

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80440

产酱香风味芽孢杆菌的选育及特征香气分析

赵 英^{1,2} 翟忠英^{1,2} 姜庆昊^{1,2} 张梦晴^{1,2}

(1. 邵阳学院食品与化学工程学院, 湖南 邵阳 422000;

2. 生态酿酒技术与应用湖南省高校重点实验室, 湖南 邵阳 422000)

摘要: [目的] 提升酱香型白酒酱香风味和品质稳定性。[方法] 联合固、液态双向发酵和电子感官分析筛选出酱香风味浓郁的菌株, 通过优化固态发酵产香工艺条件, 利用气相色谱分析其代谢的特征香气组分。[结果] 获得一株产酱香优势枯草芽孢杆菌菌株 Bac14, 其产酱香风味最佳工艺条件为温度梯度 37 °C→45 °C→50 °C→55 °C, 接种比例 10%, 水分含量 50%, 该条件下菌株产香显著, 3-羟基-2-丁酮、2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪、糠醛等相关风味物质明显增加。[结论] 从高温大曲中获得了一株酱香风味浓郁的枯草芽孢杆菌菌株。

关键词: 酱香风味; 高温大曲; 芽孢杆菌; 感官闻香; 产香特性

Breeding of *Bacillus* for producing sauce-flavor and analysis of characteristic aroma

ZHAO Ying^{1,2} ZHAI Zhongying^{1,2} JIANG Qinghao^{1,2} ZHANG Mengqing^{1,2}

(1. College of Food and Chemical Engineering, Shaoyang University, Shaoyang, Hunnan 422000, China; 2. Ecological Brewing Technology and Application Key Laboratory of Hunan Higher Education Institutions, Shaoyang, Hunnan 422000, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to breed and analyze the aroma characteristics analysis of functional *Bacillus subtilis* strains derived from high-temperature Daqu to enhance the sauce-flavor and quality stability of sauce-flavor liquor. [Methods] A combination of solid-state and liquid-state fermentation along with electronic sensory analysis was employed to identify strains with enriched sauce flavor. The solid-state fermentation conditions for aroma production were optimized, and the characteristic aroma compounds were identified using gas chromatography. [Results] A strain of *B. subtilis*, Bac14, with sauce-flavor-producing advantages was obtained, and the optimal condition for its sauce-flavor-producing flavor is the temperature gradient of 37 °C→45 °C→50 °C→55 °C, the vaccination ratio is 10%, and the water content is 50%. Under the control of these conditions, the strain has significant aroma production, and related flavor substances such as 3-hydroxy-2-butanone, 2, 3, 5-trimethylpyrazine, 2, 3, 5, 6-tetramethylpyrazine, and furfural have significantly increased. [Conclusion] A high-temperature Daqu—derived *B. subtilis* strain with excellent sauce-flavor-producing properties was obtained, and its optimal aroma-producing conditions were established. This study provides a foundation for developing enhanced Daqu and improving the quality and stability of sauce-flavor liquor.

Keywords: sauce flavor; high temperature Daqu; bacillus; sensory smell; aroma-producing characteristics

高温制曲是酱香型白酒独特的酿造工艺, 制曲温度的变化促进了菌群结构的演替, 同时高温制曲过程也强化了糟醅发酵, 增强了糟醅酱味物质形成的原动力^[1-4]。微生物的发酵与代谢是白酒风味物质的主要来源, 其产物可直接作为风味物质或前体物质, 对酒体酱香风味的形成至关重要^[5-8]。芽孢杆菌固态发酵产生含氮化合物、

酚类、醛类、内酯类和酸类等风味物质的同时, 还代谢产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶等酶类物质, 促进了风味大分子物质降解和褐变物质的产生, 是最具代表的产酱香风味功能性细菌^[9-10], 对酱香型白酒风格的形成发挥重要作用^[11-13]。黄晓宁等^[14]基于组学方法筛选出一株产酶活性优越的地衣芽孢杆菌, 将其应用到白酒生产中, 可显著

基金项目: 湖南省自然科学基金(编号: 2022JJ50231); 湖南省研究生科研创新项目(编号: CX20231301)

通信作者: 翟忠英(1993—), 女, 邵阳学院讲师, 博士。E-mail: zzyc6h6@163.com

收稿日期: 2024-05-12 改回日期: 2024-11-01

提高酒醅中挥发性风味物质含量;秦立芹等^[15]从酱香型白酒大曲中筛选到一株解淀粉芽孢杆菌,该菌株是酱香型白酒中多种重要风味物质的来源;刘小改等^[16]采用感官嗅闻法从清香型白酒大曲中分离筛选得到2株具有产香功能的地衣芽孢杆菌,并将其应用于麸曲白酒酿造,增加了原酒香气;张春林等^[17]从高温大曲中分离出14株耐热细菌,其所产生的风味物质对大曲及白酒的香气形成具有重要作用;王小平等^[18]通过风味导向策略,从高温大曲中筛选出产酱香浓郁、呈香典型的芽孢杆菌菌株。

目前,有关酿酒过程中功能微生物的研究较多,但如何优化发酵条件及对功能微生物的高效应用才是提升酿酒品质的关键。而酱香型白酒主体香气成分不明确、酱香型白酒酿造过程中酱香风味不突出等问题限制了白酒的高质量发展。现阶段对于功能性芽孢杆菌的研究主要集中在芽孢杆菌耐高温、产酶活性、产香功能,而有关产酱香风味的芽孢杆菌筛选,产酱香风味芽孢杆菌的功能性研究和应用等尚未见报道。

