



泸型酒窖泥中梭菌的分离及代谢产物分析

蒲秀鑫^{1,2}, 柴丽娟², 徐鹏翔¹, 张晓娟^{2,4}, 陆震鸣^{2,4}, 王松涛⁴, 沈才洪⁴, 史劲松³, 许正宏^{1,2,4*}

¹江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

²江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

³江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

⁴国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

摘要:【目的】分离窖泥中的梭菌微生物并对其代谢产物进行评估。【方法】对窖泥中梭菌群落的 16S rRNA 基因进行高通量测序; 利用高丰度的梭菌 OTU 序列在 KOMODO 数据库进行培养基的预测, 定向分离窖泥中梭菌菌株; 采用顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用仪对窖泥和代表性梭菌菌株的挥发性代谢产物进行检测。【结果】利用 KOMODO 数据库预测的梭菌培养基共计筛选到 31 株梭菌微生物, 分属于梭菌属的 14 个种; 根据风味代谢特性, 这些菌株主要分为两大类, 一是 *C. carboxidivorans*、*C. sporogenes* 和 *C. tyrobutyricum* 等产酸为主的梭菌, 二是 *C. beijerinckii*、*C. butyricum* 和 *C. sphenoides* 等产醇为主的梭菌。【结论】利用测序序列预测培养基有助于从窖泥中分离获得丰富的梭菌菌株, 其物种和代谢能力的多样性对解析白酒复杂风味形成机理奠定了一定的基础。

关键词: 泸型酒, 窖泥, 梭菌, KOMODO

白酒是我国传统发酵型蒸馏酒^[1], 根据其风味特点可分为不同香型^[2]。其中, 浓香型白酒的产量占白酒总产量 70% 以上^[3]。浓香型白酒是以高粱为主要原料, 大曲为发酵剂, 泥窖为发酵容器, 经过多菌种混合发酵、固态蒸馏、勾调、陈酿等工艺酿造而成, 具有窖香浓郁、绵甜醇厚、香味协调、回味悠长的特点^[4]。

生产实践经验告诉我们“好窖出好酒”, 说明了窖泥在浓香型白酒发酵形成风味过程中扮演了重要角色^[5-6]。近年来随着微生物免培养技术的不断发展, 已经分析了窖泥中存在的梭菌、芽孢杆菌、甲烷杆菌等种类复杂的微生物多样性^[7-8]。其中, 梭菌是优质窖泥中的优势微生物, 对风味物质形成具有重要影响。例如, *C. carboxidivorans*^[9]、

基金项目: 国家自然科学基金(31771967, 31901658); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题(2018-11)

*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-02-26; 修回日期: 2019-05-15; 网络出版日期: 2019-10-17

C. beijerinckii^[10]、*C. butyricum*^[11]和*C. tyrobutyricum*^[12-13]等梭菌被证实具有产生乙酸、丁酸、己酸和丁醇等小分子化合物的能力。但是,目前窖泥中仍然有许多梭菌尚未纯培养分离,对其在窖泥中的代谢功能尚缺乏深入了解。

本研究首先对窖泥中细菌群落进行高通量测序,根据基因序列的丰度和亲缘关系获得梭菌代表性 OTU;其次利用 OTU 序列在 KOMODO^[14]数据库(<http://komodo.modelseed.org/>)中进行梭菌培养基的预测,定向分离窖泥梭菌菌株;最后,采用顶空固相微萃取结合气相色谱质谱联用仪对代表性梭菌菌株的代谢产物进行检测。本研究为明确窖泥中梭菌群落的结构和功能,解析窖泥风味来源和白酒酿造机理奠定了研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 取样地点为泸州老窖股份有限公司酿酒基地的新窖窖池(约 30 年)和老窖窖池(约 200 年)。在窖池开封后进行底部三点取样,每个点约 5 g 窖泥,放入无菌塑封袋后尽快用于微生物分离。

1.1.2 主要试剂和仪器: PowerSoil DNA 提取试剂盒,美国 MOBIO 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,上海捷瑞生物工程有限公司;2-辛醇,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;气相色谱质谱联用仪 Trace1310 ISQ 和 NanoDrop 2000 超微量分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 窖泥宏基因组提取

采用 PowerSoil DNA 提取试剂盒对窖泥宏基因组进行提取,步骤参考说明书。用超微量分光

光度计测定 DNA 的浓度和纯度。保证样品 DNA 质量大于 5 μg 且 A_{260}/A_{280} 值为 1.8–2.0^[15]。

1.3 细菌 16S rRNA 基因测序

采用细菌 16S rRNA 基因 V3–V4 区通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')与 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),合成带有 6 bp 碱基 Barcode 的特异性引物,对样本进行 16S 高通量测序。测序平台为 Illumina MiSeq,按照测序标准流程进行测序上机操作,由华大基因股份有限公司完成。

