(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119736166 A
(43)申请公布日 2025.04.01

(21)申请号 202411721278.8
(22)申请日 2024.11.28
(83)生物保藏信息
CGMCC No.41536 2024.10.11
(71)申请人 宜宾五粮液股份有限公司
地址 644007 四川省宜宾市岷江西路150号
(72)发明人 雷学俊 张霞 郑佳 赵东 苏建 卢彦坪 覃凤阳 刘芳 张清玫 王晓妹 黄箭 李站胜
(74)专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通合伙) 51124
专利代理师 蒋丽萍
(51)Int.Cl.
C12N 1/14(2006.01)
C12G 3/02(2019.01)
C12R 1/645(2006.01)

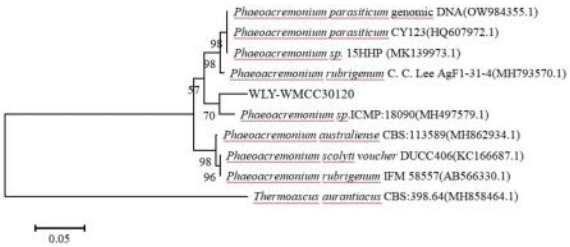
权利要求书1页 说明书9页
序列表（电子公布） 附图3页

(54)发明名称

暗色枝顶孢霉属新菌种及其用途

(57)摘要

本发明属于酿酒微生物发酵技术领域,具体涉及一种暗色枝顶孢霉属(Phaeoacremoniumsp.)新菌种及其用途。为了进一步丰富白酒酿造环境中的有益微生物,本发明从浓香型大曲生产环境中分离筛选得到一株暗色枝顶孢霉属新菌种,保藏编号为CGMCC No.41536。该菌用于制备麸曲和大曲能产多种酿酒所需水解酶;同时较未强化大曲,该菌用于模拟生产强化大曲能高产α-GC和β-GC水解酶;而且模拟窖池发酵,能产生4-乙基苯酚、4-乙基愈创木酚等多种风味物质,为白酒酿造中提升白酒风味提供了一种新的选择,具有广阔的应用前景和极大的应用价值。



CN 119736166 A

1.一种暗色枝顶孢霉属新菌种WLY-WMCC30120,其特征在于:分类学名称为Phaeoacremonium sp.,保藏编号为CGMCC No.41536。

2.一种微生物菌剂,其特征在于:含有权利要求1所述的暗色枝顶孢霉属新菌种。

3.权利要求1所述的暗色枝顶孢霉属新菌种或权利要求2所述的微生物菌剂在白酒酿造中的用途。

4.根据权利要求3所述的用途,其特征在于:所述白酒为酱香型、浓香型、清香型或米香型中至少一种。

5.权利要求1所述的暗色枝顶孢霉属新菌种或权利要求2所述的微生物菌剂在制备麸曲、大曲、强化大曲或酒醅上的用途。

6.根据权利要求5所述的用途,其特征在于:所述的暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂能代谢产水解酶,所述水解酶为α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

7.权利要求1所述的暗色枝顶孢霉属新菌种或权利要求2所述的微生物菌剂在产酿酒风味物质上的用途。

8.根据权利要求7所述的用途,其特征在于:所述风味物质包括4-乙基愈创木酚、乙酸、乙基苯酚、异戊醇、己酸、乙酸乙酯、异戊酸、苯乙醇、异丁酸、2,4-二叔丁基苯酚、2-甲氧基-4-乙烯基苯酚、苯乙醛、异戊醛、油酸甲酯、4-甲基戊酸、γ-壬内酯、棕榈酸乙酯、苯甲酸、正己醇、苯甲醛、丁酸、正戊酸、对羟基苯乙烯、正己酸乙酯、2-丙基-1-戊醇、2,3,5-三甲基吡嗪、正癸醇、甲基麦芽酚、棕榈油酸甲酯、异丁醇、棕榈酸、异辛醇或辛醇中至少一种。

9.根据权利要求8所述的用途,其特征在于:所述暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂在产4-乙基愈创木酚上的应用。

10.根据权利要求8或9所述的用途,其特征在于:所述风味物质是将权利要求1所述的暗色枝顶孢霉属新菌种或权利要求2所述的微生物菌剂在马铃薯葡萄糖液体培养基或五粮粉中进行发酵获得。

暗色枝顶孢霉属新菌种及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于酿酒微生物发酵技术领域,具体涉及一种暗色枝顶孢霉属(Phaeoacremoniumsp.)新菌种及其用途。

背景技术

[0002] 大曲的生产是在开放、自然环境中进行,广泛分布于制曲空气、水、原料、器具和曲房环境等。在制曲过程中,这些自然环境微生物沉降富集到小麦等淀粉质原料制成的曲坯上,通过控温控湿培养,形成各种有益酿酒微生物菌系和酶系,再经贮存成为生产酿造大曲,是酿酒生产糖化剂及发酵剂。

[0003] 暗色枝顶孢霉属(Phaeoacremonium sp.)在分类学上属于真核生物原界、真菌界、子囊菌门、盘菌亚门、粪壳菌纲、Togniniales、Togniniaceae的一属真菌。暗色枝顶孢霉属新菌种的分生孢子的形状为圆柱状、椭圆状、尿囊状等形态。目前,全球大约仅有60个种的暗色枝顶孢霉属微生物新菌种,分布于南非、巴西、西班牙等19个国家,其中有2个种P.cratiense、P.fusiformostromum来源于中国广东、贵州等地的木材中。有研究表明Phaeoacremonium是沉香属植物、麻黄根中的优势真菌属,能够促进白木愈伤组织中倍半萜成分的积累和麻黄根中双黄酮类化合物的合成。

