

浓香型大曲中产香微生物的筛选及鉴定

明红梅¹, 郭志¹, 周健¹, 陈蒙恩¹, 许德富², 姚霞¹

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川自贡 643000) (2. 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000)

摘要: 本研究从传统浓香型大曲微生物资源中筛选产香功能性微生物, 研究其与大曲香味物质之间的联系, 并对产香功能菌株进行分子生物学鉴定。采用传统微生物分离法从不同发酵阶段的浓香型大曲中分离纯化获得细菌 22 株, 酵母 6 株。以小麦固体培养基为底物对各细菌、酵母菌株进行单菌产香实验, 经闻香评价, 菌株 X19 和 J3 发酵后能产生浓郁的香味。采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术对这两株菌的发酵产物进行挥发性成分检测, 发现菌株 X19 和 J3 的发酵产物中香味物质种类丰富, 其中吡嗪类物质、苯乙醇、愈创木酚等香味物质为浓香型大曲的重要香味成分。因此, 可初步认定菌株 X19 和 J3 为浓香型大曲的产香功能菌。经形态学观察和分子生物学鉴定, 菌株 X19 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 菌株 J3 为异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*)。

关键词: 浓香型大曲; 产香微生物; 挥发性成分; 筛选; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2015)4-186-191

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.030

Screening and Identification of Aroma-producing Microorganisms in Luzhou-flavor Daqu

MING Hong-mei¹, GUO Zhi¹, ZHOU Jian¹, CHEN Meng-en¹, XU De-fu², YAO Xia¹

(1. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

(2. Luzhou Laojiao Co. Ltd., Luzhou 646000, China)

Abstract: Aroma-producing microorganisms were screened from traditional Luzhou-flavor daqu microbial resources. The relationship between aroma-producing microorganisms and flavoring substances in Luzhou-flavor daqu was also investigated. Functional aroma-producing microorganisms were identified using various molecular biology techniques. Multiple strains of bacteria (22) and yeast (6) were isolated and purified from the various fermentation stages of Luzhou-flavor daqu by traditional microbial separation. The bacterial and yeast strains were separately cultured in wheat solid growth medium, and tested for single-strain aroma production. The individual strains X19 and J3 were observed to produce rich flavors post-fermentation by a sensory evaluation (smell test). The volatile components present in the fermentation products of the two strains were identified by headspace solid phase micro extraction-gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS). This analysis identified a number of flavor substances in the fermentation products of the two strains. Among these, pyrazine, phenylethanol, and guaiacol were identified as important flavor substances present in Luzhou-flavor daqu. Therefore, the two strains were primarily identified as the functional aroma-producing microorganisms present in Luzhou-flavor daqu. Morphological observation and molecular biology identification analyses have identified the X19 and J3 strains as types of *Bacillus licheniformis* and *Wickerhamomyces anomalus*, respectively.

Key words: Luzhou-flavor daqu; aroma-producing microorganisms; volatile components; screening; identification

浓香型大曲是一种含有微生物菌系、微生物酶系和复合曲香香味物质的微生态制品, 故大曲被认为是一种发酵生香剂, 其质量好坏直接影响到大曲酒的品质和风味特征。名优大曲酒生产企业具有独特的地域

收稿日期: 2014-08-11

基金项目: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目 (NJ2011-13); 泸州老窖科研奖学金项目 (131 jzk04); 泸州市科技局应用基础项目 (2011-S-28); 四川省高等教育质量工程项目 (2011-659)

作者简介: 明红梅 (1971-), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事酿酒生物技术及应用研究

资源优势, 拥有生态的制曲和酿酒资源, 包括地理条件、气候条件、水质条件以及在这样的环境中滋生和孕育的微生物类群。这些微生物类群中蕴藏着大量的酿酒功能菌, 对白酒风味物质产生、风格形成及质量变化有着密切的相关性^[1]。大曲微生物是传统白酒发酵不可缺少的微生物资源之一, 包括细菌、霉菌、酵母菌等。这些微生物利用原料中的淀粉、蛋白质等营养物质繁殖代谢, 分泌白酒酿造过程中所需要的淀粉酶、糖化酶、酯化酶、蛋白酶等各种酶, 在生物酶和温度的作用下, 经过一系列复杂的化学和生物化学反应进

