



SEMINAR

2018 ▾

《Determination of the Microbial Origin of Geosmin in Chinese Liquor》
与SPE、SPME固相（微）萃取技术



李岚宇
2016/4/14

1

文章介绍

2

文献内容讲述

3

固相（微）萃取技术

4

学有所得



01

PART ONE

文章介绍



01 | 文章介绍——文章信息



食品科学与技术国家重点实验室
STATE KEY LABORATORY OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY

Article

pubs.acs.org/JAFC

Determination of the Microbial Origin of Geosmin in Chinese Liquor

Hai Du and Yan Xu*

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, 1800 Lihu Avenue, Wuxi, Jiangsu, China 214122



《 JOURNAL OF
AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY 》

《农业食品化学》
影响因子：3.154



食品与技术国家
重点实验室

是在原江南大学食品科学与安全和南昌大学食品科学两个教育部重点实验室的基础上建立起来的国内食品科学领域第一个国家重点实验室。



徐岩教授

我国第一位白酒博士，致力于用现代科学方法解析传统行业，运用现代风味化学、微生物（组）学、分子生物学等前沿技术，开展了大量创新性研究。

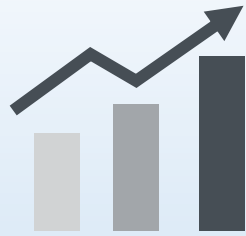


01 | 文章介绍——本次主角

白酒的定义：以曲类为糖化发酵剂，利用淀粉质(糖质)原料，经蒸煮、糖化、发酵、蒸馏、陈酿和勾兑而酿制而成的各类白酒。

※世界六大白酒：白兰地Brandy、威士忌Whisky、伏特加Vodka、金酒Gin、朗姆酒Rum、**中国白酒Liquor and Spirits**。

本次主角——汾酒→



《Determination of the Microbial Origin of Geosmin in Chinese Liquor》

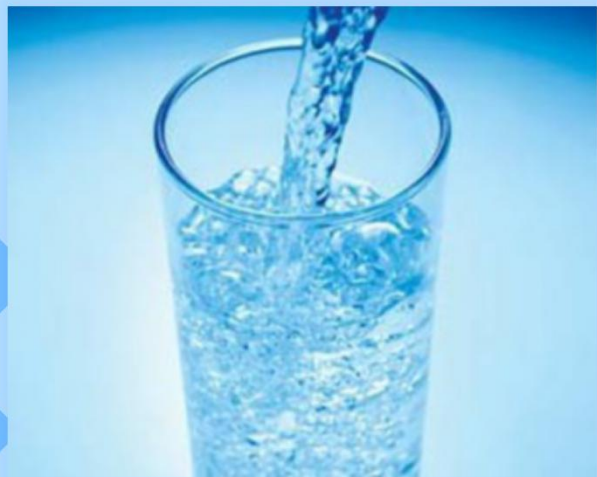
酒魂



01 | 文章介绍——无处不在的geosmin (GSM)

早在19世纪，科学家在研究雨后的森林里的土壤的气味时。第一次发现了该物质---Geosmin（GSM具有泥土和发霉的气味特征）。

随后在许多其他地方如：饮用水，各种水果和蔬菜以及水产品中同样发现了GSM分子。



文章介绍——无处不在的geosmin (GSM)

01

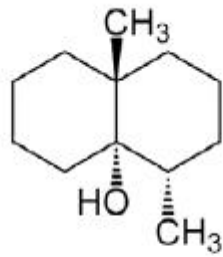


Fig. 1. The molecular structure of geosmin (trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol).

