

# 酱香白酒堆积发酵过程酒醅中酵母菌的分析研究

黄永光<sup>1</sup>, 谌永前<sup>1</sup>, 吴广黔<sup>1</sup>, 杨国华<sup>1</sup>, 张肖克<sup>1</sup>, 黄平<sup>1</sup>, 姜莹<sup>1</sup>, 徐兴绿<sup>2</sup>

(1. 贵州省轻工业科学研究所, 贵州 贵阳 550007; 2. 贵州平坝窖酒厂, 贵州 平坝 561100)

**摘要:** 采用 WL 培养基对酱香型白酒生产堆积发酵过程酒醅中的酵母菌进行分离、形态学初筛和 PCR 产物扩增及 26S rDNA 定性鉴定分析, 并对其中所获取的部分优选菌株的发酵性能及其发酵代谢风味成分贡献进行研究。结果表明, 从堆积酒醅中共分离鉴定出 *S.cerevisiae*, *Z.bailii*, *R.mucilaginosa*, *K.exigua*, *I.orientalis*, *P.membranifaciens*, *S.pombe*, *D.hansenii*, *G.geotrichum* 等属种酵母; 1#、3#、4#、8#、9# 菌株对温度的耐受性较强, 1#、2#、3# 和 8# 具有较好的耐酒精特性; 6#、2# 和 4# 对酸环境的耐受性比较强; 1#、4#、6#、11#、12# 和 13# 菌发酵启动快, CO<sub>2</sub> 释放总量大, 发酵残糖低; *S.cerevisiae*、*K.exigua*、*I.orientalis*、*Z.bailii*、*G.geotrichum*、*Sch.pombe*、*K.exigua* 的几类酵母对酒体风味的贡献大。

**关键词:** 酱香型白酒; 堆积发酵; 酵母; 变化规律; 耐受性; 发酵性能; 风味成分

中图分类号: TS262.33; TS261.4; TS261.1; Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2013)06-0008-06

## Analysis of Yeast Strains in Fermented Grains during Stacking Fermentation of Jiang-flavor Liquor

HUANG Yongguang<sup>1</sup>, CHEN Yongqian<sup>1</sup>, WU Guangqian<sup>1</sup>, YANG Guohua<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoke<sup>1</sup>,

HUANG Ping<sup>1</sup>, JIANG Ying<sup>1</sup> and XU Xinglu<sup>2</sup>

(1. Guizhou Provincial Light Industry Scientific Research Institute, Guiyang, Guizhou 550007;

2. Guizhou Pingba Distillery, Pingba, Guizhou 561100, China)

**Abstract:** In this study, the separation of yeast strains from fermented grains during stacking fermentation of Jiang-flavor liquor, its morphological screening, PCR amplification, and 26S rDNA qualitative identification were operated by use of WL culture medium, and the fermenting performance of some quality strains obtained in the experiments and their contributions to Jiang-flavor were investigated. The results showed that *S.cerevisiae*, *Z.bailii*, *R.mucilaginosa*, *K.exigua*, *I.orientalis*, *P.membranifaciens*, *S.pombe*, *D.hansenii*, *G.geotrichum* etc. were separated from fermented strains, strain 1#, 3#, 4#, 8# and 9# could tolerate high temperature, strain 1#, 2#, 3# and 8# could tolerate high alcohol content, strain 6#, 2# and 4# could tolerate high acid content, and strain 1#, 4#, 6#, 11#, 12# and 13# could start fermentation rapidly and release more CO<sub>2</sub> with low residual sugar. Several yeast strains including *S.cerevisiae*, *K.exigua*, *I.orientalis*, *Z.bailii*, *G.geotrichum*, *Sch.pombe*, *K.exigua* made more contributions to Jiang-flavor of liquor. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** Jiang-flavor liquor; stacking fermentation; yeast; change rules; tolerance; fermenting performance; flavoring compositions

堆积发酵是酱香型白酒生产的特殊工序环节, 通过堆积可以实现网罗和富集微生物, 特别是为入窖发酵富集酵母菌。已有研究表明, 在堆积过程中酵母数量实现了显著性的增长, 而且增长速度比细菌和霉菌快。在堆积发酵过程由于堆积酒醅各位点环境物态参数的差异, 导致其微生态变化也不尽相同。唐玉明<sup>[1-2]</sup>等研究表明, 堆上、堆中和堆心在 24 h 后酵母菌就增值达到高峰。王贵军<sup>[3]</sup>等研究也表明, 在堆积过程酵母的生物量得到大量增加。这些都是对堆积过程酵母类微生物的微生态变