试验拟以优质酱香型高温大曲为原料,以酱香味物质为感官风味导向,联合固、液态双向发酵和电子感官分析法对产酱香菌株进行筛选及产香发酵条件分析;同时通过模拟固态发酵过程,对筛选产酱香风味菌株代谢产生的特征香气进行分析,探究其菌株是否能够产生酱香味物质,各风味物质对酱香型白酒的作用,为今后该酱香风味菌株在酱香型白酒发酵增香中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

菌株:选取所生产高温大曲中第二次翻曲时的优质曲,贵州老酱台酒业有限公司;

中国白酒风味嗅闻瓶:中国食品发酵工业研究院及国家酒类品质与安全国际联合研究中心;

糠醛、2,3-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪、愈创木酚、4-甲基愈创木酚、4-乙基愈创木酚、乳酸乙酯、己酸乙酯、乙酸乙酯、3-羟基-2-丁酮等标准品:色谱纯,上海麦克林生物科技有限公司;

陈曲:贵州老酱台酒业有限公司;

酱香调味酒:贵州茅台酒股份有限公司;

麸皮:湘窖酒业有限公司;

27F、1492R 扩增引物:上海生工生物工程有限公司;

细菌基因组 DNA 提取试剂盒:山东思科捷生物技术有限公司。

1.2 主要仪器与设备

电子鼻:I-Nose 型,上海昂申智能科技有限公司;

基因扩增仪:RePure-B 型,杭州柏恒科技有限公司;

电泳仪:EPS300 型,上海天能科技有限公司;

赛里安气相色谱仪:SCION456-GC 型,WAX 色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),天美(中国)科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 感官评定模块建立 根据文献[18],以酱香型白酒香气特性^[19-20]及中国酒业协会白酒嗅闻瓶^[21-23]作为参照标样构建感官风味评定标准,制定出如图1所示的酱香风味功能菌感官评定模块风味轮,作为酱香风味感官评定的闻香标度,用于产酱香微生物的筛选。



图1 菌种发酵物闻香感官风味评定模块

Figure 1 Evaluation module of smell and sensory flavor of strain fermentation

(1) 人工感官闻香:根据 Lezaeta 等^[24]的方法,建立风味感官品评小组及评分标准,按表1从色泽、香气、黏性方面进行评分,每组重复评定3次取平均值。

表1 固体发酵物感官评定标准[†]

Table 1 Sensory evaluation criteria for solid fermentation

项目	评分标准	分值
色泽	黑褐色,明亮有光泽	4
	黄褐色,有光泽	3
	黄色	2
	淡黄色	1
香气	酱香纯正,典型香	4
	酱香,麦香,发酵香	3
	奶香,酸味,植物香	2
	麸皮香,谷味,异香	1
黏性	+++	3
	++	2
	+	1
	-	0

[†] 表中出现的典型香、发酵香、植物香和异香均以图1标品为参考;参与闻香的人员均提前经过培训;+为有黏性;-为无黏性;+越多表示黏性越大。

(2) 机械感官闻香:根据文献[21,25],以白酒风味试剂盒为参比样,选取7种单体香味和3种复合香作为标准(见表2)。酱香风味参比样及发酵液经过样品前处理,基本参数测定后,利用电子鼻对酒体气味进行检测分析。

表 2 酱香风味描述语参比样

Table 2 Reference sample of flavor description

参比样	主要香型	具体描述语
愈创木酚	发酵香	焦酱香
四甲基愈创木酚	发酵香	酱油香
四乙基愈创木酚	发酵香	焦糊香
乳酸乙酯	果香	水果香
2,3-二甲基吡嗪	异香	霉香
2,3,5-三甲基吡嗪	植物香	青椒香
3-羟基-2-丁酮	甜香	奶油香
酱香调味酒	典型香	酱香
陈曲	典型香	曲香
麸皮浸出汁	典型香	麸皮香、谷味

每个样品重复 3 次,通过对参比样与发酵液各气味成分的强度进行比对分析。

1.3.2 菌种富集及初筛 采用五点法。称取 2 g 酱香酒曲置于 18 mL 生理盐水中,37℃、150 r/min 混合 30 min。采用 10 倍稀释法将菌悬液稀释至 10^{-6} ,分别取各浓度菌液 100 μ L 均匀涂布于 LB 固体培养基上,55℃培养 24~36 h。选取不同形态的菌落编号并反复进行分离和纯化操作,得到纯化后的菌株。

1.3.3 菌种复筛 根据文献[26]。

(1) 固态发酵产香:将纯化后的初筛菌液按 10% 接种量接入灭菌的麸皮固体发酵培养基中,模拟大曲升温流程,于 37℃→45℃→50℃→55℃/2 d 的温度梯度培养箱中培养 8 d,以未接种菌液的麦麸固体培养基为对照。发酵结束后进行人工感官闻香,筛选出酱香风味突出的菌株进行液态发酵产香。

(2) 液态发酵产香:将产酱香风味明显的菌株应用于液态发酵感官闻香试验,筛选出固、液双向发酵均产酱香风味突出的菌株。按 5% 的接种量将种子液接入麸皮浸出汁培养基中,于 37℃→45℃→50℃→55℃/2 d、150 r/min 摇床恒温培养 8 d,同时设置空白对照组。发酵结束后,按酱香风味评定模型对不同菌体固态和液态发酵物中各气味成分进行评定,同时利用电子鼻对样品的香气值进行检测,绘制酱香风味雷达图,最终筛选出产酱香风味最为浓郁的菌株。