1.4 梭菌培养基的预测

根据细菌高通量测序结果中梭菌纲 OTU 的序列条目,构建系统发育树,结合梭菌纲 OTU 的丰度和亲缘关系,找出代表性梭菌 OTU 序列,将所得到的 OTU 序列在 KOMODO 网站^[14]上进行培养基种类的预测。

1.5 梭菌的分离

根据 KOMODO 预测的结果,采用德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)数据库中的 Medium 1、9、21、78、339、634 和 693 这 7 种培养基对窖泥中梭菌进行分离培养。

1.6 提取细菌 DNA

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对细菌的 DNA 进行提取,步骤参考说明书。并利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 的质量。

1.7 16S rRNA 基因扩增及菌种鉴定

采用 PCR 扩增仪对基因组进行扩增。所采用的引物为细菌通用引物:27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')与 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系为(25 μL): ExTaq 酶 12.5 μL , 引物 27F 1 μL , 引物 1492R 1 μL , 模板

DNA 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 30 个循环; 终延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

PCR 产物使用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检验后, 送至无锡天霖测序公司测序, 将所得到的结果提交至 GenBank 进行在线 BLAST 比对分析, 进行物种鉴定。

1.8 风味物质检测

1.8.1 样品预处理: (1) 发酵液处理方法: 选取代表性菌株在对应培养基中活化至对数期后转接于液体发酵培养基中, 置于厌氧培养箱培养 7 d, 吸取菌株培养液 10 mL 至离心管中, 离心取 8 mL 上清至萃取瓶中, 加入 2.8 g 氯化钠, 并同时加入 10 μL 浓度为 2.2 g/L 的 2-辛醇标准品用于分析。

(2) 窖泥处理方法: 准确称取 2 g 窖泥于萃取瓶中, 加入 8 mL 盐溶液(0.85% NaCl, 1% CaCl₂), 然后加入 2.8 g 氯化钠, 并同时加入 10 μL 浓度为 2.2 g/L 的 2-辛醇标准品用于分析。

1.8.2 气相色谱及质谱检测条件^[11]: (1) 萃取方法: 采用美国 Supelco 公司的 50 μm /30 μm DVAB/CAR/PDMS 固相微萃取头, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 萃取 30 min, 将萃取后的固相萃取头插入气相色谱仪进样口进行热解吸附 5 min, 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$ 。(2) GC-MS 检测条件: 色谱柱规格为 Agilent DB-Wax 毛细管柱(30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm), 载气为氦气, 流速为 10 mL/min, 不分流, 进样口温度维持在 250 $^{\circ}\text{C}$, 升温程序为: 40 $^{\circ}\text{C}$ 维持 5 min 之后, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至 60 $^{\circ}\text{C}$, 以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至 230 $^{\circ}\text{C}$, 维持 8 min。质谱条件: EI 电离源, 离子源温度为 220 $^{\circ}\text{C}$, 接口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 离子源能量为 70 eV, 扫描范围: 33–450 amu。

1.8.3 定性与半定量: 在 NIST 谱库和 Willey 谱

库中检索出匹配度大于 800 的挥发性化合物, 根据内标 2-辛醇与风味物质峰面积之比计算出挥发性风味物质含量, 再乘以稀释倍数得出样品中挥发性风味物质的含量。

1.9 数据分析

采用 SPSS 等软件进行数据统计分析, 系统发育树构建采用 MEGA 7, 热图分析等采用 Graphpad Prism 7.0、R 语言等软件处理。

2 结果和分析

2.1 窖泥中微生物群落结构及代表性梭菌系统发育分析

对新窖窖泥和老窖窖泥中细菌的微生物群落结构从纲水平进行分析, 结果如图 1-A 所示。新窖泥细菌群落中主要是梭菌纲(*Clostridia*)、拟杆菌纲(*Bacteroidia*)和芽孢杆菌纲(*Bacilli*), 相对丰度分别为 54%、35% 和 7%; 老窖泥细菌群落中梭菌纲和拟杆菌纲的相对丰度分别为 80% 和 13%, 而芽孢杆菌纲仅占 0.29%。上述结果与 Hu 等^[12]、邓杰^[16]、任聪等^[17]、罗雯等^[18]的报道相似。从梭菌纲中筛选出相对丰度排名前 55 的代表性 OTU 序列, 构建系统发育树, 发现其分为 9 个类群(图 1-B)。

2.2 窖泥中梭菌培养基的预测

将 55 条代表性 OTU 上传至 KOMODO 网站, 筛选最高分值或得分在 800 以上的结果, 总共获得了 7 种梭菌培养基: 包括 Medium 1、9、21、78、339、634 和 693, 培养基条件参见德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)数据库(表 1)。

