

产 β -D-葡萄糖苷酶菌株筛选及其在香草兰豆荚发酵生香中的应用

周 焯^{1,3}, 侯梅芳¹, 赵青云^{2,3*}, 谢心湄⁴, 徐 飞^{3,5}, 吴桂苹^{3,5}, 谷风林^{2,3,5}

1. 上海应用技术大学生态技术工程学院, 上海 200233; 2. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572000; 3. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 4. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070; 5. 海南省特色热带作物适宜性加工与品质控制重点实验室, 海南万宁 571533

摘 要: 本研究从发酵后的香草兰豆荚中筛选出产 β -D-葡萄糖苷酶的微生物菌株, 并将筛选出的菌株应用到香草兰发酵过程中, 以提高发酵豆荚品质。采用七叶苷选择培养基传统分离培养方法, 从发酵后的香草兰豆荚中筛选出可产 β -D-葡萄糖苷酶的菌株, 鉴定每株菌的菌株同源性, 测量每株菌产 β -D-葡萄糖苷酶酶活, 绘制 2 株产酶较高的菌株系统发育树, 并将产酶最高的 2 株菌按照不同组合喷洒至发酵中的香草兰豆荚中, 测定其发酵豆荚香兰素含量、香兰素葡萄糖苷含量和挥发性成分。结果表明: 从产自马达加斯加 (M) 的香草兰发酵豆荚中共筛选出 9 株菌、产自中国热带农业科学院香料饮料研究所 (S) 的香草兰发酵豆荚中筛选到 12 株菌, 检测出的 15 株菌均为芽孢杆菌, 其中 M3、S7 的 β -D-葡萄糖苷酶活力较高。使用 M3、S7 以不同组合添加喷菌发酵试验的豆荚中, 只喷 M3 的发酵豆荚香兰素含量最高为 2.25%, M3 与 S7 按照体积比 1:1 喷洒处理的香兰葡萄糖苷含量下降最多, 为 80.7%, 只喷 M3 的发酵豆荚鉴定出挥发性物质 34 种。本研究成功筛选出产 β -D-葡萄糖苷酶的功能微生物, 并利用筛选出的微生物辅助香草兰豆荚发酵生香, 可用于提升香草兰豆荚品质。

关键词: 香草兰; β -D-葡萄糖苷酶; 香兰素; 发酵优化

中图分类号: Q815 **文献标志码:** A

Isolation of β -D-glucosidase Producing Microorganisms and Application on Vanilla Pods Fermentation

ZHOU Ye^{1,3}, HOU Meifang¹, ZHAO Qingyun^{2,3*}, XIE Xinmei⁴, XU Fei^{3,5}, WU Guiping^{3,5}, GU Fenglin^{2,3,5}

1. School of Ecological Technology and Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200233, China; 2. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572000, China; 3. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 4. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; 5. Key Laboratory of Processing Suitability and Quality Control of the Special Tropical Crops of Hainan Province, Wanning, Hainan 571533, China

Abstract: This study aims to screen the microbial strains capable of producing β -D-glucosidase from fermented vanilla pods and apply the screened strains to the fermentation process of vanilla with the goal of enhancing vanillin production and improving the quality of vanilla bean. Septenary selective medium was utilized to isolate β -D-glucosidase producing bacteria, identify the homology of each bacterial strain and measure the production of β -D-glucosidase activity of each strain on two strains with higher enzyme production. The phylogenetic tree was constructed. The two strains of bacteria with the highest enzyme production in different combinations were sprayed onto the fermented vanilla pods. The content of vanillin, vanillin glucoside, and volatile components in different treatments of β -D-glucosidase producing bacteria

收稿日期 2024-04-19; **修回日期** 2024-04-30

基金项目 三亚崖州湾科技城科技专项 (No. SCKJ-JYRC-2022-25); 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2022XDNY268); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630142022008)。

作者简介 周 焯 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 香草兰发酵。*通信作者 (Corresponding author): 赵青云 (ZHAO Qingyun), E-mail: qingyun_022@163.com。

were determined. Nine strains were successfully screened from the vanilla pods originating in Madagascar (M), and twelve strains were isolated from the vanilla pods produced by Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (S). The fifteen strains were detected as *Bacillus*. M3 and S7 had higher enzyme activities than other isolates. Vanilla pods treated with M3 obtained the highest vanillin content, which reached to 2.25% and possessed the highest aroma components. The maximum decrease in vanillin glucoside content was 80.7% when sprayed with M3 and S7 in a volume ratio of 1:1. There were 34 volatile substances in the fermented pods sprayed with M3, making it the most volatile combination of spraying bacteria. In the present study, we successfully isolated β -D-glucosidase producing bacteria for improving the quality of vanilla pods fermentation.

Keywords: vanilla; β -D-Glucosidase; vanillin; fermentation optimization

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.024

香草兰 (*Vanilla planifolia* Andrews) 又名香荚兰、香子兰, 属多年生大型肉质藤本香料植物, 是兰科植物中最有实用价值的优质食用香料, 享有天然食品香料之王的美誉, 单价仅次于藏红花^[1-3]。新鲜成熟的香草兰豆荚无特殊香气, 其豆荚经杀青、发汗、干燥、陈化等工艺后可产生香兰素、香草酸、香草醇等, 据报道其芳香成分可达 250 多种, 是各种高端食品饮料及化妆品等优质原料, 广泛应用于调配各级高档食品、化妆品等, 在国际市场上供不应求^[4-10]。

香草兰发酵后的众多芳香成分中, 最受瞩目及最能反映豆荚品质的香味物质是香兰素^[11], 其由香草兰豆荚中的 β -D-葡萄糖苷酶转化香兰素葡萄糖苷生成^[12-14], 因此在发酵过程中香兰素葡萄糖苷含量逐渐降低, 香兰素含量逐渐提升。香草兰鲜豆荚中香兰素葡萄糖苷含量达 10% 以上, 但加工后豆荚中香兰素含量仅占 1%~3%, 香兰素葡萄糖苷并不能完全转化为香兰素。浦帆等^[15]研究发现添加 β -D-葡萄糖苷酶, 酶促生香效果明显, 可提高豆荚中香兰素含量。莫丽梅^[16]在香草兰青豆荚中添加 β -D-葡萄糖苷酶、果胶酶、纤维素酶, 处理后香兰素含量有明显提升。张彦军等^[17]使用冷冻-联合纤维素酶、果胶酶、 β -D-葡萄糖苷酶方法处理香草兰鲜豆荚, 显著提高香兰素转化率。WALISZEWSKI 等^[18]使用结晶酶 PML-MX、Zymafilt L-300 和 Novozym 3 种纤维素分解酶产物对香草兰豆荚进行预脱水和酶促预处理, 结果表明酶促预处理使香兰素含量增加 1 倍。以上研究均可证明额外添加酶, 尤其是 β -D-葡萄糖苷酶对提高香兰素含量起着重要作用, 但酶价格昂贵, 而微生物已被证明参与香草兰发酵过程^[19], 且微生物来源获得高纯度 β -D-葡萄糖苷酶制剂的制备工艺较为简单、酶促效果更佳^[20], 从香草兰豆荚

中筛选的微生物应用到香草兰发酵中也更安全可靠。陈永敢^[21]使用产 β -D-葡萄糖苷酶的芽孢杆菌辅助豆荚发酵生香, 明显提高了香草兰豆荚中香兰素含量。

本研究以产自马达加斯加香草兰发酵豆荚 (M) 和中国热带农业科学院香料饮料研究所香草兰发酵豆荚 (S) 为原料, 使用七叶苷选择性培养基, 筛选产 β -D-葡萄糖苷酶的微生物菌株, 选择酶活较高的 2 株菌按照不同比例混合, 喷洒到香草兰豆荚表面, 使用 HPLC 技术和 GC-MS 技术测定发酵豆荚的香兰素、香兰素葡萄糖苷含量和挥发性物质, 旨在利用微生物辅助香草兰豆荚发酵生香, 为提升豆荚品质提供支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试香草兰豆荚: 产自马达加斯加的香草兰商品豆荚 (M) 和产自中国热带农业科学院香料饮料研究所的香草兰商品豆荚 (S)。