1.3.4 菌种鉴定

(1) 形态学鉴定:将选育得到的菌株接种于 LB 固体培养皿上,55℃培养 24~36 h,观察菌落表面形状、颜色、突起和边缘等特征。挑取菌株进行革兰氏染色,观察菌株形态特征。

(2) 生理生化鉴定:根据文献[27]。

(3) 分子生物学鉴定:利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA,采用细菌通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACGCTACCTTGTTCAGACTT-3')进行 PCR 扩增反应。将扩增产物送至上海生工生物有限公司检测,将最终检

测的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对,使用 MEGA11 构建菌种系统进化树。

1.3.5 菌株产香条件优化 模拟高温大曲实际发酵流程,将筛选得到的优良产香菌株种子液接入麦麸固体培养基中发酵 8 d,对比分析不同条件对菌株发酵产香的影响,与酱酒风味成分参比液液比后,用 Origin 2021 绘制产香风味雷达图,对菌株最优产香发酵条件进行优化。

(1) 发酵温度:按 10% 的接种量将 Bac14 种子液接入麦麸固体培养基中,分别于 37℃→40℃→45℃→50℃、37℃→45℃→50℃→55℃、37℃→50℃→55℃→60℃ 3 个温度梯度进行产香发酵,各温度梯度发酵 2 d,对菌株发酵温度进行优化。

(2) 水分含量:将菌株 Bac14 种子液于最优的温度梯度,按 10% 的接种量接种于水分含量分别为 40%、50%、60% 的麦麸固体发酵培养基中进行发酵,对菌株水分含量进行优化。

(3) 接种量:将菌株 Bac14 种子培养液分别按 5%、10%、15% 接种至最优水分含量的麦麸固体发酵培养基,以最优温度梯度进行发酵,对菌株接种量进行优化。

1.3.6 挥发性物质含量分析 利用气相色谱法对最优产香发酵条件下固态发酵产物馏分进行分析。通过与风味物质标样保留时间对照,最终确定菌株代谢所产生的风味化合物的骨架物质成分^[28]。按文献[29]的 GC 条件对标准品进行定性分析,确定标准溶液保留时间,用标准物质的保留时间对发酵馏分进行对比定性,确定样品馏分中各物质的出峰时间。

1.3.7 数据分析 每次试验均设 3 次平行,运用 Excel 软件进行数据处理及分析,并采用 Origin 2021 绘制香气雷达图及气相色谱图,利用软件 MEGA11 进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 感官评价复筛分析

2.1.1 人工感官复筛分析 固态发酵过程中的美拉德反应与酱香风味物质的形成密切相关,菌株代谢的各种酶类物质对美拉德反应的发生有促进作用,通过美拉德反应所产生的风味物质对酱酒的形成起决定性作用^[30]。通过对初筛分离获得的形态不同的 31 种菌株的固态发酵产物进行感官评定,结果显示菌种 YB11、Bac13、Bac14 和 Bac20 呈现明显的酱香风味,Bac13、Bac14 菌株固态发酵代谢产生酱香风味较强烈,但褐变不明显,且伴随菜臭、酸味等杂味。此前对于产酱香风味菌株的筛选大部分采用模拟温度梯度固态发酵,以人工感官的方式进行筛选^[18]。由于人工感官的局限性及单一固态发酵结果不明显。为探究其产酱香风味最明显的菌株,以 YB11、Bac13、Bac14 和 Bac20 4 株菌株为出发菌株进行后续固态和液态双向发酵的机械感官闻香验证实验,结果见表 3。

2.1.2 机械感官复筛分析 聂慧芳等^[31]将从酱香型大曲中分离出的有较高蛋白酶活性的枯草芽孢杆菌应用于固

表3 固体发酵物基质评价结果[†]

Table 3 Evaluation results of solid fermentation substrate

菌株编号	色泽	香气	黏性	评分	菌株编号	色泽	香气	黏性	评分
空白	淡黄色	麸皮香,谷味	—	2	Bac16	淡黄色	麸皮香,谷味	+	3
Bac1	淡黄色	麸皮香,谷味	+	3	Bac17	淡黄色	酱香味,酸味	++	7
Bac2	黄褐色	菜臭,麸皮味	++	5	Bac18	黄褐色	麦香,奶香	—	6
Bac3	黄色	麸皮香,谷味	—	3	Bac19	黄色	发酵香,奶香	++	6
Bac4	黄色	菜臭,麸皮味	+	4	Bac20	黑褐色	焦酱香味,酸味	++	10
Bac5	黄色	菜臭	—	2	YB1	淡黄色	麸皮香,谷味	+	3
Bac6	黄色	麸皮香,谷味	—	3	YB2	黄褐色	酸臭味,麸皮味	+	5
Bac7	黄褐色	麦香,奶香	++	7	YB3	淡黄色	曲香	++	5
Bac8	黄色	麸皮香,酱油香	++	8	YB4	黄褐色	发酵香,奶香	++	7
Bac9	黄褐色	发酵香,奶香	+++	8	YB5	黄色	酸臭味,麸皮味	+++	6
Bac10	黄褐色	发酵香,奶香	++	7	YB6	黄色	麸皮味,谷味	+	4
Bac11	黄褐色	菜臭	++	6	YB7	黄褐色	发酵香,奶香	+++	8
Bac12	黄色	菜臭,麸皮味	++	5	YB8	黄褐色	发酵香,奶香	+++	8
Bac13	黑褐色	酱香纯正,典型香	++	10	YB9	淡黄色	麸皮香,谷味	+	8
Bac14	黑褐色	酱香纯正,酸味	++	10	YB10	黄褐色	酸臭味	—	3
Bac15	黄色	酱油香,酸味	++	8	YB11	黑褐色	酱油香,酸味	+	9

