

通过外源添加芽孢杆菌提升北方地区高温大曲的品质

何猛超, 郭子璇, 西玉玲, 张德中, 陈玉莲, 李 坤, 井会涵, 王鸿博, 刘海坡, 陈彬彬, 韩兴林

Enhancing the Quality of High-temperature Daqu in Northern China by Adding Exogenous *Bacillus* spores

HE Mengchao, WU Zixuan, XI Yuling, ZHANG Dezhong, CHEN Yulian, LI Kun, JING Huihan, WANG Hongbo, LIU Haipo, CHEN Shanbin, and HAN Xinglin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020198>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于气相离子迁移谱黄酒产地识别的研究

Origin Identification of Yellow Wine Based on Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry

食品工业科技. 2019, 40(22): 273-276,281 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.047>

利用Illumina高通量测序技术筛选低温降解玉米秸秆真菌

Screening of Low-temperature Degrading Corn Stalk Fungi by Illumina High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2020, 41(20): 99-103 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.016>

基于传统培养和高通量测序方法分析羊肉加工过程中的菌群多样性

Analysis of Microbial Diversity in Mutton Processing Based on Traditional Culture and High-Throughput Sequencing

食品工业科技. 2020, 41(9): 95-101,107 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.015>

基于高通量测序分析四川辣椒酱自然发酵过程中细菌群落结构演替规律

Succession of Bacterial Community Structure during Sichuan Chili Sauce Natural Fermentation Analyzed by High-throughput Sequencing

食品工业科技. 2020, 41(24): 81-86 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020262>

基于高通量测序技术分析预包装豆干生产过程中的真菌污染风险

Analysis of Fungal Contamination Risk in Pre-packaged Dried Soybean Curd Processing Line Based on High-throughput Sequencing Technology

食品工业科技. 2021, 42(9): 207-213 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070037>

基于高通量测序解析四川晒醋固态发酵过程中细菌群落变化

Analysis of Bacterial Community Changes in Sichuan Sun Vinegar Solid-state Fermentation Process Based on High-throughput Sequencing

食品工业科技. 2021, 42(19): 135-143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030041>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

何猛超, 郭子璇, 西玉玲, 等. 通过外源添加芽孢杆菌提升北方地区高温大曲的品质 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(1): 145–154. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020198

HE Mengchao, WU Zixuan, XI Yuling, et al. Enhancing the Quality of High-temperature Daqu in Northern China by Adding Exogenous *Bacillus* spores[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(1): 145–154. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020198

· 生物工程 ·

通过外源添加芽孢杆菌提升北方地区 高温大曲的品质

何猛超^{1,2}, 郭子璇¹, 西玉玲³, 张德中³, 陈玉莲³, 李 坤³, 井会涵³, 王鸿博³,
刘海坡⁴, 陈彬彬^{1,2}, 韩兴林^{1,2,*}

- (1. 中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京 100015;
2. 国家酒类品质与安全国际联合研究中心, 北京 100015;
3. 山东秦池酒业(集团)有限公司, 山东潍坊 262600;
4. 中国酒业协会, 北京 100831)

摘 要: 本研究主要是在高温大曲制作过程中添加贝莱斯芽孢杆菌的强化 1 号曲、解淀粉芽孢杆菌的强化 2 号曲和不添加芽孢杆菌的对照曲为研究对象, 以期从微生物角度来提高北方地区高温大曲的质量, 从而提升酱香型白酒的品质。通过理化指标测定、高通量测序技术、气相色谱-离子迁移谱 (GC-IMS) 技术手段分析得出: 强化 2 号曲在糖化力、液化力、发酵力、酯化力理化指标与强化 1 号曲和对照曲存在显著性差异, 同时强化 1 号曲、强化 2 号曲酸度也有所降低; 通过高通量测序及微生物计数结果看强化 2 号曲的芽孢杆菌数能达到 4.2×10^8 CFU/g、丰度占比为 21.68%, 其次是强化 1 号曲芽孢杆菌数为 2.3×10^8 CFU/g、丰度占比为 18.92%, 而对照曲的芽孢杆菌数为 4.4×10^7 CFU/g、丰度占比为 7.48%; GC-IMS 三维谱图可知两种强化曲中的风味物质含量和种类显著高于对照曲, 且根据指纹图谱从强化 2 号曲中鉴定出多种特征性吡嗪类物质。由此可见, 通过外源添加芽孢杆菌后两种强化大曲在理化指标、微生物指标、挥发性风味物质方面有所改进, 进而有效提高了北方地区高温大曲的质量。

关键词: 北方地区, 高温大曲, 理化指标, 高通量测序, 气相色谱-离子迁移谱

中图分类号: TS262.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)01-0145-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020198

本文网刊:



Enhancing the Quality of High-temperature Daqu in Northern China by Adding Exogenous *Bacillus* spores

HE Mengchao^{1,2}, WU Zixuan¹, XI Yuling³, ZHANG Dezhong³, CHEN Yulian³, LI Kun³, JING Huihan³,
WANG Hongbo³, LIU Haipo⁴, CHEN Shanbin^{1,2}, HAN Xinglin^{1,2,*}

- (1. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co., Ltd., Beijing 100015, China;
2. International Joint Research Center of Quality and Safety of Alcoholic Beverages, Beijing 100015, China;
3. Shandong Qinchil Liquor Group Co., Ltd., Weifang 262600, China;
4. China Alcoholic Drinks Association, Beijing 100831, China)

Abstract: In this study, the quality of high-temperature Daqu in Northern China was targeted for enhancement, with the aim of subsequently improving the quality of sauce-flavor liquor. This was achieved by incorporating No.1 *Bacillus velezensis*, No.2 *Bacillus amyloliquefaciens* and the control without exogenous spore addition during the Daqu production process. A comparative analysis of different Daqu samples was conducted using physicochemical index determination, high-

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 国家重点研发计划传统酿造食品智能制造技术研究及示范项目 (2022YFD2101205)。

作者简介: 何猛超 (1993-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 发酵工程, E-mail: hemengchao2021@163.com。

* 通信作者: 韩兴林 (1983-), 男, 博士, 教授级高级工程师, 研究方向: 发酵工程, E-mail: hanian2009@163.com。

throughput sequencing technology, and gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS). The findings revealed that in Fortified Daqu No.2, the physicochemical indices including saccharification, liquefaction, fermentation, and esterification capabilities were significantly elevated compared to Fortified Daqu No.1 and the control Daqu. Additionally, a decrease in Daqu acidity was observed following spore addition. High-throughput sequencing and microbial counts showed that *Bacillus* populations in Fortified Daqu No.2 reached 4.2×10^8 CFU/g, and the abundance ratio was 21.68%. In contrast, Fortified Daqu No.1 contained 2.3×10^8 CFU/g *Bacillus*, and the abundance ratio was 18.92%, while the control Daqu exhibited 4.4×10^7 CFU/g *Bacillus* and the abundance ratio was 7.48%. Analysis of the GC-IMS three-dimensional spectra indicated that both the content and variety of flavor compounds in the two Fortified Daqu samples were markedly higher than those in the control Daqu. Furthermore, multiple characteristic pyrazines were identified in Fortified Daqu No.2 based on fingerprint analysis. In brief, the addition of exogenous *Bacillus subtilis* has improved the physical and chemical indicators, microbial indicators, and volatile flavor compounds of the two types of Fortified Daqu, improving the quality of high-temperature Daqu in Northern China.