化规律所进行的研究, 类似的研究也比较多。要了解在堆积过程中酵母菌的功能作用, 除了认识其生态变化规律外, 更需要对其微观种类的变化及其定性进行分析, 从而实现更清晰的认识堆积发酵机理和堆积过程酵母菌的功能机理作用, 其中首当其冲的是对复杂酵母群落中类种属的认识。熊子书<sup>[4-6]</sup>等在茅台试点时从堆积酒醅中分离出了卡尔斯伯酵母、酿酒酵母、白地霉、假丝酵母、粟酒裂殖酵母、球拟酵母、毕赤酵母、掷孢酵母等; 范光先<sup>[7-10]</sup>等从堆积发酵酒醅中分离获得酿酒酵母、克鲁斯假丝酵母、

基金项目: 贵州省工业攻关项目(黔科合 GZ 字(2011)3015); 贵州省工业攻关项目黔科合 GY 字(2011)3052。

收稿日期: 2013-05-17

作者简介: 黄永光(1976-), 男, 贵州人, 高级工程师, 硕士生导师, 发酵工程在读博士, 贵州省酿酒工业协会副秘书长, 贵州省白酒评委, 贵州省白酒专家委员会专家。主要从事白酒发酵工艺优化, 微生物及其应用; 产品品质控制与白酒品评; 行业产业政策及其经济分析研究; 科技期刊编辑出版等工作; 发表论文 50 多篇。

汉逊酵母、异常汉逊酵母、丝孢酵母、假丝酵母、白地霉等;庄名扬<sup>[11]</sup>等在酱香型白酒堆积酒醅中分离获得多种酵母属酵母,如假丝酵母、红酵母、白地霉等。

本研究对酱香型白酒堆积发酵过程酒醅中酵母类微生物进行跟踪分析,采用 WL 培养基对堆积酒醅中的酵母先进行分离、形态学特征鉴别初筛,再进行 26S rDNA 分子鉴定。并从分离鉴定菌株中优选部分代表菌株进行生产主要影响因子参数的耐受性考察,以及菌株发酵力考察和发酵代谢产风味成分分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株分离

#### 1.1.1 样品

酒醅:贵州某酒厂堆积发酵酒醅。

#### 1.1.2 培养基

WL 培养基(%):培养基成分参考文献<sup>[12]</sup>,培养基 pH 值为 6.5,121 °C 灭菌 20 min。灭菌后在培养基中加入 100 mg/L 青霉素。

#### 1.1.3 方法

取各采样点混合样 10 g 酒醅于装有 90 mL 无菌生理盐水的三角瓶中(瓶中装有少许玻璃珠),摇床 200 r/min 振荡浸提 15 min。取上清液,梯度稀释后各取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  浓度梯度菌液 0.1 mL 涂布平板培养,各平板作 3 次重复。

培养条件:30 °C 培养 4 d。

计数:每个平板菌落数在 30~300 个内有效。

### 1.2 形态特征与分子鉴定分析

#### 1.2.1 形态特征

根据平板上菌落特征,分别挑取单菌落进行重复稀释涂布培养观察形态特征差异;液态稀释培养电镜观察形态。

#### 1.2.2 分子水平鉴定

提取酵母基因组及 PCR 扩增。基因组提取及 PCR 扩增与序列分析送上海生工分析。26S rDNA 分子鉴定,引物为 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。

将送样分析菌株的 26S rDNA D1/D2 区域序列在 GenBank 数据库中进行同源序列(BLAST search)比对分析,对分离菌株进行属种鉴定<sup>[13-16]</sup>。

### 1.3 生产主要条件参数应激性分析

取 1 mL 酵母接种菌液于装有 50 mL YPD 的液体培养基中,以 150 r/min 培养 48 h。利用酶标仪测定 600 nm 处菌液的 OD<sub>600</sub> 值,以此等效比较不同培养条件下的菌体浓度,此值越大说明应激性越强。

#### 1.3.1 温度耐受性

YPD 液体培养基,121 °C 灭菌 20 min,分别接种 1 mL 对数期培养菌液于装有 50 mL YPD 液体培养基的三角

瓶中,分别于 30 °C、35 °C、40 °C、45 °C 和 48 °C,150 r/min 培养 48 h,测定 600 nm 处菌液的 OD<sub>600</sub> 值,比较分析菌株对温度的应激性。