七叶苷麦克林试剂, 香兰素标准品, 上海源叶生物科技有限公司; 香兰素葡萄糖苷标准品, 阿拉丁试剂公司; C7~C30 烷烃标准样品, 美国 Sigma 公司。

初筛培养基: 参考高娉娉等^[22]的方法, 称取氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 琼脂 15 g, 七叶苷 1 g, 柠檬酸高铁氨 2.5 g, 蒸馏水 1000 mL, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 备用。LB 培养基: 氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 备用 (发酵条件优化用液体培养基不加琼脂)。发酵培养基: 参考崔萍等^[23]的方法, 酵母浸膏 1.0% (氮源), 葡萄糖 2.0% (碳源), 蛋白胨 2.0% (氮源和碳源), NH_4NO_3 0.3%

(氮源)、 KH_2PO_4 0.4%，自然 pH，115 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min，备用。

1.2 方法

1.2.1 产 β -D-葡萄糖苷酶菌株筛选 分别将 M 和 S 2 种香草兰豆荚用无菌剪刀剪短至约 0.2 cm 长的小段，取剪短后的豆荚 5 g 置于 45 mL 无菌水中，180 r/min 震荡 1 h，静置 30 min 后，将上清液进行梯度稀释，选取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释液，分别吸取 0.2 mL 稀释液，均匀涂布至初筛培养皿上，每梯度设置 3 次重复，在 28 ℃ 的培养箱中倒置培养 48 h。待长出菌落后，根据菌落形态、颜色，挑选可产生明显黑色水解圈的单菌落，将单菌落在 LB 培养皿上划线。连续纯化 5 次后挑取单菌落接种至 LB 培养基斜面，置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 产 β -D-葡萄糖苷酶菌株的分子鉴定 菌株 16S rDNA 分子鉴定参考尚方剑等^[24]的方法。采用 DNA 离心柱型试剂盒提取菌株的 DNA，将总 DNA 作为模板，将细菌特异性引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGACTACNCGGTTCCTAAT-3') 对 DNA 的内转录间隔区进行 PCR 扩增。将纯化后的产物送至上海派森诺生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 菌株产 β -D-葡萄糖苷酶活力测定 酶活测定参考王彩肖等^[25]的方法。

1.2.4 样品的制备 将香草兰豆荚置于 75 ℃ 水中杀青 5 min，用无菌纱布将豆荚表面水分擦净。将 M3、S7 菌株接种至 LB 液体培养基中，将含菌液的培养基在 28 ℃ 和 180 r/min 的恒温摇床中震荡培养 48 h。在无菌环境下将菌液以 8000 r/min 离心 10 min，弃上清液，再加入 50 mL 无菌水，充分摇匀后再次离心，重复 2 次以上操作，调整菌液吸光度约为 0.5 后，作喷菌处理，喷菌比例如表 1 所示。将菌液均匀喷洒在杀青后的豆荚表

面，每组豆荚 10 根喷菌液 10 mL，将豆荚置于干燥阴凉处分别发酵 20 d 和 60 d 后取样。测量分析前，将样品低温冻干粉碎并过 60 目筛。

1.2.5 香兰素与香兰素葡萄糖苷含量分析 参考杨峰等^[13]的方法，称取 0.05 g 冻干香草兰豆荚粉末，加入 50 mL 无水乙醇，充分搅拌后进行超声萃取，设置超声功率 100 W，50 ℃ 条件下萃取 10 min；萃取后过滤，重复进行 3 次萃取，合并滤液，定容至 50 mL 容量瓶，测豆荚中的香兰素和香兰素葡萄糖苷含量，取萃取液用 0.22 μm 有机滤膜过滤后进行 HPLC 分析。分析条件：反相 C18 柱 (Zorbax, 4.6 mm $\times$ 100 mm, 3.5 μm , Agilent)；流速为 0.8 mL/min；进样量为 5 μL ；柱温为 25 ℃；检测波长为 280 nm；流动相为 0.5% 醋酸溶液：乙腈=85：15 等梯度洗脱。采用香兰素标准品、香兰素葡萄糖苷标准品和出峰保留时间定性，外标法确定物质含量。

1.2.6 香草兰挥发性成分分析 称取 1 g 冻干香草兰豆荚粉末于 20 mL 顶空进样瓶中，80 ℃ 振摇 SPME 萃取 40 min，250 ℃ 解吸 5 min。GC-MS 采用 DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) 石英毛细管柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)，升温程序为：柱温 40 ℃ 保持 3 min，以 3 ℃/min 速率升温到 90 ℃，以 2 ℃/min 速率升温到 120 ℃，以 3 ℃/min 速率升温到 240 ℃，保持 20 min。样品进样不分流，电子冲击能量为 70 eV，离子源和四极杆的温度分别设定在 230 ℃ 和 150 ℃。扫描范围为 40~450 amu。

1.3 数据处理

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行方差分析；采用 Origin 2019 软件、MEGA 11.0 软件和 GenBank 中的 BLAST 软件进行数据处理和绘图。

2 结果与分析

2.1 产 β -D-葡萄糖苷酶菌株的筛选

从发酵后的香草兰豆荚中筛选到 21 株可在七叶苷筛选培养基上产生黑色水解圈的菌株，各菌株菌落形态特征存在差异 (图 1)，黑色水解圈大小不同，其中菌株 M3、M7、S2、S3、S4、S7 黑色水解圈较大。从产自马达加斯加香草兰豆荚上筛选到的菌株 M3 在 LB 培养基培养 24 h 后菌落呈圆形，乳白色，表面光滑湿润，边缘整齐。从产自香饮所的香草兰豆荚上筛选到的菌株 S7 菌落形态与 M3 相似。

表 1 喷菌处理
Tab. 1 Spray treatment

处理 Treatment	方法 Method
CK	喷无菌水
M3	只喷 M3 菌液
S7	只喷 S7 菌液
1 : 1	M3 与 S7 菌液按照体积比 1 : 1 混合
2 : 1	M3 与 S7 菌液按照体积比 2 : 1 混合
1 : 2	M3 与 S7 菌液按照体积比 1 : 2 混合