† “—”表示无黏性;“+”表示有黏性;“+”越多表明黏性越大。

态发酵过程发现其能影响酱香味物质种类和含量。黄永光等^[32]研究发现,酱香型白酒生产过程中枯草芽孢杆菌对酱香味影响较大,其代谢产生的中性蛋白酶能够促进 α -淀粉酶的合成,其菌株发酵代谢产生包括乙醇、乙

酸乙酯、呋喃类、吡嗪类在内的主要特征风味物质与酱香型白酒风味形成密切相关。由图2可知,菌株YB11以奶油香、霉香为主,其余香气表现较弱;菌株Bac13表现出较显著的青椒香,同时伴随着水果香、奶油香气、焦酱,酱香

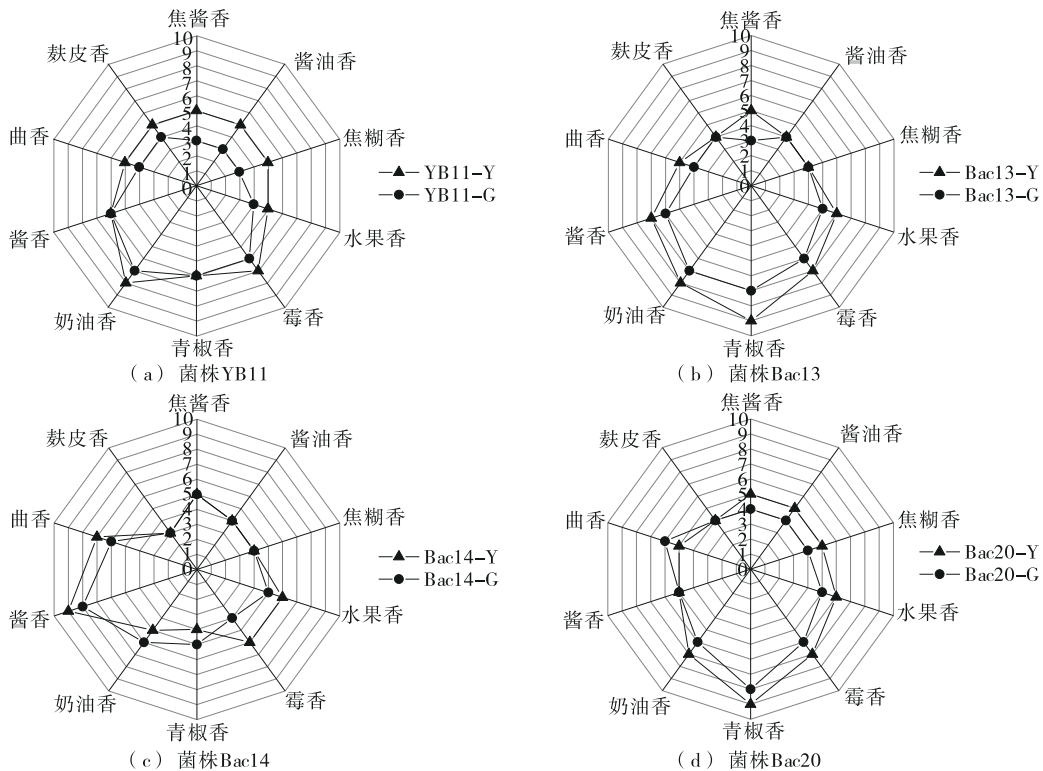


图2 菌株发酵基质产香雷达图

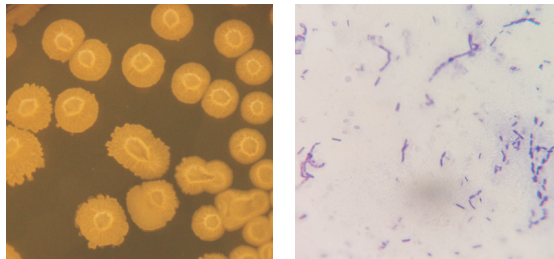
Figure 2 Radar map of aromatic production of fermentation substrate of strain

香气较弱;菌株 Bac14 以产酱香、焦香为主,整体呈现出酱中带焦的特点,曲香、水果香、奶油香气适中,霉香、麸皮香较弱;菌株 Bac20 的酱香风味较弱,青椒香气较明显,其余香气均较不明显;其中菌株 Bac14 的酱香最为突出。结合人工感官和机械感官结果,菌株 Bac13、Bac14 产酱香味较明显;但菌株 Bac13 产青椒香气较明显,酱香味表现较微弱;菌株 Bac14 代谢产生的酱香味强烈,其余香气较微弱。综上,选定在固、液态发酵条件下酱香纯正的菌株 Bac14 为目标研究菌株,并对其产香特性进行研究。

