唐洁, 杜佳炜, 单义民, 等. 高产 4-乙烯基愈创木酚菌株的筛选及其在酱香白酒中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(16): 217−227. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060311

TANG Jie, DU Jiawei, SHAN Yimin, et al. Screening of Strains with High Yield of 4-Vinylguaiacol and Its Application in Sauce-flavor Baijiu Fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(16): 217−227. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060311

· 生物工程 ·

# 高产 4-乙烯基愈创木酚菌株的筛选及其在酱香白酒中的应用

唐　洁, 杜佳炜, 单义民, 谢超新, 安龙旭, 管　莹, 范荣盛, 左可成, 张　龙, 杨生智, 杨　强, 陈申习*

（劲牌有限公司, 劲牌研究院, 中药保健食品质量与安全湖北省重点实验室, 湖北黄石 435100）

**摘　要:** 为提高白酒中健康风味物质 4-乙烯基愈创木酚（4-vinylguaiacol，4-VG）的含量，筛选高产 4-VG 菌株并对其产量进行优化后应用于白酒发酵中。本研究以神农架酱香大曲为对象，经初筛、复筛选出高产 4-VG 菌株，并进行鉴定，再通过单因素和响应面试验优化菌株产 4-VG 发酵条件，并对菌株耐受性进行研究，最终将菌株应用于白酒发酵中。结果表明：筛选到 1 株自身高产 4-VG 和转化前体物质生成 4-VG 能力强的细菌 JP-2，鉴定为丙二酸克诺杆菌（*Cronobacter malonaticus*）；菌株 JP-2 产 4-VG 的最优工艺为：高粱汁培养基、蔗糖 26.90 g/L、初始 pH5.0、发酵时间 72 h，优化后 4-VG 含量为 4342.92±401.62 μg/L，较未优化前提升了 190.45%；菌株 JP-2 最高耐受乙醇浓度 6%，最低耐受 pH4.0，最高耐受温度 45 ℃，耐受葡萄糖浓度可达 300 g/L；应用于酱香型白酒发酵，发酵结束后实验组的酒醅及白酒中 4-VG 质量浓度比对照组分别显著增加了 53.85% 和 279.80%（$P$<0.05），且能增加白酒酯类含量和提高了酒体的焦香、花果香等。本研究为提升酱酒品质和健康方面提供优良菌株和数据基础。

**关键词:** 4-乙烯基愈创木酚, 菌株筛选, 分离鉴定, 响应面优化, 酱香型白酒发酵

**中图分类号:** TS261.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)16−0217−11

**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2025060311　　本文网刊:

# Screening of Strains with High Yield of 4-Vinylguaiacol and Its Application in Sauce-flavor Baijiu Fermentation

**TANG Jie, DU Jiawei, SHAN Yimin, XIE Chaoxin, AN Longxu, GUAN Ying, FAN Rongsheng, ZUO Kecheng, ZHANG Long, YANG Shengzhi, YANG Qiang, CHEN Shenxi***

（Jing Brand Co., Ltd., Jing Brand Research Institute, Hubei Key Laboratory for Quality and Safety of Traditional Chinese Medicine Health Food, Huangshi 435100, China）

**Abstract:** To increase the content of 4-vinylguaiacol (4-VG), a health-promoting flavor compound in Baijiu, microbial strains with high-yielding 4-VG were isolated and its production was optimized for application in Baijiu fermentation. In this study, high-yielding 4-VG strains were screened from Shennongjia sauce-flavor Daqu through primary and secondary screening, followed by identification. The fermentation conditions for 4-VG production by the strain were optimized using single-factor and response surface methodology (RSM) methods, and the strain tolerance was further investigated. Ultimately, the selected strain was used for fermentation in Baijiu. The results showed that the strain of JP-2 exhibiting both high endogenous 4-VG production and efficient precursor conversion was obtained by screening and was identified as *Cronobacter maloniacus*. The optimal fermentation conditions for high-yielding 4-VG of *C. maloniacus* JP-2 were sorghum juice-based medium, a sucrose concentration of 26.90 g/L, an initial pH of 5.0, and a fermentation time of 72 hours. Under the optimized conditions, the content of 4-VG reached 4342.92±401.62 μg/L, representing a 190.45% increase compared to the pre-optimization level. The tolerance test indicated that *C. maloniacus* JP-2 could survive at the condition of 6%

**收稿日期:** 2025−06−25

**基金项目:** 湖北省重点研发计划（2023BBB004）; 湖北省自然科学基金（2025AFD022）。

**作者简介:** 唐洁（1987−）, 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物与发酵, E-mail: tjjnan@163.com。

*** 通信作者:** 陈申习（1986−）, 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品微生物与发酵, E-mail: chenshenxi2006@163.com。

alcohol, pH4.0, 45 ℃, and 300 g/L glucose, respectively. Compared to the control group, 4-VG contents in fermented grains at the end of fermentation and Baijiu made with biofortification with *C. maloniacus* JP-2 increased by 53.85% and 279.80% ($P$<0.05), respectively. Additionally, the JP-2 inoculation also increased esters contents and improved sensory qualities, particularly enhancing caramel and floral-fruity notes in Baijiu. This study would provide excellent strains and a data basis for improving the quality and health benefits of sauce-flavor Baijiu.

**Key words**: 4-vinylguaiacol; strain screening; isolation and identification; response surface methodology; sauce-flavor Baijiu fermentation

4-乙烯基愈创木酚(4-vinylguaiacol, 4-VG)是一种由阿魏酸脱羧生成的挥发性酚类化合物,具有烟熏味、辛香味、丁香味和独特的发酵香气,其感官阈值低(0.3 mg/L),是白酒、葡萄酒、啤酒和酱油等发酵食品中的重要风味物质之一[1−2]。同时,由于 4-VG 价格约为其前体物质阿魏酸的 40 倍左右,其商业价值显著,是食品、化妆品、药物及化工等领域高价值的精细化工原料[3]。此外,4-VG 具有抗氧化活性和抗癌功效,使其具有重要的医药价值[4−5]。白酒,作为中国的国酒,历经数千年传承至今仍为现代人所青睐,不仅彰显出中国白酒的独特魅力,更凸显其作为健康产品的价值[6]。因此,提高白酒中 4-VG 含量不仅有利于提升白酒风味更赋予其一定的健康内涵。

相比传统化学合成 4-VG 存在安全与环境问题、从天然植物中提取产量有限等缺点,生物合成法已成为生产天然 4-VG 的可行和可持续的替代方法[7]。其中,微生物发酵法因其成本低、绿色环保的优势正成为生产 4-VG 的研究趋势。文献报道一些细菌和真菌可将阿魏酸脱羧转化生成 4-VG,相比真菌存在代谢途径复杂、生长周期长、成本高等局限,细菌代谢合成途径更具经济性,因此,筛选高产 4-VG 的细菌已成为当前研究的重点[1,7−9]。目前,大多数研究基于传统的可培养方法筛选 4-VG 菌株,即利用常用的细菌或真菌培养基从混合基质中分离选育大量菌株,纯化后在发酵培养基中进行复筛,获得高产 4-VG 菌株后进行分子鉴定明确种属[9−11]。该方法的缺点是盲筛、无针对性、效率低。阿魏酸作为 4-VG 的前体物质,在培养基中加入一定浓度的阿魏酸或其衍生物,可以大幅提升筛选效率。

文献 [12] 报道白酒中 4-VG 是由发酵过程中微生物转化酿造原料中阿魏酸生成的,其在白酒中的香味阈值较低,为 209.30 μg/L。相对而言,白酒中产 4-VG 菌株筛选及应用研究较少。因此,通过定向分离选育优良菌株、优化培养条件,最终将菌株生物强化应用于白酒生产,是提高白酒中 4-VG 的有效途径。本研究从白酒大曲中筛选出产 4-VG 且发酵性能优良的微生物菌株,通过响应面试验优化菌株产 4-VG 最佳培养条件,并模拟酱香型一轮次白酒生产工艺,通过生物强化技术应用于酱香白酒酿造中,旨在为白酒生产提供优质的菌种资源和提高白酒中 4-VG 浓度,对提升白酒风味品质和健康价值具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

酒曲样品、糯高粱等材料　劲牌有限公司提供;葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、氯化钠、阿魏酸、阿魏酸乙酯等所有化学试剂　分析纯,国药(集团)上海化学试剂有限公司;淀粉酶(5 万 U/g)、糖化酶(10 万 U/g)　无锡雪梅酶制剂科技有限公司;定量内标(愈创木酚-d3)、标准品(4-乙烯基愈创木酚)　色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司;TIANGENR 土壤基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)提取试剂盒　天根生化科技有限公司。