#### 1.3.2 酒精浓度耐受性

YPD 液体培养基,121 °C 灭菌 20 min,冷却后,用无水乙醇分别配制成 4 %vol、6 %vol、8 %vol、10 %vol、12 %vol 和 14 %vol 梯度酒精浓度液体培养基,分别接种 1 mL 对数期培养菌液于装有 50 mL YPD 液体培养基的三角瓶中,30 °C、150 r/min 培养 48 h,测定 600 nm 处菌液的 OD<sub>600</sub> 值,考察菌株对酒精浓度的应激性。

#### 1.3.3 酸环境耐受性

YPD 液体培养基,121 °C 灭菌 20 min,冷却后,用乳酸分别配制成 2.0 % (v/v)、4.0 % (v/v)、8.0 % (v/v)、10.0 % (v/v)、12.0 % (v/v) 梯度液体培养基,分别接种 1 mL 对数期培养菌液于装有 50 mL YPD 液体培养基的三角瓶中,30 °C 培养 48 h,测定 600 nm 处菌液的 OD<sub>600</sub> 值,考察各菌株对环境酸度的应激性。

### 1.4 代表菌株发酵力分析

培养基:高粱汁培养基,10 °Bx,培养基初始葡萄糖浓度为 80.00 g/L。

培养条件:250 mL 三角瓶装 100 mL 培养基,接种量 2 % (初始细胞浓度为  $10^6$  个/mL),装好发酵栓并称重,30 °C 恒温培养,间隔 12 h 取样称重分析,记录失重,以失重量小于 0.3 g 为终止点停止培养取样。

### 1.5 代表菌株发酵代谢风味成分分析

#### 1.5.1 发酵代谢风味成分分析

培养基:YPD 液体培养基。

取 1 mL 对数期培养菌液,接种于装有 20 mL YPD 液体培养基的 150 mL 三角瓶中,培养基初始接种菌浓度为  $10^6$  CFU/mL,30 °C、200 r/min 培养 48 h。

#### 1.5.2 样品预处理

发酵液以 8000 r/min 离心 10 min。取 8 mL 上清液于装有 2.8 g NaCl 的顶空进样瓶中,加入内标,上样分析。

#### 1.5.3 HS-SPME-GC-MS 分析<sup>[17-18]</sup>

顶空固相微萃取(Head-Space Solid Phase Extraction)条件:50 °C 预热 5 min,萃取吸附 45 min,GC 解吸 5 min。

GC 条件:三相萃取头。GC 升温程序:50 °C 保持 2 min,以 4 °C/min 升至 230 °C,保持 15 min;进样口温度 250 °C,载气 He,流速 2 mL/min;进样量 1 μL,不分流。

MS 条件:EI 电离源,离子源温度 230 °C,电子能量 70 eV,扫描范围为 35.00~350.00 amu。

#### 1.5.4 定性与半定量分析

测定化合物通过与 NIST05a.L Database (Agilent Technologies Inc) 进行检索比对分析,并通过计算相应的保留指数(RI)进行确认。化合物含量采用内标法进行半定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 堆积过程酒醅中酵母菌变化

按实验设计方法对酒醅中的酵母进行分离计数分析。从分离过程来看,在 WL 平板上不同种属的酵母间形态特征差别比较明显,分离计数的有效性明显。酒醅堆积发酵过程各采样点酒醅中的酵母菌变化情况见图 1。

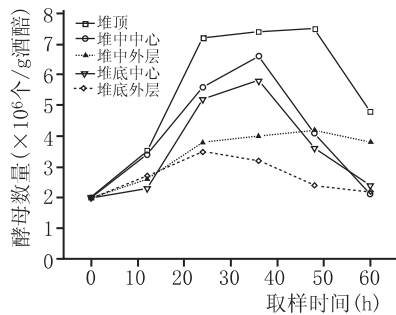


图 1 堆积过程酒醅中的酵母菌总量变化结果

图 1 表明,随着发酵时间的推进,发酵酒醅堆中各层面、各部位的酵母菌总量呈现明显差异,主要原因在于堆子中各部位的温度、酸度和氧浓度的差异,使酵母生长的环境因子发生改变和出现不同,这与对各位点的温度监测和氧浓度监测结果一致(另文发表),同时也与谭宏等的研究报道一致<sup>[19]</sup>。图 1 结果还充分说明了堆积发酵过程生态因子的变化规律与微生物生长生物量的量变规律的一致性<sup>[20-22]</sup>。同时,各采样点酒醅的酵母类别分析结果还表明,各位点微生物种类的变化也不一样(另文专叙)。

### 2.2 酵母菌定性鉴定

#### 2.2.1 分离及其形态特征

通过 WL 培养基进行分离及其形态特征初筛,可将酒醅中酵母菌菌落形态差异分成 15 种类别,结合真菌手册对酵母菌进行初步鉴定。为了进一步对经形态特征初筛鉴别所分离获得的酵母菌株进行种属鉴定,对酵母菌株进行 PCR 产物扩增及 26S rDNA 定性比对分析。

