



酱香型白酒堆积酒醅中象牙色克罗彭斯特德菌的分离筛选及其代谢特性解析

吴双全^{1,2}, 柴丽娟^{1,2*}, 黄廷财^{1,2}, 时伟^{1,2}, 陆震鸣^{1,2}, 张晓娟^{1,2}, 王松涛³, 沈才洪³, 许正宏^{1,2,3*}

- 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122
- 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122
- 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000

吴双全, 柴丽娟, 黄廷财, 时伟, 陆震鸣, 张晓娟, 王松涛, 沈才洪, 许正宏. 酱香型白酒堆积酒醅中象牙色克罗彭斯特德菌的分离筛选及其代谢特性解析[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2502-2521.

WU Shuangquan, CHAI Lijuan, HUANG Tingcai, SHI Wei, LU Zhenming, ZHANG Xiaojuan, WANG Songtao, SHEN Caihong, XU Zhenghong. Isolation, screening, and metabolic characterization of *Kroppenstedtia eburnea* from the fermented grains of Jiang-flavor Baijiu[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2502-2521.

摘要: 【目的】高温堆积发酵是酱香型白酒生产中的关键工艺环节, 克罗彭斯特德菌属 (*Kroppenstedtia*) 是堆积酒醅中的优势细菌属, 研究其生长和代谢特征对于理解堆积发酵的关键作用至关重要。【方法】采用胰酪大豆蛋白胨 (tryptic soy broth, TSB) 培养基从酒醅中筛选克罗彭斯特德菌, 通过形态学和 16S rRNA 基因测序确定其分类学地位, 结合菌株纯培养及不同温度 (45 °C 和 50 °C) 下的高粱固态发酵实验, 研究其生长和挥发性化合物代谢特征。【结果】从酱香型白酒堆积酒醅中分离筛选到 3 株克罗彭斯特德菌, 经鉴定为象牙色克罗彭斯特德菌 (*Kroppenstedtia eburnea*)。液态培养时菌株 *K. eburnea* 1613 促进吡嗪类物质的产生, 为对照的 2.66 倍。在固态发酵高粱中检出的挥发性化合物主要为醇类和酸类, 总含量随发酵时间的推移而逐渐增加。50 °C 发酵高粱有利于醇类、酸类和吡嗪类物质的积累, 而 45 °C 下酯类物质含量较高。3 株菌以高粱为基质进行固态发酵时主要代谢产物是苯乙醇和异戊酸, 其中 *K. eburnea* 1615 在 50 °C 下发酵 15 d 时苯乙醇和异戊酸含量最高, 为 (31.17±0.14) μg/g 和 (16.75±0.76) μg/g。菌株 *K. eburnea* 6E22 在 50 °C 下发酵 15 d 时 2,5-二甲基吡嗪含量最高, 为 (1.67±0.14) μg/g。菌株 *K. eburnea* 1613 在发酵 15 d 时已

资助项目: 国家科技基础资源调查专项(2021FY100900)

This work was supported by the National Science and Technology Fundamental Resources Investigation Program of China (2021FY100900).

*Corresponding authors. E-mail: CHAI Lijuan, chailijuan2017@jiangnan.edu.cn; XU Zhenghong, zhenghuxu@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-12-29; Accepted: 2024-03-18; Published online: 2024-03-19

酸含量最高, 为 (3.74 ± 0.19) $\mu\text{g/g}$ 。50 °C下发酵高粱自身中醛酮类物质积累明显。偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)显示, 温度和时间对3株菌发酵高粱中挥发性化合物的组成有显著影响。【结论】象牙色克罗彭斯特德菌有助于堆积发酵酒醅风味化合物的产生, 特别是醇类、酸类和吡嗪类等酱香型白酒特征风味物质。

关键词: 堆积发酵; 象牙色克罗彭斯特德菌; 固态发酵; 挥发性化合物

Isolation, screening, and metabolic characterization of *Kroppenstedtia eburnea* from the fermented grains of Jiang-flavor Baijiu

WU Shuangquan^{1,2}, CHAI Lijuan^{1,2*}, HUANG Tingcai^{1,2}, SHI Wei^{1,2}, LU Zhenming^{1,2}, ZHANG Xiaojuan^{1,2}, WANG Songtao³, SHEN Caihong³, XU Zhenghong^{1,2,3*}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, Sichuan, China

Abstract: [Objective] High-temperature stacking fermentation is a key process in the production of Jiang-flavor Baijiu. *Kroppenstedtia* is a predominant bacterial genus in the stacked fermented grains, and investigating its growth and metabolic characteristics contributes to comprehensively understanding the crucial role of stacking fermentation. **[Methods]** The tryptic soy broth was used to screen *Kroppenstedtia* strains from the stacked fermented grains, and the taxonomic status of each strain was determined by morphological observation and 16S rRNA gene sequencing. Furthermore, the growth characteristics and volatile compound metabolism of each strain were investigated by solid-state fermentation experiments on sorghum at different temperatures (45 °C and 50 °C) in combination with pure culture. **[Results]** Three strains of *Kroppenstedtia* were isolated from the fermented grains of Jiang-flavor Baijiu and identified as *K. eburnea*. The liquid culture of strain *K. eburnea* 1613 significantly enhanced the production of pyrazines, which was 2.66 folds of that in the control group. The volatile compounds of sorghum in solid-state fermentation predominantly consisted of alcohols and acids, the total content of which increased over the fermentation time. The fermentation at 50 °C promoted the accumulation of alcohols, acids, and pyrazines, and that at 45 °C facilitated the accumulation of esters. The primary metabolites produced by the three strains during solid-state fermentation with sorghum as the substrate were phenethyl alcohol and isovaleric acid. The fermentation with *K. eburnea* 1615 at 50 °C for 15 days produced the highest levels of phenethyl alcohol and isovaleric acid, which reached (31.17 ± 0.14) $\mu\text{g/g}$ and (16.75 ± 0.76) $\mu\text{g/g}$, respectively. The fermentation with *K. eburnea* 6E22 and *K. eburnea* 1613 at 50 °C yielded the highest levels of 2,5-dimethyl pyrazine [(1.67 ± 0.14) $\mu\text{g/g}$] and hexanoic acid [(3.74 ± 0.19) $\mu\text{g/g}$], respectively, after 15 days. The

accumulation of aldehydes and ketones was significant in sorghum fermented at 50 °C. The partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) revealed significant influences of temperature and time on the volatile compound composition of sorghum fermented by the three strains. **[Conclusion]** *K. eburnea* contributes to the production of flavor compounds in fermented grains, particularly the characteristic flavor compounds such as alcohols, acids, and pyrazines of Jiang-flavor Baijiu.

Keywords: stacking fermentation; *Kroppenstedtia eburnea*; solid-state fermentation; volatile compounds

酱香型白酒以其香气幽雅细腻、酒体醇厚丰满著称，其生产工艺特点是“四高两长，一大一多”，即高温堆积，高温馏酒，高温发酵，高温制曲；生产周期长，储酒时间长；用曲量大，多轮次取酒^[1]。高温堆积发酵是酱香型白酒生产的关键工序，被称为是“二次制曲”过程，主要起到网罗环境中的微生物、生成重要酱香风味化合物或前体物质以及糖化发酵作用^[2-3]。

克罗彭斯特德菌属(*Kroppenstedtia*)是酱香型白酒大曲生产和酒醅堆积发酵过程中的优势细菌，相对丰度约为 3.49%–41.73%^[4-6]。克罗彭斯特德菌属属于芽孢杆菌纲(*Bacilli*)的高温放线菌科(*Thermoactinomycetaceae*)，基于 EzBioCloud 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/identify>)，目前该属有 4 个分类学地位明确的种，包括象牙色克罗彭斯特德菌(*K. eburnea*)、广州克罗彭斯特德菌(*K. guangzhouensis*)、肺克罗彭斯特德菌(*K. pulmonis*)和血克罗彭斯特德菌(*K. sanguinis*)，主要是从塑料表面、血液、土壤和脑脊液分离出来的^[7-9]，均为好氧耐热微生物，其中 *K. guangzhouensis* 最适生长温度为 50 °C，其余均为 45 °C。温度是影响酱香型白酒堆积发酵质量的重要因素，能反映堆积发酵过程是否正常^[10-11]，在堆积过程酒醅温度最高能达到 50 °C 左右^[12]。

目前基于宏转录组学和宏基因组学研究发现，克罗彭斯特德菌属是酱香型白酒酿造过程脂肪酸生物合成的功能微生物^[13]。对 6 个轮次

大曲酶编码基因进行功能注释发现，象牙色克罗彭斯特德菌编码 α -淀粉酶，能参与大曲发酵过程的碳水化合物代谢^[14]。此外，斯皮尔曼相关性分析显示，在大曲发酵过程中克罗彭斯特德菌属与氨基酸、乙酸等风味物质呈显著正相关^[15-17]。然而，克罗彭斯特德菌属在菌株水平的代谢特性及其在酱香型白酒堆积过程中对风味的贡献尚不清楚。

因此，本研究采用传统分离培养手段从酱香型白酒堆积酒醅中分离、筛选克罗彭斯特德菌，结合冷场扫描电镜及测序手段鉴定其形态特征和分类学地位；在纯培养条件下研究菌株的生长和挥发性化合物代谢情况；最后，以酱香型白酒酿造原料红缨子高粱为基质进行 15 d 恒温固态发酵实验，探究克罗彭斯特德菌在不同温度(45 °C和 50 °C)条件下挥发性化合物的产生情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

本研究中所用的酒醅样品取自某酱香型白酒酒厂，分别取自酱香型白酒第三次堆积发酵的第 1、4、9 天的酒醅。每一个酒醅样品取自距离地面 50 cm 的堆积酒醅，取样深度为 20 cm，三点取样，每个点取约 50 g 酒醅，混匀后放入无菌自封袋。放冰袋 4 °C 保存，送回实验室进行后续微生物分离。

1.1.2 主要试剂和仪器

叔戊醇(色谱级纯度), Sigma-Aldrich 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 胰酪大豆蛋白胨(tryptic soy broth, TSB)培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 气相色谱-质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司; 定量 PCR 仪, ThermoFisher Scientific 公司; Spark 多模微孔板阅读器, Tecan 公司; 冷场扫描电镜, HITACHI 公司。

1.1.3 培养基

调研克罗彭斯特德菌属相关文献发现, 常用 TSB 培养基作为筛选培养基^[7-9]。

TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 17.0, 氯化钠 5.0, 大豆蛋白胨 3.0, 磷酸氢二钾 2.5, 葡萄糖 2.5。固体培养基需添加质量分数 2.0%的琼脂粉。灭菌条件为 115 °C、20 min。