AL204 电子分析天平、FE20PH 计　梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;JJ1000 电子天平　常熟双杰测试仪器厂;SFG-02B 电热恒温鼓风干燥箱　上海精宏实验设备仪器厂;BSC-150 恒温恒湿培养箱、YXQ-LS-75-SII 立式压力蒸汽灭菌器　上海博迅实业有限公司医疗设备厂;BCM-1600A 洁净工作台　苏州安泰空气技术有限公司;Nikon ECLIPSE E200LED MV Series 显微镜　日本 Nikon 公司;2720 PCR 仪　美国应用生物系统公司;DYY-L 电泳仪　北京六一生物科技有限公司;ZF-288 全自动凝胶成像分析系统　上海嘉鹏科技有限公司;Agilent 8890-5977B 气相色谱-质谱联用仪、DB-FFAP 色谱柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm)　美国 Agilent 科技有限公司;Milli-Q 超纯水仪　美国 Millipore 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1　培养基配制　富集和筛选培养基参考专利[13]进行改良。富集培养基(g/L):酵母粉 5,蛋白胨 10,氯化钠 10,阿魏酸乙酯 1.5,pH 自然;筛选培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母粉 5,氯化钠 10,阿魏酸乙酯 1.5,琼脂 20,pH 自然;种子培养基(g/L):酵母粉 5,蛋白胨 10,氯化钠 10,pH 自然;LB 固体培养基(g/L):酵母粉 5,蛋白胨 10,氯化钠 10,琼脂 20,pH 自然;发酵培养基:高粱汁培养基基础上加入 50 mg/L 阿魏酸。高粱汁培养基、米曲汁培养基、豆芽汁培养基、青稞汁培养基、大麦芽汁培养基、小麦芽汁培养基制作方法具体见参考文献 [14]。以上培养基均 121 ℃ 灭菌 20 min。

1.2.2　菌株的筛选

1.2.2.1　菌株初筛　称取酒曲 10 g,放入装有 90 mL

无菌水中，30 ℃、160 r/min 振荡 30 min 后，取 1 mL 于富集培养基中，30 ℃、160 r/min 培养 24 h 后在无菌超净台中取 10 mL 于已灭菌富集培养基中于 30 ℃、180 r/min 摇床富集培养 24 h。在无菌条件下吸取 1 mL 富集悬浮液注入 9 mL 无菌水中进行梯度稀释，吸取 0.2 mL 菌悬液涂布至筛选培养基中，于 30 ℃ 静置培养，每个梯度设置 3 个平行样品。培养 2~3 d 后，待平板上长出菌落且生成透明圈后，将产透明圈菌落经过 2~3 次纯化后挑取单菌落点涂到新的筛选培养基中培养，培养 2~3 d 后观察筛选培养基上长透明圈情况，产透明圈明显菌株为初步产 4-VG 菌株。

1.2.2.2　高粱汁发酵复筛　将初筛菌株纯化后在种子培养基中活化后接种至发酵培养基中进行发酵，并以前期实验室筛选的一株高产愈创木酚类菌株 B257[15] 为对照，筛选的菌株产 4-VG 能力强于 B257 为目标菌株。发酵 7 d 后，离心取上清液，采用气相色谱质谱联用（gas chromatography-mass spectrometry，GC-MS）技术对发酵液中 4-VG 健康因子含量进行定量分析。将产 4-VG 含量较高的菌株接种至含有 50 mg/L 阿魏酸的高粱汁液体培养基中进行液态发酵，进一步确定菌株转化阿魏酸生成 4-VG 的能力，从而筛选高产 4-VG 的菌株。

1.2.3　菌株的鉴定

1.2.3.1　形态学鉴定　将保藏好的菌株在 LB 固体培养基进行划线，37 ℃ 恒温培养 24 h 后，挑取菌体进行革兰氏染色，通过光学显微镜观察菌株形态结构。

1.2.3.2　分子生物学鉴定　按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒步骤对菌株的 DNA 进行提取，以其为模板，采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩赠。扩增条件：94 ℃ 预变性 5 min，94 ℃ 变性 30 s，53 ℃ 退火 50 s，72 ℃ 延伸 90 s，35 个循环；72 ℃ 再延伸 10 min，4 ℃ 保存。将获得的 PCR 产物检测合格后寄送至华大基因进行测序，将获得的 16S rDNA 序列提交至美国国立生物技术信息中心（national center for biotechnology information，NCBI）网站的 GenBank数据库中进行 BLAST 同源性比对；使用 MEGA 7.0 软件中的邻接（neighbor joining，NJ）法构建菌株系统发育进化树。

1.2.4　菌株产 4-VG 条件优化

1.2.4.1　单因素实验　参照 SUN 等[16] 发酵条件优化研究不同影响因素对菌株产 4-VG 的影响。分别配制小麦芽汁培养基、青稞汁培养基、大麦芽汁培养基、高粱汁培养基、豆芽汁培养基、米曲汁培养基及麸皮汁培养基，每种培养基初始 pH 自然，接种量 2%（v/v），30 ℃ 培养静置发酵 96 h，测定发酵液的 4-VG 含量，确定最佳的培养基种类。

确定最佳培养基种类后考察不同碳源、氮源对菌株产 4-VG 的影响。碳源及浓度：分别添加 10 g/L 蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖、海藻糖；确定最适碳源后再进行浓度优化（0、10、20、30、40、50 g/L）。氮源及浓度：10 g/L 牛肉浸膏、蛋白胨、酵母浸粉、硫酸铵、磷酸氢二铵；确定最适氮源后再进行浓度优化（0、10、20、30、40、50 g/L）。培养条件：初始 pH 自然，接种量 2%（v/v），30 ℃ 培养静置发酵 96 h，测定发酵液的 4-VG 含量，确定最佳的碳、氮源种类及浓度。

在确定最佳培养基组成的基础上，分别设置不同初始 pH（3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0），接种量 2%（v/v），30 ℃ 培养静置发酵 96 h，测定发酵液的 4-VG 含量，确定最适的初始 pH。

在最适 pH 和最佳培养基组成条件下，分别考察发酵温度（25、30、35、40、45、50 ℃）对菌株产 4-VG 能力的影响。接种量 2%（v/v），不同培养温度下静置发酵 96 h，测定发酵液的 4-VG 含量，确定最适的发酵温度。

将种子液以 2%（v/v）接种量接入最优初始 pH 的最佳培养基中，在最适发酵温度下分别进行发酵时间 24、48、72、96、120、144 h 静置发酵，测定发酵液的 4-VG 含量，确定最适的发酵时间。

1.2.4.2　Plackett-Burman（PB）试验筛选重要影响因素　根据单因素实验结果，选取初始 pH、发酵温度、发酵时间、蛋白胨含量和蔗糖含量 5 个因素进行析因实验，筛选影响菌株产 4-VG 的主效因子。每个因素取高、低两个水平（表 1）。

表 1　PB 试验设计因素水平设计

Table 1　Level of PB design factors

| 因素水平 | A初始pH | B发酵温度（℃） | C发酵时间（h） | D蛋白胨含量（g/L） | E蔗糖含量（g/L） |
|---|---|---|---|---|---|
| −1 | 5 | 30 | 72 | 20 | 20 |
| 1 | 9 | 37 | 168 | 40 | 40 |

1.2.4.3　最陡爬坡试验　根据 PB 试验的结果，对影响显著的因素进行最陡爬坡试验，确定菌株发酵产 4-VG 的最佳发酵条件作为 Box-Behnken 试验的起始中心点。

1.2.4.4　Box-Behnken 试验设计　根据响应面试验设计原理，采用 Design-Expert 13.0 软件对菌株发酵条件进行三因素三水平 Box-Behnken 试验设计，各因素与水平如表 2 所示。

表 2　Box-Behnken 试验因素与水平

Table 2　Box-Behnken test factors and levels

| 水平 | 因素 | | |
|---|---|---|---|
| | A初始pH | B发酵时间（h） | C蔗糖含量（g/L） |
| −1 | 4.5 | 24 | 20 |
| 0 | 5.5 | 72 | 40 |
| 1 | 6.5 | 120 | 60 |

1.2.5 菌株耐受性研究 将活化后的种子液按 2%(v/v)的接种量接种于 LB 液体培养基中, 37 ℃ 培养 24 h, 用分光光度计在 600 nm 处测定菌液 OD 值。考察对象为乙醇含量(0%、2%、4%、6%、8%、10% 和 12%)、初始 pH(3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0)、温度(30、35、40、45、50 和 55 ℃)和葡萄糖含量(0、50、100、150、200、250 和 300 g/L)。

1.2.6 高产 4-VG 菌株在白酒发酵中的应用 在实验室模拟一轮次酱酒小试固态发酵试验, 以糯高粱为原料, 第一轮经过泡粮、蒸粮、下曲堆积、入池发酵和蒸馏得到酒尾后, 将酒尾加入底锅水中对第二轮发酵完毕酒醅进行蒸馏。其中, 第二轮发酵的试验组为将筛选得到的菌株按照 1.2.4 发酵条件优化后获得高产 4-VG 菌株发酵液, 按 1%(w/w)接种量入池添加, 空白组为未添加发酵液。生产用曲均在堆积前加入, 堆积时间为 4 d(堆积醅内部温度达到 50~52 ℃即停止堆积), 培养箱温度设置为 30、35、35、35 ℃。入池发酵培养温度 30 ℃, 发酵 30 d。分别取 0 d、发酵结束时酒醅及原酒检测 4-VG 含量和挥发性风味物质, 且由感官评分小组成员(5 名男性和 5 名女性, 平均 30 岁)对原酒酒样进行感官品评, 并绘制白酒风味雷达图。

