

DOI: 10.13907/j.cnki.nykxyj.2026.03.003

基于定性培养基的非酿酒酵母产酯酶能力分析

喻启胜, 陈宗琴, 王春晓

(贵州大学酿酒与食品工程学院, 贵州省生态特色食品新质化加工与贮藏全省重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要:微生物产酯酶能力的高低通过发酵过程直接影响酒类产品中酯类物质的形成,因此产酯微生物的筛选及相关方法的选用对促进酒类品质提升和多元化开发具有重要作用。通过产酯微生物的初筛定性培养基选用、配制和培养条件设置,采用商业酯酶比较 2 种定性培养基的表征效果。结果表明:三丁酸甘油酯 YPD 培养基更适于产酯酶能力表征,最佳条件为采用玻璃培养皿、培养 4 h 后观察、酯酶浓度为 $3.75 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为阳性对照。进一步基于该定性培养基评价 4 种野生非酿酒酵母(*Wickerhamomyces anomalus* 异常威克汉姆酵母、*Issatchenkia terricola* 土壤伊萨酵母、*Schizosaccharomyces japonicus* 日本裂殖酵母和 *Hanseniaspora uvarum* 葡萄汁有孢汉逊酵母)产酯酶能力,共筛选出产酯酶能力较强的 2 株异常威克汉姆酵母菌株和 1 株日本裂殖酵母菌株,而 1 株葡萄汁有孢汉逊酵母和 1 株土壤伊萨酵母未呈现明显产酯酶能力。菌株生长能力(菌落大小)几乎与透明圈大小呈正相关,这能够为产酯酶能力的定量表征提供辅助检测视角。本研究为产酯微生物的初筛和产酯酶能力评价提供定性培养基筛选方法,所筛选的高产酯酶酵母能够提升酯类物质含量,可为促进酒类多元化开发提供菌种参考。

关键词:酯酶;酯类物质;三丁酸甘油酯;非酿酒酵母

中图分类号:TS262

文献标志码:A

酯类物质是酒类风味物质中重要的呈香物质,主要通过陈酿阶段酸和醇缓慢的酯化作用形成,葡萄等水果原料和发酵过程也会影响酒中酯类物质的种类和含量。近年来受酒类多元化开发的推动,通过发酵过程提升酯类含量的产酯微生物受到广泛关注^[1],如 *Oenococcus oeni* 酒酒球菌^[2]、*Clostridium* 梭菌^[3]、*Schizosaccharomyces pombe* 粟酒裂殖酵母^[4]、*Kluyveromyces marxianus* 马克思克鲁维酵母^[5]、*Pichia kudriavzevii* 库德里阿兹威毕赤酵母^[6]、*Pichia fermentans* 发酵毕赤酵母^[7-8]、*Wickerhamomy-*

ces anomalus 异常威克汉姆酵母^[9-10]、*Saccharomyopsis fibuligera* 扣囊复膜酵母^[11]等。这些产酯微生物大多筛选自酒曲、传统发酵食品、果酒自然发酵过程等,筛选目标通常关联酯类物质含量和种类,但为快速瞄准目标微生物,相关研究大多通过定性培养基初筛产酯酶能力强的微生物,再开展酯酶产量和酯类物质生成量研究与验证。酯酶(EC3.1.1.1)通常指的是水解短链底物(碳原子数小于 10)酯键的酶,但部分研究表明酯酶既能催化酯键的水解,也能催化酯键的合成^[9]。酒类酿造中产酯微生物产

收稿日期:2026-02-27

基金项目:国家自然科学基金项目(32572542,32160544);贵州省科技计划项目(黔科合基础—ZK[2023]重点007号;黔科合支撑[2024]一般116;黔科合支撑[2025]一般034;黔科合人才KJZY[2025]093);贵州省生态特色食品新质化加工与贮藏全省重点实验室项目(ZSYS[2025]023);贵州省酱香型白酒技术创新中心项目(黔科合平台JSZX[2025]002);贵州省发酵工业特征微生物资源挖掘与利用科技创新人才团队建设项目(黔科合平台人才—CXTD[2023]029)

