

## 研究报告

## 白酒酿造环境中高温菌株的筛选、鉴定及其特性分析

仲秀芳<sup>1</sup>, 马景浩<sup>1</sup>, 赵萱<sup>1</sup>, 袁思涵<sup>1</sup>, 富志磊<sup>2</sup>, 田淑斌<sup>3</sup>, 刘晓艳<sup>1</sup>, 范光森<sup>\*1,3,4</sup>

1 北京工商大学 老年营养与健康教育部重点实验室, 北京 100048

2 河北民族师范学院 生物与食品科学学院, 河北 承德 067000

3 淄博新糖源营养健康研究院, 山东 淄博 256306

4 北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心, 北京 100048

仲秀芳, 马景浩, 赵萱, 袁思涵, 富志磊, 田淑斌, 刘晓艳, 范光森. 白酒酿造环境中高温菌株的筛选、鉴定及其特性分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 309-326.

ZHONG Xiufang, MA Jinghao, ZHAO Xuan, YUAN Sihan, FU Zhilei, TIAN Shubin, LIU Xiaoyan, FAN Guangsen. Screening, identification, and characterization of thermophilic strains in the brewing environment of *Baijiu*[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 309-326.

**摘要:**【背景】高温菌株在白酒酿造环境中普遍存在, 它们是白酒酿造工艺中不可或缺的一类关键微生物菌群。【目的】对白酒酿造环境样品中的高温菌株进行分离、纯化及鉴定, 并深入研究它们的生长特性, 为其在白酒生产中的应用提供科学依据和理论基础。【方法】对多份酒曲、酒醅和酒糟样品分别进行梯度稀释, 然后选取合适稀释梯度样品分别涂布在溶菌肉汤琼脂培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基和马铃薯葡萄糖琼脂培养基上, 通过三区划线分离方法进行筛选。

【结果】共筛选获得 22 株高温细菌和 18 株高温真菌; 通过菌落形态观察分析发现有 4 种细菌和 4 种真菌菌落形态不同, 分别选取这 8 种微生物进行鉴定, 结合形态观察、生理生化特性和分子生物学鉴定为白色链霉菌(*Streptomyces albus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、鲁戈斯芽孢杆菌(*Bacillus rugosus*) 4 种高温细菌和微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*)、嗜热棉毛菌(*Thermomyces lanuginosus*)、坚脆嗜热子囊菌(*Thermoascus crustaceus*)、樟绒枝霉(*Malbranchea cinnamomea*) 4 种高温真菌, 其中鲁戈斯芽孢杆菌和樟绒枝霉在白酒研究中尚无报道; 对上述 8 种不同高温微生物菌种生长温度范围、pH 范围和 NaCl 耐受性等分析发现, 不同菌种生物学特性存在差异。【结论】本研究共筛选到 4 种不同的高温细菌和 4 种不同的高温真菌, 并对其进行了鉴定以及生长特性分析, 为后续解析这些微生物在白酒酿造中的作用及应用提供了重要保障。

**关键词:** 高温菌株; 白酒; 鲁戈斯芽孢杆菌; 樟绒枝霉

资助项目: 北京市自然科学基金(6222003)

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (6222003).

\*Corresponding author. E-mail: fanguangsen@btbu.edu.cn

Received: 2024-04-10; Accepted: 2024-06-08; Published online: 2024-07-08

## Screening, identification, and characterization of thermophilic strains in the brewing environment of *Baijiu*

ZHONG Xiufang<sup>1</sup>, MA Jinghao<sup>1</sup>, ZHAO Xuan<sup>1</sup>, YUAN Sihan<sup>1</sup>, FU Zhilei<sup>2</sup>, TIAN Shubin<sup>3</sup>, LIU Xiaoyan<sup>1</sup>, FAN Guangsen<sup>\*1,3,4</sup>

1 Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health, Beijing Technology and Business University, Ministry of Education, Beijing 100048, China

2 School of Biology and Food Science, Hebei Minzu Normal University, Chengde 067000, Hebei, China

3 Sweet Code Nutrition and Health Institute, Zibo 256306, Shandong, China

4 Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

**Abstract:** [Background] Thermophilic strains are ubiquitous in the brewing environment of *Baijiu* and are a microbial group indispensable for the brewing of *Baijiu*. [Objective] To isolate and identify thermophilic strains in the samples collected from the brewing environment of *Baijiu* and characterize the growth of the strains, thereby laying a theoretical foundation for the application of the strains in the production of *Baijiu*. [Methods] Gradient dilution was carried out for the samples of *Jiuqu* (starter), *Jiupi* (fermented grains), and *Jiuzao* (distilled grains), respectively. The samples with suitable dilution factors were then selected and coated on the Luria-Bertani, yeast extract peptone dextrose, and potato dextrose agar media, respectively. The plate streaking method was employed to isolate the strains. [Results] A total of 22 strains of thermophilic bacteria and 18 strains of thermophilic fungi were screened out. Among them, 4 species of bacteria and 4 species of fungi with distinct colony morphology were selected and identified by morphological observation, physiological and biochemical tests, and phylogenetic analysis. The four species of bacteria were identified as *Streptomyces albulus*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. rugosus*, and the four species of fungi were identified as *Rhizomucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus crustaceus*, and *Malbranchea cinnamomea*. It is worth noting that *B. rugosus* and *M. cinnamomea* had not been reported in the research on *Baijiu*. The eight species showcased differences in the growth temperature range, pH range, and NaCl tolerance. [Conclusion] We screened out, identified, and characterized the growth of four species of thermophilic bacteria and four species of thermophilic fungi, which provided data support for studying the roles and applications of these microorganisms in the brewing of *Baijiu*.

**Keywords:** thermophilic strains; *Baijiu*; *Bacillus rugosus*; *Malbranchea cinnamomea*

白酒, 不仅承载着我国深厚的历史文化底蕴, 作为国酒之一享有崇高地位, 更以其独特的酿造工艺和卓越品质, 傲然跻身于世界六大杰出蒸馏酒之列, 成为无可替代的瑰宝。中国传统白酒工业是我国重要的传统生物技术产业之一, 它

是以高粱、大米、糯米、玉米、小米、大麦、小麦等粮食作物为原料, 以大曲、小曲或麸曲和酒母等作为糖化发酵剂, 经蒸煮、糖化、液化、发酵、蒸馏、陈酿、勾调而制成的蒸馏酒<sup>[1-2]</sup>。究其实质是酒曲、窖池、酒醅以及生产环境中

微生物降解、转化原料中的淀粉、蛋白质、脂类、纤维素等大分子物质生成醇类、酯类、酸类、酮类等风味物质的代谢活动<sup>[2]</sup>。在这种复杂的代谢活动中,微生物会产生大量的发酵热,导致发酵体系中温度的升高,温度的升高则会引起微生物菌群有规律的演替变化,各具特色和作用的微生物协调的“谱曲”和“弹奏”,从而形成了具有特色风味品质的白酒产品<sup>[3]</sup>。在我国现有传统白酒酿造完整的生产过程中,大多数都会出现温度高于 45 °C 的阶段,如在酒曲生产过程,酒糟堆积阶段、酒醅发酵阶段,或是在丢糟堆积过程<sup>[4]</sup>。由此可见,白酒酿造生产过程中必然存在高温菌,并且有研究表明,这些高温菌在酿制优质白酒方面具有重要的作用<sup>[5-6]</sup>。这些高温菌能产生耐热酶,如耐热淀粉酶、耐热蛋白酶、耐热脂肪酶、耐热酯酶等,有助于白酒酿造原料中的淀粉、蛋白质等物质的分解、转化从而形成决定白酒品质的成百上千种风味物质<sup>[6-7]</sup>。

近年来,随着现代分子生物学技术的大力发展,已有较多技术应用到白酒酿造微生物研究中,如采用高通量测序方式已获知白酒酿造过程中存在较多的高温菌,这有利于白酒酿造过程中蕴含的众多内在机制的解析,然而,更加确定的内在机制解析离不开对其酿造过程中一个个具体的微生物菌种功能机制的揭示<sup>[8-17]</sup>。可见,从白酒酿造环境中筛选微生物菌种,并建立相应微生物菌种库,对于提升我国白酒酿造品质及拥有我国独有的白酒酿造微生物菌种库具有非常重要的意义<sup>[18-20]</sup>。

本文采用传统筛选方法对多份白酒酿造环境样品中的高温菌株进行分离、纯化,对筛选得到的菌株进行鉴定并考察其生物学特性,以期有助于为白酒酿造菌种资源的完善提供一定的数据支撑,为其在白酒生产中的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

白酒酒曲、酒醅和酒糟,由安徽古井集团有限责任公司(2份酒曲、4份酒醅和1份酒糟)、山东扳倒井股份有限公司(4份酒曲、5份酒醅和1份酒糟)、新疆第一窖古城酒业有限公司(3份酒曲)和酒鬼酒股份有限公司(3份酒曲、2份酒醅和2份酒糟)等酒厂提供,大曲样品随机从曲房中选取整个质量合格的曲块,酒醅则为刚酿造结束的样品,每份随机选取 1 kg,酒糟则取自存在厂房外的酒糟,每份随机各取 1 kg,以上每份样品分别用自封袋包装好后,立即取回存于 4 °C,用于菌种分离。

### 1.2 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶、10×PCR Buffer 和 dNTPs,天根生化科技(北京)有限公司;酵母膏、胰蛋白酶、牛肉膏等生物试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;葡萄糖、明胶、尿素、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、七水合硫酸镁、七水合硫酸亚铁、四水合酒石酸钾钠等分析纯试剂,西陇化工股份有限公司。

生物洁净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;电子天平和 pH 计,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;立式高压蒸汽灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;恒温恒湿培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;奥特光学生物显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司;PCR 仪, Biometra 公司;离心机,北京天林恒泰科技有限公司。

### 1.3 培养基

LB 培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(yeast extract peptone dextrose agar, YPDA)培养基和