人类对GSM非常敏感，即具有非常低的气味阈值（6-10ng / L），我们通常会从7ng / L开始出现本能的反感与厌恶。

而经检测在46vol %的酒中GSM含量能达到110ng /L。一言以蔽之：土臭素是我国清香型白酒土腥异味的主要原因。

※尚无报道发现GSM对生物致死的现象

《Determination of the Microbial Origin of Geosmin in Chinese Liquor》



02

PART TWO
文献内容讲述



02 | 文献内容讲述

摘要

简介

材料与amp;方法

结果与amp;讨论

土臭素是我国清香型白酒土腥异味的来源，而在发酵用的“大曲”曲块中存活的部分微生物是在酒中存在土臭素的主要原因。

本文从不同类型的大曲中分离出具有产生挥发性GSM的菌株并定量检测。



02 | 文献内容讲述

简介



土腥异味在清香型白酒（汾酒）中尤为明显，这其中最主要的土臭素来源是发酵白酒时使用的“大曲”中部分微生物次生代谢的产物。

大曲的制作：
是通过自然接种的谷物中的霉菌、酵母和细菌来制备的



小麦、大麦和豌豆磨碎，并与水混合



模压机压缩，形成一个大曲土坯



发酵培育微生物（40~50℃）



储存成熟（6个月）

→ 成熟大曲与煮熟的谷物混合固态发酵（一个月）



蒸馏白酒



02 | 文献内容讲述

样品与材料部分

实验样品：新制大曲、储存大曲、
发酵高粱、蒸馏酒等

化学/生物实验材料：土臭素
标样、L-薄荷醇、LB、RBA、
PDA培养基



试验方法部分

顶空固相微萃取气相色谱质谱
联用(HS-SPME-GC-MS)定量测定
土臭素

微生物分离、鉴定

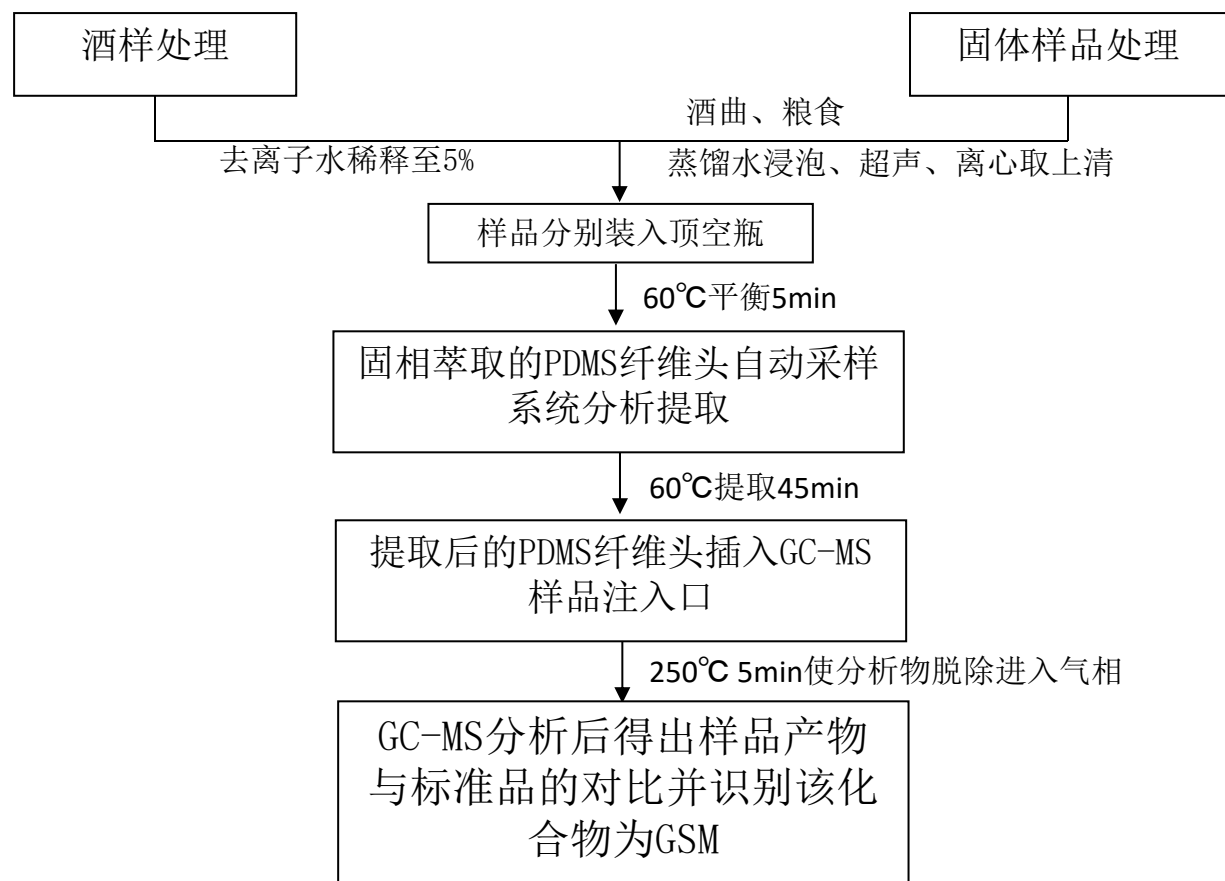


02 | 文献内容讲述



顶空固相微萃取气相色谱质谱联用 (HS-SPME-GC-MS) 定量测定土臭素

顶空法固相微萃取 (HS-SPME) + 气相色谱-质谱联用 (GC-MS)



02 | 文献内容讲述



微生物分离、鉴定

“All of the people were trained with geosmin standard solution. The total training time is over 30 h.”

