

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180512

脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶对酿酒酵母己酸乙酯合成的影响

何亚辉, 马艳蕊, 薛星祥, 杜永静, 陈叶福, 郭学武, 肖冬光
(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心,
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 己酸乙酯作为浓香型白酒的特征性风味物质, 主要是在发酵后期由窖泥微生物产生的己酸与酵母产生的乙醇在大曲中酯化酶的作用下生成的, 而酿酒主体微生物酿酒酵母(*S. cerevisiae*)的产己酸乙酯能力很低. 本研究从酿酒酵母具有外源脂肪酸摄入能力入手, 通过构建酿酒酵母脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶基因(*FAA1*、*FAA2*、*FAA3*、*FAA4*、*FAT1*)敲除和过表达菌株, 研究了脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶对酿酒酵母摄入外源己酸生成己酰辅酶 A 进而合成己酸乙酯的影响. 玉米浓醪发酵实验结果表明, $\alpha 5$ - Δ FAA3 菌株己酸乙酯产量提高了 23.8%, 过表达 *FAA4* 菌株己酸乙酯产量提高了 32.1%, 进而通过 *FAA3* 敲除同时过表达 *FAA4* 得到菌株 $\alpha 5$ -FAA4 Δ FAA3, 其己酸乙酯产量达到了 17.34 mg/L, 比出发菌 $\alpha 5$ 提高了 57.4%. 该研究有效提高了酿酒酵母利用外源己酸合成己酸乙酯的能力, 为通过酿酒酵母强化浓香型白酒中己酸乙酯的生成奠定了基础.

关键词: 浓香型白酒; 己酸乙酯; 酿酒酵母; *FAA3*; *FAA4*

中图分类号: Q552 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)02-0013-09

Effect of Fatty Acid Acyl-CoA Synthetase on the Synthesis of Ethyl Caproate in *Saccharomyces cerevisiae*

HE Yahui, MA Yanrui, XUE Xingxiang, DU Yongjing, CHEN Yefu,
GUO Xuewu, XIAO Dongguang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Engineering Research Center of Microbial Metabolism and Fermentation Process Control, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Ethyl caproate, as the main flavor substance of Luzhou-flavor Baijiu, is mainly produced through esterification of caproic acid produced by pit mud microorganisms and ethanol produced by yeast in the late fermentation stage, but the ethyl caproate produced by main microorganism *Saccharomyces cerevisiae* is very low. According to the intake ability of *Saccharomyces cerevisiae* to exogenous fatty acids, this research has studied the effects of fatty acid acyl-CoA synthetase on caproic acids absorption and the synthesis of ethyl caproate in *Saccharomyces cerevisiae* by constructing knockout and overexpressing strains of acyl coenzyme A gene (*FAA1*, *FAA2*, *FAA3*, *FAA4* and *FAT1*) through genetic engineering. The experimental results of concentrated mash fermentation of corn showed that the ethyl caproate of *FAA3* knockout strain increased by 23.8%, and ethyl caproate of *FAA4* overexpressing strain increased by 32.1%. Then *FAA3* knockout with the overexpression of *FAA4* was used to obtain strain $\alpha 5$ -FAA4 Δ FAA3, and its ethyl caproate content reached 17.34 mg/L, which was 57.4% higher than that of the starting strain $\alpha 5$. This study has effectively improved the ability of *S. cerevisiae* to synthesize ethyl caproate using exogenous caproic acid, and built a foundation for strengthening the production of ethyl caproate in

收稿日期: 2018-12-29; 修回日期: 2019-04-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31671843); 工业微生物优良菌种选育与发酵技术公共服务平台项目(17PTGCCX00190)

作者简介: 何亚辉(1993—), 男, 河北邯郸人, 硕士研究生; 通信作者: 陈叶福, 教授, yfchen@tust.edu.cn

Luzhou-flavor Baijiu with *S. cerevisiae*.

