酱香型酒醅产香芽孢杆菌的分离鉴定及其代谢产物分析

钟姝霞，邓杰，汪文鹏，李永博，卫春会，黄治国

（四川理工学院生物工程学院，酿酒生物技术及应用四川省重点实验室，四川自贡 643000）

摘要：本文研究了酱香型酒醅中的产香芽孢杆菌及其优势代谢产物。通过平板分离法从酱香型酒醅中筛选出 5 株芽孢杆菌，采用 PLFA 技术对其鉴定，分别为：蜡样芽孢杆菌（*Bacillus ereus*）、泛酸枝芽孢杆菌（*Virgibacillus pantothenticus*）、巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）和地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）；革兰氏染色试验结果说明：这五类菌株均为革兰氏阳性菌；生化分析发现：枯草芽孢杆菌产淀粉酶能力最强，巨大芽孢杆菌蛋白质水解能力最强；以高粱粉为底物进行固态发酵，采用 GC-MS 分析技术对发酵代谢产物进行分析表明：菌株的优势产物主要为 3-羟基-2-丁酮，另外还有少量的 2,3-丁二醇和酯类等芳香物质。蜡样芽孢杆菌、泛酸枝芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌这五类菌株是酱香型白酒主要的产香功能菌。

关键词：酱香型酒醅；芽孢杆菌；PLFA 技术；优势产物

文章篇号：1673-9078(2017)4-89-95 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.014

Isolation, Identification, and Metabolite Analysis of Aroma-producing *Bacillus* spp. from Maotai-flavor Fermented Grains

ZHONG Shu-xia, DENG Jie, WANG Wen-peng, LI Yong-bo, WEI Chun-hui, HUANG Zhi-guo

(Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Making Bio-Technology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000, China)

Abstrate: Aroma-producing *Bacillus* spp. and their major metabolites from Maotai-flavor fermented grains were investigated in this study. Five *Bacillus* strains were isolated from Maotai-flavor fermented grains using the plate dilution method. Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis was adopted to identify the strains, which were *Bacillus cereus*, *Virgibacillus pantothenticus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus licheniformis*. Gram staining revealed that the strains were all gram-positive bacteria. Biochemical analysis indicated that *Bacillus cereus* exhibited the highest amylase-producing capacity, while *Bacillus megaterium* exhibited the highest protein hydrolysis capacity. Solid state fermentation was performed using local sorghum powder as a substrate, and metabolites were detected by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that 3-hydroxy-2-butanone was the major product, and a small quantity of aromatic compounds, such as 2,3-butanediol and esters, was also detected. The flavor-producing *Bacillus* strains in the grains were mainly *Bacillus cereus*, *Virgibacillus pantothenticus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus licheniformis*.

Key words: Maotai-flavor fermented grains; *Bacillus;* phospholipid fatty acid technique; major product

酱香型白酒酒醅参与多轮发酵，其中蕴含大量发酵微生物，为白酒独特的酱香风味起到关键作用。根据相关文献得知[1]，窖泥和酒醅中含有的微生物体系不尽相同。窖泥中特有菌种及其代谢产物和酒醅中菌种及其代谢产物通过黄水相互进行物质能量交换。近年来研究人员对酒醅及窖泥的关注增多，其重要性越来越多的被发现[2]。酱香型白酒的功能细菌主要是芽孢杆菌，它具有一定的液化力、糖化力及蛋白质水解力，有利于原料中淀粉的糖化和蛋白质的分解，有助于出酒率的提高[3]。芽孢杆菌属[4]（*Bacillus*）是一类产芽孢的革兰氏阳性细菌，好氧或兼性厌氧生活，产生具有抗逆性球形或椭圆形芽孢。芽孢对高温、紫外线、干燥、电离辐射和很多有毒的化学物质都有很强的抗性。

目前，除了传统方法如菌体形态观察外，诸多分子生物学的方法被引进微生物的研究中，如基于 PCR

收稿日期：2016-05-12

基金项目：国家固态酿造工程技术研究中心开放课题（2015k-246）；酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目（NJ2014-16）；四川理工学院人才引进项目（2014RC28）