(原话：这三十位评委通过土臭素标样溶液嗅闻训练，且训练时间超过30h)

大曲样品稀释涂布



加入氯霉素、制霉菌素用以控制真菌及其他细菌



纯化得到的微生物



麸皮+超纯水液体试管培养基



30位评委感官分析选出具有泥土气味的试管



得到GSM活性菌株



测序并获得GSM产物用以GC-MS检测确定



02 | 文献内容讲述

(1) 在不同的发酵时期发酵高粱中土臭素的浓度

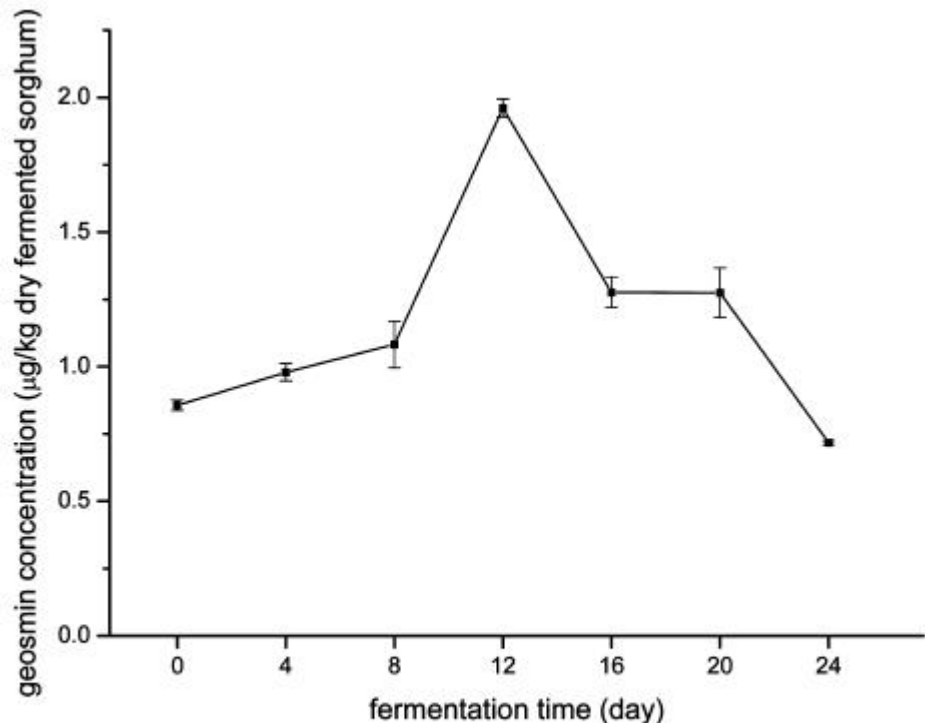
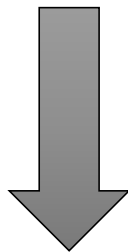


Figure 1. Concentrations of geosmin in fermented sorghums during the fermentation process.

首先，测定了样品不同发酵时期样品的土臭素浓度。

在所有发酵的高粱中都发现了Geosmin。在发酵到第12天时,GSM浓度达到 $1.96\mu\text{g}/\text{kg}$ ；到第24天时，则下降到 $0.72\mu\text{g}/\text{kg}$ 。



推测，在发酵的高粱中存在着GSM活性的微生物，它们可能是好氧微生物。在发酵过程中，随着好氧微生物的正常生长和代谢，环境GSM浓度逐步上升；而当环境中的溶解氧消耗殆尽时，则转变形成适合厌氧微生物生长环境，甚至会消耗掉样品中的GSM。



02 | 文献内容讲述

(2) 3批次发酵高粱(1、4、5)的蒸馏时间对土臭素浓度和酒精含量的变化。

不同批次的发酵高粱中淀粉含量比较为：1st>4th>5th

由图可得，在10分钟左右的时间里，大部分的酒精和其他味道化合物都被蒸馏出来了，而GSM则主要在十分钟之后被蒸馏出来，淀粉含量越高GSM浓度越大，且GSM出现的峰值的浓度一般在酒精含量50-60%时。