Key words: Luzhou-flavor Baijiu; ethyl caproate; *Saccharomyces cerevisiae*; *FAA3*; *FAA4*

中国白酒与白兰地、伏特加、威士忌、朗姆酒和金酒并称世界著名的六大蒸馏名酒^[1]。根据风味特征的不同,中国白酒可分为4种主要香型:清香型、浓香型、酱香型和米香型,其中浓香型白酒占据了白酒市场的70%^[2-3]。己酸乙酯是浓香型白酒的主要特征风味物质,其含量的多少直接决定了浓香型白酒的风味品质。

传统浓香型白酒发酵过程中,己酸乙酯主要是在发酵后期由窖泥微生物中的己酸菌产生的己酸在大曲中酯化酶的作用下与酿酒酵母产生的乙醇发生酯化反应生成的^[4-5]。其中的己酸菌属于厌氧菌,生活在窖泥内部,因此其产生的己酸要参与生成己酸乙酯的过程就要渗透到窖泥的外层到发酵醅中去,这会增加粮耗并且延长发酵周期,同时窖泥还会生成一些不良的风味物质如土臭素等,对浓香型白酒品质产生负面影响^[6]。

在酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中己酸乙酯可以经醇乙酰基转移酶催化己酰辅酶A与乙醇生成己酸乙酯^[7-8],而此时其前体物质己酰辅酶A的浓度是其生成的一个重要限制因素^[9]。有研究^[10]表明添加外源脂肪酸可以提高乙基酯的产量。酿酒酵母在利用外源脂肪酸的时候主要是通过脂酰辅酶A合成酶的作用,将外源脂肪酸以酰辅酶A的形式摄入胞内,进而增加了胞内酰辅酶A的浓度,然后再经醇乙酰基转移酶作用生成相应的酯。例如,中链脂肪酸乙酯(己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯)通过增加前体中链脂肪酸(MCFAs)的含量,使得中链脂肪酸乙酯含量升高,即在一定范围内,高浓度的MCFAs可以促进乙基酯的生成^[11]。在实际生产中,将培养的己酸菌液加入发酵曲中作为生产己酸乙酯的前体物质,能够显著增加己酸乙酯的产量,并且缩短发酵周期,降低成本。

酿酒酵母中的脂酰辅酶A合成酶的基因有*FAA1—FAA4*、*FAT1—FAT2*^[12-14]。Leber等^[15]证明*FAA1*、*FAA2*、*FAA3*和*FAT1*参与外源游离脂肪酸(FFA)的吸收活化用于脂肪酸以及脂肪酸乙酯的合成,*FAA2*基因可以将外源脂肪酸直接吸收活化为酰辅酶A的形式并运入过氧化物酶体,降解形成乙酰辅酶A。Asano等^[16]报道,敲除*FAA1*基因的清酒酵母可较大幅度地提高己酸乙酯的产量,这是由于*FAA1*基因控制绝大部分长链脂肪酸的吸收,敲除

*FAA1*后,长链脂肪酸活化为长链酰辅酶A的量减少,减轻了对乙酰辅酶A羧化酶的抑制,使得己酸乙酯的生成量有所提高。Faergeman等^[17]研究表明,酿酒酵母对外源长链脂肪酸进行代谢之前,需要先通过酰辅酶A合成酶Faa1p和Faa4p吸收和活化,以及Fat1p转运蛋白的参与。敲除*FAA1*和*FAA4*基因后,酵母酰辅酶A的水平下降了10%。Knoll等^[18]曾报道过酿酒酵母体内的3种酰辅酶A合成酶基因*FAA1*、*FAA2*、*FAA3*,将其编码的蛋白Faa1p、Faa2p、Faa3p分别在缺乏酰辅酶A合成酶的大肠杆菌(*E. coli*)内表达,实验表明Faa1p倾向于利用C12:0—C16:0脂肪酸(12~16个碳的脂肪酸);Faa2p利用范围是C7:0—C17:0脂肪酸;Faa3p倾向利用C16:0和C18:0脂肪酸。研究^[19]表明,通过同时异源表达产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*)的I型脂肪酸合成酶系统过表达*FAA1*,从而提高酰基CoA含量,并在此基础上过表达*WS/DGAT*基因,脂肪酸乙酯的产量提升了6.3倍。由此看出,酰辅酶A合成酶对酿酒酵母中己酸乙酯的生成量有一定影响。

本研究构建了脂肪酸酰辅酶A合成酶基因*FAA1—FAA4*、*FAT1*的敲除和过表达菌株,并根据添加己酸发酵结果构建了*FAA3*敲除同时过表达*FAA4*菌株 $\alpha\delta$ -*FAA4* Δ *FAA3*,旨在增强酿酒酵母利用外源己酸生成己酸乙酯的能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本实验所用的所有菌株和质粒见表1,大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)AY15的单倍体 $\alpha\delta$ 均为天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏。质粒Yep352、pUG6为本实验室保藏。

1.1.2 培养基及培养条件

YEPD培养基(g/L):葡萄糖20,蛋白胨20,酵母浸粉10。

LB培养基(g/L):葡萄糖10,氯化钠10,酵母浸粉5。

以上两种培养基,自然pH,固体培养基加20g/L琼脂,115℃高压灭菌15min。

一级种子液: 糖度为 8 Brix 的玉米水解液, 酵母浸粉 5 g/L.

