌发酵培养基中进行 1:3、1:6、1:9 的比例发酵, 发酵后通过 GS-MS 技术对发酵液挥发成分进行差异分析。

1.8 数据处理

样品处理过程中平行样品测定 3 次, 方法学验证采用 5 次重复验证试验。应用 LC-20A 自带软件工作站及 Office Excel 2019 进行数据处理和谱图处理。

2 结果与分析

2.1 目标菌株的形态和生理生化特征

通过对窖泥微生物富集和分离纯化, 将 120 株试验菌种进行显示反应试验, 观察平板上呈现的菌落形态的基础上, 包括其尺寸、形状、色泽、边缘特征以及表面质感等, 同时综合考虑在特定环境条件下的生物生态特性, 并结合溴甲酚蓝显色剂和革兰氏染色法检测, 最终鉴别出 8 株样本菌株。菌株 SY1~SY8 的表面光滑, 呈隆起状, 菌落淡白色半透明不规则形状, 菌落周边呈淡黄色显色反应。菌株形态详见图 1。SY1 和 SY3 菌株为革兰氏阴性, 其余五株均为革兰氏阳性。见图 2 菌株的显微镜观察, 为番红色的菌株是革兰氏阴性, 其余为紫色的菌株是革兰氏阳性。8 株

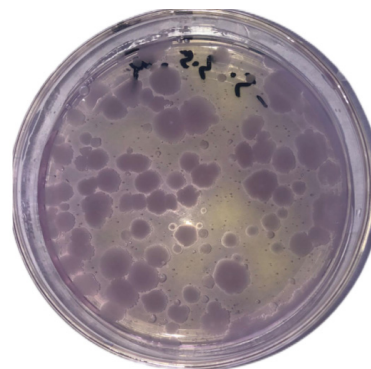


图 1 菌落显色反应图

Fig.1 Color reaction chart of colony

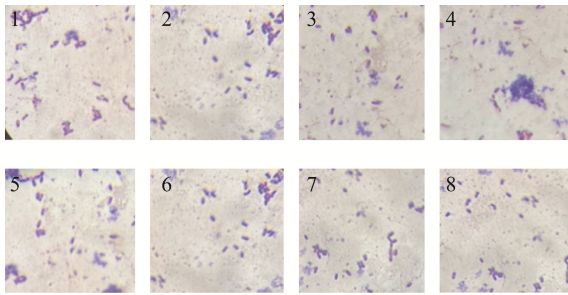


图 2 SY1~SY8 代表性菌株的细菌形态

Fig.2 SY1-SY8 representative strains of bacterial morphology

菌株进行生理生化特性鉴定, SY4 菌株经过 7 项检测均为阳性, 其余菌株只有 6 项指标为阳性, 说明 SY4 菌株生化特性优于其他菌株, 具体结果见表 1。

表 1 菌株生理生化鉴定结果
Table 1 Strain physiological and biochemical identification results

条件	SY1	SY2	SY3	SY4	SY5	SY6	SY7	SY8
甲基红试验	+	+	+	+	+	+	-	+
V-P 试验	+	+	-	+	+	-	+	+
接触酶试验	-	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原试验	+	+	+	+	-	+	+	+
淀粉水解试验	+	+	-	+	+	+	+	+
乳糖利用	+	+	+	+	+	+	+	-
蔗糖利用	+	-	+	+	+	+	+	+

注: +阳性; -阴性。

2.2 16S rDNA 基因 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳分析

窖泥中筛选出的 8 株细菌进行种子液扩培, 将发酵液进行严格的 DNA 提取, 采用天根试剂公司提供的引物 PrimerF 和 R 进行 PCR 扩增试验, 扩增产物接着加入 1% 琼脂糖凝胶样品槽中进行电泳试验^[26], 得到的 8 种菌株的扩增产物琼脂糖凝胶成像图, 见图 3。