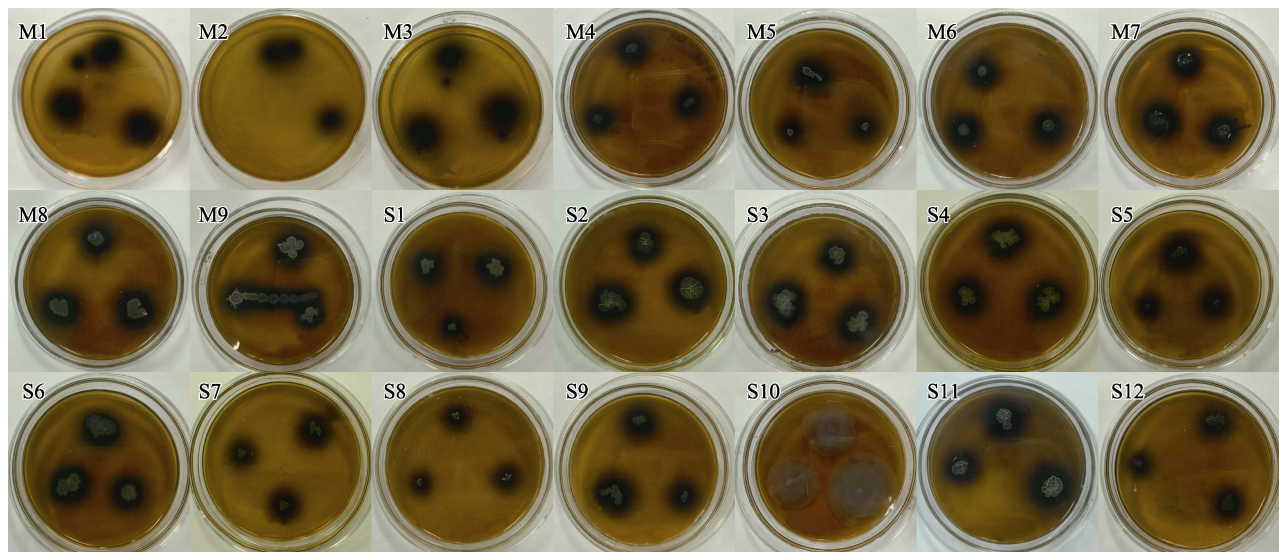


图 1 菌株在筛选培养基上产水解圈情况
Fig. 1 Hydrosphere of strains in screening medium

2.2 产 β -D-葡萄糖苷酶菌株的鉴定

经 16S rRNA 序列测定后，用 BLAST 与 GenBank 中 16S rDNA 序列进行同源性比较。发现菌株 M1、M3、M6、S1、S3、S7 的 16S rRNA 序列与 NCBI 数据库中的 *B. paramycoides* MCCC 1A04098、*L. macroides* LMG 18474、*B. subtilis* DSM 10、*B. altitudinis* 41KF2b、*B. rugosus* SPB7、*B. paramycoides* MCCC 1A04098 相似度分别达到 99.79%、99.52%、99.52%、99.93%、99.93%、99.86%（表 2）。除 6 株菌未检测出外，其余 15 株菌 NCBI 比对分析结果表明均为芽孢杆菌，其中，M1、M3、M6、S1、S3、S7 分别为副蕈状芽孢杆菌（*Bacillus paramycoides*）、长形氨酸芽孢杆菌（*Lysinibacillus macroides*）、枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）、高空芽孢杆菌（*B. altitudinis*）、胶质芽孢杆菌（*B. altitudinis*）、副蕈状芽孢杆菌（*B. paramycoides*）。对菌株 M3 及 S7 的测序结果建立系统发育树，结果如图 2 所示，进一步验证 M3 为 *Lysinibacillus macroides*，S7 为 *B. paramycoides*。

2.3 产 β -D-葡萄糖苷酶菌株的产酶活性

鉴定出的 15 株芽孢杆菌产 β -D-葡萄糖苷酶能力如图 3 所示，菌株产酶活性在 0.00294~0.01117 U/mL。分离自马达加斯加香草兰豆荚上的长形赖氨酸芽孢杆菌 M3 酶活性最高，是副蕈状芽孢杆菌 M8 酶活力的 3.8 倍。分离自香饮所香草兰豆荚上的菌株产酶活力在 0.00599~0.00736 U/mL，酶活力变化范围低于分离自马达加

斯加香草兰豆荚上的产酶菌株，其中菌株副蕈状芽孢杆菌 S7 酶活力高于本组中其他菌株酶活力。

2.4 香兰素与香兰素葡萄糖苷含量变化

从图 4 可看出，每组处理喷菌 60 d 后的香兰素含量均高于 20 d 时的含量。CK 在 20、60 d 时的香兰素含量分别为 0.28%和 0.92%。只喷 M3 菌株的处理在 20 d 时香兰素含量为 0.49%，60 d 高达 2.25%，显著高于其他处理。只喷 S7 菌株的处理，在 20、60 d 时的香兰素含量分别为 1.39%、1.52%，上升幅度不大。菌株 M3、S7 按照 1 : 1

表 2 产 β -D-葡萄糖苷酶的菌株 16S rDNA 鉴定结果
Tab. 2 β -D-glucosidase producing microbes identified by 16S rDNA sequences

编号 No.	同源菌株 Homologous strain	同源性 Homology/%
M1	<i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.79
M2	<i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.93
M3	<i>L. macroides</i> LMG 18474	99.52
M5	<i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.86
M6	<i>B. subtilis</i> DSM 10	99.52
M7	<i>L. macroides</i> LMG 18474	99.59
M8	<i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.73
M9	<i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.73
S1	<i>B. altitudinis</i> 41KF2b	99.93
S2	<i>L. macroides</i> LMG 18474	99.66
S3	<i>B. rugosus</i> SPB7	99.93
S7	<i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.86
S8	<i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.86
S11	<i>B. subtilis</i> DSM 10	99.86
S12	<i>L. macroides</i> LMG 18474	99.52

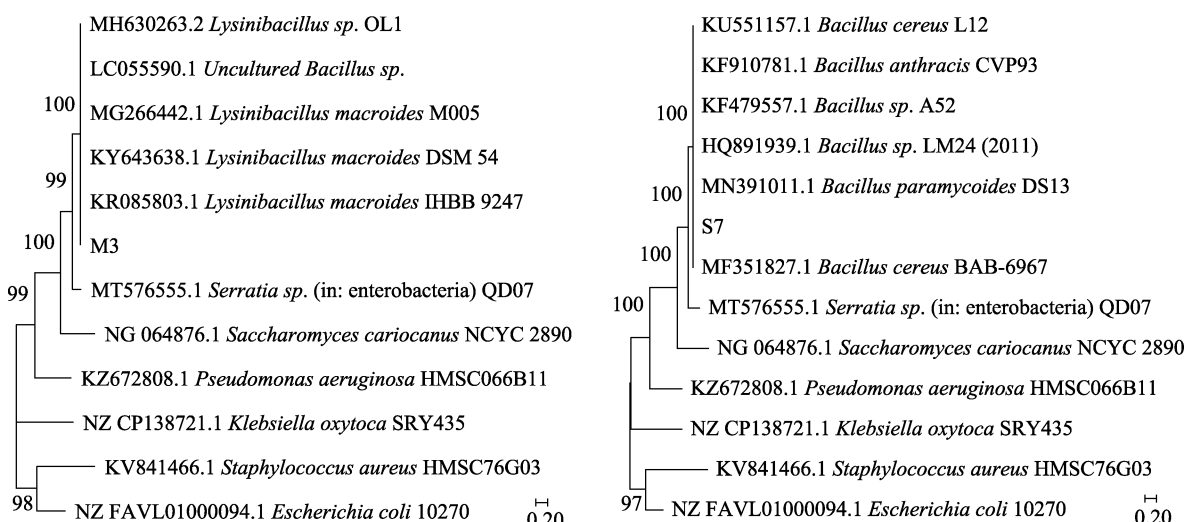
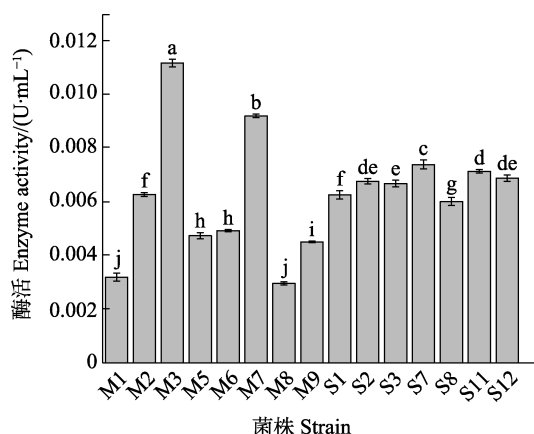


图 2 基于 16S rDNA 基因全长序列构建的系统进化树 (左: M3, 右: S7)

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain M3 and S7 based on 16S rDNA sequence (left: M3, right: S7)

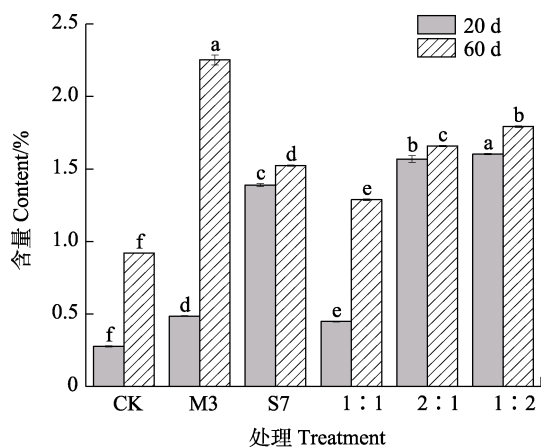


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 3 不同菌株 β -D-葡萄糖苷酶活力

Fig. 3 β -D-glucosidase activities of different strains



不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

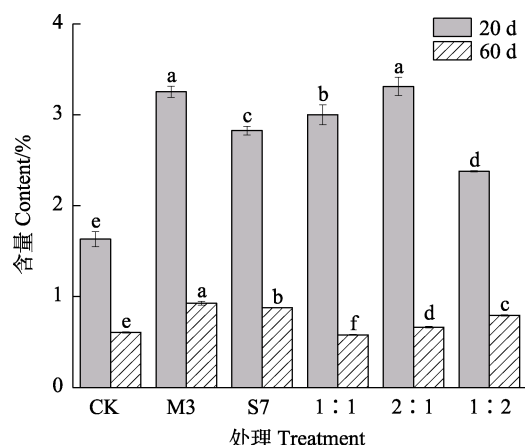
Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the same time ($P < 0.05$).