而产生众多的芳香成分。这些芳香类物质对形成大曲及白酒的香气成分起着重要的作用^[2]。其中细菌和酵母是生成大曲中芳香类物质的主要菌源。因此,挖掘和开发名优酒企业宝贵的菌种资源,构建微生物菌种资源库,对名优酒实现异地再现具有现实意义。

目前,浓香型大曲微生物的研究主要集中在菌种的分离、筛选和鉴定上,以及对微生物区系中微生物的种类、数量、分布及其变化规律的研究,随着现代分离分析技术的发展,对大曲风味物质的研究正在逐步开展,但是,对于微生物与风味物质之间的联系的研究还有待深入^[3]。本研究主要对不同发酵阶段中高温浓香型大曲的细菌和酵母^[4]进行筛选,分析鉴定其挥发性代谢产物,探寻与大曲香味成分之间的联系,以期找到产香性能突出的菌株,改良大曲发酵功能菌群,为提高浓香型大曲质量和改善白酒风味奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器

1.1.1 大曲样品

选取泸州老窖制曲生态园不同曲库中安曲后及第1 d、3 d、5 d、7 d、9 d、15 d、30 d、60 d、90 d、120 d的曲样。分别整块粉碎后过40目筛,采用四分法浓缩至150 g,装于无菌袋4℃冰箱贮存备用。

1.1.2 培养基

细菌分离、保藏培养基主要采用牛肉膏蛋白胨培养基;酵母分离、保藏培养基主要采用马铃薯葡萄糖培养基^[5];

细菌种子培养基:蛋白胨10 g,氯化钠2.5 g,葡萄糖5 g,蒸馏水500 mL, pH 7.4~7.6;

酵母种子培养基:葡萄糖20 g,胰蛋白胨20 g,酵母浸出膏10 g,蒸馏水1000 mL, pH 5.0~5.5;

小麦固体培养基:取80 g适度粉碎的小麦于250 mL三角瓶中,调节小麦原料含水量36%~40%。

1.1.3 试剂

TaqDNA polymerase, dNTPs, DL2000TMDNA Marker, 均购自宝生物工程(大连)有限公司;蛋白酶K, 购自Merck公司;溶菌酶, 购自Sigma公司;琼脂糖、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、去离子甲酰胺均购自Solarbio;引物由上海英潍捷生物技术公司合成。

1.1.4 仪器与设备

GZ-250-M 恒温培养箱, 韶关市广智科技设备有限公司; SW-CJ-1F 型超净工作台, 苏州苏洁净化设备有限公司; VEGA 3 SBU 型扫描电子显微镜, 德国

NETZSCH公司; 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 固相微萃取头, 美国Supelco公司; 手动SPME进样器, 美国Supelco公司; 15 mL带硅橡胶垫的样品瓶, 美国Supelco公司; Agilent 6890N-5975B 气相色谱-质谱联用仪, 美国安捷伦公司; My Cycler 型PCR仪, 美国BIA-RAD公司; SC-805 凝胶成像系统, 上海山富科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌及酵母的分离、纯化

微生物的分离培养采用稀释平板涂布法。准确称取1 g大曲样品, 置入装有99 mL无菌水的三角瓶中, 震荡30 min。然后用移液枪吸取1 mL震荡均匀的菌悬液, 置入装有9 mL无菌水的试管中, 震荡均匀, 以此10倍逐级稀释至 10^{-7} 。

取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释度的菌悬液分别在牛肉膏蛋白胨培养基和马铃薯葡萄糖培养基上进行平板涂布, 细菌于37℃下倒置培养24 h; 酵母于28℃下倒置培养48 h。待长出菌落后, 选取具有典型酵母菌和细菌特征的菌落进行划线分离、纯化, 镜检后编号, 接种于斜面试管中保藏。

