

# 产酯酶和酯类化合物的粟酒裂殖酵母 筛选及应用

罗浩<sup>1</sup>, 但俊林<sup>1</sup>, 蔡岭舛<sup>1</sup>, 刘杰<sup>2</sup>, 邹伟<sup>1,3,4\*</sup>

(1. 四川轻化工大学 生物工程学院, 四川 宜宾 644005; 2. 安徽临水酒业有限公司, 安徽 六安 237471;  
3. 四川轻化工大学 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644005; 4. 四川轻化工大学  
中国轻工业酿酒生物技术及智能制造重点实验室, 四川 宜宾 644005)

**摘要:** 酯化液在改善和提升食品口感和风味方面拥有较大的市场发展潜力, 并受到社会的普遍关注。该文从浓香型白酒大曲中进行产酯酵母菌的筛选研究, 得到一株产酯酶活力为(15.52±0.03) U/mL的菌株JM2-5。该菌株的透明圈直径与菌落直径比值为2.57±0.03, 经分子生物学鉴定为粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。对其形态、生理耐受性及发酵性能进行研究, 结果发现在不添加乙醇的情况下, 该菌在30℃厌氧发酵9d能够自身合成乙酸乙酯631.000 mg/L、乳酸乙酯86.000 mg/L、己酸乙酯25.000 mg/L。此外, *S. pombe* JM2-5菌株产生的酯酶具有体外催化产生高含量酯类物质的能力。综上, *S. pombe* JM2-5菌株可应用于白酒, 以促进生产过程中的酯化反应; 或者作为催化剂, 通过催化酯化反应产物的产生, 应用于调味料酒的生产。

**关键词:** 粟酒裂殖酵母; 酯酶; 乙酸乙酯; 白酒; 调味液

## Screening and Application of *Schizosaccharomyces pombe* with Production Esterases and Ester Compounds

LUO Hao<sup>1</sup>, DAN Junlin<sup>1</sup>, CAI Lingxi<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>2</sup>, ZOU Wei<sup>1,3,4\*</sup>

(1. School of Biological Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644005, Sichuan, China; 2. Anhui Linshui Liquor Co., Ltd., Lu'an 237471, Anhui, China; 3. Liquor Making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644005, Sichuan, China; 4. Liquor Brewing Biotechnology and Intelligent Manufacturing Key Laboratory of China Light Industry, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644005, Sichuan, China)

**Abstract:** Esterification liquids have great market development potential in improving the taste and flavor of food, and have caught widespread attention from society. This paper conducted a study on screening ester-producing yeasts from strong-flavor Baijiu Daqu and obtained a strain JM2-5 with the esterase enzyme activity of (15.52±0.03) U/mL. The ratio of the transparent ring diameter to the colony diameter of this strain was 2.57±0.03, and it was identified as *Schizosaccharomyces pombe* by molecular biological techniques. Meanwhile, the morphology, physiological tolerance, and fermentation performance of JM2-5 were studied. The results showed that without the addition of ethanol, the strain was able to synthesize 631.000 mg/L of ethyl acetate, 86.000 mg/L of ethyl lactate, and 25.000 mg/L of ethyl hexanoate during anaerobic fermentation at 30 °C for nine days. Additionally, the esterase produced by the *S. pombe* JM2-5 strain could catalyze the production of high-content esters *in vitro*. In summary, the *S. pombe* JM2-5 strain can be employed in Baijiu production to promote the esterification reaction during production or can be adopted as a catalyst to catalyze the esterification reaction product to produce flavoring liquor.

**Key words:** *Schizosaccharomyces pombe*; esterase; ethyl hexanoate; Baijiu; flavoring liquid

基金项目: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2023-07); 中国轻工业酿酒生物技术及智能制造重点实验室项目(2023-05); 四川轻化工大学校级大学生创新创业训练计划项目(CX2023133)

作者简介: 罗浩(1999—), 女(汉), 硕士, 研究方向: 发酵工程。

\*通信作者: 邹伟(1985—), 男(汉), 副教授, 研究方向: 系统生物学与发酵工程。

引文格式:

罗浩,但俊林,蔡岭舛,等.产酯酶和酯类化合物的粟酒裂殖酵母筛选及应用[J].食品研究与开发,2025,46(6):152-160.

LUO Hao, DAN Junlin, CAI Lingxi, et al. Screening and Application of *Schizosaccharomyces pombe* with Production Esterases and Ester Compounds[J]. Food Research and Development, 2025, 46(6): 152-160.

酯酶(羧基酯酶)是一种能够催化合成和水解羧酯键及低级脂肪酸酯的酶类<sup>[1]</sup>,在白酒行业中,酯酶也称为酯化酶和酯分解酶,主要参与短碳链酯类的合成过程。酯酶在改善白酒香味方面发挥重要作用,可以有效解决品质缺陷问题<sup>[2]</sup>。此外,酯酶还被广泛应用于白酒生产中的养窖、护窖过程<sup>[3]</sup>,以及食品工业、化妆品、制药和造纸等领域<sup>[4-5]</sup>,它还应用于生物聚合物和生物柴油的酶法合成<sup>[6]</sup>。由于其低能耗、低成本、高效和无污染等诸多优势<sup>[6-8]</sup>,酯酶在白酒生产工业和调味液生物技术领域得到广泛应用。

在白酒酿造过程中,酵母是至关重要的微生物,发挥着核心功能<sup>[9]</sup>。作为主要的乙醇生产菌株,酵母参与多种风味物质的合成,在酯类物质生产中也起着重要作用。具体而言,酯类物质的生成主要是依赖于酵母所生成的酯酶催化乙醇和酸类物质合成酯<sup>[10]</sup>。目前,生产上已经将产酯化酶的菌株用来提高白酒副产物中的酯含量,并制成含量丰富的调味液<sup>[11]</sup>,同时,产酯化酶菌株还有助于保健醋和料酒的开发<sup>[12]</sup>。其中,“酿造料酒”以其独特的酿造工艺主要用于生产高端酒品<sup>[13]</sup>,其灵活性在于可以根据市场需求添加各类香料物质,以增加其多样性和独特性<sup>[14]</sup>。因此,研究和筛选产酯酶酵母菌对于促进高含量酯类物质的形成具有重要意义。

