

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250108003

引用格式: 潘宇, 叶雨, 杨第芹, 等. 黄水中耐盐产酯化酶菌株的分离鉴定及代谢产物分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 237-247.

PAN Y, YE Y, YANG DQ, et al. Isolation, identification and metabolic product analysis of salt-tolerant esterase-producing strains from yellow water [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 237-247. (in Chinese with English abstract).

黄水中耐盐产酯化酶菌株的分离鉴定及 代谢产物分析

潘宇¹, 叶雨^{1,2}, 杨第芹¹, 龙艳丽², 罗云³, 冯国江⁴, 陆宽^{1,2}, 杨熟英^{1,2*}

(1. 贵州省生物技术研究开发基地有限公司, 贵阳 550014; 2. 贵州省科晖检验检测研究院有限公司, 贵阳 550014;
3. 贵州省开阳县市场监督管理局检测中心, 贵阳 550300; 4. 贵州奔福酒业集团有限公司, 仁怀 564500)

摘要: **目的** 筛选黄水中耐盐产酯化酶菌株, 分析其代谢产物。**方法** 从黄水中分离产酯化酶菌株, 采用形态学、生理生化及分子生物学对其进行鉴定。**结果** 从黄水中共筛选出9株产酯化酶菌株, 其中CZ-1、CZ-5和CZ-8为树状类芽孢杆菌(*Paenibacillus dendritiformis*), CZ-9为库氏类芽孢杆菌(*Paenibacillus cookii*), CZ-10、CZ-13和CZ-15为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), CZ-3为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), P5-5为满洲毕赤酵母(*Pichia manshurica*)。9株菌株均具有良好的耐盐碱性, 能在pH 2.0~11.0的条件下生长, 其中7株菌株盐耐受性高达120 g/L。实验表明, 以己酸为底物时, 菌株CZ-1、CZ-3、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-13、CZ-15和P5-5酯化酶活力分别为69.93、70.62、6.01、67.65、35.31、48.51、69.24和71.45 U/mL, 菌株CZ-10无酯化酶活力。气相色谱-质谱法分析表明, 发酵液中共检测出醇类挥发性成分12种, 醛类挥发性成分7种, 醚类挥发性成分1种, 胺类挥发性成分3种, 酮类挥发性成分11种, 酯类挥发性成分9种, 酸类挥发性成分3种和其他挥发性成分22种。**结论** 从黄水中筛选了9株产酯化酶菌株, 均具有良好的盐碱耐受性以及酯化酶活力, 以P5-5酯化酶活力最高, 挥发性成分种类最多, 这为后续黄水处理及应用提供理论依据。

关键词: 黄水; 酯化酶; 代谢产物; 树状类芽孢杆菌

Isolation, identification and metabolic product analysis of salt-tolerant esterase-producing strains from yellow water

PAN Yu¹, YE Yu^{1,2}, YANG Di-Qin¹, LONG Yan-Li², LUO Yun³,
FENG Guo-Jiang⁴, LU Kuan^{1,2}, YANG Shu-Ying^{1,2*}

(1. Guizhou Biotechnology Research and Development Base Co., Ltd., Guiyang 550014, China; 2. Guizhou Kehui Inspection and Testing Research Institute Co., Ltd., Guiyang 550014, China; 3. Testing Center of Kaiyang County Market Supervision Administration, Guiyang 550300, China; 4. Guizhou Benfu Liquor Group Co., Ltd., Renhuai 564500, China)

收稿日期: 2025-01-08

基金项目: 科研机构创新能力建设专项资金项目(黔科合服企[2023]012); 开发类科研院所技术开发研究专项资金项目(黔科合资[2024]001); 贵州省科技计划项目(黔科合成果[2022]重点 002号)

第一作者: 潘宇(1997—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为微生物技术和食品科学。E-mail: 2538989584@qq.com

*通信作者: 杨熟英(1988—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为药学及食品科学。E-mail: alei8879@163.com

ABSTRACT: Objective To screen salt-tolerant esterase-producing strains from yellow water and analyze their metabolic products. **Methods** Esterase-producing strains were isolated from yellow water and identified using morphological, physiological, biochemical and molecular biological methods. **Results** The 9 esterase-producing strains were screened from yellow water, among which CZ-1, CZ-5 and CZ-8 were *Paenibacillus dendritiformis*, CZ-9 was *Paenibacillus cookii*, CZ-10, CZ-13 and CZ-15 were *Bacillus velezensis*, and CZ-3 was *Saccharomyces cerevisiae*, P5-5 was *Pichia manshurica*. All 9 strains had good salt tolerance and could grow at pH 2.0–11.0, and 7 strains had salt tolerance up to 120 g/L. Experiments showed that when using caproic acid as the substrate, the esterifying enzyme activities of strains CZ-1, CZ-3, CZ-5, CZ-8, CZ-9, CZ-13, CZ-15 and P5-5 were 69.93, 70.62, 6.01, 67.65, 35.31, 48.51, 69.24 and 71.45 U/mL respectively, and strain CZ-10 had no esterifying enzyme activity. Gas chromatography-mass spectrometer analysis showed that 12 kinds of volatile components of alcohols, 7 kinds of volatile components of aldehydes, 1 kind of volatile component of ethers, 3 kinds of volatile components of amines, 11 kinds of volatile components of ketones, 9 kinds of volatile components of esters, 3 kinds of volatile components of acids and 22 kinds of other volatile components were detected in the fermentation broth. **Conclusion** The 9 esterifying enzyme-producing strains are screened from yellow water, all of which have good salt and alkali tolerance and esterifying enzyme activity. P5-5 has the highest esterifying enzyme activity and the most types of volatile components, which provides a theoretical basis for the subsequent treatment and application of yellow water.

KEY WORDS: yellow water; esterase; metabolic products; *Paenibacillus dendritiformis*

0 引言

酿酒黄水是酿造过程中产生的一种副产物,其高浓度化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)和有害成分使其成为一种难以处理的废水。黄水中含有大量的有机酸、淀粉和还原性糖等,还有醇、醛、酯等挥发性物质及乳酸菌、酵母菌和芽孢杆菌等益生菌群在白酒发酵过程中有重要作用^[1]。目前,针对于黄水的研究主要集中于微生物资源筛选^[2]、成分分析及再利用方面如进行白酒勾兑、二次酿造和提取活性多糖^[3-4]等。而对于黄水中产酯化酶菌株的分离及代谢产物特征研究较少。酯化酶^[5]是一类能够催化酯化反应的生物催化剂,具有广泛的应用潜力,特别是在食品、化妆品和制药等领域^[6-7]。

黄水中主要的酯类物质通过化学反应和微生物发酵两种途径产生,其中微生物发酵是主要的产酯途径。近年来,研究者从黄水中分离出多种具有产酯化酶能力的微生物,如酵母菌和芽孢杆菌,并对其产酯能力进行了初步研究。例如,酵母菌具有较强的产酯化酶能力,能够将醛、酮等有机物质转化为酯类物质^[8-9],研究者从黄水中分离出新的酵母菌株少孢哈萨克斯坦酵母(*Kazachstaniaaexigua*)、矮小假丝酵母(*Candida humilis*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),优化条件下乙酸乙酯、乙酸异戊酯和 2-苯基乙醇等香气化合物有所增加^[10];还有研究者从白酒粗发酵剂大曲中分离出一种能够产生大量己酸乙酯的酵母 YX3307,能够改善白酒的风味及品质^[11]。同时,芽孢杆菌属在黄水形成中也起着关键作用,能够产生酯类、酸类、酮类和醛类等风味成分^[12-13]。已有