1.2.2 固态产香实验

分离的各细菌、酵母菌株分别接入对应的种子培养基中, 细菌于37℃下培养18 h后, 调节种子液浓度至 10^8 个/mL。酵母于28℃下培养48 h后, 调节种子液浓度至 10^7 个/mL。然后按10%接种量接种于灭菌处理后的小麦固体培养基中, 细菌于37℃培养9 d, 酵母于28℃培养9 d。

1.2.3 产香性能测定

对各细菌、酵母菌株的发酵产物跟踪(0~9天)进行感官评价。其中, 发酵产物香味良好的菌株需进一步跟踪(0~9天)分析其发酵产物的挥发性成分变化。

1.2.3.1 固态发酵产物感官评价

由10名经过闻香训练的人员组成评价小组, 对各菌株固态发酵后的样品进行外观、气味评价。

1.2.3.2 固态发酵产物的挥发性成分检测

固相微萃取条件: 精确称取经研磨后的样品4.0 g于15 mL的进样瓶中, 置于60℃的水浴中平衡15 min, 顶空吸附30 min后于230℃气质联用仪解析3 min后进行鉴定。

气相色谱条件: 毛细管色谱柱为DB-WAX, 规格为(60 m×250 μm, 0.25 μm); 手动无分流进样, 进样口温度250℃; 程序升温: 初始温度40℃, 保留1 min, 以3℃/min的速率升至180℃, 再以2.5℃/min的速

率升至 230 °C，保留 10 min；汽化室温度 250 °C；载气 He，流速 1 mL/min。

质谱条件：EI 电离源，电子能量 70 eV，扫描范围 20~500 u，离子源温度 250 °C；接口温度 230 °C。

1.2.4 产香菌株鉴定

对筛选出的产香性能突出的菌株采用电子扫描显微镜进行形态观察，并进行分子生物学鉴定。酵母采用 18S rDNA 分子生物学鉴定，引物设计为 NL-1：GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 和 NL-4：GGTCCGTGTTTCAAGACGG；细菌采用 16S rDNA 分子生物学鉴定，引物设计为 27F：GAGTTTGATCMTGGCTCAG 和 1492R：TACGGYTACCTTGTTACG。利用 PCR 扩增技术分别对 18S rDNA 和 16S rDNA 进行扩增后送样测序，将测序结果在国际 GeneBank 中进行 BLAST 比对，利用 MEGA4.0 软件进行多重序列同源性比对分析，并采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 构建系统发育树^[6]。

2 结果与分析

2.1 微生物分离结果

采用稀释平板涂布法对不同发酵阶段大曲样品中的细菌、酵母进行分离，选取具有典型酵母菌和细菌特征的菌落进行纯化，结合显微镜下的细胞形态，最终获得细菌 22 株，分别编号为 X1-X22；酵母 6 株，分别编号为 J1-J6。

2.2 固态产香结果

2.2.1 固态发酵产物感官评价结果

将分离获得 22 株细菌、6 株酵母的种子液接种至小麦固体培养基中培养，然后对各菌株发酵产物进行外观、气味评价，其中 4 株细菌、2 株酵母发酵后香气较好，其发酵 9 d 后的固态产物感官评价结果如表 1 所示。

表 1 各菌株固态发酵产物感官评价

Table 1 Sensory evaluation of solid fermentation products produced by different microbial strains

菌株编号	外观描述	气味描述
X5	棕褐色	香味淡薄、有酱味
X12	棕黄色	香味淡薄、有甜味
X19	深褐色	香味浓郁
X20	棕黄色	香味淡薄，略有酱味
J1	保持小麦原色	香味淡薄
J3	保持小麦原色	酒香味浓郁

由表 1 可见，各菌株发酵小麦固体培养基后所产生的感官特征各异。细菌菌株 X19、X5、X12、X20 和酵母菌株 J3、J1 发酵后产物有令人愉悦的香味，可初步确定为具有产香性能的菌株。细菌菌株 X19 经过 37 °C 发酵 9 d 后，发酵基质为深褐色，并且产生浓郁的香味。酵母菌株 J3 经过 28 °C 发酵 9 d 后，发酵基质保持小麦原色，酵母菌体在基质上生长十分丰富，整个基质呈现有白色。通过嗅闻气味后，发酵基质带有浓郁的酒香味。