本文从浓香型白酒大曲中筛选产酯酵母,并对其产酯能力和生理性能进行研究,以期产酯酵母酯化液的生产及与其他菌株混合培养产酯化液的开发应用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

成品大曲:安徽某浓香型酒厂;三丁酸甘油酯、聚乙烯醇、制霉菌素(均为分析纯):上海麦克林生化科技股份有限公司;牛肉膏、蛋白胨:北京奥博星生物技术有限责任公司;琼脂粉、葡萄糖、氯化钠、磷酸氢二钾(均为分析纯):成都市科隆化学品有限公司;D2300真菌DNA快速提取试剂盒:北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

XY-85-158L型超低温冰箱:上海欣谕仪器有限公司;V-1000型可见光分光光度计:翱艺仪器(上海)有限公司;Y400型光学显微镜:北京中科科仪股份有限

公司;VEGA3 SBU型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM):日本尼康公司;HZ150L型恒温培养摇床:武汉瑞华仪器设备有限公司;MJ-250型恒温培养箱:四川蜀科仪器有限公司;JE2002型电子天平:北京欧普特科技有限公司;LS-50HJ型立式压力蒸汽灭菌锅:江阴滨江医疗设备有限公司;SW-CJ2D型超净工作台:上海苏净实业有限公司;FD-1A-50型真空冷冻干燥机:博医康(北京)仪器有限公司;0.22 μm有机相滤膜:尤尼柯(上海)仪器有限公司。

### 1.3 培养基的配制

筛选培养基1:葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母膏 10 g/L、链霉素 50 μg/mL、琼脂粉 2%<sup>[15]</sup>。

筛选培养基2:去皮马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、50 μg/mL青霉素、琼脂粉 2%、pH自然。

筛选培养基3:麦芽汁培养基基础上加 50 μg/mL 氨苄青霉素、琼脂粉 2%<sup>[16]</sup>。

筛选培养基4:豆芽 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂粉 2%。

筛选培养基5:葡萄糖 30 g/L、酵母膏 5 g/L、蛋白胨 5 g/L、硫酸铵 5 g/L、磷酸二氢钾 1.5 g/L、硫酸镁 0.65 g/L、氯化钙 2.8 g/L、茶啉酮酸 50 μg/mL、琼脂粉 2%。

复筛培养基1:酵母膏 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、葡萄糖 20 g/L、乳化液 20%、琼脂粉 2%、pH自然。其中,乳化液为 3% 聚乙烯醇和三丁酸甘油酯按体积比 9:1 制成<sup>[17]</sup>。

复筛培养基2:下层培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)、琼脂粉 2%,上层培养基为 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 0.5 g/L、葡萄糖 0.5 g/L、琼脂粉 2%<sup>[18]</sup>。

种子液培养基:葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母膏 10 g/L。固体培养基在此基础上加 2% 琼脂粉。

发酵培养基:葡萄糖 2%、氯化钠 0.5%、酵母膏 1%。

产酯酶培养基:葡萄糖 30 g/L、氯化铵 20 g/L、氯化钠 0.9 g/L、磷酸氢二钾 0.7 g/L、磷酸二氢钾 0.7 g/L、pH5.0。发酵固体培养基在产酯酶培养基基础上加 2% 琼脂粉。

产酯培养基:葡萄糖 2%、氯化钠 0.5%、磷酸氢二钾 1 g/L、酵母膏 0.5%、氯化铵 2%、牛肉膏 1%、L-半胱

氨酸盐酸盐 0.05%、乙酸钠 0.3%、可溶性淀粉 0.1%、1% 生物素 2%。

#### 1.4 方法

##### 1.4.1 产酯酶酵母菌的筛选

###### 1.4.1.1 富集液的制备

将成品大曲混匀并研磨成细粉,称取 5 g 样品于 45 mL 无菌水中,振荡 6 h,静置 30 min。

###### 1.4.1.2 酵母菌的一级筛选

从富集液中吸取 1 mL 样品并稀释为  $10\sim 10^7$  倍的菌悬液,分别吸取不同稀释倍数的菌悬液 100  $\mu\text{L}$ ,并均匀涂布到不同类型的筛选培养基平板上,每个稀释梯度的菌悬液进行 3 次平行涂布培养,再将培养皿放入 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 48 h,待单菌落形成后进行挑取。

将纯化处理 3 次后的单菌株挑取到含有乳化液的复筛培养基 1 中进一步筛选,具有产酯化酶能力的菌株能够分解培养基中的三丁酸甘油酯并在培养基平板上形成透明圈。透明圈的大小与酯化能力成正比,透明圈越大说明酯化力越强<sup>[19]</sup>。因此,在培养 3 d 后,记录菌株的透明圈直径( $D$ )与菌落直径( $d$ )的比值( $D/d$ ),选择比值较大的菌株进行二级筛选。

###### 1.4.1.3 酵母菌的二级筛选

在非活细胞状态下,TTC 是一种无色物质。然而,在活细胞内,经由呼吸链脱氢酶的作用,无色的氧化态 TTC 会被还原成红色的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTF)<sup>[20]</sup>。因此 TTC 染色法也被应用于高产乙醇酵母的筛选<sup>[18]</sup>。通过颜色深浅观察酵母菌呼吸酶活力大小,可以判断其产酒精能力的强弱。在一级筛选的单菌落平板上覆盖一层复筛培养基 2——TTC 显色培养基,然后避光培养 60 min 观察菌落颜色变化。若菌落呈现深红色说明该酵母菌株产酒精能力强;呈粉红色则表示产酒精能力较弱;没有产酒精能力的菌株几乎不显色<sup>[18]</sup>。挑选呈深红色的菌株进行三级筛选。