[0004] 然而,目前还未发现暗色枝顶孢霉属微生物在白酒生产尤其是大曲生产环境中的相关报道。

发明内容

[0005] 为了进一步丰富白酒酿造环境中的有益微生物,本发明开发了一种新的酿酒霉菌,其为暗色枝顶孢霉属(Phaeoacremonium sp.)新菌种,菌株编号为WLY-WMCC30120。

[0006] 为实现上述申请目的,本发明采用的技术方案如下:

[0007] 第一方面,本发明提供暗色枝顶孢霉属(Phaeoacremonium sp.)新菌种,菌株编号为WLY-WMCC30120,保藏编号为CGMCC No.41536。该新菌种保藏时间为2024年10月11日;保藏地点为:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编:100101。分类命名为Phaeoacremonium sp.。

[0008] 其中,上述暗色枝顶孢霉属新菌种的ITS rRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] SEQ ID NO:1暗色枝顶孢霉属新菌种的ITS rRNA的核苷酸序列:

[0010] ttgggaagtaaaagtcgtaacaaggtctccgttggtgaaccagcggagggatcattaccgagtctcgtactccaaaccctttgtgaacatacctgtttctcgttgcttcggcaggtgaaggcggagggccccccgggcccaatgccgccgccgggcgccccacttcgcggtgggggccgccgggcgggcctgccggagggacgcgcaaaactctgtattaaaacgtacatctctgagttatcttttacaaacaagtaaaaactttcaacaacggatctcttggttctggcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgaatcatcgaatctttgaacgcacattgcgcccgccagtattctggcgggcatgcctgtccgagcgtcatttcaaccctcaggccccggttgcctggtgttgggg

cgccgcgcaccctcagcgggcgcgggccccgaaagtcagtggcgggctcgccaggactccgagcgcagtaattatc tctcgctgtggagcgcctggtgggtttcccggccgtaaaacacccaaaactttccaaaggttgacctcggatcagg taggaatacccgctgaacttaagcatatcaaaatcgggaaggaa。

[0011] 其中,上述暗色枝顶孢霉属新菌种的形态学特征为:菌丝无隔膜且粗糙,有芽孢子,孢子形状为长椭圆形;菌落中央呈黑色,边缘呈白色,表面平坦,质地颗粒状,边缘整齐扩散。

[0012] 其中,上述暗色枝顶孢霉属新菌种所制备的麸曲能产α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

[0013] 其中,上述暗色枝顶孢霉属新菌种所制备的大曲能产α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

[0014] 其中,上述暗色枝顶孢霉属新菌种所制备的强化大曲能产α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

[0015] 第二方面,本发明提供一种微生物菌剂,其含有上述暗色枝顶孢霉属新菌种。

[0016] 第三方面,本发明提供上述暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂在白酒酿造中的用途。

[0017] 其中,所述白酒为酱香型、浓香型、清香型或米香型中至少一种。

[0018] 第四方面,本发明提供上述暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂在制备麸曲、大曲、强化大曲或酒醅上的用途。

[0019] 其中,所述的暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂能代谢产水解酶,所述水解酶为α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

[0020] 第五方面,本发明提供上述暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂在产酿酒风味物质上的用途。

[0021] 其中,所述风味物质包括4-乙基愈创木酚、乙酸、乙基苯酚、异戊醇、己酸、乙酸乙酯、异戊酸、苯乙醇、异丁酸、2,4-二叔丁基苯酚、2-甲氧基-4-乙烯基苯酚、苯乙醛、异戊醛、油酸甲酯、4-甲基戊酸、γ-壬内酯、棕榈酸乙酯、苯甲酸、正己醇、苯甲醛、丁酸、正戊酸、对羟基苯乙烯、正己酸乙酯、2-丙基-1-戊醇、2,3,5-三甲基吡嗪、正癸醇、甲基麦芽酚、棕榈油酸甲酯、异丁醇、棕榈酸、异辛醇或辛醇中至少一种。

[0022] 特别地,上述暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂在产4-乙基愈创木酚上的用途。

[0023] 其中,所述风味物质是将上述暗色枝顶孢霉属新菌种或微生物菌剂在马铃薯葡萄糖液体培养基或五粮粉中进行发酵。

[0024] 有益效果:本发明从浓香型大曲生产环境中分离筛选得到了一株暗色枝顶孢霉属(Phaeoacremonium sp.)新菌种,保藏编号为CGMCC No.41536。将该新菌种用于制备麸曲和大曲能代谢产多种水解酶;同时将该新菌种用于模拟生产强化大曲能高产β-葡萄糖苷酶,活力达1522.40U/g干曲,较未强化大曲提高了2倍;而且模拟窖池发酵条件下可产生4-乙基

苯酚、4-乙基愈创木酚等多种风味物质,拓宽了产4-乙基愈创木酚的微生物来源,使其不限于酵母和芽孢杆菌;同时满足白酒酿造,尤其是多粮浓香型白酒酿造的需求,为白酒酿造中提升白酒风味提供了一种新的选择,具有广阔的应用前景和极大的应用价值。

附图说明

[0025] 图1为本发明暗色枝顶孢霉属新菌种WLY-WMCC30120基于ITS序列的Neighbor-Joining法构建的系统发育树;

[0026] 图2为本发明暗色枝顶孢霉属新菌种WLY-WMCC30120菌体显微形态图;

[0027] 图3为本发明暗色枝顶孢霉属新菌种WLY-WMCC30120菌落形态图;

[0028] 图4为本发明暗色枝顶孢霉属新菌种WLY-WMCC30120麸皮培养基上制备麸曲产酶结果图;

[0029] 图5为本发明暗色枝顶孢霉属新菌种WLY-WMCC30120纯小麦培养基上制备大曲产酶结果图;

