

# 一株致香真菌香气成分的 GC-MS 分析

李德英, 李娜 (青海大学生态环境工程学院, 青海西宁 810016)

**摘要** [目的] GC-MS 分析致香真菌香气成分。[方法] 用顶空液相微萃取法(HSLM)和有机溶剂萃取法对一株致香真菌产生的香气进行萃取分析。[结果] 顶空液相微萃取法, 萃取剂甲醇的效果好, 最适萃取体积为 3  $\mu\text{l}$ , 萃取时间为 5 min。其中烃类有 8 种, 含量占总量的 8.03%; 醇类有 2 种, 含量占总量的 0.03%; 酯类有 5 种, 含量占总量的 7.95%; 酮类为 3 种, 含量占总量的 0.81%; 酸类有 2 种, 含量占总量的 0.11%。有机溶剂萃取法, 萃取剂乙醚的萃取效果好, 其中烃类有 20 种, 含量占总量的 56.20%; 酸类 3 种, 含量占总量的 3.07%; 酯类 7 种, 含量占总量的 21.27%; 醇类 2 种, 含量占总量的 1.62%; 酮类有 1 种, 含量占总量的 0.51%。[结论] 对该致香真菌香气成分的分析可为其应用提供参考。

**关键词** 香气成分; 气相色谱-质谱联用仪; 致香真菌; 顶空液相萃取法

**中图分类号** S182; Q935 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)03-217-03

## GC-MS Analysis of the Aroma Compounds Produced by an Aroma Fungi

LI De-ying, LI Na (The Ecological Environment Engineering College, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

**Abstract** [Objective] The aroma compounds produced by a fungi were analyzed by GC-MS. [Method] Two methods for extracting sweet smelling substance of an aroma fungi by Head-Space Liquid-Phase Microextraction (HSLM) and Solvent Extraction. GC-MS was used in the research. [Result] The method of HSLM, better extractant was methanol, extractant volume was 3  $\mu\text{l}$ , time was 5 minutes. Volatile compounds were hydrocarbon (8 kinds, taking up relative content 8.03%), alcohol (2 kinds, taking up relative content 0.03%), esters (5 kinds, taking up relative content 7.95%), ketones (3 kinds, taking up relative content 0.81%), and acids (2 kinds, taking up relative content 0.11%). The method of Solvent Extraction, better extractant was ether. Volatile compounds were hydrocarbon (20 kinds, taking up relative content 56.20%), alcohol (2 kinds, taking up relative content 1.62%), esters (7 kinds, taking up relative content 21.27%), ketones (1 kinds, taking up relative content 0.51%), and acids (3 kinds, taking up relative content 3.07%). [Conclusion] Analysis of aroma components of the aroma fungi laid the foundation for study and development of natural perfume.

**Key words** Aroma components; GC-MS; Aroma fungi; Head-space liquid-phase microextraction

微生物因代谢产生不同气味物质而被人们所知, 而这些气味有些是人们喜欢的, 而有些则是让人们厌恶的。由于有些微生物有其特殊的气味, 而被广泛用于食物和饮料中, 如牛奶、奶酪、奶油、酒等<sup>[1-2]</sup>。人们把能够产生人们喜欢的气味的微生物称为致香微生物或致香菌。利用微生物生成有香气的物质或者是通过微生物的作用转换成与香料关联的物质的尝试已正在进行<sup>[3]</sup>。Y. Wache 发现, 某些酵母菌能产生香味物质而且已将这些香味物质用于生产香水和香味调料等领域<sup>[4]</sup>。日本研究并已应用的从耐左旋刀豆氨酸变异菌株中分离出的高产香酵母, 生产出的清酒香味成分浓、风味好。同时, 日本在开发利用食用微生物香味剂这方面也有一定的发展<sup>[5]</sup>。虽然, 致香菌在一些领域中已经得到了很好的应用, 但是其应用领域仍可以进一步拓宽<sup>[6]</sup>。为了更好地利用致香微生物, 人们开始研究各种致香微生物所产香气的成分。目前对致香微生物香气成分的分析已有报道<sup>[3,7-10]</sup>, 但利用简单方便的顶空液相萃取法(LPME)<sup>[11]</sup>萃取致香微生物所产香气并进行萃取分析的较少, 该方法是近年来在传统的液-液萃取基础上发展起来的微型化的液相萃取技术, 可以快速有效地萃取香气。笔者采用顶空液相萃取法和有机溶剂萃取法对一株致香真菌香气进行萃取, 利用气相色谱-质谱联用分析法进行致香真菌香气成分分析, 以期为该致香真菌的应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌种。**供试菌种由青海大学微生物实验室分离纯化。