固态发酵高粱培养基: 向 250 mL 锥形瓶中加入 100 g 红缨子高粱和 80 mL 去离子水, 121 °C 灭菌 30 min 后, 冷却至 50 °C 备用。

1.2 酒醪中微生物的分离筛选及鉴定

称取 10 g 堆积醪样品, 添加到装有 100 mL 无菌生理盐水和适量玻璃珠的 250 mL 三角瓶内, 45 °C、180 r/min 振荡 30 min, 静置 10 min, 待酒醪沉到瓶底后, 获得菌悬液。取上清液进行梯度稀释(10^{-1} – 10^{-7}), 取 100 μ L 菌悬液涂布在 TSB 固体培养基上, 放置在 45 °C 培养箱, 恒温培养 2–3 d。待菌落长出后, 每隔一段时间挑选不同菌落形态的单菌落, 分离纯化 3 次后接种到 TSB 液体培养基中, 在恒温摇床上 45 °C、180 r/min 培养 2 d。取 2 mL 菌液, 根据细菌 DNA 快速提取试剂盒的说明书, 提取菌株 DNA 用于物种鉴定, 同时取 0.9 mL 菌液转移到有 0.9 mL 50%甘油的保种管里, 置于–80 °C 冰箱保藏备用。

参照《伯杰细菌鉴定手册》^[18]和《常见细

菌系统鉴定手册》^[19]的方法对克罗彭斯特德菌进行形态学和分子生物学鉴定。分子生物学鉴定以细菌的 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对提取的菌株 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): DNA 模板 1 μ L, 2 \times Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 加无菌 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 7 min; 95 °C 变性 25 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。将 PCR 产物送至天霖生物科技无锡有限公司测序, 将测序结果与 EzBioCloud 数据库中的模式菌株进行同源比对。利用 MEGA 7 软件基于邻近法(neighbor-joining)构建系统进化树, 以暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*) KCTC 13613^T 的 16S rRNA 基因作为外源菌序列。

1.3 菌株生长代谢特性

1.3.1 生长曲线测定

将菌株在固体 TSB 培养基上进行划线培养, 挑选单菌落在液体 TSB 培养基中培养获得生长活力良好的种子液。以 1%接种量转接到加有适量玻璃珠的装有 100 mL TSB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 每隔 4 h 采集发酵液用于分析生长和代谢特征, 以未接种的培养基为对照, 每组设置 3 个平行。

吸取 200 μ L 发酵液至 96 孔板中, 使用酶标仪测量 600 nm 处 OD 值。采用微量 pH 计(METTLER TOLEDO 公司)测定 pH 值。将传代 3 次的生长至对数生长期(OD₆₀₀ 约为 2.0)的菌液涂布在平板上, 让菌长满整个平板。挑取菌体, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 再用 2.5%的戊二醛溶液固定 2 次, 用冷场扫描电子显微镜观察菌体的微观形态。

1.3.2 挥发性化合物测定

采用顶空固相微萃取-气质联用法(headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME-GC-MS)测定菌液中挥发性化合物组成。取 30 mL 培养至平稳期的菌液于 50 mL 离心管中, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min。取 5 mL 上清液于 20 mL 顶空瓶中, 加入 2.3 g 氯化钠以及 10 μ L 8.05 g/L 的色谱级叔戊醇内标液。

检测条件: 色谱柱为 DB-Wax 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m), 载气为 He, 流速为 1 mL/min, 进样口温度为 250 °C, 解吸 5 min, 不分流进样; 气相升温程序: 初始温度 40 °C, 保持 3 min, 以 5 °C/min 升至 60 °C, 再以 10 °C/min 升至 230 °C, 保持 8 min。质谱条件: 离子源温度 260 °C, 界面温度 200 °C, 电子能量 70 eV, 扫描质量范围 25–350 amu。采用 NIST17 谱库进行定性分析, 采用内标法计算各种物质的相对含量。

1.4 菌株固态发酵高粱的产香特征分析

1.4.1 不同温度条件下固态发酵高粱

菌株按 1% 的接种量接种于 TSB 液体培养基, 培养至平稳期, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 利用 PBS 缓冲液洗涤菌体 2 次并重悬。向固态发酵高粱培养基中分别加入 20 mL 菌株重悬液, 混匀后分别放入 45 °C 和 50 °C 的恒温培养箱中培养, 以加入 20 mL 无菌水为空白对照, 每个处理设置 3 个平行。在发酵第 0、4、7 和 15 d 时分别取样, 置于 -80 °C 冰箱备用。

1.4.2 菌株固态发酵高粱的挥发性化合物测定

采用 HS-SPME-GC-MS 检测菌株在不同温度条件下发酵高粱的挥发性化合物组成。取 5 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 超纯水, 充分涡旋振荡混匀, 4 °C 超声处理 30 min, 8 000 r/min 离心 10 min。取 5 mL 上清液至 20 mL 顶空瓶中, 加入 2.3 g 氯化钠以及 10 μ L

8.05 g/L 的色谱级叔戊醇内标液。HS-SPME-GC-MS 运行程序与分析方法见 1.3.2。

1.5 数据分析

利用 Microsoft Excel 2016、Origin 2021 等软件对获得的原始数据进行处理, 使用 SIMCA 14.1 软件对挥发性化合物进行多元统计分析, 利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图并对数据进行方差分析, 使用派森诺云平台 (<https://www.genescloud.cn/login>) 进行挥发性物质聚类热图绘制, 对每个挥发性化合物分别采用 Z-score 方法标准化。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离鉴定及生长特性

2.1.1 菌株的形态学特征

从酱香型白酒堆积酒醅中共筛选到 179 株菌株, 结合《伯杰细菌鉴定手册》《常见细菌系统鉴定手册》和德国微生物与细胞培养物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-45196>), 平板菌落形态初步确定有 3 株潜在克罗彭斯特德菌, 编号为 *K. eburnea* 1613、*K. eburnea* 1615、*K. eburnea* 6E22, 其菌落形态基本一致, 以菌株 *K. eburnea* 1613 为例, 在 TSB 固体培养基上 45 °C 培养 48 h 后, 菌落呈象牙色, 扁平状, 形态不规则, 边缘呈波浪状, 表面无光泽, 生长到后期菌落呈放射状, 褶皱状, 有土腥味 (图 1A)。通过冷场扫描电镜观察, 菌株 *K. eburnea* 1613 的菌丝呈长的弯曲状, 在不分枝的菌丝顶端上发育单个内生孢子, 菌丝体大小约 (0.3–0.5) μ m \times (4.0–6.0) μ m (图 1B)。

2.1.2 菌株的分子生物学鉴定

将菌株的 16S rRNA 基因序列提交到 EzBioCloud 数据库比对, 结果显示 *K. eburnea*

1613、*K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 均与模式菌株 *Kroppenstedtia eburnea* DSM 45196^T 相似度最高, 分别为 99.16%、98.76%和 98.95%, 与模式菌株 *Kroppenstedtia guangzhouensis* GD02^T 的相似度分别为 95.88%、95.82%和 95.61%。已有研究定义潜在新物种的 16S rRNA 基因序

列相似度阈值为 98.65%^[20-21]。系统发育分析显示 3 株菌与 *Kroppenstedtia eburnea* DSM 45196^T 聚为一支(图 2)。因此, 综合菌株形态特征和 16S rRNA 基因序列分析, 将菌株 *K. eburnea* 1613、*K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 鉴定为 *Kroppenstedtia eburnea*。

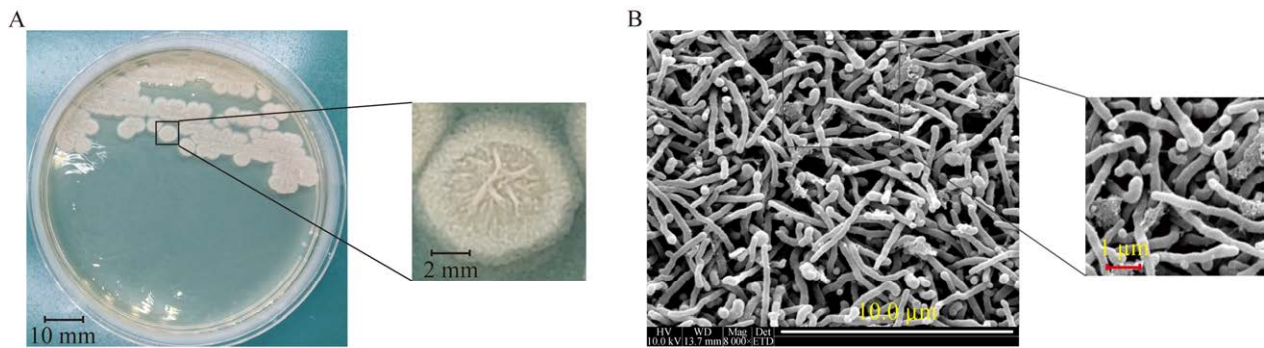


图 1 菌株 *Kroppenstedtia eburnea* 1613 的菌落形态(A)和冷场扫描电镜图(B)

Figure 1 Morphological characteristics of *Kroppenstedtia eburnea* 1613 colonies (A) and its cold field emission scanning electron micrograph (B).

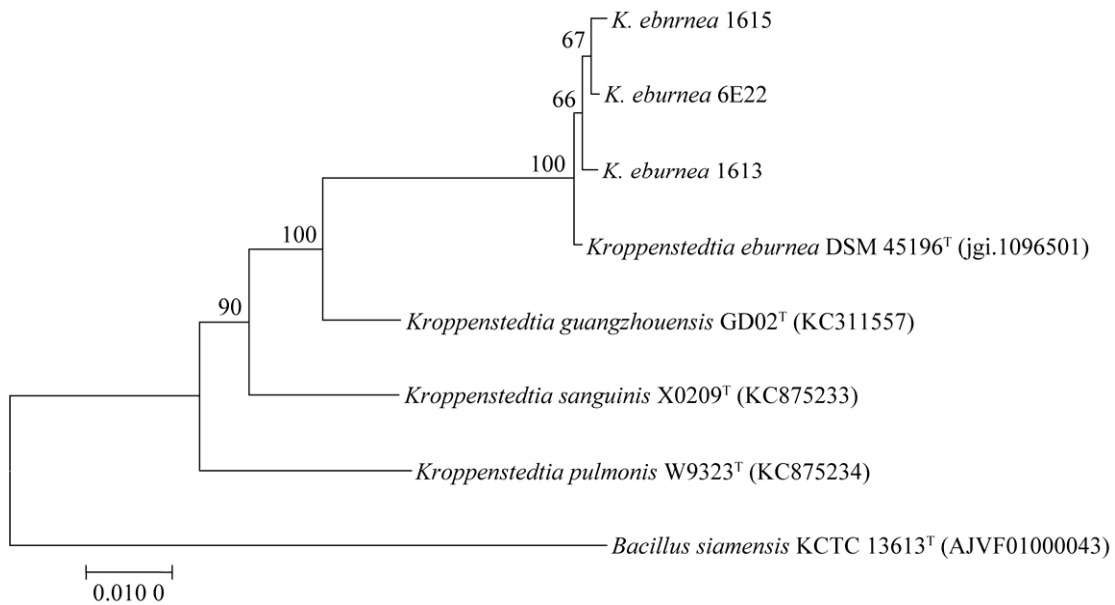
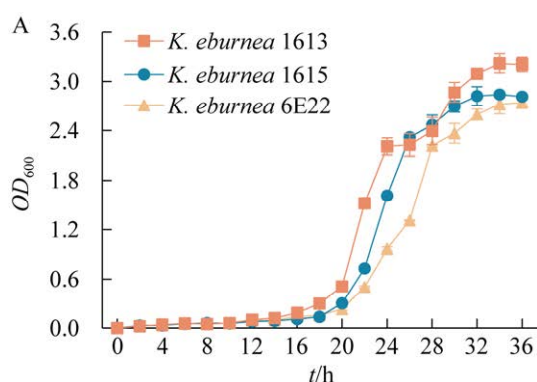


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的邻近法系统进化树

Figure 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strains *Kroppenstedtia eburnea* 1613, *K. eburnea* 1615, *K. eburnea* 6E22, and other closest relatives. Bootstrap values ($\geq 50\%$) based on 1 000 replications are shown at branch nodes. *Bacillus siamensis* KCTC 13613^T (AJVF01000043) is used as the outgroup. Bar: 0.010 0 represents substitutions per nucleotide position.

