

# 拟青霉固态发酵代谢产物分析

杨帆 林琳 王和玉 王莉 杨代永 吕云怀 季克良

(贵州茅台酒股份有限公司技术中心, 贵州 仁怀 564501)

**摘要:** 从茅台酒生产环境中分离纯化得到1株霉菌MTDF-01,经该菌的18S rDNA测序比对,最终确定该菌株为拟青霉。将该菌在制曲工艺、堆积工艺以及兼性条件下分别进行纯种固态发酵,利用GC-MS对其代谢物检测解析。结果表明,纯种固态发酵能代谢生成酸、醇、醛、酮、酯及芳香族化合物等多种物质。这些物质中有多种是食品中的风味物质和风味前体物质,亦是茅台酒众多呈香呈味物质中的组成部分。

**关键词:** 微生物; 拟青霉; 固态发酵; 代谢产物; 茅台酒风味

中图分类号: Q93-3; TS262.33

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)07-0041-03

## Analysis of Metabolites of *Paecilomyces varioti* by Solid Fermentation

YANG Fan, LIN Lin, WANG Heyu, WANG Li, YANG Daiyong, LV Yunhuai and JI Keliang

(Technology Center of Moutai Co.Ltd, Renhuai, Guizhou 564501, China)

**Abstract:** MTDF-01 was isolated from the production environment of Maotai liquor. MTDF-01 was identified as *Paecilomyces varioti* by 18S rDNA identification. Then pure solid fermentation of MTDF-01 was carried out under starter-making conditions, stacking conditions, and facultative conditions respectively and GC-MS was applied to analyze its metabolites. The results showed that MTDF-01 could produce acids, alcohols, aldehydes, ketones, esters and aromatic compounds by pure solid fermentation. Most of the metabolites were flavoring compounds and flavoring precursors for food, and also an integral part of aroma-producing & flavoring-producing substances in Maotai liquor.

**Key words:** microbe; *Paecilomyces varioti*; solid fermentation; metabolites; Maotai flavor

拟青霉(*Paecilomyces varioti*)是一种在茅台酒生产环境中极易分离得到的霉菌,且数量较大<sup>[1]</sup>。它被认为是茅台酒酿造微生物种群中的优势菌之一<sup>[2]</sup>,它积极参与了茅台酒的酿造过程。在茅台酒酿造过程中,制曲与制酒阶段是微生物代谢活动最为活跃的两个时期,微生物在此期间大量繁殖并代谢出多种物质,这些代谢产物就是茅台酒的风味物质或风味前体物质。本文以1株从茅台酒生产环境中分离纯化得到的拟青霉为研究对象,选用茅台酒生产过程中两个特色工艺——制曲工艺和堆积工艺为培养条件进行纯种固态发酵。此外,还以高粱与小麦混合培养基,在兼性条件下进行纯种固态发酵。考察拟青霉在上述条件下的代谢产物,探索该菌在茅台酒酿造过程中对茅台酒风味的贡献。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

拟青霉 MTDF-01。

### 1.2 培养基及培养条件

液态富集培养基:葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵

母膏 5 g/L, NaCl 10 g/L, 磷酸氢二钾 5 g/L, pH 7.0, 于 121 °C 灭菌 20 min。

小麦培养基:茅台酒制曲用小麦, 121 °C 灭菌 20 min。

高粱培养基:茅台酒制酒用高粱, 121 °C 灭菌 120 min。

MTDF-01 经液态培养富集后分别接入小麦培养基和高粱培养基,并分别按制曲工艺和堆积工艺培养,培养时间与制曲周期、堆积周期同步。

MTDF-01 经液态培养富集后接入小麦培养基, 37 °C 培养 2 d, 再接入高粱培养基按堆积工艺培养,培养时间与酒糟堆积时间同步,堆积培养结束后接入窖工艺条件培养与酒糟窖内发酵时间同步。

### 1.3 菌种鉴定

#### 1.3.1 基因组提取及 18S rDNA 的 PCR 扩增。

取新鲜培养的霉菌, 9000×g 离心 5 min, 收集沉淀; 重悬于 1 mL buffer Z, 混匀后, 转移到加有 0.3 g 玻璃珠(直径 0.1 mm)的螺帽管中, 加入 150 μL 苯酚, Beadbeater 细胞破碎仪以最大速度击打 4 min, 加入 110 μL 10% SDS, 轻轻混匀后, 冰浴 10 min, 每 5 min 轻轻颠倒摇匀, 加入 150 μL 氯仿:异戊醇(24:1)溶液, 轻轻混匀, 15000×g