**1.1.2 培养基。**蛋白胨 2 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L,  $\text{KCl}$  0.5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L, 葡萄糖 30 g/L, 麸皮 3 g/L, pH 自然, 121  $^\circ\text{C}$  灭菌 20 min。

**1.1.3 主要仪器。**立式电动电热压力蒸汽灭菌器(LDZX-40 II), 超净工作台, 智能光照培养箱(GXZ), 电子秤(XS.225A-SCS), 恒温振荡器(HZQ-C), 离心机, 气相色谱质谱联用仪(TRACE DSQII, 美国 Thermo Fisher 公司)。

**1.1.4 主要试剂。**蛋白胨、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、葡萄糖、甲醇、丙酮、正辛醇、正己烷、环己烷、四氯化碳、乙醚、甲酸乙酯, 均为分析纯。

**1.2 方法** 液体发酵培养: 定量将菌株接种到装有 100 ml 液体培养基的 250 ml 三角瓶中, 在摇床上以 25  $^\circ\text{C}$ , 120 r/min 的条件培养 3 d, 进行香气的萃取分析。

**1.2.1 顶空液相萃取法。**用微量进样器吸取一定量的有机溶剂萃取剂, 垂直插入样品瓶中, 使针尖位于样品液(液体发酵液)液面上一定距离处, 将微量进样器内的有机溶剂慢慢推出, 使之悬挂在进样器的针尖上, 萃取一定时间后, 慢慢将悬挂的萃取剂抽回到进样器, 再将进样器从样品瓶中抽出, 直接进样到气相色谱质谱联用仪中进行分析。该试验对萃取剂的种类、萃取剂的体积以及萃取时间进行了比较分析。

**1.2.2 有机溶剂萃取法。**将发酵液以 4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。在上清液中加入等体积的有机溶剂萃取 6

**基金项目** 青海大学中青年基金团队项目(2012-QNT-7)。

**作者简介** 李德英(1982-), 女, 青海西宁人, 讲师, 硕士, 从事微生物学研究。

**收稿日期** 2014-12-11

h,取有机相1  $\mu\text{l}$ ,用气相色谱质谱联用仪进行分析。

**1.2.3 香气的分析。**使用气相色谱质谱联用仪对致香真菌香气成分进行分析。色谱条件:GSPB-5MS 毛细管色谱柱(30  $\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ );载气为氦气,流速1  $\text{ml}/\text{min}$ ;进样口温度240  $^{\circ}\text{C}$ ;升温程序为50  $^{\circ}\text{C}$ 保持1  $\text{min}$ ,以8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至260  $^{\circ}\text{C}$ ,保持5  $\text{min}$ ;连接杆温度260  $^{\circ}\text{C}$ 。质谱条件:EI 离子源,离子源温度250  $^{\circ}\text{C}$ 。谱库:NIST05。使用面积归一化法进行相对定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 顶空液相萃取

**2.1.1 萃取剂的选择。**试验选取甲醇、丙酮、正辛醇、正己烷、环己烷、四氯化碳作为萃取剂。结果表明,丙酮、正己烷、环己烷、四氯化碳的挥发性较强,在未到期萃取时间萃取剂已挥发完,不宜选作萃取剂;甲醇和正辛醇初步选为萃取剂。将甲醇和正辛醇的萃取结果进行GC-MS分析,甲醇作为萃

取剂的样品分析出20种,而正辛醇的分析出15种,故甲醇萃取效果好。因此,用于顶空液相萃取的最佳萃取剂为甲醇。

**2.1.2 萃取剂的体积。**萃取剂的体积会直接影响目标物的萃取量。试验表明,萃取剂一般都具有挥发性,萃取剂体积小(1、2  $\mu\text{l}$ ),目标物的萃取量有限;萃取剂体积过大(4  $\mu\text{l}$ ),微量进样器的针尖上悬挂不住。因此,最适当的萃取体积为3  $\mu\text{l}$ 。