1.2.7 白酒挥发性风味物质的定量检测 参照孙细珍等[17] 方法, 采用 GC-FID(gas chromatography-flame ionization detector-Flame Ionization Detector)对白酒中挥发性物质进行定量检测。取 1 mL 酒样于气相进样小瓶, 加入10.0 μL 内标混合溶液(2-乙基己醇 163.34 mg/L, 叔戊醇 160.10 mg/L, 乙酸正戊酯 176.21 mg/L), 混合均匀后进气相色谱仪进行检测分析。气相色谱条件: 载气为高纯氮气(纯度≥99.999%), 进样口温度为 250 ℃, 分流比 20∶1, 流速恒定为 1 mL/min; 柱温箱升温程序: 起始温度 35 ℃, 保持 1 min, 以3.5 ℃/min 升至 70 ℃, 再以 3.5 ℃/min 升至 190 ℃, 保持 15 min; 检测器为氢火焰离子化检测器(FID), 温度为 260 ℃; 尾吹气为 25 mL/min, 氢气为流速30 mL/min, 空气为流速 350 mL/min。通过与标准物质的保留时间相匹配来鉴定挥发性化合物, 与内标面积进行比较对挥发性化合物进行定量分析。

1.2.8 4-VG 的定量检测 参照刘家欢等[18] 的方法稍作修改, 使用液液微萃取(liquid-liquid microextraction, LLME)结合 GC-MS(gas chromatography-mass spectrometry)技术定量发酵液和原酒中 4-VG 浓度。

1.2.8.1 样品前处理 准确吸取 4 mL 发酵液或酒样于 50 mL 离心管中, 加入 20 μL 内标(愈创木酚-d3, 100 mg/L)和 NaCl 饱和, 充分振摇 5 min 后加入 2 mL 二氯甲烷, 振摇 5 min、超声 10 min 后以 8000 r/min 离心 5 min, 收集上层萃取液。向萃取液中加入无水 $Na_2SO_4$ 干燥, 过滤后所得样液用于 GC-MS 分析。

1.2.8.2 标准曲线的建立 将标准化合物(4-VG)溶解在无水乙醇溶液中, 用 53% 乙醇水溶液按 1∶1 的比例逐级稀释得到不同梯度工作标准液, 标准液与 1.2.8.1 样品前处理方法相同。以目标化合物峰面积和内标物峰面积的比值为纵坐标, 目标化合物质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线建立定量分析标准曲线。

1.2.8.3 检测条件 气相色谱条件: 进样口温度为 250 ℃, 载气为高纯氦气(纯度≥99.999%); DB-FFAP 色谱柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm), 流速为 1.4 mL/min, 进样量为 1 μL, 不分流进样; 柱温箱升温程序: 起始温度 50 ℃, 保持 5 min, 再以 3 ℃/min 升至 160 ℃, 保持 1 min, 再以 5 ℃/min 升至 220 ℃, 最后以 25 ℃/min 升至 250 ℃, 保持 5 min。

质谱条件: 离子源为电子轰击离子源(EI Xtr350), 能量 70 eV, 温度 230 ℃, 四级杆温度150 ℃, 辅助通道加热温度 280 ℃, 溶剂延迟 10 min; 选择离子模式(selected ion monitor, SIM)。

### 1.3 数据处理

本研究每个实验样本均进行三次生物学重复测定, 结果以平均值±标准差呈现。采用 WPS 表格和 SPSS 31.0 软件对数据进行统计分析, 并用单因素方差分析中的 Duncan 检验进行显著性差异比较[19]; 柱状图采用 Origin 2026 进行绘制; 菌株的系统发育树通过 MEGA 7.0 软件构建, 使用 Design-Expert 13.0 软件进行响应面优化试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选

从筛选培养基上初步获得了 87 株产透明圈菌株, 根据透明圈直径/菌落直径的大小选择比值较大的 23 株菌进行高粱汁液态发酵复筛, 并以前期筛选的一株产 4-VG 较高的菌株 B257 为对照[15]。由图 1 可知, 不同菌株产 4-VG 能力之间具有较大的差异, 有 13 株菌产 4-VG 含量显著高于对照菌株 B257($P$<0.05)。其中菌株 JP-2 在高粱汁培养基中产 4-VG 含量最高, 为 1495.32±74.24 μg/L, 与其他菌株之间存在着显著差异($P$<0.05)。

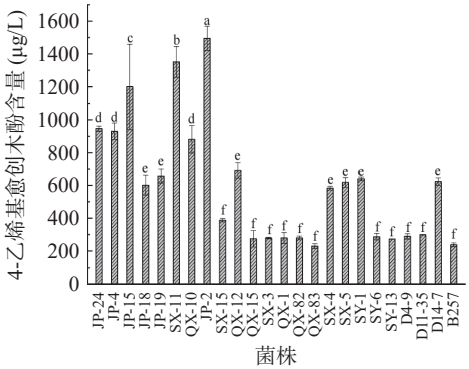



图 1 不同菌株产 4-VG 能力

Fig.1 Yields of 4-VG from the strains

注: 不同字母表示差异显著($P$<0.05), 图 2、图 5、图 7~图 9 同。

微生物代谢产 4-VG 主要以阿魏酸为底物经过脱羧作用生成[8]，因此菌株利用阿魏酸底物生成 4-VG 能力同样需要探究。从图 2 可知，在含有底物阿魏酸的发酵培养基中菌株 JP-2 产 4-VG 含量最高，达 2.82±0.04 g/L，显著高于菌株 D14-7、SY-1、QX-10 和 SX-5（$P$<0.05）。JP-2 与 JP-15、JP-24 等 6 株菌利用阿魏酸产 4-VG 含量虽无显著差异，但相对来说其产 4-VG 含量最高。表明了菌株 JP-2 在有无前体物质情况下均生成 4-VG 能力最强，且在有前体物质时 4-VG 含量显著提升，说明该菌株转化阿魏酸的能力较好。邹谋勇等[11]在接种筛选 *Hyphopichia burtonii* L9-1 发酵的发酵液培养基中 4-VG 含量为 0.47 mg/L，添加 50 mg/L 阿魏酸后接种筛选的菌株 L9-1 发酵液中的 4-VG 含量达到了 24.36 mg/L。而本研究筛选的菌株 JP-2 在不含和含有 50 mg/L 阿魏酸时发酵液中 4-VG 分别为 1495.32±74.24 μg/L 和 2.82±0.04 g/L，说明菌株 JP-2 自身生成和转化阿魏酸产 4-VG 能力更强。

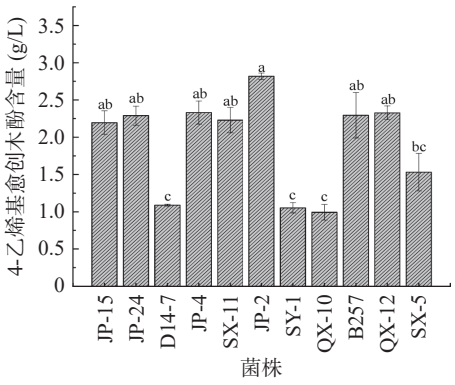



图 2　不同菌株在含阿魏酸培养基中产 4-VG 能力

Fig.2　4-VG contents produced by the strains in ferulic acid-supplemented medium

## 2.2　菌株的鉴定

观察菌株 JP-2 菌落形态特征，发现该菌株的菌落为淡黄色，圆形，菌落微凸，表面光滑，边缘整齐，质地湿润、易挑起，菌落直径约为 1~3 mm。革兰氏染色阴性，在显微镜下观察到的菌体为细胞短杆状，通常以单个或成对的形式存在（图 3）。提取该菌株 DNA，对 16S rDNA 基因进行 PCR 扩增并测序。测序结果进行 BLAST 同源性比对，结果显示，菌株 JP-2 与丙二酸克罗诺杆菌（*Cronobacter malonaticus*）碱基对同源性为 98.81%。采用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建系统发育树（图 4），菌株 JP-2 与丙二酸克罗诺杆菌（*Cronobacter malonaticus*）处在同一系统发育枝上，结合单菌落形态特征，确定该菌株为丙二酸克罗诺杆菌（*Cronobacter malonaticus*）。产 4-VG 的微生物主要有真菌和细菌，真菌包括伯顿丝孢毕赤酵母（*Hyphopichia burtonii*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、季也蒙假丝酵母（*Candida guilliermondii*）、芦苇曲霉（*Aspergillus luchuensis*）等[20−22]；细菌主要包括枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）、产氮假

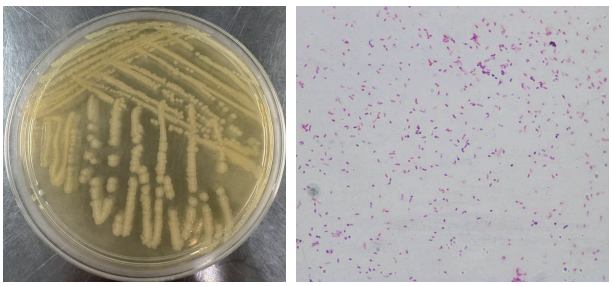


图 3　菌株 JP-2 菌落形态与细胞形态（1000×）

Fig.3　Colony morphology and cell morphology of strain JP-2 (1000×)