收稿日期: 2011-05-09

作者简介: 杨帆(1983-), 男, 工学硕士。

优先数字出版时间: 2011-06-13 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20110613.1423.001.html?uid=>

离心 10 min, 收集上清液, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠, 15000×g 离心 10 min, 收集上清液, 2 倍体积冰乙醇-20 °C 沉淀, 12000×g 离心 15 min, 弃上清液, 将沉淀物真空冷冻干燥后溶于 30 μL 无菌水中, 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像。

用引物 18SF (5'-CCAACCTGGTTGATCCT-GCCAGTA-3') 和 18SR (5'-CCT TGT TAC GACTTCAC-CTTCCTCT-3') PCR 扩增该菌 18S rDNA, 按下述反应条件进行 30 个循环: 94 °C、1 min; 55 °C、1 min; 72 °C、1 min; 72 °C、10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物电泳检测。

### 1.3.2 18S rRNA 测序及比对

把 PCR 产物送交上海生工测序。将测序获得的 18S rRNA 序列运用 DNASTar 剪切拼接, 所得 DNA 序列在 www.ncbi.nlm.nih.gov 中运用 BLAST 软件进行同源性分析。初步判断 MTDF-01 的分类学地位。

### 1.4 分析仪器

Agilent 7890 A-5975 C 气相色谱质谱联用仪 (GC-MS)。

### 1.5 提取方法<sup>[3]</sup>

发酵结束后, 取一定量固态发酵样品, 加入 50% vol 乙醇溶液浸提, 浸提结束后, 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。

### 1.6 GC-MS 分析条件

GC 条件: 样品通过毛细管柱 HP-ffap (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm, J&W Scientific) 进行分离。进样口温度 250 °C, 载气 He, 流速 1.1 mL/min。进样量 1 μL, 不分流进样。升温程序: 40 °C (保持 2 min), 以 4 °C/min 的速度升温至 70 °C, 再以 6 °C/min 的升温速率升温至 230 °C (保持 10 min)。

MS 条件: 离子源温度: 230 °C; 离子化方式: EI; 电子能量: 70 eV; 扫描范围: 35~550 amu。

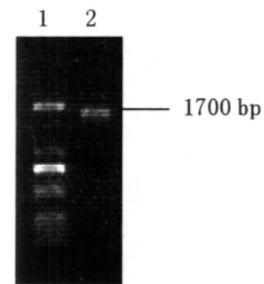
物质定性分析: 将未知物质谱图与 NIST 08a.L Database (Agilent Technologies Inc.) 中标准谱图进行比对定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种鉴定

以菌株 MTDF-01 基因组 DNA 为模板, PCR 产物电泳鉴定结果见图 1。

由图 1 可知, 泳道 2 为菌株 MTDF-01 的 18S rDNA 扩增产物, 扩增出保守序列片段长度为 1700 bp, 与报道的 18S rDNA 分子量一致。确认以上片段即为所需的目的片段, 将扩增产物送交上海生工测序。测序获得菌株



1. DL-2000 分子量标准; 2. 菌株 MTDF01 18S rDNA PCR 产物

图 1 18S rDNA PCR 扩增电泳图

MTDF-01 的 18S rDNA 序列长度为 1600 bp, 通过与美国国立生物技术信息中心中的菌种信息比对, 菌株 MTDF-01 的 18S rDNA 与瑞典国家生命研究所等上传的拟青霉属 (*Paecilomyces*) 微生物的 18S rDNA 序列碱基排序的相似性为 99%, 认为 MTDF-01 的分类学地位为拟青霉属。