**2.1.3 萃取时间。**萃取剂一般都具有挥发性,萃取时间过长,萃取剂的挥发会影响目标物的萃取量;如果萃取时间过短,萃取不够充分,同样会影响目标物的萃取量。试验表明,5  $\text{min}$ 为最适的萃取时间。

**2.1.4 顶空液相萃取香气成分GC-MS分析。**使用顶空液相萃取法时,根据NIST05谱库,并结合人工解析,检出并鉴定出20种化合物,其分析结果如表1。

表1 顶空液相萃取香气成分分析结果

序号	保留时间//min	化合物中文名称	化合物英文名称	相对含量//%
1	3.06	3-甲基-1-丁醇	1-Butanol,3-methyl-	0.01
2	3.39	乙酸-2-甲基丙酯	Acetic acid,2-methylpropyl ester	0.26
3	3.96	N-癸酸	n-Decanoic acid	0.02
4	4.73	3-甲基-1-丁醇-乙酯	3-methyl-1-butanol-ethyl	0.20
5	5.00	乙酸(2,4,5-三氯苯氧基)-异辛酯	Acetic acid,(2,4,5-trichlorophenoxy)-,isooctyl ester	0.01
6	6.48	薄荷醇	Menthol	0.02
7	6.91	萘	Naphthalene	0.08
8	7.24	丙酸	Propanoic acid	0.09
9	8.18	四烷	Tetracosane	0.01
10	10.17	1-甲基萘,	-Naphthalene,1-methyl-	0.22
11	11.01	1,2,3,7,8-五氯二苯并呋喃	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran	0.26
12	14.45	1-(2,4,6-三甲苯)-乙酮	1-(2,4,6-trimethylphenyl) Ethanone	0.02
13	14.90	2,5-环己二烯-1,4-二酮	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione,	0.61
14	16.31	邻苯二甲酸二乙酯	Diethyl Phthalate	6.32
15	17.47	2,6-二甲基萘	Naphthalene,2,6-dimethyl-	0.04
16	17.77	2,7-二甲基萘	Naphthalene,2,7-dimethyl	0.04
17	18.45	2,6-双(1,1-二甲基)-环己二烯-1,4-二酮	Cyclohexadiene-1,4-dione,2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	0.18
18	19.87	四乙基锡烷	Stannane,tetraethyl-	0.06
19	22.70	硫氰酸甲酯	Thiocyanic acid,methyl ester	1.16
20	26.78	二十七烷	Heptacosane	7.32

由表1可看出,致香真菌香气成分中,烃类有8种,含量占总量的8.03%;酯类有5种,含量占总量的7.95%;酮类有3种,含量占总量的0.81%;醇类有2种,含量占总量的0.03%;酸类有2种,含量占总量的0.11%。

**2.2 有机溶剂萃取法**采用甲酸乙酯和乙醚作为有机溶剂萃取剂,甲酸乙酯作为萃取剂检出并鉴定出21种香气成分,乙醚作为萃取剂检出并鉴定出33种香气成分,故乙醚的萃取效果好。乙醚为萃取剂时,其分析结果如表2。

由表2可以看出,致香真菌香气成分中,烃类有20种,含量占总量的56.20%;酯类7种,含量占总量的21.27%;酸类3种,含量占总量的3.07%;醇类2种,含量占总量的1.62%;酮类有1种,含量占总量的0.51%。

## 3 讨论

该研究采用不同的萃取方法,香气成分分析的结果显示

其分析出的成分有烃类、酯类、酸类、醇类与酮类。在整个香气成分萃取过程中,运用了顶空液相萃取法和有机溶剂萃取法,但是经比较发现,二者的分析结果有差异,其共同成分很少。可能的原因是2种方法萃取的位置不同,顶空液相萃取是采用萃取剂对菌体产生的香气进行顶空萃取,而有机溶剂萃取是采用有机溶剂对菌体发酵液离心后萃取,由于香气物质挥发性的差异,导致2种方法萃取结果的差异。因此,对致香真菌香气成分分析时要结合2种方法进行综合分析。供试菌株发酵液果香味浓香,产酯种类较多,可尝试用作香精和香料的提取等应用。同时青海大学生态环境工程学院实验室从青海湖中和腐烂荸荠各分离出一株产凤梨味真菌,后经鉴定为同种(另文发表)。