2.3 窖泥中梭菌菌株的分离

从窖泥样品中分离获得 31 株梭菌微生物, 分属于梭菌属的 14 个种(表 2)。

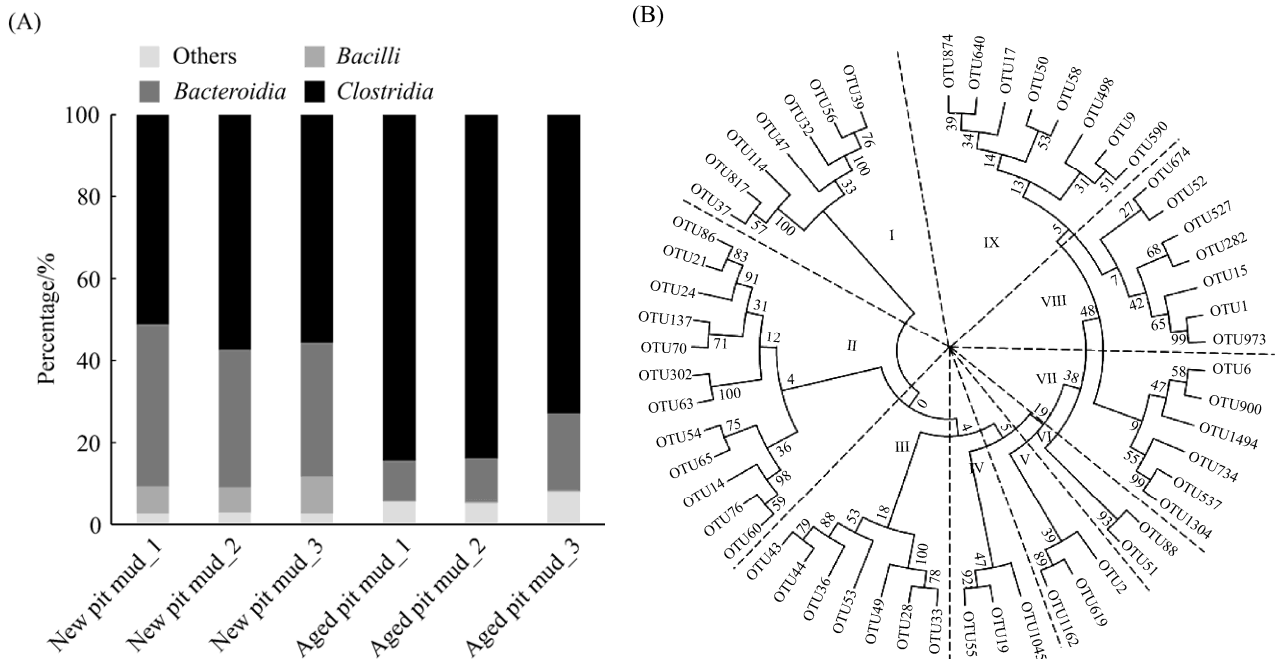


图 1. 新老窖泥细菌群落结构(A)及基于邻接法构建的相对丰度前 55 的梭菌纲 OTU 序列系统发育树(B)

Figure 1. The microbial community structure of new- and aged-pit mud at class level (A) and the phylogenetic tree of 55 representative Clostridial OTU sequences constructed by neighbor-joining method (B).

将 14 个不同种梭菌菌株的 16S rRNA 基因序列与窖泥细菌群落高通量测序结果进行比对, 分析不同梭菌在群落中的相对丰度(图 2)。 *C. tyrobutyricum* 在新窖泥和老窖泥中相对丰度较高, 分别为 0.16% 和 0.11%; *C. sporogenes* 在老窖泥中平均相对丰度为 0.21%, 而在新窖泥中仅为 0.03%。老窖泥中 *C. scatologenes* 的平均相对丰度为 0.09%。

2.4 窖泥和梭菌发酵液中挥发性化合物分析

从窖泥中共检测出 80 种挥发性风味化合物, 包括酯类 45 种, 酸类 9 种, 醇类 10 种, 醛酮类 9 种以及 7 种其他化合物; 梭菌发酵液中检测出 239 种化合物, 其中酯类 43 种, 酸类 17 种, 醇类 56 种, 醛酮类 44 种以及 79 种其他化合物。

窖泥中含量最多的为酯类物质, 其次是酸和醇, 而醛酮和其他物质含量很少(图 3)。窖泥 A 和

B 的酯类物质分别占总量的 63% 和 76%, 酸类物质分别占总量的 30% 和 21%, 醇类物质分别占总量的 6% 和 2%。而梭菌的挥发性代谢物组成则随菌株的不同而具有明显的差异, 但总体可归纳为: 梭菌 C1 (*C. senegalense*)、C2 (*C. sphenoides*)、C5 (*C. celerecrescens*)、C6 (*C. butyricum*)、C7 (*C. tepidum*)、C8 (*C. beijerinckii*) 和 C9 (*Clostridium* sp.) 中醇类物质含量比较高。梭菌 C3 (*C. aminovalericum*)、C4 (*C. homopropionicum*)、C11 (*C. scatologenes*)、C12 (*C. carboxidivorans*)、C13 (*C. sporogenes*) 和 C14 (*C. tyrobutyricum*) 的发酵液中酸类物质含量比较高。梭菌代谢产生的酯类较少, 除 C9 (*Clostridium* sp.) 外, 其余梭菌试验条件下均没有表现出较突出的产酯能力。