Key words: Northern China; high-temperature Daqu; physicochemical index; high-throughput sequencing; gas chromatography-ion mobility spectrometry

中国白酒是最古老的蒸馏酒之一,同时也是中国五千年历史流传下来的宝贵财富,在中国传统文化中扮演着十分重要的角色,深受广大消费者喜爱^[1-2]。贵州高原地区长期的高温、高湿环境为酱香型白酒提供了天然的酿造环境,通过长期不间断的酿造酱香型白酒这里逐渐孕育了多种耐热、耐湿的功能微生物。以茅台酒为代表的酱香型白酒工艺主要包括:高温大曲的制备、高温堆积发酵、高温固态蒸馏、陶坛长期贮存等,其中高温大曲的质量是决定产品品质的关键因素之一^[3-4]。随着近些年来中国白酒所呈现的“酱酒热”势头高居不下,许多茅台地区之外的酒厂也开始酿造酱香型白酒,以山东为代表的北方地区酒厂也在不断提升自身酱香型白酒品质与质量,从高温大曲的制作、酒醅的堆积工艺、酒体贮存与勾调方面不同程度在改进。

目前,行业对北方地区和南方地区所产的高温大曲群落结构研究比较多,也解析出南北方高温大曲在微生物方面的差异同时提出相关改变策略。候强川等^[5]通过从细菌群落结构、功能以及细菌表型等多个维度来对比茅台和湖北尧治河高温大曲之间的差异性,两种曲共有的细菌主要有芽孢杆菌属、嗜热放线菌属、克罗彭斯特菌属等,但这些菌属的相对含量在两种曲里面存在很大差异。何猛超等^[6]通过对比茅台地区与湖南地区高温大曲的细菌群落结构发现,在 Alpha 多样性指数中,茅台地区高温大曲的细菌群落丰富度较高,而湖南地区高温大曲细菌群落多样性较高,两个地区细菌在属水平差异较大;梁慧珍等^[7]通过在高温大曲中筛选高产吡嗪类物质芽孢杆菌,并对大曲进行功能微生物的强化有效提高了高温大曲吡嗪类物质种类;王晓丹等^[8]在高温大曲中筛选地衣芽孢杆菌并添加到窖池中层酒醅中,与对照曲比较,通过 5% 的菌株添加量,四甲基吡嗪提高了 3.30 倍,有效提高了粹沙酒的酱香风格。目前行业内对不同地区的高温大曲研究较多的是分析其微生物群落结构并筛选其功能微生物,以及将功能微生物在酒醅堆积过程中进行应用,但运用不同芽孢杆菌在北方地

区高温大曲制作过程中进行添加并探究其鲁棒性,最终得到适应性较优的菌株在北方地区进行规模化运用来提升高温大曲质量的研究较为少见。

气相色谱-离子迁移谱(gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)是一种近年来新兴的可用于检测复杂基质样品中挥发性和半挥发性有机物的技术^[9-10],其优势在于结合了气相的强分离能力和离子迁移谱的高灵敏度,可在短时间内完成痕量风味物质的分离和响应^[11-12]。该方法不要求真空检测环境、检出限低、样品无需前处理,在食品鉴伪及生产加工过程中的质量监控中的应用日益成熟^[13-14]。ZHANG 等^[15]通过 GC-IMS 检测了新鲜大曲和成熟大曲中挥发性有机化合物组成,结果表明熟化前后高温大曲中挥发性有机化合物存在显著差异。HE 等^[16]采用 GC-IMS 揭示了黑曲霉侵染水稻中挥发性有机化合物的动态变化及其代谢途径,并建立了基于 VOC 分析的真菌侵染程度预测模型。以上研究证明利用 GC-IMS 用于高温大曲中标志性代谢物分析和判别的可行性。

本论文主要是通过将贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌两种芽孢杆菌在高温大曲中进行添加强化,并研究不同芽孢杆菌对大曲发酵能力和风味的影响。旨在提高北方地区高温大曲的质量进而提升酱香型白酒的品质,同时也为除茅台地区以外的酱香产区的高温大曲制作提供建议。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本实验选用的菌株(贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌)均由中国食品发酵研究院有限公司提供;高温大曲均来自山东秦池酒业有限公司,采取九点取样法收集出仓大曲,粉碎过 40 目筛后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测;大曲微生物 DNA 试剂盒 Fast DNA® Spin Kit for Soil;无水乙醇、浓硫酸、氢氧化钠、酚酞、丙酮、2-丁酮、2-戊酮、2-己酮、2-庚酮、2-辛酮、2-壬酮等分析纯,天津市福晨化学试剂厂;乙酸乙酯、己酸乙酯等标准品 色谱纯,美国 Sigma-Aldrich

公司;TAE 缓冲液 北京索莱宝科技有限公司;引物 上海生物工程股份有限公司;DNA Marker Takara;琼脂糖 南京生兴生物技术有限公司;核酸染料 Gengreen 上海赛百盛有限公司;土壤 DNA 提取试剂盒(E.Z.N.A. Soil DNA Kit) Omega Bio-Tek 公司;所用的细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基,霉菌培养基为马铃薯葡萄糖(PDA)培养基。

CP1502 电子天平 上海奥豪斯仪器有限公司;HH-S6A 电热恒温水浴锅 北京利伟永兴仪器有限公司;PX2 型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪 上海赛默生物科技有限公司;DYY5 稳压电泳仪 北京六一仪器厂;Gel Image System Tanon 1600 凝胶成像仪 上海天能科技有限公司;Illumina MiSeq 高通量测序平台 美国 Illumina 公司;FlavourSpec®1H1-00053 型气相离子迁移谱;配有 LAV、Reporter、Gallery Plot 插件以及内置的 GC×IMS Library Search NIST 数据库和 IMS 数据库 德国 G.A.S.公司;CTC-PAL 自动进样装置 瑞士 CTC Analytics AG 公司;WAX 毛细管柱(30 m×0.53 mm, 1 μm) 美国 RESTEK 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芽孢杆菌在强化大曲中的添加方法 将提供的两株高产吡嗪芽孢杆菌(贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌)用牛肉膏蛋白胨液体培养基活化并在 37 ℃、180 r/min 培养 1 d 至 10^8 CFU/mL。每种芽孢杆菌的添加量为 10 L 种子液添加到 10 t 生曲中,添加时间为在高温大曲拌料时和水进行混合后加入,每种芽孢杆菌各做 5 房作为实验曲,以不添加菌株作为空白对照曲,每个曲房的长×宽×高规格为 9.5 m×3.8 m×4.5 m,地面面积约为 36 m²,待出仓后采用五点取样法即房子的四点取一块,中心点取一块进行取样分析。将添加贝莱斯芽孢杆菌的高温大曲简称强化 1 号曲,将添加解淀粉芽孢杆菌的高温大曲简称为强化 2 号曲,不添加芽孢杆菌的简称为对照曲。

1.2.2 高温大曲中芽孢杆菌、霉菌计数 芽孢杆菌计数方法:准确称取 10 g 样品,加入装有 90 mL 无菌生理盐水(0.9% NaCl 溶液)的三角瓶中,振荡均匀,在 80 ℃ 水浴锅下放置 15 min,充分去除掉其他菌的干扰,再取 1 mL 加入无菌水 9 mL,以此类推,根据实际情况逐级稀释,一般稀释至 10^{-4} ~ 10^{-6} 。

霉菌计数方法:准确称取 10 g 样品,置入装有 90 mL 无菌生理盐水(0.9% NaCl 溶液)的三角瓶中,振荡均匀,在 30 ℃ 条件下放置 30 min,再取 1 mL 加入无菌水 9 mL,以此类推,根据实际情况逐级稀释,一般稀释至 10^{-4} ~ 10^{-6} 。

分别取 100 μL 稀释液在牛肉膏蛋白胨培养基和马铃薯葡萄糖培养基上进行涂布,芽孢杆菌在 37 ℃ 恒温恒湿培养箱培养 16~24 h,霉菌在 35 ℃ 恒温恒湿培养箱培养 24~36 h 进行菌落数的计算^[17]。