表 2 有机溶剂萃取香气成分分析结果

序号	保留时间//min	化合物中文名称	化合物英文名称	相对含量//%
1	3.33	N,N-二甲基-甲酰胺	Formamide,N,N-dimethyl	1.20
2	4.96	N-棕榈酸	n-Hexadecanoic acid	2.75
3	5.00	[1,1'-2 环氧丙基]-2-辛酸,-2'-己基甲基酯	[1,1'-bicyclopropyl]-2-octanoic acid,2'-hexyl-methyl ester	1.07
4	5.75	辛酸甲酯	Octanoic acid,methyl ester	0.04
5	6.46	1-十四醇	1-Tetradecanol	1.01
6	7.01	丙酸	Propanoic acid	0.07
7	7.69	9-硬脂酸(z)-甲酯	9-Octadecenoic acid(Z)-,methyl ester	0.38
8	8.38	苯乙醇	Phenylethyl Alcohol	0.61
9	8.83	癸二酸甲酯	Decanoic acid,methyl ester	0.44
10	9.56	N-癸酸	n-Decanoic acid	0.15
11	10.50	十七烷	Heptadecane	0.19
12	11.09	1-甲基萘	Naphthalene,1-methyl	0.38
13	11.38	棕榈酸甲酯	Hexadecanoic acid,methyl ester	0.37
14	11.82	二十七烷	Heptacosane	0.46
15	12.66	2-十三烷酮	2-Tridecanone	0.51
16	13.86	十九烷	Nonadecane	0.68
17	14.55	十五烷	Pentadecane	1.03
18	14.80	2,4-二(1,1-二甲基)-苯酚	Phenol,2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	1.07
19	16.33	2,6,11-三甲基十二烷	dodecane2,6,11-trimethyl	2.08
20	16.35	十六烷	Hexadecane	2.09
21	18.42	2,6-2 异丙基萘	2,6-2 isopropyl naphthalene	4.57
22	17.79	2-(1-甲基)-萘	Naphthalene,2-(1-methylethyl)	4.77
23	18.47	2,3,6-三甲基-萘	Naphthalene,2,3,6-trimethyl-	5.64
24	18.89	二十烷	Eicosane	1.26
25	19.46	二十八烷	Octacosane	3.20
26	20.85	十八烷	Octadecane	3.22
27	21.71	邻苯二甲酸二丁酯	Dibutyl phthalate	4.72
28	22.60	二十五烷	Pentacosane	5.24
29	23.38	二十一烷	Heneicosane	5.64
30	24.53	十四烷	Tetradecane	4.45
31	25.85	酚-1,3-甲基-5-(1-甲基乙基)-氨基甲酸酯	Phenol,3-methyl-5-(1-methylethyl)-,methylcarbamate	14.25
32	26.67	二十六烷	Hexacosane	7.34
33	28.16	N,N-二乙基-1,4-苯二胺	1,4-Benzenediamine,N,N-diethyl-	3.18

## 参考文献

- [1] ANIL KUMAR P, SRINIVAS T N R, PRASAD A R, et al. Identification of fruity aroma-producing compounds from *Chryseobacterium* sp. isolated from the western ghats, India[J]. *Curr Microbiol*, 2011, 63:193-197.
- [2] 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):157-160.
- [3] 朱大恒, 韩锦峰, 周御风, 等. 利用产香微生物发酵生产烟用香料技术及其应用[J]. *烟草科技*, 1997(1):88-93.
- [4] WACHE Y. Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 89:405-416.
- [5] 藤卷正生, 服部达彦, 林和夫. 香料科学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2005:128-131.
- [6] 张世奇, 阙建全. 会东块菌香气成分的 GC-MS 分析[J]. *食品科学*, 2011(8):33-37.
- [7] 朱宇, 郑琳, 刘煜宇, 等. 西瓜内生菌的挥发性成分分析及其发酵香料在卷烟中的应用[J]. *光谱试验室*, 2011, 28(4):2093-2097.
- [8] 李峰, 明艳红, 李媛媛, 等. 产果香菌株的初步鉴定及香味成分分析[J]. *食品科学*, 2010, 9(14):89-94.
- [9] 高健, 徐爱清, 唐新科. 一株莴苣内生生产香酵母菌的分离、鉴定及挥发性香气成分分析[J]. *食品科学*, 2011, 2(23):162-166.
- [10] 王庆国. 两株产果香菌株的初步鉴定及香味成分分析[J]. *食品研究与开发*, 2007, 7(8):52-55.
- [11] 张占恩, 罗三珊. 顶空液相微萃取-GC/MS 法测定土壤中的苯系物[J]. *现代科学仪器*, 2010(3):64-67.