###### 1.4.1.4 酵母菌的三级筛选

酵母菌产酯能力与其酯化酶活力的高低密切相关。具有较高酯化酶活力的菌株表现出更强的酯合成能力,而酵母的酯化作用主要由胞内酯化酶发挥作用,胞外酯化酶起辅助作用<sup>[21]</sup>。在二级筛选中,选择呈深红色的菌株将其置于含有 20 mL 种子液培养基的 100 mL 锥形瓶中活化培养,活化 2 次。随后,以 5% 接种量将活化好的种子液接种到产酯酶培养基中,在 180 r/min、30  $^{\circ}\text{C}$  下培养 24 h。按照陈聪等<sup>[17]</sup>方法测定酶活力。在滴定过程中,溶液会吸收空气中的  $\text{CO}_2$  使粉红色褪色,一般认为当滴定到粉红色并保持 30 s 不退即表示到达终点。然后从中筛选出酶活性最高的菌株进行下一步试验。

酶活力定义:以每分钟分解底物(三丁酸甘油酯乳化液)所需酶量定义为 1 个酶活力单位,单位以 U/mL 表示<sup>[17]</sup>。

##### 1.4.2 菌株形态学观察

将菌株接种到种子液培养基中进行活化,并在固体培养基进行多次纯化。然后,将菌株置于 30  $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱中培养 2 d。在此过程中,观察菌落的大小、表面形态、颜色、边缘形状等特征,并详细记录观察结果。最后,使用光学显微镜和扫描电子显微镜对菌株的形态进行观察。

扫描电子显微镜观察样品处理步骤:取培养至对数期的种子液于 5 000 r/min 条件下离心 5 min,收集足量菌体。以 40 倍体积加入 2.5% 戊二醛溶液在 4  $^{\circ}\text{C}$  下固定 8 h<sup>[22]</sup>;再次同条件离心,用提前 4  $^{\circ}\text{C}$  保藏的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液混匀静置 5 min 后,5 000 r/min 离心 5 min,清洗 2 次<sup>[23]</sup>。上清液用 30%~100% 的乙醇溶液逐级脱水,每次混匀后静置 15 min,5 000 r/min 离心 5 min;用体积比为 1:1 的乙醇-叔丁醇置换 2 次,每次混匀后反应 20 min,再 5 000 r/min 离心 5 min,最后加入等体积的叔丁醇混匀,放入 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻过夜。为避免污染菌体,以上溶液均经 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤。第 2 天将冷冻过夜后的菌体放入真空冷冻干燥机中干燥 9 h 以上直至呈粉末状,然后取少量粉末喷金,进行 SEM 观察。

##### 1.4.3 酵母菌的分子生物学鉴定

对目标菌株进行分子生物学鉴定,将目标菌株在发酵固体培养基上划线至培养出单菌落,培养 2 d 后,利用 D2300 真菌 DNA 快速提取试剂盒提取目标菌株的基因组 DNA,以提取的 DNA 作为模板,采用酵母菌通用引物 26sF、26sR 对目标菌株的 26S rDNA 基因序列进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction; PCR)扩增。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s,72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 7 min,循环数 35。取菌株纯化后的 PCR 产物进行 DNA 测序,使用 Blast 程序将拼接后的序列文件与 NCBI 的核酸数据库(GenBank)中的数据进行同源性比对,选择与待测物种 26S rDNA 序列相似性最高的序列进一步分析。使用 MEGA 11.0 软件,采用邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树,得出鉴定结果<sup>[24]</sup>。

##### 1.4.4 菌株生长特性测定

将鉴定后的菌株进行活化,30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 恒温振荡 48 h,共活化两次,每隔 2 h 测一次  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ,利用 Origin 软件绘制生长曲线,根据 Logistic 方程拟合菌株的生长曲线得到比生长速率曲线。

##### 1.4.5 生理耐受性测定

###### 1.4.5.1 温度耐受性

将菌株的种子液以 5% 接种量接种至发酵培养基



上,分别在 20、25、30、35、40、45、50 °C 条件下,于 180 r/min 培养 24 h,分别测定 OD<sub>600 nm</sub>,探究菌株的温度耐受性。

#### 1.4.5.2 pH 值耐受性

将菌株的种子液以 5% 接种量接种至发酵培养基中,调整 pH 值至 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10,在 180 r/min、30 °C 恒温培养摇床下培养 24 h,分别测定 OD<sub>600 nm</sub>,探究菌株的 pH 值耐受性。

#### 1.4.5.3 葡萄糖耐受性

将菌株的种子液以 5% 接种量分别接种至葡萄糖浓度为 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10% 的发酵培养基(除葡萄糖外,其余原料的浓度不变)中,在 180 r/min、30 °C 下培养 24 h,分别测定 OD<sub>600 nm</sub>,探究菌株的葡萄糖耐受性。

#### 1.4.5.4 乙醇耐受性

将菌株的种子液以 5% 接种量接种至发酵培养基上,以发酵培养基质量(100%)计,向发酵培养基中分别加入乙醇,使乙醇浓度分别为 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%,乙醇使用前过 0.22 μm 有机相滤膜除菌,每组 3 个平行。在 180 r/min、30 °C 下培养 24 h,分别测定 OD<sub>600 nm</sub> 值,探究菌株的乙醇耐受性。

#### 1.4.6 菌株发酵性能的测定

在 180 r/min、30 °C 条件下将菌株制备成种子液,并以 5% 接种量接种在产酯培养基中,并在没有加入乙醇的条件下,30 °C 厌氧发酵 9 d,发酵结束后,将发酵液 8 000 r/min 离心 15 min。取 1 mL 经 0.22 μm 有机相滤膜过滤的滤液于进样瓶中,加入 10 μL 乙酸戊酯混匀,备用。采用气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry,GC-MS)技术结合内标法进行定性定量分析。为确保结果准确性,同时进行 3 组平行试验。

为验证菌株的酶活力,将菌株种子液以 5% 接种量接种至产酯培养基中,在 30 °C 条件下厌氧培养 2 d。培养后将发酵液通过 5 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤,然后分别依次加入 3 g/L 的乙酸、乳酸、丁酸、己酸进行混合培养,在 180 r/min、30 °C 条件下培养 2 d。2 d 后,取发酵液进行 8 000 r/min 离心 15 min,取 1 mL 经 0.22 μm 有机相滤膜过滤的滤液于进样瓶中,加入 10 μL 乙酸戊酯混匀;采用 GC-MS 结合内标法进行定性定量分析。为确保结果准确性,同时进行 3 组平行试验。