[0030] 图6为本发明暗色枝顶孢霉属新菌种WLY-WMCC30120模拟强化大曲产酶结果图。

[0031] 本发明的暗色枝顶孢霉属新菌种,保藏编号为CGMCC No.41536。保藏时间为2024年10月11日;保藏中心为:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编:100101,分类命名为Phaeoacremonium sp.。

具体实施方式

[0032] 为了使本申请要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施方式,对本申请进行进一步详细说明。除非另有定义,本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的相同含义。

[0033] 本发明中出现的酶及缩写如下:α-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20缩写为α-GC)、β-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21缩写为β-GC)、α-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22缩写为α-GAL)、β-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.23缩写为β-GAL)、N-乙酰基-β-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.52缩写为NAG)、羧酸酯酶(EC 3.1.1.1缩写为CarE)、碱性蛋白酶(EC 3.4.4.16缩写为AKP)、酸性蛋白酶(EC 3.4.23.18缩写为ACP)、中性蛋白酶(缩写为NP)、脂肪酶(EC 3.1.1.3缩写为LPS)、β-葡萄糖醛酸苷酶(EC 3.2.1.31缩写为β-GD)、糖化酶(EC 3.2.1.3)、外切β-1,4-葡聚糖酶/纤维二糖苷酶(EC 3.2.1.91缩写为C1)、α-L-阿拉伯呋喃糖苷酶(EC 3.2.1.55缩写为α-L-Af)、β-木糖苷酶(EC 3.2.1.37)、纤维素酶(EC 3.2.1.4缩写为CL)、α-淀粉酶(EC 3.2.1.1缩写为α-AL)、β-淀粉酶(EC 3.2.1.2缩写为β-AL)、果胶酶、植物蔗糖酶(EC 3.2.1.26缩写为P-SC)、多聚半乳糖醛酸酶(EC 3.2.1.15缩写为PG)、酰基转移酶(EC 2.3.1.-缩写为AAT)。

[0034] 在本发明的一种实施方式中,提供了一种暗色枝顶孢霉属新菌种,保藏编号为CGMCCNo.41536。保藏时间为2024年10月11日;保藏中心为:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编:100101,分类命名为Phaeoacremonium sp.。其是从宜宾五粮液股份有限公司制曲环境中筛选分离的,生物学特征为:菌丝无隔膜且粗糙,有芽孢子,孢子形状为长椭圆形;菌落中央呈黑色,边缘呈白色,表面平坦,质地颗粒状,边缘整齐扩散。

[0035] 其中,本发明所述的暗色枝顶孢霉属新菌种的ITS rRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0036] 在本发明的一种实施方式中,将所述的暗色枝顶孢霉属新菌种于麸皮培养基上制备麸曲,能产α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

[0037] 在本发明的一种实施方式中,将所述暗色枝顶孢霉属新菌种制备大曲能产α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

[0038] 在本发明的一种实施方式中,将所述暗色枝顶孢霉属新菌种制备强化大曲能产α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT中至少一种。

[0039] 在本发明的一种实施方式中,将所述的暗色枝顶孢霉属新菌种采用马铃薯葡萄糖和五粮粉液态静置发酵模拟窖池发酵,发酵条件下可产生4-乙基苯酚、4-乙基愈创木酚等多种风味物质,满足多粮浓香型白酒酿造的需求,提高了白酒酿造中的风味物质成分和含量,为提升白酒风味提供了基础。

[0040] 下面将列举具体实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0041] 实施例1新菌种筛选

[0042] 1、新菌种的初筛

[0043] 材料:宜宾五粮液股份有限公司制曲环境

[0044] 培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):商业合成培养基,购买于广东环凯微生物科技有限公司,产品型号为021052。马铃薯葡萄糖液体培养基::商业合成培养基,购买于广东环凯微生物科技有限公司,产品型号为021053。

[0045] 2、试验方法:

[0046] 选取宜宾五粮液股份有限公司制曲环境,采用浙江苏净净化设备有限公司FKC-1型浮游菌采样器,距离地面80cm,将直径为9cm的麦芽汁琼脂平板置于采样器内,每次采用设置三个平行,空气流量为100L/min,采样时间为1min。然后将平板倒置于28℃培养箱中培养3-4d;待菌落长出后,挑选菌落形态不同的霉菌单菌落于PDA培养基中,编号并划线纯化,重复纯化2~3次,直至平板上的菌落都为同一形态。挑取单菌落制成水浸片,于显微镜下观察菌体细胞形态,分离纯化完成,斜面试管保存于4℃冰箱。

[0047] 实施例2本发明暗色枝顶孢霉属新菌种的形态鉴定

[0048] 下述各试验中均要用到新活化的菌体,挑取少量菌体接种于PDA培养基中,28℃培养3-5d。

[0049] 菌落及菌体形态观察:

[0050] 将上述经活化的暗色枝顶孢霉属新菌种用接种环划线接种于PDA培养基上,28℃培养5-7d,观察菌落形态;用接种针挑取少量菌体,利用显微镜观察菌体形态。

[0051] 菌体观察结果:菌丝无隔膜且粗糙,有芽孢子,孢子形状为长椭圆形。如图2所示。

[0052] 菌落观察结果:菌落中央呈黑色,边缘呈白色,表面平坦,质地颗粒状,边缘整齐扩散。如图3所示。

[0053] 实施例3本发明暗色枝顶孢霉属新菌种分子生物学的鉴定

[0054] 提取新菌种基因组DNA,用ITS通用引物对正向引物ITS1,SEQ ID NO:2:TCCGTAGGTGAACCTGCGG和ITS4,SEQ ID NO:3:TCCTCCGCTTATTGATATGC扩增基因组DNA,反应条件为:94℃预变性4min后进入以下循环:94℃变性45s,55℃退火45s,72℃延伸60s,30个循环;72℃延伸10min。经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果良好。将PCR扩增产物寄送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将测序结果在NCBI数据库上进行BLAST序列比对,新菌种WLY-WMCC30120与Phaeoacremonium rubrigenum、Phaeoacremonium parasiticum^{T}同源性分别为94.49%、93.43%,与亲缘关系最近的新菌种的碱基序列差异为5.51%,与Phaeoacremonium parasiticum模式新菌种的碱基序列差异为6.57%,均远大于霉菌菌种间在此区域的序列差异(-1%),结合菌落形态、菌体特征、ITS rDNA基因序列分析,确定为暗色枝顶孢霉属中的一个新种,并命名为Phaeoacremonium sp.WLY-WMCC30120。将所述新菌种于2024年10月11日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No.41536,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所。