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基参考文献[18-19]配制。

## 1.4 菌株的分离与纯化

将不同来源的酒曲、酒醅或酒糟样品分别捣碎并各自混合均匀,每份不同样品分别称取25 g,加入225 mL无菌水中,充分摇匀15 min后,在无菌操作条件下,用无菌水逐级稀释至 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 和 $10^{-6}$ 这4个梯度。取各梯度菌悬液0.1 mL分别涂布于LB、YPDA和PDA培养基平板上,每个稀释梯度做3个平行。将培养基平板倒置于50 °C恒温恒湿培养箱中培养10 d,每天观察菌落生长情况。挑选平板上具有不同特征的单菌落,分别划线于新的对应培养基平板上,直至在培养基平板为单一形态菌落,且显微镜下菌体形态一致。将得到的纯菌种保存于对应斜面培养基上。

## 1.5 菌株的形态观察

### 1.5.1 菌落形态

将分离获得的纯菌株分别划线于其对应分离培养基平板上,于50 °C培养48-96 h,观察单菌落形态。

### 1.5.2 细胞形态

挑取1.5.1中培养基平板上单菌落中的少量菌体,轻柔、均匀涂布在载玻片中的无菌水液滴中,固定后采用结晶紫或美蓝染色液进行染色,于10×40或10×100油镜下观察,记录细胞形态特征。

## 1.6 生理生化试验

菌株生理生化鉴定参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[21]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup>,包括糖发酵、碳源同化、淀粉试验、明胶试验、石蕊牛乳试验、尿素试验等。

## 1.7 分子生物学鉴定

采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)提取基因组DNA<sup>[23]</sup>,

以细菌基因组DNA为模板,以通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')扩增16S rRNA基因序列,PCR反应体系和条件参照秦立芹等<sup>[24]</sup>方法进行;以真菌基因组DNA为模板,以通用引物SR1R(5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')和SR6R(5'-CCTTGTTACGACTTTTACTT-3')扩增18S rRNA基因序列,PCR反应体系和条件参照朱会芳等<sup>[25]</sup>方法进行。PCR扩增产物采用1%琼脂糖凝胶电泳检测,将分子量大小正确的PCR扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

使用BLAST将16S rRNA基因和18S rRNA基因测序结果在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上比对,根据同源性搜索结果,使用MEGA 7.0.14生物学软件对测试菌株和相关菌株的多个序列进行比对分析并用Neighbor-Joining方法构建系统发育树。

## 1.8 环境因子对菌株生长的影响

菌株的生长温度范围、pH范围、NaCl耐受性和乙醇耐受性测定方法参照范光森等<sup>[26-27]</sup>方法进行,相关参数水平依据菌株特性进行适当的调整。将待测细菌分别接种于LB液体培养基中45 °C、120 r/min培养12 h。将活化后的菌株分别接入新配制的LB液体培养基中,置于不同温度条件下培养12 h,采用分光光度计测定菌悬液的 $OD_{600}$ ,依据不同温度下菌株生长情况判断其生长温度范围和最适生长温度;细菌生长pH范围、NaCl耐受性和乙醇耐受性的测定操作同生长温度范围的测定操作,仅是培养时pH、NaCl浓度或乙醇浓度不同。真菌测定方法则采用PDA固体培养基,将高温真菌分别在PDA培养基平板上于50 °C活化2 d,然后分别点种于PDA培养基平板上于不同温度条件下培养2 d,测定不同培养条件下菌落的直

径大小,从而判断其生长温度范围和最适生长温度;真菌生长 pH 范围和 NaCl 耐受性测定操作同生长温度类似,仅培养时 pH 或 NaCl 浓度不同。

## 1.9 数据分析

利用 Excel 2019 软件绘制相关图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 高温菌株的分离和鉴定

#### 2.1.1 高温细菌的分离与鉴定

从不同来源的酒曲、酒醅等样品中共筛选获得 22 株高温细菌,通过形态观察比较分析发现,呈现出 4 种不同菌落形态(图 1),取 4 种菌落的典型菌株分别标记为 BFGS1、BFGS2、BFGS3 和 BFGS4 进行分析。由图 1 可见,BFGS1

菌落呈现灰白色,干燥粗糙、不易挑起,边缘规则,在 LB 培养基上产生少量紫色素,疑似为放线菌;BFGS2 菌落表面湿润黏稠,边缘不规则,略呈粉红色;BFGS3 菌落表面也较为湿润黏稠,但该菌落褶皱且呈乳白色;BFGS4 菌落与 BFGS3 菌落较为类似,湿润黏稠且有褶皱,不同之处则是略大且呈现肉粉色。通过显微镜观察发现,菌株 BFGS1 气生菌丝上有螺旋形孢子丝,球形至卵圆形孢子成串,表面光滑;菌株 BFGS2 细胞为杆状,较短,革兰氏染色为阳性;菌株 BFGS3 细胞为杆状,较长,革兰氏染色为阳性;菌株 BFGS4 细胞与 BFGS3 菌株相似,为杆状,较长,革兰氏染色为阳性。通过菌落形态与细胞结构初步判断 BFGS1 为放线菌,而 BFGS2、BFGS3 和 BFGS4 均为芽孢杆菌。

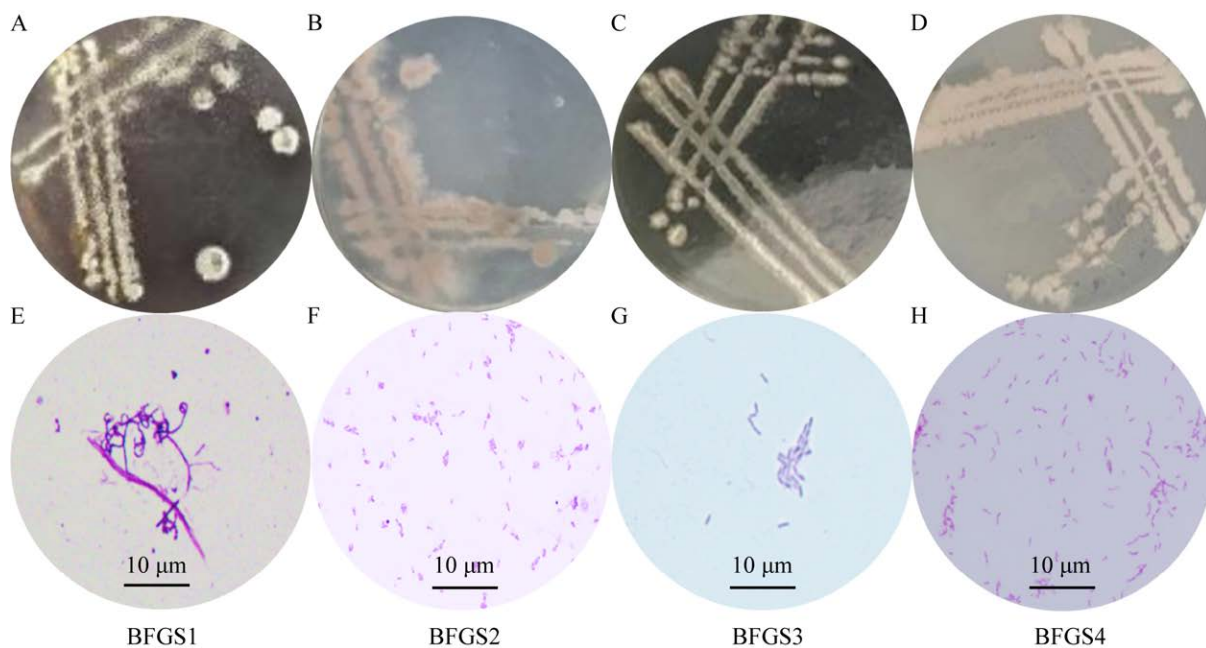


图 1 四株高温细菌的菌落形态(A-D)与细胞形态(E-H) 细胞形态图中标尺是采用目镜测微尺与镜台测微尺进行标定的。

Figure 1 Colony morphology (A-D) and cell morphology (E-H) of four high-temperature bacterial colonies. The scale in the cell morphology diagram was calibrated using an eyepiece micrometer with a microscope stage micrometer.

参照《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[21-22]</sup>, 通过糖发酵试验、碳源同化试验、石蕊牛乳试验和尿素试验等对 4 株细菌分别进行了生理生化特性分析, 结果见表 1。由表 1 糖发酵测试结果可知, 菌株 BFGS1 能够利用葡萄糖、麦芽糖和乳糖进行发酵产气或产酸, 而不能利用蔗糖发酵产气或产酸, 3 株芽孢杆菌都能够利用蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和乳

糖进行发酵产气或产酸。碳源同化试验表明, 放线菌 BFGS1 和 3 株芽孢杆菌都能够利用山梨醇、甲醇、鼠李糖、松三糖、木糖、甘油、乳糖、纤维二糖、乙醇、半乳糖、海藻糖和肌醇为碳源生长。放线菌 BFGS1 在柠檬酸盐试验、淀粉水解试验、尿素试验和石蕊牛乳试验中呈现阳性, 表明该菌能够利用柠檬酸盐作为唯一碳源生长, 具有产淀粉酶活性和尿素酶活性,

表 1 四株细菌的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of four bacterial strains

项目 Test	Strain BFGS1	Strain BFGS2	Strain BFGS3	Strain BFGS4
糖发酵试验 Sugar fermentation tests				
蔗糖 Sucrose	-	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+	+
碳源同化试验 Carbon source assimilation tests				
山梨醇 Sorbose	+	+	+	+
甲醇 Methanol	+	+	+	+
鼠李糖 L-rhamnose monohydrate	+	+	+	+
松三糖 Raffinose	+	+	+	+
木糖 Xylose	+	+	+	+
甘油 Glycerol	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+	+
乙醇 Ethanol	+	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	+	+	+
海藻糖 Trehalose	+	+	+	+
肌醇 Inositol	+	+	+	+
硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	-	-	-	-
吲哚试验 Indole test	-	-	-	-
甲基红试验 Methyl red test	-	-	-	-
V-P 试验 Voges-Proskauer test	-	-	+	-
柠檬酸盐试验 Citrate test	+	-	-	-
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+	-	+	-
尿素试验 Urea test	+	-	-	+
明胶液化试验 Gelatin liquidized test	-	-	+	+
石蕊牛乳试验 Litmus buttermilk test	产酸、脲化 Acid-producing, peptization	产酸、脲化 Acid-producing, peptization	产酸、脲化 Acid-producing, peptization	产酸、脲化 Acid-producing, peptization

+: 阳性; -: 阴性。

+: Positive; -: Negative.