气相色谱条件:DB-WAX UI 谱柱(30 mm×0.25 mm, 0.25 μm),程序升温:40 °C 保持 1 min,以 20 °C/min 升高至 85 °C,再以 12 °C/min 升高至 200 °C 保持 15 min。分流比 30:1,以氦气(He)为载气,流速设定为 1 mL/min,以氢气(H<sub>2</sub>)和氧气(O<sub>2</sub>)为辅助气体,流速分别设定为 40、300 mL/min,检测器为火焰离子检测器。

质谱条件:电子电离源,传输线温度 250 °C,电子能量 70 eV,光电倍增管电压 350 V,质量扫描范围 m/z 30~350。

#### 1.5 数据分析

柱状图及折线图使用 Origin 进行绘制,图片的整合利用 AI(Adobe Illustrator)软件,GC-MS 原始谱图采用 Thermo Scientific Xcalibur 进行峰提取和匹配。

### 2 结果与分析

#### 2.1 酵母菌的分离

##### 2.1.1 酵母菌的筛选

##### 2.1.1.1 一级筛选

酵母菌的一级筛选结果见图 1。

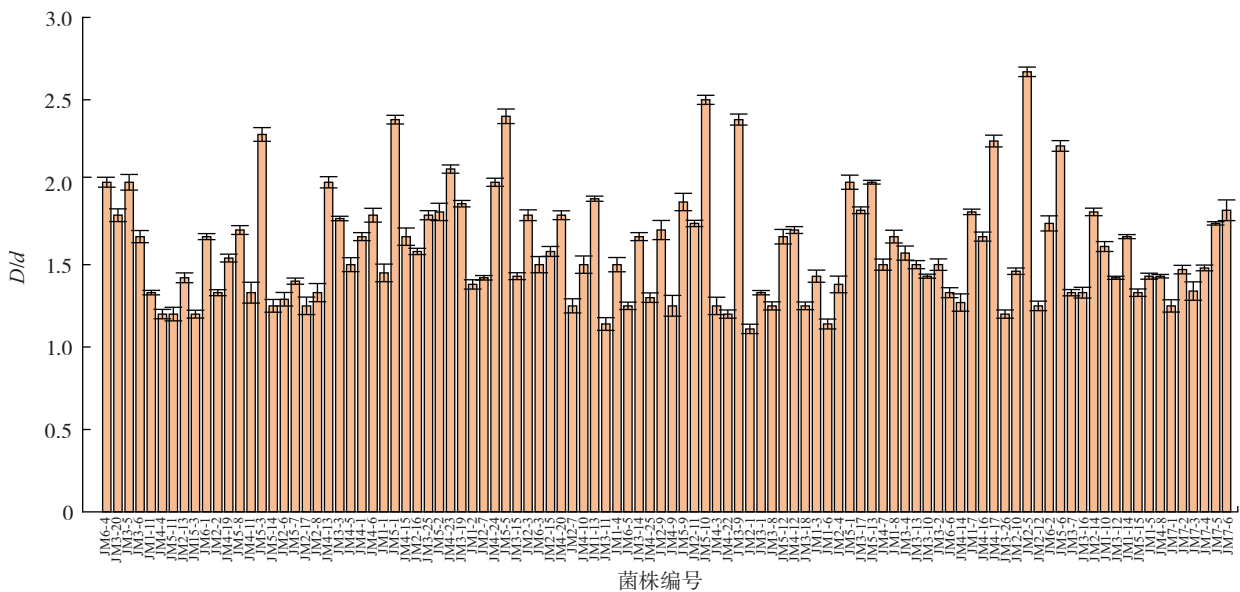


图 1 酵母菌的一级筛选

Fig.1 Primary screening of yeasts

从筛选培养基 1、筛选培养基 2、筛选培养基 3、筛选培养基 4、筛选培养基 5 中筛选出 147 株浓香型大曲中的酵母菌株,然后将这 147 株菌株接种到复筛培养基 1 上进行筛选,这些菌株在经过复筛培养基 1 生长后,会产生透明圈,由图 1 可知,*Dld* 在 1.0 以上的有 102 株。

### 2.1.1.2 二级筛选

将一级筛选中 *Dld* 在 1.5 以上的 56 株单菌株接入 TTC 培养基中观察,结果见图 2。

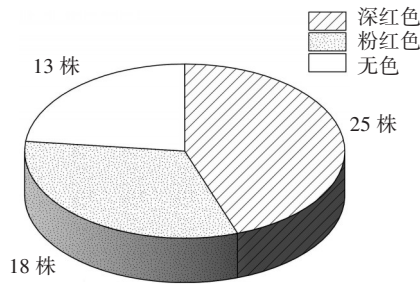


图 2 酵母菌的二级筛选

Fig.2 Secondary screening of yeasts

由图 2 可知,有 25 株菌株呈现深红色、18 株菌株呈现粉红色、13 株菌株无色。通过二级筛选可知,呈现深红色的 25 株菌株产酒精能力较强。后续将这 25 株菌株进行产酯化酶能力的三级筛选。