其它细菌菌株发酵后均未产生令人愉悦的香味，或保持小麦原味、甚至产生刺鼻的氨味、怪味。其它酵母菌株发酵后均未产生令人愉悦的香味，或无味、甚至产生怪味。综合来看，细菌菌株 X19 和酵母菌株 J3 的产香性能较为突出，可作为下一步挥发性发酵产物研究的菌株。

2.2.2 固态发酵产物挥发性成分测定结果

对 X19、J3 两株菌发酵 9 d 的固态产物采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术测定其中的挥发性物质^[7~9]，其萃取的挥发性物质的总离子流色谱图分别如图 1、图 2 所示，分析鉴定出的挥发性物质分别如表 2、表 3 所示。

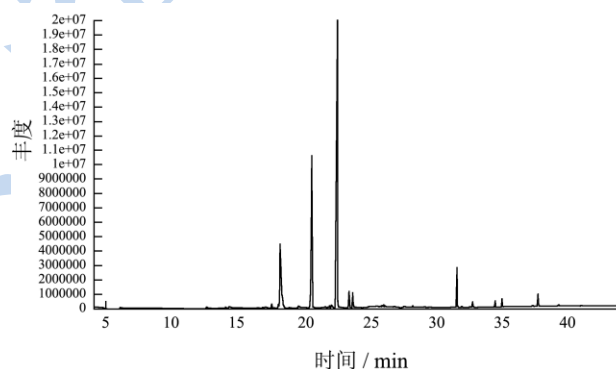


图 1 X19 发酵产物挥发性物质 GC-MS 总离子流色谱图

Fig.1 GC-MS total ion current chromatogram of volatile substances present in the fermentation product of X19

由表 2 可以看出，细菌菌株 X19 发酵小麦固体培养基后共获得 24 种挥发性化合物。这些化合物多属于吡嗪类化合物、芳香族化合物、酚类化合物等物质。其中吡嗪类化合物最多，其含量超过了挥发性物质总量的 50%，主要包括 2,5-二甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪等。吡嗪类化合物具有烘焙香、坚果香，在浓香型大曲香味的组成中具有比较重要的地位^[10]。苯乙醇、愈创木酚、苯甲醛这些物质均在大曲中检测到，也是大曲香味成分的组成部分^[11]。苯乙醇、3-羟基-2-丁酮、苯甲醛、吡嗪类化合物等也是浓香型白酒的风味物质^[12]，白酒中的这些风味成分有可

能是由大曲带入。

表 2 X19 发酵产物挥发性物质测定

Table 2 Volatile substances identified in X19 fermentation

products		
保留时间/min	物质名称	相对含量/%
13.07	2,4,5-三甲基恶唑	0.33
15.49	2-甲基吡嗪	0.11
16.07	3-羟基-2-丁酮	0.26
16.23	十三烷	0.10
17.07	2,5-二甲基吡嗪	14.89
18.61	2,3,5,6-四甲基吡嗪	46.74
19.59	2,3,5-三甲基吡嗪	24.58
20.62	3-乙基-2,5-甲基吡嗪	0.14
21.08	2-乙基-3,5-二甲基吡嗪	0.41
22.42	2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪	1.67
22.70	苯甲醛	1.69
22.90	十五烯	0.08
24.80	2-硝基-3-氟基吡啶	0.07
25.83	糠醇	0.03
28.09	茶	0.05
30.57	愈创木酚	3.60
30.95	苯甲醇	0.08
31.53	抗氧化剂 264	0.07
31.75	苯乙醇	0.50
33.47	苯酚	0.52
33.99	4-乙基-2-甲氧基苯酚	0.60
36.30	3-乙基氨基苯酚	0.07
36.77	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	0.96
38.27	邻苯二甲酸二异丁酯	0.13