2.2 菌株鉴定

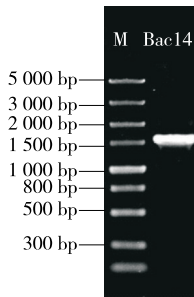
2.2.1 形态学鉴定 由图 3 可知,菌株 Bac14 为圆形,白色,边缘呈锯齿状,中间凸起不透明,表面不光滑且质地黏腻。光学显微镜观察结果显示,单个菌株呈杆状,革兰氏染色结果为阳性,为革兰氏阳性菌。

2.2.2 生理生化鉴定 由表 4 可知,该菌株可以分解葡萄

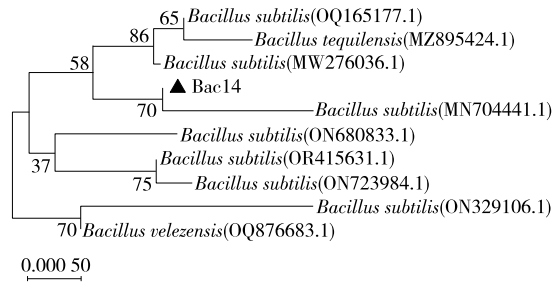


(a) 菌落形态 (b) 细胞形态
图 3 菌株 Bac14 的菌落形态和细胞形态

Figure 3 Colony morphology a and cell morphology b of strain Bac14



(a) PCR产物电泳图



(b) 系统发育树

图 4 Bac14 菌株 PCR 产物电泳图和系统发育树分析

Figure 4 Electrophoresis of PCR products of Bac14 strain and phylogenetic tree analysis

2.3 菌株产香特性分析

2.3.1 产香条件优化 菌株固态发酵过程中,发酵温度与微生物代谢密切相关,过高过低的发酵温度均不利于菌种生长代谢^[33]。由图 5 可知,随着发酵温度的增加,菌株 Bac14 发酵过程中产生的风味物质发生了变化,在温度梯度为 37℃→45℃→50℃→55℃时,该菌株能够适应高温堆积的酿酒环境,其细胞代谢产生的酱香味浓烈,有助于提升酒质。在固态发酵过程中,细菌的生长和代谢都需要水分,发酵基质中水分含量会影响菌株的生长状

况以及对营养物质的分解和利用,同时也影响发酵温度的传导,适当的水分含量有助于微生物生长^[34]。当培养基质的水分含量为 50% 时,菌株 Bac14 发酵产生的酱香味较强烈。在固态发酵过程中,接种量过大,营养物质不足,微生物不能很好生长,对最终代谢的香气物质也有影响,而接种量过小,菌株的繁殖能力不足,发酵能力较弱,所产生的香气物质含量也较弱。当接种量为 10% 时,菌株 Bac14 代谢产生的酱香味最强烈。综上,该菌株产香的最优发酵条件为发酵温度 37℃→45℃→50℃→55℃,

表 4 菌株 Bac14 的生理生化结果[†]

Table 4 Physiological and biochemical results of strain Bac14

生理生化指标	细菌菌株	
	Bac14	<i>Bacillus subtilis</i>
革兰氏反应	+	+
V-P	+	+
淀粉水解	+	+
甲基红反应	+	+
7%耐盐试验	+	+
5%耐盐试验	+	+
葡萄糖发酵	+	+
耐酸性试验	+	+

† + 为阳性;- 为阴性。

2.2.3 分子生物学鉴定 通过对 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,得到菌株约为 1 500 bp 的 16S rRNA 基因条带(图 4)。将 PCR 产物与 NCBI 数据库中的序列进行比对,该菌株与 *Bacillus subtilis* (MN704441.1) 位于同一进化树分支且序列相似度为 99.93%,表明两者亲缘关系极近,由此可确定该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

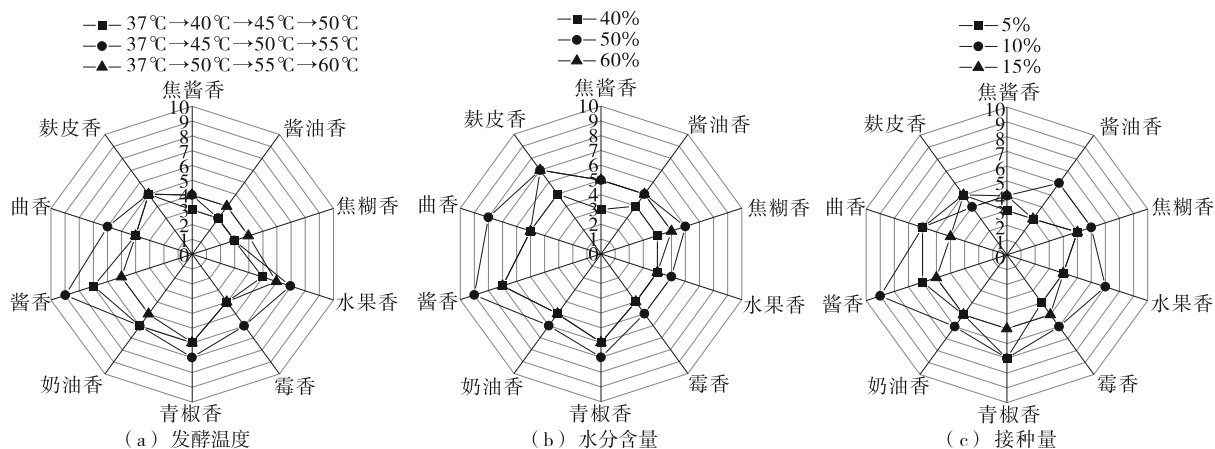


图5 产酱香味菌株发酵条件优化

Figure 5 Results of the study on the fermentation characteristics of the sauce-flavor-producing strain

