

研究报告

天津地区酱香白酒生产中产吡嗪芽孢杆菌的应用

吴雨菴¹, 孙羊羊¹, 李继齐^{*2}, 李昂², 李梦², 杨文丽², 卫春会³, 张欢¹, 杜丽平^{*1}

1 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 天津芦台春酿造有限公司, 天津 301500

3 四川轻化工大学 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644000

吴雨菴, 孙羊羊, 李继齐, 李昂, 李梦, 杨文丽, 卫春会, 张欢, 杜丽平. 天津地区酱香白酒生产中产吡嗪芽孢杆菌的应用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1250-1264.

WU Yumeng, SUN Yangyang, LI Jiqi, LI Ang, LI Meng, YANG Wenli, WEI Chunhui, ZHANG Huan, DU Liping. Application of pyrazine-producing *Bacillus* in the production of Maotai-flavor Baijiu in Tianjin[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1250-1264.

摘要:【背景】吡嗪类化合物与酱香型白酒的酱香风味关系密切。【目的】筛选出高产吡嗪类化合物芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)应用于白酒生产中, 为提升酱香型白酒品质提供依据。【方法】从 50 株来源于酱香型白酒酿造过程的芽孢杆菌中经初筛、复筛筛选出一株高产吡嗪类化合物的芽孢杆菌 J1, 对其进行 16S rRNA 基因分子生物学鉴定, 通过单因素和正交试验对菌株产吡嗪条件进行优化, 通过模拟发酵和原位发酵验证其发酵效果。【结果】菌株 J1 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 接种菌液浓度为 10^7 CFU/mL, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)与 J1 接种比例为 1:100, 菌株 J1 接种时间为接种酿酒酵母后 2 d, 升温至 50 °C 为最优发酵条件, 其吡嗪含量可达 322.48 mg/L。模拟发酵表明该菌株所产吡嗪种类丰富。原位发酵所得白酒中吡嗪类化合物含量为 480.87 mg/L, 约是对照组的 10 倍。【结论】本研究可为提升酱香型白酒品质提供依据。

关键词: 酱香型白酒; 吡嗪类化合物; 芽孢杆菌; 原位发酵

资助项目: 天津芦台春酿造有限公司技术开发委托项目(2021LTCNZ-ky01); 天津市研究生科研创新项目(2022SKYZ108); 四川省重点基础研究项目(NJ2022-01★)

This work was supported by the Tianjin Lutaichun Brewing Limited Company Technology Development Commissioned Project (2021LTCNZ-ky01), the Tianjin Graduate Research and Innovation Project (2022SKYZ108), and the Key Basic Research Program of Sichuan Province (NJ2022-01★).

*Corresponding authors. E-mail: LI Jiqi, 937101827@qq.com; DU Liping, dlp123@tust.edu.cn

Received: 2024-06-14; Accepted: 2024-07-28; Published online: 2024-09-19

Application of pyrazine-producing *Bacillus* in the production of Maotai-flavor Baijiu in Tianjin

WU Yumeng¹, SUN Yangyang¹, LI Jiqi^{*2}, LI Ang², LI Meng², YANG Wenli², WEI Chunhui³, ZHANG Huan¹, DU Liping^{*1}

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Lutaichun Brewing Co., Ltd., Tianjin 301500, China

3 Sichuan Provincial Key Laboratory of Brewing Biotechnology and Application, Sichuan University of Science and Engineering, Yibin 644000, Sichuan, China

Abstract: [Background] Pyrazines are closely related to the flavor of Maotai-flavor Baijiu. [Objective] To screen out the *Bacillus* strains with high yields of pyrazines for Baijiu production and provide a basis for improving the quality of Maotai-flavor Baijiu. [Methods] After primary screening and secondary screening, strain J1 with a high yield of pyrazines was screened out from 50 strains of *Bacillus* in the brewing process of Maotai-flavor Baijiu. The strain was identified by 16S rRNA gene sequencing. The conditions of pyrazine production by this strain were optimized by single factor and orthogonal experiments. Finally, the fermentation performance of the strain was evaluated by simulated fermentation and *in-situ* fermentation. [Results] Strain J1 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The optimum fermentation conditions were as follows: inoculum concentration of 10^7 CFU/mL, *Saccharomyces cerevisiae* to J1 ratio of 1:100, inoculation of J1 two days after inoculation of *S. cerevisiae*, and the fermentation temperature raised to 50 °C. Under these conditions, the content of pyrazines reached 322.48 mg/L. The simulation experiment showed that the strain J1 produced rich pyrazines. The content of pyrazines in the Baijiu obtained by *in-situ* fermentation was 480.87 mg/L, which was about 10 times that of the control group. [Conclusion] This study can provide a basis for improving the quality of Maotai-flavor Baijiu.

Keywords: Maotai-flavor Baijiu; pyrazines; *Bacillus* sp.; *in-situ* fermentation

吡嗪类化合物是在苯环的 1,4 位上带有 2 个杂氮原子的挥发性六元杂环化合物，具有芳香性^[1]。不同的取代基可以取代苯环上的 4 个碳原子，形成不同种类的吡嗪。据统计，已知存在 70 余种烷基吡嗪类化合物^[2]。吡嗪类化合物是酱香型白酒中重要的风味物质，主要体现为焦糊香、烤香和坚果香，同时吡嗪类化合物对其他风味物质有衬托叠加的作用，使白酒香气更加丰满，可提升酱香型白酒品质^[3]。另外，吡嗪类物质在人体内具有增强免疫力、调节血压

血糖等功效^[4]，也具有镇痛、抗病毒、抗菌等多种用途^[5]，在白酒中发挥着“健康因子”的作用。然而，不同地区、不同品牌的酱香型白酒中吡嗪类化合物含量差异显著^[6]，调节吡嗪类化合物的生成对于控制酱香型白酒的品质具有重要意义。

吡嗪类化合物在酱香白酒发酵过程中主要通过美拉德反应和微生物代谢产生^[7]。Zhu 等^[8]对 3 种不同色泽的高温大曲进行研究，导致高温大曲外观色泽差异最重要的因素正是美拉德

反应, 研究发现黑曲中吡嗪类物质的平均比例为 34%, 高于白曲和黄曲。而功能微生物代谢的酶类会影响美拉德反应进程, 戴奕杰^[9]通过对高温大曲的研究发现芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) 代谢的生物酶对美拉德反应有极强的催化作用, 从而提高了四甲基吡嗪的产量, 说明微生物代谢酶催化美拉德反应对吡嗪类化合物具有重要影响。李声睿等^[10]通过对高温大曲微生物群落与风味物质关联性分析, 发现芽孢杆菌属与吡嗪类化合物呈极显著正相关, 说明功能微生物代谢及相互协同作用会影响吡嗪类化合物的含量。因此, 通过外源添加的方式调控微生物群落来实现提高吡嗪类化合物的含量将会是一条可行的途径。

目前将优良菌种用于酿酒过程中的方法主要有:(1) 将功能菌制成麸曲等菌剂与传统大曲进行协同发酵^[11]; (2) 在传统发酵工艺的基础上进行菌种强化并优化发酵和蒸馏工艺, 以改善白酒风味与品质。张温清等^[12]从高温和中温大曲中筛选出一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) XJB-104 用于麸曲固态发酵, 四甲基吡嗪产量达 202.54 mg/kg。本研究从实验室前期分离的 50 株芽孢杆菌中筛选出高产吡嗪类化合物的菌株, 对菌株进行形态观察和分子生物学鉴定, 通过单因素和正交试验确定菌株接种量、接种浓度、接种比例、接种时间和升温温度条件, 将优化好的条件应用于模拟发酵和原位发酵中, 以期提高实际生产中吡嗪类化合物产量, 提高白酒酱香风味和品质。

1 材料与方 法

1.1 样品

50 株芽孢杆菌, 实验室保藏(筛选于白酒酿造车间); 耐高温酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 安琪酵母股份有限公司。