作者简介：钟姝霞（1990-），女，在读研究生，研究方向：发酵工程

通讯作者：黄治国（1978-），男，博士，教授，研究方向：发酵工程

技术的 PCR-SSCP、DGGE、TGGE、RFLP[5]和基于分子水平的高通量测序[6]方法。PLFA（Phospholipid Fatty Acid）指纹图谱技术[7,8]是一种研究微生物群落结构的快捷方法，已被广泛应用于土壤、淤泥和堆肥等复杂体系的微生物群落及动态变迁规律的研究，以及可培养微生物的鉴定及群落分析，十分适合微生物群落的动态监测，因此该方法在土壤微生物群落结构分析方面，技术已经相当的成熟。较其他鉴定技术而言，PLFA 指纹图谱技术可以通过脂肪酸组成和含量的差异快速鉴定纯培养微生物的种类。微生物种类不同，其磷酸脂肪酸的类型和含量有着很大的差异，但在遗传上有着很大的稳定性。MIDI-Sherlock[9]微生物鉴定系统利用微生物的这一特性，将微生物细胞膜上的磷脂脂肪酸甲基化成脂肪酸甲酯；将提取出的脂肪酸甲酯经气相分析后，得到脂肪酸甲酯谱图，利用 MIDI-Sherlock 鉴定系统存有的数据库对谱图进行分析，从而得到微生物鉴定信息。目前，磷脂脂肪酸分析技术作为一种新的微生物生物标记法，也开始应用于白酒微生物方面的研究，但仍处于初级阶段[10]。不同香型的白酒有各自的风味特征，其微生物的作用至关重要，研究白酒的风味物质和微生物二者之间的联系将会是白酒研究的重点。因此，本实验以酱香型白酒酒醅为材料，采用平板分离法，结合 PLFA 技术和 GC-MS 分析技术对酒醅中的产香芽孢杆菌进行研究。通过研究它们的产香能力和代谢活动，为从细菌方面间接提升酱香型白酒酒质的研究提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

酒醅样品采于贵州省仁怀市茅台镇某酒厂，取出窖酒醅，在上、中、下各层，采取 3 点取样混合均匀作为一个分析样品，迅速置于冰盒运回，-20 ℃保藏。

1.2 主要试剂

甲醇、干酪素、氯化钠、可溶性淀粉、95%乙醇等为分析纯，购自成都市科龙化工试剂厂；正己烷为色谱纯，购自 Darmstadt，Germany 公司；甲基叔丁基醚为色谱纯，购自 Tedia Company。

1.3 主要仪器

微生物鉴定系统（美国 MIDI Sherlock）；气相色谱-质谱联用仪（Agilent GC7890，5975）；全自动菌落分析仪（上海智理科学仪器有限公司 Scan1200）；气相色谱仪（安捷伦科技有限公司 GC6890）；正置生物显微镜（德国徕卡 DM3000）

1.4 试验方法

1.4.1 酒醅中芽孢杆菌的分离纯化

芽孢杆菌悬液的制备：无菌称取 10 g 酒醅样品，在无菌操作台上迅速加入到装有 90 mL 无菌水的三角瓶中，充分摇匀，置于摇床振荡 1 h，将细胞悬浮。

采用稀释涂布平板法的方法对芽孢杆菌进行分离纯化，将获得的不同形态特征单克隆菌落在 4 ℃的条件下保存。

1.4.2 产香芽孢杆菌的形态观察

将分离纯化后的细菌进行革兰氏染色和制片，通过光学显微镜进行观察，对细菌的形状、大小、芽孢和包囊等状况进行记录。

1.4.3 菌种的鉴定

1.4.3.1 试剂的配制

皂化试剂：NaOH 22.5 g、甲醇 75 mL、去离子水 75 mL，将水和甲醇混合，加入固体 NaOH，边加边搅拌，直至固体完全溶解。

甲基化试剂：6 mol 盐酸 32.5 mL、甲醇 27.5 mL，加酸液到甲醇中搅拌混匀。

萃取试剂：正己烷 100 mL、甲基叔丁基醚 100 mL，加入甲基叔丁基醚（MTBE）到正己烷中并搅拌均匀。

碱洗涤：NaOH 3.6 g、去离子水 300 mL、加入 NaOH 在水中同时搅拌至完全溶解。

1.4.3.2 获菌

培养基以四区划线法接种 4 ℃保存的菌株，37 ℃培养 24 h。将所得的菌用接种环挑取第三区的菌落（约 40 mg）于螺旋试管底部，菌量宁多勿少，同时做好标记。注意小心挑种，不要将培养基带入，以免影响结果。