[0055] 其生物学特征为:菌丝无隔膜且粗糙,有芽孢子,孢子形状为长椭圆形;菌落中央呈黑色,边缘呈白色,表面平坦,质地颗粒状,边缘整齐扩散。

[0056] 实施例4本发明新菌种WLY-WMCC30120的产酶性质

[0057] 培养基:活化培养基:商业合成培养基,购买于广东环凯微生物科技有限公司,产品型号为021053;

[0058] 麸皮培养基:麸皮10g,蒸馏水8mL,搅拌均匀,121℃高压灭菌20min;

[0059] 大曲制备:纯小麦经热水润后按照现有常规制曲工艺要求进行粉碎,加水拌和成曲胚,121℃高压灭菌20min;

[0060] 模拟强化大曲:纯小麦经热水润后按照现有浓香型白酒大曲制备工艺要求进行粉碎,加水拌和成曲胚。

[0061] 酶学性质分析:本发明检测了22种水解酶,分别为α-GC、β-GC、α-GAL、β-GAL、NAG、CarE、AKP、ACP、NP、LPS、β-GD、糖化酶、C1、α-L-Af、β-木糖苷酶、CL、α-AL、β-AL、果胶酶、P-SC、PG和AAT。这22种酶活检测均参照定量试剂盒(北京盒子生工有限公司)进行。

[0062] 其中,α-GC的标准曲线为y=0.032x+0.0068,R^2=0.9999;β-GC的标准曲线为y=0.0033x+0.0045,R^2=0.9999;α-GAL的标准曲线为y=0.0034x-0.0008,R^2=0.9996;β-GAL的标准曲线为y=0.0036x+0.0142,R^2=0.9994;糖化酶的标准曲线为y=0.2954x-0.1997,R^2=0.9933;α-L-Af的标准曲线为y=0.0073x+0.0195,R^2=0.9997;β-木糖苷酶的标准曲线为y=1.5042x-0.0768,R^2=0.9959;CL的标准曲线为y=0.3758x-0.0636,R^2=0.9999;α-AL和β-AL的标准曲线为y=1.991x-0.1095,R^2=0.9999;果胶酶的标准曲线为y=0.1042x-0.1389,R^2=0.9931;P-SC的标准曲线为y=0.3398x-0.06,R^2=0.9993;PG的标准曲线为y=0.1983x+0.0741,R^2=0.9972;LPS标准曲线为y=0.0067x+0.1531,R^2=0.9952;NAG标准值为0.285;CarE的标准值为0.004,ACP的标准值为0.753,AKP的标准值为0.696,NP的标准值为0.753;β-GD的标准值为0.001;所有标准曲线中“y”为吸光值,“x”为标准品的浓度。

[0063] 其中,根据吸光值,结合标准曲线,求出相应底物生成量。

[0064] 其中,α-GC酶活单位的定义:每g大曲在每mL体系中每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活单位;β-GC酶活单位定义:每g大曲在每mL体系中每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活单位;α-GAL酶活单位定义:每g大曲在每mL体系中每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活活力单位;β-GAL酶活单位定义:每g大曲在每mL体系中每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活单位;NAG酶活单位定义:每g大曲在每mL体系中每分钟生成1nmol对硝基苯酚定义为一个酶活力单位;CarE酶活单位定义:37℃条件下,每g大曲每分钟催化吸光值增加0.5定义为一个酶活力单位;AKP酶活单位定义:30℃每mL液体样本每分钟催化生成1μmol酪氨酸定义为一个酶活力单位;ACP酶活单位定义:30℃每mL液体样本每分钟催化生成1μmol酪氨酸定义为一个酶活力单位;NP酶活单位定义:30℃每mL液体样本每分钟催化生成1μmol酪氨酸定义为一个酶活力单位;LPS酶活单位定义:37℃条件下,每g大曲每分钟氧化1nmol NADPH定义为一个酶活力单位;β-GD酶活单位定义:每g大曲每小时生成1μmol酚酞所需酶量定义为一个酶活力单位;糖化酶的酶活单位定义:每g大曲在每小时生成1mg葡萄糖定义为一个酶活单位;C1酶活单位定义:每g大曲每小时产生1nmol对-硝基苯酚为一个酶活力单位;α-L-Af酶活单位定义:每g大曲在每分钟生成1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活单位;β-木糖苷酶的酶活单位定义:每g大曲在每分钟生成1μmol对-硝基苯酚定义为一个酶活单位;CL酶活单位定义:每g大曲在每分钟催化产生1μg葡萄糖定义为一个酶活单位;α-AL和β-AL酶活单位定义:每g大曲在每分钟生成1mg葡萄糖定义为一个酶活单位;果胶酶的酶活单位定义:50℃pH 3.5条件下,每g大曲每小时产生1μmol半乳糖醛酸为一个酶活力单位;P-SC酶活单位定义:每g大曲每分钟催化水解1μg蔗糖为一个酶活力单位;PG酶活单位定义:40℃pH 6.0条件下,每g大曲每小时分解多聚半乳糖醛酸生成1mg半乳糖醛酸定义为一个酶活力单位;AAT酶活力单位定义:37℃条件下,每mL体系中每g大曲每分钟催化吸光值变化0.0005定义为一个酶活力单位。