### 2.2 MTDF-01 小麦培养基制曲工艺发酵培养产代谢产物分析

将未接种 MTDF-01 的小麦固态培养基按制曲工艺培养, 作为空白对照。将发酵结束的空白样品按 1.5 方法提取浓缩进样分析, 其结果见图 2。

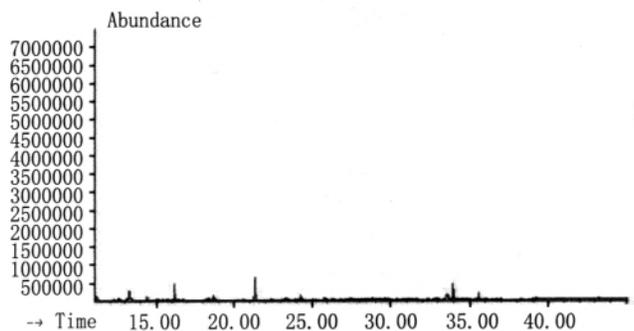
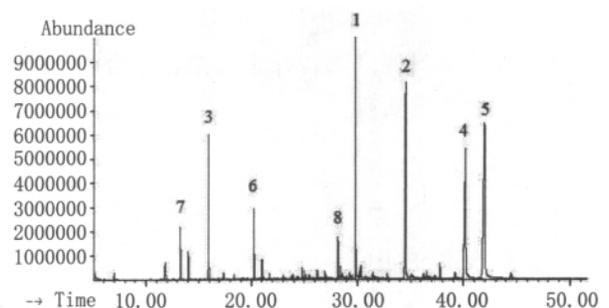


图 2 小麦发酵培养基物质分析总离子流图

将培养好的 MTDF-01 菌液接入小麦培养基按制曲工艺发酵培养。将发酵结束后样品提取浓缩进样分析, 其结果见图 3。



1. 苯乙酸; 2. 十六酸; 3. 3-甲基丁酸; 4. 亚油酸;  
5. 软脂酸; 6. 苯乙醇; 7. 乙酸; 8. 苯甲酸

图 3 拟青霉 MTDF-01 小麦底物发酵代谢产物分析总离子流图

对比图 2、图 3 可知,拟青霉 MTDF-01 代谢产物有酸、酯、醇、酮及芳香族化合物等。其中含量较高的有:苯乙酸、十六酸、3-甲基丁酸、苯乙醇、软脂酸、亚油酸、乙酸、苯甲酸,以上 8 种物质是该菌在制曲工艺条件下纯种固态发酵的主要代谢产物。推断拟青霉 MTDF-01 是茅台酒中这 8 种风味物质的主要产生菌株之一。

### 2.3 MTDF-01 高粱底物堆积工艺发酵产代谢产物分析

将未接种 MTDF-01 固态高粱培养基按堆积工艺培养发酵,作为空白对照。对其发酵醅提取浓缩进样分析,其结果见图 4。

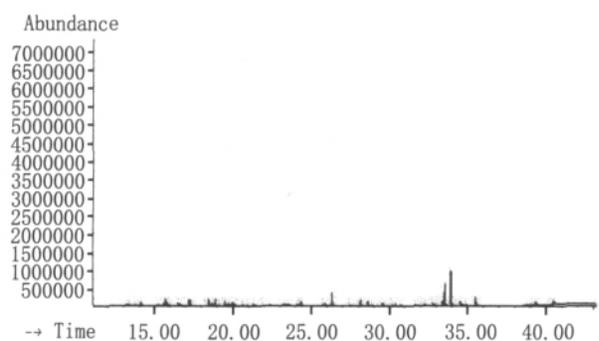
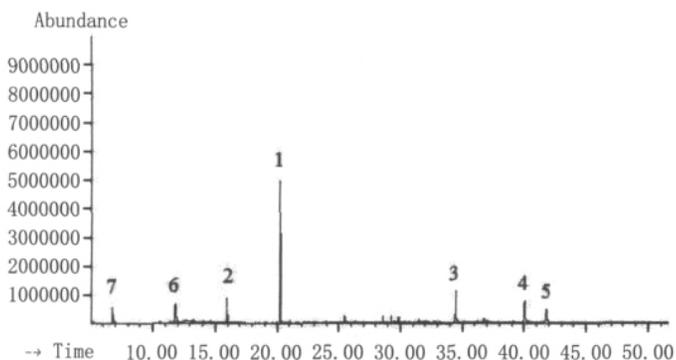


图 4 高粱底物堆积工艺发酵物质分析总离子流图

将培养好的 MTDF-01 菌液接入固态高粱培养基,按堆积工艺培养发酵。对其发酵醅提取浓缩进样分析,其结果见图 5。



1.苯乙醇;2.3-甲基丁酸;3.十六酸;4.软脂酸;  
5.亚油酸;6.乙酸;7.3-甲基丁醇

图 5 拟青霉 MTDF-01 在堆积工艺条件下  
所产代谢产物总离子流图

对比图 4、图 5 可知,拟青霉 MTDF-01 代谢产物中含量较高的有:苯乙醇、3-甲基丁酸、十六酸、软脂酸、亚油酸、乙酸、3-甲基丁醇,这 7 种物质是该菌在堆积工艺条件下纯种高粱固态发酵的主要代谢产物。推断拟青霉是茅台酒中这 7 种物质的主要产生菌株之一。对比图 3 和图 5 发现,该菌以小麦为培养基在制曲工艺条件下代谢产物的种类较高粱为培养基在堆积工艺条件下代谢产物的种类多。此外,还发现了一种尚未定性的物质,该物