1.4.3.3 皂化与甲基化

取 1.0 mL 的萃取剂 1 注入试管内，将螺旋管旋紧，震荡 5~10 s 后 95~100 ℃水浴 5 min，取出试管再震荡 5~10 s，再水浴 25 min 后取出，自来水冷却后，打开螺旋盖，加入 2.0 mL 的萃取剂 2 旋好盖子后震荡 5~10 s，80 ℃水浴 10 min，取出试管，自来水冷却。

1.4.3.4 萃取与碱洗涤

打开螺旋盖，加入 1.25 mL 的萃取剂 3，旋好盖子后，将试管上下混合 10 min，注意来回混合，防止气泡产生，然后静置分层。打开盖子，用灭菌滴管吸取出下层液体，而保留上层液体。加入 3.0 mL 的萃取剂 4，旋好盖子，缓慢将试管上下混合 5 min，静止分层。若分层不明显，加少许饱和的氯化钠溶液。然后

用灭菌的玻璃滴管吸取 2/3 的上清液，移至 GC 小管内。保存于冰箱中待检。

1.4.3.5 MIDI 鉴定系统的菌相分析

将待检样品用气相色谱仪进行鉴定。气相色谱各参数由 MIDI 程序设置调用。利用相关数据库和相关计算机分析软件，鉴定样品中微生物的种类。

1.4.4 生化检测

1.4.4.1 蛋白酶活力的测定

培养基配方：牛肉膏 5 g，干酪素 5 g，琼脂 10 g，蒸馏水 500 mL，pH 7.6~7.8，121 ℃灭菌 15 min。

每类菌采用划线法划两个平板，尽量出现 5 个以上单菌落。培养 24~48 h，观察透明圈，选 3 个菌落记录菌落平均直径和透明圈平均直径及各自面积比。

1.4.4.2 淀粉酶活力的测定

培养基配方：牛肉膏 1.5 g，蛋白胨 5 g，琼脂 7.5 g，可溶性淀粉 5 g，NaCl 2.5 g，蒸馏水 500 mL，pH 7.0~7.2，121 ℃灭菌 15 min。

每类菌采用划线法划两个平板，尽量出现 5 个以上单菌落，培养 24~48 h，滴加革兰氏染色用碘，稍停片刻，观察透明圈，选 3 个菌落记录菌落平均直径和透明圈平均直径及各自面积比。

1.4.5 芽孢杆菌发酵代谢产物分析

采用液体培养基扩培（39 ℃，200 r/min 振荡培养 3 d），当菌体长到对数期时再分别接入已灭菌的高粱粉中，39 ℃固态发酵 10 d，pH 为 7.2。发酵结束后，取适量发酵样品进行顶空固相微萃取后用 GC-MS 分析其代谢产物。

气相色谱(GC)条件：DB-WAX（60.0 m×0.25 mm×0.25 μm）毛细管色谱柱；进样口温度 230 ℃；分流比 100:1；程序升温：40 ℃保持 3 min，3 ℃/min 升到 130 ℃，再以 8 ℃/min 升到 230 ℃保持 10 min；载气：99.999%氦气，载气流速：0.8 mL/min。

质谱(MS)检测条件：电离方式为电子电离(electron ionization，EI)源，电子能量 70 eV，离子源温度 230 ℃，四极杆 150 ℃，传输线温度 230 ℃，全扫描模式，扫描质量范围为 25~500 u，溶剂延迟 3 min。

1.4.6 数据统计分析

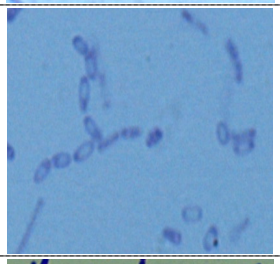
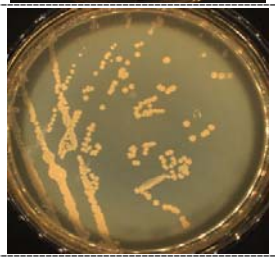
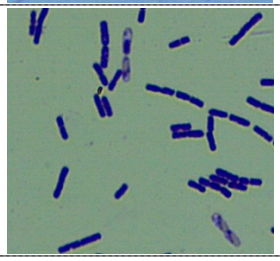
利用 SPSS 软件对数据进行方差分析（采用一般线性模型单因素 Duncan 法），检测结果用 $\bar{x}\pm Sd$ 表示，所得数据在 Excle 中编辑作图。