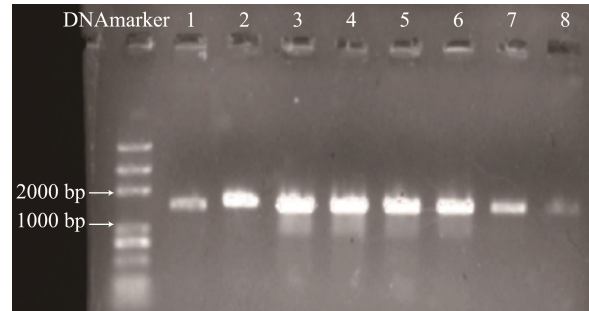


图 3 SY1~SY8 菌琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 SY1-SY8 bacterial agarose gel electrophoresis figure

根据图 3 的展示, 与 Marker 进行比对后, 可以明确 16S rDNA 基因的 PCR 扩增产物片段长度约为 1500 bp, 这与正常条件下预期得到的目标片段长度相符, 因此该片段适宜用于后续的 16S rDNA 测序工作。测序结果将与美国国家生物技术信息中心的 GenBank 数据库进行同源性分析, 进而下载最接近的模式菌株序列, 确定 8 株细菌主要为克鲁维氏梭菌、贝莱森芽孢杆菌和暹罗芽孢杆菌。随后, 利用 MEGA6.0 软件采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育进化树, 优势菌 SY4 菌株相似的属和种详细信息见图 4。