质在图 3 并未出现,推断该物质是该菌以高粱为培养基所产生的特有代谢产物。

### 2.4 MTDF-01 利用混合底物在兼性条件下的代谢产物分析

将未接种 MTDF-01 的固态混合培养基按 1.2 方法培养,作为空白对照。将发酵结束后的空白样品按照 1.5 方法提取浓缩进样分析,结果见图 6。

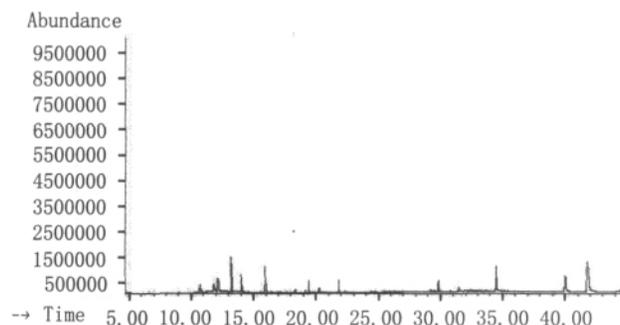
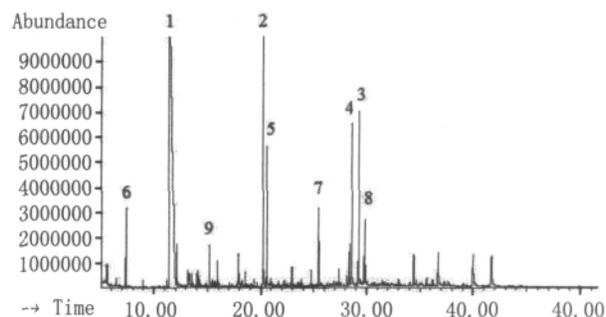


图 6 混合基质培养发酵空白样品分析总离子流图

将培养好的 MTDF-01 菌液接入固态混合培养基中,在兼性条件下培养发酵。将固态发酵结束后的样品按照 1.5 方法提取浓缩进样分析,结果见图 7。



1.乙酸;2.苯乙醇;3.亚麻油酸;4.油酸乙酯;5.α-亚乙基-苯乙醛;  
6.3-甲基丁醇;7.十六酸乙酯;8.苯乙酸;9.3-甲基丁酸

图 7 拟青霉 MTDF-01 混合基质发酵样品分析总离子流图

对比图 6、图 7 可知,拟青霉 MTDF-01 的代谢产物中含量较高的有:乙酸、苯乙醇、亚麻油酸、油酸乙酯、α-亚乙基-苯乙醛、3-甲基丁醇、十六酸乙酯、苯乙酸、3-甲基丁酸,将这 9 种物质确定为该菌在兼性条件下的主要代谢产物。将图 7 与图 3、图 5 对比发现,MTDF-01 利用混合培养基,在兼性条件下所产代谢物的种类,包含了该菌在制曲工艺与堆积工艺下所产代谢物的种类。该菌在兼性条件下生成 α-亚乙基-苯乙醛,在图 3 与图 5 中并未发现,可见可以将该物质确定为拟青霉 MTDF-01 在兼性条件下的特有代谢产物。此外,在兼性条件下该菌相同代谢产物的浓度还发生明显变化,乙酸、苯乙醇大量积累,苯乙酸积累较少。

(下转第 46 页)

### 3 结论

3.1 高温大曲中的微生物在酸度不同的各培养基上,随酸度的升高,在一定的培养时间内,其微生物的变化主要是从细菌为主,霉菌、酵母和放线菌共同存在的一个微生物群体向以霉菌为主的微生物体系过渡。在糖化周期内糖化堆糟醅中的微生物在酸度不同的各培养基上,在一定的培养时间内,随酸度的升高,其微生物的变化趋势与高温大曲基本相同,从以细菌为主的微生物体系向以霉菌和酵母为主的微生物体系过渡。所以,酱香型白酒的酿造过程也是一个对有机酸的控制与利用过程。