2 结果与讨论

2.1 芽孢杆菌的分离纯化

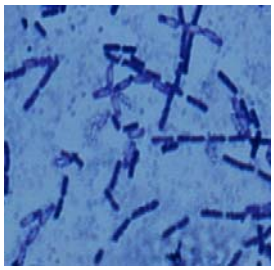
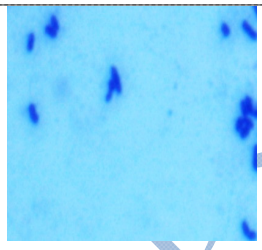
表 1 分离菌种的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of isolated strains

编号	菌落形态	菌落图	革兰氏染色镜检图
Z-2	该菌的单菌落直径为 2~3 mm，灰白色，菌落中间颜色较浅，边缘颜色较白，边缘较光滑，比较湿润，挑起黏性大，不易于挑取。		
Z-3	单菌落直径大小为 2~3 mm，黄色，湿润，光滑，不透明，粗壮，末端圆，具有流动性，有的菌落表面微皱，易于挑取，菌落培养久时会产生黑色色素。		
Z-4	单菌落直径大小 1~2 mm,白色或浊白色，扁平，干燥，无光泽，表面的呈膜状物形成褶皱，有的菌落中间有“水珠”，不易挑取。		

转下页

接上页

Z-5	单菌落直径大小 2~3 mm,浅黄灰色，菌落大，扁平，圆形，边缘不整齐，表面粗糙似溶蜡状，有蜡样光泽，易于挑取。		
Z-6	单菌落直径在 2~3 mm，米白色，菌落边缘不规则，多呈锯齿状，其正面和反面颜色一样，比较干燥，易于挑取，且挑起无黏性。		

本试验采用牛肉膏蛋白胨培养基，根据菌落形态的不同筛选出了 5 株不同的微生物，并对其编号为 Z-2、Z-3、Z-4、Z-5 和 Z-6。对分离出的 5 株芽孢杆菌进行革兰氏染色和镜检实验，5 株芽孢杆菌均为革兰氏阳性菌（表 1）。

2.2 MIDI 微生物鉴定系统鉴定结果

通过皂化、甲基化、萃取和碱洗涤等过程，提取出 5 株细菌的 PLFA，运用 MIDI 微生物鉴定系统进行了菌种鉴定。分离出的细菌为 5 种不同的芽孢杆菌，分别为地衣芽孢杆菌、泛酸枝芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌（表 2）。其中，枯草芽孢杆菌 Z-4（*Bacillus subtilis*）是产生酱香风味和芝麻香风味的重要菌种。地衣芽孢杆菌 Z-6（*Bacillus licheniformis*）是白酒生产过程中一种常见的功能菌。在发酵过程中，它可以通过代谢产生丰富的生物酶和代谢风味产物，其产生的生物酶对美拉德反应具有较强的催化反应。蜡样芽孢杆菌 Z-5（*Bacillus cereus*）能在葡萄糖肉汤中厌氧培养产酸，分解碳水化合物不产气。它也可以产生抗菌物质，抑制有害微生物的生长繁殖，改善生态环境。

表 2 MIDI 微生物鉴定系统鉴定结果

Table 2 Identification results from the MIDI microbial identification system

编号	库	相似度	名称
Z-2	TSBA6 6.21	0.701	*Virgibacillus pantothenticus* 泛酸枝芽孢杆菌
Z-3	CLIN6 6.20	0.858	*Bacillus megaterium* 巨大芽孢杆菌
Z-4	CLIN6 6.20	0.860	*Bacillus subtilis* 枯草芽孢杆菌
Z-5	CLIN6 6.20	0.830	*Bacillus cereus* 蜡样芽孢杆菌
Z-6	CLIN6 6.20	0.905	*Bacillus licheniformis* 地衣芽孢杆菌