#### 2.2.2 PCR 产物扩增及 26S rDNA 测序

对利用 WL 培养基初筛所获得的 15 种形态特征差异的代表株进行 26S rDNA 分子测序分析鉴定,共定性鉴定出以下种属菌株(表 1)。

从表 1 可知,经 WL 培养基分离、形态学初筛及其 26S rDNA 分子鉴定,从堆积发酵酒醅中分离并鉴定到属种的酵母有:*Saccharomyces cerevisiae*,*Zygosaccharomyces bailii*,*Pichia membranifaciens*,*Schizosaccharomyces pombe*,*Rhodotorula mucilaginosa*,*Kazachstania exigua*,*Debaryomyces hansenii*,*Issatchenkia orientalis*,*Galactomyces geotrichum*,*Candida krusei*,*Trichosporon yeast*,*Carl Bloomsbury yeast*,*Torulopsis*,*Throw toruloides*,*Hyphichia Burtoniiai*。该结果与范光先等人的研究结果有相似性<sup>[23-26]</sup>。这充分表明,酱香型白酒堆积发酵过程酒醅中酵母菌的多态性非常丰富,是有别于其他香型白酒发酵及其酵母体系

表 1 部分菌株 26S rDNA 序列相似性分析结果

菌株类别	名称	相似度(%)
MY-I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
MY-II	<i>Kazachstania exigua</i>	99
MY-III	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99
MY-IV	<i>Galactomyces geotrichum</i>	99
MY-V	<i>Hyphichia Burtoniiai</i>	98
MY-VI	<i>Pichia membranifaciens</i>	99
MY-VII	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	99
MY-VIII	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99
MY-IX	<i>Torulopsis</i>	99
MY-X	<i>Debaryomyces hansenii</i>	97
MY-XI	<i>Issatchenkia orientalis</i>	99
MY-XII	<i>Candida krusei</i>	99
MY-i	<i>Trichosporon yeast</i>	98
MY-ii	<i>Carl Bloomsbury yeast</i>	98
MY-iii	<i>Throw toruloides</i>	99

的差异性特征,也是形成香型白酒风格之间差异的原因。

### 2.3 生产主要条件参数应激特性分析

选取分离鉴定出的酵母菌株首先进行闻香发酵实验,从中优选具有明显产香的菌株作为种属代表菌株进行后续研究。本节实验选取了 10 株菌进行生产主要条件参数的应激特性实验。按 1.3 节方法进行不同种类酵母代表株的生产条件适应性实验,其结果见图 2~图 4。

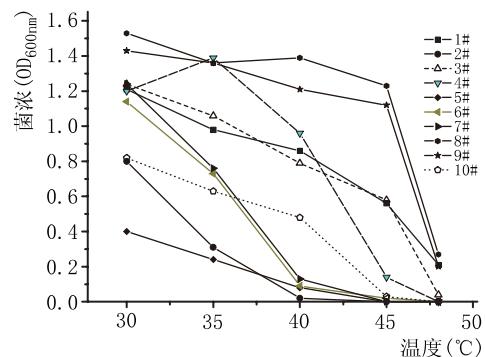


图 2 不同酵母菌对温度的应激性反应

从图 2 可以看出,不同类别的酵母对温度、乙醇浓度和酸度的应激特性存在明显差异。其中 1#、3#、4#、8#、9# 菌株对温度的耐受性较强,能够适应高温堆积工艺过程高温的应激,实现良好生长和发挥功能作用,其分别为 *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *I. orientalis*, *G. geotrichum* 和 *P. membranifaciens* 的代表株。

堆积过程虽然不是产酒精的主要过程,但入窖后是否能进行生长和发酵代谢,以及发挥酵母菌的功能作用,这主要看菌株是否对酒精具有较强的耐受性,耐受性强在窖内的力挺时间长,对发酵产酒和增香贡献就大。从图 3 可以看出,1#、2#、3# 和 8# 菌株具有较好的耐酒精特性,特别是 1#、2# 和 8# 能耐受 12%vol 的酒精浓度。几株菌分别为 *S. cerevisiae*, *Z. bailii* 和 *I. orientalis* 的代表