不同梭菌发酵液挥发性代谢产物的组成具有明显差异(图 4), 梭菌 C3 (*C. aminovalericum*)、C4

表 1. 基于 55 条梭菌 OTU 序列的培养基预测结果
Table 1. Predicted media based on 55 Clostridial OTU sequences

Classification	OTU number	Predicted medium	Score
Group I	OTU 37	Medium 1(DSMZ)	1200
	OTU 39	Medium 697(DSMZ)	665
	OTU 47	Medium 971(DSMZ)	400
	OTU 114	Medium 507(DSMZ)	400
	OTU 56, OTU 32, OTU 817	No results found	
Group II	OTU 24	Medium 9(DSMZ)	150139
	OTU 21	Medium 220(DSMZ)	400
	OTU 137	Medium 58(DSMZ)	400
	OTU 63	Medium 769(DSMZ)	400
	OTU 65	Medium 53(DSMZ)	400
	OTU 76	Medium 515(DSMZ)	400
	OTU 86, OTU 70, OTU 302, OTU 54, OTU 14, OTU 60	No results found	
Group III	OTU 28	Medium 693(DSMZ)	800
	OTU 43	Medium 220(DSMZ)	400
	OTU 44	Medium 339(DSMZ)	400
	OTU 36	Medium 788(DSMZ)	400
	OTU 53	Medium 92(DSMZ)	400
	OTU 49	Medium 436(DSMZ)	400
	OTU 33	No results found	
Group IV	OTU 19	Medium 220(DSMZ)	400
	OTU 55, OTU 1045,	No results found	
Group V	OTU 1162, OTU 619, OTU 2	No results found	
Group VI	OTU 88	Medium 65(DSMZ)	400
	OTU 51	Medium 156(DSMZ)	400
Group VII	OTU 1304	Medium 104(DSMZ)	400
	OTU 1494	Medium 123(DSMZ)	400
	OTU 900	Medium 1237(DSMZ)	400
	OTU 6	Medium 110(DSMZ)	400
	OTU 537, OTU 734	No results found	
Group VIII	OTU 674	Medium 634(DSMZ)	2400
	OTU 282	Medium 78(DSMZ)	2000
	OTU 527	Medium 339(DSMZ)	800
	OTU 52, OTU 973	Medium 339(DSMZ)	400
	OTU 15	Medium 104(DSMZ)	400
	OTU 1	No results found	
Group IX	OTU 874	Medium 78(DSMZ)	2000
	OTU 50	Medium 21(DSMZ)	1600
	OTU 498, OTU 58	Medium 110(DSMZ)	400
	OTU 590, OTU 9, OTU 17, OTU 640	No results found	

表 2. 基于 14 株代表性菌株 16S rRNA 序列的生物鉴定对比表

Table 2. BLAST results based on the 16S rRNA sequences of representative isolated *Clostridium* strains

Number	Most similar strain	Similarity/%	Accession No.
C1	<i>C. senegalense</i>	100	NR_125591.1
C2	<i>C. sphenoides</i>	99	NR_112174.1
C3	<i>C. aminovalericum</i>	97	NR_113199.1
C4	<i>C. homopropionicum</i>	98	NR_026148.1
C5	<i>C. celerecrescens</i>	99	NR_026100.1
C6	<i>C. butyricum</i>	99	NR_113244.1
C7	<i>C. tepidum</i>	99	NR_157639.1
C8	<i>C. beijerinckii</i>	99	NR_113388.1
C9	<i>Clostridium</i> sp.	100	AB610569.1
C10	<i>C. botulinum</i>	99	CP027775.1
C11	<i>C. scatologenes</i>	99	CP009933.1
C12	<i>C. carboxidivorans</i>	99	NR_104768.1
C13	<i>C. sporogenes</i>	99	NR_113245.1
C14	<i>C. tyrobutyricum</i>	100	NR_044718.2

(*C. homopropionicum*)、C11 (*C. scatologenes*)、C12 (*C. carboxidivorans*)、C13 (*C. sporogenes*)和 C14 (*C. tyrobutyricum*)的发酵液中酸类物质含量比较高, 主要为己酸、乙酸、丁酸和辛酸等。梭菌 C1 (*C. senegalense*)、C2 (*C. sphenoides*)、C5 (*C. celerecrescens*)、C6 (*C. butyricum*)、C7 (*C. tepidum*)、C8 (*C. beijerinckii*)和 C9 (*Clostridium* sp.)中醇类物质含量比较高, 主要为己醇、丁醇和乙醇等。梭菌所产生的这些酸类物质和醇类物质在白酒发酵过程中可直接作为呈香物质, 并且还可以在酶的催化作用下进一步形成相应的酯类化合物, 如己酸乙酯、乙酸乙酯等, 是白酒典型香气物质的主要来源。此外, 梭菌还能代谢产生少量的醛酮类化合物、烷烃类化合物、吡嗪类化合物和一些其他物质, 进一步影响白酒的品质。