麦麸固体培养基水分含量为50%,接种量为10%,在该条件下进行固态发酵,菌株产香特性明显增强。

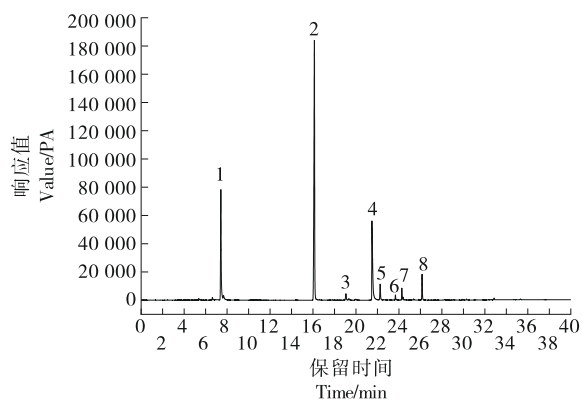
2.3.2 产香挥发性物质分析 模拟最优固态发酵条件,利用气相色谱对菌株所产生的主要挥发性物质进行分析^[35],通过与风味物质标样的保留时间(表5)进行比对,该菌株所产的主要挥发物质如图6所示。

表5 10种风味物质标样的保留时间比对

Table 5 Comparison of retention time of 10 standard samples of flavor substances

匹配序列	保留时间/min	风味物质
	13.78	己酸乙酯
2	16.03	3-羟基-2-丁酮
	17.72	2,3-二甲基吡嗪
	17.76	乳酸乙酯
3	19.87	2,3,5-三甲基吡嗪
4	21.95	糠醛
5	22.18	2,3,5,6-四甲基吡嗪
	30.27	愈创木酚
	31.82	4-甲基愈创木酚
	32.85	4-乙基愈创木酚

已有大量研究^[36]证实,枯草芽孢杆菌这类嗜热芽孢微生物是代谢吡嗪类物质的主要微生物,能产乙偶姻、四甲基吡嗪和呋喃扭尔等风味物质。糠醛是一类在酱香型白酒中含量高于其他香型白酒的杂环类化合物,与酱香型白酒风味形成密切相关^[37];3-羟基-2-丁酮又被称为乙偶姻,是2,3,5,6-四甲基吡嗪的前体物质,两种物质均是酱香有关的重要化合物^[25];吡嗪类化合物是酱香型白酒中关键香气物质,其中含量较高的吡嗪类物质主要为2,3-二甲基吡嗪,2,3,5-三甲基吡嗪,2,3,5,6-四甲基吡嗪,2-乙基-6-甲基吡嗪和2,6-二甲基吡嗪^[38]。由图6可知,菌株Bac14代谢所产生的风味化合物的骨架物质成分主要



1、6、7、8. 未明确 2. 3-羟基-2-丁酮 3. 2,3,5-三甲基吡嗪 4. 糠醛 5. 2,3,5,6-四甲基吡嗪

图6 菌株发酵馏分气相色谱图谱

Figure 6 Gas chromatogram of the fermented fractions of the strain

为2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪、糠醛、3-羟基-2-丁酮等。2,3,5-三甲基吡嗪和糠醛主要由高温条件下的美拉德反应生成,对形成焦香、烘焙香等酱香风格具有重要贡献;3-羟基-2-丁酮、2,3,5,6-四甲基吡嗪等物质是重要的酱味前体物质,通常表现出奶油、焦酱香气;这些风味物质均为酱香白酒中呈香呈味物质的组成部分,因此,菌株Bac14可为酱香风格的形成提供物质基础。

3 结论

研究以感官风味为导向,通过比对固、液双向发酵产香,借助人工感官联合机械感官闻香,最终筛选得到产酱香味浓郁的菌株 Bac14。经形态学、生理生化和 16S rRNA 鉴定,该菌株为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。通过模拟实际生产中固态发酵,该菌株固态发酵产香的最优工艺条件为温度上升梯度 37 °C→45 °C→50 °C→55 °C、麦麸固体培养基水分含量 50%、菌株接种量

10%,此时菌株产酱香味最佳。同时利用气相色谱对菌株所产生的主要挥发性物质进行分析,结果表明菌株 Bac14 代谢所产生的风味化合物的骨架物质成分主要为 2,3,5-三甲吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪、糠醛、3-羟基-2-丁酮等,显著增强了酱香型白酒的香气,从而使得酒体呈香呈味、醇厚度得到提高。后续可将筛选到的产香菌株应用于酱香型白酒生产中,提升酒体典型风格。