1.2.3 大曲理化指标检测 不同类型高温大曲的理

化指标(水分、糖化力、液化力、酯化力、发酵力、酸度等)依据 QB/T 4257—2011《酿酒大曲通用分析方法》测定^[18]。

1.2.4 大曲微生物群落组成检测

1.2.4.1 总 DNA 的提取 称取不同类型高温大曲 5.0 g 用液氮速冻后迅速研磨。大曲总 DNA 提取方法按照土壤 DNA 提取试剂盒操作说明书^[18-19]。为了保证所提取的基因组的浓度及纯度对其进行 PCR 扩增及产物纯化,对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区进行扩增,所用引物为 338F/806R(5-CTCTCTA-CGGGAGGCAGCA-3/5-GGACTACHVGGGTWT-CTAAT-3),扩增体系为:DNA 模板 10 ng, 10×PCR 缓冲液 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs mix 2 μL, 5 U/μL DNA 聚合酶 0.4 μL, 5 μmol/L 正向和反向引物各 0.8 μL, 体系用 ddH₂O 补充至 20 μL。扩增条件为 95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 35 个循环, 72 ℃ 10 min。对真菌的内部转录间隔区(ITS1)进行扩增,所用引物为 ITS5F/ITS1R (5-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3/5-GCTG-CGTTCTTCATCGATGC-3),扩增体系为:DNA 模板 10 ng, 10×PCR 缓冲液 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs mix 2 μL, 5 U/μL DNA 聚合酶 0.4 μL, 5 μmol/L 正向和反向引物各 0.8 μL, 体系用 ddH₂O 补充至 20 μL。扩增条件为 95 ℃ 预变性 6 min, 接着进入循环:94 ℃ 变性 45 s, 52 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 120 s, 共循环 35 次, 72 ℃ 终延伸 10 min。扩增后用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4.2 高通量测序 将检测合格样品送往苏州帕诺米克生物医药科技有限公司,通过高通量测序(Illumina Miseq PE250)平台进行高通量测序。

1.2.5 大曲挥发性有机物的检测

1.2.5.1 气相色谱-离子迁移谱分析条件 大曲粉末混匀后称取 1 g 于 20 mL 顶空进样瓶中,封盖备用,每个样品设置 2 次平行。

进样条件:顶空进样体积 500 μL;孵育时间 10 min;孵育温度 50 ℃;孵育转速 500 r/min;高纯度氮气(≥99.999%)为载气;进样针温度 85 ℃;清洗时间 0.5 min。

GC 分析条件:WAX 30 m ID: 0.53 mm 石英毛细管柱,柱温 60 ℃;载气:高纯度氮气(≥99.999%);载气流速程序:初始 2.0 mL/min,保持 2 min, 10 min 内线性增至 10 mL/min, 20 min 内线性增至 100 mL/min,运行时间 30 min。

IMS 分析条件:漂移管长度 98 mm;管内线性电压 500 V/cm;漂移管温度 45 ℃;漂移气为高纯度氮气(≥99.999%);漂移气流速 150 mL/min;放射源为 β 射线(氚, 3H);模式:正离子。

物质定性分析方法:GC-IMS 检测结果为三维信号吸收峰图谱,采用仪器配套的 Vocal 软件结合其配置的 NIST 气相保留指数数据库和 G.A.S 自建 IMS

迁移时间数据库对二维谱图中物质进行定性分析。

1.3 数据处理

采用 Reporter、Gallery Plot 插件生成二维、三维峰谱图和有机物指纹图谱并进行样品间的差异对比;采用 The Unscrambler X 10.3 进行 PCA 分析并制图;采用 SIMCA 14.1 进行正交偏最小二乘回归分析。

2 结果与分析

2.1 强化大曲理化指标分析

酱香型高温大曲的理化指标中的水分、酸度、液化力和糖化力反映酱香型大曲是否成熟;发酵力和酯化力是酱香型大曲的生化性能,反映了酱香型高温大曲品质。

从表 1 中数据结果可以看出,试验组与对照曲的理化指标存在差异。其中,大曲的水分是衡量大曲质量的关键指标之一,三种高温大曲的水分均在 11% 左右,总体上符合低于 13% 的酱香型高温大曲的标准。

液化力和糖化力的高低与大曲中微生物的生长繁殖有一定的关联性,尤其是霉菌。测得的三种大曲的糖化力和液化力中,强化 1 号曲和强化 2 号曲与对照曲存在显著性差异($P<0.05$),可能原因是通过添加一定量的芽孢杆菌,促进了霉菌的数量,进而提高了大曲的糖化力和液化力。

酯化力、发酵力作为高温大曲生化功能的动态指标,目前还没有标准对高温大曲的两个指标作出明确规定。三种大曲的酯化力和发酵力中,强化 2 号曲与强化 1 号曲、对照曲存在显著性差异($P<0.05$),可见芽孢杆菌的添加对于大曲酯化力和发酵力也有一定的影响,尤其是对强化 2 号曲影响较大,因为酱香型高温大曲的发酵力、酯化力与微生物的种类、数量和代谢产物密切相关,特别是产酯酵母、酒精酵母,强化 2 号曲中可能酵母菌属的占比稍高而使酯化力、发酵力高于强化 1 号曲及对照曲。

大曲的酸度也是衡量大曲质量的重要指标。三种大曲中对照曲的酸度最高为 1.39 mmol/10 g,其次是添加强化 2 号曲的酸度为 1.33 mmol/10 g,添加强化 1 号曲的酸度最低为 1.21 mmol/10 g,通过添加一

定量的芽孢杆菌有效地提高了高温大曲的酶活,并通过提高原料的利用率进而降低了大曲的酸度。

2.2 强化大曲微生物指标分析

2.2.1 不同高温大曲微生物菌落计数结果 从表 2 可以看出,通过添加一定比例的不同芽孢杆菌,三种高温大曲中强化 1 号曲、强化 2 号曲与对照曲的芽孢杆菌数、霉菌数之间存在显著性差异($P<0.05$)。从实验结果可以看出通过外源添加一定量的芽孢杆菌数,能够有效增加北方地区酒厂的高温大曲的芽孢杆菌数,在芽孢杆菌的数量级上能初步达到茅台地区的水平。其次,通过外源添加芽孢杆菌后,能够影响其他微生物的群落结构,本实验以霉菌的变化作为参考,因为在高温大曲制作过程中由于制作温度较高,大多数酵母不耐受高温都会死掉,只有耐高温的细菌尤其是芽孢杆菌,还有就是霉菌能够存活下来,所以以霉菌作为参考。可以看出,强化 1 号曲的霉菌数最高,能达到 1.3×10^8 CFU/g 左右,其次是强化 2 号曲霉菌数,能达到 1.1×10^8 CFU/g 左右,而对照曲的霉菌数最低为 1.0×10^7 CFU/g 左右。

2.2.2 高温大曲微生物群落结构分析

2.2.2.1 高温大曲细菌落结构分析 三种高温大曲中的细菌种类及相对丰度在属水平上的分析结果见图 1。

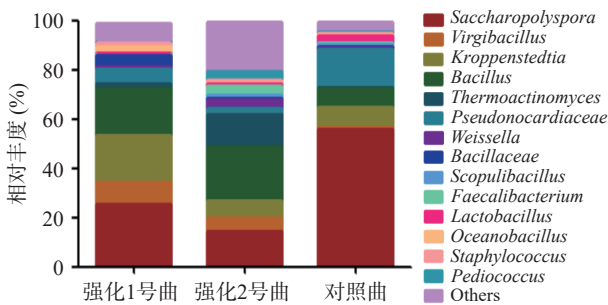


图 1 不同高温大曲细菌属水平微生物群落结构
Fig.1 Bacteria structure of different high temperature Daqu at the genus level