2.1.3 菌株的生长曲线

生长曲线测定结果表明,3个菌株在0–16 h 生长速度缓慢,处于延滞期;培养至18 h 生长迅速,进入对数生长期;在32 h 左右进入平稳期, OD_{600} 为2.8–3.2。菌株 *K. eburnea* 1613 pH 在整个生长过程中呈上升趋势,从初始7.46 变化为8.46 (图3B)。菌株 *K. eburnea* 1615、*K. eburnea* 6E22 终点 pH 值为7.70,与初始 pH 值相比变化不显著($P>0.05$)。



2.2 菌株发酵液中挥发性化合物分析

2.2.1 挥发性化合物大类组成

采用 HS-SPME-GC-MS 方法在菌液中共检出97种挥发性化合物,包括17种醇类、16种吡嗪类、13种醛类、12种酮类、10种酯类、6种酚类、5种酸类以及18种其他类化合物。菌液挥发性化合物总相对浓度为 (10.05 ± 0.38) – (22.17 ± 1.37) mg/L (图4A)。与空白对照组相比,菌株 *K. eburnea* 1613 的菌液中挥发性化合物含量是其1.88倍

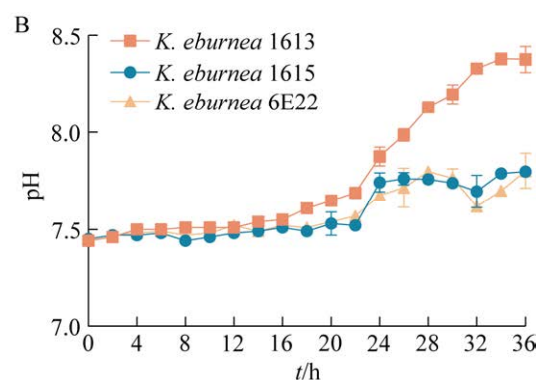


图3 菌株在45 °C、pH 7.50 条件下的生长特性 A: OD_{600} . B: pH

Figure 3 Growth characteristics of strains under conditions of 45 °C and pH 7.50. Error bars represent the standard deviations of the mean. A: OD_{600} . B: pH.

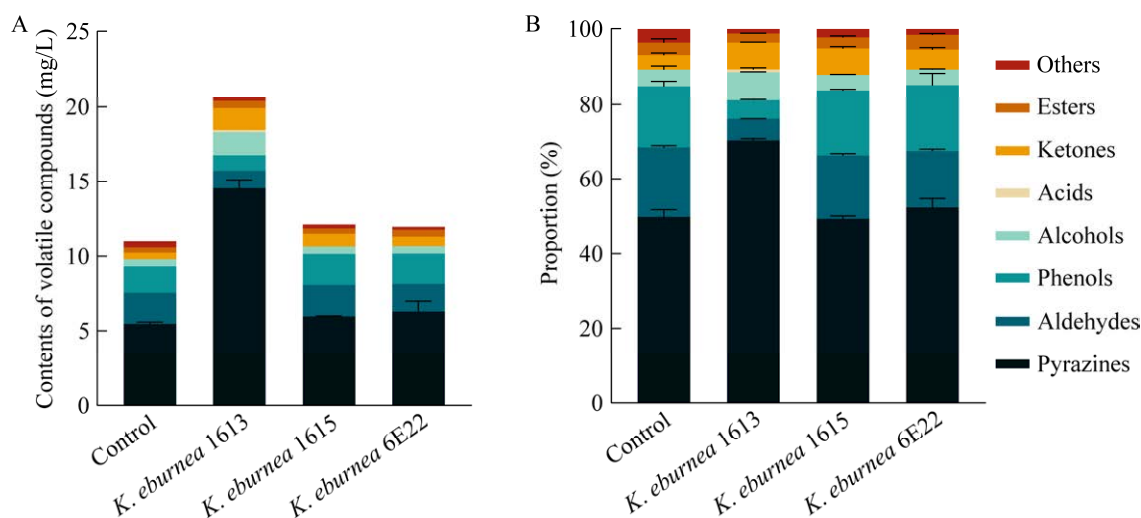


图4 菌液挥发性化合物相对浓度(A)及百分占比(B)

Figure 4 Relative content (A) and proportion (B) of volatile compounds in fermentation broth from different strains. Error bars represent the standard deviations of the mean.

($P < 0.01$), 而菌株 *K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 与对照差异不显著($P > 0.05$)。吡嗪类物质在各菌株发酵液中占比最大, 为 49.68%–70.35%, 其中菌株 *K. eburnea* 1613 占比最高, 达到 70.35% (图 4B)。空白对照组中吡嗪类物质含量为(5.45±0.17) mg/L, 菌株 *K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 菌液中吡嗪类物质浓度分别为(5.95±0.07) mg/L 和(6.26±1.19) mg/L, 与对照组差异不显著($P > 0.05$), 而 *K. eburnea* 1613 中吡嗪类浓度为(14.53±0.99) mg/L, 显著高于对照组($P < 0.01$), 是对照组的 2.66 倍, 说明菌株 *K. eburnea* 1613 能促进吡嗪类物质的产生。

2.2.2 各类挥发性化合物分析

为了比较菌株 *K. eburnea* 1613、*K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 在纯培养条件下的挥发性化合物含量差异, 对每个物质进行 Z-score 标准化并绘制成热图(图 5), 其中对照(control)为未接种的空白培养基。3 株菌的发酵液中所含挥发性化合物的成分有明显差异, 菌株 *K. eburnea* 1613 发酵液中吡嗪类、酮类、酸类、醇类和酚类物质普遍明显高于菌株 *K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22。

吡嗪类物质是胺和羰基化合物发生美拉德反应产物之一^[22], 空白培养基中吡嗪类物质占比为 49.68%, 推测是由于培养基中物质之间发生美拉德反应的产物。相较于对照, 菌株 *K. eburnea* 1613 中检测出的 2,5-二甲基吡嗪、2,3,5-三甲基吡嗪和 2-乙基-3,6-二甲基吡嗪的含量都显著上升, 分别是其 1.5、5.5 和 16.0 倍, 再次表明菌株 *K. eburnea* 1613 能促进吡嗪类物质的生成。此外, 菌株 *K. eburnea* 1613 发酵液中检出 2-壬酮、2-庚酮和 2-十一酮等 7 种酮类化合物, 而在 *K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 中未检出, 其中 2-壬酮和 2-庚酮具有花果香和清甜气味; 酸类物质仅在 *K. eburnea* 1613 发酵

液中检出, 含量为(0.16±0.09) mg/L; 醇类含量也明显高于对照和另外 2 株菌。菌株 *K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 中检出的 3,5-二叔丁基苯酚含量高于其他组, 分别为(2.01±0.04) mg/L 和(2.03±1.18) mg/L。另外, 各菌株发酵液中均检测到了不同种类的酯类物质, 例如, *K. eburnea* 1613 中检测到癸酸甲酯、十三酸甲酯和 12-甲基十三烷酸甲酯, 这些酯类呈花果香的气味。综上所述, 菌株 *K. eburnea* 1613 能显著提高各类挥发性风味化合物的产生, 包括吡嗪类、酮类等, 这些物质有利于酱香型白酒典型风味的形成。

2.3 固态发酵高粱中挥发性化合物分析

不同发酵方式对于微生物的生长和代谢具有重要影响^[23], 因此, 为更好地探究微生物在堆积酒醅中的生长和代谢特点, 进一步进行了恒温固态发酵高粱实验。

2.3.1 不同温度固态发酵高粱中挥发性化合物大类组成

采用 HS-SPME-GC-MS 方法在发酵高粱中共检出 89 种挥发性化合物, 包括 23 种酯类、14 种酮类、11 种醛类、12 种醇类、11 种酸类、2 种酚类以及 16 种其他类化合物。挥发性化合物的含量随着发酵时间的延长呈现上升趋势(图 6)。菌株 *K. eburnea* 1613、*K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 在 50 °C 发酵 15 d 时发酵高粱中检出的挥发性化合物总含量均高于 45 °C, 其中主要为醇类和酸类, 它们的总含量呈现明显的上升趋势。菌株 *K. eburnea* 1615 在发酵第 15 天时挥发性化合物含量最高, 45 °C 和 50 °C 时分别为(67.79±18.72) μg/g 和(72.79±0.58) μg/g (图 6A、6B)。

2.3.2 不同温度固态发酵高粱中挥发性化合物分析

为比较菌株 *K. eburnea* 1613、*K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22 在不同温度下的固态发

