

# 一株膜璞毕赤酵母的生理特性及其代谢产物研究

姚翠萍,王和玉,林琳,刘玄,王莉

(贵州茅台酒股份有限公司技术中心,贵州 仁怀 564501)

**摘要:** 从茅台酒入窖酒醅中分离得到一株膜璞毕赤酵母。对其在不同碳源、不同 pH 值、不同温度下的生长生理特性进行研究,并对其不同底物、不同温度条件下的液态发酵代谢产物进行分析,其主要代谢产物为酸、醇、酯以及一些特殊呈香物质。

**关键词:** 微生物; 膜璞毕赤酵母; 液态发酵; 代谢产物; 茅台酒风味

**中图分类号:** Q93-3; TS261.1; TS262.33

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-9286(2011)07-0057-03

## Analysis of the Physiological Characteristics and the Metabolites of A *Pichia Membranifacien* Strain

YAO Cuiping, WANG Heyu, LIN Lin, LIU Xuan and WANG Li

(Technical Center of Guizhou Maotai Co.Ltd, Renhuai, Guizhou 564501, China)

**Abstract:** A *Pichia membranifacien* yeast strain was isolated from pit entry fermented grains of Maotai liquor. Its growth and physiological properties under different carbon source, different pH values, and different temperature were investigated. And its metabolites by liquid fermentation at different temperature were analyzed and the results indicated that its main metabolites included acids, alcohols, esters, and some special aroma-producing substances.

**Key words:** microbe; *Pichia membranifaciens*; liquid fermentation; metabolites; Maotai-flavor

白酒生产过程要形成香型风格不同的白酒,关键过程是生香,香味物质的不同决定了白酒香型的不同;而生香的关键是白酒酿造工艺及发酵过程中微生物体系的差异。茅台酒幽雅细腻、丰满醇厚的风格形成除高温大曲中芽孢杆菌起了重要作用外,与高温堆积、网罗环境中诸如酵母菌类微生物也密切相关。

据文献报道,膜璞毕赤酵母对酒有明显的增香作用,其亦存在于大曲、酱菜、酱油等发酵食品生产中,常用于白酒、酱油、食醋、酱菜等食品的风味改善。从茅台酒生产环境中分离得到 1 株酵母菌,经鉴定为膜璞毕赤酵母,它几乎存在于整个茅台酒生产过程。本研究主要对其生理特性及代谢产物进行研究分析,了解该菌株代谢物质对于茅台酒的风味贡献;同时,进一步探索其在食品或其他领域的潜在应用价值。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

从茅台酒入窖酒醅中分离到的 1 株膜璞毕赤酵母,由企业微生物资源库保存。

#### 1.2 培养基

##### 1.2.1 碳源选择培养基

碳源 2%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%。

##### 1.2.2 生长培养基

较适碳源 2%, 酵母膏 1%, 蛋白胨 1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%。

##### 1.3 浸提液制备

将生产所用的高粱,加入一定量的沸水浸泡,并将其置于摇床振荡 3 h,取浸泡液备用。

##### 1.4 菌体干重

将干离心管称重并记录,取 20 mL 发酵液,于 9000 r/min 离心 5 min,去上清液,80 °C 烘干至恒重,称重并记录,计算菌体干重。

##### 1.5 分析仪器

Agilent GC 7890A-5975 C mass selective detector (MSD)。

##### 1.6 提取方法

培养结束后,取一定量发酵样品,加入一定量 50 %vol 乙醇溶液冷冻 24 h,采用乙醚进行液液萃取,再将萃取液氮吹浓缩,GC-MS 分析检测。

##### 1.7 仪器条件

气相色谱分离条件:色谱柱温初始温度为 40 °C,以

收稿日期:2011-06-13

作者简介:姚翠萍(1983-),贵州玉屏人,从事酿酒微生物研究工作,发表论文数篇。

优先数字出版时间 2011-06-14,地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110614.1513.002.html?uid=>。

6 °C/min 的升温速率升至 230 °C, 保持 20 min; 柱流量 1.6 mL/min, 采用恒压模式; 进样口温度 230 °C; 进样量 1  $\mu$ L, 采取不分流进样方式, 进样 1 min 后分流阀打开。

质谱条件: 电子电离电压为 70 eV; 四极杆温度为 150 °C; 离子源温度 230 °C; 采用全扫描方式(scan), 使用 35~550 amu 的质量范围; 溶剂延迟 5 min。