作者简介:喻启胜(2004—),酿酒工程专业本科生。

通信作者:王春晓,教授,博士,主要从事酒酿造微生物多样性、酿酒生物技术、食品生物工程、贵州特色发酵食品工程微生物研究,电子邮箱:cxwang@gzu.edu.cn。

引用格式:喻启胜,陈宗琴,王春晓.基于定性培养基的非酿酒酵母产酯酶能力分析[J].农业科学研究(中英文),2026,47(3):21-26.

Citation: Yu Qisheng, Chen Zongqin, Wang Chunxiao. A preliminary study on esterase production by non-*Saccharomyces* yeasts using qualitative screening media[J]. Journal of Agricultural Sciences, 2026, 47(3): 21-26.

酯机制与高产酯酶水解大分子物质产生风味物质前体小分子、催化有机酸与乙醇酯化反应合成酯类物质和通过醇酰基转移酶途径形成酯等有关。因此,产酯酶能力的高低是评价产酯微生物形成酯类物质的主要参数之一。

采用定性培养基初筛产酯酶能力强的微生物通常用于产酯微生物快速筛选的第一步,因此定性培养基的选择对准确快速锚定目标微生物具有重要作用。主要筛选原理为微生物代谢含油脂底物可形成透明圈或脂肪酸沉淀、代谢含染色剂培养基可产生显色产物等^[12-13]。常见筛选方法包括透明圈法、变色圈法和荧光圈法。具体来说,透明圈法筛选是利用微生物分泌的酯酶水解培养基中甘油三酯底物,形成以菌落为中心的透明圈^[10,14]。变色圈法和荧光圈法与透明圈法筛选的一致性在于观察所产圈的大小,但圈的展现形式有差异:张瑛等^[15]以维多利亚蓝为指示剂,采用变色圈平板快速检测碱性脂肪酶活力;鄢洪德等^[16]以溴甲酚紫为指示剂,采用平板变色圈法筛选产酯微生物;Zottig等^[17]根据罗丹明B阳离子能与水解产物脂肪酸形成荧光物质,通过紫外激发产生荧光的原理筛选产酯微生物。透明圈法因培养基成分简单较为常用,多以三丁酸甘油酯为酯酶作用底物,常用的定性培养基为三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基^[18-20]和三丁酸甘油酯YPD培养基(酵母浸出粉胨葡萄糖培养基)^[9,12,21]。不同培养条件影响产酯微生物酯类物质代谢^[12],因此进行产酯微生物初筛时须关注定性培养基的成分、配制和培养条件设置。合适商业酶浓度的阳性对照可为初筛培养基成分、配制和培养条件(含培养皿材质)的确定提供不同样品和培养批次之间的统一参考依据。

本研究首先对比分析三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基和三丁酸甘油酯YPD培养基的酯酶检测能力差异,进一步采用较优定性培养基开展4种野生非酿酒酵母产酯酶能力分析(*Wickerhamomyces anomalus* 异常威克汉姆酵母、*Issatchenkia terricola* 土壤伊萨酵母、*Schizosaccharomyces japonicus* 日本裂殖酵母和 *Hanseniaspora uvarum* 葡萄汁有孢汉逊酵母),以期为产酯酵母初筛提供简便、准确的培养基,同时为产酯野生酵母进一步应用提供菌株参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌种 本研究所用4种贵州本土野生非酿酒酵母菌株为FBKL2.9-G1异常威克汉姆酵母(*W. anomalus*)、FBKL2.9-G12异常威克汉姆酵母、FBKL2.91436土壤伊萨酵母(*I. terricola*)、FBKL2.9252土壤伊萨酵母、FBKL2.9886日本裂殖酵母(*S. japonicus*)、FBKL2.9363葡萄汁有孢汉逊酵母(*H. uvarum*),分离来源为酱香型高温大曲和刺葡萄自然发酵^[22],目前保存于贵州大学酿酒与食品工程学院实验室。