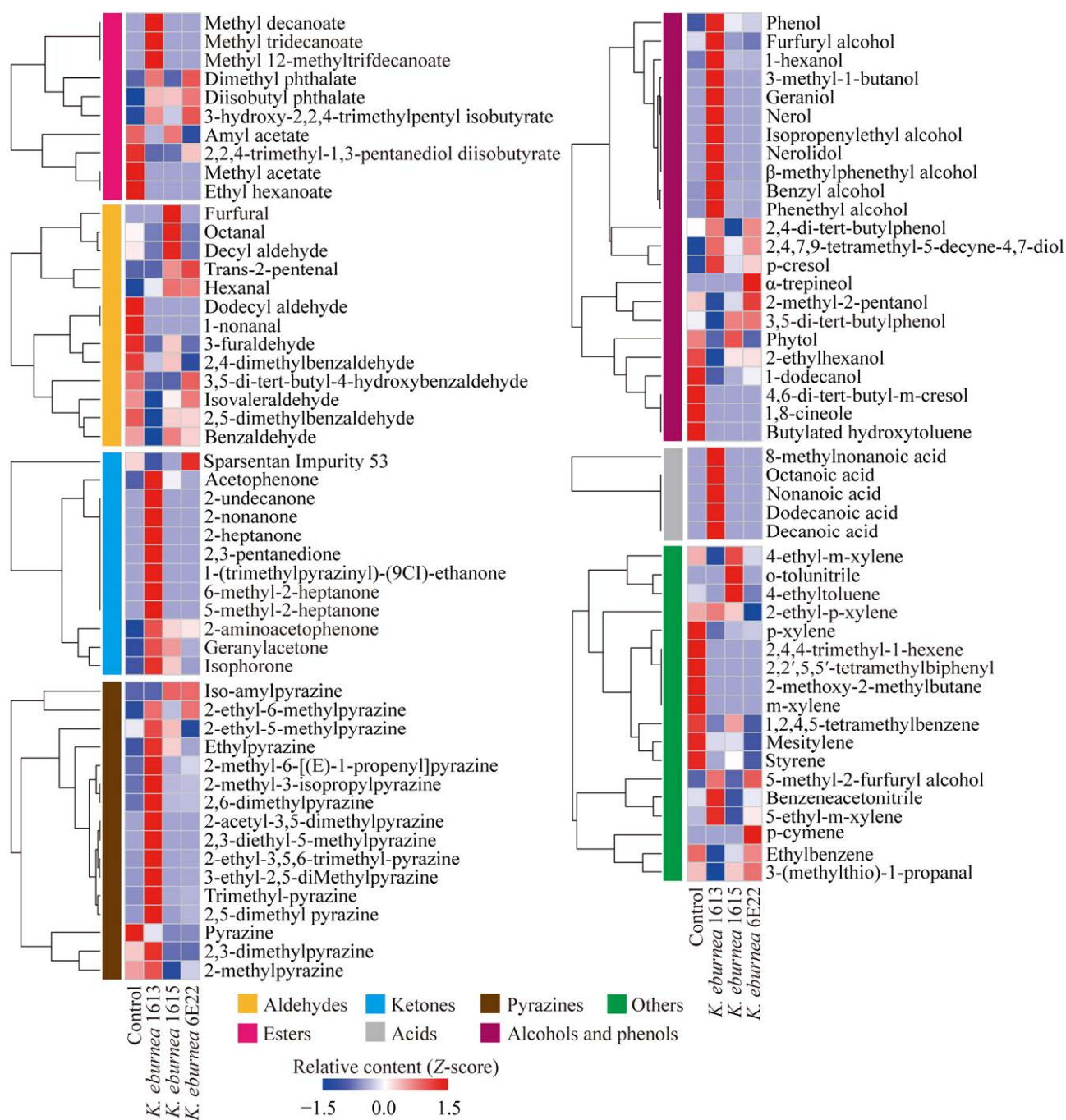


图 5 纯培养条件下菌株各类挥发性化合物聚类热图分析

Figure 5 Cluster heatmap analysis of diverse volatile compounds in fermentation broth.

醇高粱各类挥发性化合物含量差异，将各类挥发性物质进行 Z-score 标准化并绘制成热图(图 7)。结果表明，菌株 *K. eburnea* 1615 在 50 °C 发酵 15 d 时醇类物质含量最高，为(33.69±0.34) μg/g，

是对照组的 3.08 倍，其中含量最高是苯乙醇，含量为(31.17±0.14) μg/g。与对照相比，3 株菌均促进了苯乙醇的产生，尤其是 *K. eburnea* 1615 (图 7A)。苯乙醇具有玫瑰花香的气味和抗真菌