能够利用牛乳中乳糖产酸,将牛奶中蛋白胨化,而硫化氢试验、吲哚试验、甲基红试验、V-P 试验、明胶液化试验都为阴性;芽孢杆菌 BFGS2 只有石蕊牛乳试验为阳性,其他为阴性,芽孢杆菌 BFGS3 则是 V-P 试验、淀粉水解试验、明胶水解试验和石蕊牛乳试验为阳性,其他为阴性;而芽孢杆菌 BFGS4 则是尿素试验、明胶液化试验和石蕊牛乳试验为阳性,其他为阴性。

将测序正确的 4 株细菌的 16S rRNA 基因序列分别在 NCBI 中进行 BLAST 比对,分别选取部分相似度高的菌株基因序列,使用 MEGA 7.0.14 对所选菌株和测试菌株基因序列进行多序列比对分析,并利用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树(图 2)。由图 2 可以看出,菌株 BFGS1 与白色链霉菌(*Streptomyces albus*) NBRC 15415 聚集为一支,结合形态学特征和生理生化试验,可以确定菌株 BFGS1 为白色链霉菌。由图 2 可知,细菌 BFGS2、BFGS3 和 BFGS4 分别与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) DSM10、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) NBRC 15535 和鲁戈斯芽孢杆菌(*Bacillus rugosus*) SPB7 聚为一支,结合菌落形态、生理生化特征,3 株芽孢杆菌分别鉴定为枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和鲁戈斯芽孢杆菌。

### 2.1.2 高温真菌的分离与鉴定

采用稀释涂布平板法从山东、河北、新疆和湖南等酒厂提供的样品中共筛选分离出了 F1501、F150402、F150403、F160301、F180501、F180502、F190401、F57-1、F57-2 等 18 种与真菌形态相似的菌株。通过菌落形态观察和细胞显微结构观察发现,这 18 株菌存在 4 种不同的形态特征和细胞结构(图 3),依据其菌落形态特性和细胞结构特点分别选取菌株 F1501、

F160301、F57-1 和 F408 这 4 株菌株进行菌种鉴定和特性研究。菌落形态观察发现,菌株 F1501 在 YPDA 培养基中培养 1 d,菌落中心呈白色,其边缘为灰黄色,棉絮状,后期生长过程中,菌落表面干燥且布满疏松的菌丝,长满培养基整个表面所需要时间大约为 3–4 d,生长速度较快,长满培养基时菌丝体偏灰白(图 3);菌株 F160301 培养 1 d,直径较小,颜色为浅绿色,棉絮状白色边缘,生长至 3–4 d 后,菌落长满培养基表面,其颜色变为深绿色,菌落上表面有灰白色菌丝圈,其中菌丝质地较为紧凑;菌株 F57-1 菌落成环状生长,随着生长时间增长,菌落环的直径不断扩大,形成菌落环数增多,且该菌菌落表面干燥,有许多白色颗粒状,无明显菌丝覆盖;菌株 F408 生长相对缓慢,起初为乳白色,随着生长时间延长逐渐变为黄色至黄褐色,表面光滑,菌落厚实紧密。通过显微镜观察,菌株 F1501 菌丝体较发达,菌丝体宽 14.0  $\mu\text{m}$ ,无隔,无分枝,从菌丝顶端生长出孢囊梗,上有孢子囊,直径为 43.0–60.0  $\mu\text{m}$ ,孢子为卵形,直径 2.0–3.0  $\mu\text{m}$ ,成熟孢子囊脱落后内有明显的囊轴;菌株 F160301 菌丝体发达,菌丝体宽 1.0  $\mu\text{m}$ ,无隔,有分枝,在分枝处有短孢囊梗,上长有孢子囊,孢子囊直径为 43.0–60.0  $\mu\text{m}$ ,孢子也呈现卵形,直径为 6.0  $\mu\text{m}$ ;菌株 F57-1 菌丝体较为发达,菌丝体宽约为 7.5  $\mu\text{m}$ ,有隔,有分支,在分化不明显的分生孢子梗顶端有成链的分生孢子,多为长方形,分生过程中孢子长度为 8.0–40.0  $\mu\text{m}$ ,孢子分裂完成后长度在 40.0–60.0  $\mu\text{m}$ ;菌株 F408 菌丝体透明,有隔,分枝,隔处内溢,在靠近隔处偶尔膨大,在分化不明显的分生孢子梗顶端有成链的分生孢子,分生孢子链断裂形成孢子,孢子多数为柱状或是长方体,3.4  $\mu\text{m}$ ×5.7  $\mu\text{m}$ 。

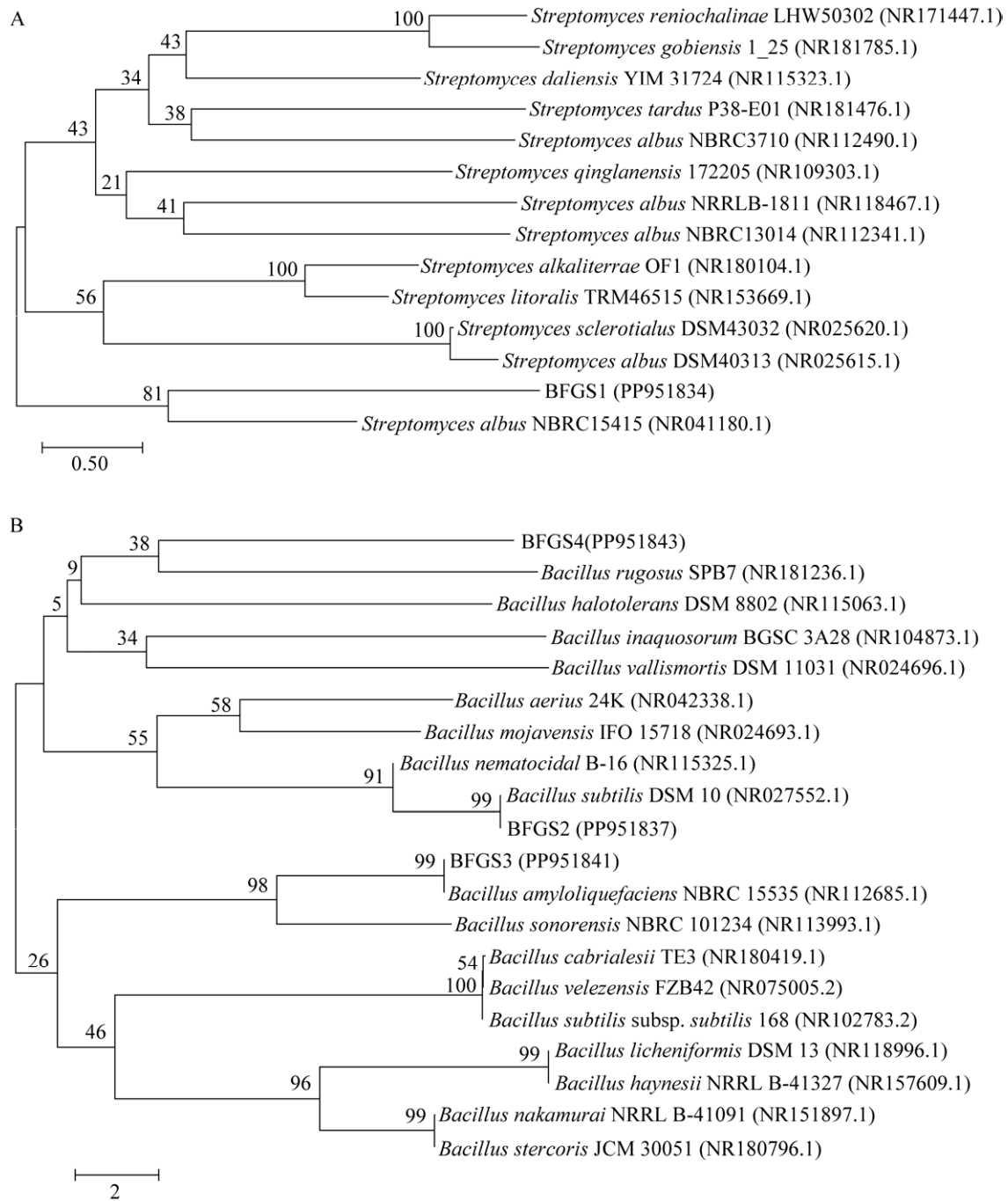


图2 基于16S rRNA基因序列构建的4株细菌的系统发育树 A: 菌株BFGS1; B: 菌株BFGS2、BFGS3和BFGS4。括号中序号为菌株登录号; 分支点上的数字为bootstrap支持率; 标尺刻度为序列差异的分支长度。

Figure 2 Phylogenetic tree of four bacterial strains based on the 16S rRNA gene sequences. A: Strain BFGS1; B: Strain BFGS2, BFGS3 and BFGS4. Numbers in parentheses: the sequence accession number; Numbers in each branch points: the percentages supported by bootstrap; Bar: Nucleotide divergence.