酒醅: 天津芦台春酿造有限公司白酒酿造车间实际使用的酒醅。

1.2 主要试剂和仪器

2,6-二甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪、2,3-二甲基-5-仲丁基吡嗪, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 2-甲基吡嗪、2,3-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪、2,3-二甲基-5-乙基吡嗪、薄荷醇, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 革兰氏染色剂和细菌 DNA 提取试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。

气相色谱-质谱联用仪(GC-MS), 安捷伦科技有限公司; 恒温培养箱, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 电子显微镜, HITACHI 公司; PCR 仪, 艾本德(上海)国际贸易有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 酵母浸粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 于 121 °C 灭菌 15 min。

葡萄糖蛋白胨酵母膏培养基(yeast extract-peptone-glucose, YPG, g/L): 葡萄糖 70.0, 蛋白胨 30.0, 酵母膏 10.0, 磷酸氢二铵 30.0, pH 7.5, 于 115 °C 灭菌 20 min。

固态高粱培养基: 粉碎至一定程度的高粱与整粒高粱比以 1:1 搅拌均匀, 料水比 1:1 润粮 18 h 后装瓶, 于 115 °C 蒸煮灭菌 20 min。将商业耐高温酿酒酵母活化后调节菌浓度至 10⁷ CFU/mL 制成菌悬液, 按 5% 的接种量接种至灭菌的高粱培养基中用于模拟固态发酵。

1.4 高产吡嗪菌株液态发酵初筛

将 50 株芽孢杆菌接种于 LB 培养基, 35 °C、200 r/min 活化 20 h, 调节菌浓度至 10⁷ CFU/mL 制成菌悬液, 按 10% 接种量将 15 mL 菌悬液接种至 135 mL YPG 培养基中, 35 °C 培养 5 d 后将温度升至 50 °C 维持 2 d, 测定吡嗪类化合物含量。

1.5 高产吡嗪菌株温度梯度固态发酵复筛

按初筛的方法制备芽孢杆菌菌悬液,按 5% 的接种量接种至 150 g 固态高粱培养基中,于 35 °C 发酵 7 d,升高温度至 50 °C 发酵 3 d 后结束发酵,蒸酒^[12],测定酒样中吡嗪类化合物含量。

1.6 分析检测

理化指标的测定:依照《酿酒分析与检测》^[13]对发酵酒醅进行理化实验。

吡嗪类化合物含量的测定:参照王学娇等^[14]的方法,采用顶空固相微萃取的方法及气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析。将表 1 中 7 种吡嗪类化合物标准品配制成适当浓度,稀释成 6 个浓度梯度,以 1.111 mg/L 薄荷醇溶液为内标,以吡嗪类化合物浓度与内标浓度之比为横坐标,以吡嗪类化合物定量离子峰面积与内标定量离子峰面积之比为纵坐标,计算该化合物的线性标准曲线,标准曲线定量公式如表 1 所示。

其他挥发性化合物含量的测定:通过上述方法进行测定,并利用内标进行半定量计算。

感官分析:酒样感官品评依照参考文献^[15]执行。由 6 名具有品酒经验的研究人员组成的感官评价小组进行酒样品评,分别从花香、甜香、焦香、粮香、果香、酸味、苦味、辛辣味、柔和度和持久性 10 个方面进行综合评价(0-5 分,

0 代表感知不到,5 代表特征极为明显)。

1.7 高产吡嗪菌株的鉴定

按照文献^[16]中的方法对菌株进行形态学观察和分子生物学鉴定。利用细菌基因组提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA。PCR 扩增体系(20 μL): DNA 模板 1 μL,正、反向引物 27F (10 μmol/L) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (10 μmol/L) (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')各 1 μL,超纯水 7 μL, 2×Accurate Taq Master Mix (dye plus) 10 μL。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 30 个循环; 72 °C 再延伸 5 min。采用 MEGA 11 软件的邻接(neighbor-joining, NJ)法 bootstrap 值为 1 000 构建系统发育树。

1.8 高产吡嗪菌株发酵工艺优化

1.8.1 单因素试验

按照 1.5 的方法,根据实际生产条件,依次考察总接种量(5%、10%、15%、20%)、酿酒酵母和芽孢杆菌接种比例(10:1、1:1、1:10、1:100)、接种菌液浓度(10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/mL)、接种时间(接种酿酒酵母后 0-7 d)、升温温度(35、40、45、50 °C)对总吡嗪产量的影响。设置初始水平为总接种量 10%,接种比例 1:1,接种浓度为 10^7 CFU/mL,接种时间为接种酿酒酵母后 0 d (即同时接种),于 35 °C 发酵 7 d,升温至 50 °C 发酵 3 d。

表 1 吡嗪类化合物标准曲线

Table 1 Standard curves of pyrazine compounds

化合物 Compound	标准曲线回归方程 Standard curve regression equation	相关系数 R^2 Correlation coefficient R^2
2-甲基吡嗪 2-methylpyrazine	$y=0.029\ 9x+0.030\ 5$	0.992 4
2,6-二甲基吡嗪 2,6-dimethylpyrazine	$y=0.018\ 7x+0.044\ 4$	0.999 7
2,3-二甲基吡嗪 2,3-dimethylpyrazine	$y=0.033\ 7x-0.358\ 4$	0.990 6
2,3,5-三甲基吡嗪 2,3,5-trimethylpyrazine	$y=0.048\ 2x-0.320\ 2$	0.994 9
2,3-二甲基-5-乙基吡嗪 2,3-dimethyl-5-ethyl pyrazine	$y=0.094\ 3x+0.231\ 6$	0.997 7
2,3-二甲基-5-仲丁基吡嗪 2,3-dimethyl-5-sec-butyl pyrazine	$y=0.026\ 5x+0.058\ 0$	0.995 1
2,3,5,6-四甲基吡嗪 2,3,5,6-tetramethylpyrazine	$y=0.057\ 5x-0.164\ 3$	0.996 6

1.8.2 正交试验

在单因素试验结果的基础上确定总接种量,进行正交试验,如表 2 所示。以总吡嗪产量为考察指标,探究该芽孢杆菌固态发酵的最优条件。

1.9 模拟发酵

取 5 kg 酒醅,按 10%拌入大曲,放入培养箱中模拟堆积过程,35 °C 发酵 2 d 后按优化发酵条件的比例接种 10^7 CFU/mL 的菌株 J1 作为实验组,35 °C 堆积发酵 1 d,升温至 50 °C 堆积发酵 2 d。转入密封瓶子中,填满封口模拟入窖发酵过程,35 °C 发酵 30 d 后结束。对照组为不加菌组,发酵条件与实验组完全相同。分别在模拟堆积结束和出窖后取样,蒸酒,测定酒样中的吡嗪含量。

1.10 原位发酵

为提升酱香型白酒第 7 轮次基酒的特征风味和品质,将高产吡嗪类化合物的菌株 J1 应用于第 7 轮次发酵过程中。取 25 kg 摊凉拌入大曲的酒醅,按照上述优化的发酵条件接入芽孢杆菌,放入棉布袋中封口,置于发酵堆和窖池的中心位置,随生产正常进行堆积发酵和入窖发酵。对照组取相同条件下的酒醅直接放入棉布袋中,与实验组放置于相同位置。待 37 d 后出窖取样,利用小型蒸锅装置加酒尾通气蒸酒,取 53 度酒测定理化指标、酒样中的吡嗪含量及其他挥发性风味物质含量。

1.11 数据处理

每个实验进行 3 次平行,采用 Excel 2016、Origin 2018、SPSS 和 SPSSAU 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 高产吡嗪芽孢杆菌初筛结果

YPG 培养基为芽孢杆菌提供可直接利用并合成吡嗪类化合物的小分子物质,因此,将其用于筛选 50 株芽孢杆菌中可代谢生成吡嗪类化合物的菌株。对比 50 株芽孢杆菌产吡嗪能力,实验结果如图 1 所示。由图 1 可知,产吡嗪能力较高的 5 株菌分别为 J1 (828.1 mg/L)、K1 (233.7 mg/L)、W (218.9 mg/L)、K5 (133.3 mg/L) 和 J5 (112.2 mg/L),因此选择这 5 株芽孢杆菌进行后续实验。