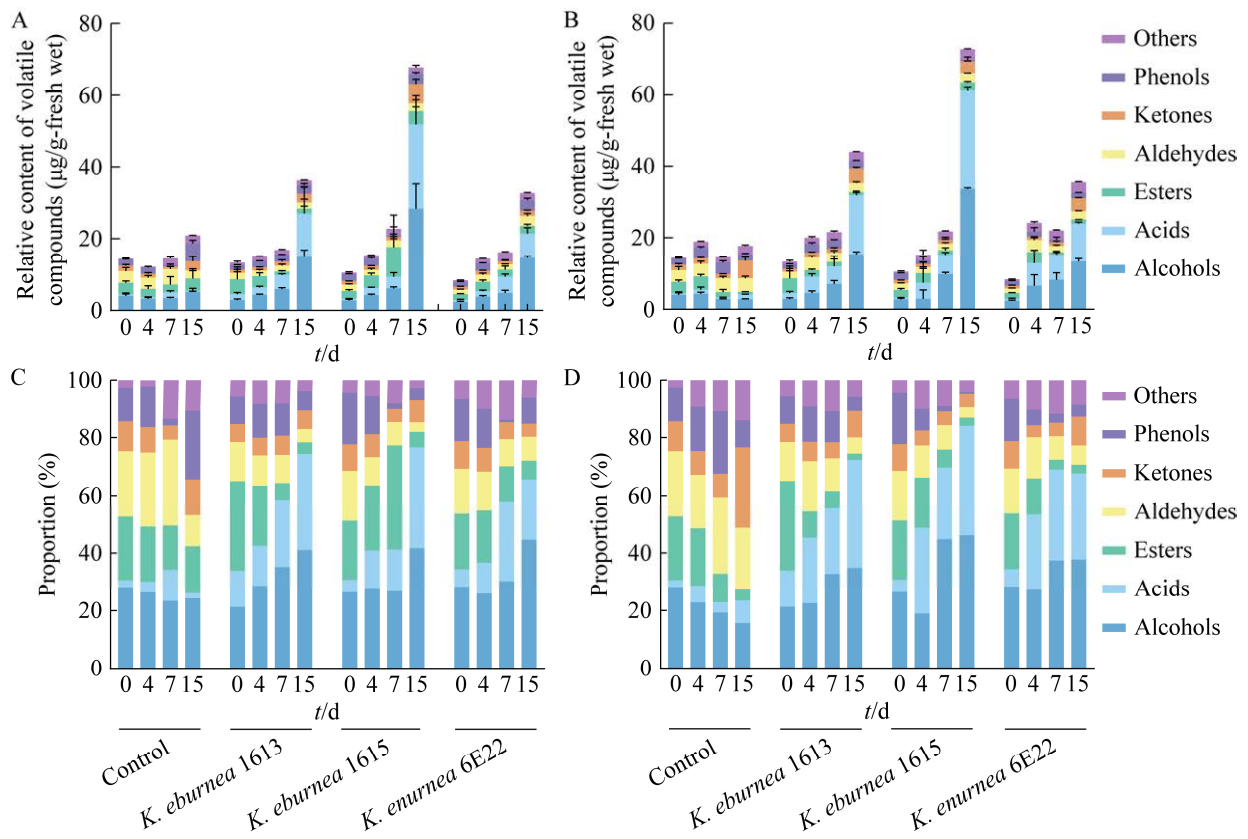
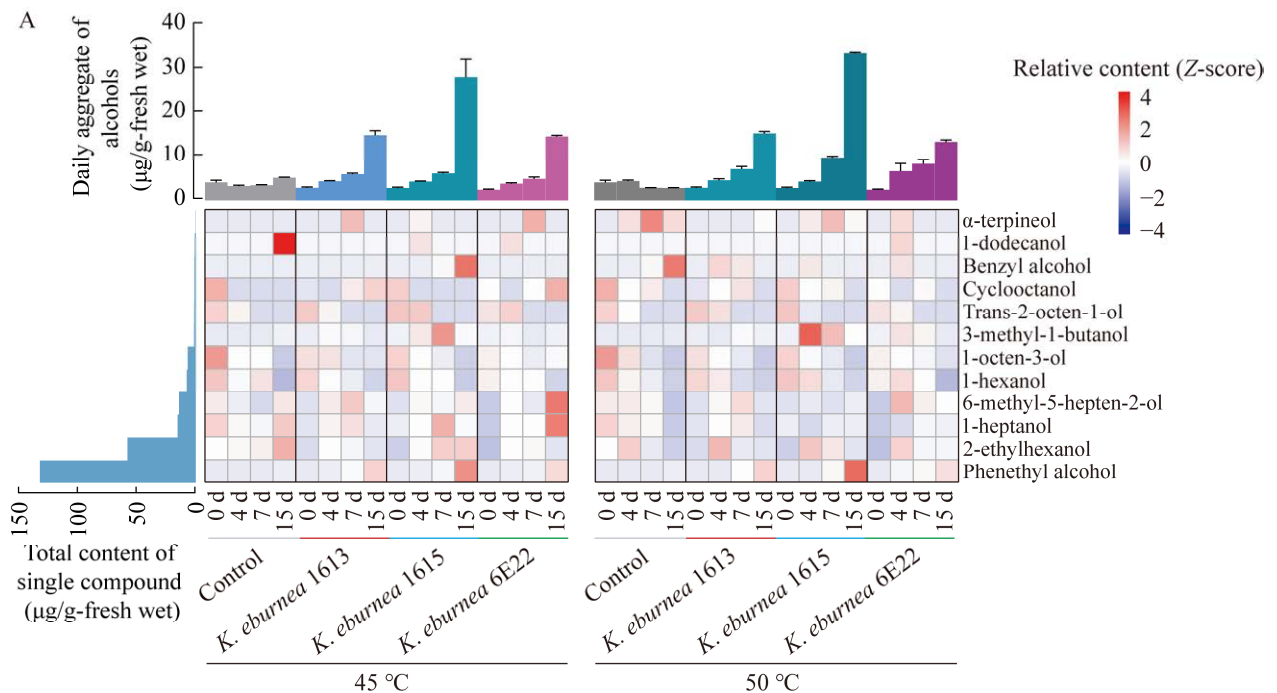
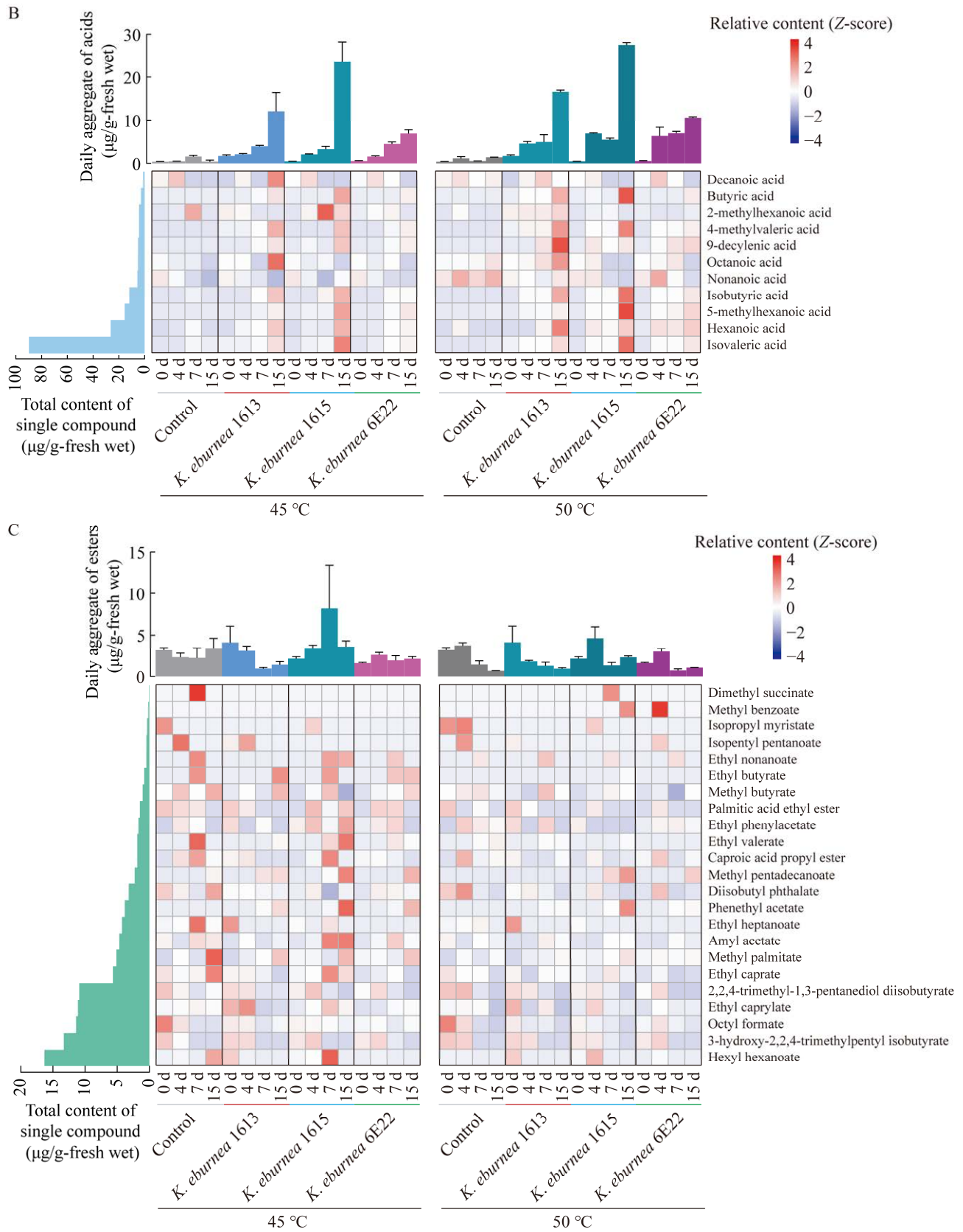
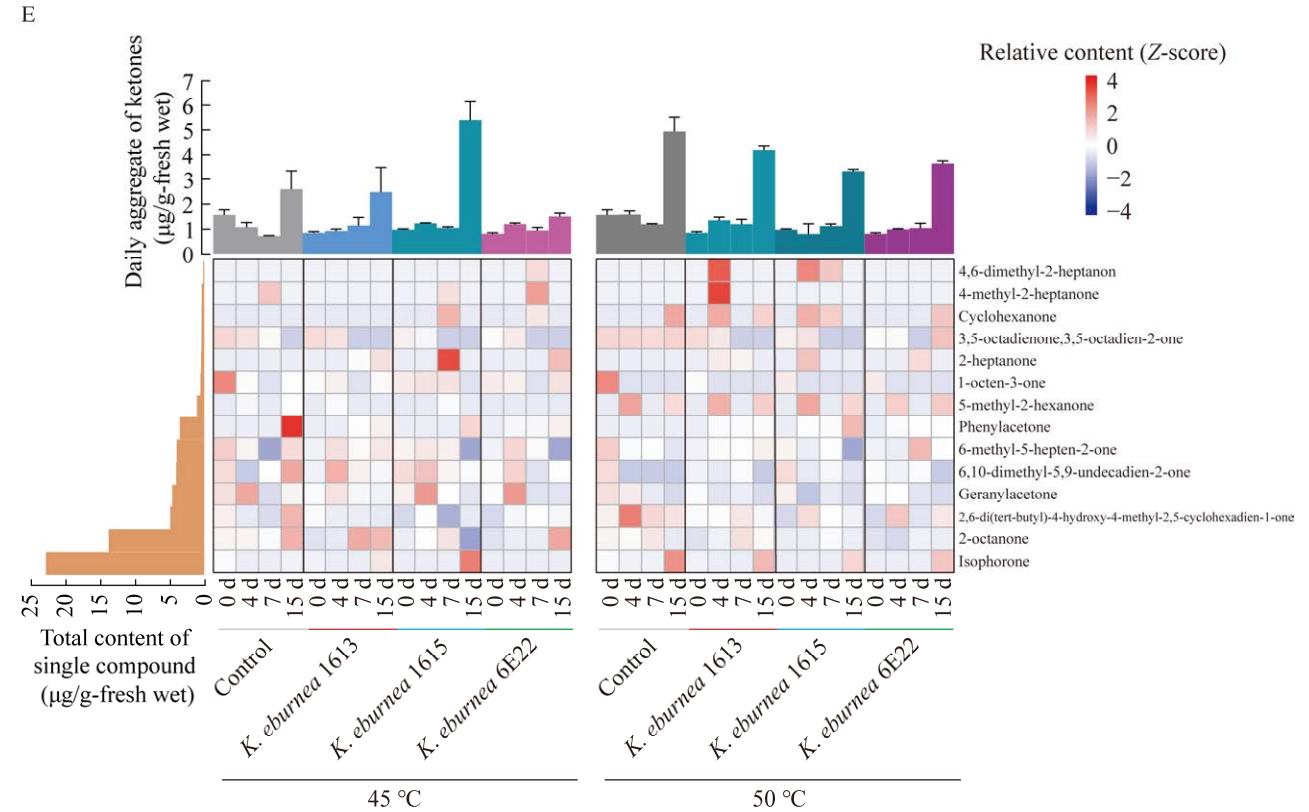
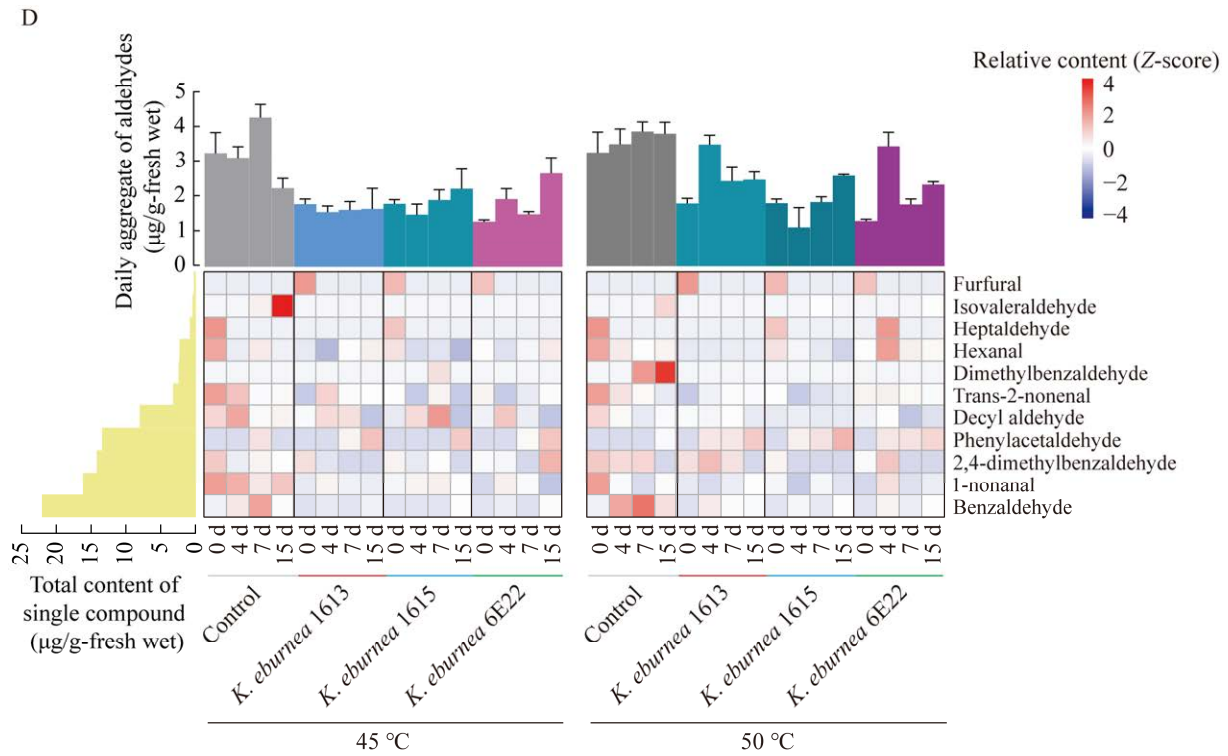


图 6 45 °C (A)和 50 °C (B)下菌株固态发酵高粱中挥发性化合物相对含量及其占比

Figure 6 Relative content and proportion of volatile compounds in the solid-state fermented sorghum of strains under 45 °C (A) and 50 °C (B). Error bars represent the standard deviations of the mean.