研究在黄水中微生物资源的筛选和利用方面取得了一定进展,但仍存在一些不足之处。现有研究多集中于单一菌株的产酯能力,缺乏对多种菌株的系统比较和代谢产物的全面分析。其次,关于菌株在极端环境(如高盐、高 pH)下的适应性和应用潜力的研究较少,限制了其在工业化生产中的应用。此外,黄水中微生物的多样性及其代谢特性仍需进一步探索。

本研究从白酒黄水样品中分离出具有高效产酯化酶的菌株,并对其耐盐碱性、酯化酶活力及代谢产物进行研究。通过筛选和鉴定产酯化酶菌株,分析其代谢产物的多样性,不仅为提升白酒等发酵产品的香气质量提供了理论依据,还为黄水的资源化利用和微生物资源的开发提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 黄水采样

黄水,取自贵州省仁怀市某酒厂。

1.1.2 实验设备

RTS-1C 全自动微生物生长曲线分析仪(北京立信宏达科技有限责任公司); TU-1810PC 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); 8890-7000E 安捷伦气相色谱三重四极杆气相色谱质谱联用仪、DB-WAX 122-7032 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)(美国安捷伦科技有限公司)。

1.1.3 实验试剂

细菌基因 DNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公

司); 酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(yeast extract peptone dextrose agar medium, YPD)培养基(广东环凯微生物科技有限公司); 平板计数琼脂培养基(plate count agar medium, PCA)、氯化钠(分析纯)、胰蛋白胨、蛋白胨、琼脂、酵母提取物(上海博威生物科技有限公司); 三丁酸甘油酯(上海麦克林生化科技股份有限公司); 无水乙醇、己酸[重庆川东化工(集团)有限公司]; 酚酞(天津奥普升化工有限公司); 氢氧化钠[天津大茂化学试剂合伙企业(有限合伙)]。

1.1.4 培养基

筛选培养基: 牛肉膏 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 氯化钠 5.0 g/L, 加入三丁酸甘油酯 10.0 g/L, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min; 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L; PCA 培养基: 胰蛋白胨 5.0 g/L, 酵母浸粉 2.5 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L; YPD 培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 酵母浸粉 5.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L; 糖类发酵基础培养基或同化碳源基础培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 碳源 20.0 g/L, pH 自然; 同化氮源基础培养基: 葡萄糖 20.0 g/L, 氮源 20.0 g/L, pH 自然。在以上液体培养基添加 2% 琼脂即为对应固体培养基。

1.2 实验方法

1.2.1 产酯化酶菌株的筛选

取 5 mL 黄水加入至装有 45 mL 无菌水的锥形瓶中, 于 30 °C、160 r/min 恒温摇床富集 30 min, 稀释涂布于固体筛选培养平板, 置于 30 °C 恒温培养箱培养 5 d, 挑取具有透明圈的单菌落进行划线, 直至得到纯种平板。将初筛出的优良菌株接种于含有三丁酸甘油酯的牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 每隔 1 d 观察 1 次。若培养基上出现透明水解圈, 则表明该菌株能产酯化酶^[14]。

1.2.2 菌种鉴定

(1) 形态学鉴定分析

接种环灼烧灭菌冷却后挑取待观察菌单菌落划线接种至 YPD 或牛肉膏蛋白胨固体培养平板上活化, 放置 30 °C 或 37 °C 培养箱静置培养 2 d, 观察菌落形态并记录; 再将活化好的细菌平板挑取单菌落进行革兰氏染色后在显微镜上观察并记录。糖发酵、碳源同化和氮源同化实验等参照《酵母菌的特征与鉴定手册》^[15], 用于检验酵母对各种糖碳源及氮源的利用情况; 参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[16]对细菌进行生理生化鉴定, 并记录结果。

(2) 分子生物学鉴定

采用 DNA 提取试剂盒对酵母 DNA 进行提取。以基因引物对 NL1/NL4 (26S rRNA 基因序列扩增引物: 正向 NL-1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAAAAG-3' 和反向引物 NL-4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' 进行纯化扩增; 利用细菌 DNA 提取试剂盒提取待测菌 DNA, 通过上游引物(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和下游引物(1492R): 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' 对目标细

菌 DNA 进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增。将 PCR 产物进行电泳分离, 将获得清晰条带的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行一代测序, 将下机的基因序列在 Gen Bank 数据库中用 BLAST 对比分析, 最终选取同源性更高的序列用邻近法在 MEGA 11.0 构建进化树。

1.2.3 菌株生长特性研究

将待测菌株活化后按 1% 接种比例接种于牛肉膏蛋白胨或 YPD 液体培养基中, 采用全自动微生物生长曲线分析仪测定其生长曲线和生长速率。参数: 温度 30 °C(酵母菌)或 37 °C(细菌), 转速 160 r/min, 测量频率: 30 min 或 60 min, 体积 30 mL, 波长 850 nm。

1.2.4 耐酸碱、耐盐性能测定

(1) 耐酸碱实验

将菌株活化并制备菌悬液培养 24 h, 将菌悬液分别以 1% 接种量接种在 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的牛肉膏蛋白胨和 YPD 液体培养基中, 每组设置 3 个平行且设置空白对照, 细菌在 37 °C、160 r/min 摇床培养 24 h, 酵母菌在 30 °C、160 r/min 摇床培养 24 h, 测定 OD₆₀₀。

(2) 耐盐性实验

将菌株活化并制备菌悬液培养 24 h, 将菌株菌悬液分别以 1% 接种量接种含 2%、4%、6%、8%、10% 和 12% 氯化钠的牛肉膏蛋白胨和 YPD 液体培养基中, 每组设置 3 个平行且设置空白对照, 细菌在 37 °C、160 r/min 摇床培养 24 h, 酵母菌在 30 °C、160 r/min 摇床培养 24 h, 测定 OD₆₀₀。

1.2.5 酯化酶活力的测定

取 10.0 mL 环己烷, 3.65 mL 乙醇, 6.25 mL 己酸, 再加入 200 μL 酶液, 酯化反应在密闭的 50 mL 离心管中进行, 反应温度为 36 °C, 144 h 后, 取上清液 0.5 mL 于 50 mL 锥形瓶中, 加入 5 mL 水, 2 滴酚酞, 用 0.10 mol/L 氢氧化钠滴定至终点, 测定己酸的消耗量^[17]。

1.2.6 挥发性物质的测定

将菌株活化后接种于液体发酵培养基中 160 r/min 恒温振荡培养 24 h 后待测。使用 8890-7000E 安捷伦气相色谱三重四极杆气相色谱质谱联用仪进行测定^[18]。色谱柱: DB-WAX 122-7032 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm) 色谱条件: 40 °C 保持 2 min, 以 4 °C/min 上升到 100 °C, 以 5 °C/min 升至 120 °C、保持 5 min, 然后以 5 °C/min, 达到 230 °C, 并在此温度下保持 5 min; 载气为氦气, 流量为 0.8 mL/min, 进样口温度为 250 °C, 分流比: 20:1; 质谱条件: 电子冲击(electron impact ionization, EI)能量为 70 eV, 离子源温度 230 °C, 四极杆温度为 150 °C, 在 45~500 AMU 范围内记录 EI 质谱。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次, 结果以平均值±标准偏差表示。采用 Origin 2018 绘图软件绘图。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定结果