物质定性分析: 将未知物质图谱与 NIST05a.L Database (Agilent Technologies Inc.) 中标准图谱进行比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同碳源的利用结果

选择葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖 4 种碳源, 培养基组分为: 碳源 2 %, (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, MgSO<sub>4</sub> 0.05 %, 接一环膜璞毕赤酵母于 25 mL 培养基中, 30 °C 下培养 48 h, 离心收集菌体, 烘干称量干菌体重量, 结果见图 1。

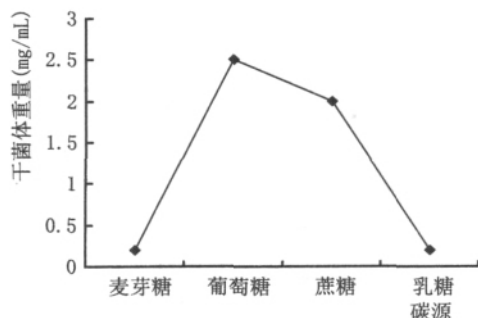


图1 膜璞毕赤酵母对不同碳源的利用

由图 1 知, 该膜璞毕赤酵母能较好地利用葡萄糖作为生长碳源, 其次为蔗糖, 麦芽糖与乳糖作为碳源时, 菌体生长极弱。

### 2.2 不同 pH 值下的生长情况

培养基组分为: 葡萄糖 2 %, 酵母膏 1 %, 蛋白胨 1 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, MgSO<sub>4</sub> 0.05 %。调节培养基的 pH 值分别为 4.5、5.0、5.5 和 6.0, 接一环膜璞毕赤酵母于 25 mL 培养基中, 在 30 °C 下摇床振荡培养 48 h, 离心收集菌体, 烘干称量菌体干重, 结果见图 2。

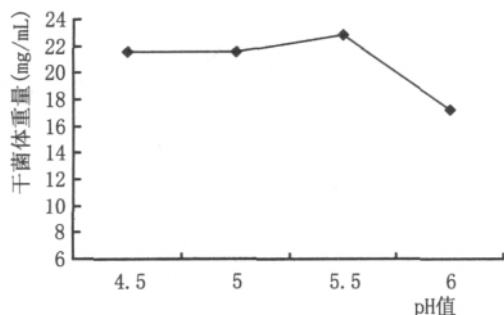


图2 膜璞毕赤酵母在不同 pH 值条件下的生长情况

由图 2 可知, 该酵母在培养基 pH 值为 5.5 时, 生长良好, 每 20 mL 发酵液中干菌体重量达到 22.8 mg/mL;

当 pH 值达到 6 时, 生长较为缓慢。

### 2.3 不同温度下的生长情况

培养基组分为: 葡萄糖 2 %, 酵母膏 1 %, 蛋白胨 1 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, MgSO<sub>4</sub> 0.05 %, pH 5.5, 接一环膜璞毕赤酵母于 25 mL 培养基中, 在 16~40 °C 范围内, 每隔 4 °C 为 1 梯度, 摇床振荡培养 48 h, 离心收集菌体, 烘干称量菌体干重, 结果见图 3。

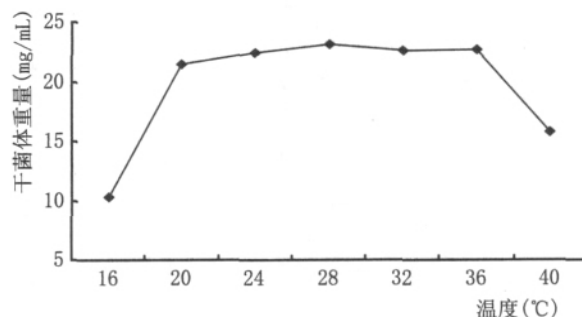


图3 膜璞毕赤酵母在不同温度下的生长情况

由图 3 的膜璞毕赤酵母在不同温度下的生长情况可知, 其在 20~36 °C 时生长良好, 在该温度范围内, 其生长并无明显差异; 当温度达到 40 °C 时, 生长仍然较好。