2.2 温度梯度固态发酵复筛结果

采用温度梯度发酵模拟车间堆积升温过程,将初筛得到的 5 株芽孢杆菌在固态发酵培养基中进一步筛选,发酵结果如表 3 所示。结果表明除菌株 W 外,其余 4 株芽孢杆菌均能够利用高粱中的碳源、氮源等营养物质进行生长代谢合成吡嗪,菌株 J1 产吡嗪能力最佳,总吡嗪产量为 310.47 mg/L,因此选择菌株 J1 进行后续实验。

2.3 菌株 J1 鉴定结果

2.3.1 形态学鉴定结果

菌株 J1 菌落边缘不规则,有黏性,表面产膜有褶皱,染色后显微镜下呈紫色,如图 2 所示。

表 2 正交试验设计因素与水平

Table 2 Orthogonal experimental design factors and levels

水平	因素 Factor			
Level	A: 接种浓度 A: Inoculation concentration (CFU/mL)	B: 接种比例 B: Inoculation ratio	C: 接种时间 C: Inoculation time (d)	D: 升温温度 D: Temperature rise (°C)
1	10^6	1:1	0	40
2	10^7	1:10	1	45
3	10^8	1:100	2	50

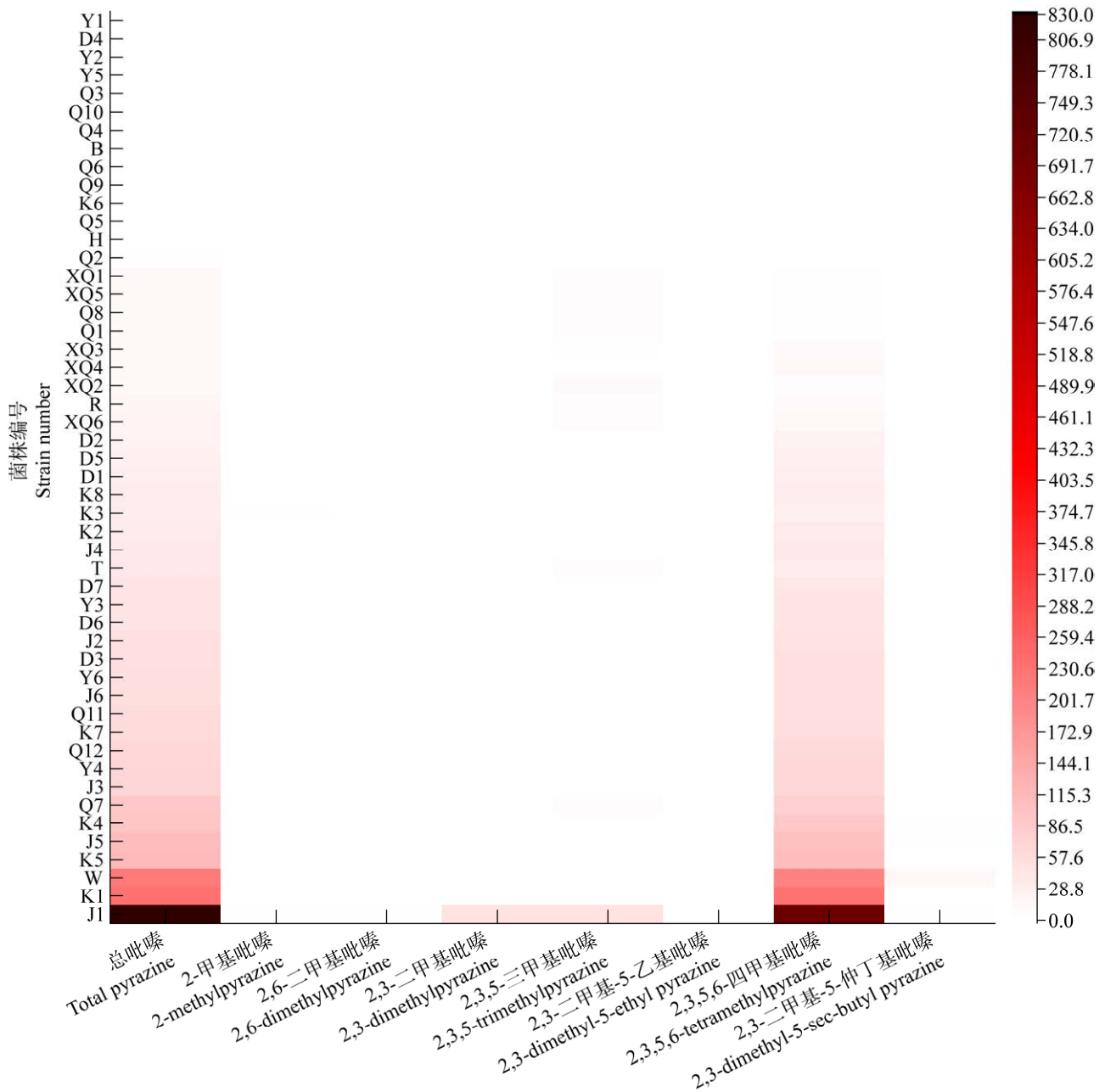


图 1 YPG 培养基中 50 株芽孢杆菌发酵产吡嗪能力比较
Figure 1 Comparison of pyrazine production capacity in YPG medium fermentation.

2.3.2 分子生物学鉴定结果

基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树见图 3，运用 NCBI 网站中 BLAST 程序进行同源性比对，菌株 J1 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) Z7 亲缘关系较近。基于菌株形态观察和分子生物学鉴定结果，菌株 J1 被鉴定为

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

2.4 芽孢杆菌产吡嗪发酵条件优化

2.4.1 不同接种量对发酵的影响

按菌液与粮食的不同接种百分比接种，吡嗪产量结果见图 4。接种量为 10%时，吡嗪类化合物产量最高且与其他实验组相比差异显著，可

表 3 混合固态发酵吡嗪含量比较

Table 3 Comparison of pyrazine content in mixed solid-state fermentation

吡嗪种类 Pyrazine species	吡嗪含量 Content of pyrazine (mg/L)				
	Strain J1	Strain J5	Strain K1	Strain K5	Strain W
2,6-二甲基吡嗪 2,6-dimethylpyrazine	0.83±0.07	0.53±0.05	—	—	—
2,3-二甲基吡嗪 2,3-dimethylpyrazine	0.12±0.03	4.48±0.79	—	—	—
2,3,5-三甲基吡嗪 2,3,5-trimethylpyrazine	3.13±0.21	2.87±0.22	0.56±0.13	1.07±0.06	—
2,3-二甲基-5-乙基吡嗪 2,3-dimethyl-5-ethyl pyrazine	4.26±1.04	—	—	—	—
2,3,5,6-四甲基吡嗪 2,3,5,6-tetramethylpyrazine	302.12±27.81	96.60±10.88	8.99±1.01	10.51±1.98	—
总吡嗪 Total pyrazine	310.47±29.16	104.48±11.94	9.55±1.14	11.59±2.04	—

—: 没有该类吡嗪类化合物生成。

—: No pyrazines of this class are formed.

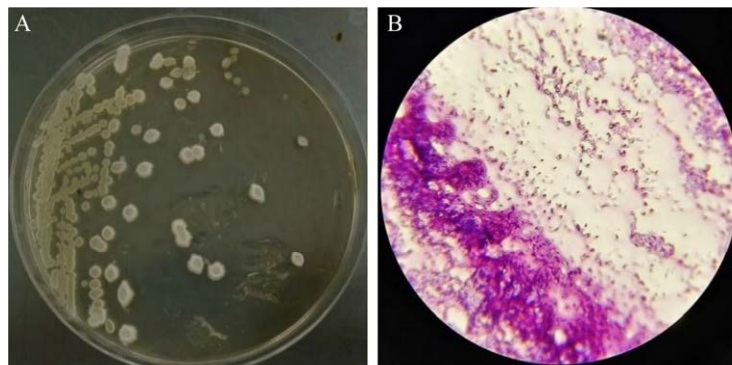


图 2 菌株 J1 的菌落形态(A)和细胞形态(B)

Figure 2 Colony morphology (A) and cell morphology (B) of strain J1.