综上，土臭素存在于发酵高粱中，它可以被蒸馏出来并转化成液体溶入酒中。

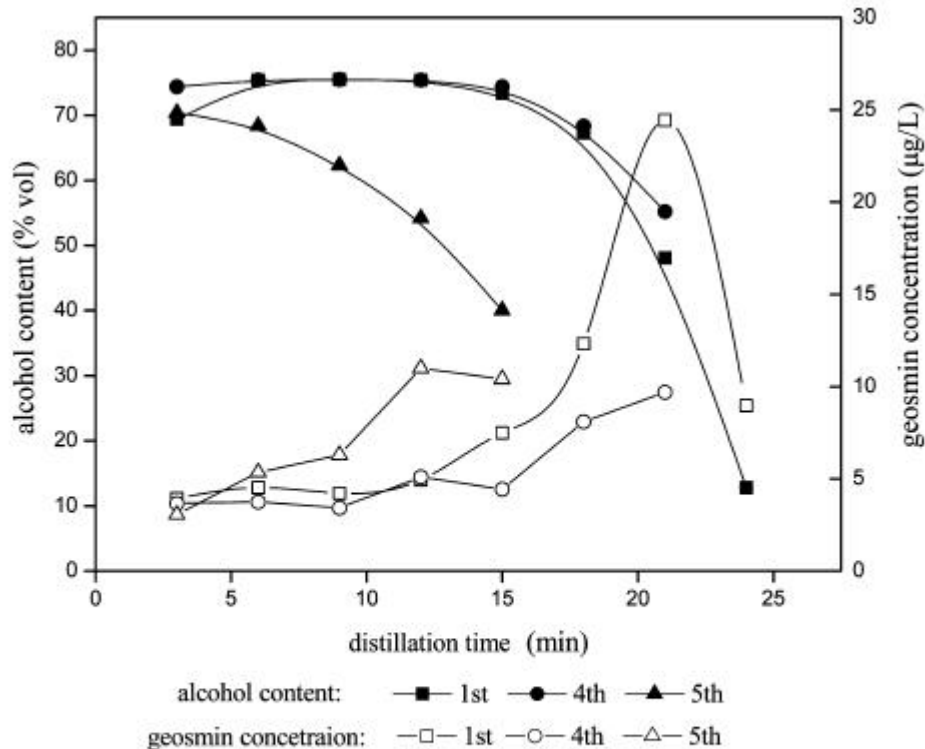


Figure 2. Changes of geosmin concentration and alcohol content during the distillation time of 3 batches of fermented sorghums (first, fourth, and fifth).



※1、2、3批的发酵高粱淀粉含量一致故合并实验

02 | 文献内容讲述

(3) “大曲”制作过程中的土臭素波动。

在用碾碎的小麦及其他谷物和水制成的大曲土坯中并没有检测到GSM，而在早期的室内培养阶段，在大曲中就发现了极低水平的GSM。约25天后，观察到大曲中土臭素浓度明显升高。此时，大曲是处于一个室内通风降温的环境中的。之后环境变化（升温、无氧）又使得大曲中GSM浓度明显下降。

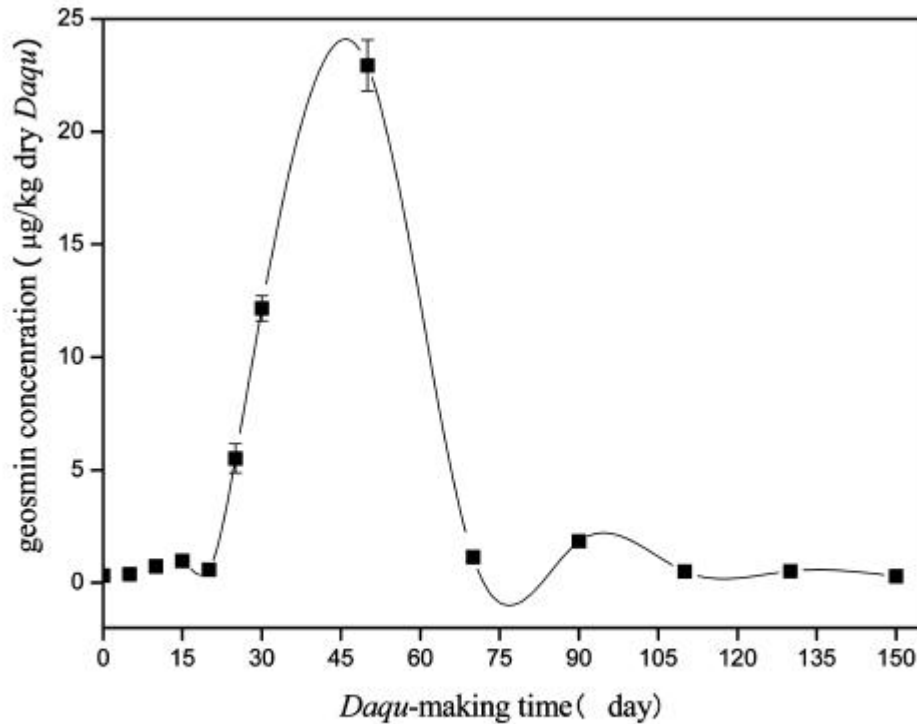


Figure 3. Kinetics of geosmin formation during the Qingcha Daqu-making process.