不同高温大曲的细菌种类、群落丰度等方面是不同的。通过添加不同菌种的高温大曲与对照高温

表 1 不同高温大曲理化指标分析

Table 1 Analysis of physical and chemical indexes of Daqu at different high temperature						
组别	水分(%)	酸度(mmol/10 g)	糖化力(U)	液化力(U)	酯化力(U)	发酵力(U)
强化1号曲	11±0.02	1.21±0.17*	102±10.40*	0.34±0.03*	35.73±3.20	0.24±0.01*
强化2号曲	12±0.02 [#]	1.33±0.95 [#]	138±13.50 [#]	0.61±0.04 [#]	45.44±4.40 [#]	0.37±0.03 [#]
对照曲	11±0.01	1.39±0.25	30±8.90	0.23±0.03	35.93±2.90	0.29±0.01

注: *表示与对照曲进行比较;[#]表示2号曲与1号曲比较, $P<0.05$ 具有显著差异(用*或[#]表示);表2同。

表 2 不同高温大曲微生物菌落计数

Table 2 Analysis of microbial colony number of Daqu at different high temperature			
组别	强化1号曲	强化2号曲	对照曲
芽孢杆菌数($\times 10^8$ CFU/g)	2.3±0.078*	4.2±0.064 [#]	0.44±0.068
霉菌数($\times 10^8$ CFU/g)	1.3±0.023*	1.1±0.031 [#]	0.10±0.025

大曲在细菌属水平上(>1%)见表 3。

表 3 不同高温大曲属水平主要细菌(%)
Table 3 Main bacteria at different levels of high temperature Daqu (%)

细菌名称	强化1号曲	强化2号曲	对照曲
糖多孢菌属(<i>Saccharopolyspora</i>)	25.11	14.17	55.97
枝芽孢杆菌属(<i>Virgibacillus</i>)	9.27	5.69	—
克罗彭斯特菌属(<i>Kroppenstedtia</i>)	19.14	7.07	8.03
芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)	18.92	21.68	7.48
高温放线菌属(<i>Thermoactinomyces</i>)	1.84	13.22	0.46
假诺卡氏菌属(<i>Pseudonocardia</i>)	6.07	2.29	15.27
威斯氏菌属(<i>Weissella</i>)	1.19	3.71	0.69
乳杆菌属(<i>Lactobacillus</i>)	0.68	1.04	3.01
海洋杆菌属(<i>Oceanobacillus</i>)	2.80	—	0.70
葡萄球菌属(<i>Staphylococcus</i>)	1.32	—	0.69

三种高温大曲的细菌在属水平上的丰度和群落结构是各不相同的。从图 1 和表 3 可以看出三种高温大曲的优势细菌属(>1%)的主要微生物有糖多孢菌属、枝芽孢杆菌属、克罗彭斯特菌属、芽孢杆菌属、高温放线菌属、假诺卡氏菌属、威斯氏菌属、乳杆菌属、海洋杆菌属、葡萄球菌属等,这也是酱香型高温大曲常见的细菌群落结构。其中强化 1 号曲中的芽孢杆菌属占比为 18.92%,强化 2 号曲中的芽孢杆菌属占比为 21.68%,而对照曲中的芽孢杆菌属占比仅为 7.48%

从三种高温大曲的微生物群落结构芽孢杆菌属丰度占比可以看出,强化 1 号曲、强化 2 号曲中的芽孢杆菌的占比明显高于对照曲,该结果与芽孢杆菌数的计数结果相一致,可见通过添加一定比例的芽孢杆菌能够增加北方地区酒厂自制高温大曲的芽孢杆菌属的数量及丰度占比。

2.2.2.2 高温大曲真菌落结构分析 三种高温大曲中的真菌种类及相对丰度在属水平上的分析结果见图 2。

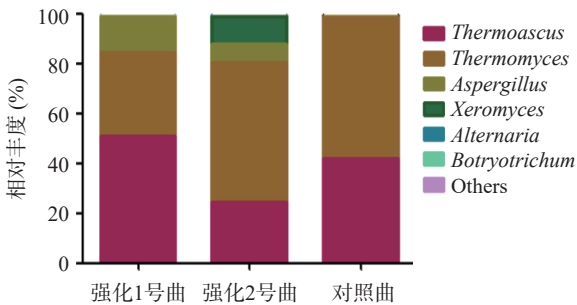


图 2 不同高温大曲在属水平上的真菌群落结构
Fig.2 Fungus structure of different high temperature Daqu at the genus level

不同高温大曲的真菌种类、群落丰度等方面是不同的。通过添加不同菌种的高温大曲与对照高温大曲在真菌属水平上(>1%)见表 4。

通过外源添加一定量的芽孢杆菌后,不仅对高温大曲的细菌群落结构有扰动现象,且同时影响了真菌的群落结构。从图 2 和表 4 可以看出,三种高温

表 4 不同高温大曲属水平主要真菌(%)

Table 4 Main fungus at different levels of high temperature Daqu (%)

真菌名称	强化1号曲	强化2号曲	对照曲
热子囊菌属(<i>Thermoascus</i>)	50.88	24.45	41.89
嗜热真菌属(<i>Thermomyces</i>)	33.43	55.90	56.63
曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	14.33	7.32	—

大曲的优势真菌属(>1%)的微生物主要为热子囊菌属、嗜热真菌属、曲霉属。其中强化 1 号曲的优势真菌属为热子囊菌属,丰度占比为 50.88%,而强化 2 号曲和对照曲的优势真菌属为嗜热真菌属,丰度占比分别为 55.90%、56.63%。通过在高温大曲制作过程中添加芽孢杆菌后,真菌群落结构也发生变化,且添加不同种类的芽孢杆菌对真菌的群落结构是不同的,强化 2 号曲中的嗜热真菌属水平上与对照曲的占比相似,但强化 1 号曲中的嗜热真菌属占比降低,曲霉增加,从这里可以看出添加解淀粉芽孢杆菌后对高温大曲的真菌群落中优势真菌属的丰度扰动较小。

从表 2、表 3、表 4 结果可以看出,在添加贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌后对原有高温大曲的微生物群落结构发生改变且芽孢杆菌属的数量及丰度占比也得到了明显增加,其他细菌、真菌在群落丰富度上发生了微小的变动。此外,通过芽孢杆菌计数、高通量数据可以看出,强化 2 号曲中的芽孢杆菌数和丰度明显比强化 1 号曲的高,所以可以初步判断通过添加一定量的解淀粉芽孢杆菌后更适合在北方地区的高温大曲中适应性驯化繁殖。

2.3 强化大曲挥发性风味物质分析

2.3.1 添加不同菌大曲 GC-IMS 谱图分析 图 3 和图 4 分别为运用仪器配置的 Reporter 插件分析获得的不同大曲 GC-IMS 三维谱图和二维谱图,图中的横坐标代表离子迁移时间,纵坐标代表气相保留时间,垂直方向高度代表对应挥发性物质的离子吸收峰强度。从图 3 可直观看出大曲挥发性组分在保留时间 400~1800 s 范围内存在明显差异,由于三维图谱分析不便,因此取俯视图(图 4)进行差异对比。以红色竖线为反应离子峰(RIP 峰),RIP 峰右侧的每个点代表 1 种挥发性有机物,信号峰越趋近于白色表示浓度越小,红色表示浓度较大,颜色越深表示浓度越大。图 4 中最左侧对照曲对应二维图中的信号峰数