1.1.2 培养基 三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基: ρ (琼脂)为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, φ (乳化液)为4%(聚乙烯醇、三丁酸甘油酯),自然pH。三丁酸甘油酯YPD培养基: ρ (蛋白胨)为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (葡萄糖)为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (酵母浸出粉)为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (琼脂)为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, φ (三丁酸甘油酯)为0.1%,自然pH。YPD培养基: ρ (蛋白胨)为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (葡萄糖)为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (酵母浸出粉)为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (琼脂)为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,自然pH。

1.1.3 仪器与设备 LT1002E型电子天平,常熟市天量仪器有限公司;PHS-3C型pH计,上海理达仪器厂;DK-98-IIA型电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;Allegra X-30R型冷冻离心机,美国Beckman Coulter公司;SZ-93型全自动双重蒸水蒸馏器,上海银泽仪器设备有限公司;SPX-250B-Z型生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;LC-JY92-IIN型超声细胞破碎仪,上海厉辰仪器科技有限公司

1.2 试验方法

1.2.1 三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基定性筛选方法 配制乳化液:配制 $3\text{ L}\cdot 100^{-1}\text{ L}^{-1}$ 聚乙烯醇溶液,按 $V(\text{三丁酸甘油酯}):V(\text{聚乙烯醇溶液})=1:3$ 的比例加入三丁酸甘油酯,低温($5\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$)放置1~2 h后,使用超声细胞破碎仪360 W下工作2 s,间歇2 s,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下乳化9 min制成乳化液^[23]。乳化液pH低于4会影响琼脂凝固^[24],因此按照1.1.2配方分别配制琼脂溶液和乳化液,分别在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下灭菌15 min,待温度冷却至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时将乳化液倒入琼脂溶液并混合均匀,倒至塑料和玻璃无菌培养皿中凝固。在平板上打7.5 mm圆孔^[25-26],将100 μL 不同浓度商业酯

酶溶液(120.0 、 60.0 、 30.0 、 15.0 、 $7.5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入圆孔中,持续观察透明圈的产生情况,确定最佳阳性对照浓度和观察时间,打孔的目的是约束溶液所在的空间范围。商业酶浓度、观察时间和培养皿材质的选择以清晰呈现大小合适的透明圈为依据,本方法中浓度、时间和材质设置基于已报道的微生物产酯酶浓度^[27]、常规菌体培养时间(48 h)设置范围,一次性塑料培养皿为常用培养皿,但呈现效果弱于经典玻璃培养皿,因此本研究设置对比,以申明酯酶定性筛选中可能会被忽视的培养皿材质筛选的影响。所购买商业酯酶为来自猪肝脏的酯酶冻干粉(酶活性为 $15\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 1 U 指的是在该酶规定的标准测定条件下, 1 min 内催化 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 反应所需的酶量),本研究中分别称取 2 、 4 、 8 mg 酯酶,加入 1 mL 无菌蒸馏水中溶解获得 30.0 、 60.0 、 $120.0\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的商业酯酶溶液,而 15.0 、 $7.5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的酯酶溶液由 $30.0\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液稀释获得。

1.2.2 三丁酸甘油酯 YPD 培养基定性筛选方法 制备三丁酸甘油酯 YPD 平板:按照 1.1.2 配方配制培养基, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 15 min ,倒至塑料和玻璃无菌培养皿中凝固。配制不同浓度商业酯酶溶液(60.00 、 30.00 、 15.00 、 7.50 、 $3.75\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$),点样 $5\text{ }\mu\text{L}$ 酯酶溶液于三丁酸甘油酯 YPD 平板,持续观察透明圈的产生情况,确定最佳培养皿材质、阳性对照浓度和观察时间,具体设置范围原因同 1.2.1。本方法仅需滴取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 酯酶溶液至培养基表面,不需打孔约束溶液位置,但需静置 1 h 以上待溶液全部吸收后方可倒置培养。