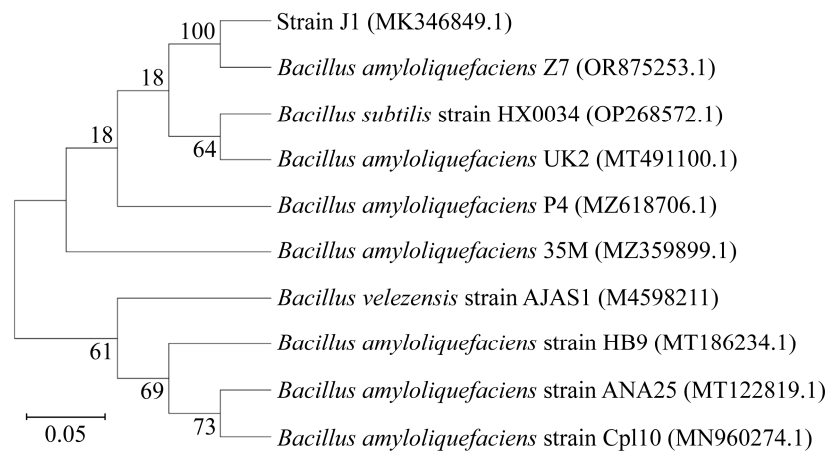


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 J1 的系统发育树 括号内的序号为 GenBank 登录号; 节点处的数字为 bootstrap 支持度; 标尺表示进化距离。

Figure 3 Phylogenetic tree of strain J1 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The serial number in parentheses is the GenBank accession number, and the number at the node is bootstrap support. The ruler represents the evolutionary distance.

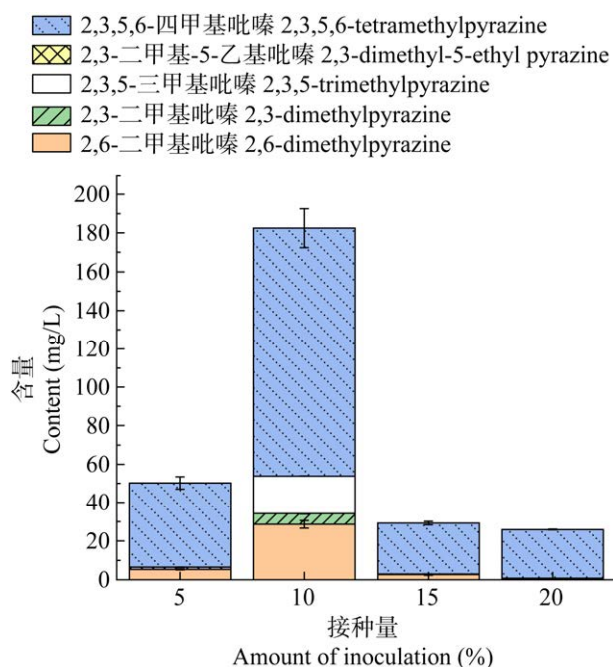


图 4 不同接种量对吡嗪含量的影响

Figure 4 Effect of different inoculation doses on pyrazine content.

能是因为此时酒醅的理化状态最适宜菌株的代谢。因此确定接种量为 10% 进行后续实验。

2.4.2 不同接种浓度对发酵的影响

接种浓度对发酵的影响如图 5A 所示。吡嗪产量随着接种浓度增加而升高，当接种浓度为 10^7 CFU/mL 时，总吡嗪产量达到最高，其中 2,6-二甲基吡嗪、三甲基吡嗪和四甲基吡嗪含量大幅增加，但接种浓度升高到 10^8 CFU/mL 时，吡嗪产量降低，可能是因为菌体浓度过高时，会造成营养物质消耗过快、溶氧下降、菌体活力下降等现象，对菌株的代谢产生影响^[17]。因此选择接种浓度 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/mL 进行正交试验。

2.4.3 不同接种比例对发酵的影响

酿酒酵母可进一步模拟实际固态发酵过程，但酿酒酵母的加入可能会与芽孢杆菌产生相互作用^[18]。按不同的接种比例接种对发酵酒醅的影响如图 5B 所示。在酿酒酵母和菌株 J1

比例为 1:10 时，吡嗪产量最高；酵母接种比例大于芽孢杆菌时，吡嗪产量最低。可能是因为芽孢杆菌和酵母的生长代谢存在一定的抑制作用，当酵母成为优势菌时会影响芽孢杆菌代谢产吡嗪的效果。选择接种比例 1:1、1:10、1:100 进行正交试验。

2.4.4 不同接种时间对发酵的影响

先接种酿酒酵母模拟实际生产中的酿酒酵母，选择一个合适的时间加入芽孢杆菌也是一个重要的影响因素。选择不同的接种时间对发酵的影响如图 5C 所示，在接种酿酒酵母后 1 d 接种 J1 芽孢杆菌，吡嗪含量最高。接种时间越晚，吡嗪含量越低，在第 3 天后接种，2,3-二甲基吡嗪不再产生，在第 6 天后接种，只存在少量的四甲基吡嗪，在第 7 天接种时，吡嗪含量几乎为 0，可能是因为随着接种酵母时间增加，酵母已成为优势菌，抑制了芽孢杆菌的生长。因此选择接种时间为 0、1、2 d 进行正交试验。

2.4.5 不同梯度温度对发酵的影响

在实际生产中，随着堆积发酵的进行，各种微生物代谢放热会使酒醅温度逐渐升高，受天气、环境等因素的影响，堆芯最高可达到 50°C 左右。探究不同梯度温度对产吡嗪效果的影响，结果如图 5D。升温到 45°C 以上有四甲基吡嗪开始生成，总吡嗪产量明显增加， 50°C 时总吡嗪产量最高，说明高温有利于吡嗪的生成，这与 Ru 等^[19]的研究结果一致。因此选择温度升高至 40 、 45 、 50°C 进行正交试验。

2.4.6 芽孢杆菌产吡嗪发酵正交试验

正交试验结果如表 4 所示。由四因素三水平正交试验得出产吡嗪最优组合 ($A_1B_3C_3D_3$) 发酵条件下吡嗪类化合物含量为 279.44 mg/L。根据极差分析结果可以发现，因素 D 升温温度的影响最大，其次是 C 接种时间，因素 A 接种浓度影响最小。