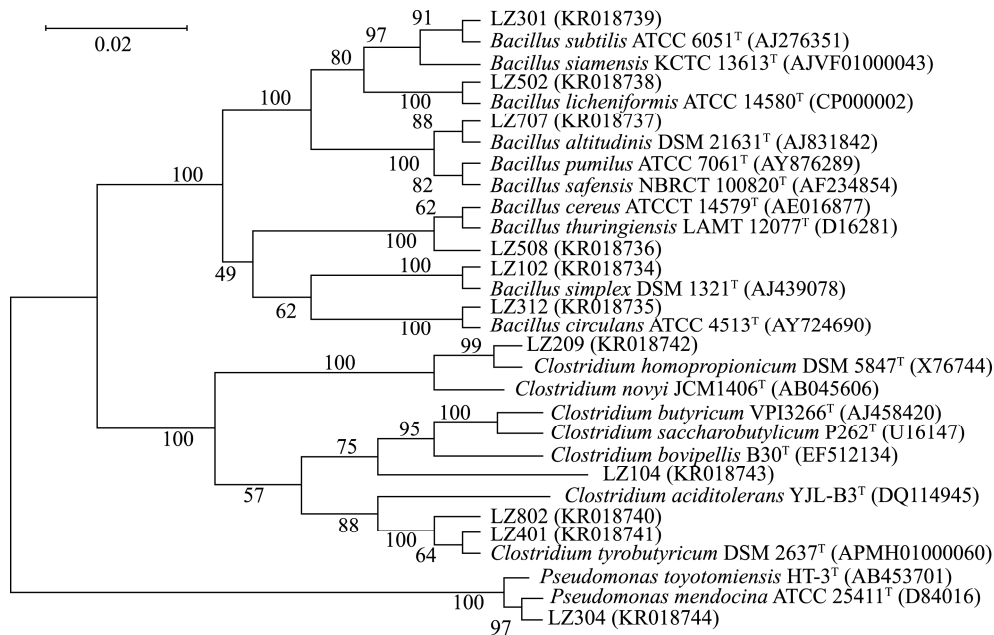


图 4 SY4 系统发育进化树

Fig.4 SY4 phylogenetic evolutionary tree

2.3 菌株发酵性能条件优化

2.3.1 己酸菌生长曲线分析

生长曲线是指以微生物生长量为纵坐标、培养时间为横坐标所绘制的曲线;常用的微生物生长量的测定方法有对微生物数量、重量及群体生理指标的测定^[27]。本研究通过测定 8 株菌体培养物波长 600 nm 值的吸光度值来绘制生长曲线。如图 5 所示,己酸菌 SY4 的生长周期相较于其余 7 株菌更短暂,第 6 d 进去生长期,至第 8 d 结束生长期,进入稳定期,且稳定期的 OD 值较其他菌株更高。此时,菌数浓度和代谢产物均较其他菌株更佳,并且稳定期的持续时间比其他菌株更长,持续了 4 d。在此阶段,时间的延长对于代谢产物的提取尤为有利。在生物发酵行业中,延长稳定期是促进代谢产物富集的关键策略。到第 12 d,吸光度的下降主要是由于发酵液中的底物消耗殆尽,导致部分菌体因缺乏营养而停止生长。

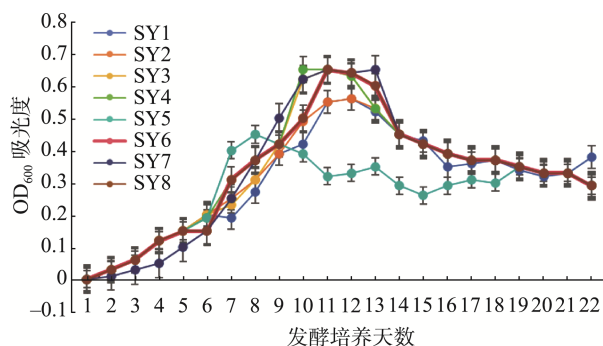


图 5 SY1~SY8 菌株生长曲线
Fig. 5 Growth curve of strain SY1-SY8

2.3.2 发酵温度对己酸菌产酸的影响

如图 6 所示,8 株菌按接种量为 8% (V/V)且 pH 为 6 的情况下,在 30~38 °C 区间均生成己酸,己酸的含量随温度的升高先呈上升后下降;SY1、SY3、SY4、SY5、SY7 菌株 34 °C 时己酸代谢最旺盛,依次为 6.9、4.2、8.4、8.1、8.2 g/L,温度超 36 °C 后己酸菌产酸与温度呈负相关;SY2、SY6、SY8 最佳发酵温度为 36 °C,产量依次是 5.4、7.3、7.4 g/L。

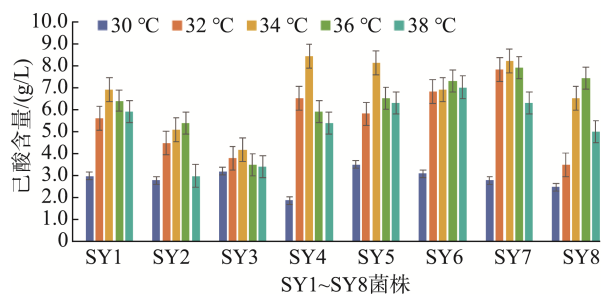


图 6 温度对己酸菌产己酸的影响
Fig. 6 Effects of temperature on the production of caproic acid by strains

2.3.3 pH 对己酸菌产酸的影响

如图 7 所示,8 株菌按接种量为 5% (V/V)且在温度 34 °C 情况下 pH 5.0~7.0 范围内均可产己酸,己酸的产量随 PH 的升高先上升后下降,pH 为 7 时菌株产酸均受到抑制;SY1、SY2、SY3、SY6、SY7、SY8 菌株 pH 6.5 时己酸产量最高,依次是为 6.4、5.1、6.1、7.3、4.1、7.4 g/L,SY4、SY5 最佳发酵 pH 为 6.0,产量依次是 9.4 g/L、5.9 g/L。

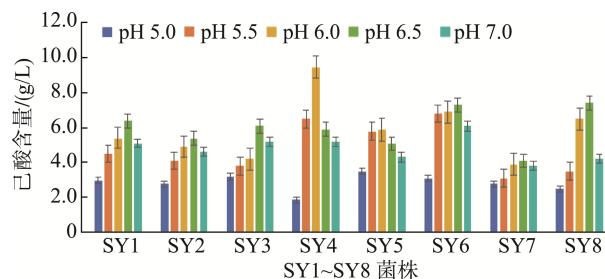


图 7 PH 对己酸菌产己酸的影响
Fig. 7 Effects of pH on the production of caproic acid by strains