### 2.1.1.3 三级筛选

将在 TTC 培养基平板上呈现深红色的 25 株菌株在产酯酶培养基中培养 24 h 后进行酯酶活力的测定,测定结果如图 3 所示。

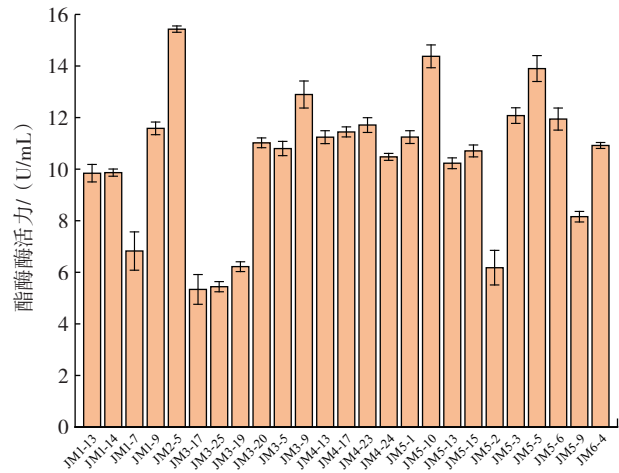


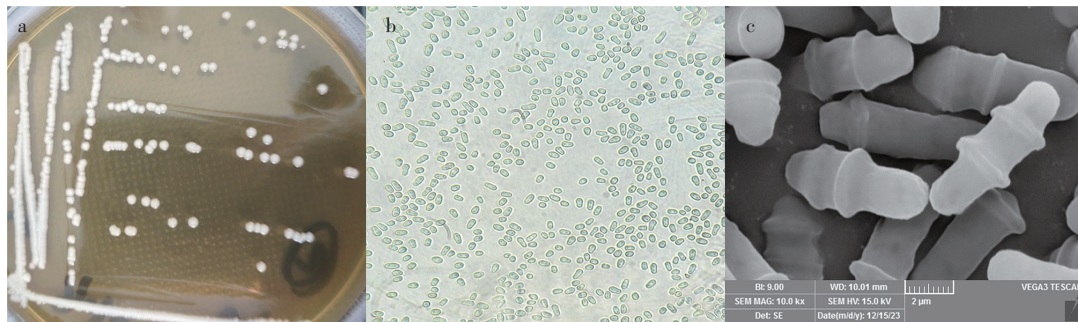
图 3 酵母菌的三级筛选

Fig.3 Tertiary screening of yeasts

由图 3 可知,菌株 JM2-5 产酯酶酶活力最大,为  $(15.52 \pm 0.03)$  U/mL。

### 2.1.2 形态学观察

菌株 JM2-5 形态学观察结果见图 4。



a. 菌落形态;b. 光学显微镜形态(×40);c. 扫描电子显微镜形态。

图 4 菌株 JM2-5 形态学观察结果

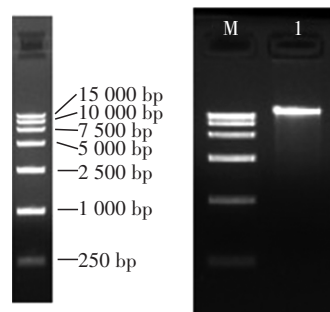
Fig.4 Morphological observation results of strain JM2-5

如图 4a 所示,菌株 JM2-5 的菌落呈乳白色,外观光滑且有光泽,菌落形状规则,边缘整齐,菌落中央稍凸起,周围与边缘颜色相同,不透明,质地湿润;如图 4b 所示,该菌株细胞形态为椭圆长棒状,没有明显聚集状态;如图 4c 所示,该菌株表面形状呈齿状,有凸起,繁殖方式是通过裂殖状态进行。

### 2.1.3 分子生物学鉴定

对菌株 JM2-5 的 DNA 进行 PCR 扩增处理,结果见图 5。

由图 5 可知,菌株 JM2-5 DNA 扩增得到的电泳图清晰,无拖尾现象。随后,将菌株序列与 BLAST 比对,其菌株序列与比对株序列采用 NJ 法构建了系统发育树。



M. 分子量标记; I. 菌株 JM2-5。

图 5 JM2-5 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.5 Detection results of JM2-5 agarose gel electrophoresis

基于 26S rDNA 基因序列构建的系统发育树见图 6。

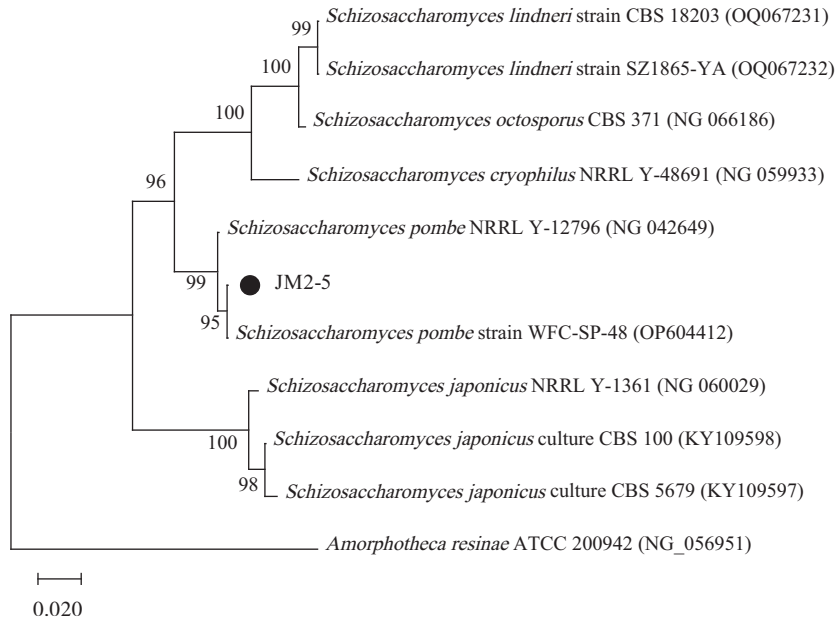
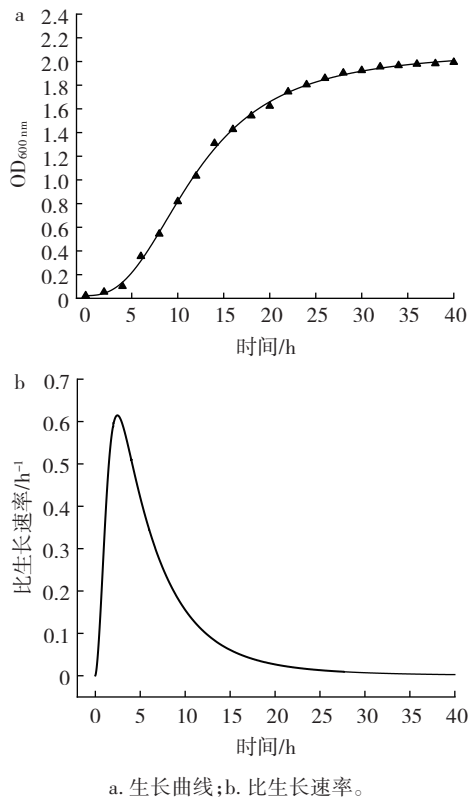