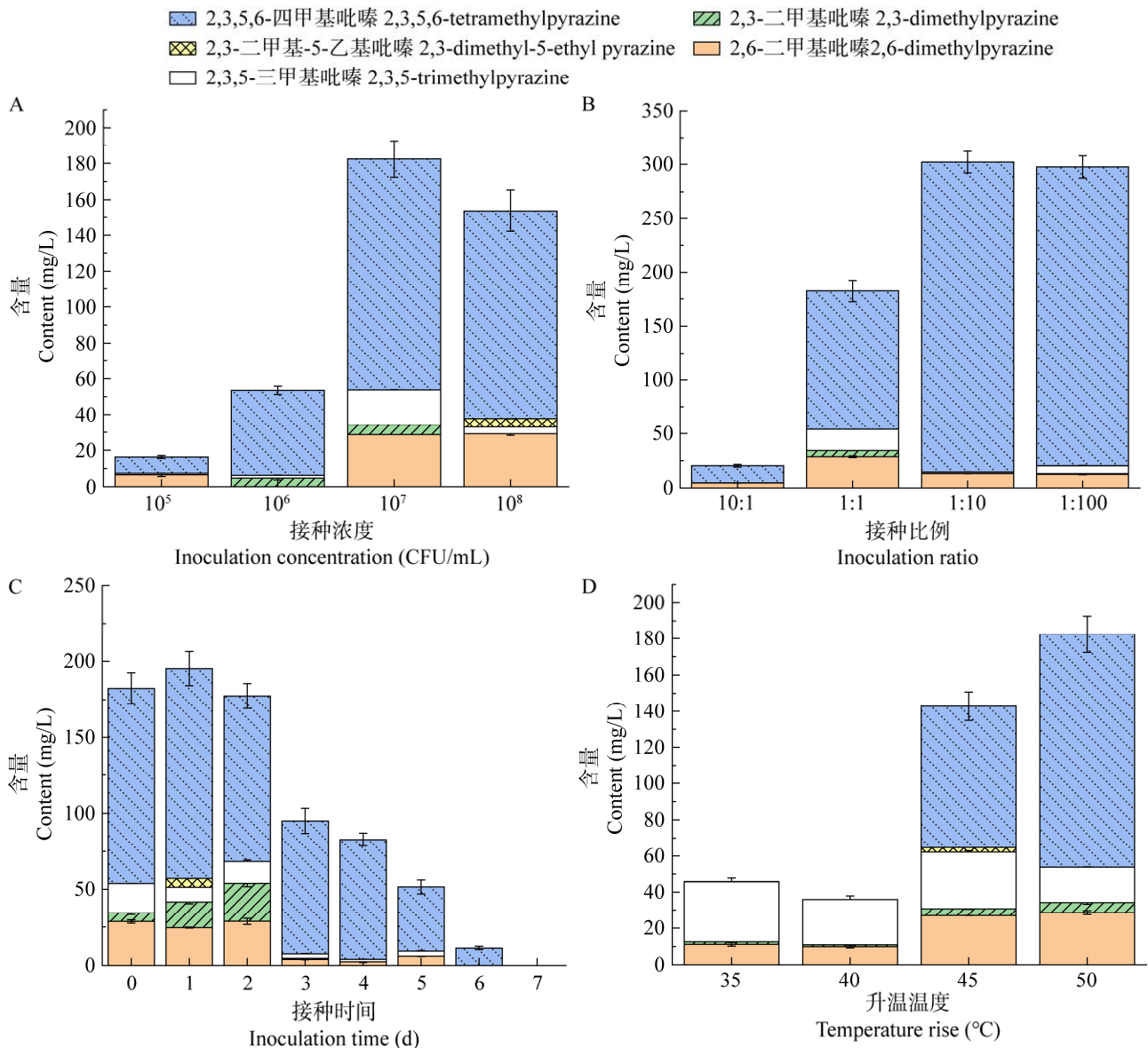


图5 不同条件下固态发酵对吡嗪含量的影响 A: 接种浓度; B: 接种比例; C: 接种时间; D: 升温温度。

Figure 5 Effect of solid-state fermentation on pyrazine content under different conditions. A: Inoculation concentration; B: Inoculation ratio; C: Inoculation time; D: Temperature rise.

验证正交试验的预测值与实验真实值之间的拟合程度结果如图6所示,在极差分析预测发酵条件下,吡嗪类化合物产量为322.48 mg/L。因此,最优发酵条件($A_2B_3C_3D_3$)是:接种浓度为 10^7 CFU/mL,接种比例1:100, J1接种时间为2 d,升温至 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 。验证实验的总吡嗪产量比单

因素和正交试验总吡嗪产量高,说明正交试验优化的最优工艺条件稳定可靠。

2.5 模拟发酵结果

模拟发酵结果如图7A所示,在堆积发酵结束时,实验组的还原糖含量比对照组高,而出窖后大幅度降低,说明菌株在入窖发酵阶段

表 4 正交试验中固态发酵产吡嗪能力比较

Table 4 Comparison of pyrazine production capacity of solid-state fermentation in orthogonal experiments

实验编号 Experiment t number	A: 接种浓度 A: Inoculation concentration	B: 接种比例 B: Inoculation ratio	C: 接种时间 C: Inoculation time	D: 升温温度 D: Temperature rise	实验安排 Arrangement of the experiment	吡嗪含量 Content of pyrazine (mg/L)
1	10 ⁸ CFU/mL	1:100	1 d	40 °C	A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	8.67
2	10 ⁸ CFU/mL	1:1	2 d	45 °C	A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	42.92
3	10 ⁷ CFU/mL	1:100	0 d	45 °C	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂	77.79
4	10 ⁷ CFU/mL	1:10	2 d	40 °C	A ₂ B ₃ C ₁ D ₁	55.03
5	10 ⁷ CFU/mL	1:1	1 d	50 °C	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	145.57
6	10 ⁶ CFU/mL	1:100	2 d	50 °C	A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	279.44
7	10 ⁶ CFU/mL	1:1	0 d	40 °C	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	11.09
8	10 ⁸ CFU/mL	1:10	0 d	50 °C	A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	156.68
9	10 ⁶ CFU/mL	1:10	1 d	45 °C	A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	12.38
K ₁	302.91	199.58	245.65	74.79		
K ₂	278.39	224.09	166.62	133.09		
K ₃	208.27	365.90	377.39	581.69		
K ₁	90.97	66.53	81.85	24.93		
K ₂	92.80	74.70	55.54	44.36		
K ₃	69.42	121.97	125.80	193.90		
R	31.55	55.44	70.26	168.97		

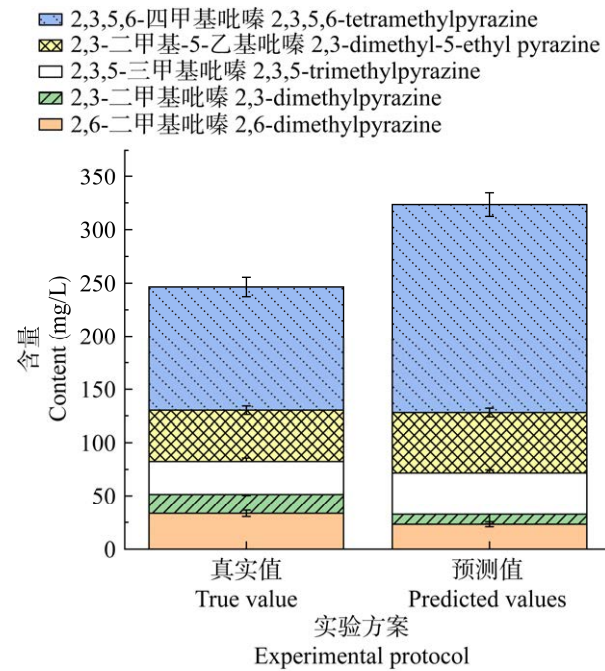


图 6 验证实验中固态发酵产吡嗪能力比较
Figure 6 Comparison of pyrazine-producing capacity of solid-state fermentation in verification experiments.