1.2.3 酵母菌产酯酶能力分析方法 对比 1.2.1 和 1.2.2 两种培养基定性效果,确定一种培养基用于酵母菌产酯酶能力分析。将 5 株酵母菌株划线接种于 YPD 固体培养基, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下恒温培养 2 d ,用牙签垂直蘸取少量新鲜菌落点样于所筛选的定性培养基上,每个菌株在同一平板上点 3 次,重复 2 个平板, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下在培养箱培养 4 d 。观察前 4 h 在定性培养基上滴入 $5\text{ }\mu\text{L}$ $3.75\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 商业酯酶溶液,以商业酯酶溶液为阳性对照,记录透明圈半径(R)和菌落半径(r),计算透明圈环径($R-r$)。使用统计软件 SPSS 21,采用 Tukey's HSD 事后检验对数据进行显著性分析,当 $P<0.05$ 时视为差异具有统计学意义。半径 r 与透明圈环径($R-r$)之间的线性关联关系,分析过程中采用双尾显著性检验,以 Pearson 相关系数

表征变量间相关的强弱,以 P 值判断相关性是否具备统计学意义。

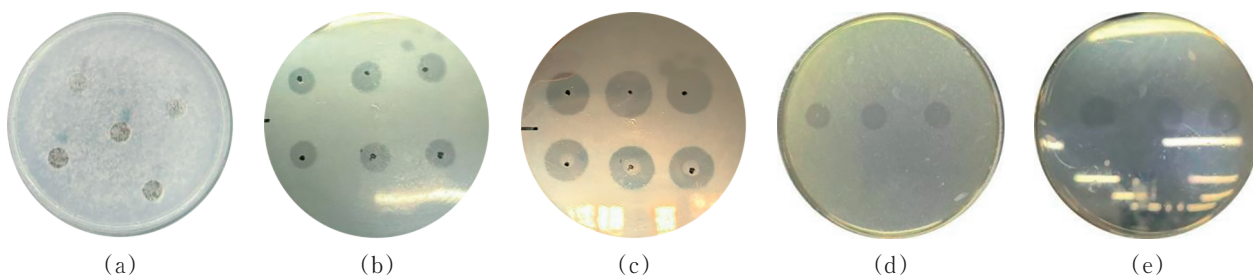
2 结果与分析

2.1 定性培养基和筛选方法对比分析

采用商业酯酶对比分析三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基和三丁酸甘油酯 YPD 培养基检测酯酶定性效果,代表性结果如图 1 所示,三丁酸甘油酯 YPD 培养基的效果优于三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基,且采用三丁酸甘油酯 YPD 培养基的最佳条件是玻璃培养皿、 4 h 以后观察、阳性对照采用 $5\text{ }\mu\text{L}$ $3.75\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液。2 种培养基的具体筛选细节如下。

1) 三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基在塑料和玻璃培养皿中表征酯酶的效果比较表明,商业酯酶加入三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基后,经过 24 h 和 48 h 后观察,各种浓度酶液均未见明显透明圈,以塑料培养皿 $100\text{ }\mu\text{L}$ $120\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液培养 24 h 为代表展示效果,透明圈不明显(图 1a)。三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基倒入塑料培养皿后会产生一些白点,放置几天后白点密度增加,剖开培养基后观察到白点大多数附着在底部培养皿上,少数在培养基里,而倒入玻璃培养皿后未观察到类似现象,推测可能乳化液与培养皿在高温下存在一定反应。