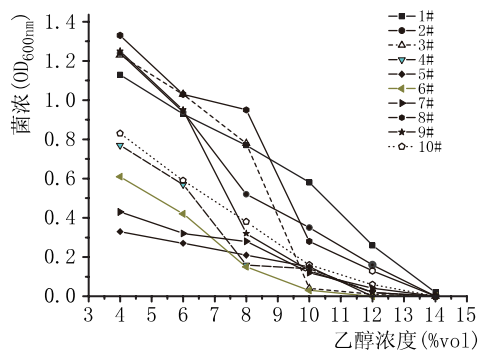


图3 不同酵母菌对乙醇浓度的应激性反应

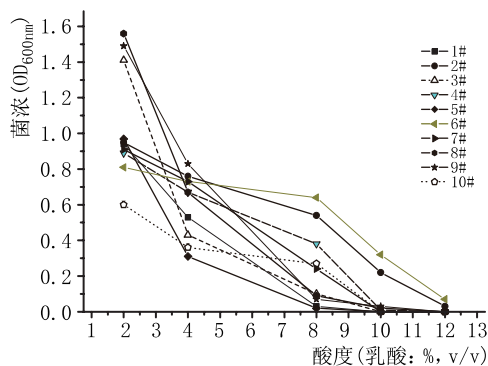


图4 不同酵母菌对酸度的应激性反应

菌株。图4表明,6#、2#和4#菌株对酸的耐受性比较强,特别是6#和2#。其分别是 *K.exigua* 和 *Z.bailii* 的代表菌株<sup>[27-29]</sup>。以上研究结果与本课题组对窖期窖内酵母菌的跟踪分析结果具有一定的吻合度(另文刊发)。

#### 2.4 不同种属酵母代表菌株发酵力分析

酵母菌在酿酒过程其主要功能是进行厌氧发酵产酒精,进行堆积工序目的是进行二次制曲,主要为网罗、富集窖池厌氧发酵产酒精的主体动力功能菌酵母。因此,酵母菌的发酵力特性往往是筛选功能酵母的主要指标。本节也优选了15株酵母菌进行发酵力实验,主要考察指标为CO<sub>2</sub>的释放总量和发酵残糖,其结果见图5和图6。

从图5结果可看出,1#、4#、6#、10#、11#、12#和13#菌株在发酵过程中的CO<sub>2</sub>释放总量较高,一方面说明这几株代表菌发酵起酵快,另一方面说明这几株菌发酵能力强;再从图6来看,1#、4#、6#、11#、12#和13#菌的发酵残糖很低,也进一步说明这几株菌对糖的利用效率高,发酵力强。这与1#、4#、6#、11#、12#和13#菌发酵过程CO<sub>2</sub>的释放总量一致。这几株菌主要为 *S.cerevisiae*、*S.pombe*、*K.exigua*、*G.geotrichum*、*I.orientalis*、*Candida krusei* 酵母菌的代表株。酵母菌株的发酵力与残糖都是评价功能发酵菌株的指标,本实验结果充分说明从堆积酒醅中所分离得的这几株菌具有明显的发酵偶联动力学特征<sup>[30-32]</sup>。

#### 2.5 代表菌株发酵代谢风味成分分析

酵母在白酒酿酒过程中不但是发酵动力和产酒精的

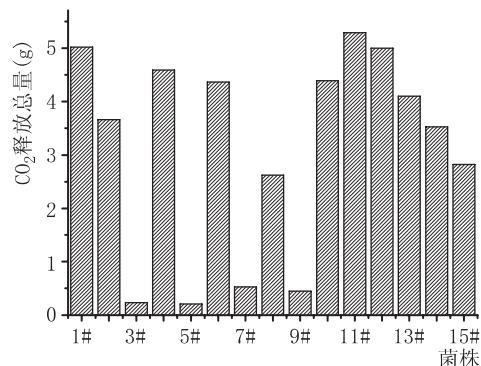
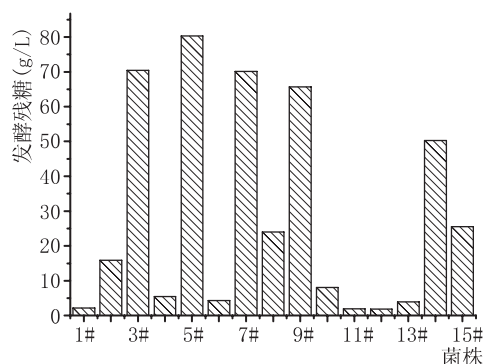
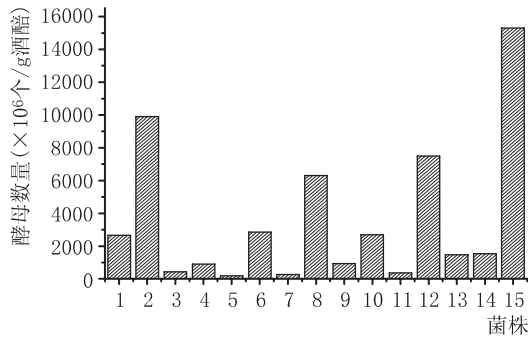
图5 不同酵母菌发酵CO<sub>2</sub>释放量