利用了小分子糖合成吡嗪类化合物，出窖后实验组比对照组的残淀粉含量低。在吡嗪产量方面，由图 7B 得出加菌的实验组均比未加菌对照组产吡嗪量高，加菌组出窖时吡嗪含量最高，达到 111.04 mg/L。其中，2,6-二甲基吡嗪均在窖池发酵阶段产生，2,3-二甲基吡嗪只存在于出窖后的加菌实验组。吡嗪类化合物合成途径相似，有些吡嗪类化合物也可与醛反应生成同位素吡嗪^[20]，可以相互转化，因此吡嗪类化合物种类丰富。

2.6 原位发酵结果

在模拟发酵基础上，进一步进行原位发酵实验。根据单因素和正交优化试验，将接种浓度为 10⁷ CFU/mL，接种比例 1:100，菌株 J1 接种时间为 2 d 的发酵条件用于第 7 轮次堆积发酵、入窖发酵过程中。堆积结束入窖时和发酵结束出窖后的理化指标如表 5 所示。可以看出在入窖时和出窖时，实验组对淀粉的利用分别

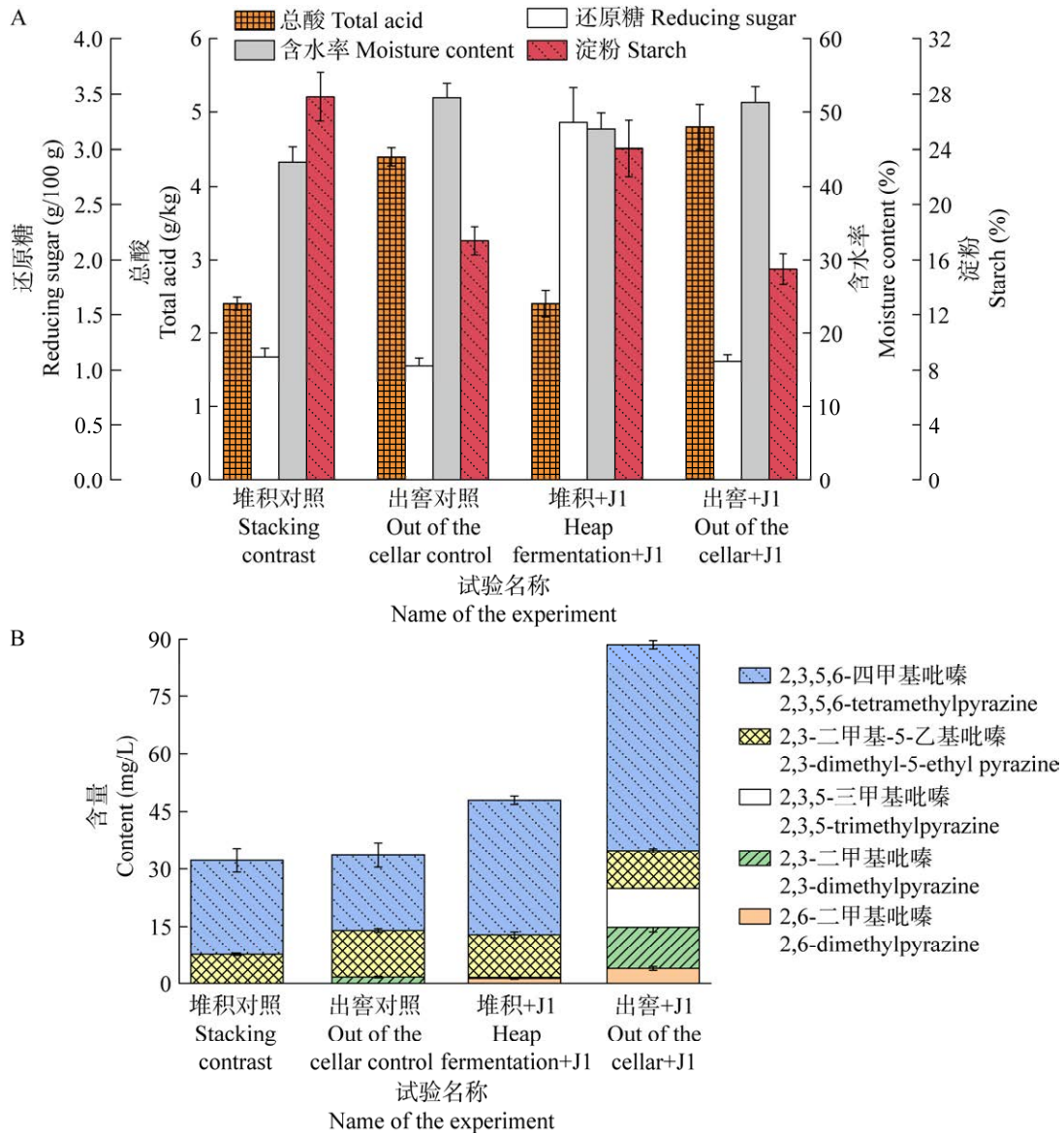


图 7 模拟发酵中酒醅理化指标(A)和酒样中吡嗪含量(B)

Figure 7 Physicochemical indexes (A) and pyrazine content (B) in Baijiu samples during simulated fermentation.

表 5 原位发酵中实验组与对照组酒醅理化指标比较

Table 5 Comparison of physicochemical indexes of fermented grains between the experimental group and the control group in *in-situ* fermentation

理化指标 Physical and chemical indicators	对照组 Control group		实验组 Experimental group	
	入窖时 Into the cellar	出窖时 Out of the cellar	入窖时 Into the cellar	出窖时 Out of the cellar
水分 Moisture (%)	47.00±0.79	45.40±1.02	46.40±0.48	47.60±0.98
总酸 Total acid (g/L)	6.40±0.52	6.00±0.61	5.80±0.55	5.20±0.47
还原糖 Reducing sugar (g/100 g)	4.08±0.41	3.56±0.33	5.52±0.43	4.66±0.56
淀粉 Starch (%)	18.81±0.77	18.26±0.98	17.74±0.65	16.46±0.81

比对照组提升了 1.07%和 1.80%,从出窖时和入窖时还原糖的差值来看,实验组比对照组还原糖的利用率更高,说明芽孢杆菌充分利用了发酵过程中分解的小分子碳源。

入窖发酵时和出窖时对照组和实验组产吡嗪及总挥发性化合物结果如图 8A 所示。在堆积发酵结束后入窖时,实验组总吡嗪产量比对照组略有升高,主要体现在三甲基吡嗪含量的升高。在出窖时,实验组总吡嗪含量高达 480.87 mg/L,约是对照组的 10 倍。其中,2,3-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪、三甲基吡嗪含量大幅提升。图 8B 表明,加入芽孢杆菌后酯类化合物产量也有显著提高,是对照组的 3.09 倍,可能是在堆积结束后,酸类物质增多,与醇类物质发生了酯化作用。其中,己酸乙酯、乳酸乙酯和乙酸乙酯为白酒中重要的香味成分,这 3 种化合物

实验组分别比对照组提高了 2.71、2.78 和 3.12 倍,这 3 种物质分别呈现出甜香、水果香、菠萝苹果香^[21];另外,对照组中未产生但实验组中大量产生的物质包括乙酸异戊酯、壬酸乙酯、乙酸己酯、己酸异丁酯、丁酸苯乙酯。据文献[19]和文献[22]报道,酯类物质多为花香、果香等怡人的气味,提高白酒风味。醛、酮、呋喃类物质较对照组也略有提高,可以增加白酒风味的丰富度和层次。对实验组和对照组进行感官品评,结果如图 9 所示,实验组酒样的花香、甜香、焦香、粮香、果香风味评分均高于对照组,并且各风味协调性较强,实验组酒样的风味持久性优于对照组。说明实验组加入了芽孢杆菌,对发酵过程高产吡嗪类化合物效果显著,郭春生等^[23]以高温大曲为材料,筛选出一株高产四甲基吡嗪的解淀粉芽孢杆菌,在发酵第 6 天添