02 | 文献内容讲述

(4) 制作工艺影响GSM浓度。

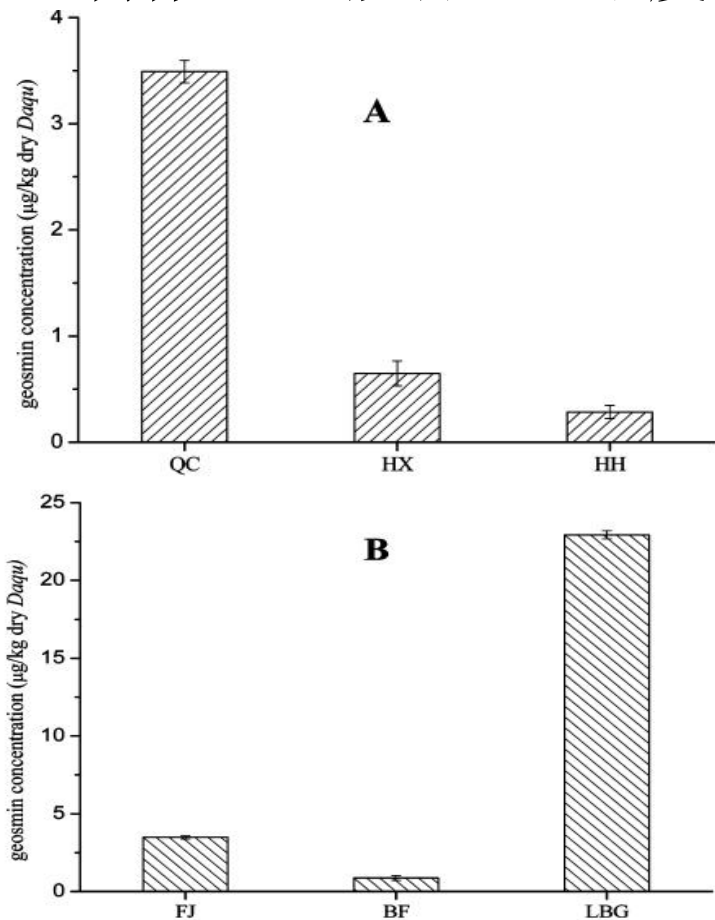


Figure 4. Comparison of geosmin content in three types of mature *Daqu* made by different technologies, *Qingcha* (QC), *Hongxin* (HX), and *Houhuo* (HH) (A), and in the mature *Qingcha Daqu* made by different light-*aroma* type liquor distilleries, *Fenjiu* (FJ), *Baofeng* (BF), and *Laobaigan* (LBG) (B).

| 大曲制作工艺 | QC | HX | HH |
|--------|------|------|------|
| 大曲制作温度 | 44°C | 48°C | 47°C |

| 酒厂 | 汾酒 | 宝丰 | 老白干 |
|--------|---------|---------|---------|
| 大曲成熟温度 | 45-46°C | 48-49°C | 42-43°C |

综上，在允许范围内适当提升大曲的制作和成熟温度可以降低GSM的含量



02 | 文献内容讲述

(5) 样品微生物分离鉴定。

Table 1. Identification and Capability of Geosmin Producing Strains Isolated from Three Different Types of Daqu

| strain | closest cultivated strain | similarity (%) | geosmin ($\mu\text{g/L}$) ^a | origin isolate |
|---------|--|----------------|--|-------------------------|
| LBG-FXJ | <i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> NRRL B-2365 (DQ026669.1) | 99 | 75.28 \pm 13.56 | Qingcha Daqu, Laobaigan |
| HX | <i>Streptomyces fradiae</i> RMS4 (HQ267533.1) | 99 | 31.20 \pm 6.37 | Hongxin Daqu, Fenjiu |
| QC-1 | <i>Streptomyces radiopugnans</i> AN-15 (HQ202876.1) | 99 | 42.44 \pm 4.31 | Qingcha Daqu, Fenjiu |
| QC-2 | <i>Streptomyces sampsonii</i> HS5341 (HQ610448.1) | 99 | 542.65 \pm 43.46 | Qingcha Daqu, Fenjiu |
| QC-3 | <i>Streptomyces</i> sp. MTCC 8377. (EU523135.1) | 99 | 102.41 \pm 14.59 | Qingcha Daqu, Fenjiu |

^aGeosmin production on solid-state bran medium simulating *Fuqu* (a starter based on a pure microbial culture).