图6 不同酵母菌发酵残糖情况

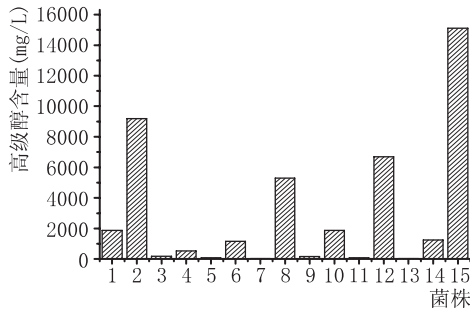
缔造者,同时也是风味成分的生产者。在发酵过程酵母菌利用碳源和氮源及其他无机盐在实现生长的同时进行代谢,产生丰富的低级醇类和酸类成分。为后期的酯类和高级醇、大分子酸的生产提供了丰富的初级代谢产物。这就是为什么存在风味功能酵母和普通酵母的差异。图7为优选的15株代表菌的发酵代谢风味成分检测结果,主要分析了所选15株酵母在YPD液体培养基中发酵代谢产风味成分的基本情况。

从图7中的A~E图可看出,不同种属酵母发酵代谢产生的挥发性风味物质存在明显差异。其中,2#和15#菌株产生的挥发性风味成分总量最高,特别是高级醇含量尤其高(图B),其次是12#和8#菌株。图7中的图C、图D表明,各菌株所代谢产的酸、酯之间没有明显的化学反应关系(只有6#菌所产的酸和酯均高),这充分说明:一方面不同属种酵母菌株在发酵过程彼此之间代谢的初级产物存在明显差异;另一方面表明液态发酵与固态发酵体系对风味成分,特别是在次生风味成分的富集方面存在明显差异,这可能就是中国传统固态发酵方式对传统白酒中丰富的风味成分所贡献的特殊性;再者,更是说明了中国白酒混菌发酵对中国传统白酒风味的特殊贡献。在挥发性风味成分分析测定分析过程中检测到一定量的醛类物质,其中15#、11#、7#和14#菌株对醛类的贡献度较大,其最高可达89.1 mg/L。

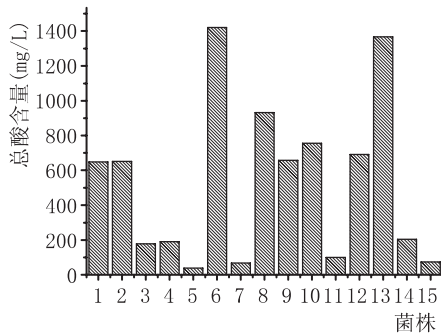
从风味成分的整体分析来看,其中 *S.cerevisiae*、*K.exigua*、*I.orientalis*、*Z.bailii*、*G.geotrichum*、*Sch.pombe*、*K.*



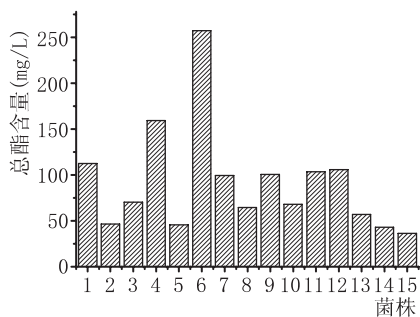
A 总挥发性物质含量



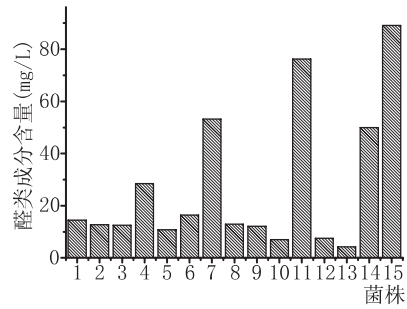
B 高级醇含量



C 总酸含量



D 总酯含量



E 醛类物质总含量

图7 不同种属酵母菌株 YPD 发酵代谢产挥发性风味物质情况

### 3 结论

3.1 通过 WL 培养基对酱香型白酒生产堆积发酵酒醅中的酵母进行分离、形态学初筛和 PCR 产物扩增及 26S rDNA 分析定性鉴定。从堆积酒醅中共分离鉴定出 *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, *P. membranifaciens*, *S. pombe*, *R. mucilaginosa*, *K. exigua*, *D. hansenii*, *I. orientalis*, *G. geotrichum* 等属种酵母。该分离鉴定结果与已有的研究报道基本一致,这些微生物都是白酒酿造过程的发酵动力,具有明显的多态性特征<sup>[34-38]</sup>。