图6 菌株 JM2-5 的系统发育树  
Fig.6 Phylogenetic tree of strain JM2-5

如图6所示,菌株 JM2-5 与 *Schizosaccharomyces pombe* WFC-SP-48 的相似性最高,达到了 95%。可见菌株 JM2-5 为粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*), 归属于 *Schizosaccharomyces*。

2.2 *S. pombe* JM2-5 的生长特性

*S. pombe* JM2-5 的生长特性结果见图7。



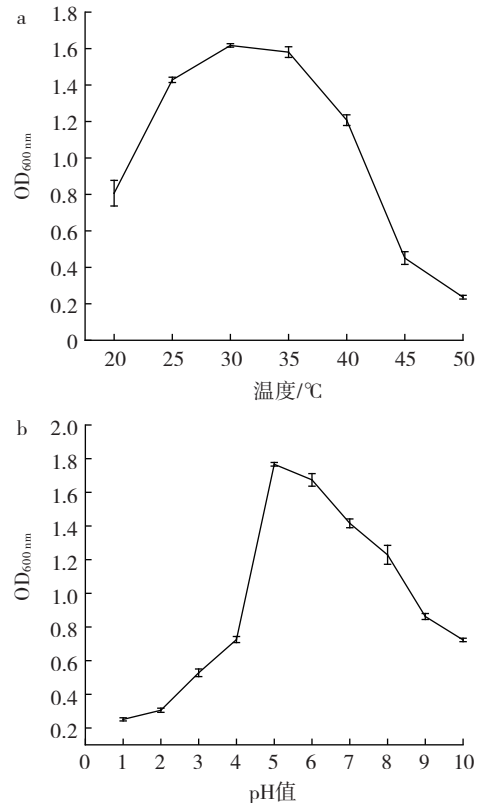
a. 生长曲线;b. 比生长速率。  
图7 菌株 JM2-5 的生长特性

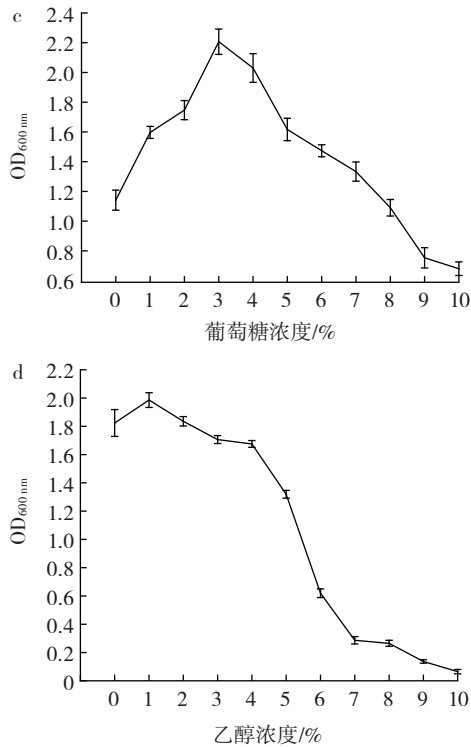
Fig.7 Growth characteristics of strain JM2-5

由图7a可知, *S. pombe* JM2-5 在 0~2 h 为延滞期, 而后进入对数期, 在 18 h 后达到稳定, 随后 OD<sub>600 nm</sub> 有稍许增加, 一直到 40 h 都能保持良好的生长。由图7b可知, 比生长速率曲线基本符合典型的“钟”型, 时间为 4 h 时, 比生长速率最大, 为 0.615 h<sup>-1</sup>。

2.3 *S. pombe* JM2-5 生理耐受性

*S. pombe* JM2-5 生理耐受性试验结果见图8。





a. 温度耐受性;b. pH 值耐受性;c. 葡萄糖耐受性;d. 乙醇耐受性。

图8 菌株 JM2-5 的生理耐受性

Fig.8 Physiological tolerance of strain JM2-5

如图 8a 所示,随着温度的升高,OD<sub>600nm</sub> 先增加后降低。在温度为 30 °C 时,OD<sub>600nm</sub> 达到最大,约为 1.6,此时菌株生长良好;温度升高至 40 °C 时,OD<sub>600nm</sub> 有所下降,OD<sub>600nm</sub> 为 1.2 左右。结果表明,*S.pombe* JM2-5 耐高温。如图 8b 所示,随着 pH 值的不断升高,*S.pombe* JM2-5 的 OD<sub>600nm</sub> 先升高后下降;在 pH1 时,OD<sub>600nm</sub> 为 0.25;在 pH5 时,OD<sub>600nm</sub> 最高,为 1.76;在 pH10 时,OD<sub>600nm</sub> 为 0.72;表明 *S.pombe* JM2-5 在强碱环境下也可以较好地生长。综上,该菌株的生长 pH 值适合微酸性、中性、碱性。如图 8c 所示,葡萄糖浓度为 0%~3% 时,OD<sub>600nm</sub> 随葡萄糖浓度增加而增加。葡萄糖浓度为 3% 时,OD<sub>600nm</sub> 最大,为 2.2;此后随着葡萄糖浓度增加,OD<sub>600nm</sub> 逐渐下降,在葡萄糖浓度上升到 10% 时,OD<sub>600nm</sub> 为 0.68,*S.pombe* JM2-5 依然可以较好地生长。结果表明,*S.pombe* JM2-5 对葡萄糖有着极好的耐受性。如图 8d 所示,随着乙醇浓度的增加,OD<sub>600nm</sub> 整体下降;在乙醇浓度为 10% 时,OD<sub>600nm</sub> 接近 0,*S.pombe* JM2-5 不生长。在乙醇浓度为 6% 时,*S.pombe* JM2-5 能较好生长,所以该酵母菌具有一定的耐乙醇能力。

#### 2.4 酵母菌的发酵性能

JM2-5 单菌发酵 9 d 的产物及其含量见表 1。

由表 1 可知,除高产乙醇、丙三醇外,还产多种酯类物质,其中对于白酒中重要的乙酸乙酯、乳酸乙酯、

表 1 JM2-5 单菌发酵 9 d 的产物及其含量  
Table 1 Products and content of JM2-5 single strain fermentation for nine days