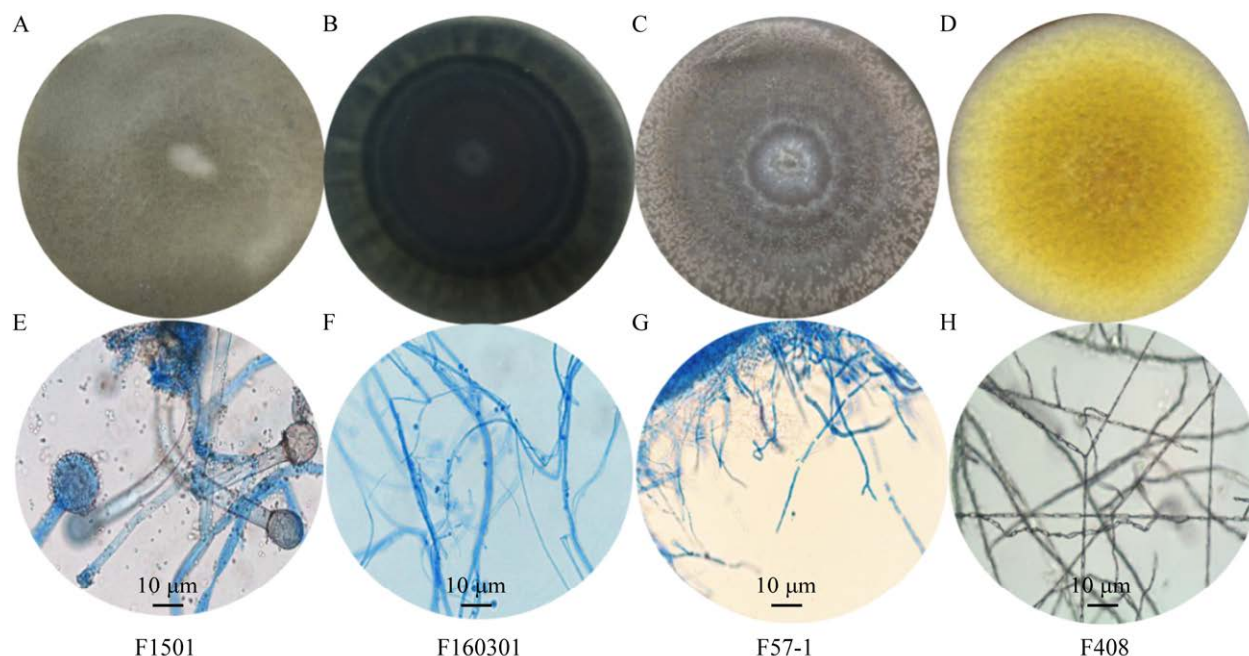


图3 四株高温真菌菌落形态(A-D)与细胞结构(E-H, 400×) 细胞形态图中标尺采用目镜测微尺与镜台测微尺进行标定。

Figure 3 Colony morphology (A–D) and cell morphology (E–H, 400×) of four high-temperature mold colonies. The scale in the cell morphology diagram was calibrated using an eyepiece micrometer with a microscope stage micrometer.

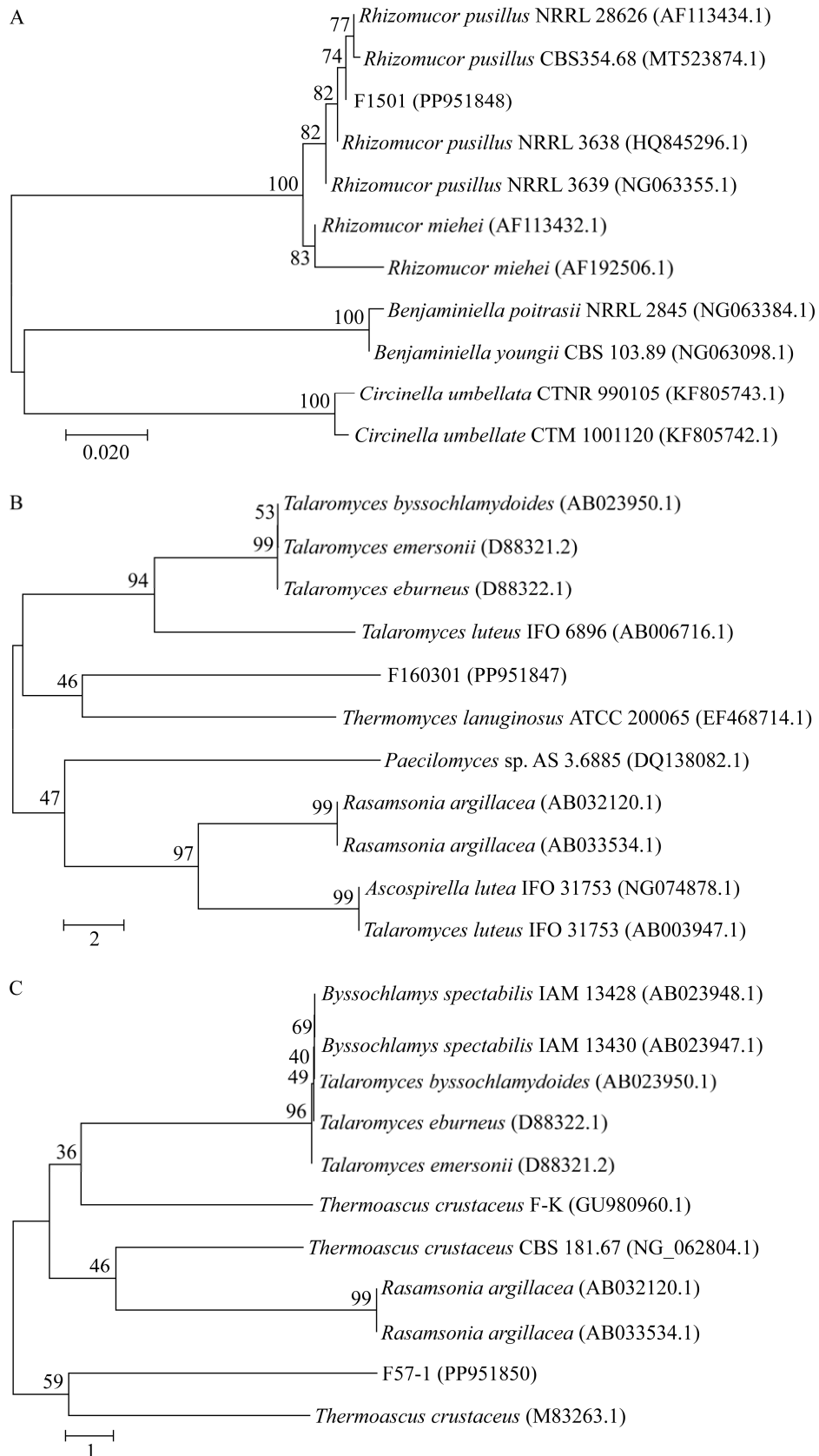
将4株真菌18S rRNA基因序列进行特异性扩增,测序后得到的基因序列分别在NCBI上进行BLAST比对,从中选取部分相似度高的菌株序列,采用MEGA 7.0.14软件对序列进行比对分析并构建系统发育树,由图4可以看出,菌株F1501与微小根毛霉(*Rhizomucor pusillus*) NRRL 28626和CBS 354.68聚为一支,结合菌株F1501形态特征鉴定为微小根毛霉。根据系统发育树的结果,菌株F160301与嗜热棉毛菌(*Thermomyces lanuginosus*) ATCC 200065聚集为一支,结合菌株形态鉴定为嗜热棉毛菌<sup>[28]</sup>。系统发育树显示菌株F57-1与坚脆嗜热子囊菌(*Thermoascus crustaceus*)聚为一支,结合菌株形态特征,菌株F57-1鉴定为坚脆嗜热子囊菌<sup>[28]</sup>。结合分子生物学和菌株形态观察,菌株F408鉴定为樟绒枝霉(*Malbranchea cinnamomea*)。

## 2.2 高温菌株的生长特性

### 2.2.1 高温细菌的生长特性

#### (1) 温度

不同微生物其生长温度范围和最适生长温度不同,由图5可知,白色链霉菌BFGS1在30℃以下生长缓慢,其最适生长温度为50℃,并且在60℃仍能生长,这表明该菌为嗜热菌;枯草芽孢杆菌BFGS2生长范围比较宽广,在20–55℃范围都能生长,并且其最适生长温度为35℃;解淀粉芽孢杆菌BFGS3生长温度范围也比较宽广,在20–50℃范围内生长,其最适生长温度略高于枯草芽孢杆菌BFGS2,为40℃;而鲁戈斯芽孢杆菌BFGS4生长范围比以上2种芽孢杆菌略窄,为25–50℃,但其最适生长温度高于上述两者,为45℃。



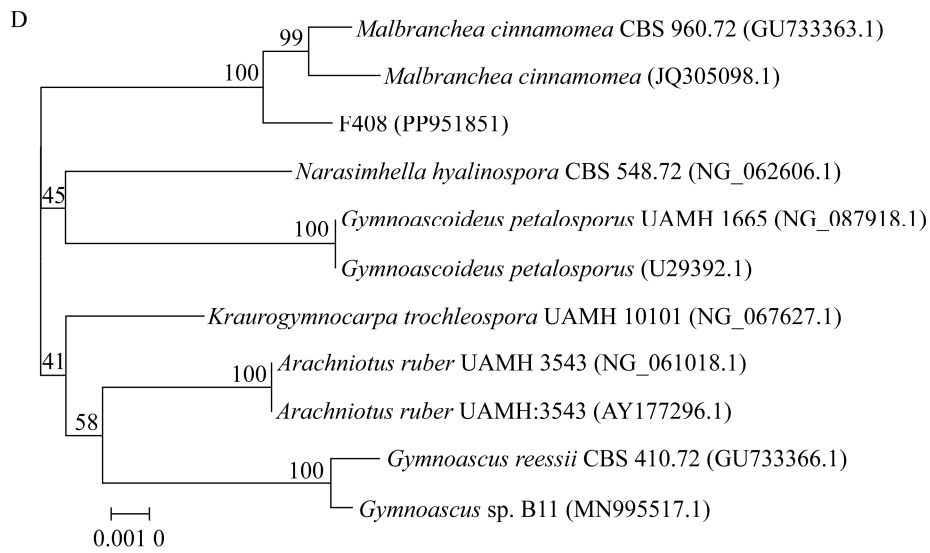


图 4 基于 18S rRNA 基因序列构建的 4 株真菌的系统发育树 A: 菌株 F1501; B: 菌株 F160301; C: 菌株 F57-1; D: 菌株 F408。括号中序号为菌株登录号; 分支点上的数字为 bootstrap 支持率; 标尺刻度为序列差异的分支长度。

Figure 4 Phylogenetic tree of four mold strains based on the 18S rRNA gene sequences. A: Strain F1501. B: Strain F160301. C: Strain F57-1. D: Strain F408. Numbers in parentheses are the sequence accession number; Numbers in each branch points are the percentages supported by bootstrap; Bar is nucleotide divergence.