对菌株 X19 的发酵产物跟踪进行感官和挥发性成分分析, 结果表明: 随着发酵时间的延长, 发酵基质在外观上从小麦原色至深褐色, 发酵基质气味从小麦原味到香味微弱、有酱味, 最终呈现浓郁的香味。发酵前期并未从发酵基质中检测到苯乙醇、愈创木酚, 随着发酵进行, 苯乙醇、愈创木酚的含量随之增高, 到发酵第 9 d 时这两种物质的色谱峰达到峰值。吡嗪类物质含量随着发酵时间的延长不断累积, 到第 9 d 时色谱峰达到峰值。

表 3 可以看出, 酵母菌株 J3 发酵小麦固体培养基后共获得 28 种挥发性物质。在这些挥发性物质中, 苯乙醇的相对含量最高, 达到 55.35%。苯乙醇具有玫瑰香味、蜂蜜香味, 在大曲香味中的贡献较高。发酵产物中也含有吡嗪类物质、愈创木酚、2-正戊基呋喃等大曲香味成分^[13]。苯乙醇、愈创木酚等物质也是白酒中的香气成分, 大曲可能是白酒中这些物质的来源之

一。

表 3 J3 发酵产物挥发性物质测定

Table 3 Volatile substances identified in the J3 fermentation

products		
保留时间/min	物质名称	相对含量/%
3.29	乙醇	0.76
13.26	双戊烯	1.32
13.52	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-双环[3.1.0]-2-己烯	0.36
13.62	桉叶油醇	2.27
14.21	2-正戊基呋喃	1.00
15.45	邻-异丙基苯	0.73
17.17	2,5-二甲基吡嗪	0.70
17.34	2,6-二甲基吡嗪	0.39
19.54	2,3,5-三甲基吡嗪	3.55
20.29	2-甲基-1-苯基丙烯	0.59
21.45	2,3,5,6-四甲基吡嗪	13.28
21.56	2-乙基己醇	3.14
22.12	2-乙酰基呋喃	0.55
22.41	2-羟基-4,6-二甲基苯甲醛	0.45
22.69	苯甲醛	0.99
25.04	乙二醇乙醚	0.14
25.43	gamma-丁内酯	0.32
25.88	乙酰苯	0.36
26.68	异戊酸	0.57
28.08	茶	1.23
28.92	2,2,3,3,4,4,4-七氟-N-(2-苯乙基)-丁酰胺	0.24
30.56	愈创木酚	0.46
30.64	2-甲基茶	0.44
31.53	抗氧化剂 264	1.05
31.76	苯乙醇	55.35
32.95	2-乙酰基吡咯	0.24
33.98	4-乙基-2-甲氧基苯酚	0.37
36.71	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	2.84

对菌株 J3 的发酵产物跟踪进行感官和挥发性成分分析, 结果表明: 随着发酵时间的延续, 发酵基质由原来的小麦原味、无香味, 演变为浓郁的酒香味。刚开始发酵原料中并无苯乙醇的存在, 到发酵第 9d 时色谱峰达到峰值。愈创木酚、2-正戊基呋喃、2,3,5-三甲基吡嗪等物质在发酵过程中含量波动变化、不稳定, 发酵过程中这些物质有可能存在生成及转化两方面的作用, 还有待进一步研究。

综合来看, 细菌菌株 X19 发酵产生吡嗪类物质能力较强, 酵母菌株 J3 发酵产生苯乙醇的能力较强, 该

两株菌发酵后能产生吡嗪类物质、苯乙醇、愈创木酚等多种对大曲香味成分有重要贡献的香味物质。其部分发酵产物和白酒风味物质之间也存有内在联系。因此,可初步认定细菌菌株 X19 和酵母菌株 J3 为浓香型大曲的产香功能菌。

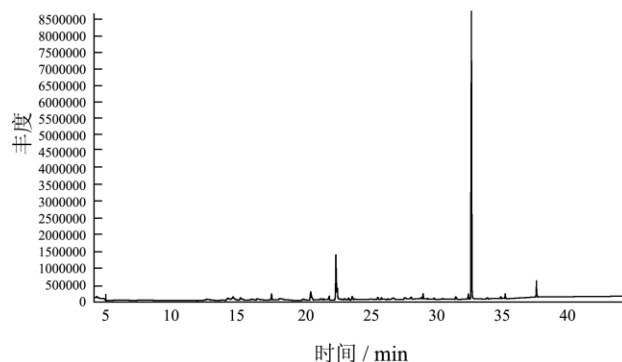


图 2 J3 发酵产物挥发性物质 GC-MS 总离子流色谱图

Fig.2 GC-MS total ion current chromatogram of volatile substances present in the fermentation products of the J3 strain