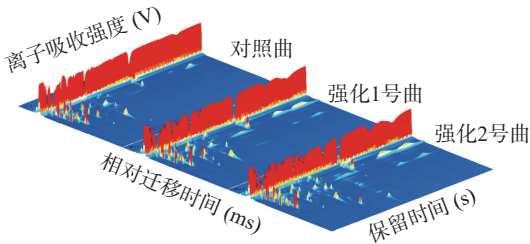


图 3 不同高温大曲的 GC-IMS 三维谱图
Fig.3 Three dimensional spectrum of GC-IMS of different high temperature Daqu

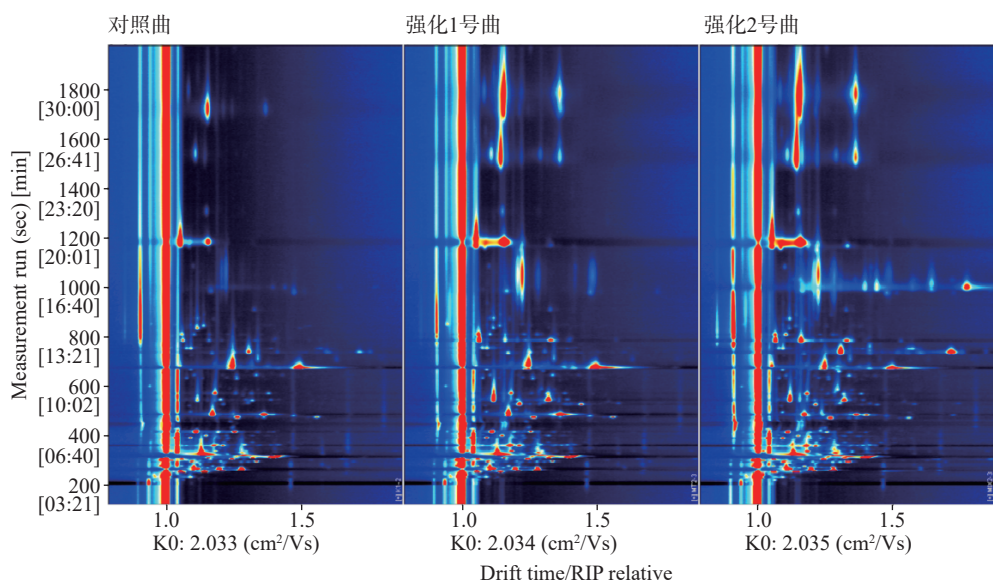


图 4 不同高温大曲中挥发性物质的 GC-IMS 谱图

Fig.4 GC-IMS patterns of volatile compounds in different high temperature Daqu

量较少,且颜色较浅,而右侧两种强化曲中的信号峰数量和总体强度相比于对照曲均有显著增加,证明添加功能菌后的高温大曲中挥发性代谢物更加丰富。

2.3.2 挥发性有机物定性分析 表 5 为利用 GC-IMS 分析大曲中挥发性有机物的定性结果,根据分析软件中自带的 NIST 数据库和德国 G.A.S 公司建立的 IMS 迁移时间数据库,对谱图中的有机物信号峰进行准确的二维定性分析。表中化合物名称后缀的 M、D 和 P 分别代表有机物单体、二聚体和三聚体。从不同大曲样品中共鉴定出共 73 个信号吸收峰,56 种挥发性有机物,主要包括醇类、酮类、醛类、酯

类、吡嗪类及其他类别。其中吡嗪类物质 7 种,醇类 13 种,酮类 12 种,醛类 8 种,酯类 9 种和其他类 7 种。其中吡嗪类物质作为酱香型白酒的关键香味物质同时也是白酒中的健康因子,为酒体提供了馥郁的烘焙和坚果香气^[20-21]。丙醛等醛类物质的气味阈值较低,可为发酵食品提供特殊风味^[22]。同时检出的酯类物质作为白酒中重要的风味组分,有助于形成酒体中柔美的花果香气^[23]。为了观察不同种大曲中风味组分的差异,利用 Vocal 软件中的 Gallery Plot 插件生成指纹图谱,对各样品图谱中同个位置的信号峰进行对比。

表 5 GC-IMS 分析高温大曲中的挥发性有机物

Table 5 Analysis of volatile components in high temperature Daqu by GC-IMS

序号	化合物	CAS号	分子式	相对分子量	保留指数	保留时间(s)	相对迁移时间(ms)
1	2-乙酰基吡嗪	C22047252	C ₆ H ₆ N ₂ O	122.1	1620.4	1529.107	1.14252
2	苯甲醛	C100527	C ₇ H ₆ O	106.1	1544.7	1310.435	1.15101
3	乙酸-M	C64197	C ₂ H ₄ O ₂	60.1	1498	1191.367	1.04799
4	乙酸-D	C64197	C ₂ H ₄ O ₂	60.1	1494.3	1182.484	1.15251
5	糠醛	C98011	C ₅ H ₄ O ₂	96.1	1489.4	1170.64	1.33187
6	2-乙基-3-甲基吡嗪	C15707230	C ₇ H ₁₀ N ₂	122.2	1404.9	985.584	1.16541
7	3-辛醇-M	C589980	C ₈ H ₁₈ O	130.2	1415.9	1007.791	1.39639
8	仲辛醇	C123966	C ₈ H ₁₈ O	130.2	1416.6	1009.271	1.44155
9	2-乙基-6-甲基吡嗪	C13925036	C ₇ H ₁₀ N ₂	122.2	1418	1012.232	1.64543
10	3-辛醇-D	C589980	C ₈ H ₁₈ O	130.2	1413.7	1003.35	1.77447
11	(E)-3-己烯-1-醇	C928972	C ₆ H ₁₂ O	100.2	1367.4	913.042	1.25057
12	正己醇	C111273	C ₆ H ₁₄ O	102.2	1366.7	911.723	1.32582
13	2,3-二甲基吡嗪	C123320	C ₆ H ₈ N ₂	108.1	1323.7	835.231	1.11227
14	2,5-二甲基吡嗪	C5910894	C ₆ H ₈ N ₂	108.1	1347.4	876.477	1.11696
15	2,6-二甲基吡嗪	C108509	C ₆ H ₈ N ₂	108.1	1330	845.971	1.13912
16	3-羟基-2-丁酮	C513860	C ₄ H ₈ O ₂	88.1	1310.1	812.404	1.06038
17	环己酮	C108941	C ₆ H ₁₀ O	98.1	1296.8	790.585	1.15996
18	仲辛酮	C111137	C ₈ H ₁₆ O	128.2	1294.9	787.648	1.33055
19	羟丙酮	C116096	C ₃ H ₆ O ₂	74.1	1309.4	811.145	1.22943
20	2-甲基吡嗪-M	C109080	C ₅ H ₆ N ₂	94.1	1273.7	754.918	1.07753
21	3-辛酮-M	C106683	C ₈ H ₁₆ O	128.2	1265.3	742.457	1.30668
22	乙酸己酯	C142927	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.2	1265.3	742.457	1.41523
23	3-辛酮-D	C106683	C ₈ H ₁₆ O	128.2	1264.4	741.019	1.71942
24	1-戊醇	C71410	C ₅ H ₁₂ O	88.1	1262.4	738.144	1.25308
25	异戊醇-M	C123513	C ₅ H ₁₂ O	88.1	1224.9	684.947	1.24638