2.3.4 乙醇对己酸菌产酸的影响

如图 8 所示,8 株菌按接种量为 5% (V/V)且在温度 34 °C 情况下 pH 6.0,随乙醇的含量升高己酸的产量先上升后下降,乙醇过高菌株产酸均受到抑制;SY1、SY2、SY4、SY6、SY7、SY8 菌株在乙醇含量 2.0% 时己酸产量最高,依次是为 6.1、6.5、10.1、7.4、4.6、6.1 g/L,乙醇浓度上升到 2.5%,己酸产量有所下降;SY5 最佳发酵乙醇含量为 1.5%,产量是 8.1 g/L,乙醇浓度继续上升后,己酸浓度下降。乙醇作为己酸生成的主要碳源之一,能够有效促进其代谢途径的进行,从而提高己酸的合成速率。因此,己酸的产量随着乙醇添加量的增多而逐渐增加,表明乙醇的添加对提高己酸产量具有显著的促进作用。乙醇添加量大于 2.5% 时,由于乙醇对细菌具有毒理反应,浓度过高会影响己酸菌代谢活动,因此己酸产量会因乙醇添加量呈负相关^[28]。

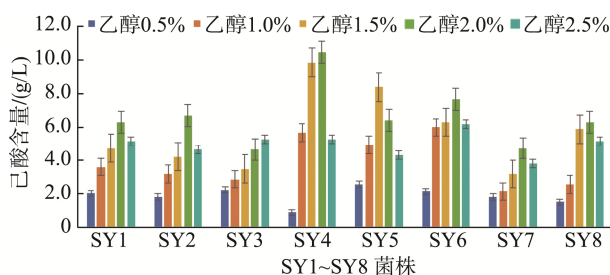


图 8 乙醇含量对己酸菌产己酸的影响
Fig. 8 Effects of ethanol content on the production of caproic acid by strains

2.3.5 接种量对己酸菌产酸的影响

如图 9 所示,8 株菌按接种量为 2.0%、3.5%、5.0%、6.5%、8.0% (V/V)且在温度 34 °C 情况下 pH 6.0,随接种量升高己酸的产量先上升后下降,接种量过大菌群相互争夺发酵液底物,代谢产物转换会受到抑制;SY1、SY2、SY3、

SY6、SY7、SY8 菌株在接种量 6.5%时己酸产量最高，依次是为 6.2、6.6、4.6、7.5、4.7、6.2 g/L，接种量上升到 8.0%，己酸产量有所下降；SY4 和 SY5 最佳发酵接种量为 5.0%，产量是 9.9 g/L 和 8.1 g/L，接种量继续上升后，己酸浓度下降。在接种量为 2.0%时，菌群总量较低，导致合成己酸所需的微生物数量不足。因此，随着接种量的增加，微生物数量得到提升，进而促进了己酸的合成，导致己酸产量随接种量的增加而增加。接种量通常认为是影响微生物发酵工艺的基本研究条件，影响微生物生长速率的基本因素，适当的增大接种量对加快代谢产物累积是有利的^[29]。SY4~SY5 接种量等于 6.5%时，会抑制己酸菌的生长和代谢，但在 8.0%时，有短暂的回升。

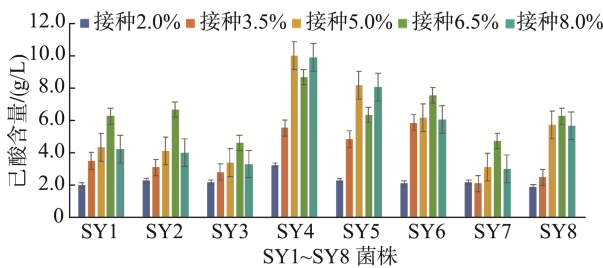


图 9 接种量对己酸菌产己酸的影响
Fig.9 Effects of inoculum size on the production of caproic acid by the strain