参考文献

- [1] 丁子元, 陈玉红, 孙玉婷, 等. 白酒大曲的微生物多样性及其酶类研究进展[J]. 食品科技, 2023, 48(3): 17-23.
DING Z Y, CHEN Y H, SUN Y T, et al. Research progress on microbial diversity and enzymes of Baijiu Daqu[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(3): 17-23.
- [2] 罗小叶, 刘婉琳, 郎莹, 等. 王茅大曲微生物菌群多样性分析[J]. 食品科技, 2024, 49(1): 9-18.
LUO X Y, LIU W L, LANG Y, et al. Microbial diversity analysis of Wangmao Daqu[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(1): 9-18.
- [3] 戴奕杰, 李宗军, 田志强. 酱香型白酒大曲和糟醅的细菌多样性分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 152-159.
DAI Y J, LI Z J, TIAN Z Q. Analysis of bacterial diversity in Daqu and fermented grains for Maotai-flavor liquor[J]. Food Science, 2019, 40(4): 152-159.
- [4] 何猛超, 邹子璇, 西玉玲, 等. 通过外源添加芽孢杆菌提升北方地区高温大曲的品质[J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 145-154.
HE M C, WU Z X, XI Y L, et al. Enhancing the quality of high-temperature Daqu in northern China by adding exogenous *Bacillus* spores[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 145-154.
- [5] 任爱容, 黄永光, 涂华彬. 茅台镇酱香型白酒酿造大曲及环境中可培养细菌多样性及功能分析[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 195-202.
REN A R, HUANG Y G, TU H B. Diversity and function of culturable bacteria in Daqu and brewing environment of Moutai-flavor Baijiu in Maotai Town[J]. Food Science, 2020, 41(14): 195-202.
- [6] 孙利林, 李立郎, 胡萍, 等. 酱香型白酒大曲的微生物菌群结构及风味成分分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 299-306, 193.
SUN L L, LI L L, HU P, et al. Analysis of microbial community structure and flavor composition of Maotai-flavor Daqu[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 299-306, 193.
- [7] HOU Q C, WANG Y R, CAI W C, et al. Metagenomic and physicochemical analyses reveal microbial community and functional differences between three types of low-temperature Daqu[J]. Food Research International, 2022, 156(6): 111167.
- [8] WANG M Y, YANG J G, ZHAO Q S, et al. Research progress on flavor compounds and microorganisms of Maotai flavor Baijiu[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(1): 6-18.
- [9] 孙佳, 杜海, 徐岩. 高温大曲中大曲岩石芽孢杆菌的筛选及其特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(17): 75-81.
SUN J, DU H, XU Y. Screening and characterization analysis of *Scopulibacillus* daqui in high-temperature Daqu[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(17): 75-81.
- [10] 郭丽丹, 张晓妍, 周婉婷, 等. 枯草芽孢杆菌拮抗菌的筛选鉴定及其抑菌特性研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 152-158.
GUO L D, ZHANG X Y, ZHOU W T, et al. Antagonistic bacteria of *Bacillus subtilis*: screening, identification and antibacterial substance characterizing[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 152-158.
- [11] XU B Y, XU S S, CAI J, et al. Analysis of the microbial community and the metabolic profile inoculation with *Bacillus licheniformis* and *Bacillus velezensis*[J]. LWT, 2022, 160: 113214.
- [12] YANG Y, ZOU Y F, ZENG K J, et al. Effect of *Bacillus subtilis* fortified inoculation on the microbial communities in different niches of Daqu[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 134(5): 407-415.
- [13] GAO L, ZHOU J, HE G Q. Effect of microbial interaction on flavor quality in Chinese Baijiu fermentation[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 960712.
- [14] 黄晓宁, 刘晶晶, 韩北忠, 等. 基于酶学特性筛选大曲来源芽孢杆菌用于强化酿酒[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 218-224.
HUANG X N, LIU J J, HAN B Z, et al. Screening of *Bacillus* from Daqu by enzymatic characteristics to enhance the fermentation of Chinese Baijiu[J]. Food Science, 2021, 42(10): 218-224.
- [15] 秦立芹, 马景浩, 李二浩, 等. 一株源于北派酱香白酒酿造环境中产淀粉酶细菌的筛选、鉴定及其特性研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(11): 154-160.
QIN L Q, MA J H, LI E H, et al. Isolation and identification of an amylase-producing bacterium from Beipai sauce-flavor Baijiu brewing environment and its characteristics research [J]. China Brewing, 2021, 40(11): 154-160.
- [16] 刘小改, 李洪媛, 周林艳, 等. 清香型大曲中产香细菌的分离筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2022, 41(5): 96-100.
LIU X G, LI H Y, ZHOU L Y, et al. Isolation, screening and identification of aroma-producing bacteria in light-flavor Baijiu Daqu[J]. China Brewing, 2022, 41(5): 96-100.
- [17] 张春林, 蒲春, 白从广, 等. 高温大曲中产酱香味细菌的筛选及其产香特性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(5): 1-6.
ZHANG C L, PU C, BAI C G, et al. Screening and identification of Moutai flavor producing bacteria from high-temperature Daqu and its aroma producing characteristics[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(5): 1-6.
- [18] 王小平, 黄永光, 周文美. 产酱香味菌株的分离筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 179-184.
WANG X P, HUANG Y G, ZHOU W M. Isolation, screening and identification of Maotai-flavor producing strains[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(10): 179-184.
- [19] 赵兴秀, 何义国, 赵长青, 等. 产酱香功能菌的筛选及其风味