产物	含量/(mg/L)
乙酸乙酯	631.000
乳酸乙酯	86.000
己酸乙酯	25.000
丙酸戊酯	0.926
棕榈酸乙酯	0.650
辛酸乙酯	14.120
苯甲酸乙酯	26.340
葵酸乙酯	0.285
乙酸	1 820.000
乳酸	937.000
己酸	92.000
戊酸	2.170
正葵酸	2.300
乙醇	5 631.000
丙三醇	2 850.000
异辛醇	12.100
月桂醇	2.600
苯乙醇	9.520
乙偶姻	237.000

己酸乙酯的产量分别为 631.000、86.000、25.000 mg/L。表明该酵母菌株在不添加乙醇的情况下,能够自身合成酯类物质。酯类物质在白酒、果酒和黄酒等发酵食品中起着增香、调节口感等作用。因此, JM2-5 菌株可进一步应用在发酵食品中。

JM2-5 菌株的酯酶催化能力结果见表 2。

表 2 JM2-5 菌株的酯酶催化能力  
Table 2 Esterase catalytic ability of strain JM2-5

产物	含量/(g/L)
乙酸乙酯	1.437±0.520
丁酸乙酯	0.926±0.240
乳酸乙酯	1.659±0.140
己酸乙酯	1.025±0.430

由表 2 可知,乙酸乙酯、丁酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯 4 种酯类物质最终含量分别为 (1.437±0.520)、(0.926±0.240)、(1.659±0.140)、(1.025±0.430) g/L。根据结果可以得出, JM2-5 菌株产生的酯酶具备良好的催化能力,能够在厌氧条件下高效地催化酸和醇的反应,产生丰富的酯类化合物。

### 3 讨论与结论

*S.pombe* 是一种具有较高乙醇生产和分解苹果酸能力的菌株<sup>[25]</sup>。它可以代谢产生丰富的吡喃型花色苷、甘油、丙酮酸<sup>[26]</sup>和一些独特的香气物质<sup>[27]</sup>。在葡萄酒发酵中,*S.pombe* 被广泛用于改善酒的色泽、提高香



气、改善口感等方面,具有较大的应用潜力。另外,*S. pombe* 还具有控制氨基乙酸乙酯、生物胺和曲霉毒素 A 含量的能力,以确保食品的安全性<sup>[28]</sup>。作为强化菌株,*S. pombe* 被应用于酱香型白酒生产,使基酒产量提高了 20% 且不影响基酒品质<sup>[29]</sup>;在苹果酒中将酿酒酵母和裂殖酵母共培养可以显著增加果香和花香的产生<sup>[30]</sup>。此外,产生酯酶的菌株也可应用于黄水、酒尾等酿酒过程中,生成酯化液作为副产物<sup>[31]</sup>,此类酯化液具有高含量且比例合适的香味物质,风味协调。对于保健食品及料酒的口感及香味有明显的促进作用。

本研究从浓香型白酒大曲中筛选出了一株具有较强酯酶活性的菌株 JM2-5,经鉴定为粟酒裂殖酵母(*S. pombe*),其产酯酶活力达到(15.52±0.03) U/mL。通过耐受性试验结果可知, JM2-5 菌株在高温、高碱、高糖、高乙醇含量条件下都能较好生长,能应用于白酒、调味料酒等生产,且满足大多数的生产要求。在不添加乙醇的单菌厌氧培养下, JM2-5 菌株通过自身产乙酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯的产量分别为 631.000、86.000、25.000 mg/L。在离心过滤后的发酵上清液中各加入 3 g/L 的乙酸、乳酸、丁酸、己酸共培养 2 d 后,乙酸乙酯、丁酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯 4 种酯类物质最终产量分别为(1.437±0.520)、(0.926±0.240)、(1.659±0.140)、(1.025±0.430) g/L。说明该菌产生的酯酶具备良好的催化酯类合成的能力,对提高酯类物质具有较高的应用价值。

本文对 *S. pombe* 的生理特性、产酯化酶能力及发酵性能进行了研究,丰富了酵母功能菌的种类,对酯类化合物的进一步开发应用提供了参考。在后续的研究中,可以利用诱变技术,对 JM2-5 菌株进行发酵培养基及发酵培养条件的正向突变来提高酯酶活性,并通过全基因组测序解析该菌株的代谢机理,最终提高酯类化合物的产量,将其添加到发酵食品中改善食品的口感与风味。