2.4 气相色谱-质谱技术数据结合聚类热图分析发酵成分

通过气相色谱-质谱技术对纯己酸菌发酵液和混菌发酵 1:3、1:6、1:9 进行挥发性成分测定，纯己酸发酵液检测出醇类 20 种，酯类 17 种，酸类 10 种，醛类 3 种，酚类 3 种，混菌发酵液共检测出挥发性成分 96 种，其中醇类 30 种，酯类 38 种，酸类 19 种，醛类 6 种，酚类 3 种。紫红曲霉混菌较纯己酸菌发酵液多检测出的 10 种醇类，21 种酯类，9 种酸类，3 种醛类，如图 10。

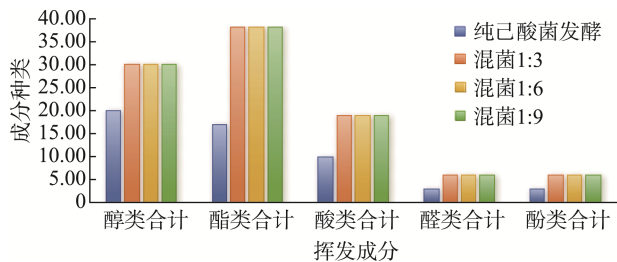


图 10 纯己酸与混菌发酵的挥发成分种类差异分析
Fig.10 Difference analysis of volatile components in fermentation between pure caproic acid and mixed bacteria

为了更加直观清晰地分析 4 组试验，样品中特征挥发性风味物质的变化，根据每类挥发性特征物质成分的生产生成热图，如图 11。混菌发酵 1:9 中挥发性化合物如己酸、己酸乙酯等产量为最佳状态^[30]。