本文作者共从样品中分离到572株不同类型的菌株，其中得到五株具有GSM活性的菌株，它们全部都是链霉菌属的放线菌，这也从间接说明了主要可以产生GSM的微生物多为放线菌。



03

PART THREE
固相（微）萃
取技术



03 | 固相（微）萃取技术——SP（M）E

1、固相（微）萃取技术简介

固相萃取(Solid Phase Extraction,SPE)

就是利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附，与样品的基体和干扰化合物分离，然后再用洗脱液洗脱或加热解吸附，达到**分离**和**富集**目标化合物的目的。

上文中的实验就使用了加热解吸附的方法

可用于环境化学、食品、医药卫生、临床化学、生物化学、法医学等领域中复杂目标物样品微量或痕量的分离、富集和分析，具有非常广泛的应用。



03 | 固相（微）萃取技术——SP（M）E

2、固相（微）萃取技术优缺点

- (1) 简单、快速和简化了样品预处理操作步骤；
- (2) 处理过的样品易于贮藏、运输，便于质控；
- (3) 操作条件温和, 适应的pH范围广；
- (4) 不出现乳化现象，提高了分离效率；
- (5) 仅用少量的有机溶剂，成本较低且安全；
- (6) 易于与其他仪器联用，实现自动化在线分析。



- (1) 专一性较强，对萃取头涂层材料要求较高；
- (2) 重复性难以保证，相同成分但是不同年代不同批号的萃取剂性质可能会有较大的区别；
- (3) 洁净度要求较高，不能有固体颗粒物或悬浮物，否则会在柱前形成堵塞，无法继续过柱及洗脱操作；
- (4) 当前萃取柱多为塑料制品，只能做常温操作，无法通过加热的方式提升吸附作用。