2.1.1 产酯菌株的分离与纯化

从筛选培养基中分离纯化出 9 株产酯化酶菌株，分别命名为 CZ-1、CZ-3、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-10、CZ-13、CZ-15 和 P5-5，其细胞形态和菌落形态如图 1 所示。CZ-1、CZ-5 和 CZ-8 菌落呈褐色，不湿润，微凸起，不透明，革兰氏阳性，细胞呈短杆状；CZ-9 菌落呈灰白色，不透明，革兰氏阳性，呈杆状；CZ-10、CZ-13 和 CZ-15 菌落呈乳白色，圆形，质地不黏稠，革兰氏阳性，细胞呈杆状；CZ-3 和 P5-5 菌落呈乳白色，圆形，凸起，细胞形态分别为圆形和椭圆形。

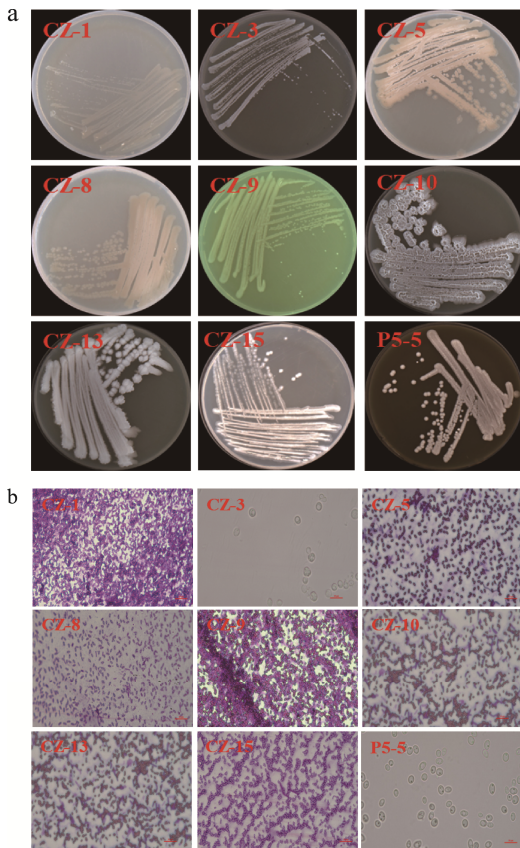


图1 菌落形态(a)和细胞形态(b, 40×)
Fig.1 Colony morphology (a) and cell morphology (b, 40×)

2.1.2 菌株生理生化

(1) 酵母菌生理生化

菌株 P5-5 和 CZ-3 的生理生化实验结果如表 1 和图 2。由表 1 可知，菌株 P5-5 利用果糖发酵时，能够产气，利用麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘露醇及乳糖作为碳源时，均不产气；菌株 CZ-3 以葡萄糖、果糖和蔗糖作为碳源时，能够产气，而以麦芽糖、可溶性淀粉、甘露醇和

乳糖作为碳源时，均不产气。由图 2 可知，菌株 P5-5 和菌株 CZ-3 能利用麦芽糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、甘露醇及乳糖作为碳源生长；同时也均能利用蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、尿素、氯化铵、硫酸铵、磷酸二氢铵和柠檬酸二铵作为氮源生长。

表 1 糖发酵实验
Table 1 Sugar fermentation experiment

碳源	P5-5	CZ-3
芽糖	-	-
葡萄糖	-	+
果糖	+	+
蔗糖	-	+
可溶性淀粉	-	-
甘露醇	-	-
乳糖	-	-

注：+表示阳性反应；-表示阴性反应，表 2 同。

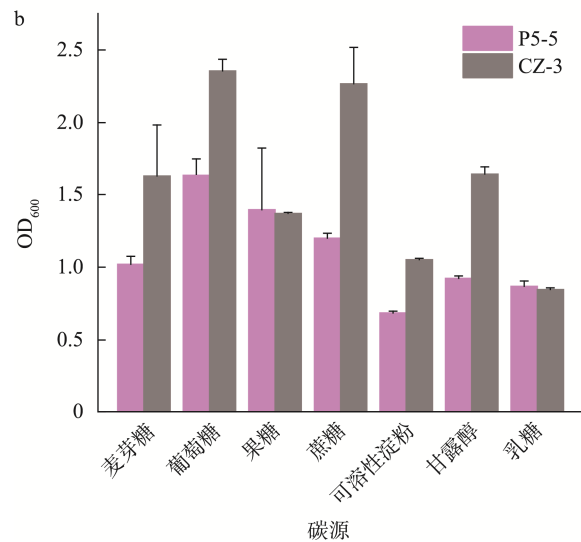
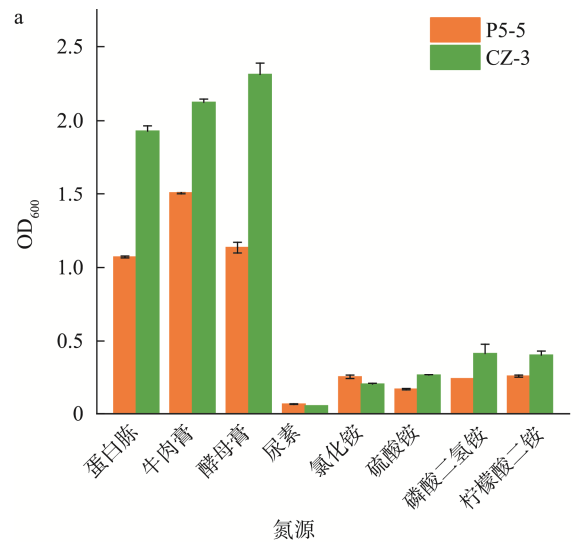


图2 氮源同化(a)和碳源同化(b)
Fig.2 Nitrogen source assimilation (a) and carbon source assimilation (b)

(2)细菌生理生化

由表 2 可知, 菌株 CZ-1、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-10、CZ-13、CZ-15 均能利用葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖作为碳源生长, 不产气; 同时菌株 CZ-9、CZ-13、CZ-15 还能利用甘露醇和乳糖作为碳源生长, 但菌株 CZ-1、CZ-5、CZ-8、CZ-10 不能利用甘露醇和乳糖作为碳源生长, 不产气; 各菌株均能产氧化酶, 还原硝酸盐, 无 H₂S 产生; 菌株 CZ-10、CZ-13、CZ-15 还能够产生淀粉酶水解淀粉, 利用柠檬酸盐; 菌株 CZ-9、CZ-13、CZ-15 吡啉实验呈阴性反应, 其余菌株呈阳性反应; 此外, 菌株 CZ-5、CZ-8、CZ-9 的 M.R.实验呈阳性反应、V-P 实验呈阴性反应, CZ-1、CZ-10、CZ-13、CZ-15 的 M.R.实验呈阴性反应、V-P 实验呈阳性反应。