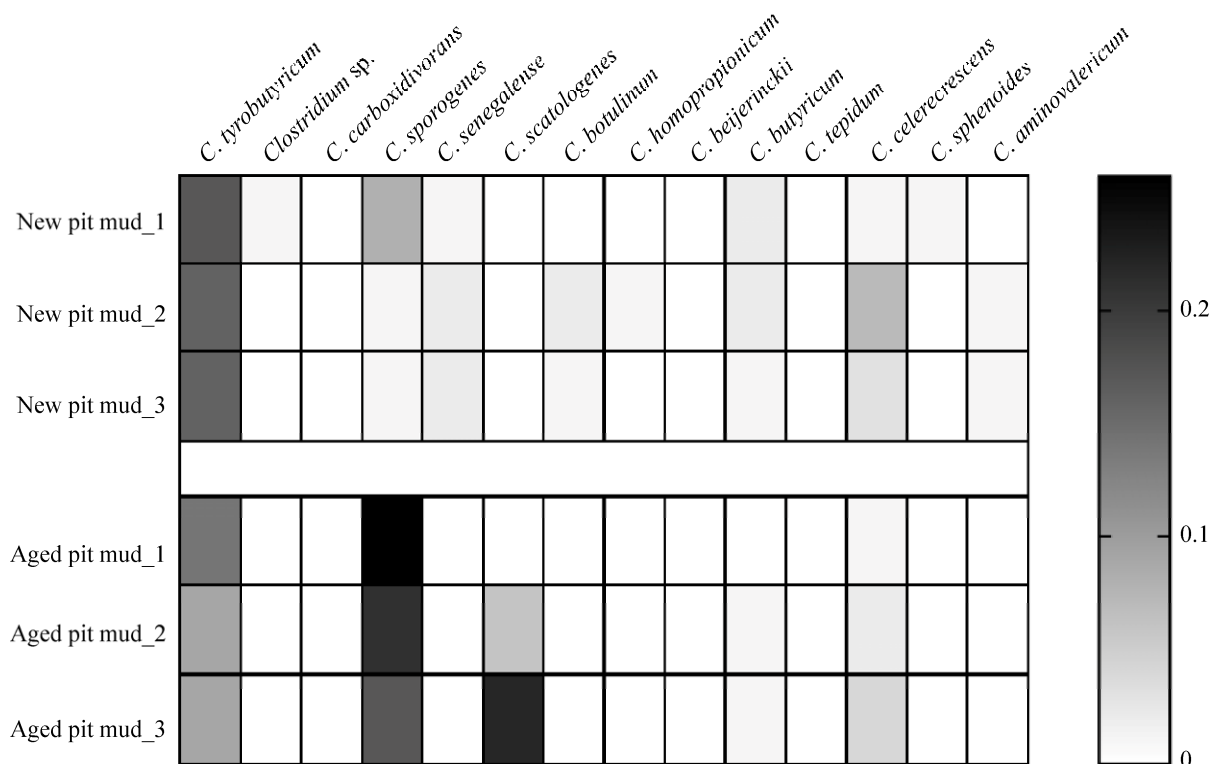


图 2. 14 株代表性梭菌在窖泥细菌群落中的相对丰度

Figure 2. Relative abundance of 14 representative *Clostridium* strains in pit mud.

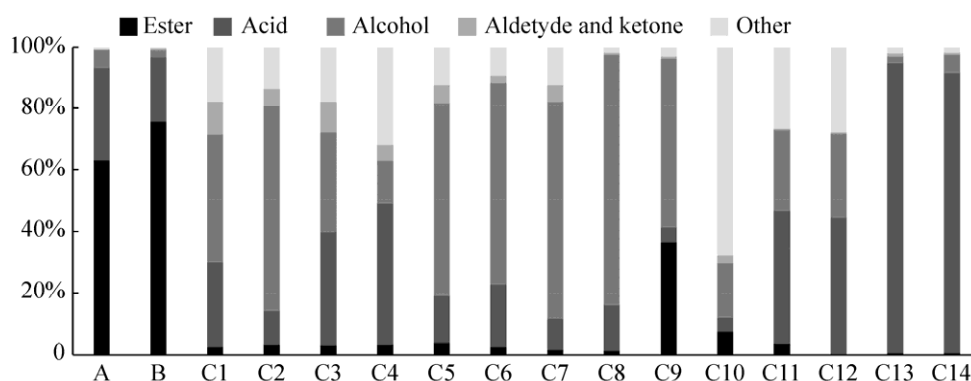


图 3. 窖泥和梭菌发酵液的挥发性物质组成

Figure 3. Composition of volatile compounds in pit mud and the fermentation broth of isolated *Clostridium* strains. A: new pit mud; B: aged pit mud; C: strains.