3.2 不同类别酵母对温度、乙醇浓度和酸度的应激特性实验表明 1#、3#、4#、8#、9# 菌株对温度的耐受性较强; 1#、2#、3# 和 8# 具有较好的耐酒精特性(耐酒精浓度达 12% vol); 6#、2# 和 4# 对发酵环境酸度的耐受性比较强。

3.3 1#、4#、6#、11#、12# 和 13# 菌株在发酵过程启酵快, CO<sub>2</sub> 释放总量较高, 发酵残糖较低, 为生产上的高效功能发酵菌株。

3.4 风味成分研究结果表明, *S. cerevisiae*, *K. exigua*, *I. orientalis*, *Z. bailii*, *G. geotrichum*, *Sch. pombe*, *K. exigua*, *C. krusei* 等几类酵母对风味的贡献最大。含量较高风味成分有 2,3-丁二醇、醋酸、棕榈酸乙酯、苯乙酸乙酯、亚油酸乙酯、乙酸、己酸、庚酸、异丁酸、乙醛、糠醛<sup>[30-40]</sup>。

3.5 本研究结果不仅对酱香型白酒堆积发酵过程酒醅中的酵母菌作了比较清楚的分析, 对部分种属代表菌株的基本性能研究也为今后白酒生产的生物优化技术、发酵控制技术和机械化技术发展都提供了基础理论依据和参考。

### 参考文献:

- [1] 唐玉明, 任道群, 姚万春, 等. 酱香型酒糟醅堆积过程温度和微生物区系变化及其规律性[J]. 酿酒科技, 2007(5): 54-58.
- [2] 任道群, 唐玉明, 姚万春, 等. 酱香型酒糟醅酵母菌的初步分类及选育[J]. 酿酒, 2007, 34(6): 44-45.
- [3] 王贵军, 沈才洪, 张洪远, 等. 酱香型白酒糟醅堆积与窖内发酵工艺研究[J]. 酿酒科技, 2011(5): 36-37.
- [4] 熊子书. 贵州茅台酒调查研究的回眸[J]. 酿酒科技, 2000(4): 26-29.

*exigua*, *G. geotrichum*, *C. krusei* 几类酵母的代表菌株对挥发性风味成分的贡献度最大。代谢产生的风味成分含量较高的有 2,3-丁二醇(5957.5 mg/L)、醋酸(11887.5 mg/L)、棕榈酸乙酯(66.8 mg/L)、苯乙酸乙酯(53.5 mg/L)、亚油酸乙酯(137.2 mg/L)、乙酸(599.8 mg/L)、己酸(29.3 mg/L)、庚酸(270.2 mg/L)、异丁酸(149.9 mg/L)、乙醛(53.3 mg/L)、糠醛(81 mg/L)<sup>[33]</sup>。