#### 参考文献:

- [1] BORNSCHEUER U T. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26(1): 73-81.
- [2] 赵静溶,徐友强,朱华,等.浓香型白酒风味乙酯微生物合成机制研究进展[J].食品与生物技术学报,2022,41(10):1-16.  
ZHAO Jingrong, XU Youqiang, ZHU Hua, et al. Research progress on microbial synthetic mechanism of flavor ethyl esters in strong-flavor Baijiu[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(10): 1-16.
- [3] 崔海灏.十里香酒产酯酵母的筛选及应用研究[D].保定:河北大学,2020.  
CUI Haihao. A study on the screening and application of ester-producing yeast for Shilixiang[D]. Baoding: Hebei University, 2020.
- [4] KIM J, DENG L L, HONG E, et al. Cloning and characterization of a novel thermostable esterase from *Bacillus gelatini* KACC 12197[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 116: 90-97.
- [5] HASAN F, ALI SHAH A, HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251.
- [6] BARZKAR N, SOHAIL M, TAMADONI JAHROMI S, et al. Marine bacterial esterases: Emerging biocatalysts for industrial applications[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(4): 1187-1214.
- [7] ROMANO D, BONOMI F, DE MATTOS M C, et al. Esterases as stereoselective biocatalysts[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(5): 547-565.
- [8] BIELY P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1575-1588.
- [9] 胡帮超,刘国英,董琪,等.白酒酿造中功能性酵母菌的研究及应用[J].酿酒,2017,44(2):13-18.  
HU Bangchao, LIU Guoying, DONG Qi, et al. Research and application of functional yeast in Chinese liquor production[J]. Liquor Making, 2017, 44(2): 13-18.
- [10] 肖冬光.白酒酿造过程中酯类物质形成机理探讨[J].酿酒科技,2022(9):17-24.  
XIAO Dongguang. Discussion on the formation mechanism of ester compounds in the production process of Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2022(9): 17-24.
- [11] 马彦超,侯雅馨,黄明泉,等.白酒工业副产物作为生物质资源的研究利用现状与前景[J].食品与发酵工业,2022,48(21):292-306.  
MA Yanchao, HOU Yaxin, HUANG Mingquan, et al. Current status and prospects of research and utilization of Baijiu industry by-products as biomass resources[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(21): 292-306.
- [12] 李大和.四川省食品企业力保食品安全掠影——“质监邀您看企业·食品安全大家行”纪实[J].食品与发酵科技,2012,48(4):1-2,24.  
LI Dahe. A glimpse of Sichuan food enterprises' efforts to ensure food safety—Record of 'quality supervision invites you to see enterprises and food safety'[J]. Food and Fermentation Technology, 2012, 48(4): 1-2, 24.
- [13] 焦新萍,曾金红,王灵芝,等.料酒品质评价检测技术的研究进展[J].食品安全导刊,2020(27):176-177,179.  
JIAO Xinping, ZENG Jinhong, WANG Lingzhi, et al. Research progress on quality evaluation and detection technology of cooking wine[J]. China Food Safety Magazine, 2020(27): 176-177, 179.
- [14] 李晨晨.杜康酒发酵黄水的综合利用研究[D].洛阳:河南科技大学,2022.  
LI Chenchen. Research on comprehensive utilization of Dukang liquor fermented by yellow water[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2022.
- [15] 吕枫,赵兴秀,李仕鲁,等.酱香型白酒窖醅中耐高温产香酵母的筛选及性能研究[J].中国酿造,2020,39(11):43-47.  
LV Feng, ZHAO Xingxiu, LI Shilu, et al. Screening of thermotolerant aroma-producing yeast from fermented grains of sauce-flavor Baijiu and its fermentation performance[J]. China Brewing, 2020, 39(11): 43-47.
- [16] 崔小亮,邵小兵,钟和平,等.多粮浓香型白酒生产过程中可培养酵母菌多样性分析与优质功能菌筛选[J].中国酿造,2019,38(7):105-110.  
CUI Xiaoliang, SHAO Xiaobing, ZHONG Heping, et al. Diversity analysis of cultivatable yeasts and screening of high-quality functional yeasts during the production of multi-grain strong-flavor Bai-



- jiu[J]. China Brewing, 2019, 38(7): 105-110.
- [17] 陈聪, 邹伟, 汤秀娟, 等. 产酯酶格氏乳球菌的筛选、鉴定与基因组注释[J]. 食品科学, 2024, 45(8): 87-95.  
CHEN Cong, ZOU Wei, TANG Xiujian, et al. Screening, identification and genome annotation of esterase-producing *Lactococcus garvieae*[J]. Food Science, 2024, 45(8): 87-95.
- [18] 胡晓冰, 王振伟. TTC 法在筛选西瓜果酒酵母中的应用[J]. 酿酒科技, 2011(2): 69-70, 73.  
HU Xiaobing, WANG Zhenwei. Application of TTC in screening yeast for watermelon fruit wine production[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011(2): 69-70, 73.
- [19] 颜丽. 高活力酯化菌株的筛选与优化研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2020.  
YAN Li. Screening and optimization of high activity esterified strain [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2020.
- [20] RICH P R, MISCHIS L A, PURTON S, et al. The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 202(2): 181-187.
- [21] 李海营. 高产酯酿酒酵母的分离筛选与酵母液体曲的制备[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2013.  
LI Haiying. Isolation and screening of high ester-producing *Saccharomyces cerevisiae* and preparation of yeast liquid koji [D]. Harbin : Heilongjiang University, 2013.
- [22] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 440.  
XIE Jiayi, DONG Guangjun, LIU Zhenying. Method of preparation of microbiological specimen for scanning electron microscope[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2005, 24(4): 440.
- [23] 任嘉瑜. 大米发酵脱镉制备米饮料[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2018.  
REN Jiayu. Rice beverage were prepared by rice fermentation to reduce cadmium[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2018.
- [24] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [25] 董超, 黄蓉, 姜娇, 等. 粟酒裂殖酵母和戴尔有孢圆酵母混合发酵对赤霞珠桃红葡萄酒品质的影响[J]. 中国食品学报, 2023, 23(3): 206-216.  
DONG Chao, HUANG Rong, JIANG Jiao, et al. Influence of mixed fermentation with *Schizosaccharomycete pombe* and *Torulasporea delbrueckii* on the quality of Cabernet Sauvignon rose wine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(3): 206-216.
- [26] MORATA A, BENITO S, LOIRA I, et al. Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(1): 47-53.
- [27] 王春晓, 俞俊竹, 周文亚, 等. 非酿酒酵母属酵母的葡萄酒发酵应用研究进展[J]. 中国农业科学, 2023, 56(3): 529-548.  
WANG Chunxiao, YU Junzhu, ZHOU Wenya, et al. Research progress on the application of non-*Saccharomyces* during wine fermentation[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(3): 529-548.
- [28] SONG Z W, DU H, ZHANG M H, et al. *Schizosaccharomyces pombe* can reduce acetic acid produced by Baijiu spontaneous fermentation microbiota[J]. Microorganisms, 2019, 7(12): 606.
- [29] 卢君, 山其木格, 唐平, 等. 耐酸酵母菌株的筛选及其在酱香白酒酿造过程中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2019(10): 106-111.  
LU Jun, SHAN Qimuge, TANG Ping, et al. Screening of acid-tolerant yeast strains and their application in the production of Jiangxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2019(10): 106-111.
- [30] YU W Y, ZHU Y Y, ZHU R X, et al. Insight into the characteristics of cider fermented by single and co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* based on metabolomic and transcriptomic approaches[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 163: 113538.
- [31] 刘宾, 陈义伦, 于忠良. 黄水酯化液酶法制备技术研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(2): 116-121.  
LIU Bin, CHEN Yilun, YU Zhongliang. Research on the preparation technology of esterifying liquid from yellow water[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(2): 116-121.