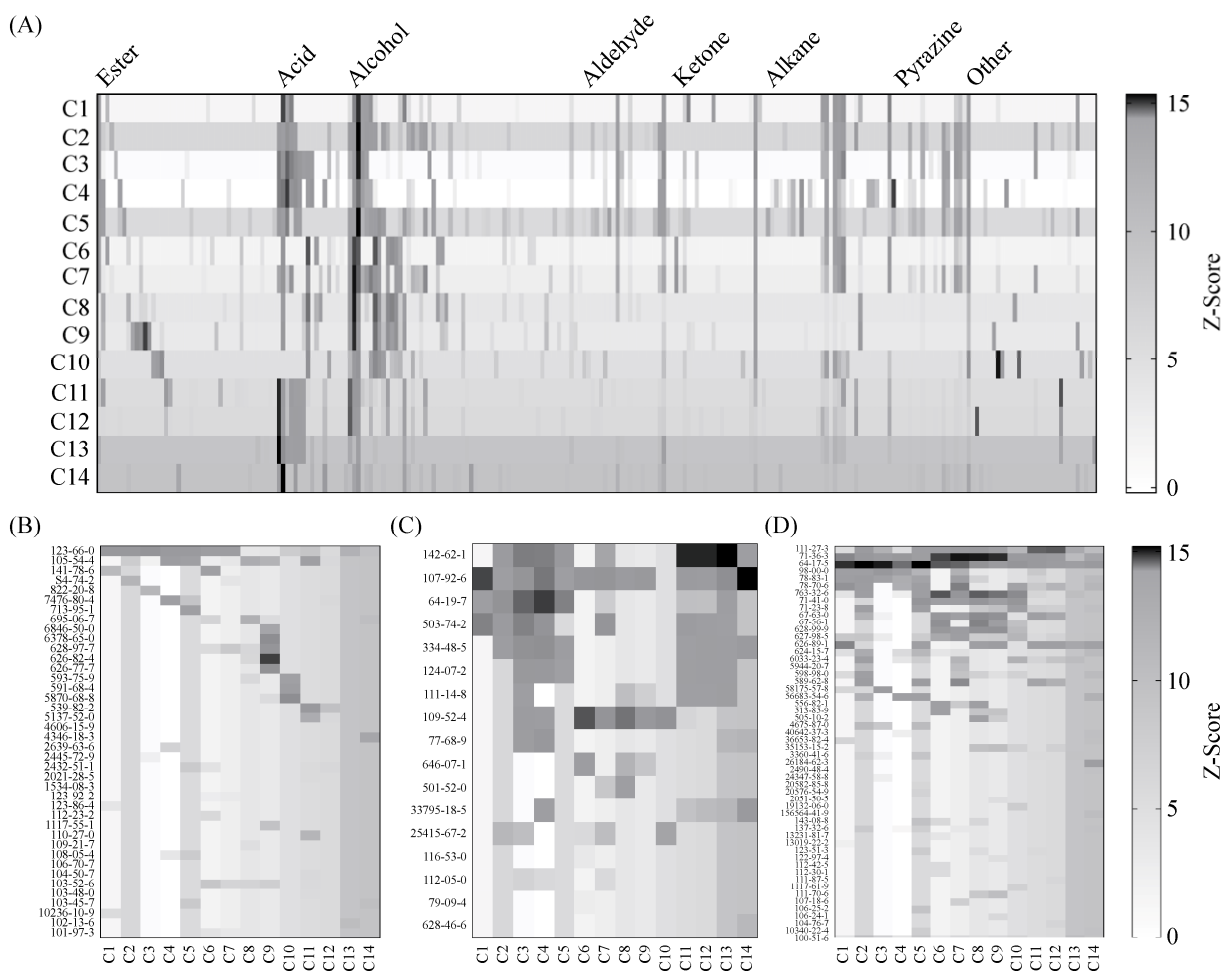


图 4. 分离到的梭菌挥发性代谢产物热图分析

Figure 4. Heatmaps of volatile compounds of the isolated *Clostridium* strains' fermentation broth. A: Total volatiles; B: Esters; C: Acids; D: Alcohols. Cas numbers of the compounds were displayed on the left side of each subfigure.