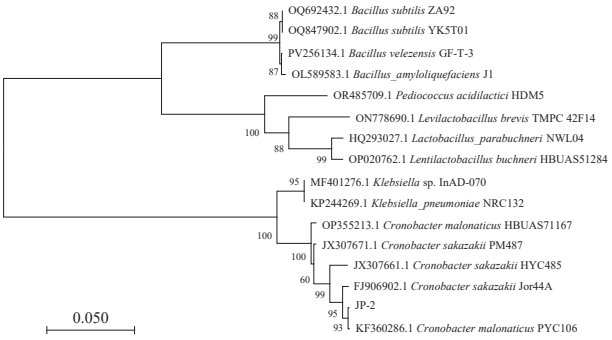



图 4　菌株 JP-2 系统发育树

Fig.4　Phylogenetic tree of strain JP-2

单胞菌（*Pseudomonas azotoformans*）、突尼斯链霉菌（*Streptomyces tunisiensis*）、肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）、香肠乳杆菌（*Lactobacillus farciminis*）等[23−25]。本研究获得的产 4-VG 菌株丙二酸克罗诺杆菌目前尚未在其他研究中报道过此类功能。

## 2.3　菌株产 4-VG 条件优化

2.3.1　单因素实验结果　培养基种类对微生物的生长代谢至关重要，合适的培养基对微生物生长代谢具有促进作用。不同谷物原料中含有阿魏酸的含量不同[26]，结合酿酒原料选取了如图 5A 所示不同原料处理后制备的培养基，考察菌株 JP-2 产 4-VG 的最佳培养基种类。菌株 JP-2 在高粱汁培养基中发酵生成 4-VG 的含量显著高于其他培养基（$P$<0.05），可能与高粱培养基中高温灭菌释放的游离阿魏酸含量较高导致培养基中有更多的底物被菌株转化生成 4-VG 有关。

碳源和氮源是微生物生长繁殖以及合成代谢物的原料和能量来源[27]。碳源优化结果表明（图 5B），与对照不添加碳源相比，在高粱汁培养基中额外添加蔗糖和淀粉对菌株产 4-VG 起到显著促进作用（$P$<0.05），且碳源为蔗糖时含量显著最高（$P$<0.05）。蔗糖浓度优化结果可知（图 5C），当蔗糖浓度≥30 g/L 时对菌株产 4-VG 有显著促进作用（$P$<0.05），且浓度为 30 g/L 时 4-VG 含量最高，为 3807.97±500.66 μg/L。因此，菌株 JP-2 产 4-VG 最适碳源为 30 g/L 的蔗糖。由氮源优化结果可知（图 5D），在培

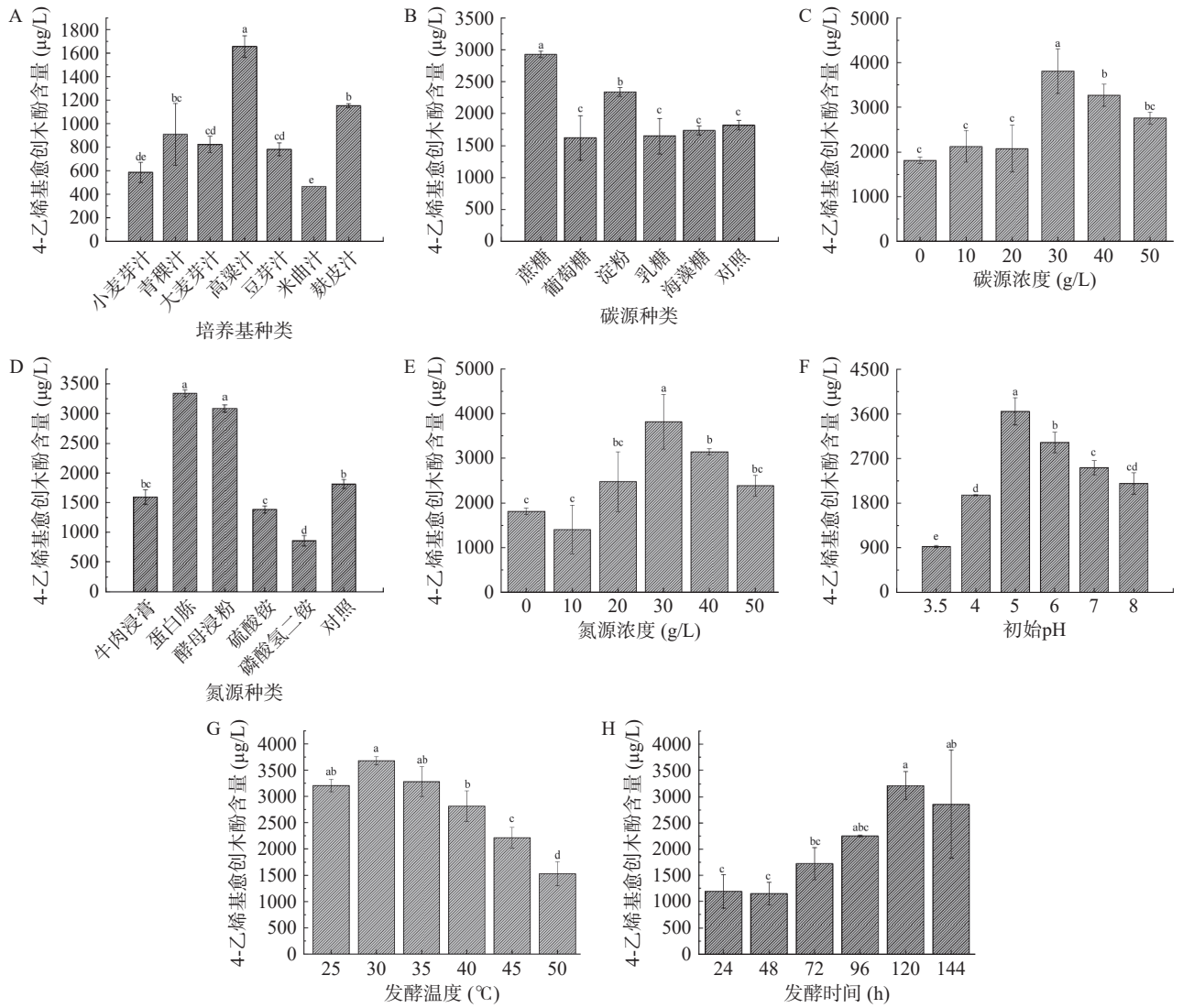



图 5 单因素条件优化

Fig.5 Optimization of single-factor conditions

注: A.培养基种类; B.碳源种类; C.碳源浓度; D.氮源种类; E.氮源浓度; F.初始 pH; G.发酵温度; H.发酵时间。

养基中添加蛋白胨和酵母浸粉均显著提高了菌株产 4-VG 能力($P$<0.05), 相对来说蛋白胨促进作用最强, 这与 SUN 等[16] 优化地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)DLF-17056 最佳产 4-VG 的氮源结果一致。进一步对蛋白胨浓度进行优化, 当蛋白胨浓度≥20 g/L 时对菌株产 4-VG 有显著的促进作用($P$<0.05)。蛋白胨浓度为 30 g/L 时, 4-VG 的产量显著最高, 为 3816.42±612.43 μg/L(图 5E)。因此, 菌株 JP-2 产 4-VG 最适氮源为 30 g/L 的蛋白胨。

良好的 pH 环境有助于微生物细胞的正常生长、蛋白质的正确功能和结构完整性, 并利于微生物发挥其功能[28]。由图 5F 可知, 不同初始 pH 对菌株产 4-VG 有显著差异($P$<0.05), 其中初始 pH 为 5.0 时产量显著最高, 且在 pH5.0~7.0 范围内菌株产 4-VG 含量较高, 表明菌株 JP-2 能够适应白酒发酵酸性环境产 4-VG。温度是影响微生物生长、繁殖和代谢途径的重要参数, 适宜的温度有利于微生物中代谢产物的生长、繁殖和积累[29]。从图 5G 可知, 温度对菌株 JP-2 产 4-VG 影响较大, 随着温度升高先增加后降低, 当温度在 25~35 ℃ 时菌株产 4-VG 保持较高的产量, 当温度超过 40 ℃ 菌株产 4-VG 含量下降明显。当温度在 30 ℃ 时 4-VG 含量最高, 为 3649.49±274.97 μg/L。这与邓照等[30] 研究产氮假单胞菌最佳产愈创木酚类制曲条件培养温度为 30 ℃ 一致。