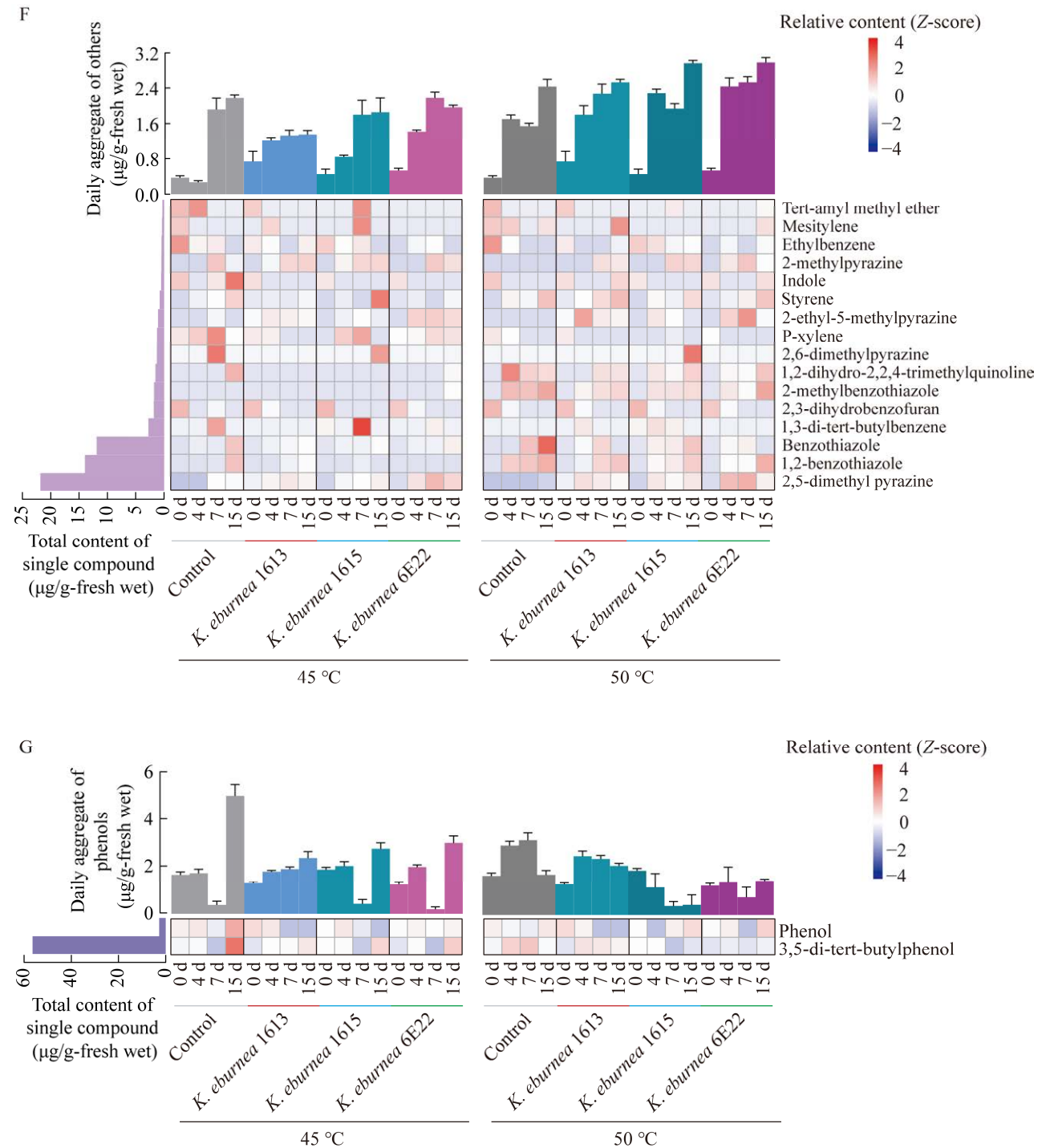


图 7 恒温发酵高粱中不同类别挥发性化合物分析 A: 醇类. B: 酸类. C: 酯类. D: 醛类. E: 酮类. F: 其他类. G: 酚类

Figure 7 Analysis of volatile compounds across various categories in sorghum subjected to constant temperature fermentation. A: Alcohols. B: Acids. C: Esters. D: Aldehydes. E: Ketones. F: Others. G: Phenols. Error bars represent the standard deviations of the mean.

活性^[24], 可能在酱香型白酒堆积过程中抑制真菌的生长。高级醇是指 3 个及以上碳原子的一元醇, 是白酒中重要的呈味化合物, 如苯乙醇、异戊醇等, 含量太低会导致白酒酒体单薄, 过量会让酒体苦涩, 容易上头^[25-26]。在白酒酿造中高级醇的合成主要是氨基酸分解代谢途径(Ehrlich 途径)^[27]和氨基酸合成代谢途径(Harris 途径)^[28]。

与对照相比, 菌株 *K. eburnea* 1613、*K. eburnea* 1615 在酸类物质积累上具有明显优势, 主要为异戊酸, 其次是己酸。*K. eburnea* 1615 在第 15 天时总含量最高, 为(27.50±1.04) μg/g, 异戊酸含量为(16.75±0.76) μg/g。酸类物质具有协调香气的作用, 适量的酸可使白酒酒体丰满、回味悠长^[29]。同时, 酸类是合成酯类不可或缺的前体^[30], 酯类物质通常具有花香、果香、甜香等愉悦的风味特征^[31], 对白酒风味有着积极的作用, 例如, 异戊酸酯化形成的异戊酸乙酯具有似苹果等的水果香^[32]。此外, 相较于 45 °C, 菌株在 50 °C 积累更多酸类物质。例如, *K. eburnea* 1615 在 50 °C 发酵 15 d 时 5-甲基己酸和丁酸的含量分别为(4.41±0.03) μg/g 和(0.88±0.01) μg/g, 是 45 °C 的 1.57 倍和 1.72 倍; 菌株 *K. eburnea* 1613 在 50 °C 发酵 15 d 时己酸含量为(3.74±0.19) μg/g, 是 45 °C 的 2.73 倍(图 7B)。然而, 高温可能不利于酯类物质的积累, 从总体上看, 菌株在 50 °C 发酵条件下的酯类物质含量普遍低于 45 °C (图 7C)。例如, *K. eburnea* 1615 在 45 °C 发酵 7 d 时, 酯类物质含量最高, 为(8.01±4.01) μg/g, 是 50 °C 的 4.97 倍。另外, 45 °C 对照组中部分酯类物质积累明显, 如棕榈酸甲酯、癸酸乙酯, 可能是高粱原料本身中物质转化形成的。

醛酮类物质种类丰富, 主要是发酵过程微生物代谢及醇类物质氧化、酮酸脱酸等产生^[33]。醛酮类共检出 25 种, 主要有苯甲醛、壬醛、异佛尔酮和仲辛酮等(图 7D、7E)。苯甲醛和异佛

尔酮分别是含量最高的醛类和酮类, 前者具有苦杏仁气味, 后者具有薄荷气味。固态发酵过程中醛类物质总含量无明显变化, 对照组中主要的醛类物质含量高于其他 3 组, 说明一定温度下高粱自身可能会释放醛类物质。然而, 3 个菌株组中苯乙醛在发酵过程逐渐增加, 至 15 d 时含量为(0.92–1.32) μg/g, 高于对照组, 苯乙醛具有苦杏仁的气味。酮类物质在发酵至 15 d 时明显积累, 其中在 50 °C 条件下对照组中酮类含量为(4.92±1.00) μg/g, 是 45 °C 的 2.03 倍, 表明 50 °C 可能促进高粱原料产生酮类物质。菌株 *K. eburnea* 1615 在 45 °C 发酵 15 d 时酮类总量最高, 为(5.38±1.30) μg/g, 是对照的 2.09 倍, 其中, 异佛尔酮的积累量最高, 为(4.82±1.19) μg/g, 是对照的 22.95 倍。结果表明, 堆积发酵过程中高温有助于醛酮类物质的积累, 菌株 *K. eburnea* 1615 在 45 °C 也能提高酮类物质的含量, 推测醛酮类的产生是温度和微生物共同作用的结果。

吡嗪类物质具有典型的烤香味、坚果味, 被认为是酱香型白酒的重要风味物质^[34]。共检出 4 种吡嗪类物质, 含量最高的为 2,5-二甲基吡嗪(图 7F)。3 个菌株的 2,5-二甲基吡嗪含量均高于对照组, 在 50 °C 下的积累量高于 45 °C, 其中 50 °C 第 7 天时菌株 *K. eburnea* 6E22 中检出的 2,5-二甲基吡嗪含量最高, 为(1.67±0.14) μg/g, 是 45 °C 下的 1.05 倍。高温有利于美拉德反应, 进而产生更多的吡嗪类物质^[35]。酚类物质在对照组中含量较高, 3,5-二叔丁基苯酚在 45 °C 发酵 15 d 时含量最高, 为(4.88±0.94) μg/g, 可能源于高粱自身物质的分解(图 7G)。此外, 菌液和发酵高粱中检出的挥发性化合物的含量和种类不同, 可能是由于底物组成不同造成的, 纯培养条件中 TSB 培养基主要以胰蛋白胍和葡萄糖为氮源和碳源, 红缨子高粱中主要是质量分数为 69.88% 的支链淀粉和 7.43% 蛋白质^[36], 其次

发酵方式的不同也可能对微生物的生长代谢产生影响^[23]。综上所述,象牙色克罗彭斯特德菌有助于堆积发酵酒醅风味化合物的产生,特别是醇类、酸类和吡嗪类等酱香型白酒特征风味物质。

2.4 不同温度固态发酵高粱挥发性化合物差异分析

为找出不同发酵温度条件下发酵高粱的特

征差异化合物,运用偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)对比了 45 °C和 50 °C条件下发酵高粱的挥发性化合物结构。结果显示,2 种温度条件下挥发性化合物结构差异显著($P<0.01$) (图 8A)。经过 200 次置换验证, R^2 大于 Q^2 且 Q^2 的起点为负数,该参数证明 PLS-DA 模型是可靠的(图 8B)。根据变