图 4 不同喷菌处理豆莢的香兰素含量

Fig. 4 Vanillin content of vanilla beans with different spraying bacteria treatments

喷菌处理的豆莢 20、60 d 时香兰素含量分别为 0.45%、1.29%，60 d 相较于 20 d 的香兰素含量增加了 186.7%。M3 与 S7 按照 2 : 1 喷菌处理的豆莢，在 20、60 d 时香兰素含量分别为 1.57%、1.66%。M3 与 S7 按照 1 : 2 喷菌处理的豆莢发酵 20、60 d 时香兰素含量分别为 1.60%、1.80%。综上，香兰素含量最高的是只喷 M3 菌株处理的豆莢。在 20、60 d 时所有喷菌处理的豆莢香兰素含量均高于 CK，说明产 β -D-葡萄糖苷酶的功能微生物可有效促进香兰素产生，提升发酵豆莢品质。

图 5 为不同处理香草兰豆莢分别在喷菌 20、60 d 后的香兰素葡萄糖苷含量。从图 5 中可得出，喷菌后的 20~60 d 内，豆莢香兰素葡萄糖苷含量呈下降趋势。喷无菌水豆莢在 20、60 d 时的香兰素葡萄糖苷含量分别为 1.63%、0.61%，60 d 相较于 20 d 的香兰素葡萄糖苷含量下降了 62.6%。只喷 M3 菌株处理的豆莢发酵 20、60 d 时的香兰素葡萄糖苷含量分别为 3.25%、0.93%，60 d 相较于 20 d 的香兰素葡萄糖苷含量下降了 71.4%。只喷 S7 菌株处理的豆莢发酵 20、60 d 时的香兰素葡萄糖苷含量分别为 2.83%、0.88%，60 d 相较于 20 d 的香兰素葡萄糖苷含量下降了 68.9%。M3 与 S7 按照体积比 1 : 1 喷洒处理的发酵豆莢 20、60 d 时的香兰素葡萄糖苷含量分别为 3.00%、0.58%，60 d 的相较于 20 d 的香兰素葡萄糖苷含量下降了 80.7%；M3 与 S7 按照体积比 2 : 1 喷菌处理的豆莢发酵 20、60 d 的香兰素葡萄糖苷含量分别为



不同小写字母表示同一时间不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the same time ($P < 0.05$).

图 5 不同喷菌处理豆荚香兰素葡萄糖苷含量

Fig. 5 Vanillin glucoside content of vanilla beans with different spraying bacteria treatments

3.31%、0.66%，60 d 的相较于 20 d 的香兰素葡萄糖苷含量下降了 80.0%；M3 与 S7 按照体积比 1 : 2 喷菌处理的豆荚发酵 20、60 d 时香兰素葡萄糖苷含量分别为 2.38%、0.79%，60 d 的相较于 20 d 的香兰素葡萄糖苷含量下降了 66.8%。由此可见，香兰素葡萄糖苷下降最多的是 M3 与 S7 按照体积比为 1 : 1 喷菌处理的豆荚，而下降最少的是 CK，这说明产 β -D-葡萄糖苷酶的微生物菌株可显著促进香兰素葡萄糖苷水解。

2.5 香草兰挥发性成分分析

采用 GC-MS 对喷菌处理发酵 20 d 和 60 d 时的豆荚进行挥发性成分分析，喷菌发酵 20 d 时检测出的挥发性物质共 47 种 (表 3)，其中烷烃类 11 种、醛类 12 种、酸类 6 种、烯烃 1 种、醇类 7 种、酚类 6 种、酮类 2 种、其他类 2 种，占比最多的是醛类，占检测出所有物质的 28% (图 6A)。喷菌发酵 60 d 时豆荚的挥发性成分共有 50 种 (表 4)，其中烷烃类有 8 种、醛类 14 种、酸类 4 种、烯烃 4 种、醇类 10 种、酚类 5 种、酯类 1 种、酮类 2 种、其他类 2 种，占比最多的依旧为醛类，占总物质种类数量的 25.4% (图 6B)。发酵 20 d 含量最高的物质是香兰素，其中 M3 与 S7 按照体积比 1 : 1 喷菌的发酵豆荚香兰素含量占比最高为 80.77%，其次是只喷菌 M3 菌株的豆荚，香兰素含量为 78.49%，M3 与 S7 按照体积比 1 : 2 和 2 : 1 喷菌处理的豆荚香兰素含量占比约为 77.00%，CK 香兰素含量最低。发酵 60 d 时含量

最高的挥发物质也是香兰素，M3 与 S7 按照体积比 1 : 2 喷洒的香兰素含量最高，只喷 S7 处理与 CK 差异不大，其他 3 个喷菌处理香兰素含量均约为 88.00%。豆荚发酵 20 d 时 CK 和只喷 M3 菌株的处理均检测到对羟基苯甲醛，且含量仅次于香兰素。对羟基苯甲醛是合成香兰素的重要前体物质，在发酵 60 d 时每个处理均检测到对羟基苯甲醛，且含量均大于 1.00%。豆荚发酵 20 d 时单独喷菌 M3、S7 及二者 1 : 1 混合的处理均检测到 2,3-丁二醇。2,3-丁二醇是香草兰的特征风味物质，在发酵 60 d 时不同处理豆荚中均含有 2,3-丁二醇，其中喷洒 S7 菌株处理的豆荚中含量高达 2.57%，高于其他处理的豆荚。

如图 7 所示，有 18 种挥发物在 2 个时间均有被检出，如香兰素、愈创木酚、乙酸、反-2-癸烯醛、香草乙酮等，且以上物质已被证明大量存在于香草兰豆荚发酵前期^[14]。只喷 M3 菌株处理的豆荚 60 d 时检测出 3-羟基丁酮，该物质是重要食品香料^[26]，具有独特香味，且其可在无其他碳源的情况下作为 *B. subtilis* 的碳源^[21]。

3 讨论

β -D-葡萄糖苷酶是纤维素酶系中一种重要的水解酶，可以催化风味前体糖苷配基 (烃基或芳基) 与糖基之间的糖苷键水解，产生芳香物质达到增香效果。微生物来源的 β -D-葡萄糖苷酶数量庞大，价格低廉，制备容易且用途广泛^[27]。本研究以香草兰豆荚为原料，分离出 21 株可产 β -D-葡萄糖苷酶的菌株，并鉴定出其中 15 株菌均为芽孢杆菌。从产自马达加斯加的香草兰豆荚中筛选出的菌株中，产 β -D-葡萄糖苷酶活力最高的菌株 M3 为长形赖氨酸芽孢杆菌 (*L. macroides*)。从产自中国热带农业科学院香料饮料研究所的香草兰豆荚中筛选出的菌株中，酶活力最高的菌株 S7 为副草状芽孢杆菌 (*B. paramycooides*)。鲍捷等^[28]筛选到 1 株产 β -D-葡萄糖苷酶的植物乳植杆菌 c4-3，并使用该菌株用于豆浆的发酵，发现添加该菌株后能够有效提升豆浆的营养。王玲^[29]筛选优化了产 β -D-葡萄糖苷酶的菌，并将其运用到葡萄酒发酵中，使葡萄酒的香气物质种类和含量相较于未添加的葡萄酒有显著差异，具有开发为酿酒增香酶制剂的潜力。