03 | 固相（微）萃取技术（SPME）

3、固相（微）萃取仪器



固相萃取（SPE）



03 | 固相（微）萃取技术（SPME）

3、固相（微）萃取仪器

固相微萃取（SPME）

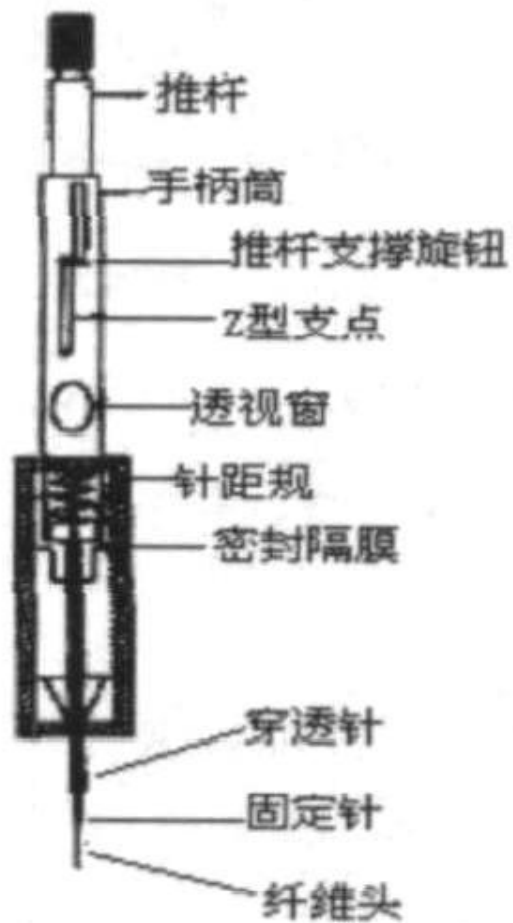


图 1 固相微萃取装置示意图



03 | 固相（微）萃取技术（SPME）

4、固相（微）萃取步骤

1、吸附剂的选择

目标的最佳保留取决于目标物极性与吸附剂极性的相似程度，两者极性越相似，则保留越好（即吸附效果越好）。

2、吸附剂的活化

在萃取样品之前要用适当的溶剂淋洗固相萃取柱，使吸附剂保持湿润，有利于吸附剂和目标物质相互作用，提高回收率。

3、上样

将液态或溶解后的固态样品倒入活化后的固相萃取柱，然后利用抽真空，加压或离心的方法使样品流经吸附剂进行吸附。

4、洗涤和洗脱

真空或离心，与液相气相联用时加热解脱

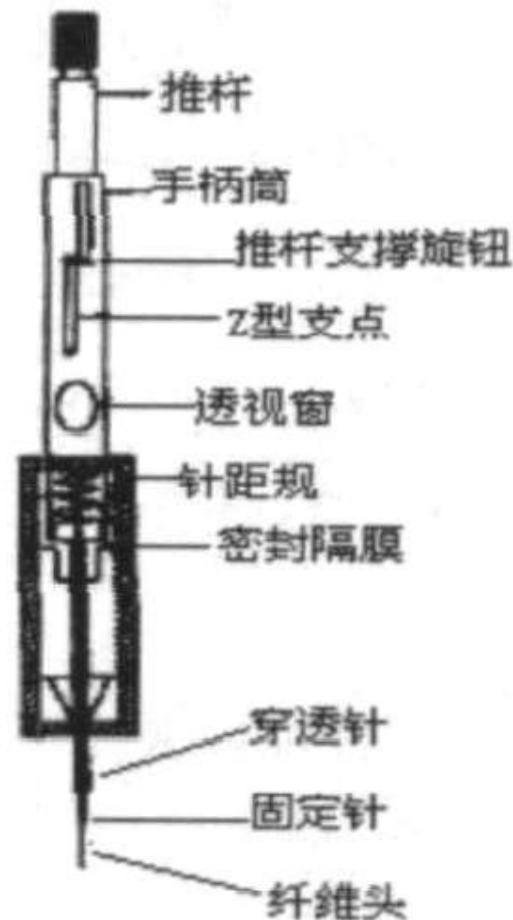


图 1 固相微萃取装置示意图



03 | 固相（微）萃取技术（SPME）

5、固相微萃取装置使用

SPME装置略似注射器与移液枪,典型的SPME装置见右。

不锈钢穿透针A为中空结构,纤维固定针B和萃取纤维C能在其中移动,石英纤维C上面涂布用于萃取的固定相,柱塞D控制固定针B的移动使纤维C伸出或退回穿透针中。当纤维暴露在样品中时,涂层可从液态-气态基质中吸附萃取待测物。

吸附完毕后,萃取纤维C退回到穿透针中被保护起来,已富集了待测物的纤维可直接转移到仪器(气相色谱仪,液相色谱仪等)进样口,通过仪器进样口的能量解吸附,然后进行分离分析。

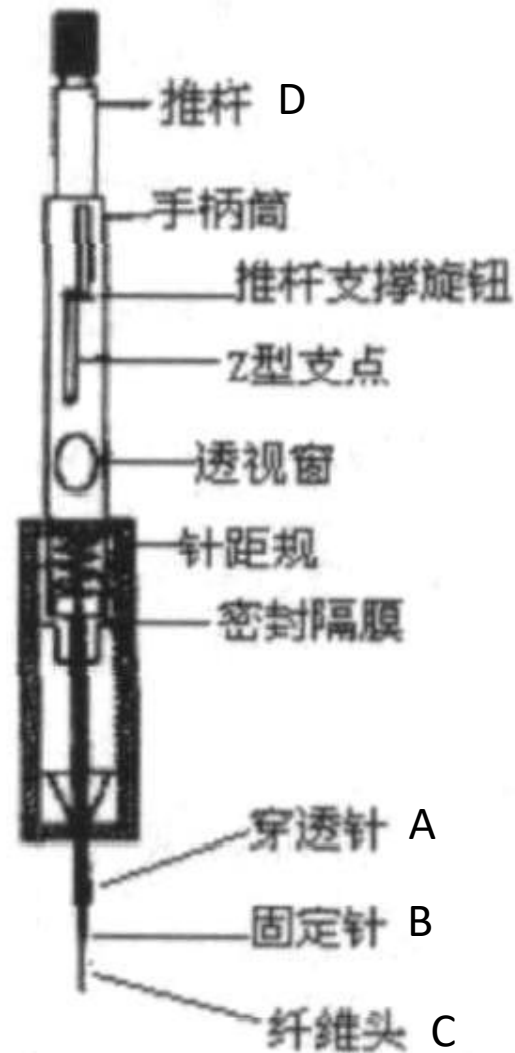


图 1 固相微萃取装置示意图



03 | 固相（微）萃取技术（SPME）

6、顶空固相微萃取（HS-SPME）与直接固相微萃取

上文中提取GSM使用的方法是顶空固相微萃取（HS-SPME），与直接萃取的区别就在于吸附涂层的石英纤维没有伸入样品中。

| | 顶空 SPME | 直接 SPME |
|------|-----------|--------------|
| 基质 | 任何基质 | 气/液态、干净样品 |
| 待测物 | 挥发/半挥发性 | 多数化合物(无机离子) |
| 萃取时间 | 短(<5m in) | 长(> 10 m in) |
| 回收率 | 低 | 高 |