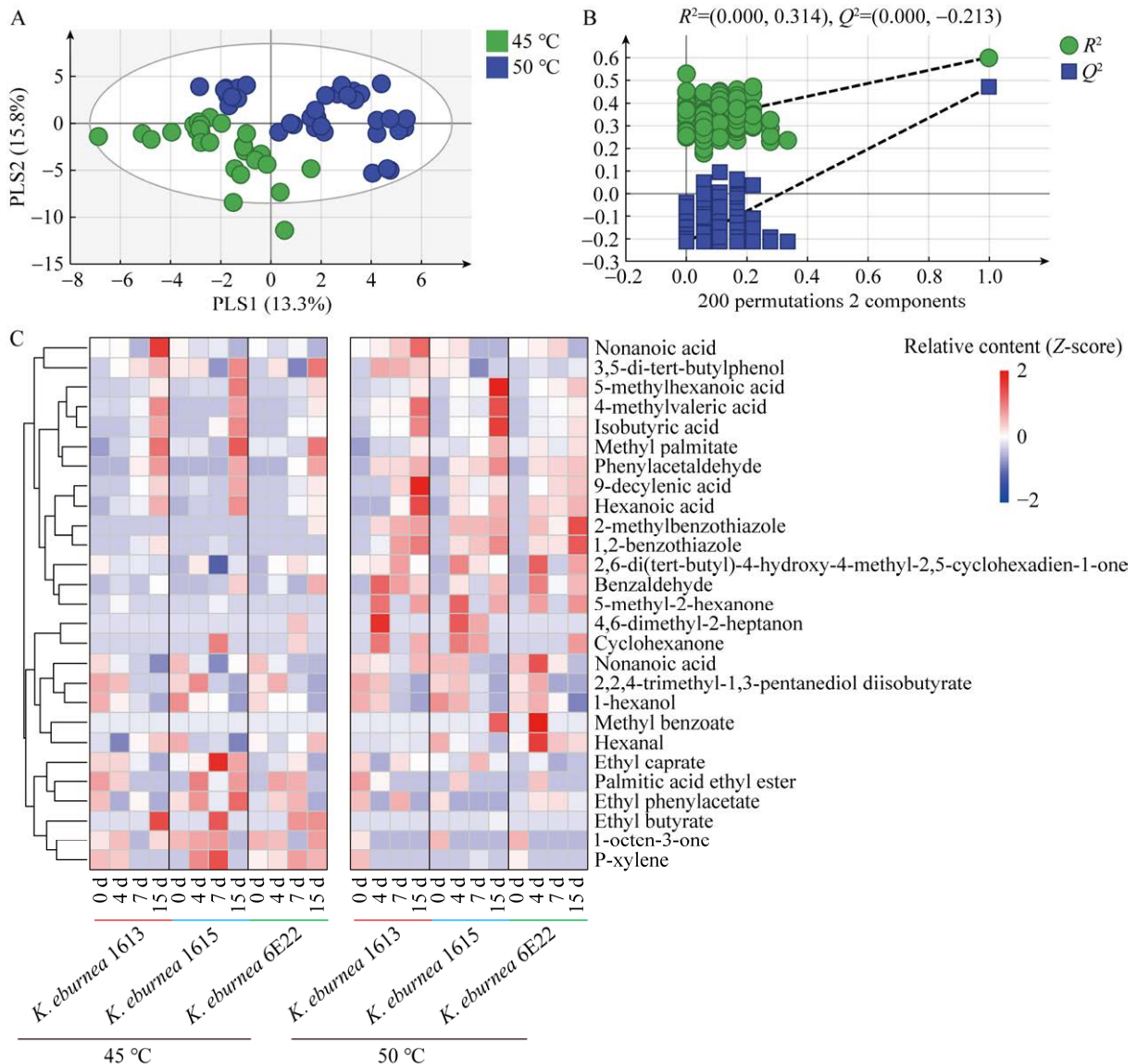


图 8 不同温度发酵高粱风味物质差异分析 A: PLS-DA 模型. B: 200 次置换检验. C: 特征差异物质聚类热图

Figure 8 Analysis of variations in flavor compounds of sorghum fermented at different temperatures. A: PLS-DA model. B: 200 permutation test. C: Heat map of the representative differential volatile substances.

异权重参数值(variable importance in projection, VIP)大于1 筛选特征差异化合物,共筛选到 27 种,使用 Z-score 标准化每种挥发性化合物并绘制聚类热图(图 8C)。45 °C条件下癸酸乙酯、苯乙酸乙酯和棕榈酸乙酯等酯类物质含量更高,在 45 °C条件下含量随着发酵天数的增加而升高,而 50 °C则呈现相反趋势,推测 45 °C条件下利于酯类物质的合成。50 °C条件下酮类和酸类物质含量更高,如 5-甲基-2-己酮、4,6-二甲基-2 庚酮、环己酮、异丁酸、己酸等,推测 50 °C条件下更利于象牙色克罗彭斯特德菌代谢产生酮类和酸类物质。

2.5 不同发酵天数固态发酵挥发性化合物差异分析

为找出不同发酵天数存在的特征差异化合物,分别对菌株 *K. eburnea* 1613、*K. eburnea* 1615、*K. eburnea* 6E22 发酵高粱挥发性物质进行不同发酵天数的差异分析,PLS-DA 显示挥发性化合物组成特点差异显著($P<0.05$) (图 9A)。经过 200 次置换验证, R^2 大于 Q^2 且 Q^2 的起点为负数,该参数证明 PLS-DA 模型是可靠的(图 9B)。使用 VIP 值大于 1 筛选出 26 种特征差异物质,使用 Z-score 标准化每种挥发性化合物并绘制聚类热图(图 9C)。1-烯-3-辛醇、2,3-二氢苯并呋喃和糠醛等在发酵第 0 天含量最高,糠醛被认为与酱香型白酒基酒焦糊味正相关^[37]。苯甲醛、 α -松油醇和 2-甲基吡嗪类物质在发酵第 4 天或第 7 天含量最高。 α -松油醇是萜烯类化合物,具有松木香,是酱香型白酒中重要的香气成分,可以让酒体更加优雅细腻^[23]。萜烯类、吡嗪类化合物可能在发酵过程中作为前体物质被转化为其他物质,有研究通过全基因组数据挖掘发现放线菌糖莱斯氏菌(*Laceyella sacchari*)具有四甲基吡嗪生物合成的完整途径^[38]。苯乙醇、异戊酸、异丁酸、乙酸苯乙酯和棕榈酸甲酯等

在发酵第 15 天时含量最高。乙酸苯乙酯和棕榈酸甲酯贡献了酒体中的花香、果香风味,属于高沸点物质,能够延长酒体后味^[39]。结果表明,象牙色克罗彭斯特德菌在堆积发酵的不同时间阶段能积累不同的风味化合物,可为生产中通过控制堆积发酵时间调控象牙色克罗彭斯特德菌的生长代谢提供理论参考。

3 结论

高温堆积发酵是酱香型白酒生产中必不可少的一环,直接影响酱香型白酒的质量和产量。本研究针对堆积发酵过程酒醅中的优势细菌属克罗彭斯特德菌属(*Kroppenstedtia*)进行分离筛选和代谢特征分析。经过形态特征及 16S rRNA 基因测序分析,共分离获得 3 株象牙色克罗彭斯特德菌(*K. eburnea*)。在 TSB 液体培养基 45 °C 纯培养条件下,3 株菌在 18 h 进入对数生长期,32 h 进入平稳期,36 h 时从菌液中检出的挥发性化合物主要是吡嗪类,其中菌株 *K. eburnea* 1613 的 2,5-二甲基吡嗪含量最高,为 5.26 mg/L,*K. eburnea* 1613 的挥发性化合物含量普遍高于其余 2 株菌。参考酱香型白酒堆积发酵条件,进行了恒温(45 °C 和 50 °C)固态发酵高粱实验,以研究它们在堆积酒醅中的生长和代谢特点。3 株菌发酵高粱中检出的挥发性化合物总量随发酵时间呈明显的上升趋势,主要为醇类和酸类,占比之和为 30.72%–84.01%,50 °C 发酵高粱中检出的醇类、酸类和吡嗪类物质含量均高于 45 °C 的,而酯类物质低于 45 °C 的。与对照相比,3 株菌均促进了含量最高的醇类物质苯乙醇和吡嗪类物质的 2,5-二甲基吡嗪产生,产量优势菌株分别是 *K. eburnea* 1615 和 *K. eburnea* 6E22;*K. eburnea* 1613 和 *K. eburnea* 1615 在酸类物质积累上表现出明显优势,主要为异戊酸,其次是己酸。对照组中主要的醛类

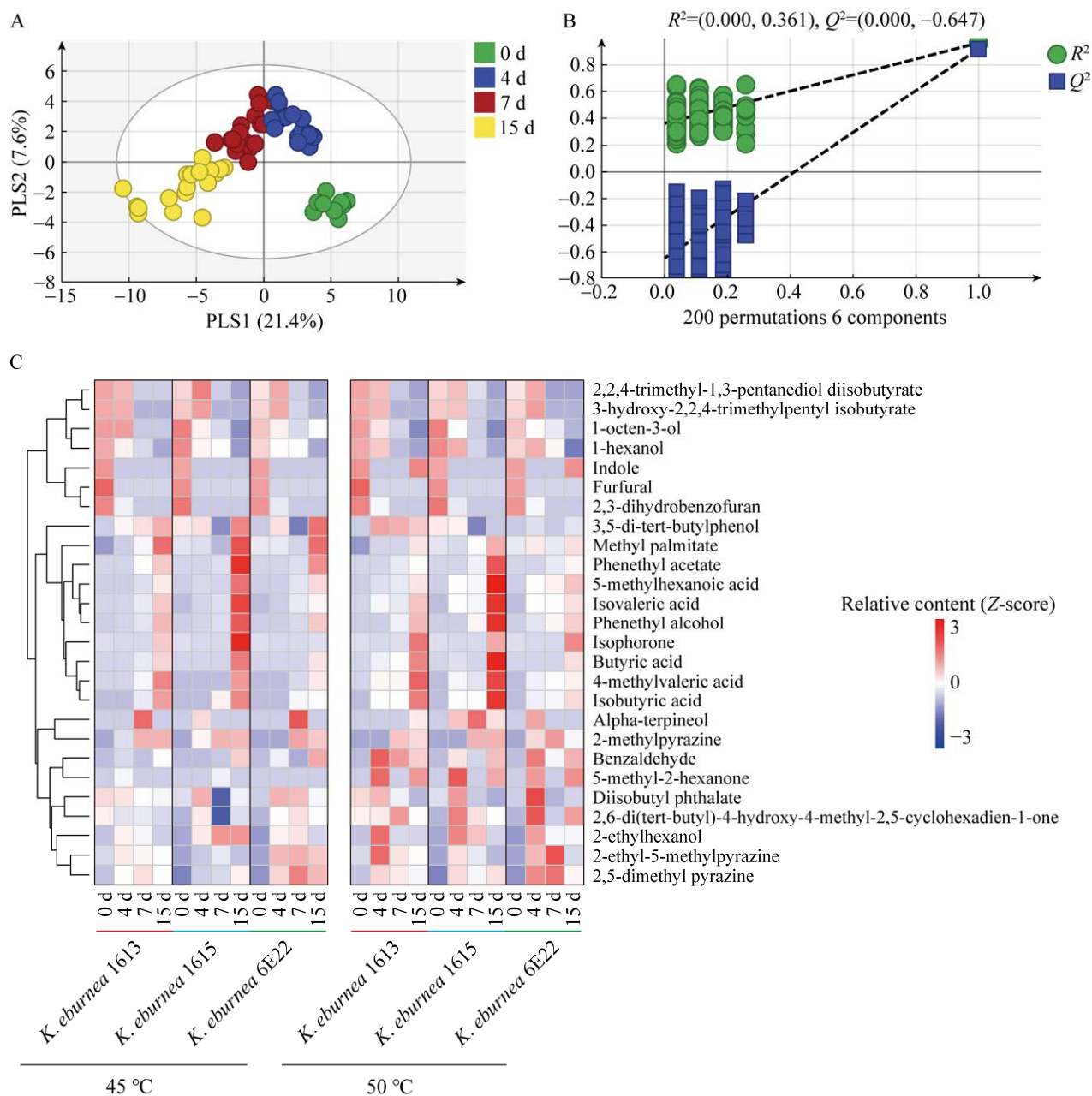


图 9 不同发酵天数高粱风味物质差异分析 A: PLS-DA 模型. B: 200 次置换检验. C: 特征差异物质聚类热图

Figure 9 Difference analysis of sorghum flavor substances in different fermentation days. A: PLS-DA model. B: 200 permutation test. C: Heat map of the representative differential volatile substances.