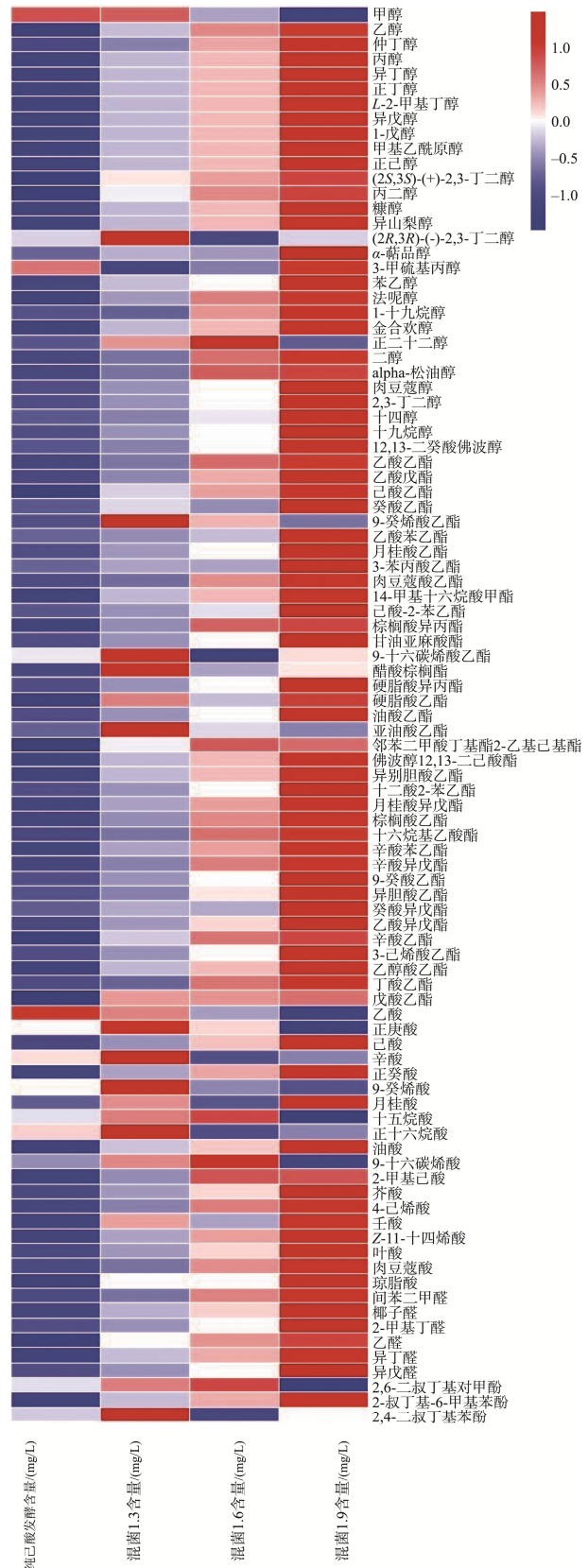


图 11 挥发性成分热图
Fig.11 Heat map of the volatile component clustering

3 结 论

研究通过对窖泥中微生物的富集与连续传代培养, 结合生物技术手段分析己酸菌发酵性能, 揭示了己酸菌液培养过程中的动态变化规律。通过己酸菌单因素发酵试验研究, 结果显示, SY4 菌株具有极佳的代谢性能, 最优发酵条件是温度 34 °C、pH 6、乙醇含量 2.0% 时, 接种 5.0%, 己酸产值到达 10.1 g/L。将优质菌株 SY4 与上海生物所保藏菌 AS3 混菌发酵, 通过气相色谱-质谱技术数据结合热图分析混菌发酵代谢成分, 紫红曲霉混菌较纯己酸菌发酵液多检测出 10 种醇类, 21 种酯类, 9 种酸类, 3 种醛类, 酚类物质种类未增加, 混菌 1:9 时发酵液中己酸和己酸乙酯等芳香物质的产量为最高, 说明本次筛选的己酸菌和紫红曲霉混菌发酵对浓香白酒的风味的提升有正相关意义。