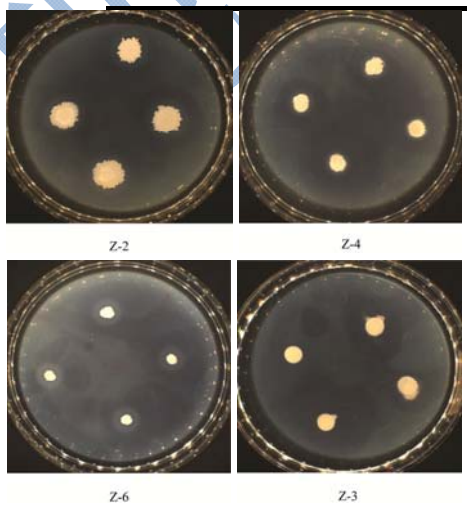


图 1 产淀粉酶菌落图

Fig.1 Images of amylase-producing colonies

2.3 产淀粉酶实验结果

本试验对各菌进行了产淀粉酶试验，其中 3 株菌的透明圈与菌落面积的比值在 1.0~2.5 之间，Z-4（枯

草芽孢杆菌）菌的比值最大，达 1.60，与 Z-2（泛酸枝芽孢杆菌）相比不显著，但显著高于 Z-6（地衣芽孢杆菌）（p<0.05）（图 1 和图 2），另外初步判断 Z-3（巨大芽孢杆菌）、Z-5（蜡样芽孢杆菌）不产淀粉酶。