表 2 细菌生理生化结果
Table 2 Results of bacterial physiology and biochemistry

实验项目	菌株编号						
	CZ-1	CZ-5	CZ-8	CZ-9	CZ-10	CZ-13	CZ-15
H ₂ O ₂ 酶实验	-	-	-	+	-	+	+
氧化酶实验	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐	-	-	-	-	+	+	+
M.R.实验	-	+	+	+	-	-	-
V-P 实验	+	-	-	-	+	+	+
吡啉实验	+	+	+	-	+	-	-
H ₂ S 产生	-	-	-	-	-	-	-
淀粉水解	-	-	-	-	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇	-	-	-	+	-	+	+
乳糖	-	-	-	+	-	+	+

2.1.3 分子生物学鉴定结果

将 CZ-1、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-10、CZ-13 和 CZ-15 菌株测序所得 16S rRNA 序列和 CZ-3、P5-5 菌株测序所得 26S rRNA 提交 Gen Bank 数据库采用 BLAST 进行序列对比分析, 由图 3 可知, CZ-1、CZ-5 和 CZ-8 分别与树状类芽孢杆菌(*Paenibacillus dendritiformis*)的同源性达 99%, CZ-9 与库氏类芽孢杆菌(*Paenibacillus cookii*)的同源性达 99%, CZ-10、CZ-13 和 CZ-15 菌株分别与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的同源性达 99%, CZ-3 与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的同源性达 99%, P5-5 与满洲毕赤酵母(*Pichia manshurica*)的同源性达 99%, 结合生理生化特征, CZ-1、CZ-5 和 CZ-8 为树状类芽孢杆菌, CZ-9 为库氏类芽孢杆菌, CZ-10、CZ-13 和 CZ-15 为贝莱斯芽孢杆菌, CZ-3 为酿酒酵母, P5-5 为满洲毕赤酵母。

2.2 菌株生长特性研究结果

通过菌株生长曲线可以得到微生物的生长周期、生长速率及代谢特性等关键信息^[19]。将菌落接入牛肉膏蛋白胨培养基中, 每隔 0.5 h 或 1.0 h 测量其吸光值, 由图 4 可知, 9 株菌株生长符合“S”型曲线特征, 存在生长延缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期。P5-5 在 14 h 时开始快速增长, 且 22 h 时生长速率最高, 生长速率达到最大值 0.11 h⁻¹, 一直处于生长状态, 但速率略有降低; CZ-1 出现较长的生长延缓期, 8 h 后进入对数生长期, 菌体快速繁殖, 13 h 后, 菌株生长平缓; CZ-3 的生长延缓期很短, 0.5 h 后进入快速生长期, 在 1 h 时开始快速增长, 8 h 到达峰值, 之后略有降低, 最终趋于平稳, 7 h 时生长速率达到最大值 0.40 h⁻¹; CZ-5 一直处于生长状态, 速率时快时慢; CZ-8 在 5 h 后开始快速生长, 10 h 后生长缓慢, 后趋于平缓; CZ-9 和 CZ-10 在 1 h 后进入生长快速期, 分别在 10 h、20 h 时达到生长峰值, 后 CZ-9 菌体开始衰亡, 而 CZ-10 生长稳定一段时间后开始衰亡, 这可能与代谢产物变化有关; CZ-13 和 CZ-15 的生长呈“S”型特征, 生长速率分别在 4.0 h、3.5 h 达到峰值, 为 0.03 h⁻¹、0.05 h⁻¹, 而分别在 20 h、17 h 后达到生长峰值。

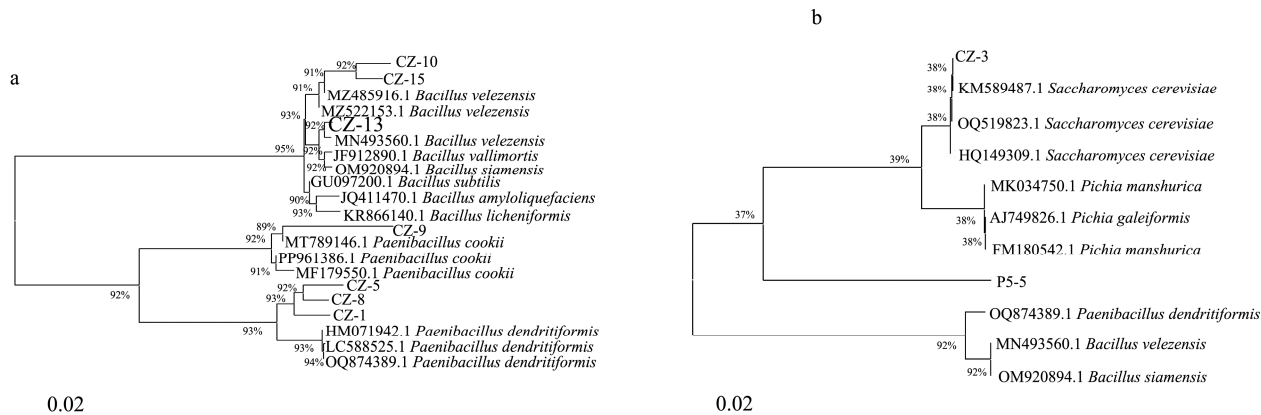
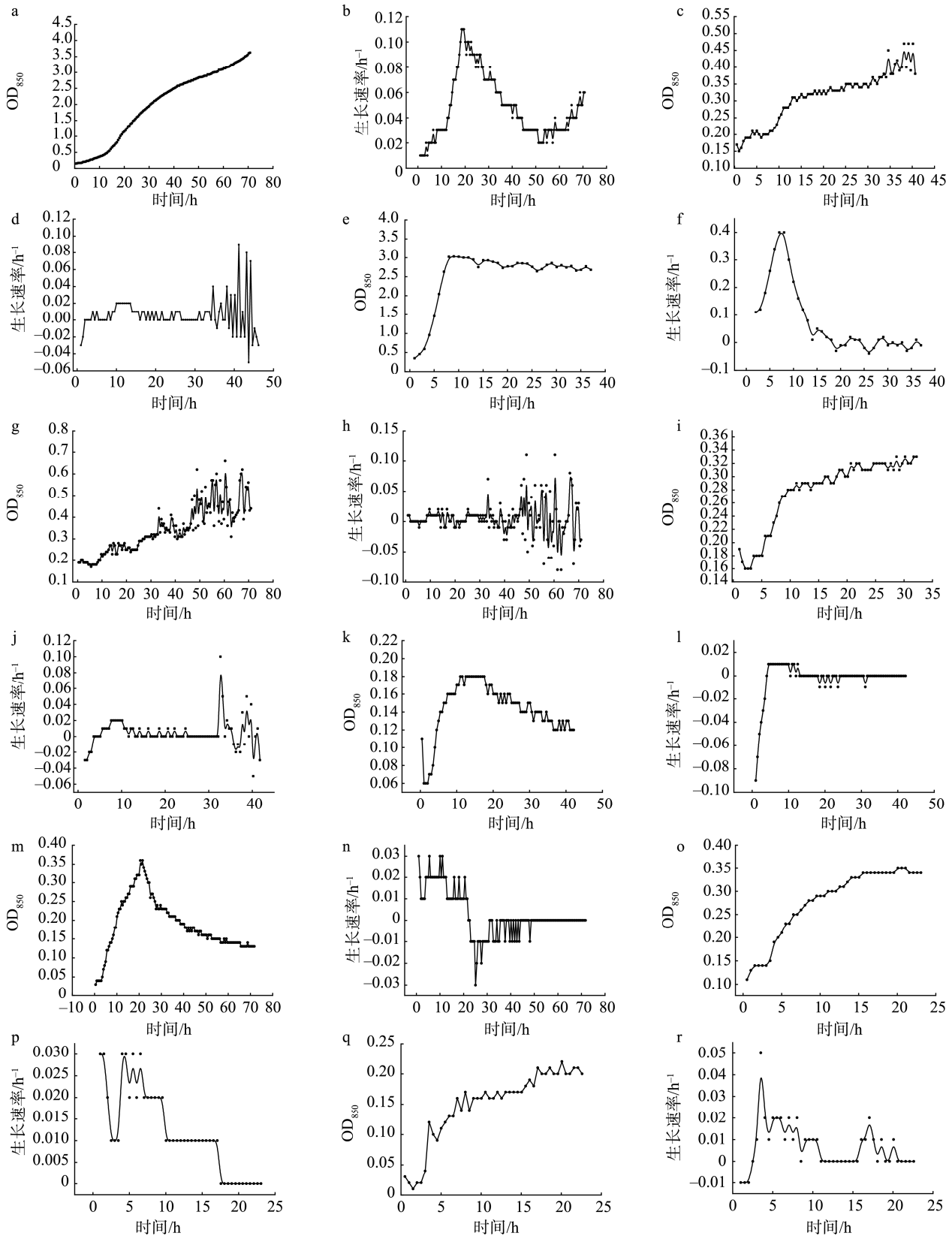