2) 三丁酸甘油酯 YPD 培养基在不同培养皿中表征不同浓度酯酶的持续培养时间效果比较表明,商业酯酶加入三丁酸甘油酯 YPD 培养基, 4 h 后产生明显透明圈,随着时间推移透明圈逐渐变大,且玻璃培养皿和塑料培养皿呈现不同的效果。在玻璃培养皿中, $3.75\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酯酶加入 1 h 即可观察到透明圈, 4 h 后透明圈如图 1b 所示, 24 h 后透明圈直径增大到 2 倍以上(图 1c), 48 h 则产生交叉影响直径判断,因此当采用玻璃培养皿进行三丁酸甘油酯 YPD 培养基定性筛选时,建议采用 $3.75\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酯酶作为阳性对照,且最佳观察时间为滴入后 4 h 。在塑料培养皿中, $30.00\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酯酶加入 4 h 后可观察到透明圈(图 1d), 8 h 后透明圈直径增大但清晰度减弱(图 1e), 48 h 后透明圈不可见,而更低浓度的酯酶(7.50 和 $15.00\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入后 4 h 也可以产生透明圈,但不如 $30.00\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 清晰,且至 24 h 时透明圈消失,因此建议采用玻璃培养皿开展菌株产酯酶定性能力筛选。



注:商业酯酶在三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基(a)和三丁酸甘油酯 YPD 培养基(b、c、d、e)上代表性效果对比。(a)为塑料培养皿 100 μL 120 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液培养 24 h(图中 7.5 mm 圆孔为注入酶液区域);(b)为玻璃培养皿 5 μL 3.75 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液培养 4 h(黑点为记号笔标记点样位置);(c)为玻璃培养皿 5 μL 3.75 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液培养 24 h(黑点为记号笔标记点样位置);(d)为塑料培养皿 5 μL 30 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液培养 4 h;(e)为塑料培养皿 5 μL 30 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酶液培养 8 h。

图1 商业酯酶在三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基(a)和三丁酸甘油酯 YPD 培养基(b、c、d、e)上代表性效果对比

Fig. 1 Comparison of the representative effects of commercial esterase on tributyrin emulsion agar medium (a) and tributyrin-containing YPD medium (b, c, d, e)

研究结果展现了三丁酸甘油酯 YPD 培养基较优的定性效果。尽管已报道的大量研究采用三丁酸甘油酯乳化液琼脂培养基开展产酯酵母初筛试验^[18,20],但相关研究并未表征商业酯酶在相关培养基上的效果。因此可能产酯酵母的作用效果优于商业酯酶,结合本研究结果,建议定性筛选时采用商业酯酶作为阳性对照表征培养基的筛选有效性。由于三丁酸甘油酯为油状,为避免在 YPD 培养基中分散不均,有相关研究将三丁酸甘油酯乳化液加入 YPD 培养基中用于筛选产酯酵母^[4],本研究也初步尝试了 φ (三丁酸甘油酯乳化液)为 0.4%YPD 培养基对商业酯酶表征效果,24 h 内塑料培养皿未观察到明显透明圈。此外,三丁酸甘油酯是常用酯酶表征底物,相关研究也有选用植物油、甘油三油酸酯和 Tween 80 等作为底物配制定性培养基^[28-30]。

2.2 野生非酿酒酵母产酯酶能力分析

本研究采用三丁酸甘油酯 YPD 培养基开展最佳条件下 6 株非酿酒酵母产酯酶能力初筛,培养 4 d 后所产透明圈情况如图 2 所示。日本裂殖酵母 FBKL2.9886、异常威克汉姆酵母 FBKL2.9-G1 和 FBKL2.9-G12 菌株生长能力较强,形成了较大菌落,且菌落周围呈现清晰透明圈。土壤伊萨酵母 FBKL2.91436 形成较小菌落,菌落周围呈现细小透明圈。葡萄汁有孢汉逊酵母 FBKL2.9363 和土壤伊萨酵母 FBKL2.9252 菌落很小且周围未形成透明圈。这说明在三丁酸甘油酯 YPD 培养基上生长能力强的菌株,形成的透明圈较大,产酶能力较强。菌落半径 r 与透明圈环径 $(R-r)$ 之间的 Pearson 相关系数为 0.939, P 为 0.005 (<0.01),表征菌落半径与透明圈环径之间存在显著强相关。