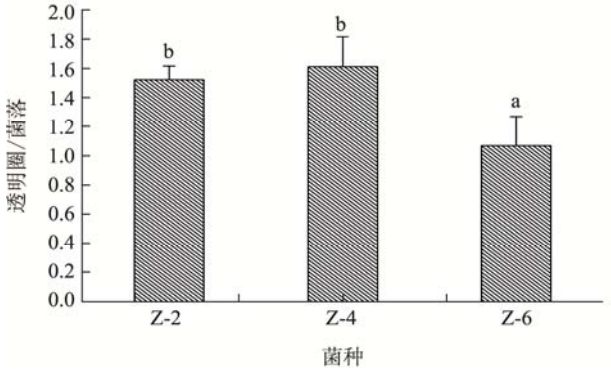


图 2 菌株产淀粉酶能力的比较

Fig.2 Comparison of the amylase-producing ability of strains

注：各菌透明圈与菌落面积的比值的差异用字母表示，有相同字母表示差异不显著（p>0.05）。

2.4 产蛋白酶实验结果

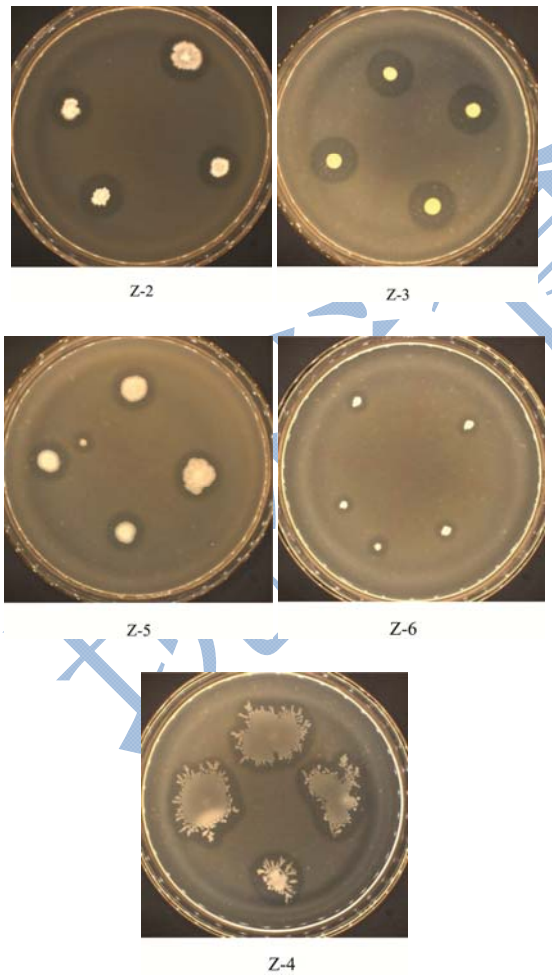


图 3 产蛋白酶菌落图

Fig.3 Images of proteinase-producing colonies

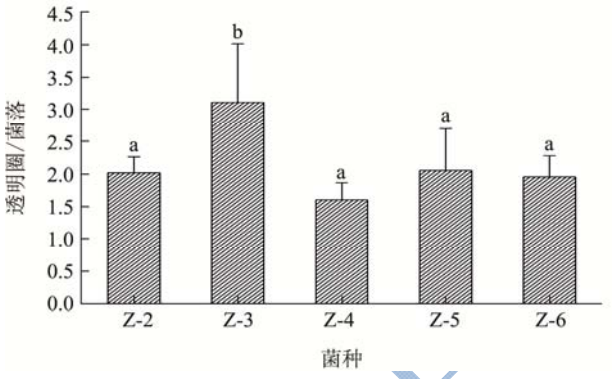


图 4 菌株蛋白质水解能力的比较

Fig.4 Comparison of protein-hydrolysis ability of strains

注：各菌透明圈与菌落面积的比值的差异用字母表示，有相同字母表示差异不显著（p>0.05）。

本试验对各菌进行了产蛋白酶试验，结果发现：5 株菌的透明圈与菌落面积的比值都在 1.5~3.5 之间，其中 Z-3（巨大芽孢杆菌）的比值最大，达 3.11，显著高于其他菌（p<0.05）（图 3 和图 4），表明其蛋白质水解能力比其他四种细菌都强。

2.5 发酵产物分析

采用气相色谱-质谱联用仪对芽孢杆菌发酵代谢产物进行分析。这些菌株的优势产物是 3-羟基-2-丁酮（乙偶姻）和 2,3-丁二醇，并含有少量的高级醇、高级酮和酯类等芳香类物质。在这几株菌中，枯草芽孢杆菌的代谢产物中乙偶姻的含量高达 67.85%，2,3-丁二酮的含量也相对较高，其他醇类、酮类物质的含量很少；巨大芽孢杆菌的代谢产物是愈创木酚和异戊醇等，有少量的 3-羟基-2-丁酮，没有其他高级醇、酮类物质，而乙苯含量达到 15.09%，这可能与其发酵的条件和方式有关；地衣芽孢杆菌和泛酸枝芽孢杆菌的 3-羟基-2-丁酮的含量也高于 50%，其他高级醇和酮类种类也较多（表 3、图 5、图 6、图 7 和图 8）。由于但 Z5（蜡样芽孢杆菌）的发酵效果不好，其产物对酱香型白酒的香味成分没有什么贡献，所以在此未列出。