图 3 细菌(a)和酵母菌(b)系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of bacteria (a) and yeast (b)



注: a、c、e、g、i、k、m、o、q依次为P5-5、CZ-1、CZ-3、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-10、CZ-13和CZ-15的生长曲线; b、d、f、h、j、l、n、p、r依次为P5-5、CZ-1、CZ-3、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-10、CZ-13和CZ-15的生长速率。

图4 菌株生长曲线和生长速率

Fig.4 Growth curves and growth rates of strains

2.3 菌株耐酸碱、耐盐性分析

从图 5a 看出, 菌株 CZ-1、CZ-3、CZ-9、CZ-10、CZ-13、CZ-15 和 P5-5 在氯化钠质量浓度为 120 g/L 时仍可生长, 菌株 CZ-5、CZ-8 分别能在氯化钠质量浓度为 80 g/L、40 g/L 的条件下生长; 由图 5b 看出, 菌株 CZ-1、CZ-3、CZ-5、CZ-9、CZ-10、CZ-13、CZ-15 和 P5-5 在 pH 2.0~11.0 条件下仍可生长, 当 pH 大于 9.0 时, 菌株 CZ-8 不能够继续生长, 表明 9 株产酯化酶菌株均有良好的耐盐碱性性能。因此, 对其进行下一步实验。

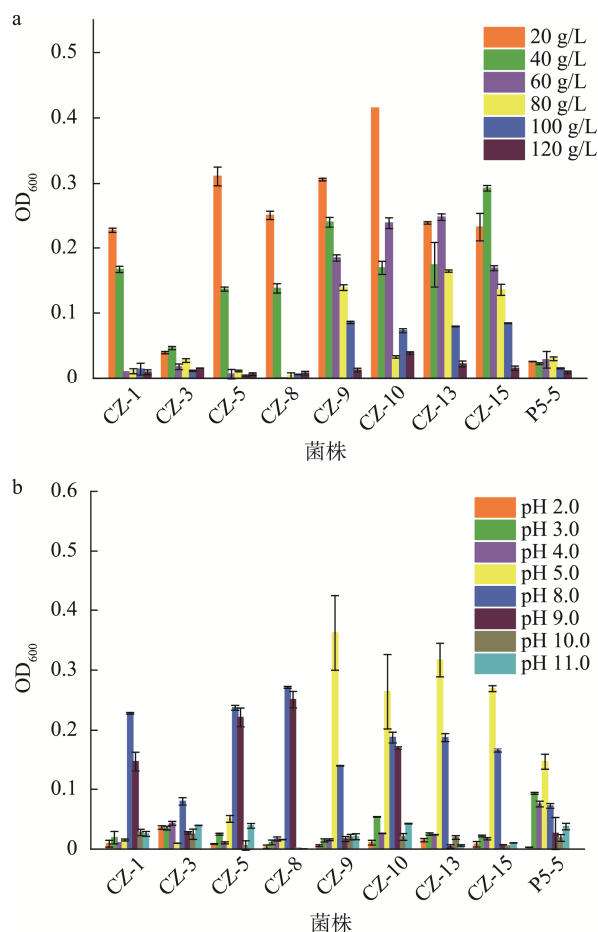


图5 菌株耐盐性(a)和耐酸碱性(b)
Fig.5 Salt tolerance (a) and acid and alkali resistance (b) of strains

2.4 菌株酯化力分析

酯化酶能够催化己酸、乙酸、丁酸和乳酸等小分子酸与乙醇反应, 生成己酸乙酯、乙酸乙酯、丁酸乙酯和乳酸乙酯等酯化物质。由图 6 可知, 以己酸为底物, 不加酶液为对照时, 菌株 CZ-1、CZ-3、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-13、CZ-15 和 P5-5 能够产生酯化酶, 以己酸为底物时, 酶活力

分别为 69.93、70.62、6.01、67.65、35.31、48.51、69.24 和 71.45 U/mL, 其中菌株 P5-5 酯化酶活力最高; 菌株 CZ-3、CZ-1、CZ-15、CZ-8 次之, 菌株 CZ-5 最低, 酯化酶活力为 6.01 U/mL, 菌株 CZ-10 无酯化酶活力。