续表 5

序号	化合物	CAS号	分子式	相对分子质量	保留指数	保留时间(s)	相对迁移时间(ms)
26	异戊醇-D	C123513	C ₅ H ₁₂ O	88.1	1222.1	681.113	1.49429
27	异戊烯醛	C107868	C ₅ H ₈ O	84.1	1212.1	667.694	1.09228
28	2-甲基丁酸丁酯	C15706737	C ₉ H ₁₈ O ₂	158.2	1222.1	681.113	1.37503
29	环戊酮-M	C120923	C ₅ H ₈ O	84.1	1194.5	644.689	1.103
30	环戊酮-D	C120923	C ₅ H ₈ O	84.1	1194.5	644.689	1.33617
31	2,5-二甲基噻吩	C638028	C ₆ H ₈ S	112.2	1188	633.187	1.07753
32	2-庚酮	C110430	C ₇ H ₁₄ O	114.2	1187.5	632.229	1.26112
33	月桂烯	C123353	C ₁₀ H ₁₆	136.2	1165.6	589.668	1.29549
34	叔丁醇-M	C71363	C ₄ H ₁₀ O	74.1	1156.6	573	1.18266
35	叔丁醇-D	C71363	C ₄ H ₁₀ O	74.1	1156.4	572.785	1.38036
36	硫丙烯	C592881	C ₆ H ₁₀ S	114.2	1144.4	551.296	1.11643
37	乙酸异戊酯	C123922	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.2	1133.6	532.601	1.30209
38	4-甲基-3戊烯-2-酮	C141797	C ₆ H ₁₀ O	98.1	1131.7	529.377	1.44258
39	异丁醇-M	C78831	C ₄ H ₁₀ O	74.1	1106.1	488.119	1.16962
40	异丁醇-D	C78831	C ₄ H ₁₀ O	74.1	1106.4	488.549	1.36732
41	β-蒎烯	C127913	C ₁₀ H ₁₆	136.2	1104.1	484.896	1.72659
42	正己醛-M	C66251	C ₆ H ₁₂ O	100.2	1097.4	474.796	1.26596
43	正己醛-D	C66251	C ₆ H ₁₂ O	100.2	1098.3	476.085	1.561
44	正丙醇-M	C71238	C ₃ H ₈ O	60.1	1051.3	419.023	1.11074
45	正丙醇-D	C71238	C ₃ H ₈ O	60.1	1050.6	418.221	1.25412
46	仲丁醇-M	C78922	C ₄ H ₁₀ O	74.1	1036.2	402.175	1.14918
47	硫代呋喃	C110021	C ₄ H ₄ S	84.1	1026.2	391.432	1.09083
48	仲丁醇-D	C78922	C ₄ H ₁₀ O	74.1	1035.1	400.971	1.32328
49	2,3-戊二酮	C600146	C ₅ H ₈ O ₂	100.1	1036	401.956	1.22324
50	α-蒎烯	C80568	C ₁₀ H ₁₆	136.2	1010.8	375.426	1.21731
51	丁酸甲酯	C623427	C ₅ H ₁₀ O ₂	102.1	994.1	359.859	1.1488
52	2,3-丁二酮	C431038	C ₄ H ₆ O ₂	86.1	997.2	362.052	1.17844
53	2-戊酮-D	C107879	C ₅ H ₁₀ O	86.1	999.7	364.244	1.37212
54	正戊醛	C110623	C ₅ H ₁₀ O	86.1	963.3	339.25	1.18371
55	乙醇	C64175	C ₂ H ₆ O	46.1	946.5	328.506	1.13299
56	异戊醛-D	C590863	C ₅ H ₁₀ O	86.1	925.5	315.57	1.40176
57	叔丁醇	C75650	C ₄ H ₁₀ O	74.1	916.8	310.308	1.32337
58	异戊醛-M	C590863	C ₅ H ₁₀ O	86.1	917.5	310.747	1.15736
59	2-丁酮-D	C78933	C ₄ H ₈ O	72.1	910.8	306.8	1.243
60	2-丁酮-M	C78933	C ₄ H ₈ O	72.1	909	305.704	1.05987
61	乙酸乙酯-M	C141786	C ₄ H ₈ O ₂	88.1	893.4	296.714	1.09478
62	乙酸乙酯-D	C141786	C ₄ H ₈ O ₂	88.1	893	296.495	1.33654
63	异丙醇	C67630	C ₃ H ₈ O	60.1	942.7	326.094	1.22785
64	正丁醛-M	C123728	C ₄ H ₈ O	72.1	837.6	266.601	1.10682
65	乙酸甲酯	C123386	C ₃ H ₆ O	58.1	816	255.829	1.05687
66	正丁醛-D	C123386	C ₃ H ₆ O	58.1	816	255.829	1.05687
67	丙醛-M	C123386	C ₃ H ₆ O	58.1	816	255.829	1.05687
68	丙醛-D	C123386	C ₃ H ₆ O	58.1	817.8	256.67	1.14249
69	丁酸乙酯	C2639636	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.3	1402	979.662	1.48155
70	2-甲基吡嗪-D	C109080	C ₅ H ₆ N ₂	94.1	1272.7	753.48	1.38977
71	乙酸丁酯	C123864	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.2	1086.7	461.145	1.23974
72	2-戊酮-M	C107879	C ₅ H ₁₀ O	86.1	1000.1	364.683	1.12179
73	丙烯酸乙酯	C140885	C ₅ H ₈ O ₂	100.1	999.7	364.244	1.41494

2.3.3 挥发性有机物指纹图谱 图 5 从上至下为对照曲、强化 1 号曲和强化 2 号曲的挥发性有机物指纹图谱, 每一行显示二维图谱中的 94 个信号吸收峰, 每个样品平行 2 次, 每一列表示同一物质在不同样

品中的信号峰。从图 5 中可以看出不同大曲之间的挥发性风味成分含量和组成均存在显著差异。红色 A 框内选中的是强化 2 号曲中的特征性代谢物, 包括 2-甲基吡嗪、2-乙基-3-甲基吡嗪、2-乙基-6-甲基

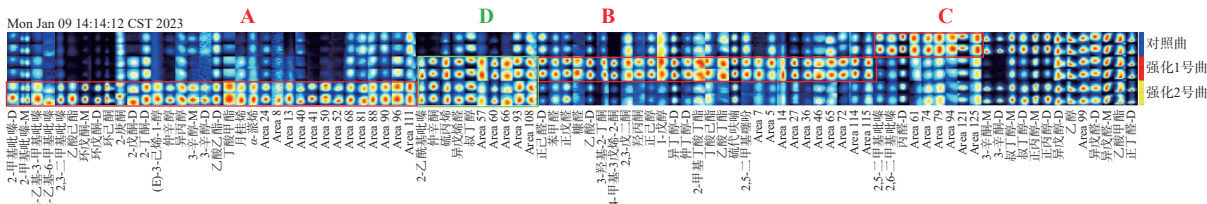


图 5 不同高温大曲中挥发性有机物指纹图谱

Fig.5 Gallery plot fingerprint of volatile compounds in different high temperature Daqu

吡嗪、2,3-二甲基吡嗪、乙酸己酯、环戊酮、环己酮、仲辛醇、异丙醇等。B 区域中的正戊醛、正己醛、苯甲醛、糠醛、2,3-戊二酮、羟丙酮、正己醇、1-戊醇、丁酸己酯、乙酸丁酯等化合物在强化 1 号曲中的含量显著高于 2 号曲和对照曲。C 区域框选了在对照曲中信号最强的物质,包括 2,5-二甲基吡嗪、2,6-二甲基吡嗪和丙醛二聚体。绿色框选中的 D 区域为同时在两种强化曲中含量显著较高的信号区域,包括 2-乙酰基吡嗪、仲辛酮、叔丁醇、硫丙烯和异戊烯醛。

大曲自身含有的挥发性有机物是多种微生物代谢反应的结果,在很大程度上受到复杂微生物群落的影响。由图 5 可知,强化 2 号曲的特征性代谢物与对照曲和 1 号曲相比含有更加丰富的吡嗪类物质,表明向相同基质大曲中外源添加一定量的芽孢杆菌后,解淀粉芽孢杆菌在北方地区环境下表现出更强的