### 2.4 代谢产物

#### 2.4.1 膜璞毕赤酵母在优化条件下的代谢产物

培养基组分为: 葡萄糖 2 %, 蛋白胨 1 %, 酵母膏 1 %, 无水 MgSO<sub>4</sub> 0.05 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, pH 5.5, 接入一环菌体, 36 °C 摇床振荡培养 72 h, 并作该发酵培养的空白对照样; 将发酵液与空白对照进行液液萃取, N<sub>2</sub> 吹浓缩, 将浓缩液过滤, 进 GC-MS 分析检测, 对比该发酵液空白对照样, 得到该菌体的主要发酵产物, 结果见图 4。

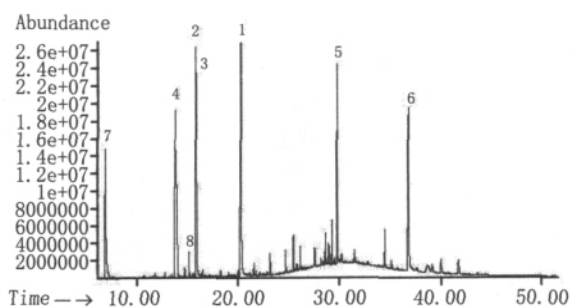


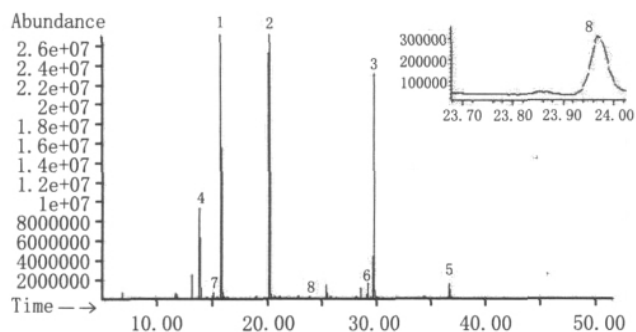
图4 膜璞毕赤酵母在较优条件下的液态发酵产物

由图 4 膜璞毕赤酵母在较优条件下的液态代谢产物图谱可知, 其主要发酵产物为酸、醇类物质, 发酵液中含有较多的物质为苯乙醇、2-甲基丁酸、3-甲基丁酸、2-甲基丙酸、苯乙酸、酪醇、3-甲基丁醇、丁酸。

#### 2.4.2 30 °C 高粱浸提液发酵代谢产物

培养基组分为: 葡萄糖 2 %, 蛋白胨 1 %, 酵母膏 1 %, 无水 MgSO<sub>4</sub> 0.05 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, 加入一定量茅

台酒生产所用高粱的浸提液,调节 pH 值为 5.5,接入一环菌体,30℃条件下摇床振荡培养 72 h,并作该培养液的空白对照样;将发酵液与空白对照样进行液液萃取, N<sub>2</sub> 吹浓缩,将浓缩液过滤,进 GC-MS 分析检测,对比发酵液空白对照样,得到该菌株的主要发酵产物,结果见图 5。



1:3-甲基丁酸;2:苯乙醇;3:苯乙酸;4:2-甲基丙酸;5:酪醇;  
6:亚油酸乙酯;7:丁酸;8:γ 癸内酯

图 5 30℃条件下膜璞毕赤酵母发酵高粱浸出液发酵产物

图 5 表明,在 30℃时,膜璞毕赤酵母添加高粱浸提液的主要发酵产物为:3-甲基丁酸、苯乙醇、苯乙酸、2-甲基丙酸、酪醇、亚油酸乙酯、丁酸、γ 癸内酯。其中,苯乙醇、苯乙酸呈玫瑰花香;酪醇为苦味物质;亚油酸乙酯有降低胆固醇和血脂的作用,可预防或减轻动脉粥样硬化症;丁酸具有泥臭味,白酒中适量丁酸使酒体香味更加浓郁;γ 癸内酯有强烈的椰子和桃子果香香气,广泛用于食品行业。