参考文献

- [1] 戴景辉. 白酒香型与风格初探[J]. 酿酒, 2000(2): 29-31.
DAI JH. Preliminary study on the flavor and style of liquor [J]. Winemaking, 2000(2): 29-31.
- [2] 吴树坤, 穆敏敏, 杨磊. 浓香型白酒窖泥微生物群落及其养护技术研究进展[J]. 中国酿造, 2024, 43(11): 8-12.
WU SK, MU MM, YANG L. Research progress on microbial community and maintenance technology of strong-flavor liquor cellar mud [J]. China Brewing, 2024, 43(11): 8-12.
- [3] 高月明. 黑龙江省浓香型白酒的生产回顾与展望[J]. 酿酒, 1989(2): 13-16.
GAO YM. Review and prospect of strong-flavor liquor production in Heilongjiang Province [J]. Winemaking, 1989(2): 13-16.
- [4] 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, 2015.
HU XL. Study on the relationship between *Clostridium* community diversity and quality of strong-flavor liquor cellar mud [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [5] QIAN W, CHUAN DW, CHENG-HOU L, *et al.* *Clostridium luticellarii* sp. nov., isolated from a mud cellar used for producing strong aromatic liquors [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(12): 4730-4733.
- [6] 杜礼泉, 饶家权, 唐聪, 等. 窖泥功能菌液在窖泥养护中的应用[J]. 酿酒, 2019, 46(1): 61-64.
DU LQ, RAO JQ, TANG C, *et al.* Application of functional bacteria solution of cellar mud in the maintenance of cellar mud [J]. Wine, 2019, 46(1): 61-64.
- [7] WEI Q, ZHEN ML, LI JC, *et al.* Cooperation within the microbial consortia of fermented grains and pit mud drives organic acid synthesis in strong-flavor Baijiu production [J]. Food Research International, 2021, 147: 110449.
- [8] REN D, LIU S, QIN H, *et al.* Metagenomics-based insights into the microbial community dynamics and flavor development potentiality of artificial and natural pitmud [J]. Food Microbiology, 2025, 125: 1046463-104646.
- [9] JIANG JG, GUO YL, AN JL, *et al.* Domination of pit mud microbes in the formation of diverse flavour compounds during Chinese strong aroma-type Baijiu fermentation [J]. LWT, 2020(prepublish): 110-442.
- [10] 叶光斌, 夏尚超, 宗绪岩, 等. 窖泥微生物的分离、鉴定和己酸菌代谢产物的初步分析[J]. 中国酿造, 2024, 43(9): 85-91.
YE GB, XIA SC, ZONG XY, *et al.* Isolation and identification of microorganisms from pit mud and preliminary analysis of metabolites of caproic acid bacteria [J]. China Brewing, 2024, 43(9): 85-91.
- [11] 杨将, 徐敬征, 张顺和, 等. 窖池高产己酸菌营养液的制备及培养条件优化[J]. 酿酒科技, 2023(7): 17-21.
YANG J, XU JZ, ZHANG SH, *et al.* Pits high caproic acid bacteria preparation and culture conditions of nutrient optimization [J]. Journal of Brewing Technology, 2023(7): 17-21.
- [12] 杜元粉. 窖泥高产己酸菌株的筛选及代谢功能解析[D]. 自贡: 四川轻化工大学, 2021.
DU YF. Screening and metabolic function analysis of high caproic acid producing strain in pit mud [D]. Zigong: Sichuan Light Chemical Technology University, 2021.
- [13] 舒孟. 乳酸菌-红曲霉混菌发酵体系的建立及其机制研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2023.
SHU M. Establishment and mechanism of *Lactobacillus monaspergillus* co-culture system [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2023.
- [14] 殷想想, 王欣蕊, 冯文聪, 等. 己酸菌的筛选及其在浓香型白酒生产中应用的研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(9): 14-18.
YIN XX, WANG XR, FENG WC, *et al.* Research progress on screening of caproic acid bacteria and its application in production of strong-flavor liquor [J]. China Brewing, 2023, 42(9): 14-18.
- [15] 郑梦妮, 常雨薇, 樊博源, 等. 酿酒酵母与有孢汉逊酵母混菌发酵葡萄酒的氨基酸利用与产香特性[J/OL]. 食品工业科技, 1-12. [2025-06-19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025010182>
ZHENG MG, CHANG YW, FAN BY, *et al.* Amino acid utilization and aroma production characteristics of wine fermented by Coculture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula sporolyticus* [J/OL]. Science and Technology of Food Industry, 1-12. [2025-06-19]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2025010182>
- [16] 冯文聪, 陈继威, 夏博宇, 等. 产己酸微生物筛选及其在浓香型白酒窖泥养护中的应用研究[J]. 中国酿造, 2024, 43(11): 41-45.
FENG WC, CHEN JW, XIA BY, *et al.* Screening of caproic acid producing microorganisms and its application in the maintenance of strong-flavor white wine cellar mud [J]. Chinese Journal of Brewing, 2020, 43(11): 41-45.
- [17] 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 bacteria producing high caproic acid in strong-flavor liquor cellar mud [J]. Food Science, 2012, 33(5): 177-182.
- [18] 汪文鹏, 王艳丽, 吴树坤, 等. 浓香型白酒窖泥中 3 株厌氧菌的分离鉴定及代谢产物分析[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 15-20.
WANG WP, WANG YL, WU SK, *et al.* Isolation and identification of three strains of anaerobic bacteria and analysis of metabolites in strong-flavor liquor cellar mud [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 15-20.
- [19] 王赞, 李光辉, 罗惠波. 浓香型白酒窖泥厌氧细菌的分离鉴定[J]. 四