2.3 产香菌株鉴定结果

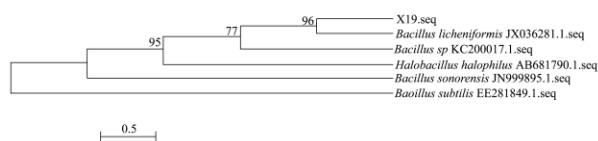


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性构建的菌株 X19 系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree for the X19 strain based on 16S rDNA sequence homology

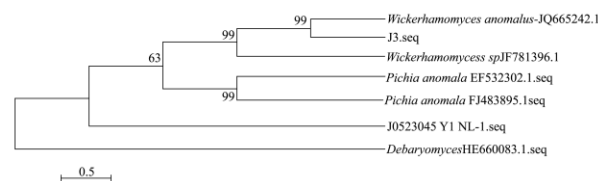


图 4 基于 18S rDNA 序列同源性构建的菌株 J3 系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree for the J3 strain based on 18S rDNA sequence homology

经对 X19、J3 菌体进行 DNA 提取^[14]、目的片段 PCR 扩增后,将 PCR 产物送往上海杰里公司测序,测序结果在 GeneBank 数据库中进行比对,结果表明,菌株 X19 与 *Bacillus licheniformis* JX 036281.1 相似性为 99%;菌株 J3 与 *Wickerhamomyces anomalus* JQ 665242.1 相似性为 99%。利用 Mega4.0 软件通过 N-J 法对菌株 X19、J3 分别构建系统发育树,结果如图 3、图 4 所示。电镜检测菌株 X19、J3 的形态结果见图 5、图 6。根据菌株 rDNA 的相似性、系统发育树和菌体形态,初步鉴定 X19 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), J3 为异常威克汉姆酵母

(*Wickerhamomyces anomalus*)。

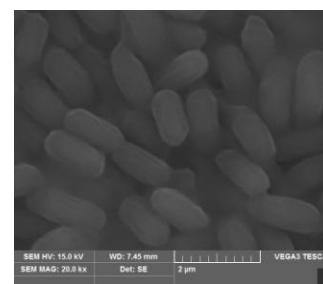


图 5 电镜下菌株 X19 形态图

Fig.5 Electron microscope individual form diagram of the X19 strain

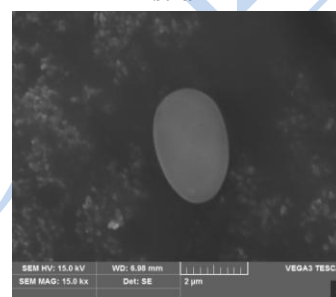


图 6 电镜下菌株 J3 形态图

Fig.6 Electron microscope individual form diagram of the J3 strain

3 结论

3.1 我国的名优大曲酒企业拥有生态酿酒环境及资源优势,环境中栖息着大量的酿酒功能菌群。本研究以浓香型大曲为研究对象,采用稀释平板涂布法从不同阶段的发酵大曲中共分离得到细菌 22 株,酵母 6 株。分别接种至小麦固体培养基进行产香实验,经闻香评价发现编号为 X19 和 J3 的菌株能产生浓郁的香味。进一步采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术对菌株 X19、J3 的发酵产物进行挥发性物质检测,发现这两株菌发酵后产生了种类较为丰富的香味物质,如 2,3,5-三甲基吡嗪、2,3,5,6-四甲基吡嗪、苯乙醇、愈创木酚等。这些物质在浓香型大曲香味物质的组成中占有重要地位。可初步认定菌株 X19 和 J3 为浓香型大曲的产香功能菌。经分子生物学鉴定, X19 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), J3 为异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*)。