表 3 喷菌处理 20 d 的香草兰豆荚挥发性成分
Tab. 3 Volatile components of vanilla pods with spraying bacteria treatments for 20 days

序号 No.	保留时间 Retention time/min	物质 Component	相对含量 Relative content/%					
			CK	M3	S7	1 : 1	2 : 1	1 : 2
1	7.802	正十一烷 undecane	1.45±0.53	0.74±0.03	1.73±1.58	—	0.30±0.43	0.02±0.02
2	11.496	正十二烷 dodecane	1.31±0.42	0.78±0.06	1.58±2.23	1.46±0.04	0.31±0.43	0.24±0.03
3	14.639	正辛醛 octanal	—	—	—	—	0.24±0.34	—
4	15.567	正二十烷 eicosane	—	—	0.17±0.23	—	—	—
5	15.576	正十九烷 nonadecane	—	—	0.15±0.21	0.13±0.18	—	—
6	15.907	反-2-庚烯醛(E)-2-heptenal	1.61±0.40	0.96±0.35	1.42±0.17	1.09±0.12	2.37±1.24	—
7	15.925	2-庚烯醛(Z)-2-heptenal	—	—	—	—	—	0.17±0.02
8	18.986	正壬醛 nonanal	3.02±1.00	1.20±0.11	1.58±0.27	1.56±0.12	2.88±0.88	0.22±0.02
9	19.702	十四烷 tetradecane	0.35±0.08	0.23±0.02	2.37±0.28	1.75±0.04	0.21±0.04	0.30±0.10
10	20.805	环十四烷 cyclotetradecane	—	—	—	0.28±0.39	—	—
11	21.421	乙酸 acetic acid	0.39±0.55	0.92±0.11	—	—	1.22±0.46	—
12	23.020	蒎烯 copaene	0.43±0.61	0.48±0.14	0.49±0.01	—	0.57±0.03	0.07±0.11
13	23.948	苯甲 benzaldehyde	0.47±0.11	0.13±0.04	0.49±0.02	0.38±0.00	0.17±0.00	0.08±0.03
14	24.095	正十五烷 pentadecane	0.06±0.08	0.03±0.04	0.23±0.05	0.27±0.02	—	0.02±0.03
15	24.104	正二十四烷 tetracosane	—	—	—	—	—	0.04±0.06
16	24.987	反式-2-壬烯醛(E)-2-nonenal	0.18±0.26	0.11±0.16	—	—	0.22±0.32	—
17	27.293	2,3-丁二醇 2,3-butanediol	—	0.97±0.10	1.25±1.20	—	1.97±2.36	—
18	28.846	正十六烷 hexadecane	—	0.03±0.04	0.40±0.05	0.41±0.01	0.05±0.07	0.05±0.00
19	28.865	3-甲基十五烷 3-methyl-pentadecane	—	—	—	0.37±0.52	—	—
20	29.508	羟基苯乙醛 benzeneacetaldehyde	0.19±0.27	—	0.42±0.08	0.31±0.02	—	0.07±0.00
21	30.133	反-2-癸烯醛(E)-2-decenal	—	—	—	—	1.55±1.75	—
22	31.079	糠醇 2-furanmethanol	0.38±0.12	—	0.27±0.05	—	—	0.03±0.04
23	33.809	十七烷 heptadecane	—	—	—	—	0.07±0.10	—
24	38.532	正十八烷 octadecane	—	—	—	—	—	0.01±0.01
25	39.892	愈创木酚 2-methoxy-phenol	0.37±0.12	0.58±0.08	1.22±0.19	0.77±0.02	1.33±0.19	0.19±0.01
26	40.701	苯甲醇 benzyl alcohol	0.81±0.28	0.42±0.02	0.69±0.11	0.64±0.02	0.43±0.05	0.16±0.03
27	42.061	苯乙醇 phenylethyl alcohol	0.92±0.33	0.64±0.03	0.69±0.02	0.65±0.00	0.59±0.03	0.15±0.00
28	43.679	甲氧甲酚 creosol	1.55±0.52	0.96±0.06	0.73±0.11	0.54±0.01	1.04±0.11	0.12±0.01
29	45.774	4-甲氧基苯甲醛 4-methoxy-benzaldehyde	0.11±0.04	0.10±0.00	0.12±0.02	0.09±0.00	0.12±0.01	0.02±0.00
30	48.218	对甲酚 p-cresol	0.60±0.20	0.30±0.01	0.29±0.05	0.14±0.20	0.58±0.00	0.09±0.01
31	48.246	间甲酚 3-methyl-phenol	—	—	—	—	0.15±0.21	—
32	48.898	正辛酸 octanoic acid	—	—	—	—	—	0.34±0.08
33	50.911	丁香酚 eugenol	—	0.15±0.02	0.72±0.11	—	0.15±0.05	—
34	54.330	茴香醇 4-methoxy-benzenemethanol	0.77±0.26	1.00±0.04	—	0.52±0.01	1.16±0.33	0.09±0.03
35	54.348	己内酰胺 caprolactam	—	—	—	0.06±0.09	—	—
36	55.864	正癸酸 n-decanoic acid	—	—	—	—	—	0.43±0.05
37	59.651	二苯甲酮 benzophenone	—	—	0.12±0.02	0.10±0.04	—	0.02±0.00
38	61.010	苯甲酸 benzoic acid	—	0.09±0.00	—	—	0.07±0.00	0.01±0.00
39	61.296	月桂酸 dodecanoic acid	0.12±0.04	0.08±0.00	1.50±0.48	7.47±0.03	—	15.25±0.90
40	62.205	香兰素 vanillin	74.14±2.96	73.67±3.30	78.49±2.04	80.77±0.57	77.19±1.54	77.12±1.04
41	64.053	香草乙酮 apocynin benzaldehyde	—	—	—	—	2.38±0.16	—
42	64.632	3-羟基-4-甲氧基苯甲醛 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	0.81±0.26	—	—	—	0.26±0.09	0.40±0.02
43	67.104	十四烷酸 tetradecanoic acid	—	—	—	—	—	1.65±0.10
44	71.616	对甲氧基苯甲醛 4-hydroxy-benzaldehyde	—	—	—	—	—	1.85±0.11
45	68.230	3-羟基-4-甲氧基苄基乙醇 3-hydroxy-4-methoxybenzyl alcohol	3.25±1.46	2.84±0.13	2.89±0.38	—	2.57±0.22	0.63±0.04
46	71.597	对羟基苯甲醛 4-hydroxy-benzaldehyde	6.63±2.28	12.75±4.42	—	—	—	—
47	72.204	对羟基苯甲醇 4-hydroxy-benzenemethanol	—	—	—	—	—	0.07±0.09

注：—为未检出。
Note: — indicates it was not detected.