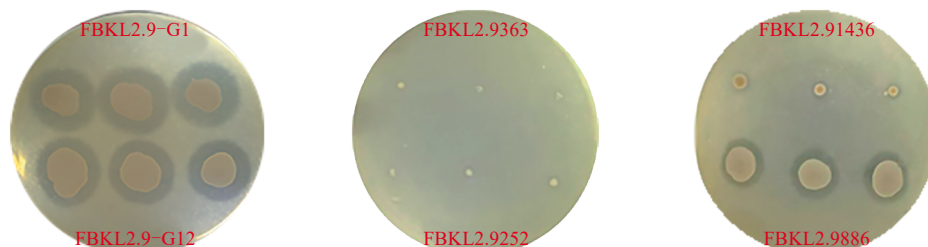


图2 6株非酿酒酵母在三丁酸甘油酯 YPD 培养基上培养 4 d 后产生透明圈的效果

Fig. 2 Transparent circles formed by six non-*Saccharomyces* yeast strains after 4 days of cultivation on tributyrin-containing YPD medium

6 株非酿酒酵母所产透明圈半径大小依次为 FBKL2.9-G1、FBKL2.9-G12、FBKL2.9886、FBKL2.91436、FBKL2.9363/FBKL2.9252,菌落半径大小依次为 FBKL2.9-G1/FBKL2.9-G12/FBKL2.9886、

FBKL2.91436、FBKL2.9363/FBKL2.9252,产酶能力(透明圈环径)大小依次为 FBKL2.9-G1、FBKL2.9-G12、FBKL2.9886、FBKL2.91436、FBKL2.9363/FBKL2.9252(表 1)。

表 1 非酿酒酵母产酯酶能力定性表征

Tab. 1 Qualitative characterization of the esterase production capacity of non-*Saccharomyces* yeasts

菌种名称	菌株编号	透明圈半径(<i>R</i>)/cm	菌落半径(<i>r</i>)/cm	透明圈环径(<i>R-r</i>)/cm
异常威克汉姆酵母	FBKL2.9-G1	1.18±0.02 ^a	0.63±0.02 ^a	0.55±0.03 ^a
异常威克汉姆酵母	FBKL2.9-G12	1.04±0.06 ^b	0.62±0.08 ^a	0.42±0.10 ^a
日本裂殖酵母	FBKL2.9886	0.78±0.05 ^c	0.55±0.03 ^a	0.23±0.06 ^b
土壤伊萨酵母	FBKL2.91436	0.22±0.03 ^d	0.17±0.03 ^b	0.05±0.04 ^c
葡萄汁有孢汉逊酵母	FBKL2.9363	0.12±0.01 ^e	0.12±0.01 ^c	0.00±0.01 ^c
土壤伊萨酵母	FBKL2.9252	0.10±0.00 ^e	0.10±0.01 ^c	0.00±0.01 ^c