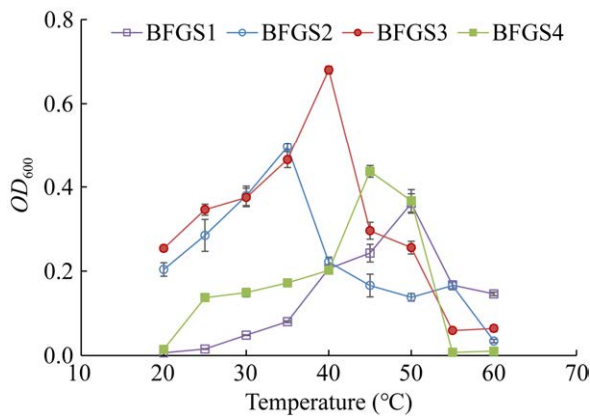


图 5 四株细菌在不同温度下的生长情况

Figure 5 The growth of four bacterial strains at different temperatures.

## (2) pH

不同的微生物其最适生长 pH 和生长 pH 范围也有所不同, 这与其生长环境有关。由图 6 可以看出, 白色链霉菌 BFGS1 生长 pH 范围较窄, 在 pH 2.0–8.0 范围生长, 并且其最适生

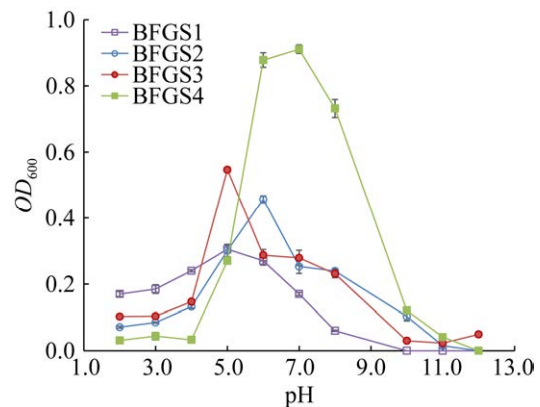


图 6 四株细菌在不同 pH 下的生长情况

Figure 6 The growth of four bacterial strains at different pH.

长 pH 值为 5.0。枯草芽孢杆菌 BFGS2 生长 pH 范围宽广, 在 pH 值为 2.0–11.0 时都能生长, 且其最适生长 pH 值为 6.0。解淀粉芽孢杆菌 BFGS3 在 pH 值为 2.0–12.0 都能生长, 具有宽广的生长 pH 范围, 其最适生长 pH 值为 5.0。

鲁戈斯芽孢杆菌 BFGS4 与枯草芽孢杆菌 BFGS2 和解淀粉芽孢杆菌 BFGS3 类似, 都具有较宽广的生长 pH 范围, 但其最适生长 pH 值为 7.0。

### (3) NaCl

不同浓度的 NaCl 会产生不同的渗透压, 对微生物生长的影响不同。不同的微生物则因其细胞结构及组成成分的不同, 对渗透压的适应能力有所不同。由图 7 可知, 白色链霉菌 BFGS1 在 5% NaCl 浓度下生长受到明显抑制, 生长十分缓慢; 而 3 种芽孢杆菌则都在 10% NaCl 浓度下生长十分缓慢, 受到明显的抑制作用。

### (4) 乙醇

具有一定乙醇耐受性的微生物在白酒酿造环境中具有更好的适应性, 发挥作用的时空效应将会更大。由图 8 可知, 乙醇对 4 种细菌生长抑制效果有所不同, 对白色链霉菌 BFGS1 生长抑制效果明显, 随着乙醇浓度的增加, 其生长速度迅速降低, 在乙醇浓度为 4% 时生长十分缓慢, 但其乙醇耐受性较高, 即使在乙醇浓度为 12% 仍有少量细胞生长; 相较于白色链霉菌 BFGS1, 3 种芽孢杆菌对乙醇的耐受性相对较强, 尤其是枯草芽孢杆菌 BFGS2, 在较低乙醇

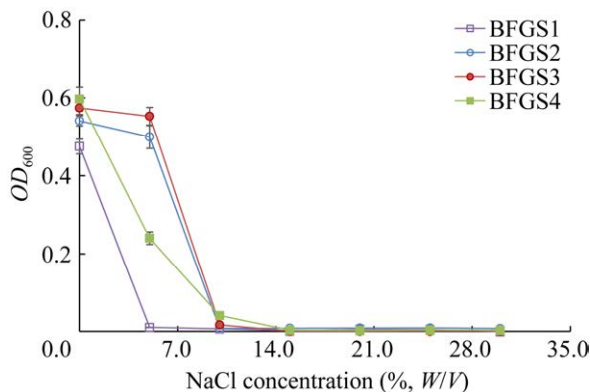


图 7 四株细菌在不同 NaCl 浓度下的生长情况  
Figure 7 The growth of four bacterial strains at different NaCl concentrations.

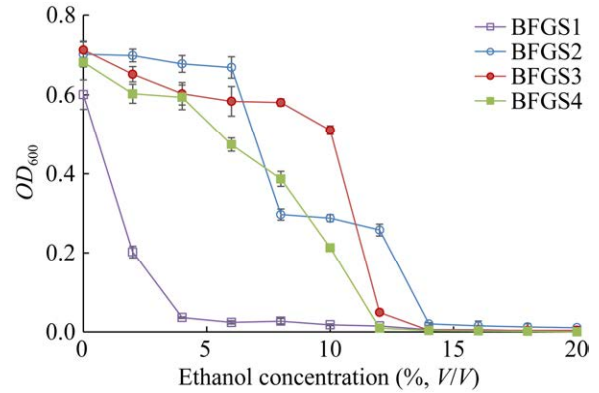


图 8 四株细菌在不同乙醇浓度下的生长情况  
Figure 8 The growth of four bacterial strains at different ethanol concentrations.

浓度时 3 种芽孢杆菌生长虽然受到抑制, 但生长速度高于白色链霉菌 BFGS1, 另外, 解淀粉芽孢杆菌 BFGS3 和鲁戈斯芽孢杆菌 BFGS4 的乙醇耐受性最高为 12%, 而枯草芽孢杆菌 BFGS2 则为 14%。

## 2.2.2 高温真菌的生长特性

### (1) 温度

由表 2 可知, 4 种真菌生长温度范围和最适生长温度存在不同, 微小根毛霉 F1501 生长温度范围为 25–55 °C, 菌株 F1501 在 40 °C 生长最快, 为其最适生长温度; 嗜热棉毛菌 F160301 生长温度范围为 25–60 °C, 最适生长温度为

表 2 四株真菌在不同温度下生长 3 d 的菌落直径  
Table 2 Colony diameters of four mold species grown at different temperatures for three days (mm)

Temperature (°C)	F1501	F160301	F57-1	F408
20	0±0	0±0	0±0	0±0
25	6±1	2±0	0±0	4±0
30	16±2	4±0	3±0	8±2
35	49±5	7±1	6±1	15±3
40	85±4	16±4	16±3	26±3
45	75±3	60±8	50±5	32±5
50	18±3	38±6	29±6	15±2
55	7±1	26±3	13±1	5±0
60	0±0	7±0	0±0	0±0

45 °C, 在耐热性方面稍高于微小根毛霉 F1501; 坚脆嗜热子囊菌 F57-1 生长温度范围为 30–55 °C, 最适温度与嗜热棉毛菌 F160301 一致, 为 45 °C; 樟绒枝霉 F408 生长温度范围为 25–55 °C, 最适生长温度为 45 °C。

### (2) pH

由表 3 可见, 微小根毛霉 F1501 生长 pH 范围比较宽广, 在 pH 3.0–12.0 都能生长, 并且在偏碱性环境条件下更有利于其生长, 其最适生长 pH 值为 7.0–9.0, 相比杨瑞娟等<sup>[29]</sup>报道的微小根毛霉最适生长 pH 高; 嗜热棉毛菌 F160301 生长 pH 范围比微小根毛霉 F1501 略窄, 在 pH 4.0–12.0 范围内生长, 并且其最适生长 pH 值为 7.0–10.0, 与微小根毛霉 F1501 类似, 偏碱性环境更有利于其生长; 坚脆嗜热子囊菌 F57-1 生长 pH 范围为 5.0–10.0, 相比前两者窄, 最适生长 pH 值为 6.0–9.0; 樟绒枝霉 F408 生长 pH 范围为 4.0–10.0, 也略窄于微小根毛霉 F1501 和嗜热棉毛菌 F160301, 其最适生长 pH 为 7.0–8.0。

### (3) NaCl

由表 4 可见, 微小根毛霉 F1501、嗜热棉毛菌 F160301 和樟绒枝霉 F408 都具有一定的 NaCl 耐受性, 在 10% 的 NaCl 都具有一定的生

表 3 四株真菌在不同 pH 下生长 3 d 的菌落直径情况

Table 3 Colony diameters of four mold species grown at different pH for three days

pH	F1501	F160301	F57-1	F408
3.0	31±3	0±0	0±0	0±0
4.0	43±7	37±2	0±0	12±1
5.0	61±7	46±7	18±3	18±1
6.0	73±10	58±4	61±5	21±3
7.0	82±8	69±7	67±9	36±10
8.0	87±6	64±10	62±4	37±8
9.0	83±11	63±3	63±7	20±2
10.0	75±7	65±8	13±2	8±1
11.0	64±9	61±5	0±0	0±0
12.0	61±5	60±9	0±0	0±0

表 4 四株真菌在不同 NaCl 浓度下生长 3 d 的菌落直径情况

Table 4 Colony diameters of four mold species grown at different NaCl concentrations for three days

NaCl (%)	F1501	F160301	F57-1	F408
0	84±1	66±4	69±4	36±7
5	52±8	31±3	0±0	13±1
10	21±3	15±1	0±0	7±0
15	0±0	0±0	0±0	0±0
20	0±0	0±0	0±0	0±0
25	0±0	0±0	0±0	0±0
30	0±0	0±0	0±0	0±0