- 川理工学院学报(自然科学版), 2014, 27(1): 16–18.
- WANG Z, LI GH, LUO HB. Isolation and identification of anaerobic bacteria in strong-flavor liquor cellar mud [J]. Journal of Sichuan University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2014, 27(1): 16–18.
- [20] 徐心悦, 赵桐桦, 万丽琼, 等. 咖啡产香酵母的分离鉴定及其挥发性成分分析[J]. 食品工业, 2023, 44(6): 137–142.
- XU XY, ZHAO TH, WAN LQ, *et al.* Isolation and identification of aromatic coffee yeast and analysis of its volatile components [J]. Food Industry, 2023, 44(6): 137–142.
- [21] 王建成, 邓鹏, 李小映, 等. 中高温大曲中生香酵母的分离鉴定及其发酵特性研究[J]. 酿酒科技, 2025(2): 61–64, 68.
- WANG JC, DENG P, LI XY, *et al.* Isolation, identification and fermentation characteristics of fragrant yeast in medium-high temperature Daqu [J]. Brewing Science and Technology, 2025(2): 61–64, 68.
- [22] 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 HM, WANG YL, MENG YJ, *et al.* Analysis of prokaryotic flora structure of wall mud and bottom mud of new and old strong-flavor liquor cellar pools [J]. Food Science, 2020, 41(18): 180–187.
- [23] 谭奕阳, 刘书彤, 张严化, 等. 一种快速提取真菌基因组进行 PCR 的方法优化[J/OL]. 生物学杂志, 1–6. [2025-06-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1081.q.20250616.1404.006.html>
- TAN YY, LIU ST, ZHANG YH, *et al.* Optimization of a method for rapid extraction of fungal genomes for PCR [J/OL]. Chinese Journal of Biology, 1–6. [2025-06-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1081.q.20250616.1404.006.html>
- [24] 王晓丹, 庞博, 陈孟强, 等. 酱香白酒酒醅中产香酵母分离与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(6): 1799–1808.
- WANG XD, PANG B, CHEN MQ, *et al.* Isolation and identification of aromatic yeast in fermented grains of maoyu Baijiu [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(6): 1799–1808.
- [25] 袁华伟, 杨泽刚, 兰著玺, 等. 气相色谱法测定己酸菌发酵液中的己酸等有机酸含量[J]. 酿酒科技, 2018(3): 102–105.
- YUAN HW, YANG ZG, LAN ZX, *et al.* Determination of caproic acid and other organic acids in the fermentation broth of caproic acid bacteria by gas chromatography [J]. Brewing Technology, 2018(3): 102–105.
- [26] 包婷, 熊成义, 文为, 等. 化学生物学试验“DNA 片段扩增和琼脂糖凝胶电泳检测”的改进研究[J]. 化学传感器, 2022, 42(3): 52–55.
- BAO T, XIONG CY, WEN W, *et al.* Improvement of DNA fragment amplification and agarose gel electrophoresis detection in chemical biology experiment [J]. Chemical Sensor, 2012, 42(3): 52–55.
- [27] 吴丹. 牦牛源产气荚膜梭菌流行病学及 Qinghai-1 菌株生物学特性研究[D]. 林芝: 西藏农牧学院, 2023.
- WU D. Epidemiology of *Clostridium perfringens* isolated from yak and biological characteristics of Qinghai-1 strain [D]. Linzhi: Xizang Agriculture and Animal Husbandry College, 2023.
- [28] ZHU X, TAO Y, LIANG C, *et al.* The synthesis of n-caproate from lactate: A new efficient process for medium-chain calboxylates production [J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 1–9.
- [29] 邓鸣东. 浓香型白酒窖泥微生物合成菌群初探[D]. 郑州: 郑州轻工业大学, 2024.
- DENG MD. Preliminary study on the microbial synthesis of strong-flavor liquor cellar mud [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2024.
- [30] 张小勤, 卓秀名, 张佳欣, 等. 混菌发酵刺梨果酒工艺研究及香气成分分析[J]. 食品科技, 2025, 50(5): 120–129.
- ZHANG XQ, ZUO XM, ZHANG JX, *et al.* Study on the fermentation process of mixed bacteria in *Rosa roxburghii* fruit wine and analysis of its aroma components [J]. Food Science and Technology, 2025, 50(5): 120–129.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)