#### 2.4.3 36℃高粱浸提液发酵代谢产物

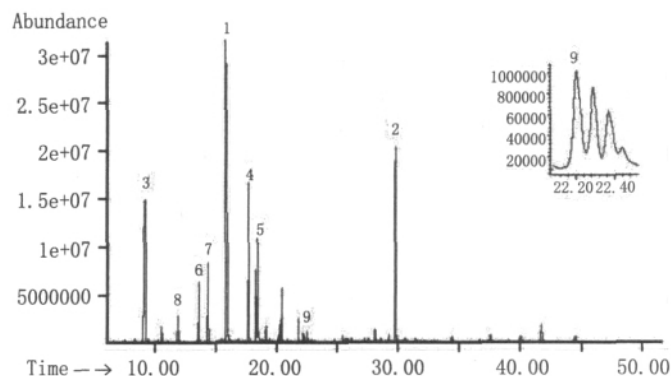
培养基组分为:葡萄糖 2%,蛋白胨 1%,酵母膏 1%,无水 MgSO<sub>4</sub> 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%,加入一定量茅台酒生产所用高粱的浸提液,调节 pH 值为 5.5,接入一环菌体,36℃条件下摇床振荡培养 72 h,并作该培养液的空白对照样;将发酵液与空白对照样进行液液萃取, N<sub>2</sub> 吹浓缩,将浓缩液过滤,进 GC-MS 分析检测,对比发酵液与空白对照样,主要发酵产物见图 6。

图 6 结果表明,36℃时,膜璞毕赤酵母添加高粱浸出液的主要发酵产物为:3-甲基丁酸、苯乙酸、乙偶姻、2,3-二羟基丁酸、乙酸、4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮。其中,乙偶姻具有强烈的奶油香气,高度稀释后有令人愉快的奶香气;4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮具有强烈的焙烤焦糖香气。

综合该膜璞毕赤酵母的代谢产物,其主要物质香气香味功能见表 1。

### 3 结论

3.1 综合该膜璞毕赤酵母在不同条件下的代谢产物,可知其主要发酵代谢产物为酸、醇以及少量特殊呈味物质,其发酵产物含量较多的为:苯乙醇、2-甲基丁酸、3-甲基丁酸、苯乙酸、酪醇、丁酸。该株酵母发酵底物在添加高粱浸提液时,可产生降低胆固醇和血脂的功能性物质——



1:3-甲基丁酸;2:苯乙酸;3:乙偶姻;4,5:未知同分异构体;  
6,7:2,3-二羟基丁酸(同分异构体);8:乙酸;  
9:4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮(呋喃扭尔)

图 6 36℃条件下膜璞毕赤酵母发酵高粱浸出液发酵产物

表 1 膜璞毕赤酵母主要代谢产物的香气、香味和功能

| 序号 | 化合物        | 嗅觉与味觉描述/用途               |
|----|------------|--------------------------|
| 1  | β-苯乙醇, 苯乙酸 | 玫瑰花香                     |
| 2  | 乙偶姻        | 奶油味                      |
| 3  | 丁酸         | 泥臭味                      |
| 4  | 呋喃扭尔       | 焦糖香气                     |
| 5  | γ 癸内酯      | 强烈的椰子和桃子香气               |
| 6  | 酪醇         | 苦味物质, 重要的医药中间体, 合成如心血管药物 |
| 7  | 亚油酸乙酯      | 降低胆固醇和血脂, 可预防或减轻动脉粥样硬化症  |

亚油酸乙酯,以及少量特殊香味物质:γ 癸内酯、4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮,这表明,茅台酒酿造用的高粱对于茅台酒风味形成以及保健功能具有特殊的贡献。

3.2 在液态发酵温度为 30℃时,检测到主要呈味物质有苯乙醇、丁酸、酪醇以及少量的 γ 癸内酯;而 36℃条件下产生大量 3-羟基-2-丁酮(据文献报道与酱香味形成密切相关),同时产生少量 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮,但未检测出苦味物质酪醇。因此,不同的发酵温度对于食品风味物质形成有重要影响。

#### 参考文献:

- [1] 刘宇驰,蒋英丽.引入“酱香功能菌”概念——探索酱香型白酒风味成因[J].酿酒科技,2009(12):47-50.
- [2] 叶选怡,钟仙龙,傅衍.一株高生物量酵母菌株对不同碳源和氮源的利用研究[J].丽水师范专科学校学报,2003(2):51-53.
- [3] 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].酿酒科技,2003(2):12-13.
- [4] 王国良,宋俊梅,曲静然.产香微生物的应用现状[J].食品研究与开发,2007(7):157-158.
- [5] 马荣山,刘婷,郭威.麸曲酱香酒醅中酵母菌的分离、筛选及应用[J].中国酿造,2008(1):17-19.
- [6] 王鹏霄,程林坤.产 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃酮酵母菌的分离、筛选及分子生物学鉴定[J].食品工业科技,2010(2):163-166.
- [7] 邵长军,李刚.白酒香型与香味成分探究[J].酿酒科技,2005(8):92-94.