长能力, 而坚脆嗜热子囊菌 F57-1 耐受 NaCl 有限, 在 5% 的 NaCl 条件下即不能生长, 这与不同菌株生理特性有关。

## 3 讨论

白酒酿造环境中存在着较多的影响着白酒品质的高温微生物<sup>[5-6]</sup>, 筛选获得这些高温微生物并对其生理特性研究将有助于科学合理地指导白酒生产工艺的改进, 为此, 本文采用传统筛选方法从白酒酿造环境中获得了 4 株高温细菌(BFGS1、BFGS2、BFGS3 和 BFGS4)和 4 株高温真菌(F1501、F160301、F57-1 和 F408)。

通过系统的生物学鉴定分析发现, 菌株 BFGS1 为白色链霉菌。有研究表明白色链霉菌是清香型大曲主要细菌菌种之一, 并且该菌株在不同酒厂中温大曲中都有发现, 能产生较多的土味素, 在白酒酿造生产中具有负面影响<sup>[30-31]</sup>; 也有研究表明, 该菌株能够产生少量盐霉素, 虽对产香功能菌株产生一定抑制影响产香, 但对致病菌也有显著抑制作用, 能减少异味杂质的产生, 提高白酒安全质量, 即能够在一定程度上调节白酒酿造过程中微生物菌群变化<sup>[32]</sup>; 另有研究表明该菌具有较高的酶活性, 对提高酯类、2,3-丁二醇等香味物质的含量具有积极的意义<sup>[33]</sup>。由此可见, 需要进一步深入研究白色

链霉菌在白酒酿造中的功能特性,并对其功能进行综合考虑。该菌株的最适生长温度为 50 °C,略低于从酱香型酒糟中分离的放线菌产色高温单孢菌 DF<sup>[34]</sup>。一般而言,放线菌最适生长 pH 为中性或偏碱性,如淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) SCF-18 的最适 pH 为 7.0<sup>[35]</sup>,而白色链霉菌 BFGS1 生长 pH 偏酸性可能与其生长环境有关。白色链霉菌 BFGS1 与淡紫灰链霉菌 SCF-18 适应生长的 NaCl 浓度相似<sup>[35]</sup>。另外,其乙醇耐受性也较高,可达 12%。

芽孢杆菌是白酒酿造过程中主要的微生物菌种之一,在不同香型白酒中都具有重要的功能,其种类比较多,是白酒中重要的产香和产功能因子的重要微生物菌群,如有研究表明芽孢杆菌是白酒中乙偶姻、2,3-丁二醇和酯类等芳香化合物的主要产生菌株,为白酒复杂风味体系提供了前体物质,对白酒品质稳定发挥了重要作用<sup>[8,36-38]</sup>。通过分析发现菌株 BFGS2、BFGS3 和 BFGS4 都为芽孢杆菌,通过鉴定分别为枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和鲁戈斯芽孢杆菌。有关枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌在白酒酿造中的研究比较多,这 2 株菌都具有产淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等酶活性,与白酒中众多风味物质的形成有着重要的关联<sup>[24,39-40]</sup>,然而目前尚无有关鲁戈斯芽孢杆菌在白酒酿造中的研究报道,鲁戈斯芽孢杆菌为近期新报道菌株,有研究表明该菌能产生二酮哌嗪类抗生素、 $\beta$ -葡萄糖苷酶等酶活性,所以该菌株在调控白酒酿造微生物菌群演替中发挥着一定作用,并且对于原料中淀粉利用产酒和形成酒中风味物质也有着重要的作用,有待深入探究<sup>[41-42]</sup>。另外,鲁戈斯芽孢杆菌 BFGS4 是从新疆第一窖古城酒业有限公司提供的酒曲样品中筛选分离获得的,而在其他样品中未筛选分离到,这可能是由于新疆地区与其他几家酒厂所在地区的环

境差异较大,在环境微生物种群上存在较为明显的差异,十分有必要对新疆地区酒曲进行微生物多样性分析。枯草芽孢杆菌 BFGS2 的最适生长温度为 35 °C,这与枯草芽孢杆菌 FWJ16X 的最佳生长温度相似<sup>[43]</sup>,而低于枯草芽孢杆菌 JLB30-2 的最适生长温度<sup>[44]</sup>;菌株 BFGS3 的最适生长温度为 40 °C,高于解淀粉芽孢杆菌 2-2 的最适生长温度<sup>[24]</sup>;而鲁戈斯芽孢杆菌 BFGS4 的最适生长温度为 45 °C,与枯草芽孢杆菌 JLB30-2 和凝结芽孢杆菌 Y1 的最适生长温度一致<sup>[45-46]</sup>。虽然上述菌株分离于不同样品,但总体来看,白酒酿造环境中蕴含着生长温度范围和最适生长温度不同的微生物,这些微生物由于生长温度范围不同呈现着交替变化,从而塑造了白酒特定的风味特征。另外,具有产生抗生素功能的白色链霉菌 BFGS1 和鲁戈斯芽孢杆菌 BFGS4 其最适生长温度都较高,并且在较低温度生长缓慢,好似特意为其他菌株生长提供一定的生长时间,从而共同谱写着一瓶优质白酒,正是由于这些微生物内在特征的微妙性驱使着白酒酿造变化规律的基本一致。枯草芽孢杆菌 BFGS2 最适生长 pH 值为 6.0,略低于枯草芽孢杆菌 AFB1 和 BSH-1 的最适生长 pH<sup>[43,46]</sup>。解淀粉芽孢杆菌 BFGS3 其最适生长 pH 值为 5.0,略低于解淀粉芽孢杆菌 2-2 的最适生长 pH<sup>[24]</sup>。但不同的是鲁戈斯芽孢杆菌 BFGS4 最适生长 pH 略高于上述 2 种芽孢杆菌,为 7.0。3 种芽孢杆菌的 NaCl 耐受性与贝莱斯芽孢杆菌 hjt6 相似,而低于解淀粉芽孢杆菌 2-2 的最高 NaCl 耐受浓度<sup>[24,47]</sup>。三者乙醇耐受性相对较高,菌株 BFGS2 为 14%,而 BFGS3 和 BFGS4 都为 12%,这与解淀粉芽孢杆菌 2-2 乙醇耐受性相近<sup>[24]</sup>。一般而言,酒醅中乙醇浓度为 2%~4%,因此,以上细菌都可在白酒酿造中生存<sup>[48]</sup>。

通过系统的生物学鉴定分析发现,筛选获

得的高温菌株 F1501、F160301、F57-1 和 F408 分别为微小根毛霉、嗜热棉毛菌、坚脆嗜热子囊菌和樟绒枝霉。研究表明,微小根毛霉具有较强的降解淀粉能力,其与大曲中还原糖含量呈正相关,是白酒酿造大曲中的优势真菌,在白酒酿造原料糖化过程中发挥着重要的作用,另外还具有降解纤维素和蛋白质的能力,即使在低水分下仍具有一定的生物活性<sup>[49-50]</sup>;嗜热棉毛菌则是一种研究相对较多的嗜热菌,具有高产木聚糖酶、脂肪酶、葡萄糖苷酶、木糖苷酶等特性,存在于一些高温大曲中,可能对于白酒酿造中原料细胞壁的破解和淀粉的释放以及白酒中有机酸和酯类化合物的形成发挥着重要作用<sup>[51-54]</sup>;坚脆嗜热子囊菌能产阿魏酸酯酶、淀粉酶、葡萄糖苷酶、木聚糖酶和纤维素酶,并且是引起大曲高酯化力的关键微生物,在白酒酿造中原料的糖化及白酒酯类化合物的形成中起到重要的作用<sup>[55-57]</sup>;虽然有研究报道樟绒枝霉可高产淀粉酶、木聚糖酶、葡聚糖酶、脂肪酶、葡萄糖苷酶,在生物质转化利用方面具有重要的作用<sup>[58-61]</sup>,然而,目前尚无该菌在白酒酿造环境中的报道,本文也是从酒糟中筛选获得的,可能是分布于酿酒周围环境中,而难以在白酒酿造环境中生存。微小根毛霉 F1501 生长温度范围为 25–55 °C,与杨瑞娟等<sup>[29]</sup>报道的微小根毛霉生长温度范围一致,其最适生长温度则与微小根毛霉 THF-5 最适生长温度接近<sup>[62]</sup>;嗜热棉毛菌 F160301 最高耐受温度与杨越等<sup>[63]</sup>报道的嗜热棉毛菌最高耐受温度一致,为 60 °C,坚脆嗜热子囊菌 F57-1 和樟绒枝霉 F408 最适生长温度都为 45 °C,与微小根毛霉 THF-12 及樟绒枝霉 CAU521 最适生长温度相似<sup>[27,62]</sup>。由此可见,这 4 株真菌都是高温菌株,十分有必要深入探究其在白酒酿造中的作用。

## 4 结论

本研究从多种来源的酒曲、酒醅和酒糟中共筛选获得了 40 株高温微生物,通过形态观察有 4 种不同的耐热细菌和 4 种不同的耐热真菌,通过生理生化及分子生物学对以上菌株进行了鉴定,4 种细菌 BFG1、BFGS2、BFGS3 和 BFGS4 分别鉴定为白色链霉菌、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和鲁戈斯芽孢杆菌,4 种真菌 F1501、F160301、F57-1 和 F408 分别鉴定为微小根毛霉、嗜热棉毛菌、坚脆嗜热子囊菌和樟绒枝霉,其中鲁戈斯芽孢杆菌和樟绒枝霉尚无在白酒研究中有所报道,随后对这些菌株生长特性进行了初步分析,这为后续研究这些菌株在白酒酿造生产中的应用提供参考价值。

## REFERENCES

- [1] 牛姣, 沈毅, 张贵虎, 程伟, 李贺贺, 郑福平, 孙宝国. 白酒酿造原料与酒体品质关系的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 322-328.  
NIU J, SHEN Y, ZHANG GH, CHENG W, LI HH, ZHENG FP, SUN BG. Research progress on the relationship between raw materials and *Baijiu* quality[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(3): 322-328 (in Chinese).
- [2] 马冲, 刘淼, 李涵, 蔡小波, 何旭, 黄孟阳, 秦辉. 现代微生物技术在白酒酿造中的应用研究进展[J]. 酿酒科技, 2023(5): 117-122, 127.  
MA C, LIU M, LI H, CAI XB, HE X, HUANG MY, QIN H. Research progress in the application of modern microbial technology in *Baijiu* production[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2023(5): 117-122, 127 (in Chinese).
- [3] ZHANG HX, WANG L, WANG HY, YANG F, CHEN LQ, HAO F, LV XB, DU H, XU Y. Effects of initial temperature on microbial community succession rate and volatile flavors during *Baijiu* fermentation process[J]. Food Research International, 2021, 141: 109887.
- [4] ZHENG XW, TABRIZI MR, ROBERT NOUT MJ, HAN BZ. *Daqu*: a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90.
- [5] SHANG CH, LI YJ, ZHANG J, GAN SL. Analysis of bacterial diversity in different types of *Daqu* and fermented grains from Danqian distillery[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 883122.
- [6] FAN GS, FU ZL, TENG C, WU QH, LIU PX, YANG R, MINHAZUL KAHM, LI XT. Comprehensive analysis of different grades of roasted-sesame-like flavored *Daqu*[J]. International Journal of Food Properties, 2019, 22(1): 1205-1222.