物质含量高于 3 个实验组，固态发酵过程中醛类总量较稳定，酮类在 15 d 时最高，值得注意的是，高温有助于对照组中醛类和酮类物质的

积累。菌株 *K. eburnea* 1615 在 45 °C 发酵 15 d 时酮类总量最高，是对照的 2.09 倍。PLS-DA 分析进一步显示不同发酵时间和温度下菌株固

态发酵高粱中挥发性化合物结构差异显著。本研究从菌株水平上探讨了象牙色克罗彭斯特德菌的风味物质代谢特征, 并分析了温度对发酵高粱中挥发性化合物积累的影响, 为认识高温堆积过程耐高温微生物在酱香型白酒风味形成中的作用提供理论基础。

参考文献

- [1] WANG MY, YANG JG, ZHAO QS, ZHANG KZ, SU C. Research progress on flavor compounds and microorganisms of Maotai flavor Baijiu[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(1): 6-18.
- [2] 周恒刚. 酱香型白酒生产工艺的堆积[J]. *酿酒科技*, 1999(1): 15-17.
ZHOU HG. Accumulation of production technology of Maotai-flavor liquor[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 1999(1): 15-17 (in Chinese).
- [3] WANG H, HUANG YG, HUANG YL. Microbiome diversity and evolution in stacking fermentation during different rounds of Jiang-flavoured Baijiu brewing[J]. *LWT*, 2021, 143: 111119.
- [4] YANG L, XIAN C, LI P, WANG XY, SONG DD, ZHAO L, ZHANG CL. The spatio-temporal diversity and succession of microbial community and its environment driving factors during stacking fermentation of Maotai-flavor Baijiu[J]. *Food Research International*, 2023, 169: 112892.
- [5] YANG L, FAN WL, XU Y. Qu-omics elucidates the formation and spatio-temporal differentiation mechanism underlying the microecology of high temperature Daqu[J]. *Food Chemistry*, 2024, 438: 137988.
- [6] SHI W, CHAI LJ, FANG GY, MEI JL, LU ZM, ZHANG XJ, XIAO C, WANG ST, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Spatial heterogeneity of the microbiome and metabolome profiles of high-temperature Daqu in the same workshop[J]. *Food Research International*, 2022, 156: 111298.
- [7] von JAN M, RIEGGER N, PÖTTER G, SCHUMANN P, VERBARG S, SPRÖER C, ROHDE M, LAUER B, LABEDA DP, KLENK HP. *Kroppenstedtia eburnea* gen. nov., sp. nov., a thermoactinomycete isolated by environmental screening, and emended description of the family *Thermoactinomycetaceae* Matsuo et al. 2006 emend. Yassin et al. 2009[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(Pt 9): 2304-2310.
- [8] YANG GQ, QIN DX, WU C, YUAN Y, ZHOU SG, CAI YF. *Kroppenstedtia guangzhouensis* sp. nov., a thermoactinomycete isolated from soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt_11): 4077-4080.
- [9] BELL ME, LASKER BA, KLENK HP, HOYLES L, SPRÖER C, SCHUMANN P, BROWN JM. *Kroppenstedtia pulmonis* sp. nov. and *Kroppenstedtia sanguinis* sp. nov., isolated from human patients[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2016, 109(5): 603-610.
- [10] CHEN B, WU Q, XU Y. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 179: 80-84.
- [11] ZHANG HX, WANG L, WANG HY, YANG F, CHEN LQ, HAO F, LV XB, DU H, XU Y. Effects of initial temperature on microbial community succession rate and volatile flavors during Baijiu fermentation process[J]. *Food Research International*, 2021, 141: 109887.
- [12] 熊子书. 酱香型白酒酿造[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 34-35.
XIONG ZS. Maotai-flavor Liquor Brewing[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1994: 34-35 (in Chinese).
- [13] ZHANG J, DU RB, NIU J, BAN SB, ZHANG YD, XU L, NIE HF, WU Q, XU Y. Daqu and environmental microbiota regulate fatty acid biosynthesis *via* driving the core microbiota in soy sauce aroma type liquor fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 408: 110423.
- [14] ZHU Q, CHEN LQ, PENG Z, ZHANG QL, HUANG WQ, YANG F, DU GC, ZHANG J, WANG L. The differences in carbohydrate utilization ability between six rounds of Sauce-flavor Daqu[J]. *Food Research International*, 2023, 163: 112184.
- [15] ZHU CT, CHENG YX, SHI QL, GE XY, YANG Y, HUANG YG. Metagenomic analyses reveal microbial communities and functional differences between Daqu from seven provinces[J]. *Food Research International*, 2023, 172: 113076.
- [16] YANG L, FAN WL, XU Y. Chameleon-like microbes promote microecological differentiation of Daqu[J]. *Food Microbiology*, 2023, 109: 104144.
- [17] WU SL, DU H, XU Y. Daqu microbiota adaptability to

- altered temperature determines the formation of characteristic compounds[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2023, 385: 109995.
- [18] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG XZ, CAI MY. *Handbook of Identification of Common Bacterial Systems*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [20] YARZA P, YILMAZ P, PRUESSE E, GLÖCKNER FO, LUDWIG W, SCHLEIFER KH, WHITMAN WB, EUZÉBY J, AMANN R, ROSSELLÓ-MÓRA R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12: 635-645.
- [21] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [22] KOEHLER PE, ODELL GV. Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1970, 18(5): 895-898.
- [23] FENG MX, HUO QJ, GAN LY, CHEN YF, XIAO DG, GUO XW. Effects of four strains of *Actinomycetes* on the content of terpenoids in Baijiu[J]. *Foods*, 2023, 12(7): 1494.
- [24] ZHANG HX, DU H, XU Y. Volatile organic compound-mediated antifungal activity of *Pichia* spp. and its effect on the metabolic profiles of fermentation communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(9): e02992-20.
- [25] DU JY, LI YM, XU JC, HUANG MQ, WANG J, CHAO JF, WU JH, SUN HB, DING HM, YE H. Characterization of key odorants in Langyatai Baijiu with Jian flavour by sensory-directed analysis[J]. *Food Chemistry*, 2021, 352: 129363.
- [26] HU YL, YANG Q, CHEN D, FU B, ZHANG Y, ZHANG Y, XIA X, PENG N, LIANG YX, ZHAO SM. Study on microbial communities and higher alcohol formations in the fermentation of Chinese Xiaoqu Baijiu produced by traditional and new mechanical technologies[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 109876.
- [27] HAZELWOOD LA, DARAN JM, van MARIS AJA, PRONK JT, DICKINSON JR. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(8): 2259-2266.
- [28] ZHEN D, LV M, CHEN MB, LUO JJ, LIU DQ. Effects of a mutated yeast plus addition of sucrose and nitrogen on the total higher alcohol levels of a plum wine fermentation[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2014, 20(4): 571-574.
- [29] 马宇, 黄永光. 清酱香型白酒挥发性风味组分及香气特征[J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 241-248.
MA Y, HUANG YG. Volatile components and aroma characteristics of Fen-Maotai-flavored liquor[J]. *Food Science*, 2019, 40(20): 241-248 (in Chinese).
- [30] PERESTRELO R, FERNANDES A, ALBUQUERQUE FF, MARQUES JC, CÂMARA JS. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: identification of the main odorants compounds[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 563(1/2): 154-164.
- [31] XU YQ, ZHAO JR, LIU X, ZHANG CS, ZHAO ZG, LI XT, SUN BG. Flavor mystery of Chinese traditional fermented Baijiu: the great contribution of ester compounds[J]. *Food Chemistry*, 2022, 369: 130920.
- [32] WANG Z, WANG Y, ZHU TT, WANG J, HUANG MQ, WEI JW, YE H, WU JH, ZHANG JL, MENG N. Characterization of the key odorants and their content variation in Niulanshan Baijiu with different storage years using flavor sensory omics analysis[J]. *Food Chemistry*, 2021, 376: 131851.
- [33] 张晓婕, 邱树毅, 王晓丹, 曾庆军, 何欢, 周鸿翔. 不同质量酱香型白酒的挥发性物质差异分析[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(10): 340-351.
ZHANG XJ, QIU SY, WANG XD, ZENG QJ, HE H, ZHOU HX. Difference analysis of volatile matter in different quality Maotai-flavor liquor[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(10): 340-351 (in Chinese).
- [34] YAN Y, CHEN S, NIE Y, XU Y. Quantitative analysis of pyrazines and their perceptual interactions in soy sauce aroma type Baijiu[J]. *Foods*, 2021, 10(2): 441.
- [35] FAN WL, QIAN MC. Characterization of aroma compounds of Chinese "Wuliangye" and

- “Jiannanchun” liquors by aroma extract dilution analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(7): 2695-2704.
- [36] 程度. 酿酒用高粱原料对酱香型白酒品质影响的初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2022.
CHENG D. Preliminary study on the influence of *Sorghum* raw materials for winemaking on the quality of Maotai-flavor liquor[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2022 (in Chinese).
- [37] 孙优兰, 骆红波, 王金龙, 程平言, 胡建锋, 汪地强. 酱香型白酒不同轮次基酒风味特征分析[J]. *食品与发酵工业*, 2023. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037173.
SUN YL, LUO HB, WANG JL, CHENG PY, HU JF, WANG DQ. Analysis of flavor characteristics of different rounds base liquor for Jiangxiangxing Baijiu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.037173 (in Chinese).
- [38] 田浩杰, 李豆南, 邱树毅, 周剑丽, 龙则河, 王珂佳, 刘茂强, 陈杰, 程度, 潘凤爽. 酱香大曲中高温放线菌的筛选及基因组解析[J]. *食品科学*, 2023, 44(18): 68-76.
TIAN HJ, LI DN, QIU SY, ZHOU JL, LONG ZH, WANG KJ, LIU MQ, CHEN J, CHENG D, PAN FS. Identification and genome analysis of *Laceyella sacchari* FBKL4.014 isolated from Moutai-flavor Daqu[J]. *Food Science*, 2023, 44(18): 68-76 (in Chinese).
- [39] 熊小月, 李利利, 马宇, 黄永光, 尤小龙, 程平言. 酱香白酒酿造轮次醇甜典型体基酒风味解析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(13): 261-267.
XIONG XY, LI LL, MA Y, HUANG YG, YOU XL, CHENG PY. Flavor analysis of alcohol-sweetness typical body base Baijiu in sauce-flavor Baijiu from fermentation rounds[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(13): 261-267 (in Chinese).