[0065] (1)将目标新菌株WLY-WMCC30120采用活化培养基进行活化,确认无污染后,按照10%接种量接种于麸皮培养基中制备麸曲,于28℃培养5天。检测培养后的水解酶活力。与空白对照组对比,新菌种WLY-WMCC30120在麸皮培养基上能代谢高产AAT、β-GC、糖化酶、β-GAL、NAG、C1、α-GAL、AKP、α-GC和α-L-Af等10种水解酶。其中,能高产AAT(EC 2.3.1.-)活力达5800U/g干曲、β-GC(EC 3.2.1.21)活力达2671.72U/g干曲、糖化酶(EC 3.2.1.3)活力达1888.46U/g干曲、β-GAL(EC 3.2.1.23)活力达1129.82U/g干曲、NAG(EC 3.2.1.52)活力达579.68U/g干曲、C1(EC 3.2.1.91)活力达438.59U/g干曲、α-GAL(EC 3.2.1.22)活力达323.78U/g干曲)、AKP(EC 3.4.4.16)活力达319.43U/g干曲、、α-GC(EC 3.2.1.20)活力达222.98U/g干曲、α-L-Af(EC 3.2.1.55)活力达154.25U/g干曲,如图4所示。

[0066] (2)将目标新菌株WLY-WMCC30120采用活化培养基进行活化,确认无污染后,按照10%接种量接种于纯小麦培养基中制备大曲,于28℃培养5天。检测培养后的水解酶活力。与空白对照组对比,新菌种WLY-WMCC30120所制备的大曲能代谢高产AAT、β-GAL、β-GC和AKP等4种水解酶。其中,能高产AAT(EC 2.3.1.-)活力达1013.33U/g干曲、β-GAL(EC 3.2.1.23)活力达474.07U/g干曲、β-GC(EC 3.2.1.21)活力达215.42U/g干曲,AKP(EC 3.4.4.16)活力达142.03U/g干曲,如图5所示。

[0067] (3)将目标新菌株WLY-WMCC30120采用活化培养基进行活化,确认无污染后,按照10%接种量接种于新鲜曲胚中制备强化大曲,于28℃培养5天。检测培养后的水解酶活力。

与未强化组对比,新菌种WLY-WMCC30120制备的强化大曲能代谢高产α-GC、β-GC等2种水解酶。其中,能高产α-GC(EC 3.2.1.20)活力达507.26U/g干曲和β-GC(EC 3.2.1.21)活力达1522.40U/g干曲,较未强化大曲提高了2倍,如图6所示。

[0068] 实施例5本发明新菌种WLY-WMCC30120发酵液中主要风味成分分析

[0069] 培养基:马铃薯葡萄糖液体培养基。商业合成培养基,购买于广东环凯微生物科技有限公司,产品型号为021053。

[0070] 培养基:五粮粉。五粮(高粱占36%,大米占22%,糯米占18%,小麦占16%,玉米占8%)经打成细粉,按照五粮粉:水=1:10,自来水煮沸,加入细五粮粉,大约熬煮40min(成稀粥状),冷却至60℃左右,同时加入液化酶(5g/3L)和糖化酶(5g/3L),62℃保温液化和糖化4h,其间每间隔1h搅拌一次,放置4℃冰箱过夜,8层纱布过滤,补足水分,加入葡萄糖使糖度活力达到12°Bé左右,pH约为6.8,分装灭菌备用。

[0071] 将新菌种WLY-WMCC30120的种子液按1%的接种量,接入马铃薯葡萄糖液体培养基和五粮粉培养基中,装液量200mL/250mL三角瓶,密封,同一处理的样品做三组平行,置于28℃培养发酵5天。

[0072] 发酵液中风味物质的前处理方法:准确吸取1.0mL发酵液装入顶空瓶中,再加入0.3g氯化钠和6μL 4-辛醇(浓度为12ppb),将装好样本的顶空瓶插入萃取柱后置于50℃水浴平衡15min后萃取45min,上机待测。

[0073] 发酵液中风味性化合物经前处理提取后,随后采用HS-SPME分析。根据以下程序进行分离:气相色谱条件:DB-WAX毛细管柱(30m×250μm×0.25μm);载气为氦气(纯度≥99.999%),流速1mL/min;进样方式:不分流进样;柱温:起始温度60℃,保持1min,以8℃/min升至200℃,保持1min,以30℃/min升至280℃,保持2min;进样口温度:250℃;辅助加热温度280℃。

[0074] 以4-辛醇(12.0ppb)为内标,采用峰面积归一化法进行半定量分析。采用选择离子(SIM)计算各化合物的峰面积,并与内标物质的峰面积之比计算各化合物的浓度。

[0075] 测定结果如表1所示,可见:新菌种在马铃薯葡萄糖液体培养基中主要产生异戊醛、乙酸、异戊醇。在五粮粉培养基中主要产4-乙基愈创木酚、乙酸、4-乙基苯酚、异戊醇、己酸、乙酸乙酯、异戊酸、苯乙醇、异丁酸。在两种培养基中共同主要乙酸、异戊醇。

[0076] 目前研究报道产4-乙基愈创木酚主要为酵母(邹谋勇,何理琴,孙启星,等.产4-乙基愈创木酚酵母的鉴定及其在酱油中的应用[J].食品科学,2021,42(12):138-144.)和芽孢杆菌(郭明威,耿予欢.酱油发酵过程中一株4-乙基愈创木酚转化菌的筛选及鉴定[J].食品与发酵工业,2021,47(21):18-23.DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026836.),未见报道于霉菌中,本发明暗色枝顶孢霉属新菌种为首次报道霉菌代谢产4-乙基愈创木酚。