表 4 喷菌处理 60 d 的香草兰豆荚挥发性成分
Tab. 4 Volatile components of vanilla pods with spraying bacteria treatment for 60 days

序号 No.	保留时间 Retention time/min	物质 Component	相对含量 Relative content/%					
			CK	M3	S7	1 : 1	2 : 1	1 : 2
1	5.260	癸烷 decane	—	0.18±0.32	—	0.80±0.39	—	—
2	6.530	正十三烷 tridecane	—	1.90±0.11	—	0.07±0.02	1.11±0.03	0.42±0.04
3	6.633	2-甲基辛烷 2-methyl-octane	—	—	—	—	—	0.25±0.43
4	6.953	3-甲基癸烷 3-methyl-decane	—	0.10±0.17	—	—	—	—
5	7.018	己醛 hexanal	—	—	2.08±0.16	—	—	—
6	7.802	正十一烷 undecane	0.27±0.27	0.04±0.06	—	1.06±0.67	0.49±0.49	—
7	11.496	正十二烷 dodecane	0.59±0.05	0.85±0.03	—	0.73±0.73	0.34±0.34	0.45±0.00
8	11.757	反-2-庚烯醛(E)-2-hexenal	—	—	0.11±0.10	0.54±0.10	—	—
9	12.491	2-正戊基呋喃 2-pentyl-furan	—	—	0.09±0.08	—	—	—
10	13.215	1-十二烯 1-dodecene	—	0.05±0.08	—	—	—	—
11	13.234	1-十三烯 1-tridecene	—	0.15±0.00	—	0.17±0.17	0.05±0.05	0.08±0.00
12	14.334	3-羟基丁酮 acetoin	—	0.11±0.19	—	—	0.14±0.14	0.19±0.01
13	14.639	正辛醛 octanal	—	—	0.28±0.02	—	—	—
14	14.776	3-甲基吡啶 3-methyl-pyridine	—	0.08±0.13	—	—	—	—
15	15.907	反-2-庚烯醛(E)-2-heptenal	1.65±0.29	0.44±0.39	0.69±0.25	—	0.43±0.12	0.15±0.11
16	18.986	正壬醛 nonanal	1.90±0.06	0.92±0.14	1.55±0.15	0.97±0.14	0.75±0.03	0.26±0.00
17	19.702	十四烷 tetradecane	0.25±0.03	0.29±0.02	—	0.62±0.08	0.21±0.01	0.21±0.03
18	21.421	乙酸 acetic acid	1.04±0.03	—	0.39±0.05	—	—	—
19	21.612	1-十四烯 1-tetradecene	—	0.06±0.01	—	0.07±0.07	—	0.10±0.10
20	21.829	糠醛 furfural	—	1.75±0.47	6.62±0.48	—	1.98±0.02	—
21	23.020	古巴烯 copaene	0.66±0.00	—	0.20±0.03	—	—	—
22	23.606	1-2-乙基己醇 2-ethyl-hexanol	0.25±0.25	—	—	0.57±0.11	—	0.17±0.00
23	23.948	苯甲醛 benzaldehyde	0.25±0.00	0.57±0.07	0.24±0.04	0.37±0.06	0.21±0.01	0.13±0.00
24	24.986	反式-2-壬烯醛(E)-2-nonenal	0.13±0.13	0.23±0.01	0.14±0.12	—	—	—
25	26.831	正辛醇 1-octanol	—	0.15±0.26	—	—	—	—
26	27.293	2,3-丁二醇 2,3-butanediol	0.32±0.02	0.39±0.34	2.59±2.61	0.08±0.08	0.10±0.10	0.27±0.00
27	28.846	正十六烷 hexadecane	0.07±0.00	0.10±0.02	—	0.11±0.11	0.08±0.01	0.07±0.00
28	29.473	环辛醇 cyclooctyl alcohol	—	0.08±0.07	—	—	0.05±0.05	0.02±0.04
29	29.508	4-羟基苯乙醛 benzeneacetaldehyde	—	0.21±0.01	0.21±0.02	0.16±0.16	0.16±0.01	0.06±0.10
30	30.133	反-2-癸烯醛(E)-2-decenal	0.16±0.16	—	—	—	—	—
31	31.079	糠醇 1-furanmethanol	0.06±0.06	0.10±0.03	0.37±0.04	0.02±0.02	0.11±0.01	0.02±0.01
32	39.892	愈创木酚 2-methoxy-phenol	0.30±0.02	0.75±0.12	0.57±0.23	0.63±0.63	0.65±0.03	0.38±0.02
33	40.701	苯甲醇 benzyl alcohol	0.36±0.02	0.10±0.00	0.03±0.03	0.12±0.12	0.11±0.00	0.06±0.00
34	42.061	苯乙醇 phenylethyl alcohol	0.35±0.01	0.10±0.00	—	0.13±0.13	0.13±0.01	0.10±0.00
35	43.679	甲氧甲酚 creosol	0.90±0.03	0.05±0.04	0.09±0.03	0.11±0.08	0.09±0.00	0.03±0.05
36	45.774	对羟基苯甲醛 4-methoxy-benzaldehyde	0.08±0.01	—	—	0.02±0.02	—	0.01±0.00
37	45.863	苯酚 phenol	—	0.03±0.01	0.05±0.05	—	0.03±0.00	0.03±0.00
38	46.530	泛内酯 pantolactone	—	—	0.12±0.20	—	—	—
39	47.612	橙花叔醇 nerolidol	—	—	0.05±0.04	—	—	—
40	48.218	对甲酚 p-cresol	0.41±0.02	0.03±0.00	—	0.05±0.01	0.06±0.00	0.05±0.00
41	52.069	对乙烯基愈创木酚 2-methoxy-4-vinylphenol	—	—	0.06±0.06	—	0.01±0.01	—
42	54.330	茴香醇 4-methoxy-benzenemethanol	0.60±0.05	0.07±0.01	0.01±0.02	0.18±0.00	0.05±0.05	0.06±0.05
43	57.899	藜芦醛 3,4-dimethoxy-benzaldehyde	—	—	—	0.01±0.01	—	—
44	60.851	苯甲酸 2-hydroxymethylfurfural	—	—	0.36±0.07	—	—	—
45	61.011	月桂酸 benzoic acid	0.04±0.04	—	—	—	—	—
46	62.205	香兰素 vanillin	77.68±0.65	88.78±1.32	80.94±1.60	88.27±0.42	89.92±0.47	94.31±0.33
47	64.053	香草乙酮 apocynin	1.85±0.25	0.04±0.06	—	0.36±0.04	0.12±0.02	0.14±0.02
48	64.632	3-羟基-4-甲氧基苯-甲醛 3-hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde	0.40±0.14	0.03±0.03	—	0.02±0.02	0.02±0.02	—
49	68.230	3-羟基-4-甲氧基苄基乙醇 3-hydroxy-4-methoxybenzyl alcohol	2.18±0.14	0.12±0.02	0.25±0.04	0.64±0.01	0.33±0.00	0.90±0.02
50	71.597	对羟基苯甲醛 4-hydroxy-benzaldehyde	7.15±0.11	1.23±0.18	1.90±0.14	2.39±0.11	1.97±0.02	1.09±0.02

注：—为未检出。
Note: — indicates it was not detected.

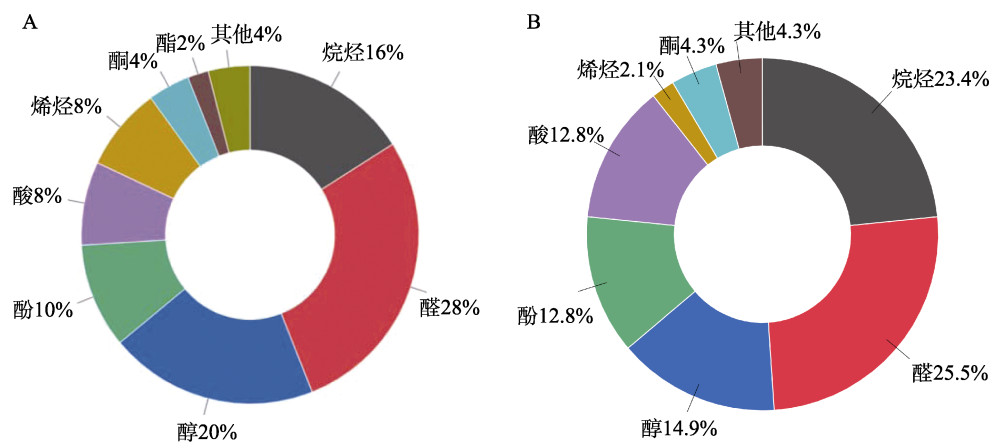


图 6 喷菌 20 d (A) 和 60 d (B) 时香草兰豆荚挥发性成分相对含量

Fig. 6 Relative contents of volatile components in vanilla pods with spraying bacteria for 20 days (A) and 60 days (B)