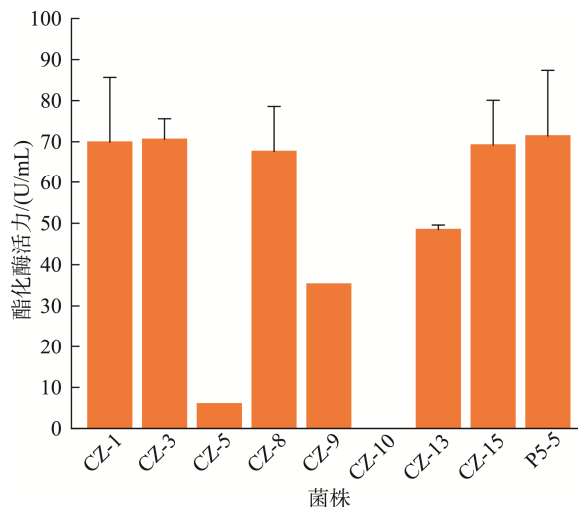


图6 酯化酶活力
Fig.6 Esterifying enzyme activity

2.5 菌株发酵液挥发性成分分析

本研究对菌株 CZ-1、CZ-3、CZ-5、CZ-8、CZ-9、CZ-10、CZ-13、CZ-15 和 P5-5 发酵液进行了挥发性成分鉴定, 利用气相色谱-质谱峰面积归一化法测定了各化学成分的相对质量分数, 经鉴定共得到 68 种挥发性有机物(表 3)。由表 3 可知, 根据官能团的不同, 可将挥发性有机物分为醇、醛、醚、胺、酮、酯、酸和其他 8 个大类, 其中其他类包含烷烃、烯烃和炔烃等。醇类挥发性成分 12 种, 醛类挥发性成分 7 种, 醚类挥发性成分 1 种, 胺类挥发性成分 3 种, 酮类挥发性成分 11 种, 酯类挥发性成分 9 种, 酸类挥发性成分 3 种和其他类挥发性成分 22 种。就确认的挥发性化学成分, CZ-1 发酵液中鉴定出挥发性成分有 13 种, 吡啶含量最高, 相对含量为 66.33%, 其次依次为苯甲醛、二甲醚、苯乙酸乙酯和苯并噻唑, 相对含量分别为 7.13%、5.11%、1.30%、0.87%, 其余化合物包括叔丁醇、2-甲基丁醇和 2-丁醇等; CZ-3 发酵液中鉴定出挥发性成分有 12 种, 正戊醇含量最高, 相对含量为 31.82%, 其次依次为 2-乙氧基乙腈和氮杂环丁烷, 相对含量分别为 14.48%、3.42%, 其余化合物还包括 2-乙基己醇、苯甲醛和苯乙醛等; CZ-5 发酵液中鉴定出挥发性成分有 12 种, 吡啶含量最高, 相对含量为 54.17%, 其次依次为苯甲醛、二甲醚和苯乙酸乙酯, 相对含量分别为 5.28%、5.14%和 0.95%, 其余化合物还包括 2-甲基丁醇、苏合香醇、三甲氧基酯和邻苯二甲酸二甲酯等; CZ-8 发酵液中鉴定出挥

表 3(续)

分类	序号	保留时间	中文名称	分子式	相对含量/%								
					CZ-1	CZ-3	CZ-5	CZ-8	CZ-9	CZ-10	CZ-13	CZ-15	P5-5
酮类	24	21.349	苯乙酮	C ₈ H ₈ O	0.13	0.05	0.12	0.11	0.19	-	-	-	-
	25	2.838	丙酮	C ₃ H ₆ O	0.18	0.15	-	-	0.29	0.42	0.14	-	0.39
	26	6.187	3-甲基-2-丁酮	C ₅ H ₁₀ O	-	-	-	-	-	-	1.02	0.14	-
	27	6.207	3-羟基-2-丁酮	C ₄ H ₈ O ₂	-	-	-	-	-	-	17.64	18.98	-
	28	15.826	2-庚酮	C ₇ H ₁₄ O	-	-	-	-	-	-	1.15	2.58	-
	29	26.450	甲基壬基甲酮	C ₁₁ H ₂₂ O	-	-	-	-	-	-	0.35	-	-
	30	3.581	2,3-丁二酮	C ₄ H ₆ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	1.24	-
	31	18.130	6-甲基-2-庚酮	C ₈ H ₁₆ O	-	-	-	-	-	-	-	0.95	-
	32	18.434	5-甲基-2-庚酮	C ₈ H ₁₆ O	-	-	-	-	-	-	-	1.95	-
	33	19.113	二氢-2-甲基-3(2H)- 噻吩酮	C ₅ H ₈ OS	-	-	-	-	-	-	-	-	0.61
34	7.571	环丁酮	C ₄ H ₆ O	-	-	-	-	-	-	-	-	2.88	
酯类	35	25.494	苯乙酸乙酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1.30	0.15	0.95	0.99	0.08	-	-	-	-
	36	29.633	邻苯二甲酸二甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0.16	0.16	0.14	0.17	0.33	0.25	0.18	0.18	0.08
	37	4.713	三甲氧基酯	C ₃ H ₆ O	-	-	0.07	-	-	-	-	-	-
	38	4.709	烯丙基正丙酯	C ₆ H ₁₂ O	-	-	-	0.10	-	-	-	0.19	-
	39	7.578	乙基硫代磷酸甲酯-2-二甲氨基乙酯	C ₇ H ₁₈ NO ₂ PS	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-
	40	3.572	乙酸乙烯酯	C ₄ H ₆ O ₂	-	-	-	-	-	-	0.93	-	-
	41	21.351	1,3-苯二酚单苯甲酸酯	C ₁₃ H ₁₀ O ₃	-	-	-	-	-	-	0.16	-	-
	42	21.349	4-(苯甲酰氧基)-2-苯甲酸氯苯酯	C ₂₀ H ₁₃ ClO ₄	-	-	-	-	-	-	-	0.17	-
	43	14.979	甲酸甲酯	C ₂ H ₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	0.95
	44	16.160	2-甲基丁酸	C ₅ H ₁₀ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	10.73
酸类	45	15.640	异戊酸	C ₅ H ₁₀ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	9.30
	46	3.574	D/L-亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08
	47	25.161	苯并噻唑	C ₇ H ₅ NS	0.87	0.74	0.68	1.01	1.88	1.41	1.38	1.78	0.10
其他类	48	26.574	吡啶	C ₅ H ₇ N	66.33	-	54.17	61.76	-	0.16	-	-	-
	49	7.433	2-乙氧基乙腈	C ₄ H ₇ NO	-	14.48	-	-	-	-	-	-	-
	50	7.569	氮杂环丁烷	C ₃ H ₇ N	-	3.42	-	-	1.16	-	-	-	6.66
	51	2.826	偶氮甲烷	C ₂ H ₆ N ₂	-	-	0.17	-	-	-	0.34	-	-
	52	16.554	2,5-二甲基嘧啶	C ₆ H ₈ N ₂	-	-	0.04	-	0.29	-	-	-	-
	53	3.009	胍	CH ₅ N ₃	-	-	-	-	0.38	-	0.51	-	-
	54	7.584	甲环丁烷	C ₅ H ₁₀	-	-	-	-	0.61	-	-	-	-
	55	18.820	4-氰基吡啶	C ₄ H ₃ N ₃	-	-	-	-	0.17	-	-	0.16	-
	56	21.667	2,6-二乙基吡嗪	C ₈ H ₁₂ N ₂	-	-	-	-	-	0.04	-	-	-
	57	21.936	愈创木酚	C ₇ H ₈ O ₂	-	-	-	-	-	2.34	-	-	-
	58	3.680	2-甲氧基丙烯	C ₄ H ₈ O	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-
	59	10.199	1,2-二甲基环氧乙烷	C ₄ H ₈ O	-	-	-	-	-	-	0.76	-	-
	60	19.528	2,3,5-三甲基吡嗪	C ₇ H ₁₀ N ₂	-	-	-	-	-	-	1.43	1.62	-
	61	20.457	氯化安息香	C ₁₄ H ₁₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	0.35	-	-
	62	26.557	间氨基苯乙炔	C ₈ H ₇ N	-	-	-	-	-	-	0.28	-	-
	63	14.364	氨基胍媒染剂	CH ₆ N ₄	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-
	64	21.845	川芎嗪	C ₈ H ₁₂ N ₂	-	-	-	-	-	-	-	0.31	-
	65	7.421	丁酸酐	C ₈ H ₁₄ O ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
66	10.417	1,3-二氧戊环	C ₃ H ₆ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	
67	15.329	2,5-二氢呋喃	C ₄ H ₆ O	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	
68	15.493	乙醛肟	C ₂ H ₅ NO	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	