- [5] 熊子书. 中国三大香型白酒的研究(二)酱香·茅台篇[J]. 酿酒科技, 2005(4): 25-31.
- [6] 周恒刚. 酱香型白酒生产工艺的堆积[J]. 酿酒科技, 1999(1): 15-17.
- [7] 范光先, 王和玉, 崔同弼, 等. 茅台酒生产过程中的微生物研究进展[J]. 酿酒科技, 2006(10): 75-77.
- [8] 陈兴唏, 季克良. 茅台酒的独特性概述[J]. 酿酒科技, 2006(2): 79-84.
- [9] 郭坤亮. 茅台酒酿造微生物的生物多样性成因及研究价值的探讨[J]. 酿酒, 2002, 29(2): 36-38.
- [10] 蒋红军. 茅台酒生态环境中酿造微生物多样性的研究及展望[J]. 酿酒, 2003, 30(4): 23-24.
- [11] 庄名扬, 孙达孟. 酱香型白酒高温堆积糟醅中酵母菌分离、选育及其分类学鉴定[J]. 酿酒, 2003(2): 12-13.
- [12] Pallmann, C L, Brown, J A, Olineka, T L, Cocolin, L, Mills, D A and Bisson, L F. Use of WL medium to profile native flora fermentations[M]. *Am J Enol Vitic*, 2001, 52: 198-203.
- [13] Baleiras Couto, M, Reizinho, R and Duarte, F. Partial 26s r DNA restriction analysis as a tool to characterize non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations[M]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 102: 49-56.
- [14] Guo, H. Isolation and identification of *Monascus* in super-mature vinegar Daqu[J]. *China Food Addit.* (in Chinese), 2006, 3: 99-103.
- [15] Mu, W, Yu, R and Yuan, Z. Study on the isolation of yeast and its characteristics[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2004, 31: 29-30.
- [16] Wu, J, Yu, L, Wang, C, Chen, M, Zhang, M, Zhou, X, Zhang, A, Guo, K and Ji, K. Isolation purification and certification on the level of genus three high-temperature-resistant mold strains in Maotai Daqu[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2007(3): 17-19.
- [17] Luo, T, Fan, W and Xu, Y. Characterization of volatile and semi-volatile compounds in Chinese rice wines by head-space solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Inst Brew*, 2008, 114, 172-179.
- [18] Zhu, S, Lu, X, Ji, K, Guo, K, Li, Y, Wu, C and Xu, G. Characterization of flavor compounds in Chinese liquor Moutai by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 597, 340-348.
- [19] 谭宏, 郭坤亮, 林忠义. 无线传感器网络技术茅台酒生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2011(1): 54-57.
- [20] Jiang, H and Fan, G. Relationship between microbe and the protein-decomposing abilities[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2003, 1, 25-27.
- [21] Leimena, M M. Microbial ecology and functionality of traditional fermentation starter "Daqu" for Chinese liquor production[M]. In: *Laboratory of Food Microbiology*, Wageningen University: Wageningen, 2008, 1-74.
- [22] Qin, H. The evolution history and development trend of distilled liquor in China[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2000, 5, 24-30.
- [23] Q Wu, Y Xu and L Chen. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavour liquor making[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55, 301-307.
- [24] Li, X, Ma, E, Yan, L, Meng, H, Du, X, Zhang, S and Quan, Z. Bacterial and fungal diversity in the traditional Chinese liquor fermentation process[J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 146, 31-37.
- [25] Yang, D, Fan, G, Wang, D and Lu, Y. Microbes in high temperature starter[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2007, 5: 37-38.
- [26] Wu, Y. Analysis of distiller's yeast microbes and research on liquor flavour type[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2004(5): 38-39.
- [27] 黄永光, 黄旭, 黄平. 茅台酒酿酒极端环境与极端酿酒微生物[J]. 酿酒科技, 2006(12): 47-50.
- [28] 崔利. 形成酱香型酒风格质量的关键工艺是“四高两长, 一大一多”[J]. 酿酒, 2007, 34(3): 24-33.
- [29] 江鹏, 蒋红军, 王和玉, 张珍良. 酱香型白酒堆积发酵过程中腰线的形成机理[J]. 酿酒科技, 2004, 126(6): 43-44.
- [30] Jiang, H. Evolvement rules & action rules of microorganism in starter-making and fermentation of Maotai liquor[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2004(3): 39-40.
- [31] Wan, Z. Changes of microbes and enzymes during Daqu culture process[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2004(4): 25-26.
- [32] Wu, Z, Zhang, W, Zhang, Q, Hu, C, Wang, R and Liu, Z. Developing new sacchariferous starters for liquor production based on functional strains isolated from the pits of several famous Luzhou-flavor liquor brewers[J]. *J. Inst. Brew.*, 2009, 115, 111-115.
- [33] Xiong, Z. Research on three flavour type liquors in China (2) Introduction to Maotai-flavour liquor[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2005(4): 25-30.
- [34] 刘晓光, 谢和, 屈直. 酱香型白酒风味物质的形成与微生物关系的研究现状与进展[J]. 贵州农业科学, 2007, 35(2): 131-134.
- [35] 杨国华, 邱树毅, 黄永光. 酱香白酒生产中产香微生物研究[J]. 中国酿造, 2011(4): 24-27.
- [36] 杨国华, 邱树毅, 黄永光. 酱香大曲中产香细菌发酵产蛋白酶的条件优化[J]. 中国酿造, 2011, 237(12): 47-50.
- [37] Wu, X. Separation, purification and identification of mold in Xiaoqu[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2004, 6, 33-34.
- [38] Wang, C, Shi, D and Gong, L. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese Maotai-flavor liquor[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008(24): 2183-2190.
- [39] Xu, Y and Ji, K. Moutai (Maotai): production and sensory properties[M]. In *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research* ed. Piggott, J. Cam-bridge: Woodhead Publishing Limited, 2012, 315-330.
- [40] Fu, J. Chinese ancient liquor-making site and unearthed ancient wine culture[J]. *Liquor-making Sci. Technol.* (in Chinese), 2004, 6, 90-92.