3 讨论

窖泥中的梭菌在白酒酿造过程中起到重要的功能和作用。任聪等发现老窖泥中的梭菌纲微生物占主导地位^[17]。Hu 等发现梭菌纲微生物在优质窖泥中的含量要高于其他品质的窖泥^[19]。本研究利用高通量测序获得的梭菌 OTU 序列所预测的 7 个不同培养基,定向分离了窖泥中 31 个梭菌菌株,分属 14 个梭菌种,其中 *C. tyrobutyricum*、*C. butyricum*、*C. sporogenes*、*C. celerecrescens* 和 *C. carboxidivorans* 等梭菌在泸型酒窖泥中有分离报道^[20–23],表明窖泥中这些梭菌较易分离培养,但对其代谢能力的研究较少。*C. beijerinckii*^[10]、*C. senegalense*^[24]、*C. scatologenes*^[25]、*C. sphenoides*^[26]、*C. aminovalericum*^[27]、*C. homopropionicum*^[28]、*C. tepidum*^[29]等梭菌在白酒中未曾有过分离报道。通过纯培养实验验证了不同梭菌菌株可以代谢产生不同的白酒风味物质及其前体,其中 *C. sporogenes* 和 *C. tyrobutyricum* 具有较强的产己酸和丁酸的能力,丰富了我们对泸型酒梭菌群落组成和功能多样性的认识。

本文仅针对测序获得的高丰度梭菌 OTU 序列进行培养基预测与菌株分离,下一步需要对窖泥微生物群落中相对丰度较低的梭菌物种进行分离鉴定,评价其代谢特性,从而加强对窖泥中梭菌多样性和酿酒功能的了解。另外,本研究根据基因序列预测微生物培养基的方法也可能遇到没有办法准确预测,或者所预测的培养基仍然无法分离出目的菌株,这可能与现有的菌种库信息不完善有关。随着数据库和菌种库的数据不断更新,利用该方法预测培养基并分离目的菌株的准确度和可靠性将会进一步提高。

参考文献

- [1] Jin GY, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 63: 18–28.
- [2] Zheng XW, Han BZ. *Baijiu*, Chinese liquor: History, classification and manufacture. *Journal of Ethnic Foods*, 2016, 3(1): 19–25.
- [3] Xu Y, Wang D, Fan WL, Mu XQ, Chen J. ChemInform abstract: traditional Chinese biotechnology. *ChemInform*, 2012, 43(50): 1522–2667.
- [4] 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*. *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. *微生物学通报*, 2017, 44(5): 1222–1229.
- [5] Wen CB, Li GH, Qiu SQ, Rao JQ, Du LQ. Study on the improvement of pit mud quality. *Liquor-Making Science & Technology*, 2009, (4): 68–70. (in Chinese)
文成兵, 李光辉, 邱声强, 饶家权, 杜礼泉. 提高窖泥质量的研究. *酿酒科技*, 2009, (4): 68–70.
- [6] Zhang Q, Shen CH, Liu QB, Deng B, Ao ZH, Qian ZW, Liang ZX, Yuan H. Research progress in the evaluation of pit mud quality. *Liquor-Making Science & Technology*, 2013, (7): 84–86. (in Chinese)
张强, 沈才洪, 刘清斌, 邓波, 敖宗华, 钱志伟, 梁泽新, 袁瀚. 窖泥质量评价研究进展. *酿酒科技*, 2013, (7): 84–86.
- [7] 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. 江南大学博士学位论文, 2015.
- [8] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2254–2260.
- [9] Fernández-Naveira Á, Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(7): 3361–3370.
- [10] Li HG, Luo W, Gu QY, Wang Q, Hu WJ, Yu XB. Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined

- low-energy ion beam implantation and *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine induction. *Bioresource Technology*, 2013, 137: 254–260.
- [11] 马箭. 泸型酒窖池丁酸菌群落结构初步解析. 江南大学硕士学位论文, 2016.
- [12] 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. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 214: 116–122.
- [13] Lawson PA. The taxonomy of the genus *Clostridium*: current status and future perspectives. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1070–1074.
- Lawson PA. 梭菌属分类研究进展: 现状和展望(英文). 微生物学通报, 2016, 43(5): 1070–1074.
- [14] Oberhardt MA, Zarecki R, Gronow S, Lang E, Klenk HP, Gophna U, Ruppin E. Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism-media pairings. *Nature Communications*, 2015, 6: 8493.
- [15] 栗连会. 泸型酒窖中乳酸菌和乳酸降解菌的多样性和代谢特性. 江南大学硕士学位论文, 2016.
- [16] 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. 四川理工学院硕士学位论文, 2015.
- [17] Ren C, Gu Y, Du H, Xu Y. Predicting dominant caproate-producing microbes by comparing the microbiotas between new- and aged-pit muds. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(12): 8–14. (in Chinese)
- 任聪, 辜杨, 杜海, 徐岩. 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. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 8–14.
- [18] Luo W, Zhang QY, Liao ZM, Zhang WX. Research on microbial composition of pit mud with different traits using high-throughput sequencing. *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. 食品与发酵工业, 2017, 43(9): 9–14
- [19] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(8): 2506–2515.
- [20] Yang JJ, Tang X, Yang XC, Liu HJ, Tang YM, Chen Q. Genetic diversity and phylogeny of caproic acid bacteria in different aged Luzhou Laojiao Pit Mud. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2015, 33(2): 181–188. (in Chinese)
- 杨菁瑾, 唐雪, 杨先超, 刘汉军, 唐玉明, 陈强. 泸州老窖不同窖龄窖泥中己酸菌遗传多样性及系统发育. 四川农业大学学报, 2015, 33(2): 181–188.
- [21] Xue ZK, Xue Y. Polyphasic identification of a hexanoic acid bacteria strain from the pit mud and study on its acid producing ability. *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. 酿酒科技, 2016, (6): 65–71.
- [22] He PX, Li FL, Zheng Y, Zhang Y, Hu XL, Sun XY, Guo FL. Isolation and volatile metabolites of *Clostridium* spp. in pit mud of strong-flavor Baijiu. *China Brewing*, 2017, 36(4): 45–49. (in Chinese)
- 何培新, 李芳莉, 郑燕, 张勇, 胡晓龙, 孙西玉, 郭福利. 浓香型白酒窖泥梭菌的分离及其挥发性代谢产物分析. 中国酿造, 2017, 36(4): 45–49.
- [23] Yuan HW, Zhao M, Jiang J, Liu GQ, Hu YQ, Shen CH, Wu ZD, Zhou RQ, Song C. Isolation and identification of a butyric acid-producing strain from pit mud and study on its growth performance. *Liquor-Making Science & Technology*, 2017, (5): 35–40. (in Chinese)
- 袁华伟, 赵猛, 蒋君, 刘光钱, 胡永奇, 沈才洪, 吴重德, 周荣清, 宋川. 窖泥中产丁酸菌的筛选、鉴定及生长性能研究. 酿酒科技, 2017, (5): 35–40.
- [24] Mishra AK, Lagier JC, Robert C, Raoult D, Fournier PE. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Clostridium senegalense* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, 2012, 6(3): 386–395.
- [25] Liu HX, Song TS, Fei KQ, Wang HQ, Xie JJ. Microbial electrosynthesis of organic chemicals from CO₂ by *Clostridium scatologenes* ATCC 25775T. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5: 7.
- [26] Tran-Din K, Gottschalk G. Formation of D(-)-1, 2-propanediol and D(-)-lactate from glucose by *Clostridium sphenoides* under phosphate limitation. *Archives of Microbiology*, 1985, 142(1): 87–92.
- [27] Barker HA, D'Ari L, Kahn J. Enzymatic reactions in the degradation of 5-aminovalerate by *Clostridium aminovalericum*. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(19): 8994–9003.
- [28] Dörner C, Schink B. *Clostridium homopropionicum* sp. nov., a new strict anaerobe growing with 2-, 3-, or 4-hydroxybutyrate. *Archives of Microbiology*, 1990, 154(4): 342–348.
- [29] Dobritsa AP, Kutumbaka KK, Werner K, Wiedmann M, Asmus A, Samadpour M. *Clostridium tepidum* sp. nov., a close relative of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium botulinum* Group I. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(7): 2317–2322.

Isolation and metabolic characters of *Clostridium* strains from pit mud of *Luzhou-flavor baijiu*

Xiuxin Pu^{1,2}, Lijuan Chai², Pengxiang Xu¹, Xiaojuan Zhang^{2,4}, Zhenming Lu^{2,4},
Songtao Wang⁴, Caihong Shen⁴, Jinsong Shi³, Zhenghong Xu^{1,2,4*}

¹ Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

² National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

³ School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

⁴ National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract: [Objective] This study aims to isolate *Clostridium* strains from Luzhou-flavor *baijiu* pit mud and evaluate their metabolic characteristics. [Methods] 16S rRNA gene sequencing was used to analyze the clostridial community structure in pit mud; specific media were predicted according to the sequences of high-abundance OTUs scattered in Clostridia using KOMODO database; volatile compounds of pit mud and the representative isolated *Clostridium* strains' fermentation broth were detected by headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. [Results] Thirty-one strains belonging to 14 species of genus *Clostridium* were isolated using the 7 media predicted by KOMODO database. Based on the analysis of volatile metabolites, these *Clostridium* strains could be divided into two clusters, including cluster I, *i.e.* strains mainly producing acids (*C. carboxidivorans*, *C. sporogenes* and *C. tyrobutyricum*) and cluster II, *i.e.* strains mainly producing alcohols (*C. beijerinckii*, *C. butyricum* and *C. sphenoides*). [Conclusion] KOMODO method is helpful for the isolation of *Clostridium* or other bacteria from the pit mud of Luzhou-flavor *baijiu*, and elucidating their metabolic profiles could be conducive to analyze the function of brewing microbes in *baijiu* flavor formation.

Keywords: Luzhou-flavor *baijiu*, pit mud, *Clostridium*, KOMODO

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31771967, 31901658) and by the National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE 2018-11)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn

Received: 26 February 2019; Revised: 15 May 2019; Published online: 17 October 2019