注: -表示该物质未检测到。

3 讨论

本研究中筛选出的 9 株菌株均表现出良好的耐酸碱性,能够在 pH 2.0~11.0 的范围内生长,且部分菌株耐受性高达 120 g/L,这一特性使其在白酒酿造过程中具有重要的应用价值,杨第芹^[20]研究发现异常威克汉姆酵母 P2 菌株耐盐能力为 7.0%,发酵毕赤酵母 W8 耐盐能力为 11.0%,在白酒酿造过程中,接种菌剂实验组含有的酯类、酮类和醇类均比对照组丰富。黄水作为白酒酿造的副产物,通常含有高浓度的有机酸和盐分,直接排放会对环境造成污染^[21]。利用这些耐盐碱的产酯化酶菌株,可以将黄水中的有机酸和乙醇转化为酯类物质,不仅减少了环境污染,还提升了黄水的经济价值^[22],筛选出的菌株在耐盐碱性方面表现较好,尤其是菌株 P5-5 和 CZ-3,能够在极端 pH (2.0~11.0)和高盐条件下(氯化钠浓度 120 g/L)生长,这为黄水的高值化利用提供了新的思路。

酯化酶是一类能够催化酯化反应的生物催化剂,其活力直接影响酯类化合物的生成^[23-26]。该研究发现,菌株 P5-5 的酯化酶活力最高,达到 71.45 U/mL,与已有研究相比,菌株 P5-5 的酯化酶活力高于其他菌株,表明其在酯类化合物生成方面具有显著优势。发酵液中检测到多种挥发性成分,尤其是酯类化合物如乙酸乙酯、己酸乙酯等,这些物质是白酒香气的重要组成部分^[27-32],徐威^[33]利用复合菌株在米酒发酵中的相互作用,对米酒增香工艺进行了探索,提升了酒体中的乙酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯和 β -苯乙醇 4 种香型物质的含量,得到一种香味突出的实验室半成品米酒。因此,菌株 P5-5 在白酒酿造中的应用潜力较大,气相色谱-质谱法分析表明,本研究共检测到 68 种挥发性成分,涵盖了醇类、醛类、醚类、胺类、酮类、酯类、酸类和其他类化合物。其中,酯类化合物是主要的代谢产物,具有丰富的香气特征,这些酯类化合物的生成能够显著提升白酒的香气质量。此外,醇类和醛类化合物也对白酒的风味有重要贡献,如苯乙醇具有玫瑰香气,苯甲醛具有杏仁香气,其存在进一步丰富了白酒的香气层次。菌株 P5-5 发酵液中检测到的 29 种挥发性成分,为白酒风味的提升提供了新的可能性。通过酯化酶的催化作用,可以将黄水中的有机酸和乙醇转化为酯类化合物,从而提高白酒的香气和风味。此外,酯化酶还可以用于丢糟发酵和白酒勾兑过程中,进一步提升基酒的品质,如 Novozym435 是一种商业化的固定化南极假丝酵母脂肪酶 B,具有较高的催化合成乙酸乙酯、乳酸乙酯和丁酸乙酯的活性^[34-35]。

4 结论

本研究从黄水中成功分离并鉴定了 9 株具有酯化酶活性的菌株,分别为树状类芽孢杆菌、库氏类芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、酿酒酵母和满洲毕赤酵母。这些菌株表现出良

好的耐盐碱性能。酯化酶活力测定表明,菌株 P5-5 的酶活性最高(71.45 U/mL)。通过气相色谱-质谱法分析,其发酵液中鉴定出 68 种挥发性成分,包括醇类、醛类、醚类、胺类、酮类、酯类、酸类及杂环化合物,其中酯类化合物贡献了主要风味特征。这为黄水的高值化利用提供了理论依据。未来可以进一步探索不同环境条件下黄水中微生物的多样性及其代谢特性,为工业生产提供更为高效的生物催化剂。

参考文献

- [1] KANG J, SUN Y, HUANG X, *et al.* Unraveling the microbial compositions, metabolic functions, and antibacterial properties of Huangshui, a byproduct of Baijiu fermentation [J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111320.
- [2] XIE J, CHENG K, ZHAO D, *et al.* *Bacillus aquiflavi* sp. nov., isolated from yellow water of strongly flavored Chinese Baijiu [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(5): 3406-3412.
- [3] HUO J, WU J, SUN B, *et al.* Isolation, purification, structure characterization of a novel glucan from Huangshui, a byproduct of Chinese Baijiu, and its immunomodulatory activity in LPS-stimulated THP-1 cells [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161: 406-416.
- [4] HUO J, LIAO Q, WU J, *et al.* Structure elucidation and intestinal barrier protection of an alpha-D-glucan in Huangshui [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 223(Pt A): 595-605.
- [5] 白茹. 白酒酿造用真菌酯化酶的挖掘、表达及催化性质研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
BAI R. Mining, expression and catalytic properties of fungal esterase for liquor brewing [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.
- [6] 汤秀娟, 吴成泽, 陈聪, 等. 高产酯酶细菌的筛选、鉴定及复合诱变选育[J]. *中国酿造*, 2023, 42(12): 87-92.
TANG XJ, WU CZ, CHEN C, *et al.* Screening, identification and composite mutagenesis breeding of high-yield esterase bacteria [J]. *China Brewing*, 2023, 42(12): 87-92.
- [7] 邱俊杰. 窖泥产酯酶梭菌分离鉴定及其酯酶异源表达、性质与应用研究[D]. 成都: 四川轻化工大学, 2022.
QIU JJ. Isolation and identification of esterase-producing *Clostridium* from pit mud and research on heterologous expression, properties and application of its esterase [D]. Chengdu: Sichuan University of Science & Engineering, 2022.
- [8] LONG J, CAI J, GAO X, *et al.* Investigation on screening, identification, and fermentation characteristics of Yunnan olive in the fermented liquid utilizing five strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Archives of Microbiology*, 2024, 206(4): 164.
- [9] ZHAO H, DU B, ZHAO P, *et al.* Analysis of ester-producing performance in high-yield ethyl hexanoate yeast and the effect on metabolites in bio-enhanced Daqu, the starter for Baijiu and other traditional fermented foods [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2024, 135(4): 1xae081.
- [10] LAI Y, CHENG K, LAI C, *et al.* Isolation and identification of aroma producing strain with esterification capacity from yellow water [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211356.
- [11] FAN G, LIU P, CHANG X, *et al.* Isolation and identification of a high-yield ethyl caproate-producing yeast from Daqu and optimization of its fermentation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 663744.