3.2 研究表明:从浓香型大曲中筛选获得的产香功能细菌和产香功能酵母,其发酵产生大曲香味成分的能力各不相同,以致产生不同风味的固态发酵产物,这可能是浓香型大曲具有复合曲香的原因之一。本研究采用了单菌发酵实验研究产香菌的挥发性成分及其变化,对于产香菌发酵产生大曲重要香味成分的形成机理和影响因素以及多菌共酵的发酵效果,相互作用

等还有待在后续实验中进行研究。

参考文献

- [1] Chen S, Xu Y. The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of chinese rice wine [J]. *J. Inst. Brew.*, 2010, 116(2): 190-196
- [2] 张宿义,许德富.泸州酒技艺大全[M].北京:中国轻工业出版社,2011
ZHANG Su-yi, XU De-fu. Luzhou-flavor liquor technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2011
- [3] 赵爽,杨春霞,窦岫,等.白酒风味化合物及其风味微生物研究进展[J].酿酒科技,2012,3:85-88
ZHAO Shuang, YANG Chun-xia, DOU Shen, et al. Research progress in liquor flavoring compounds and its flavoring microbes [J]. *Liquor-making Technology*, 2012, 3: 85-88
- [4] SLUIS CV, TRAMPER J, WUFFELS RH. Enhancing and accelerating flavor formation by salt tolerant yeasts in Japanese soy sauce processes [J]. *Trends Food Sci. Tech.*, 2001, 12: 322-327
- [5] 张兰河,贾艳萍,王旭明,等.微生物学实验[M].北京:化学工业出版社,2013
ZHANG Lan-he, JIA Yan-ping, WANG Xu-ming, et al. *Microbiology experiment* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013
- [6] 罗惠波,杨晓东,杨跃寰,等.浓香型大曲中可培养真菌的分离鉴定与系统发育学分析[J].现代食品科技, 2013, 29(9): 2047-2052
LUO Hui-bo, YANG Xiao-dong, YANG Yue-huan, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of culturable fungi in Luzhou-flavor Daqu [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(9): 2047-2052
- [7] ZHANG Rong, WU Qun, XU Yan. Aroma characteristics of Moutaiflavor liquor produced with *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation [J]. *Litters in Applied Microbiology*, 2013, 57(1): 11-18
- [8] Fan W, Shen H, Xu Y. Quantification of volatile compounds in Chinese soy sauce aroma type liquor by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(7): 1187-1198
- [9] UZI R, MEITAL E, CHENI Z, et al. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS-SPME stereoselective GC-MS [J]. *Flavor and Fragrance Journal*, 2009, 25(1): 20-27
- [10] COSENZA G H, WIL LIAMSA S K, JOHNSON A D D, et al. Development and evaluation of a fermented cabrito snack stick products [J]. *Meat Science*, 2003(64): 51-57
- [11] 张春林,敖宗华,炊伟强,等.顶空固相微萃取-气质联用快速测定大曲中的挥发性风味成分[J].食品科学, 2011, 32(10): 137-140
ZHANG Chun-lin, Ao Zong-hua, CHUI Wei-qiang, et al. Rapid analysis of volatile compounds in daqu by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2011, 32(10): 137-140
- [12] Fan W, Xu Y, Zhang Y. Characterization of pyrazines in some Chinese liquors and their approximate concentrations [J]. *J Agr Food Chem*, 2007, 55(24): 9956-9962
- [13] 周健,郭志,明红梅,等.优质中高温浓香型大曲主要香味成分的初步研究[J].酿酒科技,2014,4:11-14
ZHOU Jian, GUO Zhi, MING Hong-mei, et al. Preliminary study of main flavoring components of quality high-temperature & medium-temperature Nong-xiang Daqu [J]. *Liquor-making Technology*, 2014, 4: 11-14
- [14] Guangbin Ye, Shufang Wang, Lijing Jiang, et al. Distribution and diversity of Bacteria and Archaea in marine sediments affected by gas hydrates at Mississippi Canyon in the Gulf of Mexico [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(6): 370-381