[0077] 4-乙基愈创木酚呈辛香、花香、丁香、烟熏、烤面包、腌猪后腿、酚气味,广泛存在于葡萄酒、啤酒、朗姆酒、威士忌、白地兰、白酒、酱油、醋中,其在浓香型白酒中的平均含量为96.07μg/L(范文来,徐岩.酒类风味化学,中国轻工业出版社,2020.),本发明暗色枝顶孢霉属新菌种静置发酵模拟窖池发酵能高产4-乙基愈创木酚达223.64μg/L。

[0078] 表1新菌种WLY-WMCC30120在不同培养基中的风味物质

[0079]

序号	化合物名	含量（μg/L）	
		马铃薯葡萄糖培养液	五粮粉培养基
1	4-乙基愈创木酚	5.42	223.64
2	乙酸	57.55	132.68
3	4-乙基苯酚	0.28	80.34
4	异戊醇	19.34	24.79
5	己酸	1.59	24.11
7	乙酸乙酯	0.17	15.13
8	异戊酸	1.21	13.80
9	苯乙醇	未检出	13.49

[0080]

10	异丁酸	0.34	10.89
11	2,4-二叔丁基苯酚	5.90	7.82
12	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	0.11	5.78
13	苯乙醛	5.01	5.54
14	异戊醛	8.04	5.44
15	油酸甲酯	未检出	5.26
16	4-甲基戊酸	0.12	4.20
17	γ-壬内酯	0.96	3.82
18	棕榈酸乙酯	0.48	3.43
19	苯甲酸	0.31	3.26
20	正己醇	1.23	3.13
21	苯甲醛	1.81	2.94
22	丁酸	未检出	2.65
23	正戊酸	未检出	2.39
24	对羟基苯乙烯	未检出	1.97
25	正己酸乙酯	未检出	1.53
26	2-丙基-1-戊醇	未检出	1.38
27	2,3,5-三甲基吡嗪	未检出	1.27
28	正癸醇	未检出	1.24
29	甲基麦芽酚	未检出	1.07
30	棕榈油酸甲酯	未检出	1.06
31	异丁醇	0.95	1.02
32	棕榈酸	1.74	未检出
33	异辛醇	1.79	未检出
34	辛醇	1.85	未检出

[0081] 由上述实施例可知,本发明的WLY-WMCC30120新菌种可用于产多种水解酶和发酵产多种风味物质,将其用于白酒酿造,能够提升白酒风味,酿造出风味更佳的白酒,具有很好的应用价值。

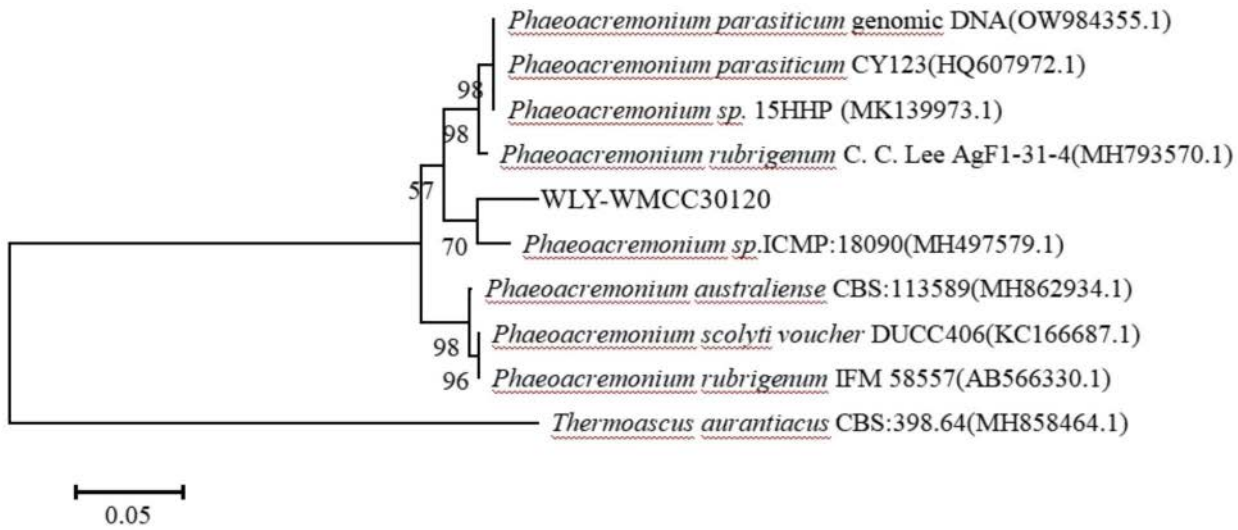

Phaeoacremonium parasiticum genomic DNA(OW984355.1)
Phaeoacremonium parasiticum CY123(HQ607972.1)
98
Phaeoacremonium sp. 15HHP (MK139973.1)
98
Phaeoacremonium rubrigenum C. C. Lee AgF1-31-4(MH793570.1)
57
WLY-WMCC30120
70
Phaeoacremonium sp.ICMP:18090(MH497579.1)
Phaeoacremonium australiense CBS:113589(MH862934.1)
Phaeoacremonium scolyti voucher DUCC406(KC166687.1)
98
96
Phaeoacremonium rubrigenum IFM 58557(AB566330.1)
Thermoascus aurantiacus CBS:398.64(MH858464.1)
0.05