产吡嗪能力。根据 GC-IMS 指纹图谱分析结果,添加解淀粉芽孢杆菌的强化 2 号曲在北方条件下培养成熟后呈现出更丰富的风味轮廓,其中投产前大曲自身含有的多种吡嗪是白酒中重要的呈味组分同时也是近年来备受关注的健康因子。

2.3.4 主成分分析与偏最小二乘回归分析 图 6a 为根据指纹图谱中定性出物质的特征信号区域的吸收峰体积进行主成分分析得分图,结果显示不同曲样本组间分离明显,前两个主成分的总分离贡献率达到 99%,其中 PC1 和 PC2 的值分别为 72% 和 27%,基于 GC-IMS 得到的代谢物信号吸收峰可以对不同强化大曲进行有效聚类。

正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)结合了正交信号^[24]和 PLS-DA 来筛选差异变量,是一种有监督的判别分析统计方法。图 6b 为 OPLS-DA 的 Biplot

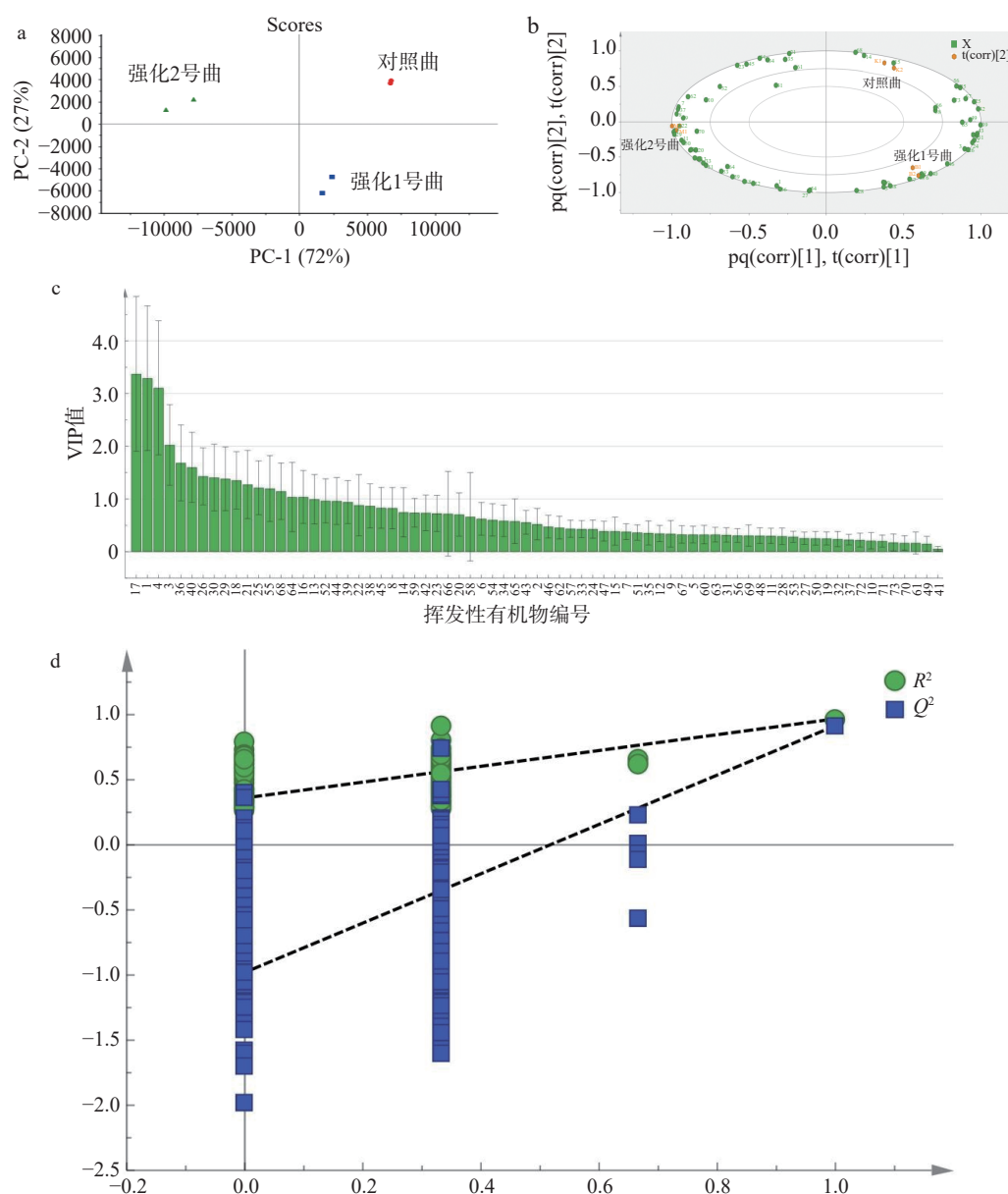


图 6 三种高温大曲的主成分分析和正交偏最小二乘结果

Fig.6 Principal component analysis and OPLS-DA of three different high temperature Daqu
注: a.主成分得分图; b. OPLS-DA 分析 Biplot 图; c.各挥发性成分 VIP 值图; d.置换检验图。

图,结合了得分和载荷信息,位于观测值附近的变量在对应样品中含量较高。从图中可知 14(2,5-二甲基吡嗪)、15(2,6-二甲基吡嗪)和 68(丙醛)对于区分对照曲有较大贡献;4(乙酸-D)、16(3-羟基-2-丁酮)、19(羟丙酮)、40(异丁醇-D)、47(硫代呋喃)和 48(仲丁醇-D)是强化 1 号曲中的特征性代谢物;8(仲辛醇)、9(2-乙基-6-甲基吡嗪)、11((E)-3-己烯-1-醇)、13(2,3-二甲基吡嗪)、17(3-羟基-2-丁酮)、22(乙酸己酯)和 29(环戊酮)是分离强化 2 号曲的关键挥发性有机物。Biplot 图所得结果与指纹图谱基本保持一致。

变量重要性投影值(variable importance in project, VIP)可以反映各组分对模型分类的贡献程度^[25],将 VIP>1 作为筛选标准,各化合物的 VIP 值结果见图 6c。筛选出 13 种 VIP 值大于 1 的对分类贡献度较大的代谢物,按照 VIP 值由高到低排序包括环己酮、2-乙酰基吡嗪、乙酸、硫丙烯、异丁醇、异戊醇、环戊酮、仲辛酮、3-辛酮、乙醇、丙醛、正丁醛和 3-羟基-2-丁酮,其中环己酮、环戊酮、仲辛酮、硫丙烯和 2-乙酰基吡嗪均在强化 2 号曲中含量较高。此外本研究还进行了 OPLS-DA 模型验证(置换检验 n=200),如图 6d 所示。 $R^2=0.561$ 、 $Q^2=-1.23$,右侧的 R^2 和 Q^2 均高于左侧,且 Q^2 与 y 轴交于负半轴,说明该模型可靠不存在过拟合现象。

3 结论

通过本研究可以看出在制作高温大曲时添加芽孢杆菌是提升北方酱酒产区高温大曲质量一种有效策略。本试验主要是添加一定比例的贝莱斯芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌两种来自茅台地区高温大曲的优势芽孢杆菌后,分析结果表明在高温大曲中微生物系统鲁棒性的情况存在下,从整体上看强化 1 号曲、强化 2 号曲在各项指标(理化指标、微生物指标、挥发性有机物)都明显优于对照曲,其次是添加解淀粉芽孢杆菌的强化 2 号曲在理化指标、芽孢杆菌数及丰度占比、风味物质组成的方面都明显优于添加贝莱斯芽孢杆菌的强化 1 号曲及对照曲;利用 GC-IMS 对添加不同芽孢杆菌大曲粉末进行分析检测,共鉴定出 56 种挥发性有机物,其中包含 7 种吡嗪类物质并根据指纹图谱判断强化 2 号曲中吡嗪类物质种类和含量显著高于强化 1 号曲和对照曲,同时也可以看出解淀粉芽孢杆菌更加适合在除茅台地区之外的北方酱香白酒产区繁殖生长,这对于提升北方地区自制高温大曲的质量及白酒品质的提升具有一定的参考价值。

参考文献

[1] JIN G Y, ZHU Y, XU Y, et al. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. Trends in Food Science and Technology, 2017, 63(4): 18–28.
[2] 丁鹏飞, 张杰, 李文达, 等. 复合麸曲在白酒生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2019, 306(12): 40–43. [DING F P, ZHANG J, LI W D, et al. Application of compound Fuqu in Baijiu production[J].