微生物代谢产物的大量积累通常始于对数生长阶段, 而峰值产量主要发生在稳定生长阶段和死亡前阶段[31]。不同的微生物通常有不同的最佳发酵期来积累代谢产物, 因此为了积累更多的 4-VG, 有必要研究菌株 JP-2 生产 4-VG 的发酵过程。发酵时间优化结果表明(图 5H), 当发酵时间小于 120 h 时, 菌株产 4-VG 随着发酵时间的增加而增高, 发酵 120 h 时产量最高可达 3216.29±260.32 μg/L, 且发酵时间再延长时, 产量变化无显著差异。

2.3.2 PB 试验筛选重要影响因素 根据 PB 试验设计及结果(表 3), 通过使用 Design-Expert 13.0 软件分析得到 A(初始 pH)、C(发酵时间)、D(蛋白胨含

量)和 E(蔗糖含量)4 个因素均对菌株 JP-2 产 4-VG 具有显著影响($P$<0.05)(表 4)。由表 4 可知，模型的 $P$ 值为 0.0002，$R^2$=0.9994，$R^2_{Adj}$=0.9964，表明模型可靠，析因试验可信度和精确度较高[32]。对数据进行多元回归拟合，得到回归方程：$Y_1$=1711.04−589.62×A−105.67×B−690.44×C−571.08×D+263.84×E+38.28×AB+369.34×AC−56.85×AD+268.29×AE−294.46×BC−209.74×BD−303.22×BE+434.41×CD+286.37×CE−210.44×DE。

表 3　PB 试验设计及结果

Table 3　Design and results of PB design factors

| 实验号 | A初始pH | B发酵温度(℃) | C发酵时间(h) | D蛋白胨含量(g/L) | E蔗糖含量(g/L) | 4-VG含量(μg/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | 30 | 72 | 40 | 20 | 2439.02±146.13 |
| 2 | 5 | 30 | 168 | 20 | 20 | 1001.19±265.40 |
| 3 | 9 | 37 | 72 | 20 | 40 | 3103.31±241.36 |
| 4 | 5 | 37 | 72 | 40 | 40 | 1318.04±308.53 |
| 5 | 9 | 30 | 72 | 20 | 20 | 1317.3±184.11 |
| 6 | 5 | 37 | 168 | 20 | 40 | 1528.55±137.90 |
| 7 | 9 | 30 | 168 | 20 | 40 | 2725.51±161.41 |
| 8 | 9 | 37 | 168 | 20 | 20 | 363.394±128.55 |
| 9 | 5 | 37 | 168 | 40 | 20 | 753.327±56.05 |
| 10 | 5 | 30 | 168 | 40 | 40 | 2192.57±573.94 |
| 11 | 5 | 30 | 72 | 20 | 40 | 4180.34±644.22 |
| 12 | 7 | 33 | 120 | 30 | 30 | 1707.56±46.56 |
| 13 | 7 | 33 | 120 | 30 | 30 | 1578.34±57.87 |
| 14 | 9 | 37 | 72 | 40 | 20 | 435.378±65.50 |
| 15 | 5 | 37 | 72 | 20 | 20 | 5061.61±458.49 |
| 16 | 9 | 30 | 168 | 40 | 20 | 275.816±23.98 |
| 17 | 7 | 33 | 120 | 30 | 30 | 1698.34±87.34 |
| 18 | 9 | 37 | 168 | 40 | 40 | 348.712±127.25 |
| 19 | 9 | 30 | 72 | 40 | 40 | 471.358±26.03 |

表 4　PB 试验分析结果

Table 4　Results of PB experimental analysis

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | $F$值 | $P$值 |
|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | $3.17\times10^7$ | 15 | $2.11\times10^6$ | 334.14 | 0.0002** |
| A初始pH | $5.56\times10^6$ | 1 | $5.56\times10^6$ | 879.13 | <0.0001** |
| B发酵温度 | $1.79\times10^5$ | 1 | $1.79\times10^5$ | 28.24 | 0.083 |
| C发酵时间 | $5.22\times10^6$ | 1 | $5.22\times10^6$ | 824.72 | <0.0001** |
| D蛋白胨含量 | $7.63\times10^6$ | 1 | $7.63\times10^6$ | 1205.48 | 0.013* |
| E蔗糖含量 | $1.11\times10^6$ | 1 | $1.11\times10^6$ | 176.03 | 0.0009** |
| AB | 23439.83 | 1 | 23439.83 | 3.7 | 0.1499 |
| AC | $2.18\times10^6$ | 1 | $2.18\times10^6$ | 344.96 | 0.0003** |
| AD | 51702.76 | 1 | 51702.76 | 8.17 | 0.0647 |
| AE | $1.15\times10^6$ | 1 | $1.15\times10^6$ | 182.02 | 0.0009** |
| BC | $1.39\times10^6$ | 1 | $1.39\times10^6$ | 219.27 | 0.0007** |
| BD | $7.04\times10^5$ | 1 | $7.04\times10^5$ | 111.24 | 0.0018** |
| BE | $1.47\times10^6$ | 1 | $1.4E\times10^6$ | 232.5 | 0.0006** |
| CD | $3.02\times10^6$ | 1 | $3.02\times10^6$ | 477.21 | 0.0002** |
| CE | $1.31\times10^6$ | 1 | $1.31\times10^6$ | 207.38 | 0.0007** |
| DE | $7.09\times10^5$ | 1 | $7.09\times10^5$ | 111.99 | 0.0018** |
| 残差 | 18981.49 | 3 | 6327.16 | | |
| 失拟项 | 8587.21 | 1 | 8587.21 | 1.65 | 0.3274 |
| 误差 | 10394.28 | 2 | 5197.14 | | |
| 总和 | $3.17\times10^7$ | 18 | | | |
| 决定系数($R^2$) | 0.9994 | | | | |
| $R^2_{Adj}$ | 0.9964 | | | | |

注：*差异显著($P$<0.05)；**差异极显著($P$<0.01)；表7同。

2.3.3　最陡爬坡试验　由回归方程可知，因素 E(蔗糖含量)偏回归系数为 263.84，表明该因素对菌株产 4-VG 的影响为正效应，应增加。其他因素为负效应，应减小。但响应面试验时考察因素超过 3 个试验次数明显增加(3 个因素为 20 次处理，4 个因素为 31 次处理)，同时因素 D(蛋白胨含量)的效应在此 4 个因素中最小，因此舍弃对该因素的进一步优化。从中心点进行爬坡设计和试验结果如表 5 所示，实验 3 的 4-VG 含量最高，因此以实验 3 为响应面试验的中心点。

表 5　最陡爬坡试验设计及结果

Table 5　Design and results of the steepest ascent

| 实验号 | A初始pH | C发酵时间(h) | E蔗糖含量(g/L) | 4-VG含量(μg/L) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 6.5 | 120 | 20 | 2642.66±494.08 |
| 2 | 6 | 96 | 30 | 3413.10±337.96 |
| 3 | 5.5 | 72 | 40 | 3885.21±126.87 |
| 4 | 5 | 48 | 50 | 3503.82±153.26 |
| 5 | 4.5 | 24 | 60 | 2901.34±481.31 |

2.3.4　响应面试验　在多组分环境中，尤其是当变量间存在交互作用时，响应面优化试验能有效确定各因素的理想影响程度及因子间的交互作用，从而快速确立最佳实验条件[33]。对 PB 试验筛选的 3 个因素和以最陡爬坡试验中最大响应值对应的各因素值为设计中心点，采用 Box-Behnken 试验设计进行响应面优化，以确定菌株最佳产 4-VG 的最优水平，结果见表 6。对数据进行多元二次回归拟合，得到 4-VG 的二元多项式回归方程为 $Y_2$=4120.56−388.23×A−203.64×B−57.09×C−59.16×AB+584.77×AC−231.42×BC−726.12×$A^2$−578.04×$B^2$−277.52×$C^2$。由回归方程线性系数可知，各因素对菌株产 4-VG 的影响由大到小依次为 A>B>C。对构建的响应面模型进行方差分析(表 7)，模拟方程的 $F$ 值为 6.79，对应 $P$ 值<0.01，表明该模型具有显著性。回归方程的决定系

表 6　Box-Behnken 试验设计及结果

Table 6　Box-Behnken designs with response variables

| 实验号 | A初始pH | B发酵时间(h) | C蔗糖含量(g/L) | 4-VG含量(μg/L) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 6.5 | 72 | 60 | 3379.65±638.30 |
| 2 | 5.5 | 72 | 40 | 3876.36±409.40 |
| 3 | 4.5 | 24 | 40 | 3279.78±387.46 |
| 4 | 4.5 | 72 | 60 | 2885.22±637.14 |
| 5 | 5.5 | 72 | 40 | 4564.04±111.04 |
| 6 | 6.5 | 120 | 40 | 2234.69±218.45 |
| 7 | 4.5 | 120 | 40 | 3230.83±71.38 |
| 8 | 5.5 | 24 | 60 | 3690.35±74.56 |
| 9 | 5.5 | 24 | 20 | 3486.91±661.09 |
| 10 | 4.5 | 72 | 20 | 4023.71±265.25 |
| 11 | 5.5 | 72 | 40 | 3531.05±396.17 |
| 12 | 6.5 | 24 | 40 | 2520.27±50.42 |
| 13 | 6.5 | 72 | 20 | 2179.08±14.43 |
| 14 | 5.5 | 120 | 60 | 2580.22±58.61 |
| 15 | 5.5 | 72 | 40 | 4287.78±159.68 |
| 16 | 5.5 | 120 | 20 | 3302.48±136.27 |
| 17 | 5.5 | 72 | 40 | 4343.56±354.33 |