图1

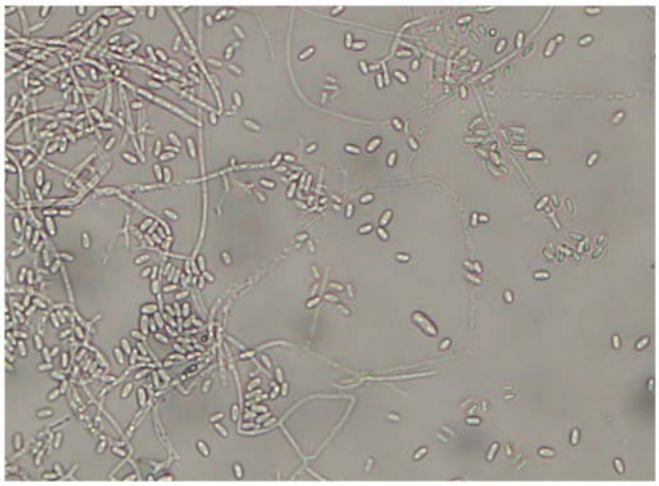


图2



图3

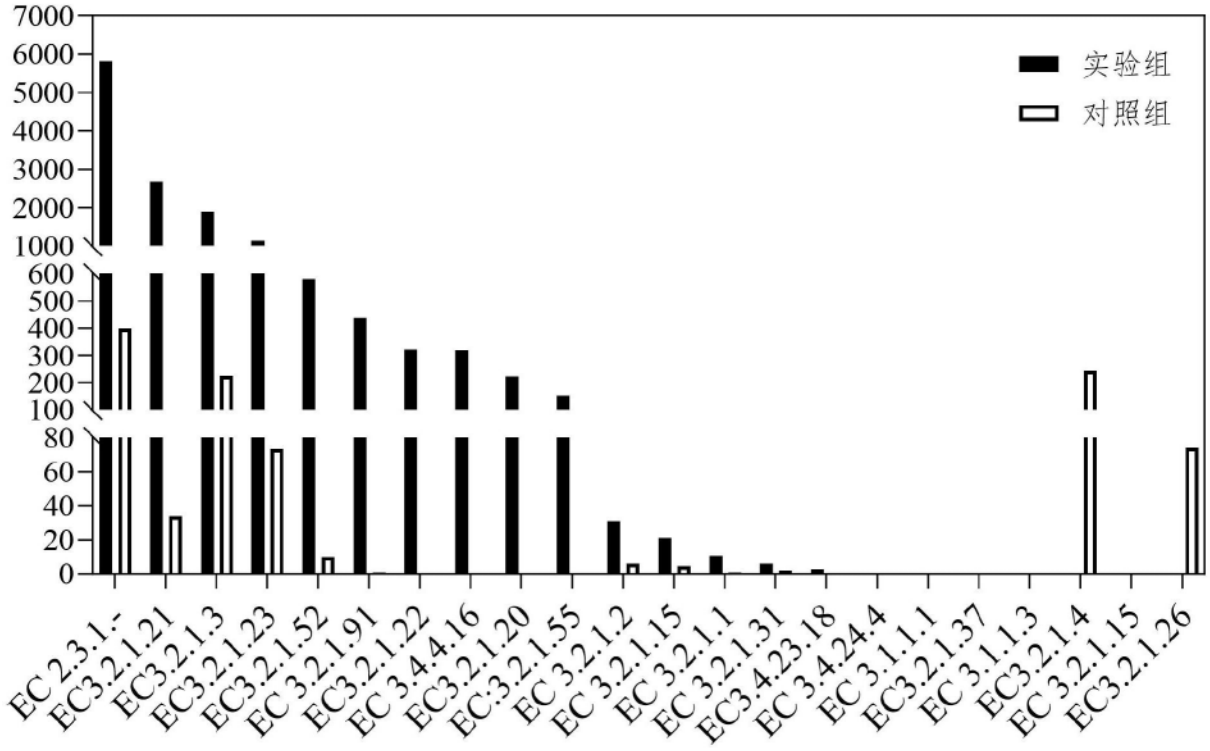

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
600
500
400
300
200
100
80
60
40
20
0
实验组
对照组
EC 2.3.1.-
EC3.2.1.21
EC3.2.1.3
EC3.2.1.23
EC3.2.1.52
EC 3.2.1.91
EC3.2.1.22
EC 3.4.4.16
EC3.2.1.20
EC:3.2.1.55
EC 3.2.1.2
EC 3.2.1.15
EC 3.2.1.1
EC 3.2.1.31
EC3.4.23.18
EC 3.4.24.4
EC 3.1.1.1
EC3.2.1.37
EC 3.1.1.3
EC3.2.1.4
EC 3.2.1.15
EC3.2.1.26