注:同列小写字母表示差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 结论与展望

研究利用商业酯酶比较 2 种定性培养基表征效果,证实三丁酸甘油酯 YPD 培养基更适于产酯酶能力表征,最佳条件为采用玻璃培养皿、培养 4 h 后观察、酯酶浓度为 3.75 U·mL⁻¹作为阳性对照。研究进一步采用三丁酸甘油酯 YPD 培养基开展最佳条件下 4 种非酿酒酵母产酯酶能力分析,筛选 3 株产酯酶能力较强的菌株,属于异常威克汉姆酵母和日本裂殖酵母,有 2 株酵母未呈现明显产酯酶能力,分别为葡萄汁有孢汉逊酵母和土壤伊萨酵母。值得注意的是,实验室平板筛选多采用一次性塑料无菌培养皿,但本研究对比发现塑料平皿不适用于三丁酸甘油酯为底物的酯酶能力表征,因此建议后续酯酶能力表征初筛时需关注培养皿材质影响和阳性商业酯酶对照的表征验证。研究采用三丁酸甘油酯 YPD 培养基比较 6 株非酿酒酵母产酯酶能力时发现,菌株生长能力(菌落大小)与透明圈大小呈显著正相关,因此后续进行产酯酶能力定量表征时,也可以考虑通过培养细胞浓度辅助表征产酶量大小。本研究所筛选的产酯酶能力强的异常威克汉姆酵母筛选自酱香型高温大曲,日本裂殖酵母筛选自刺葡萄自然发酵过程,这为提升酒类香气品质提供了初步的产酯酵母菌种来源。目前酒类酿造菌种来源大多为本土商业化菌株^[31],这在一定程度上限制了风味的多元化创新。基于现有研究对不同来源菌株跨酒类应用潜力的探索^[8],为促进酒类多元化开发与应用,本研究所筛选的高产酯酶菌种具备提升酯类物质含量性能,可进一步探索其在其他不同酒类酿造中的应用潜力。

参考文献:

[1] 梁龙元,王露,薛栋升.白酒酿造中酯酶及己酸乙酯的研

究进展[J].酿酒,2018,45(1):17-23.

[2] 祝霞,赵丹丹,李俊娥,等.河西走廊产区酒球菌酯酶活性对葡萄酒酯类香气物质的影响[J].农业工程学报,2021,37(1):315-322.

[3] 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].自贡:四川轻化工大学,2022.

[4] 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.

[5] 梁斯梅,万瑞杰,张龙,等.米香型白酒产酯酵母的分离筛选及推广应用[J].酿酒科技,2025(4):27-32.

[6] 孙羊羊,尹亚格,李继齐,等.天津地区酱香型白酒生产中产酯酵母的筛选及应用[J].微生物学通报,2025,52(8):3788-3804.

[7] 王子莹.耐酸产酯酵母的筛选及其在沙棘果酒中的应用[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2024.

[8] 李婷.川南白酒窖池中产酯酵母的筛选及其葡萄酒增香酿造的潜力分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.

[9] 石馨.异常威克汉姆酵母 Y-1 的产酯酶特性及其在酿酒中的应用[D].郑州:河南工业大学,2022.

[10] 龚雯,罗小叶,何旭丽,等.酱香大曲中产香酵母的筛选鉴定及特性分析[J].中国酿造,2024,43(8):24-30.

[11] 王毅飞,高婷婷,王硕,等.清香型白酒大曲中高产酯酵母菌株的筛选及应用[J].中国酿造,2026,45(1):148-157.

[12] 吕梅.*Lichtheimia* 属 HSM 菌株酯酶发酵条件及酶学特性研究[D].武汉:湖北工业大学,2014.

[13] 杨俊,崔佳琦,于鹏飞,等.脂肪酶活力检测方法研究进展[J].食品与生物技术学报,2024,43(12):29-36.

[14] 蔡海莺,王珍珍,张婷,等.微生物脂肪酶资源挖掘研究进展[J].食品科学,2018,39(7):329-337.

[15] 张瑛,吴跃进,何成芳,等.一种新的水稻种子碱性脂肪酶活性快速检测方法及其应用[J].中国农业科技导报,2009,11(S2):43-45.

[16] 郝洪德,汪钊,李光伟.产酯酶微生物菌种的筛选研究[J].工业微生物,2007(6):44-48.