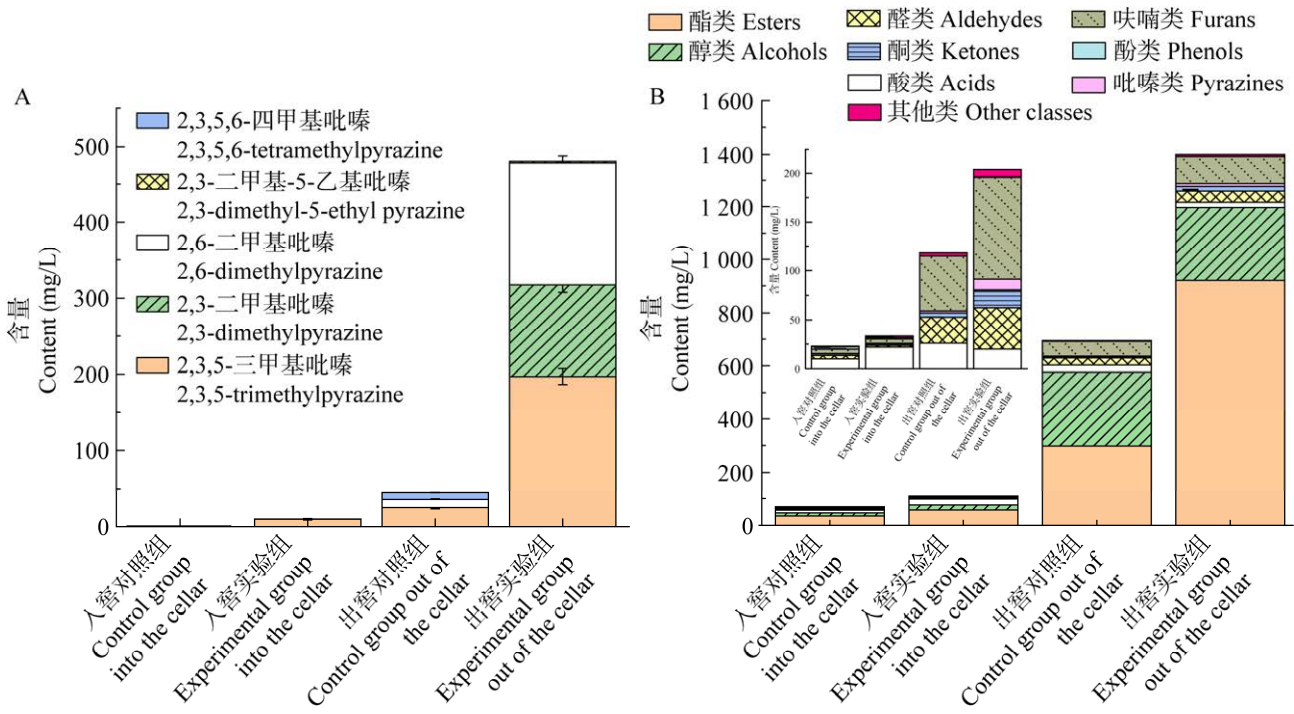


图 8 原位发酵中白酒吡嗪(A)及总挥发性化合物(B)含量

Figure 8 Comparison of pyrazine (A) and total volatile compounds (B) during *in-situ* fermentation in Baijiu.

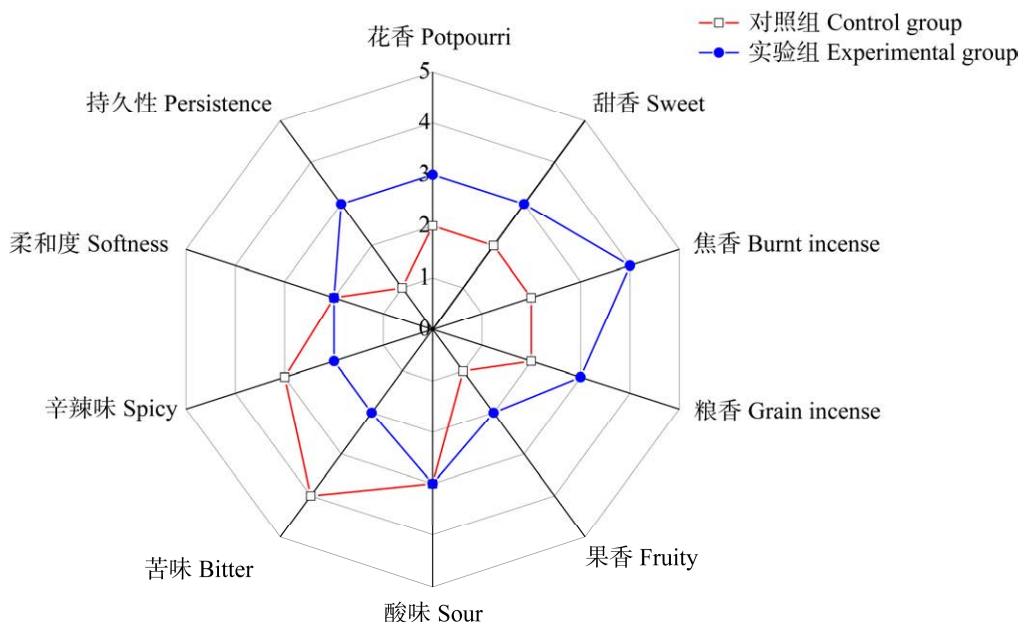


图9 酒样的感官雷达图

Figure 9 Sensory radar map of Baijiu sample.

加铵盐, 四甲基吡嗪产量为 (166.19 ± 2.79) mg/L。He 等^[24]在大曲中接种贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 实验组大曲中吡嗪含量比对照大曲增加 90.8%。与文献中已有研究相比, 本实验所筛选的解淀粉芽孢杆菌及优化的发酵条件有效提高了白酒中总吡嗪含量, 达到 480.87 mg/L, 同时其他微量风味化合物含量也有所提高, 白酒感官风味协调性及持久性较强, 有效提升了白酒的品质。

3 讨论

吡嗪类化合物是酱香型白酒重要的风味物质, 吡嗪类化合物及加热香气说是有关酱香型白酒主体香成分学说之一, 其认为生成酱香成分的主要途径包括氨基酸与蛋白质在高温下发生分解, 糖类参与的反应过程以及微生物代谢过程中生成的吡嗪类化合物^[11]。芽孢杆菌是产吡嗪类化合物的主要微生物, 在酿酒过程中, 芽孢杆菌充分发挥其产酶能力, 为发酵提供葡萄糖

和游离氨基酸, 产出的酶与霉菌相互作用, 促进原料中复杂大分子的降解, 并在发酵的初期促进各类风味成分及其前体物的积累。目前大多数研究围绕提高四甲基吡嗪产量展开^[22], 而其他吡嗪类化合物也有其独特风味和贡献。本实验对高产总吡嗪类化合物的芽孢杆菌进行筛选, 筛选菌株在初筛复筛阶段吡嗪类化合物含量明显高于其他菌株, 在接种浓度为 10^7 CFU/mL、酿酒酵母与菌株 J1 接种比例 1:100、菌株 J1 接种时间为酿酒酵母后 2 d、升温至 50 °C 的优化条件下, 吡嗪类化合物含量可达 322.48 mg/L。在强化方式上, 目前大多数研究是通过强化大曲的方法将菌株引入发酵^[23], 本研究从酱香型白酒酿造环境、酒醅、大曲中分离筛选出安全、健康、适应酿造环境的芽孢杆菌, 优化发酵条件后直接应用于发酵酒醅中, 通过模拟发酵进行小试, 随后引入堆积发酵和入窖发酵, 与文献中已有研究相比, 本实验所筛选菌株及优化的发酵条件有效提高了白酒中总吡嗪含量, 达到 480.87 mg/L,

并且酒体感官风味协调。

4 结论

本研究通过对来自酱香型白酒酿造环境、酒醅、大曲中的 50 株芽孢杆菌进行 YPG 液态发酵初筛和固态发酵复筛,产总吡嗪最高的菌株 J1 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。采用单因素和正交试验确定菌株 J1 的最优发酵条件是:接种浓度 10^7 CFU/mL,酿酒酵母与菌株 J1 接种比例为 1:100,菌株 J1 接种时间为接种酵母后 2 d,升温至 50 °C。随后进行模拟小试发酵,结果显示堆积和入窖发酵阶段,加 J1 实验组均比未加菌对照组的总吡嗪产量多。进一步用优化条件在酱香型白酒的生产车间进行原位发酵,吡嗪类化合物总量达 480.87 mg/L,约是对照组的 10 倍。与此同时,酒样中酯类化合物显著提高,醛、酮、呋喃类物质较对照组也略有提高,增加了白酒风味的丰富度和层次。