数 $R^2$ 为 0.9372，表明所建立的模型可以很好地解释响应值。此外，失拟项并不显著，表明实际值和预测值之间存在良好的相关性。该模型可用于预测 4-VG 的产量。

表 7 4-VG 浓度的响应面方差分析结果

Table 7 Analysis of variance for the 4-VG concentration

| 来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | $F$值 | $P$值 |
|---|---|---|---|---|---|
| 模型 | $7.50\times10^6$ | 9 | $8.34\times10^5$ | 6.79 | 0.0097** |
| A初始pH | $1.21\times10^6$ | 1 | $1.21\times10^6$ | 9.82 | 0.0165* |
| B发酵时间 | $3.32\times10^5$ | 1 | $3.32\times10^5$ | 2.70 | 0.1442 |
| C蔗糖含量 | 26075.65 | 1 | 26075.65 | 0.21 | 0.6589 |
| AB | 13997.84 | 1 | 13997.84 | 0.11 | 0.7455 |
| AC | $1.37\times10^6$ | 1 | $1.37\times10^6$ | 11.14 | 0.0125* |
| BC | $2.14\times10^5$ | 1 | $2.14\times10^5$ | 1.74 | 0.2281 |
| $A^2$ | $2.22\times10^6$ | 1 | $7.04\times10^5$ | 18.08 | 0.0038** |
| $B^2$ | $1.41\times10^6$ | 1 | $1.47\times10^6$ | 11.46 | 0.0117* |
| $C^2$ | $3.24\times10^5$ | 1 | $3.24\times10^5$ | 2.64 | 0.1482 |
| 残差 | $8.60\times10^5$ | 7 | $1.23\times10^5$ | | |
| 失拟项 | $1.78\times10^5$ | 3 | 59313.28 | 0.35 | 0.7937 |
| 误差 | $6.82\times10^5$ | 4 | $1.70\times10^5$ | | |
| 总和 | $8.36\times10^6$ | 16 | | | |
| 决定系数($R^2$) | 0.9372 | | | | |
| $R^2_{Adj}$ | 0.8651 | | | | |

基于回归方程，绘制了相应的响应面 3D 图，结果见图 6。初始 pH 在 4.9~5.3、发酵时间 62.4~81.6 h 范围内，发酵液的 4-VG 浓度最高，3D 曲面的坡度较为平整，说明初始 pH 与发酵时间的交互作用对菌株 JP-2 产 4-VG 的影响不大(图 6(A))。由图 6(B)可知，当初始 pH4.9~5.3、蔗糖含量为 28~36 g/L 范围内 4-VG 含量最高，3D 曲面的坡度较大，说明这 2 个因素交互作用对菌株产 4-VG 的影响较大，与响应面试验方差分析结果一致；如图 6(C)所示，在发酵时间 62.4~81.6 h、蔗糖含量为 28~36 g/L 范围内发酵液的 4-VG 含量最高。回归方程模型预测菌株产 4-VG 的最佳发酵条件为初始 pH4.97，发酵时间 71.15 h，蔗糖含量为 26.92 g/L，此时 4-VG 含量为 4243.87 μg/L。按实际情况，调整预测条件进行验证实验，在初始 pH5.0，发酵时间 72 h，蔗糖含量为 26.90 g/L 的条件下 4-VG 含量为 4342.92±401.62 μg/L，较未优化前的 4-VG 含量(1495.24±50.82 μg/L)提升了 190.45%，说明模型较好的预测了实际发酵情况。

## 2.4 菌株耐受性研究

白酒发酵过程极其复杂，菌株对酿造条件的适应能力影响了发酵过程及最终产品质量，关键影响环境因素包含温度、乙醇浓度、酸度及渗透压等[34]。菌株 JP-2 的乙醇、pH、温度和葡萄糖耐受性见图 7。由图 7A 可知，菌株 JP-2 的菌体量在乙醇浓度大于 2% 后随着乙醇浓度的增加而降低，乙醇浓度在 4%~6% 时，菌株生长虽受抑制但仍有一定存活和生长，当乙醇浓度超过 6% 菌株完全受抑制不生长。如图 7B 所示，菌株 JP-2 在酸性范围内，随着 pH 的升

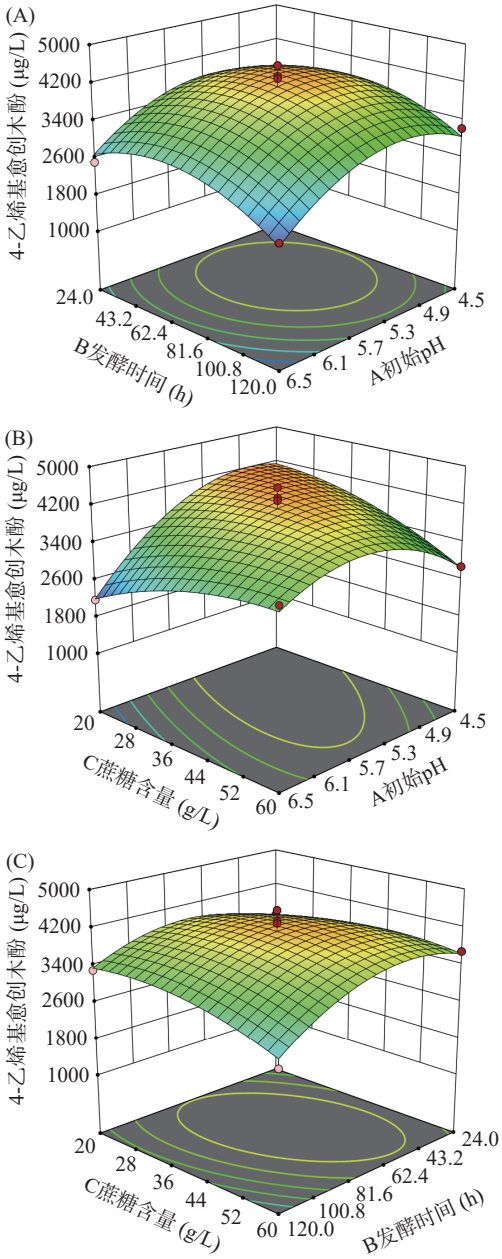



图 6 初始 pH、发酵时间、蔗糖含量对菌株 JP-2 产 4-VG 的影响

Fig.6 Effects of initial pH, fermentation time, and sucrose content on the 4-vinylguaiacol concentration producing by JP-2

注：(A)初始 pH 和发酵时间；(B)初始 pH 和蔗糖含量；(C)发酵时间和蔗糖含量。

高菌体量先增加后降低，当 pH5.5 时菌体量最高，当 pH 低于 4.0 后，菌体量急剧下降，菌株生长受到抑制不生长。由图 7C 可知，菌株 JP-2 菌体量随着温度的升高先增加后下降，最适生长温度为 35 ℃。当温度高于 35 ℃ 后，菌株生长受到了一定程度的阻碍，甚至死亡。当温度在 40~45 ℃，菌株生长受抑制，但仍有一定的菌体量。当温度达到 50 ℃，菌体完全受抑制死亡。如图 7D 所示，菌株 JP-2 生长随葡萄糖浓度升高先增加后下降，当葡萄糖浓度为 50 g/L 时，菌体量达最高。菌株表现出较强的耐糖性能，在葡萄糖浓度达 300 g/L 时，OD 值均达 0.9 以上，菌体量较高。