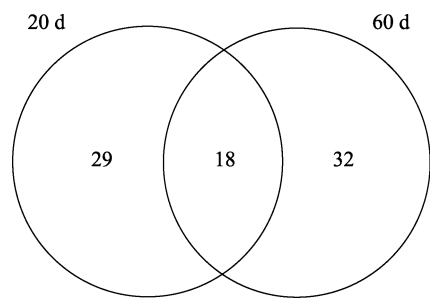


图 7 喷菌 20、60 d 处理的香草兰豆荚挥发成分 Venn 图

Fig. 7 Venn diagram of the Vanilla pods with spraying bacteriat for 20 and 60 days

本研究发现只喷菌 M3 菌株的香草兰豆荚香兰素含量最高，产生的挥发性成分最多，且只喷 M3 菌株的豆荚在发酵 60 d 时产生了 3-羟基丁酮。李林海等^[30]研究发现，培养条件影响微生物产生 3-羟基丁酮，且微生物发酵是生产 3-羟基丁酮的主要方法之一。因此，优化微生物培养条件可提升菌株产 3-羟基丁酮的能力，增加香草兰发酵豆荚香气。M3 与 S7 按照体积比 1 : 1 喷洒处理的香兰素葡萄糖苷下降最多为 80.7%，说明复合菌液可有效转化香兰素葡萄糖苷。傅航等^[31]对黄芪渣进行单一菌、2 菌剂复合、3 菌剂复合发酵，发现 3 菌剂复合按照 1 : 1 : 1 比例的效果最佳。夏欣欣等^[32]使用酿酒酵母和芽孢杆菌经混菌固态发酵米糠后，谷维素含量和抗氧化活性均显著提高。焦奕豪等^[33]使用酵母菌和枯草芽孢杆菌混合固态发酵沙棘果渣，研究结果发现固态发酵沙棘果渣可改善其营养价值。本研究结果为仅喷 M3 菌株在香兰素含量、整体挥发性含量等方面效果最佳，M3 与 S7 按照体积比 1 : 1 喷洒处理的香兰素葡萄糖苷下降最多，后续研究可以增加喷菌比例，找出可以提高香草兰品质的最佳组合。

从香草兰豆荚中提取的香兰素由于其纯天然、安全性高、品质优等被广泛应用于调配高端食品和化妆品中，但天然香兰素远远不能满足市场需求^[34]，采用微生物辅助发酵提升香兰素产量是获得高品质香草兰豆荚，弥补天然香兰素产量难以满足市场需求的重要措施之一。通过测定香兰素含量、香兰素葡萄糖苷含量、挥发成分等方式确定最佳喷菌方式组合，为后续开发微生物辅助豆荚发酵生香，提升品质提供可靠的菌株资源储备和技术参考。未来拟研究不同发酵时期、不同喷洒量等对豆荚香气成分及豆荚表面微生物区系的影响，揭示其提升豆荚品质的微生态机制，研发微生物辅助发酵生香关键技术，为获得高品质香草兰豆荚，开发高附加值产品提供理论与技术支撑。

参考文献

[1] 赵青云. 起源于热带雨林的香料之王: 香荚兰[J]. 生命世界, 2021(9): 19-21.
ZHAO Q Y. The king of spices originating from tropical rainforests: vanilla[J]. Living World, 2021(9): 19-21. (in Chinese)

[2] 周江, 邓亦峰, 黄茂芳. 香草兰酊剂的制备研究[J]. 香料香精化妆品, 1999(1): 9-11.
ZHOU J, DENG Y F, HUANG M F. Study on preparation of vanilla tincture[J]. Flavour Fragrance Cosmetic, 1999(1): 9-11. (in Chinese)

[3] MORLOCK G E, BUSSO M, TOMEBA S, SIGHICELLI A. Effect-directed profiling of 32 vanilla products, characterization of multi-potent compounds and quantification of vanillin and ethylvanillin[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1652: 1-13.

- [4] NETHAJI J G, BIRGER L M. Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8: 40-57.
- [5] 韦霄, 里雨桐, 秦惠珍, 唐健民, 韦记青. 香荚兰化学成分及栽培技术研究进展[J]. *广西科学院学报*, 2022, 38(2): 118-124.
- WEI X, LI Y T, QIN H Z, TANG J M, WEI J Q. Research progress on chemical components and cultivation techniques of vanilla[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2022, 38(2): 118-124. (in Chinese)
- [6] 洪英华, 谷凤林, 蔡莹莹, 徐飞, 房一明. 香荚兰豆荚发酵过程中挥发性成分的变化[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(24): 253-259, 265.
- HONG Y H, GU F L, CAI Y Y, XU F, FANG Y M. Changes of volatile compounds in vanilla beans during curing process[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(24): 253-259, 265. (in Chinese)
- [7] 洪英华, 蔡莹莹, 谷凤林, 徐飞, 房一明. 香荚兰豆荚加工过程物性测定与风味电子感官分析[J]. *热带作物学报* 2018, 39(3): 559-564.
- HONG Y H, CAI Y Y, GU F L, XU F, FANG Y M. Physical property determination and flavor electronic sensory analysis of vanilla pods during processing[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39(3): 559-564. (in Chinese)
- [8] 杨敏. 香荚兰生香加工工艺优化[J]. *食品研究与开发* 2022, 43(4): 143-148.
- YANG M. Optimization of curing process of vanilla[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(4): 143-148. (in Chinese)
- [9] SAEDEH T S, DAKSHINA Y, MUHAMMAD S M, VENKATACHALAM L, BHAGYALAKSHMI N. An integrated strategic framework for priority setting in the Australian vanilla industry[J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2023, 7: 1-6.
- [10] YEH C H, CHOU C Y, WU C S, CHU L P, HUANG W J. Effects of different extraction methods on vanilla aroma[J]. *molecules*, 2022, 27(14): 2-12.
- [11] 赵青云, 赵秋芳, 王辉, 王华, 庄辉发, 朱自慧. 根际促生菌 *Bacillus* Y-IV1 在香草兰上的应用效果研究[J]. *植物营养与肥料学报* 2015, 21(2): 535-540.
- ZHAO Q Y, ZHAO Q F, WANG H, WANG H, ZHUANG H F, ZHU Z H. Beneficial effects of plant growth promoter rhizobacteria on vanilla (*Vanilla planifolia* Ames.) growth[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2015, 21(2): 535-540. (in Chinese)
- [12] MARK J W D, ROB H, JOSEF K, CHRIS W, ROB V. Identification of glucosides in green beans of *Vanilla planifolia* Andrews and kinetics of vanilla β -glucosidase[J]. *Food Chemistry*, 2004, 85: 199-205.
- [13] 杨峰, 黄申, 席高磊, 陈芝飞, 于国强, 付瑜锋, 樊新顺, 赵志伟, 李杰, 蔡莉莉, 王小飞, 王东. 香荚兰豆中香兰素葡萄糖苷的提取、分离及表征[J]. *烟草科技*, 2020, 53(8): 44-49.
- YANG F, HUANG S, XI G L, CHEN Z F, YU G Q, FU Y F, FAN X S, ZHAO Z W, LI J, CAI L L, WANG X F, WANG D. Extraction, separation and characterization of vanillin glucoside from vanilla beans[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2020, 53(8): 44-49. (in Chinese)
- [14] 董智哲. 香荚兰挥发性成分鉴定及提取研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- DONG Z Z. Research of identification and extraction of vanilla volatile components[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [15] 浦帆, 江明, 张正居, 张劲松, 孔繁浩. 香荚兰酶促生香的研究[J]. *云南植物研究*, 1998, 20(3): 355-361.
- PU F, JIANG M, ZHANG Z J, ZHANG J S, KONG F H. Study on vanilla curing by enzyme treatment method[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 1998, 20(3): 355-361. (in Chinese)
- [16] 莫丽梅. 外源酶对香草兰青豆荚提取物中香兰素含量的影响[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- MO L M. Effect of exogenous enzymes on the vanillin from extract of green vanilla[D]. Haikou: Hainan University, 2014. (in Chinese)
- [17] 张彦军, 徐飞, 贺书珍, 谭乐和. 冷冻-溶解联合外源酶处理香草兰鲜豆荚对香气成分的影响研究[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(12): 2269-2275.
- ZHANG Y J, XU F, HE S Z, TAN L H. The effect of freezing-thawing combined with different exogenous enzymes on main aroma components of fresh vanilla pods[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(12): 2269-2275. (in Chinese)
- [18] WALISZEWSKI K N, OVANDO S L, PARDIO V T, VIOLETA T P. Effect of hydration and enzymatic pretreatment of vanilla beans on the kinetics of vanillin extraction[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78: 1267-1273.
- [19] GU F L, CHEN Y G, HONG Y H, FANG Y M, TAN L H. Comparative metabolomics in vanilla pod and vanilla bean revealing the biosynthesis of vanillin during the curing process of vanilla[J]. *AMB Express*, 2017, 7(116): 2-9.
- [20] 荆丰雪, 钟斌, 万娅琼, 樊洪泓, 程江华, 徐雅芫. 微生物源 β -葡萄糖苷酶在发酵食品中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(24): 8041-8049.
- JING F X, ZHONG B, WAN Y Q, FAN H H, CHENG J H, XU Y Y. Application of microbial β -glucosidase in fermented food[J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2022, 13(24): 8023-8049. (in Chinese)
- [21] 陈永敢. *Bacillus* 属菌株对香草兰发酵过程中香兰素生成的影响机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.