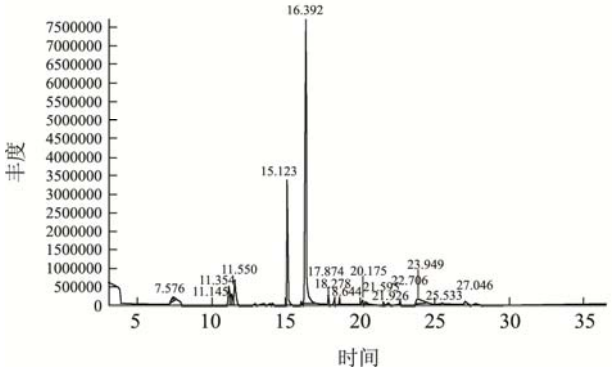


图 5 Z-6 菌株 GC-MS 分析图

Fig.5 GC-MS analysis of strain Z-6

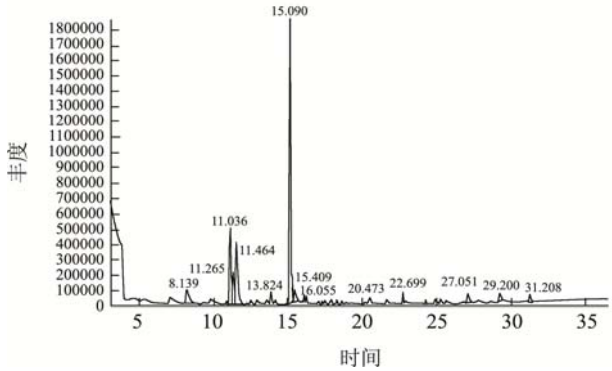


图 6 Z-3 菌株 GC-MS 分析图

Fig.6 GC-MS analysis of strain Z-3

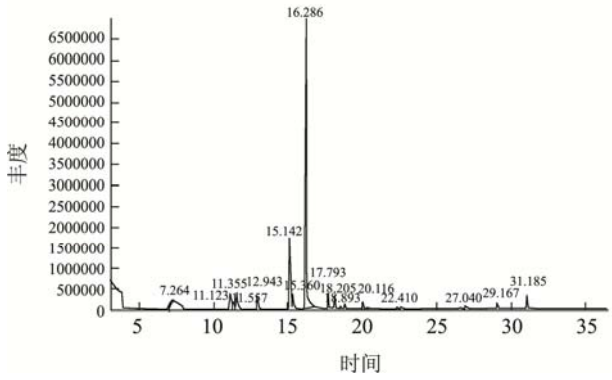


图 7 Z-2 菌株 GC-MS 分析图

Fig.7 GC-MS analysis of strain Z-2

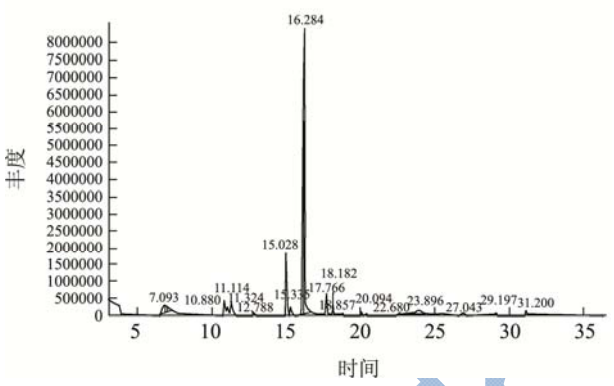


图 8 Z-4 菌株 GC-MS 分析图

Fig.8 GC-MS analysis of strain Z-4

3-羟基-2-丁酮（乙偶姻）存在于咖啡、奶油、草莓和葡萄酒等物质中，广泛用于食品、医药等行业。虽然 3-羟基-2-丁酮的香气与酱香香气没有直接联系，但它是传统发酵食品重要香气成分四甲基吡嗪生物合成的前体物质[11~13]。茅台迎宾酒中的吡嗪类化合物的总含量为 9028.80 μg/L，四甲基吡嗪的含量为 1657.84 μg/L[14]。由此可见，四甲基吡嗪是酱香型白酒中的重要香气化合物。从而，3-羟基-2-丁酮也是酱香型白酒香气化合物中的重要物质。

表 3 发酵产物分析

Table 3 Analysis of fermentation products

序号	成分名称	Z-6/%	Z-4/%	Z-3/%	Z-2/%
1	2,3-丁二酮（双乙酰）	0.44	4.75	-	0.20
2	3-羟基-2-丁酮	57.41	67.85	0.62	64.74
3	2,3-丁二醇	2.66	1.73	-	-
4	2-氨基-4-甲基苯甲酸	-	0.29	-	-
5	4-甲氧基苯酚	-	-	2.245	-
6	糠醇	0.27	-	-	-
7	异辛醇	0.12	-	-	-
8	2-庚酮	-	0.49	-	3.06
9	3-戊醇	1.11	1.72	-	1.62
10	异丙醇	-	2.04	-	-
11	2-乙基己醇	0.12	-	-	-
12	2-壬酮	-	0.16	-	0.45
13	愈创木酚	-	-	1.31	0.78
14	异戊醇	-	-	1.66	-
15	2,2-二甲基-3-庚酮	-	-	-	0.23
16	2-甲基乙酰乙酸乙酯	-	-	-	0.33
17	3,4-二乙酰基-2,5-己二酮	-	0.15	-	-
18	乙苯	-	-	15.09	-

注：“-”表示没有；Z-6 表示地衣芽孢杆菌；Z-4 表示枯草芽孢杆菌；Z-3 表示巨大芽孢杆菌；Z-2 表示泛酸枝芽孢杆菌。

3 结论

3.1 酱香白酒生产过程中的制曲、堆积和发酵等工艺中可富集大量芽孢杆菌，它们是形成酱香型白酒风味成分的基础和关键。经形态培养观察、生理生化和MIDI 微生物鉴定系统鉴定表明，酱香型白酒酒醅中产香芽孢杆菌主要为蜡样芽孢杆菌（*Bacillus-cereus*）、泛酸之芽孢杆菌（*Virgibacillus-pantothenticus*）、巨大芽孢杆菌（*Bacillus-megaterium*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus-subtilis*）、地衣芽孢杆菌（*Bacillus-licheniformis*）。其中，枯草芽孢杆菌产淀粉酶能力最强，巨大芽孢杆菌蛋白质水解能力最强。芽孢杆菌属能产芽孢因此具有极强的环境适应能力，普遍存在于白酒生产的各个微生态环境中，是产乳酸、产淀粉酶和蛋白酶的重要菌类，同时也是酱香型白酒中风味物质的主要产生菌之一。