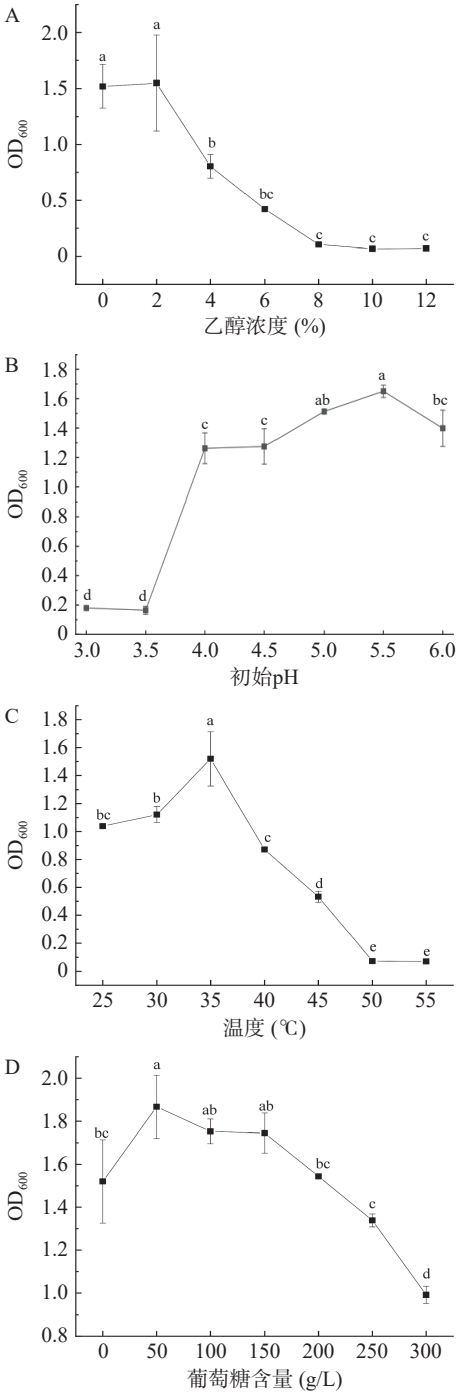



图 7　菌株 JP-2 耐受性研究

Fig.7　Tolerance characteristics of strain JP-2

注：A：乙醇浓度；B：初始 pH；C：培养温度；D：葡萄糖含量。

## 2.5　产 4-VG 菌株在白酒中的应用

2.5.1　对白酒中 4-VG 的影响　将强化菌株 JP-2 的试验组和未强化的对照组酒醅及酒样中 4-VG 进行定量分析，如图 8 所示。添加菌株发酵液的试验组中，与刚入窖发酵（0 d）的酒醅相比，发酵结束时酒醅中 4-VG 显著上升了 53.85%（$P$<0.05），而未添加菌株发酵液的对照组发酵结束时酒醅中 4-VG 浓度无显著变化（$P$>0.05）。蒸馏取酒后，与原酒对照组（966.97±146.03 μg/L）相比，试验组的 4-VG 含量（3672.60±178.66 μg/L）显著增加了 279.80%（$P$<

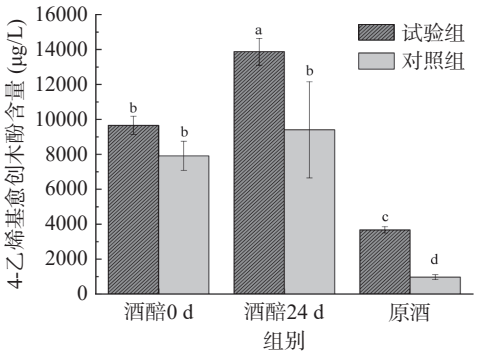



图 8　酒醅及原酒中 4-VG 浓度的变化

Fig.8　Changes in 4-Vinylguaiacol contents in fermented grains and original liquor

0.05）。Deng 等[25] 将 *Pseudomonas azotoformans* YF-58 以细菌麸曲的形式强化至芝麻香型白酒发酵中，原酒中 4-VG 含量提升至 0.049±0.0060 mg/L。何宏魁等[10] 将菌株 *Bacillus velezensis* GX5 应用于浓香型实验生产时，发酵后白酒中的 4-VG 产量增加至 2.42 mg/L。林斌等[15] 将枯草芽孢杆菌 B257 以麸曲形式添加至清香型小曲白酒中，发酵后原酒中 4-VG 增长至 2.29 mg/L。本研究获得的菌株应用于酱酒中提升 4-VG 含量均高于文献已报道。

2.5.2　对白酒风味的影响　将强化菌株 JP-2 的试验组和未强化的对照组酒样中风味物质进行定量分析

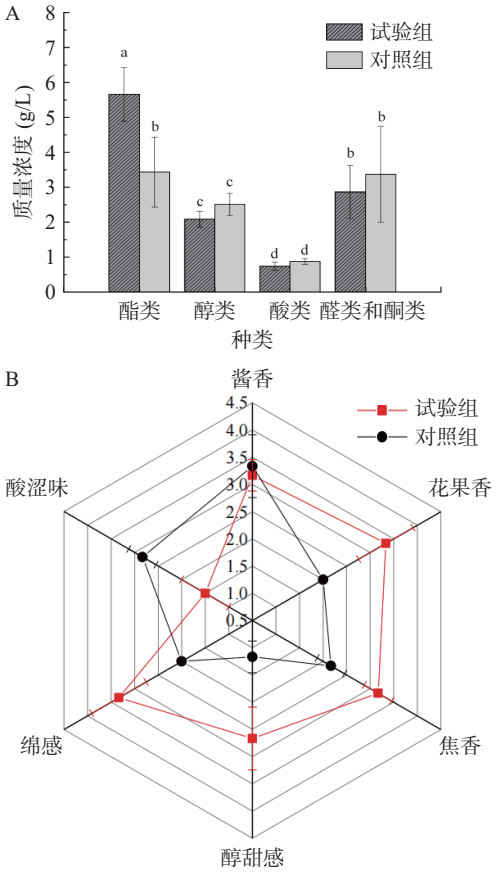



图 9　JP-2 生物强化对白酒挥发性风味物质（A）及口感（B）的影响

Fig.9　Effects of JP-2 biofortification on the contents (A) of volatile flavor compounds and taste (B) in Baijiu

(图 9A),结果表明试验组原酒中酯类物质浓度显著高于对照组($P$<0.05),比对照组显著提升了 64.81%,其他挥发性成分与对照组无显著性差异。这与林斌等[15]研究的强化高产愈创木酚类菌株于白酒中提升酯类物质含量结果一致。

按照 Tang 等[35]方法对原酒风味进行品评并绘制白酒风味雷达图,如图 9B 所示。与对照组相比,添加高产 4-VG 菌株的试验组增加了原酒的焦香、花果香、醇甜感和绵感,减少了酸涩味。文献报道在发酵食品中提高 4-VG 可改善食品的风味和口感,如在葡萄酒和啤酒中适当提高 4-VG 浓度可以改善其香气特征[36]、在白酒中应用产愈创木酚类菌株可增加花果香及焦香[10,25]、在酱油中应用产愈创木酚类菌株可提升酱油的醇香、焦香和花果香[37]。综上,菌株 JP-2 可以增加白酒发酵过程中 4-VG 的浓度,并且对酒的风味和口感有一定的促进作用。

## 3 结论

本研究将酒曲富集培养后通过筛选培养基初筛及发酵定量检测复筛的方法得到了 13 株菌株产 4-VG 含量显著高于对照菌株,结合进一步在含前体物质液态发酵培养基中筛选,最终获得了一株高产 4-VG 菌株丙二酸克罗诺杆菌(*C. malonaticus*)JP-2。使用 GC-MS 法定量检测该菌在不含和含有阿魏酸前体发酵培养基中 4-VG 的浓度,分别为 1495.32±74.24 μg/L 和 2.82±0.04 g/L,说明菌株 JP-2 具有较好的转化阿魏酸生成 4-VG 的能力。通过响应面试验设计优化得到菌株 JP-2 高产 4-VG 的发酵条件:初始 pH5.0、发酵时间 72 h、蔗糖含量为 26.90 g/L,此条件下 4-VG 浓度为 4342.92±401.62 μg/L,比未优化前提升了 190.45%。菌株 JP-2 具有良好的耐受性,能够在乙醇体积分数 6%,pH4.0,温度为 45 ℃,葡萄糖浓度为 300 g/L 的环境中生长。将该菌株应用于白酒发酵能显著提高原酒中 4-VG 的含量和提升白酒的风味成分及口感。综上,本研究筛选得到的菌株 JP-2 具有在白酒发酵过程中提升 4-VG 活性成分和风味品质的能力,对于提高白酒风味成分和健康内涵具有一定现实意义。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献

[1] 李青卓, 王嘉瑞, 张小龙, 等. 风味物质 4-乙烯基愈创木酚的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(4): 15−19. [LI Q Z, WANG J R, ZHANG X L, et al. Research progress of flavor substance 4-vinylguaiacol[J]. China Brewing, 2021, 40(4): 15−19.]

[2] 李宗泽. 高产 4-乙烯基愈创木酚的酵母菌株的构建及其在酱油发酵中的应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2022. [LI Z Z. Constuction of yeast with high yield of 4-vinylguaiaicoland its application in soy sauce fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.]

[3] 刘杰, 顾秋亚, 邓怀利, 等. 酿酒酵母表面展示酚酸脱羧酶及其在生产 4-乙烯基愈创木酚上的应用[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(20): 159−166. [LIU J, GU Q Y, DENG H L, et al. *Saccharomyces cerevisiae* surface displaying phenolic acid decarboxylase and its application in production of 4-vinylguaiacol[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(20): 159−166.]

[4] LUO Yun, WANG Chongzhi, SAWADOGO R, et al. 4-vinylguaiacol, an active metabolite of ferulic acid by enteric microbiota and probiotics, possesses significant activities against drug-resistant human colorectal cancer cells[J]. ACS Omega, 2021, 6(7): 4551−4561.

[5] SHIN J A, JEONG S H, JIA Caihua, et al. Comparison of antioxidant capacity of 4-vinylguaiacol with catechin and ferulic acid in oil-in-water emulsion[J]. Food Science and Biotechnology, 2019, 28(1): 35−41.

[6] SHI Xiaoshan, ZHAO Shumiao, CHEN Shenxi, et al. Tetramethylpyrazine in Chinese Baijiu: Presence, analysis, formation, and regulation[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1004435.