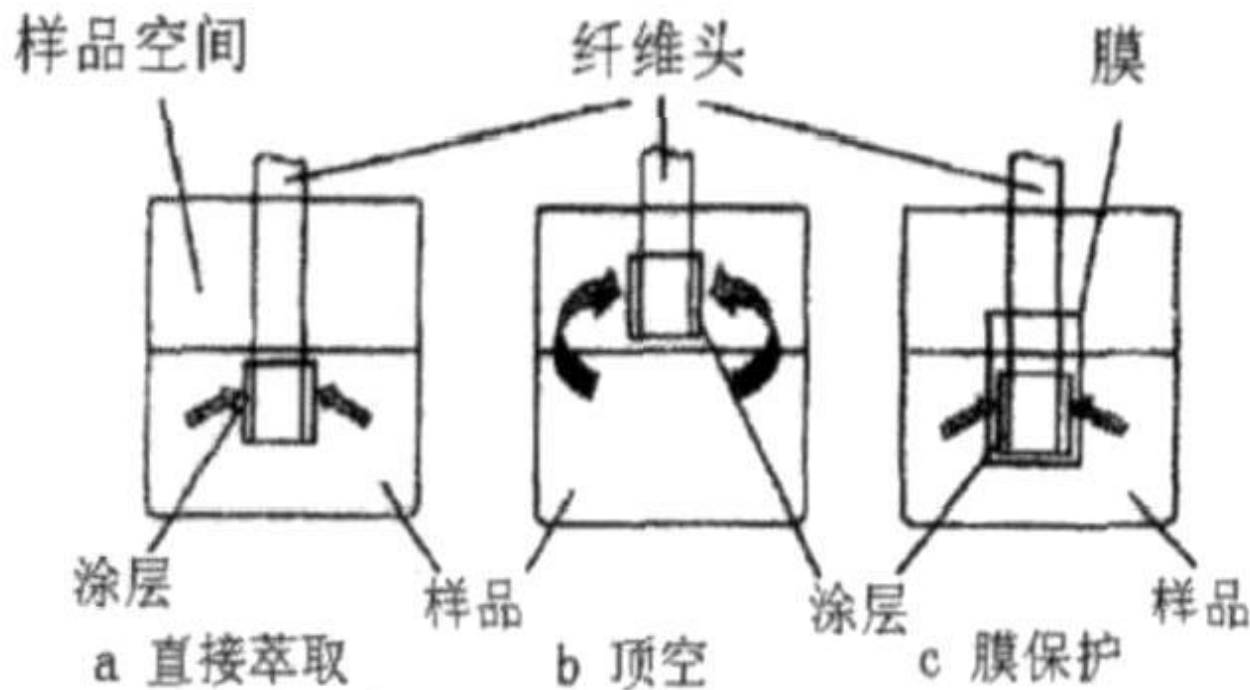


图 2 固相微萃取三种萃取方式



04

PART FOUR
所学所得



04 | 所学所得

A

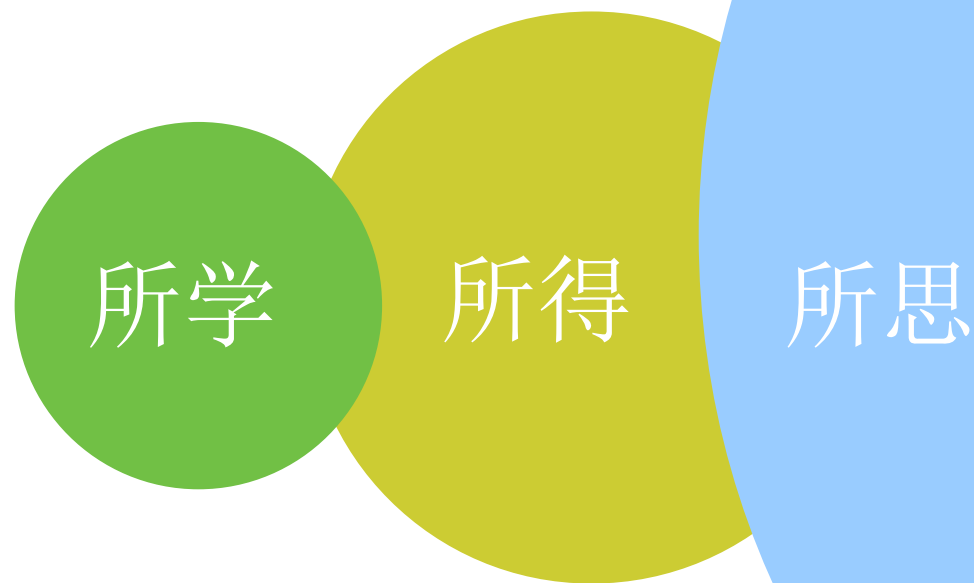
所学，一篇土臭素文献及其相关文献；

B

土臭素相关知识，固相微萃取技术。

C

发散思维，罪魁祸首链霉菌的消除，鱼体土臭素的提取等





THANK YOU

2018 ▾