REFERENCES

- [1] ZHANG HZ, ZHANG LJ, YU XW, XU Y. The biosynthesis mechanism involving 2,3-pentanedione and aminoacetone describes the production of 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine by *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(11): 3558-3567.
- [2] 吕晓凤. 高产吡嗪类化合物的芽孢杆菌在芝麻香白酒中的应用研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2023.
LÜ XF. Study on the application of *Bacillus* with high pyrazine compounds in sesame-flavored liquor[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2023 (in Chinese).
- [3] 赵莹, 胡建锋, 钟航, 李吉炼, 黄蓝花, 毕远林, 席德州, 张德芹. 酱香型白酒不同调味酒的应用研究进展[J]. 酿酒科技, 2023(5): 123-127.
ZHAO Y, HU JF, ZHONG H, LI LJ, HUANG LH, BI YL, XI DZ, ZHANG DQ. Research progress in the application of different flavoring liquors in Jiangxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2023(5): 123-127 (in Chinese).
- [4] XU T, CHEN GH, TONG X, WU YT, XU HL, HAN X, ZHANG GY, DING WJ, LIU B, ZHOU YC. Tetramethylpyrazine: a review of the most recent research[J]. Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine, 2022, 5: 100171.
- [5] CHOUDHARY D, GARG S, KAUR M, SOHAL HS, MALHI DS, KAUR L, VERMA M, SHARMA A, MUTREJA V. Advances in the synthesis and bio-applications of pyrazine derivatives: a review[J]. Polycyclic Aromatic Compounds, 2023, 43(5): 4512-4578.
- [6] LI X, ZHANG BS, LI WX, ZHAO YW, LYU XT, YOU XL, LIN LC, ZHANG CY. Unraveling the chemosensory characteristics dependence of sauce-flavor Baijiu on regionality using descriptive sensory analysis and quantitative targeted flavoromics[J]. Food Chemistry, 2024, 441: 138274.
- [7] YU H, ZHANG RY, YANG FW, XIE YF, GUO YH, YAO WR, ZHOU WB. Control strategies of pyrazines generation from Maillard reaction[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 795-807.
- [8] ZHU Q, CHEN LQ, PU XX, DU GC, YANG F, LU JJ, PENG Z, ZHANG J, TU HB. The differences in the composition of Maillard components between three kinds of sauce-flavor daqu[J]. Fermentation, 2023, 9(9): 860.
- [9] 戴奕杰. 酱香型白酒酿造过程中微生物群落组成及其与酒品质的关系[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2019.
DAI YJ. Composition of microbial community in the process of maotai-flavor liquor brewing and its relationship with liquor quality[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [10] 李声睿, 张立强, 魏阳, 冉茂芳, 涂荣坤, 杨平, 沈才洪, 王松涛, 明红梅, 倪斌. 不同堆积发酵方式高温大曲理化指标及微生物关联性研究[J]. 食品与发酵工业, 2024(1): 1-15.
LI SR, ZHANG LQ, WEI Y, RAN MF, TU RK, YANG P, SHEN CH, WANG ST, MING HM, NI B. Investigation of physicochemical indexes and microbial correlation of high temperature Daqu in different fermentation methods[J]. Food and Fermentation Industries, 2024(1): 1-15 (in Chinese).
- [11] 岳腾飞, 梁伟伟, 李子森, 关玉权, 张志勇, 薛锡佳, 程伟. 现代酶工程技术及其在白酒酿造生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2022(8): 103-111.
YUE TF, LIANG WW, LI ZS, GUAN YQ, ZHANG ZY, XUE XJ, CHENG W. Modern enzyme engineering technology and its application in Baijiu production[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2022(8): 103-111 (in Chinese).
- [12] 张温清, 司冠儒, 梅婕, 汪家胜, 李井雷, 周慧佳, 叶明, 夏少东, 程凡, 郭志忠, 周萍. 江南小窖宣酒酿造微生态系统中高产四甲基吡嗪功能微生物的筛选与鉴定[J]. 酿酒科技, 2020(2): 55-59, 64.
ZHANG WQ, SI GR, MEI J, WANG JS, LI JL, ZHOU HJ, YE M, XIA SD, CHENG F, GUO ZZ, ZHOU P. Screening and identification of functional strains with high-yield of tetramethylpyrazine in the brewing micro-ecological system of Xuanjiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2020(2): 55-59, 64 (in Chinese).
- [13] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
WANG FR. Brewing Analysis and Detection[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005 (in Chinese).
- [14] 王学娇, 张河云, 王旭, 马立娟, 张欢, 李继齐, 李

- 昂, 杜丽平. 天津酱香白酒不同轮次酒风味解析[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(13): 141-152.
WANG XJ, ZHANG HY, WANG X, MA LJ, ZHANG H, LI JQ, LI A, DU LP. Flavor analysis of different rounds liquors of Tianjin sauce-flavor Baijiu[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(13): 141-152 (in Chinese).
- [15] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 白酒感官品评导则: GB/T 33404—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Guidelines for sensory evaluation of Baijiu: GB/T 33404—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese).
- [16] 吴雨霁, 孙羊羊, 尹亚格, 王华威, 李继齐, 杜丽平. 酱香型白酒酒醅中乳酸菌的分离鉴定及其益生特性研究[J]. 中国酿造, 2023, 42(4): 76-82.
WU YM, SUN YY, YIN YG, WANG HW, LI JQ, DU LP. Isolation, identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria in fermented grains of sauce-flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2023, 42(4): 76-82 (in Chinese).
- [17] 陆文清, 章克昌, 吴佩琮. 核黄素产生菌的补料发酵[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3): 240-243.
LU WQ, ZHANG KC, WU PC. Batch-fed fermentation of riboflavin producing strain *E. ashbyii*[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2000, 19(3): 240-243 (in Chinese).
- [18] SHI XS, ZHAO SM, CHEN SX, HAN XL, YANG Q, ZHANG L, XIA X, TU JM, HU YL. Tetramethylpyrazine in Chinese Baijiu: presence, analysis, formation, and regulation[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1004435.
- [19] RU HL, XU HY, LI Q, YU YG, ZHENG Q. Equilibrium of esterification in Chinese distilled liquor (Baijiu) during ageing[J]. LWT, 2024, 192: 115735.
- [20] 张霁月. 超声波对酱油的催陈作用及其吡嗪类化合物加速合成机理研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2022.
ZHANG RY. Study on the aging effect of ultrasonic wave on soy sauce and the mechanism of accelerating the synthesis of pyrazine compounds[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [21] 胡晓龙, 田瑞杰, 樊建辉, 韩素娜, 李建民, 李华, 王亚平, 何培新. 浓香型白酒挥发性化合物香气贡献及其地域特征研究进展[J]. 轻工学报, 2022, 37(2): 1-14.
HU XL, TIAN RJ, FAN JH, HAN SN, LI JM, LI H, WANG YP, HE PX. Research progress on the aroma contribution and their regional characteristics of volatile compounds in Chinese strong-flavor Baijiu[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(2): 1-14 (in Chinese).
- [22] PEÑA-CORREA RF, ATAÇ MOGOL B, van BOEKEL MAJS, FOGLIANO V. Fluidized bed roasting of cocoa nibs speeds up processing and favors the formation of pyrazines[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 79: 103062.
- [23] 郭春生, 杨舟, 乔月梅, 杨婧, 赵永红, 李林达, 李力群. 高产四甲基吡嗪微生物的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(9): 80-85.
GUO CS, YANG Z, QIAO YM, YANG J, ZHAO YH, LI LD, LI LQ. Screening, identification and fermentation conditions optimization of high yield tetramethylpyrazine microorganism[J]. China Brewing, 2022, 41(9): 80-85 (in Chinese).
- [24] HE GQ, DONG Y, HUANG J, WANG XJ, ZHANG SY, WU CD, JIN Y, ZHOU RQ. Alteration of microbial community for improving flavor character of Daqu by inoculation with *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis*[J]. LWT, 2019, 111: 1-8.