[7] TANG Xueyu, WU Shanshan, HUA Xia, et al. Ferulic acid triggering a co-production of 4-vinyl guaiacol and fumaric acid from lignocellulose-based carbon source by *Rhizopus* oryzae[J]. Food Chemistry, 2024, 461: 140799.

[8] BOUDAOUD S, AOUF C, DEVILLERS H, et al. Sourdough yeast-bacteria interactions can change ferulic acid metabolism during fermentation[J]. Food Microbiology, 2021, 98: 103790.

[9] 巩园园, 毛豪, 晋湘宜, 等. 产 4-乙烯基愈创木酚细菌的筛选及酚酸脱羧酶基因的克隆与表达[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 160−164. [KONG Y Y, MAO H, JING X Y, et al. Screening of 4-vinylguaiacol-producing bacteria and cloning and expression of phenolic acid decarboxylase gene[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 160−164.]

[10] 何宏魁, 吴浩, 刘智慧, 等. 产 4-乙烯基愈创木酚菌种的筛选及在浓香型白酒生产中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2024(7): 83−86. [HE H K, WU H, LIU Z H, et al. Screening of 4-vinylguaiacol-producing strain and its application in the production of Nongxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2024(7): 83−86.]

[11] 邹谋勇, 王珂瑶, 公维明, 等. 产 4-乙烯基愈创木酚酵母的筛选、鉴定及其在酱油中的应用[J]. 中国酿造, 2024, 43(10): 103−108. [ZOU M Y, WANG K Y, GONG W M, et al. Screening, identification of 4-vinylguaiacol producing yeast and its application in soy sauce[J]. China Brewing, 2024, 43(10): 103−108.]

[12] 唐洁, 林斌, 单义民, 等. 白酒中愈创木酚类化合物研究进展[J]. 中国酿造, 2025, 44(1): 1−5. [TANG J, LIN B, SHAN Y M, et al. Research progress on guaiacol compounds in Baijiu[J]. China Brewing, 2025, 44(1): 1−5.]

[13] 四川大学. 一株高产愈创木酚的产氮假单胞菌 YF-58 及其应用: 中国, 202310542325.1[P]. 2024-04-19. [Sichuan University. A *Pseudomonas azotoformans* YF-58 strain with high guaiacol yield and its applications: China, 202310542325.1[P]. 2024-04-19.]

[14] 唐洁, 杨强, 刘源才, 等. 高糖化力米根霉 G1 培养条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 173−178. [TANG J, YANG Q, LIU Y C, et al. Optimization of culture conditions of high saccharifying ability *Rhizopus oryzae* G1[J]. China Brewing, 2022, 41(7): 173−178.]

[15] 林斌, 杨强, 宿智新, 等. 产愈创木酚类功能菌筛选及其在清香型小曲白酒中的应用[J]. 中国酿造, 2022, 41(9): 74−79. [LIN B, YANG Q, SU Z X, et al. Screening of guaiacol-producing strains

and their application in light-flavor Xiaoqu Baijiu[J]. China Brewing, 2022, 41(9): 74−79.]

[16] SUN Lihui, LV Shiwen, YU Feng, et al. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 281: 144−149.

[17] 孙细珍, 杜佳炜, 黄盼, 等. 现代工艺和传统工艺酿造小曲清香型白酒感官表征及风味成分分析[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 282−290. [SUN X Z, DU J W, HUANG P, et al. Analysis of sensory characteristics and flavor components in light-flavor Chinese liquor (Baijiu) made with Xiaoqu starter by modern and traditional technologies[J]. Food Science, 2021, 42(6): 282−290.]

[18] 刘家欢, 孙细珍, 熊亚青, 等. 基于感官和化学分析技术解析不同产区酱酒风味特征[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(9): 268−283. [LIU J H, SUN X Z, XIONG Y Q, et al. Analysis of flavor characteristics in sauce-flavor Baijiu from two regions by the chemosensory technique[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(9): 268−283.]

[19] 唐洁, 阮松, 林斌, 等. 配糟对清香型白酒发酵中环境因子及微生物群落的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 554−572. [TANG J, RUAN S, LIN B, et al. Effects of distilled grains on environmental factors and microbial communities in the fermentation of light flavor Baijiu[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 554−572.]

[20] VILELA N, GORKOVSKIY A, HERRERA-MALAVER B, et al. From residues to clove: Harnessing novel phenolic acid decarboxylase for 4-vinyl guaiacol production in industrial yeast[J]. Food and Bioproducts Processing, 2025, 151: 20−27.

[21] MAEDA M, MOTOSOKO M, TOKASHIKI T, et al. Phenolic acid decarboxylase of *Aspergillus luchuensis* plays a crucial role in 4-vinylguaiacol production during awamori brewing[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(4): 352−359.

[22] MISHRA S, SACHAN A, VIDYARTHI A S, et al. Transformation of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol as a major metabolite: A microbial approach[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2014, 13(4): 377−385.

[23] SLAMA N, MANKAI H, LIMAM F. *Streptomyces tunisiensis* DSM 42037 mediated bioconversion of ferulic acid released from barley bran[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(4): 70.

[24] dos SANTOS M B C, SCARPASSA J A, MONTEIRO D A, et al. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by *Klebsiella pneumoniae* TD 4.7[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2021, 52(3): 1181−1190.

[25] DENG Z, ZHU M, DU Y, et al. Exploring the enhancement of guaiacol compounds in sesame-flavored Baijiu via inoculation with *Pseudomonas azotoformans* YF-58[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2024, 60(6): 1363−1374.

[26] 王薇薇, 潘奕鸥, 王丽, 等. 谷物中阿魏酸的分布及其生理活性的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2019, 27(5): 43−48. [WANG W W, PAN Y O, WANG L, et al. Research advances on the distribution and physiological activity of ferulic acid in grain[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2019, 27(5): 43−48.]

[27] 何文彬, 张捷文, 徐晴元, 等. 高产酸性蛋白酶的菌株筛选及培养条件优化[J]. 中国调味品, 2025, 50(2): 10−16. [HE W B, ZHANG J W, XU Q Y, et al. Screening of high-yield acid protease strains and optimization of culture conditions[J]. China Condiment, 2025, 50(2): 10−16.]

[28] 聂铭, 杨裕然, 李振轮. 微生物胞内外 pH 稳态维持机制研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 1−13. [NIE M, YANG Y R, LI Z L. Research progress in the mechanisms of maintaining intracellular and extracellular pH homeostasis in microorganisms[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 1−13.]

[29] SUN Qi, MA Jinghao, BASIT R A, et al. Screening of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with high 3-methylthio-1-propanol yield and optimization of its fermentation conditions[J]. Foods, 2024, 13(9): 1296.

[30] 邓照, 杜亚珂, 夏玛, 等. 产愈创木酚的假单胞菌在白酒酿造中的应用初探[J]. 食品科技, 2024, 49(5): 1−7. [DENG Z, DU Y K, XIA Y, et al. Enhanced application of a strain of *Pseudomonas azogenes* with high guaiacol-producing capacity in Baijiu-brewing[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(5): 1−7.]

[31] MA Jinghao, CHENG Liujie, ZHANG Yujiao, et al. Screening of yeasts isolated from Baijiu environments for producing 3-methylthio-1-propanol and optimizing production conditions[J]. Foods, 2022, 11(22): 3616.

[32] 葛松涛, 寿泉洪, 韩文凤, 等. 响应面法优化鲜黄酒瓶内发酵工艺[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 278−284. [GE S T, SHOU Q H, HAN W F, et al. Optimization of bottling fermentation process of draft Huangjiu by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 278−284.]

[33] TANG Jie, LIN Bin, JIANG Wei, et al. Screening of *β*-damascenone-producing strains in light-flavor Baijiu and its production optimization *via* response surface methodology[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1067671.

[34] 李群, 张龙, 李锐, 等. 高产 2-苯乙醇菌株筛选及其在米香型白酒中的应用[J]. 中国酿造, 2025, 44(8): 100−106. [LI Q, ZHANG L, LI R, et al. Screening of high yield 2-phenylethanol strain and the application in rice-flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2025, 44(8): 100−106.]

[35] TANG Jie, LIN Bin, SHAN Yimin, et al. Application of indigenous *Saccharomycopsis fibuligera* for light-flavor Baijiu fermentation: Changes of microbial community and flavor metabolism[J]. Current Research in Food Science, 2025, 10: 101008.

[36] XU Lili, ZHANG Haimeng, CUI Yunqian, et al. Increasing the level of 4-vinylguaiacol in top-fermented wheat beer by secretory expression of ferulic acid decarboxylase from *Bacillus pumilus* in brewer's yeast[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(12): 2711−2720.

[37] 张颖超, 于鑫, 赵祥颖, 等. 产愈创木酚菌株筛选及其在酱油酿造中的应用[J]. 中国调味品, 2024, 49(2): 42−48,61. [ZHANG Y C, YU X, ZHAO X Y, et al. Screening of guaiacol-producing strains and their application in soy sauce brewing[J]. China Condiment, 2024, 49(2): 42−48,61.]