3.2 这几株芽孢杆菌在以本地高粱粉为底物进行固态发酵过程中，其优势产物主要为 3-羟基-2-丁酮和和 2,3-丁二醇，并含有少量的酯类等芳香类物质。在这几株芽孢杆菌中枯草芽孢杆菌的代谢产物中乙偶姻的含量高达 67.85%，巨大芽孢杆菌主要代谢产物是愈创木酚和异戊醇。将这几株产香型芽孢杆菌类菌株加入到酱香型白酒酿造的过程中，对其酱香丰度的提升以及白酒质量的提高都具有重要的指导意义。

参考文献

[1] 魏丕伟,黄治国,赵斌,等.川南与川北酱香型白酒糙沙糟真菌群落比较研究[J].酿酒科技,2014,9:14-16
WEI Pi-wei, HUANG Zhi-guo, ZHAO Bin, et al. Comparison of fungal communities of fermented grains of jiangxiang baijiu (liquor) collected from south sichuan and north sichuan [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2014, 9: 14-16

[2] 邓杰,黄治国,卫春会,等.基于高通量测序的浓香型白酒窖池细菌群落结构分析[J].现代食品科技,2015,31(7):50-55
DENG Jie, HUANG Zhi-guo, WEI Chun-hui, et al. High-throughput sequencing reveals bacterial structure in the mud pits of heavy-fragrance baijiu [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 50-55

[3] 杨国华,邱树毅,黄永光.酱香白酒生产中产香微生物研究[J].中国酿造,2011,4:24-27
YANG Guo-hua, QIU Shu-yi, HUANG Yong-guang. Microbiology research of liquor production [J]. China Brewing, 2011, 4: 24-27

[4] Zahir I, Houari A, Iraqui M, et al. Antibacterial effect of bacillus strains and partial characterization of their extracts [J]. British Microbiology Research Journal, 2015, 5: 57-67

[5] Delgado S, Rachid C T C C, Fernández E, et al. Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing [J]. Food Microbiology, 2013, 36(1): 103-111

[6] Degnan P H, Ochman H. Illumina-based analysis of microbial community diversity [J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 183-194

[7] Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. Use and misuse of PLFA measurements in soils [J]. Soil Biol. Biochem., 2011, 43(8): 1621-1625

[8] Hwang H H, Wu E T, Liu S Y, et al. Characterization and host range of five tumorigenic *Agrobacterium* tumefaciens strains and possible application in plant transient transformation assays [J]. Plant Pathology, 2013, 62(6): 1384-1397

[9] 黄朱梁,裘迪红.MIDI Sherlock 微生物自动鉴定系统鉴定方法的建立-以贻贝中分离的蜡样芽胞杆菌为例[J].宁波大学学报(理工版),2011,24(2):8-13
HUANG Zhu-liang, QIU Di-hong. Identification of bacillus cereus separated from mussels using MIDI sherlock microorganism auto identification system [J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2011, 24(2): 8-13

[10] 赵金松,郑佳,吴重德,等.基于磷脂脂肪酸技术研究酱香大曲微生物群落结构[J].应用与环境生物学报,2014,20(4):558-563
ZHAO Jin-song, ZHENG Jia, WU Zhong-de, et al. Study of microbial community structure of sauce-flavor Daqu based on PLFA technology [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2014, 20(4): 558-563

[11] ZHU Bing-feng, XU Yan. Production of tetramethylpyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis* with optimal pH control strategy [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(8): 815-821

[12] ZHU Bingfeng, XU Yan. A feeding strategy for tetramethylpyrazine production by *Bacillus subtilis* based on the stimulating effect of ammonium phosphate [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010, 33(8): 953-959

[13] 徐岩,范文来,吴群.应用内源前体策略提高杆菌发酵制备TTMP 的能力[J].酿酒科技,2010,12:17-22
XU Yan, FAN Wen-lai, WU Qun. High-yield fermentative preparation of tetramethylpyrazine using an endogenous

precursor approach by *Bacillus* sp. [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2010, 12: 17-22

[14] Fan W L, Xu Y, Zhang Y H. Characterization of pyrazines in some Chinese liquors and their approximate concentrations [J]. J. Agric. Food Chem., 2007, 55(24): 9956-9962

现代食品科技