[17] Zottig X, Meddeb-Mouelhi F, Beauregard M. Develop-

- ment of a high throughput liquid state assay for lipase activity using natural substrates and rhodamine B[J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 496: 25-29.
- [18] 龚雯. 高温大曲中产香酵母的分离筛选及特性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2025.
- [19] 张旭姣, 闫裕峰, 郎繁繁, 等. 耐高温产香酵母的分离筛选及麸曲制作工艺优化[J]. *中国酿造*, 2025, 44(2): 108-114.
- [20] 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.
- [21] 梁龙元, 王露, 朱玲敏, 等. 深海海泥产酯酶菌株的筛选及鉴定[J]. *酿酒*, 2017, 44(6): 36-42.
- [22] Wang C, Wu C, Qiu S. Yeast diversity investigation of *Vitis davidii* Föex during spontaneous fermentations using culture-dependent and high-throughput sequencing approaches[J]. *Food Research International*, 2019, 126: 108582.
- [23] 杜春迎. 浓香型大曲中高产酯化酶菌株的筛选及产酶条件优化[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2012.
- [24] 孙青民, 刘威, 姚红. 屎肠球菌产生有机酸降低琼脂胶凝作用[J]. *中国微生物学杂志*, 2018, 30(11): 1252-1257.
- [25] 郭冉冉. 高产脂肪酶菌株的筛选及酶学性质的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [26] 徐伟芳, 黄涛杨, 周敏, 等. 一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定及其酶学性质研究[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(5): 62-69.
- [27] 龚心愿, 杨章宇, 杨可, 等. 酱香型高温大曲酵母菌耐高温特性和产酶特性研究[J/OL]. *食品与发酵工业*, 1-15 [2026-06-10]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.047094>.
- [28] 李国凤, 周诗雯, 程俊秋, 等. 脂肪酶产生菌的分离鉴定及产酶条件优化[J]. *东南园艺*, 2025, 13(2): 155-161.
- [29] 严幻汝, 祝霞, 杨学山. 优良非酿酒酵母的筛选及其在发酵过程中酯酶活力的变化[J]. *中国食品学报*, 2024, 24(12): 193-204.
- [30] 李雪. 野生酵母的分离筛选及其在桃酒发酵中的应用[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2025.
- [31] 王佳薇, 李映龙, 金悦, 等. 贺兰山东麓四个品种干白葡萄酒香气成分比较分析[J]. *农业科学研究*, 2023, 44(2): 90-96.

A preliminary study on esterase production by non-*Saccharomyces* yeasts using qualitative screening media

Yu Qisheng, Chen Zongqin, Wang Chunxiao

(School of Liquor and Food Engineering, Guizhou University, Guizhou Provincial Key Laboratory of New-Quality Processing and Storage of Ecological Specialty Foods, Guiyang 550025, China)

Abstract: Microbial esterase production directly affects the formation of ester compounds in alcoholic beverages during fermentation. Therefore, the screening of ester-producing microorganism and the selection of appropriate screening methods are important for improving the quality and promoting the diversified development of alcoholic beverages. In this study, two qualitative media were compared using commercial esterase by optimizing medium selection and preparation and establishing the culture conditions for the preliminary screening of ester-producing microorganisms. The results show that tributyrin-containing YPD medium was more suitable for characterizing esterase production capacity. The optimal conditions involved the use of glass Petri dishes, observation after 4 hours of incubation, and an esterase concentration of $3.75 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ as the positive control. Using this qualitative medium, the esterase production capacities of four wild non-*Saccharomyces* yeast species—*Wickerhamomyces anomalus*, *Issatchenkia terricola*, *Schizosaccharomyces japonicus*, and *Hanseniaspora uvarum*—were further evaluated. Two *Wickerhamomyces anomalus* strains, and one *Schizosaccharomyces japonicus* strain with relatively high esterase production capacities were identified, whereas one *Issatchenkia terricola* strain and one *Hanseniaspora uvarum* strain did not show obvious esterase production capacity. Colony size was generally positively correlated with clear-zone size, providing an additional indicator for the quantitative characterization of esterase production capacity. This study provides a qualitative medium-based screening method for the preliminary screening of ester-producing microorganisms and the evaluation of their esterase production capacity. The selected yeasts strains with high esterase production capacity can increase ester concentrations and may serve as candidate strains for promoting the diversified development of alcoholic beverages.

Keywords: esterase; ester compounds; tributyrin; non-*Saccharomyces* yeasts

(责任编辑 魏 乐)