- CHEN Y G. Study on the mechanism of *Bacillus* isolates influencing vanillin formation during the curing of *Vanilla planifolia* anderws[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [22] 高娉娉, 朱亚同, 刘宇, 张馨文, 梁丽红, 康文军, 王婧. 高产酸性 β -葡萄糖苷酶的优良本土酵母菌株筛选、鉴定及酶学性质分析[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(12): 30-36.
- GAO P P, ZHU Y T, LIU Y, ZHANG X W, LIANG L H, KANG W J, WANG J. Identification and enzymatic property analysis of excellent native yeast strains with high acidic β -glucosidase productivity[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(12): 30-36. (in Chinese)
- [23] 崔萍, 罗晓梅, 覃青双, 韦萍真, 廉洁, 安慧, 陆丽丽, 高丽霞. 1 株产 β -葡萄糖苷酶菌株的分离、鉴定与发酵条件初步优化[J]. 饲料研究, 2022(4): 86-89.
- CUI P, LUO X M, QIN Q S, WEI P Z, LIAN J, AN H, LU L L, GAO L X. Isolation, identification and optimization of fermentation conditions of a β -glucosidase producing strain[J]. Feed Research, 2022(4): 86-89. (in Chinese)
- [24] 尚方剑, 王洁, 邢诒彰, 苏兰茜, 赵少官, 洪珊, 赵青云. 四种香草兰根际土壤微生物群落功能多样性解析[J]. 热带农业科学, 2021, 41(5): 6-14.
- SHANG F J, WANG J, XING Y Z, SU L X, ZHAO S G, HONG S, ZHAO Q Y. Functional diversity analysis of rhizosphere soil microbial communities in four types of vanilla[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2021, 41(5): 6-14. (in Chinese)
- [25] 王彩肖, 武伟伟, 李艳. 产 β -D-葡萄糖苷酶酵母菌的筛选及产酶性质研究[J]. 酿酒科技, 2014(10): 14-22.
- WANG C X, WU W W, LI Y. Screening of yeast strains with high-yield of β -D-glucosidase and study on their β -D-glucosidase-producing properties[J]. Brewing Technology, 2014(10): 14-22. (in Chinese)
- [26] 杜刚. 3-羟基丁酮的研究进展[J]. 广东化工, 2016, 43(24): 106-107.
- DU G. Progress in research of 3-hydroxy-2-butanone[J]. Guangdong Chemical Industry, 2016, 43(24): 106-107. (in Chinese)
- [27] 张媛媛, 苏敏, 朴春红, 胡洋, 刘俊梅, 薛艳杰, 于寒松. 微生物来源的 β -葡萄糖苷酶在食品工业中应用进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(16): 329-335.
- ZHANG Y Y, SU M, PU C H, HU Y, LIU J M, XUE J Y, YU H S. Progress on the β -glucosidase from microorganisms and its applications in food industry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(16): 329-335. (in Chinese)
- [28] 鲍捷, 代艺伟, 陈映羲, 梁会朋, 林心萍, 张素芳. 产 β -葡萄糖苷酶植物乳植杆菌 c4-3 发酵豆浆的营养评价和代谢分[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(3): 8-15.
- BAO J, DAI Y W, CHEN Y X, LIANG H P, LIN X P, ZHANG S F. Nutritional evaluation and metabolic analysis of soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactibacillus plantarum c4-3[J]. Food Research and Development, 2024, 45(3): 8-15. (in Chinese)
- [29] 王玲. 酒球菌 β -葡萄糖苷酶产酶条件优化及其在葡萄酒中的应用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- WANG L. Optimization of the β -glycosidase production of oenococcus oeni and its application in winemaking[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016. (in Chinese)
- [30] 李林梅, 刘柠, 马长义, 胡椿, 李珊珊, 沈慧, 高南. 枯草芽孢杆菌 NRCB002 发酵液的促生效应及高产乙偶姻发酵条件优化[J/OL]. 南京农业大学学报, 1-8 (2024-02-19) [2024-04-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.S.20240219.1016.002.html>.
- LI L M, LIU N, MA C Y, HU C, LI S S, SHEN H, GAO N. Growth promoting effects of fermentation broth and optimization of high-yield acetoin fermentation conditions of *Bacillus subtilis* NRCB002[J/OL]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1-8 (2024-02-19)[2024-04-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.S.20240219.1016.002.html>. (in Chinese)
- [31] 傅航, 李轲, 芦荣华, 贾娟, 杨雯雯. 不同发酵剂对黄芪渣发酵及营养品质的影响[J]. 中国饲料, 2024(6): 68-71.
- FU H, LI K, LU R H, JIA J, YANG W W. Effects of different starter cultures on the fermentation and nutritional quality of *Astragalus membranaceus* residue[J]. China Feed, 2024(6): 68-71. (in Chinese)
- [32] 夏欣欣, 林海, 杨谷良, 彭霞, 贺辛乐. 混菌固态发酵米糠产谷维素的工艺及抗氧化活性评估[J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 154-161.
- XIA X X, LIN H, YANG G L, PENG X, HE X L. Process study on mixed bacterial solid-state fermentation of rice bran for the preparation of oryzanol and evaluation of its antioxidant activity[J]. Food and Machinery, 2023, 39(9): 154-161. (in Chinese)
- [33] 焦奕豪, 高腾雨, 龚建刚, 李帅英, 冯志华, 张海华. 混菌固态发酵对改善沙棘果渣营养价值工艺优化的研究[J/OL]. 饲料研究, 1-8 (2024-04-08)[2024-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2114.S.20240407.0840.002.html>.
- JIAO Y H, GAO T Y, GONG J G, LI S Y, FENG Z H, ZHANG H H. Study on the optimization of solid-state fermentation with mixed bacteria to improve the nutritional value of seabuckthorn fruit residue[J/OL]. Feed Research, 1-8 (2024-04-08)[2024-04-15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2114.S.20240407.0840.002.html>. (in Chinese)
- [34] 于飞. 香草兰育种研究综述[J]. 现代农业科学, 2009, 16(5): 53-55.
- YU F. A review of breeding research of vanilla[J]. Modern Agricultural Science, 2009, 16(5): 53-55. (in Chinese)