- [7] 汪江波, 沈玉洁, 张明春, 曹敬华, 陈茂彬. 白云边高温大曲中嗜热功能菌的分离筛选[J]. 酿酒, 2010, 37(5): 28-31.  
WANG JB, SHEN YJ, ZHANG MC, CAO JH, CHEN MB. Isolation and differentiation of thermophilic Bacteria in Baiyunbian high temperature Daqu[J]. Liquor Making, 2010, 37(5): 28-31 (in Chinese).
- [8] FAN GS, FU ZL, SUN BG, ZHANG YH, WANG XL, XIA YQ, HUANG MQ, LI XT. Roles of aging in the production of light-flavored Daqu[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 127(3): 309-317.
- [9] WANG Q, WANG CY, XIANG XQ, XU HL, HAN GQ. Analysis of microbial diversity and succession during Xiaogu Baijiu fermentation using high-throughput sequencing technology[J]. Engineering in Life Sciences, 2022, 22(7): 495-504.
- [10] CHEN YR, LI KM, LIU T, LI RY, FU GM, WAN Y, ZHENG FP. Analysis of difference in microbial community and physicochemical indices between surface and central parts of Chinese special-flavor Baijiu Daqu[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 592421.
- [11] ZHA MS, SUN BG, YIN S, MEHMOOD A, CHENG L, WANG CT. Generation of 2-furfurylthiol by carbon-sulfur lyase from the Baijiu yeast *Saccharomyces cerevisiae* G20[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(9): 2114-2120.
- [12] CHAI LJ, LU ZM, ZHANG XJ, MA J, XU PX, QIAN W, XIAO C, WANG ST, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Zooming in on butyrate-producing clostridial consortia in the fermented grains of Baijiu via gene sequence-guided microbial isolation[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1397.
- [13] ZHA MS, YIN S, SUN BG, WANG X, WANG CT. STR3 and CYS3 contribute to 2-furfurylthiol biosynthesis in Chinese sesame-flavored Baijiu yeast[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(27): 5503-5511.
- [14] WANG YP, WEI XQ, GUO XW, XIAO DG. Effect of the deletion of genes related to amino acid metabolism on the production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BioMed Research International, 2020, 2020(1): 6802512.
- [15] YANG L, ZENG SR, ZHOU MD, LI YT, JIANG ZY, CHENG PY, ZHANG CL. Comprehensive genomic and metabolomic analysis revealed the physiological characteristics and pickle like odor compounds metabolic pathways of *Bacillus amyloliquefaciens* ZZ7 isolated from fermented grains of Maotai-flavor baijiu[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1295393.
- [16] SUN H, CHAI LJ, FANG GY, LU ZM, ZHANG XJ, WANG ST, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Metabolite-based mutualistic interaction between two novel clostridial species from pit mud enhances butyrate and caproate production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(13): e0048422.
- [17] 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.
- [18] ZHANG YJ, SUN Q, LIU XY, BASIT RA, MA JH, FU ZL, CHENG LJ, FAN GS, TENG C. Screening, identification, and fermentation condition optimization of a high-yield 3-methylthiopropanol yeast and its aroma-producing characteristics[J]. Foods, 2024, 13(3): 418.
- [19] MA JH, CHENG LJ, ZHANG YJ, LIU YC, SUN Q, ZHANG J, LIU XY, FAN GS. Screening of yeasts isolated from Baijiu environments for producing 3-methylthio-1-propanol and optimizing production conditions[J]. Foods, 2022, 11(22): 3616.
- [20] FAN GS, LIU PX, CHANG X, YIN H, CHENG LJ, TENG C, GONG Y, LI XT. Isolation and identification of a high-yield ethyl caproate-producing yeast from Daqu and optimization of its fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 663744.
- [21] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984  
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [22] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.  
CAI MY, DONG XZ. Handbook for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [23] BARAKI SG, SIAHKOLAE SN, MOUSAVI A. Optimization of the genomic DNA extraction in some mosses[J]. Rostaniha, 2018, 19(2): 165-175.
- [24] 秦立芹, 马景浩, 李二浩, 周阳, 杨博思, 朱宇婷, 吴秋华, 田进英, 李秀婷, 范光森. 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.
- [25] QIN LQ, MA JH, LI EH, ZHOU Y, YANG BS, ZHU YT, WU QH, TIAN JY, LI XT, FAN GS. 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 (in Chinese).
- [26] 朱会芳, 江正强, 赵兰英, 郝姗姗. 一株产木聚糖酶的耐冷皮壳正青霉菌鉴定与酶谱分析[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(3): 376-379.  
ZHU HF, JIANG ZQ, ZHAO LY, HAO SS. Identification of a novel cold-adaptive xylanolytic *Eupenicillium crustaceum* and zymogram analysis of xylanase[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2009, 15(3): 376-379 (in Chinese).
- [27] 范光森, 许岱, 富志磊, 许春艳, 滕超, 孙宝国, 李秀婷. 古井贡酒曲中酵母的分离及其产香挥发性风味物质分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 220-229.  
FAN GS, XU D, FU ZL, XU CY, TENG C, SUN BG, LI XT. Screen of aroma-producing yeast strains from Gujingong Daqu and analysis of volatile flavor compounds produced by them[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(7): 220-229 (in Chinese).
- [27] 范光森, 严焯, 杨绍青, 闫巧娟, 江正强. 一株产木聚糖嗜热真菌樟绒枝霉的鉴定及其产纤维质降解酶系分析[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(1): 48-53.  
FAN GS, YAN Y, YANG SQ, YAN QJ, JIANG ZQ. Identification of a xylanase-producing thermophilic fungus, *Malbranchea cinnamomea*, and analysis of its