图4

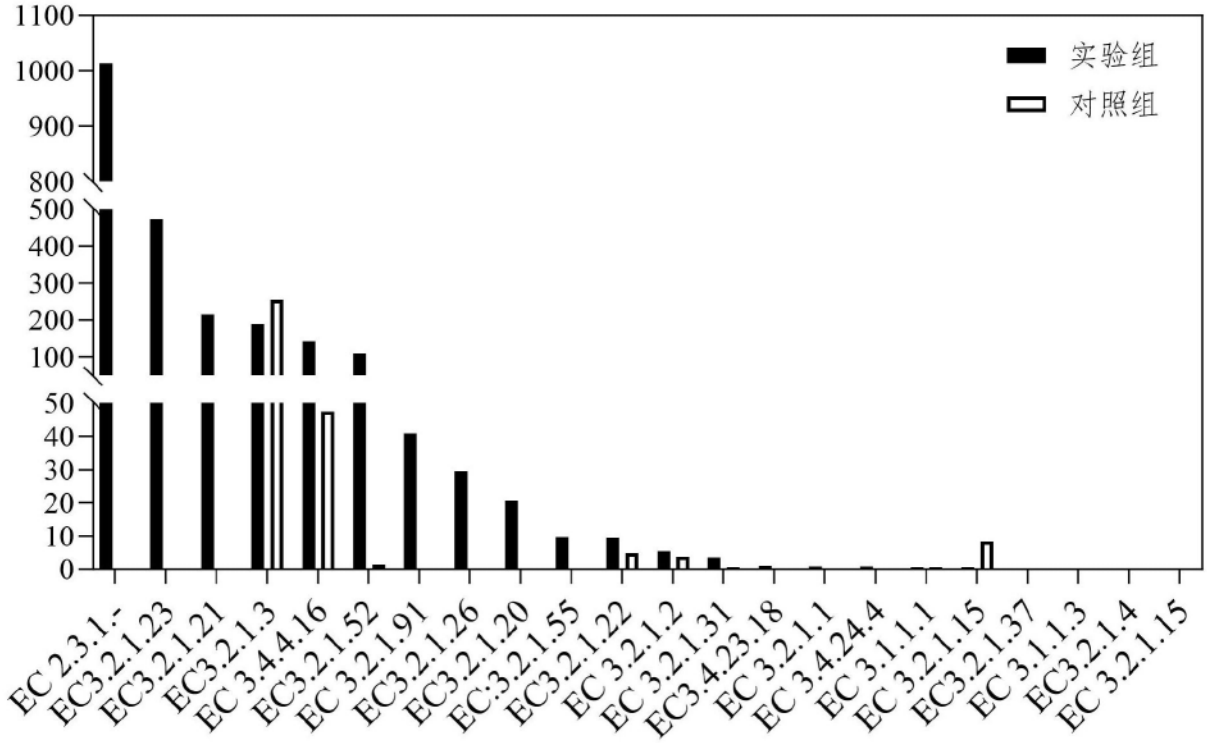

1100
1000
900
800
500
400
300
200
100
50
40
30
20
10
0
实验组
对照组
EC 2.3.1.-
EC3.2.1.23
EC3.2.1.21
EC3.2.1.3
EC 3.4.4.16
EC3.2.1.52
EC 3.2.1.91
EC3.2.1.26
EC3.2.1.20
EC:3.2.1.55
EC3.2.1.22
EC 3.2.1.2
EC 3.2.1.31
EC3.4.23.18
EC 3.2.1.1
EC 3.4.24.4
EC 3.1.1.1
EC 3.2.1.15
EC3.2.1.37
EC 3.1.1.3
EC3.2.1.4
EC 3.2.1.15

图5

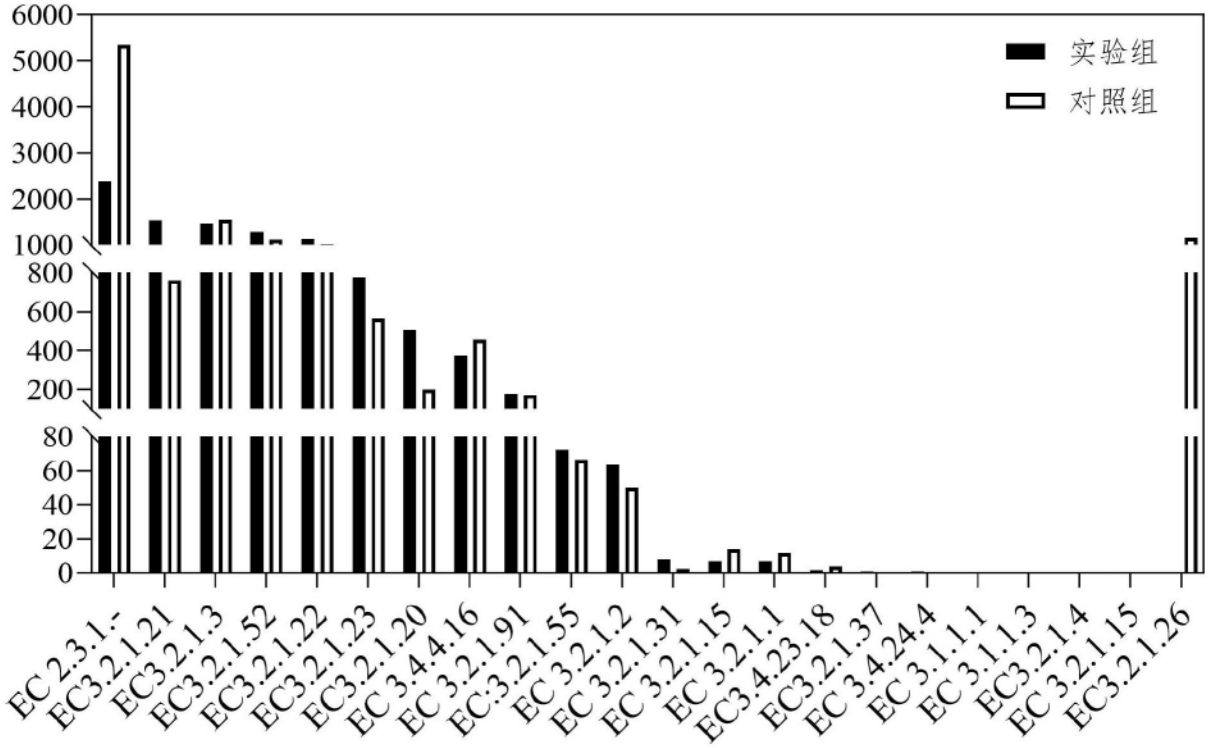

6000
5000
4000
3000
2000
1000
800
600
400
200
80
60
40
20
0
实验组
对照组
EC 2.3.1.-
EC3.2.1.21
EC3.2.1.3
EC3.2.1.52
EC3.2.1.22
EC3.2.1.23
EC3.2.1.20
EC 3.4.4.16
EC 3.2.1.91
EC:3.2.1.55
EC 3.2.1.2
EC 3.2.1.31
EC 3.2.1.15
EC 3.2.1.1
EC3.4.23.18
EC3.2.1.37
EC 3.4.24.4
EC 3.1.1.1
EC 3.1.1.3
EC3.2.1.4
EC 3.2.1.15
EC3.2.1.26

图6