- 物质研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 196-200.
- ZHAO X X, HE Y G, ZHAO C Q, et al. Screening of sauce flavor producing bacteria and flavor compounds research[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(6): 196-200.
- [20] 沈海月. 酱香型白酒香气物质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2010: 1-10.
- SHEN H Y. Studies on aroma compounds of Chinese soy sauce aroma type liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010: 1-10.
- [21] 李世平. 酱香型白酒异嗅味风味轮的构建及感官特性研究[J]. 酿酒科技, 2022(8): 84-89.
- LI S P. Construction of flavor wheel of offensive odors in Jiangxiang Baijiu and study on its sensory characteristics[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2022(8): 84-89.
- [22] 范文来, 徐岩. 白酒 79 个风味化合物嗅觉阈值测定[J]. 酿酒, 2011, 38(4): 80-84.
- FAN W L, XU Y. Determination of odor thresholds of volatile aroma compounds in Baijiu by a forced-choice ascending concentration series method of limits[J]. Liquor Making, 2011, 38(4): 80-84.
- [23] 沈世明, 梁明锋, 张娇娇, 等. 酱香高温大曲风味轮的初步构建及其香气特征分析[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 73-78.
- SHEN S M, LIANG M F, ZHANG J J, et al. Preliminary construction of sauce-flavored high temperature *Daqu* flavor wheel and its aroma characteristic analysis[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1): 73-78.
- [24] LEZAETA A, BORDEU E, AGOSIN E, et al. White wines aroma recovery and enrichment: sensory-led aroma selection and consumer perception[J]. Food Research International, 2018, 108: 595-603.
- [25] 王荣钰, 赵金松, 苏占元, 等. 酱香型白酒关键酱香风味物质研究现状[J]. 酿酒科技, 2020(6): 81-86.
- WANG R Y, ZHAO J S, SU Z Y, et al. Research status of key flavoring compounds of Jiangxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2020(6): 81-86.
- [26] 王小平. 酱香风味菌株筛选及其发酵代谢香气特性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020: 7-11.
- WANG X P. Screening of Maotai-flavor strains and study on aroma characteristics of fermentation and metabolism[D]. Guiyang: Guizhou University, 2020: 7-11.
- [27] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 142.
- DONG X Z, CAI M Y. Handbook for identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 142.
- [28] 谭笑, 余估, 雷鹏, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 的不同生产月份馥郁香型白酒酿造用大曲挥发性成分分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(8): 40-48, 69.
- TAN X, YU J, LEI P, et al. Analysis of volatile component in *Daqu* used for brewing Fuyu flavor Baijiu from different production months based on HS-SPME-GC-MS[J]. Food & Machinery, 2024, 40(8): 40-48, 69.
- [29] RU H L, XU H Y, LI Q, et al. Equilibrium of esterification in Chinese distilled liquor (Baijiu) during ageing[J]. LWT, 2024, 192: 115735.
- [30] 陈心雨, 刘念, 王超凯, 等. 高温大曲中美拉德反应的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2023, 59(6): 109-112.
- CHEN X Y, LIU N, WANG C K, et al. Research progress of Maillard reaction in high temperature *Daqu*[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2023, 59(6): 109-112.
- [31] 聂慧芳, 蒋英丽, 沈毅, 等. 酱香型大曲中高产蛋白酶细菌的分离鉴定[J]. 酿酒科技, 2015(12): 41-44.
- NIE H F, JIANG Y L, SHEN Y, et al. Isolation and identification of bacteria strains with high-yield of protease from Jiangxiang *Daqu*[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015(12): 41-44.
- [32] 黄永光, 杨国华, 张肖克, 等. 产酱香风味芽孢杆菌类菌株发酵代谢产物及其酶分析研究[J]. 酿酒科技, 2013(1): 41-45.
- HUANG Y G, YANG G H, ZHANG X K, et al. Study on the metabolites of Jiang-flavor-producing *Bacillus*[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2013(1): 41-45.
- [33] ZHANG H X, WANG L Y, WANG H, et al. Effects of initial temperature on microbial community succession rate and volatile flavors during Baijiu fermentation process[J]. Food Research International, 2021, 141: 109887.
- [34] 张颖, 李霄霄, 李景辉, 等. 高产四甲基吡嗪芽孢杆菌的筛选及其对酱香型白酒堆积过程的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 142-149.
- ZHANG Y, LI X X, LI J H, et al. Screening of high-yielding tetramethylpyrazine *Bacillus* and its effect on the accumulation process of Maotai-flavor liquor[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 142-149.
- [35] 陆梦思, 余估, 余冰, 等. 馥郁香型基酒陈酿过程中理化指标及挥发性成分变化分析[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 29-36.
- LU M S, YU J, YU B, et al. Analysis of physical and chemical indicators and volatile composition changes during aging of Fuyuxiangxing crude Baijiu[J]. Food & Machinery, 2024, 40(5): 29-36.
- [36] 王西, 沈毅, 张亚东, 等. 产香枯草芽孢杆菌在酱香型白酒生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2018(7): 70-75.
- WANG X, SHEN Y, ZHANG Y D, et al. Application of aroma-producing *B. subtilis* in the production of Jiangxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2018(7): 70-75.
- [37] 许汉英. 白酒中糠醛含量与香型之间关系的研究[J]. 酿酒, 2002(5): 37-39.
- XU H Y. Study on relativity between furfural content and fragrance style of Chinese liquor[J]. Liquor-Making, 2002(5): 37-39.
- [38] 沈毅, 陈波, 张亚东, 等. 高产吡嗪类物质芽孢杆菌在高温大曲中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2019(10): 101-105, 123.
- SHEN Y, CHEN B, ZHANG Y D, et al. Application of high pyrazines-yield *Bacillus* strains in the production of high-temperature *Daqu*[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2019(10): 101-105, 123.