3.2 细菌极不耐酸,适合于微碱性或接近中性条件下生长,而一般霉菌和酵母适合于在  $\text{pH} < 7$  的酸性条件下生长。酱香型白酒的酿造就是利用每一种微生物都有其合适的生长  $\text{pH}$  范围“以酸制酸”进行调控,通过控制一定的糟醅酸度,从而抑制细菌的生长代谢与繁殖,而让相对耐酸的霉菌和酵母菌占据优势而发挥正常的代谢功能。

3.3 酱香型白酒酿造过程中,大量生酸微生物代谢产生的酸参与调控微生物的分布趋势,导致酱香型白酒中酸含量偏高,使有机酸成为酱香型白酒生产过程的调控者、

构成者、参与者。

3.4 本研究过程是以糖化堆的糖化时间为参考,如果培养时间改变,其培养结果应有所变化。而且,无论成品曲还是糖化堆糟醅的取样,都受取样条件(时间、环境、操作方法等)的影响,每次操作都略有偏差,导致实验结果略有偏差,但其演变趋势都大致相同。

#### 参考文献:

- [1] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [2] 张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990.
- [3] 唐玉明,姚万春,任道群,等.酱香型白酒窖内发酵过程中糟醅的微生物分析[J].酿酒科技,2007(12):50-53.
- [4] 杨代永,范光先,等.高温大曲中的微生物研究[J].酿酒科技,2007(5):37-38.
- [5] 翁庆北,赵维娜,万晴姣.习酒酒曲中产淀粉酶细菌分离及性质研究[J].酿酒科技,2006(1):21-22.
- [6] 无锡轻工大学.微生物学[M].2版.北京:中国轻工业出版社,1990.
- [7] 武汉大学,复旦大学.微生物学[M].2版.北京:高等教育出版社,1980.

(上接第43页)

### 3 结论

通过采用不同培养基与培养条件,对拟青霉 MTDF-01 进行纯种固态发酵所得代谢产物进行分析,发现该菌的代谢产物中含有多种食品中的风味物质及其前体物质。其主要代谢产物有:乙酸、苯乙醇、亚麻油酸、油酸乙酯、 $\alpha$ -亚乙基-苯乙醛、3-甲基丁醇、十六酸乙酯、苯乙酸、3-甲基丁酸以及一种未定性物质。这些主要代谢产物中有一些物质是茅台酒的色谱骨架成分。乙酸、苯乙醇、苯乙酸、 $\alpha$ -亚乙基-苯乙醛,这4种物质拥有独特香气,且特征明显。乙酸香气刺激易辨识,它是酒中乙酯化重要前体。苯乙醇与苯乙酸呈现玫瑰花香,且香气怡人。 $\alpha$ -亚乙基-苯乙醛也呈现花香,具有可和和红茶香气特征,其被认为是酿造酱油的特有成分<sup>[4]</sup>,推断该物质与形成酱香有关,是形成酱香的特征物质之一。目前,研究结果表明, $\alpha$ -亚乙基-苯乙醛是拟青霉以混合基质为培养

基在兼性条件下所产生的特有代谢产物。通过对拟青霉 MTDF-01 固态发酵代谢产物的分析,初步明确该菌在茅台酒酿造过程中对茅台酒风味的贡献。这一研究成果是阐述酱香型白酒风味物质的形成与微生物关系理论的重要组成部分,对酱香型白酒工业的发展具有重要的理论意义。

#### 参考文献:

- [1] 杨代永,范光先,汪地强.高温大曲中的微生物研究[J].酿酒科技,2007(5):37-38.
- [2] 范光先,王和玉,崔同弼.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.
- [3] 王和玉,杨帆,姚翠萍,等.枯草芽孢杆菌利用不同基质所产代谢物的分析对比[J].酿酒科技,2009(12):93-95.
- [4] 冯笑军,吴惠勤,黄晓兰,等.气相色谱-质谱对天然酿造酱油与配制酱油香气成分的分析比较[J].分析测试学报,2009(6):661-665.

## 五粮液一季度营业收入 62.4 亿

本刊讯 据《糖酒快讯》报道 四川五粮液集团公司一季度营业收入 62.4 亿 增长 39.0% 归属于母公司净利润 20.8 亿 EPS0.548 元 增长 36.7%。公司计划将五粮醇打造为销量最大的子品牌,一季度销量已经超过五粮液(去年五粮醇销量 13100 吨 和五粮液基本持平)。五粮液出厂价 509 元 团购价 569 元。预计五粮液未来上涨的空间要远大于下跌的空间。8 个月目标价 45.6 元 对应于 11PE30 倍。(小舅)

来源 糖酒快讯-食品资讯 2011-07-05