- cellulosic enzymes[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013, 19(1): 48-53 (in Chinese).
- [28] 蔡杰华, 刘斌, 石冬梅, 彭万强, 赖钧灼. 四种嗜热真菌的分离与鉴定[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(6): 1059-1064.  
CAI JH, LIU B, SHI DM, PENG WQ, LAI JZ. Isolation and identification of four species of thermophilic fungi[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(6): 1059-1064 (in Chinese).
- [29] 杨瑞娟, 吕杰, 严亮, 杨柳霞, 李晨晨, 姜姝, 盛军. 普洱茶渥堆发酵中嗜热真菌的分离和鉴定[J]. 茶叶科学, 2011, 31(4): 371-378.  
YANG RJ, LU J, YAN L, YANG LX, LI CC, JIANG S, SHENG J. Isolation and identification of thermophilic fungi during the fermentation of Puer tea[J]. Journal of Tea Science, 2011, 31(4): 371-378 (in Chinese).
- [30] 周森, 胡佳音, 崔洋, 赵卫鹏, 张如今, 白逢彦. 应用高通量测序技术解析清香型大曲微生物多样性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(6): 244-250.  
ZHOU S, HU JY, CUI Y, ZHAO WP, ZHANG RJ, BAI FY. Microbial diversity analysis of flight-flavor Daqu using high-throughput sequencing[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(6): 244-250 (in Chinese).
- [31] 张溪桐, 徐岩, 杜海. 低含水量条件下大曲中抑制土味素的功能微生物解析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 55-62.  
ZHANG XT, XU Y, DU H. Analysis of the geosmin-inhibiting microorganisms in Daqu under low water content[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(13): 55-62 (in Chinese).
- [32] 尤小龙. 酱香白酒酿造过程放线菌代谢活性成分研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2016.  
YOU XL. Study on active components of an actinomycete from Maotai-flavor liquor brewing process[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2016 (in Chinese).
- [33] 姚亚林, 郑若欣, 程铁轵, 邓杰, 任志强, 卫春会, 黄治国. 浓香型白酒窖泥中放线菌的发酵特性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(13): 191-197.  
YAO YL, ZHENG RX, CHENG TY, DENG J, REN ZQ, WEI CH, HUANG ZG. Study on the fermentation characteristics of actinomycetes in pit mud of Luzhou-flavor liquor[J]. Food Research and Development, 2020, 41(13): 191-197 (in Chinese).
- [34] 白成松, 陈莉, 卢红梅, 周莲, 任颀柯. 茅台地区酱香型酒糟中高温放线菌的分离鉴定[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 199-202.  
BAI CS, CHEN L, LU HM, ZHOU L, REN XK. Isolation and identification of thermoactinomycete from Moutai-flavor vinasse in Moutai region[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 199-202 (in Chinese).
- [35] 张靖宜, 张倩茹, 项文化, 魏树和, 牟文燕. 一株拮抗立枯丝核菌的放线菌筛选、鉴定及生理特性[J]. 生态学杂志, 2014, 33(2): 394-399.  
ZHANG JY, ZHANG QR, XIANG WH, WEI SH, MU WY. Screening, identification and physiological characteristics of an actinomycete strain against *Rhizoctonia solani*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(2): 394-399 (in Chinese).
- [36] 林群, 肖之陶, 付秋香, 方向明, 莫龙久, 潘启福. 产香风味地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的分离及发酵代谢产物分析[J]. 酿酒科技, 2013(12): 49-52.  
LIN Q, XIAO ZT, FU QX, FANG XM, MO LJ, PAN QF. Isolation of aroma-producing *Bacillus licheniformis* and analysis of its fermentation metabolites[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2013(12): 49-52 (in Chinese).
- [37] 张璋, 赵腾飞, 李红霞, 宋露露. 产蛋白酶芽孢杆菌的筛选、耐酸性驯化及蛋白酶学性质分析[J]. 中国酿造, 2024, 43(1): 84-90.  
ZHANG Z, ZHAO TF, LI HX, SONG LL. Screening and acid resistance acclimatization of protease-producing *Bacillus* and enzymatic characteristics analysis[J]. China Brewing, 2024, 43(1): 84-90 (in Chinese).
- [38] 成冬冬, 董灿灿, 韩小龙, 迟玉洁, 吕冰, 杨威, 陈坤, 胡彦营. 浓香型大曲白酒窖池微生物及养护研究进展[J]. 食品科技, 2022, 47(12): 15-19.  
CHENG DD, DONG CC, HAN XL, CHI YJ, LYU B, YANG W, CHEN K, HU YY. Research progress on microorganism and maintenance of Luzhou-flavor Daqu liquor pit[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(12): 15-19 (in Chinese).
- [39] SHEN T, LIU J, WU Q, XU Y. Increasing 2-furfurylthiol content in Chinese sesame-flavored *Baijiu* via inoculating the producer of precursor L-cysteine in *Baijiu* fermentation[J]. Food Research International, 2020, 138(Pt A): 109757.
- [40] 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.
- [41] BHATTACHARYA D, de LOS SANTOS VILLALOBOS S, RUIZ VV, SELVIN J, MUKHERJEE J. *Bacillus rugosus* sp. nov. producer of a diketopiperazine antimicrobial, isolated from marine sponge *Spongia officinalis* L.[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2020, 113(11): 1675-1687.
- [42] 孔晓双, 黄新新, 董应宏, 侯敏, 买尔哈巴·艾合买提, 侯新强, 崔卫东. 一株产 $\beta$ -葡萄糖苷酶甘草内生菌的筛选、全基因组分析及产酶优化[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 279-294.  
KONG XS, HUANG XX, DONG YH, HOU M, MARHABA A, HOU XQ, CUI WD. Screening, whole genome analysis, and fermentation condition optimization of a  $\beta$ -glucosidase-producing endophyte from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 279-294 (in Chinese).
- [43] 高颖, 张弘弢, 陈媛媛. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其体外降解 AFB1 的效果分析[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2022, 34(5): 54-60.  
GAO Y, ZHANG HT, CHEN YY. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* FWJ16X degrading aflatoxin B1 and detoxification effect *in vitro*[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022, 34(5): 54-60 (in Chinese).
- [44] 张颖超, 于鑫, 赵祥颖, 刘丽萍, 黄艳红, 张家祥, 刘建军. 产 4-乙基愈创木酚菌株的筛选、鉴定及其在酱油酿造中的应用[J]. 中国酿造, 2023, 42(11): 115-121.  
ZHANG YC, YU X, ZHAO XY, LIU LP, HUANG YH, ZHANG JX, LIU JJ. Screening and identification of 4-ethyl guaiacol-producing strain and its application in soy sauce brewing[J]. China Brewing, 2023, 42(11): 115-121 (in Chinese).

- [45] 江森, 李仁祥, 李博, 唐霄, 李童, 薛文阁, 尹崇. 艾草发酵物中凝结芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性[J]. 湖南饲料, 2023(6): 38-43.  
JIANG S, LI RX, LI B, TANG X, LI T, XUE WG, YIN C. Isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus coagulans* from wormwood fermentation products[J]. Hunan Feed, 2023(6): 38-43 (in Chinese).
- [46] 卢宇, 马东晓, 周锦涛, 胡治旭, 杨泽慧, 段晓盟, 纵丹, 何承忠. 一株产吡啶乙酸的日本野漆树内生枯草芽孢杆菌生长条件及其促生特性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(3): 392-399.  
LU Y, MA DX, ZHOU JT, HU ZX, YANG ZH, DUAN XM, ZONG D, HE CZ. Growth conditions and growth-promoting characteristics of an endophytic bacterium from *Toxicodendron succedaneum*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2023, 38(3): 392-399 (in Chinese).
- [47] 胡江涛, 刘奇, 周英, 宋倩, 何小露, 郭崇炎, 邹志华, 梅文宇, 熊春晖, 张静燕. 芽孢杆菌 hjt6 的鉴定、生长特性及其对瓠瓜灰霉病菌的拮抗效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 832-845.  
HU JT, LIU Q, ZHOU Y, SONG Q, HE XL, GUO CY, ZOU ZH, MEI WY, XIONG CH, ZHANG JY. Identification and growth characterization of *Bacillus* sp. hjt6 with antagonistic effects on *Cladosporium tenuissimum* causing gray mold disease of bottle gourd[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 832-845 (in Chinese).
- [48] HONG LX, FU GM, LIU T, CHEN YR, WU SW, CAI WQ, XIE ZJ, WAN Y. Functional microbial agents enhance ethanol contents and regulate the volatile compounds in Chinese *Baijiu*[J]. Food Bioscience, 2021, 44: 101411.
- [49] 吴正坤, 刘蒲临, 杨团元, 缪礼鸿, 廖卫芳. 不同贮存期高温大曲微生物群落演替与理化指标相关性分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(7): 160-166.  
WU ZK, LIU PL, YANG TY, MIAO LH, LIAO WF. Correlation analysis of microbial community succession and physicochemical properties of Daqu in different storage periods[J]. China Brewing, 2023, 42(7): 160-166 (in Chinese).
- [50] STERGIOU PY, FOUKIS A, GKINI OA, BAROUNI E, GEORGOULIA PS, KANELLAKI M, KOUTINAS AA, PAPAGIANNI M, PAPAMICHAEL EM. Novel FRET-substrates of *Rhizomucor pusillus* rennin: Activity and mechanistic studies[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 926-933.
- [51] 范光森, 杨绍青, 闫巧娟, 严烨, 江正强. 嗜热棉毛菌固体发酵产木聚糖酶条件的优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 219-224.  
FAN GS, YANG SQ, YAN QJ, YAN Y, JIANG ZQ. Optimization of xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* CAU44 by solid-state fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(6): 219-224 (in Chinese).
- [52] HUANG YH, YI ZL, JIN YL, ZHAO YG, HE KZ, LIU DY, ZHAO D, HE H, LUO HB, ZHANG WX, FANG Y, ZHAO H. New microbial resource: microbial diversity, function and dynamics in Chinese liquor starter[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 14577.
- [53] LI J, ZHANG JD, SHEN SG, ZHANG B, YU WW. Magnetic responsive *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel synthesis[J]. Materials Today Communications, 2020, 24: 101197.
- [54] ZHU Q, CHEN LQ, PENG Z, ZHANG QL, HUANG WQ, YANG F, DU GC, ZHANG J, WANG L. The differences in carbohydrate utilization ability between six rounds of Sauce-flavor *Daqu*[J]. Food Research International, 2023, 163: 112184.
- [55] 黄娜, 张明, 李子健, 饶家权, 邹永芳, 黄丹, 罗惠波. 不同颜色酱香型大曲微生物群落结构及功能比较[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(4): 260-266.  
HUANG N, ZHANG M, LI ZJ, RAO JQ, ZOU YF, HUANG D, LUO HB. Comparative analysis of microbial community structure and function in Jiangxiang Daqu with different colors[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(4): 260-266 (in Chinese).
- [56] GARBIN AP, GARCIA NFL, CAVALHEIRO GF, SILVESTRE MA, RODRIGUES A, Da PAZ MF, FONSECA GG, LEITE RSR.  $\beta$ -glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus crustaceus*: production and industrial potential[J]. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2021, 93(1): e20191349.
- [57] LIU X, GUO KL, ZHANG HX. Determination of microbial diversity in Daqu, a fermentation starter culture of Maotai liquor, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(6): 2375-2381.
- [58] FAN GS, YANG SQ, YAN QJ, GUO Y, LI YX, JIANG ZQ. Characterization of a highly thermostable glycoside hydrolase family 10 xylanase from *Malbranchea cinnamomea*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 482-489.
- [59] HAN P, ZHOU P, HU SQ, YANG SQ, YAN QJ, JIANG ZQ. A novel multifunctional  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*: biochemical characterization and three-dimensional structure[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(2): 420-435.
- [60] BASOTRA N, JOSHI S, SATYANARAYANA T, PATI PK, TSANG A, CHADHA BS. Expression of catalytically efficient xylanases from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea* for synergistically enhancing hydrolysis of lignocellulosics[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 185-192.
- [61] ZHU N, JIN HM, KONG XP, ZHU YY, YE XM, XI YL, DU J, LI BQ, LOU MH, SHAH GM. Improving the fermentable sugar yields of wheat straw by high-temperature pre-hydrolysis with thermophilic enzymes of *Malbranchea cinnamomea*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 149.
- [62] 姚灿, 李国友, 张彬, 郝传发, 杨涛. 中高温大曲中嗜热真菌的分离鉴定及其酶活性测定[J]. 酿酒, 2019, 46(5): 32-35.  
YAO C, LI GY, ZHANG B, HAO CF, YANG T. Isolation and identification of thermophilic fungi from moderate/high-temperature Daqu and determination of enzyme activity[J]. Liquor Making, 2019, 46(5): 32-35 (in Chinese).
- [63] 杨越. 云南部分温泉嗜热微生物的多样性及嗜热酶的研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2012.  
YANG Y. Studies on species diversity and thermophilic enzyme from hot spring in part regions of Yunnan[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2012 (in Chinese).