Liquor-Making Science and Technology, 2019, 306(12): 40–43.]
[3] FAN G S, FU Z L, SUN B G, et al. Roles of aging in the production of light-flavored Daqu[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2018, 127(3): 309–317.
[4] DU H, WANG X, ZHANG Y, et al. Exploring the impacts of raw materials and environments on the microbiota in Chinese Daqu starter[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 297: 32–40.
[5] 侯强川, 王玉荣, 王文平, 等. 茅台和尧治河高温大曲细菌群落结构差异及功能预测[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(1): 36–44. [HOU Q C, WANG Y R, WANG W P, et al. Difference of bacterial community structure and functional prediction in high-temperature Daqu of Maotai and Yaozhihe[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(1): 36–44.]
[6] 何猛超, 罗家顺, 罗轲, 等. 基于高通量技术对比分析南洲大曲与茅台大曲的细菌多样性[J]. 酿酒科技, 2022, 340(10): 17–21. [HE M C, LUO J S, LUO K, et al. Comparative analysis of bacterial diversity between Nanzhou Daqu and Maotai Daqu based on high-throughput sequencing[J]. Liquor-Making Science and Technology, 2022, 340(10): 17–21.]
[7] 梁慧珍, 卢延想, 刘正, 等. 高温大曲中高产吡嗪类物质芽孢杆菌的筛选与应用[J]. 中国酿造, 2022, 41(1): 116–122. [LIANG H Z, LU Y X, LIU Z, et al. Screening and application of high-yield pyrazines *Bacillus* from high temperature Daqu[J]. China Brewing, 2022, 41(1): 116–122.]
[8] 王晓丹, 雷安亮, 王婧, 等. 产四甲基吡嗪地衣芽孢杆菌的应用[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 35–38. [WANG X D, LIE A L, WANG J. et al. Application of *Bacillus licheniformis* with tetramethyl pyrazine yield[J]. China Brewing, 2017, 36(2): 35–38.]
[9] YANG Y, ZHU H, CHEN J, et al. Characterization of the key aroma compounds in black teas with different aroma types by using gas chromatography electronic nose, gas chromatography-ion mobility spectrometry, and odor activity value analysis[J]. LWT, 2022, 163: 113492.
[10] GAO C, WANG R, ZHANG F, et al. The process monitors of probiotic fermented sour cherry juice based on the HS-GC-IMS[J]. Microchem J, 2022, 180: 107537.
[11] CAI W C, WANG Y R, WANG W P, et al. Insights into the aroma profile of sauce-flavor Baijiu by GC-IMS combined with multivariate statistical analysis[J]. J Anal Methods Chem, 2022, 148: 4614330.
[12] 袁红飞, 钟小清, 唐胜春, 等. 基于电子舌和气相色谱-离子迁移谱分析不同等级佛跳墙的风味特征[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(9): 73–84. [YUAN H F, ZHONG X Q, TANG S C, et al. Analysis of flavor substances of different grades of 'Fo Tiao Qiang' based on electronic tongue and gas chromatography-ion mobility spectrometry[J]. Journal Food Science and Biotechnology, 2021, 40(9): 73–84.]
[13] YIN J, WU M, LIN R, et al. Application and development trends of gas chromatography-ion mobility spectrometry for traditional Chinese medicine, clinical, food and environmental analysis[J]. Microchem J, 2021, 168: 106527.
[14] MARÍA D M C, NATIVIDAD J C, LOURDES A, et al. A robustness study of calibration models for olive oil classification: Targeted and non-targeted fingerprint approaches based on GC-IMS[J]. Food Chem, 2019, 288: 315–423.
[15] ZHANG Y D, SHEN Y I, CHENG W, et al. Understanding the shifts of microbial community and metabolite profile from wheat to mature Daqu[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 714726.

- [16] HE P H, HASSAN, M M, TANG F J, et al. Total fungi counts and metabolic dynamics of volatile organic compounds in paddy contaminated by *Aspergillus niger* during storage employing gas chromatography-ion mobility spectrometry[J]. *Food Analytical Methods*, 2022, 15(6): 1638–1651.
- [17] 乔宗伟, 张文学, 张丽莺, 等. 浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J]. *酿酒*, 2005(1): 18–22. [QIAO Z W, ZHANG W X, ZHANG L Y, et al. Analysis on microbes in brewing mass of strong aromatic spirits during fermentation[J]. *Liquor Making*, 2005(1): 18–22.]
- [18] WANG X, DU H, ZHANG Y, et al. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2017, 84(4): AEM.02369–17.
- [19] 王海燕. PCR-DGGE 技术对清香型汾酒微生物群落结构演变规律的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014. [WANG H Y. Analysis of microbial community in the brewing of light aroma style Fenjiu using PCR-DGGE[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.]
- [20] 范恩帝, 黄魏, 谢丹, 等. 酱香大曲中高产四甲基吡嗪微生物的选育及应用研究[J]. *酿酒科技*, 2022(11): 45–50, 71. [FANG E D, HUANG W, XIE D, et al. Breeding and application of microorganisms with high yield of tetramethylpyrazine in Jiangxiang Daqu[J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2022(11): 45–50, 71.]
- [21] 丁海龙, 沈小娟, 宋川, 等. 中国白酒健康功能成分吡嗪类化合物研究进展[J]. *中国酿造*, 2022, 41(9): 8–12. [DING H L, SHENG X J, SONG C, et al. Research progress on pyrazines in healthy functional components of Chinese Baijiu[J]. *China Brewing*, 2022, 41(9): 8–12.]
- [22] 刘宇, 王莉, 管桂坤, 等. 基于强化大曲的北方酱香型白酒品质提升研究[J]. *酿酒科技*, 2021(11): 80–84. [LIU Y, WANG L, GUANG G K, et al. Quality improvement of Northern Jiangxiang Baijiu based on Fortified Daqu[J]. *Liquor-Making Science and Technology*, 2021(11): 80–84.]
- [23] 唐平, 山其木格, 王丽, 等. 白酒风味化学研究方法及其酱香型白酒风味化学研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(17): 315–324. [TANG P, SAHN Q M G, WANG L et al. A review of research methods in Baijiu flavor chemistry and recent progress in the flavor chemistry of Maotai-flavored Baijiu[J]. *Food Science*, 2020, 41(17): 315–324.]
- [24] HUANG X W, ZHAO L H, PANG S, et al. Effects of varieties, cultivation methods, and origins of *Citrus sinensis* ‘hong jiang’ on volatile organic compounds; HS-SPME-GC/MS analysis coupled with OPLS-DA[J]. *Agriculture*, 2022, 12(10): 281–293.
- [25] 范威威, 林熙, 龚霄, 等. 基于顶空气相-离子迁移谱技术对不同酵母发酵的百香果果啤香气比较[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 325–332. [FAN Weiwei, LIN Xi, GONG Xiao, et al. Aroma comparison of passion beer fermented by different yeasts based on headspace phase-ion mobility spectroscopy technology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(7): 325–332.]