- [12] HU D, JU X, LI L, *et al.* Improved in situ saccharification of cellulose pretreated by dimethyl sulfoxide/ionic liquid using cellulase from a newly isolated *Paenibacillus* sp. LLZ1 [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 201: 8–14.
- [13] TONG W, HE P, YANG Y, *et al.* Occurrence, diversity, and character of *Bacillaceae* in the solid fermentation process of strong aromatic liquors [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 811788.
- [14] 龚虎程, 王宇, 罗静, 等. 窖泥中酯化菌的筛选鉴定及协同发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2023, 42(12): 81–86.
- GONG HC, WANG Y, LUO J, *et al.* Screening and identification of esterifying bacteria in pit mud and optimization of synergistic fermentation conditions [J]. *China Brewing*, 2023, 42(12): 81–86.
- [15] BARNETT JA, PAYNE RW, YARROW D, *et al.* *Yeasts: Characteristics and identification* [Z]. 1983.
- [16] BOONE D, CASTENHOLZ R, GARRITY G. *Bergey's manual® of systematic bacteriology* [Z]. 2001.
- [17] YADAV B, ROOPESH MS. In-package atmospheric cold plasma treatment and storage effects on membrane integrity, oxidative stress, and esterase activity of *Listeria monocytogenes* [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(3): 682.
- [18] 王桃红, 张少博, 张会敏, 等. 荞麦蜜中挥发性成分测定及其与成熟度的相关性分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 222–230.
- WANG TH, ZHANG SB, ZHANG HM, *et al.* Determination of volatile components in buckwheat honey and analysis of their correlation with maturity [J]. *Food Science*, 2020, 41(22): 222–230.
- [19] 朱霞, 杨第芹, 潘宇, 等. 酸汤中高产酸细菌的分离筛选及其特性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(18): 271–280.
- ZHU X, YANG DQ, PAN Y, *et al.* Isolation, screening and characterization of high acid-producing bacteria in sour soup [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(18): 271–280.
- [20] 杨第芹. 酱香酒酯和大曲中耐高温产酯酵母的筛选及其生产丢糟酒的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- YANG DQ. Screening of high-temperature-resistant ester-producing yeasts from fermented grains of jiang-flavor liquor and Daqu and study on the production of discarded grains liquor [D]. Guiyang: Guizhou University, 2022.
- [21] 刘延波, 唐艳彦, 赵志军, 等. 张弓老酒大曲中高产酯化酶细菌的分离筛选及产酶条件优化[J]. *甘肃农业大学学报*, 2021, 56(2): 150–159.
- LIU YB, TANG YY, ZHAO ZJ, *et al.* Isolation and screening of bacteria with high esterase-producing ability from Daqu of Zhanggong Laojiu liquor and optimization of enzyme-producing conditions [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2021, 56(2): 150–159.
- [22] 江晓钦, 唐羽翼, 张立, 等. 酯化酶用于酒厂黄水酸性成分再利用的研究进展[J]. *生物化工*, 2022, 8(4): 169–172.
- JIANG XQ, TANG YY, ZHANG L, *et al.* Research progress on the reutilization of acidic components in Huangshui from liquor factories by esterifying enzyme [J]. *Biochemical Engineering*, 2022, 8(4): 169–172.
- [23] 曹新志, 钟利明, 谢进, 等. 大曲中产酯化酶霉菌的分离筛选及发酵条件优化[J]. *中国酿造*, 2024, 43(4): 129–134.
- CAO XZ, ZHONG LM, XIE J, *et al.* Isolation and screening of esterase-producing molds in Daqu and optimization of fermentation conditions [J]. *China Brewing*, 2024, 43(4): 129–134.
- [24] 刘小敏. 高乳酸乙酯酯化酶活力菌种的筛选及在老白干三茬酒中的应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2022.
- LIU XM. Screening of strains with high esterification enzyme activity for ethyl lactate and their application in the third-fermented liquor of Laobaigan [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2022.
- [25] 宋川, 刘双平, 敖宗华, 等. 白酒酿造微生物酯化酶的研究进展[J]. *酿酒*, 2024, 51(2): 34–40.
- SONG C, LIU SP, AO ZH, *et al.* Research progress of esterifying enzymes from microorganisms in Baijiu (Chinese liquor) brewing [J]. *Liquor Making*, 2024, 51(2): 34–40.
- [26] 刘小改, 马美荣, 李洪媛, 等. 清香型白酒大曲中产酯化酶微生物分离筛选及鉴定[J]. *酿酒科技*, 2024(3): 53–58.
- LIU XG, MA MR, LI HY, *et al.* Isolation, screening and identification of esterase-producing microorganisms in Daqu for fen-flavor Baijiu (Chinese liquor) [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2024(3): 53–58.
- [27] 吉彩婷. 不同香型白酒香气组分对比研究[J]. *化工设计通讯*, 2018, 44(10): 128–129.
- JI CT. Comparative study on aroma components of different flavor types of Baijiu (Chinese liquor) [J]. *Chemical Engineering Design Communications*, 2018, 44(10): 128–129.
- [28] 崔新莹, 吕志远, 张梦梦, 等. 基于主成分分析法构建浓香型白酒香气分类模型[J]. *酿酒科技*, 2024(2): 17–24.
- CUI XY, LV ZY, ZHANG MM, *et al.* Construction of an aroma classification model for strong-flavor Baijiu based on principal component analysis [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2024(2): 17–24.
- [29] 蔡炳彪, 张凤梅, 牛云蔚. 利用二维气相色谱质谱鉴定清香型白酒香气成分[J]. *食品工业*, 2020, 41(2): 300–304.
- CAI BB, ZHANG FM, NIU YW. Identification of aroma components in Fen-flavor Baijiu by two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry [J]. *The Food Industry*, 2020, 41(2): 300–304.
- [30] 刘丽丽, 杨辉, 荆雄, 等. 基于 GC-IMS 和电子鼻技术分析贮存容器对凤香型白酒香气成分的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(4): 257–263.
- LIU LL, YANG H, JING X, *et al.* Analysis of the influence of liquor storage containers on the aroma components of Feng-flavor Baijiu based on GC-IMS and electronic nose technologies [J]. *Food Science*, 2022, 43(4): 257–263.
- [31] 胡晓龙, 田瑞杰, 樊建辉, 等. 浓香型白酒挥发性化合物香气贡献及其地域特征研究进展[J]. *轻工学报*, 2022, 37(2): 1–14.
- HU XL, TIAN RJ, FAN JH, *et al.* Research progress on the aroma contribution of volatile compounds in strong-flavor Baijiu and its regional characteristics [J]. *Journal of Light Industry*, 2022, 37(2): 1–14.
- [32] 陈晓梅. 三种不同年份茅台酒香气成分研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2017.
- CHEN XM. Study on the aroma components of Moutai liquor in three different years [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2017.
- [33] 徐威. 产酯化酶菌株的筛选鉴定及在小曲米酒增香中的应用[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- XU W. Screening and identification of esterase-producing strains and their application in enhancing the aroma of Xiaoqu rice wine [D]. Nanning: Guangxi University, 2020.
- [34] ZHENG J, LIANG Y, LI J, *et al.* Enzymatic preparation of mono- and diacylglycerols: A review [J]. *Grain & Oil Science and Technology*, 2023, 6(4): 185–205.
- [35] 陈轩宇, 程飞扬, 陈晓军, 等. 鱼油乙酯和甘油的脂肪酶转酯催化制备富含 n-3 脂肪酸的单酰甘油酯[J]. *福建轻纺*, 2025(1): 22–28.
- CHEN XY, CHENG FY, CHEN XJ, *et al.* Preparation of monoglycerides rich in n-3 fatty acids by lipase-catalyzed transesterification of fish oil ethyl esters and glycerol [J]. *Fujian Textile and Light Industry*, 2025(1): 22–28.

(责任编辑: 安香玉 韩晓红)