二级种子液: 糖度为 12 Brix 的玉米水解液, 酵母浸粉 5 g/L.

发酵培养基: 60 g 玉米粉按 1 : 3 (g : mL) 的料水比加水, 70 °C 糊化 20 min, 加 30 μL 淀粉酶, 85 ~ 90 °C 液化 90 min, 加适量营养盐和酸性蛋白酶及 90 μL 糖化酶, 55 ~ 60 °C 糖化 20 min 后待用.

1.1.3 试剂与仪器

淀粉酶(2.9×10^5 U/mL)、糖化酶(1.0×10^5 U/mL)、

限制性内切酶、DNA 连接酶、*rTaq* 聚合酶、RNA 提取试剂盒、质粒精提试剂盒、PCR 纯化回收试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 卡那霉素(*KanMX*), 美国 Merck 公司.

所用仪器主要有 PCT-200 型 PCR 仪、高速离心机、水浴锅、电子天平、DYY-4c 型电泳仪、照胶仪、移液枪、DL 102x 型电热鼓风干燥箱、StepOneplus™ 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪、安捷伦 7890 型气相色谱、安捷伦 1260 型高效液相色谱.

表 1 实验所用质粒和菌株

Tab. 1 Strains and plasmids used in this study

类别	名称	特性
菌株	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 lacU169 (φ80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>
	$\alpha 5$	Haploid yeast strain from AY15
	$\alpha 5 \Delta OPI1$	<i>OPI1 :: loxP-KanMX-loxP</i>
	$\alpha 5 \Delta FAA1$	<i>FAA1 :: loxP-KanMX-loxP</i>
	$\alpha 5 \Delta FAA2$	<i>FAA2 :: loxP-KanMX-loxP</i>
	$\alpha 5 \Delta FAA3$	<i>FAA3 :: loxP-KanMX-loxP</i>
	$\alpha 5 \Delta FAA4$	<i>FAA4 :: loxP-KanMX-loxP</i>
	$\alpha 5 \Delta FAT1$	<i>FAT1 :: loxP-KanMX-loxP</i>
	$\alpha 5$ -FAA1	<i>FAA1 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA1-PGK1t</i>
	$\alpha 5$ -FAA2	<i>FAA2 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA2-PGK1t</i>
	$\alpha 5$ -FAA3	<i>FAA3 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA3-PGK1t</i>
	$\alpha 5$ -FAA4	<i>FAA4 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA4-PGK1t</i>
	$\alpha 5$ -FAT1	<i>FAT1 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAT1-PGK1t,</i>
	$\alpha 5 O$ -FAA1	<i>OPI1 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA1-PGK1t,</i>
	$\alpha 5 O$ -FAA2	<i>OPI1 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA2-PGK1t,</i>
$\alpha 5 O$ -FAA3	<i>OPI1 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA3-PGK1t,</i>	
$\alpha 5 O$ -FAA4	<i>OPI1 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAA4-PGK1t,</i>	
$\alpha 5 O$ -FAT1	<i>OPI1 :: loxP-KanMX-loxP-PGK1p-FAT1-PGK1t,</i>	
质粒	Yep352-PGK1	Ap ^r , containing the PGK1p-PGK1t expression cassette
	pUG6	Kan ^r , <i>loxP-KanMX-loxP</i> cassette
	Yep-PF1	Ap ^r , <i>PGK1p-FAA1-PGK1t</i>
	Yep-PF2	Ap ^r , <i>PGK1p-FAA2-PGK1t</i>
	Yep-PF3	Ap ^r , <i>PGK1p-FAA3-PGK1t</i>
	Yep-PF4	Ap ^r , <i>PGK1p-FAA4-PGK1t</i>
	Yep-PFAT1	Ap ^r , <i>PGK1p-FAT1-PGK1t</i>

1.2 实验方法

本实验采用酵母基因同源重组基因改造方法, 同时结合载体构建技术将相应基因连接到载体 Yep352 上, 然后在酿酒酵母 $\alpha 5$ 基因组的相应位置上做相关基因的敲除和过表达, 并筛选得到重组菌株.

1.2.1 引物

本实验所用引物均通过 Primer 5.0 软件设计获得, 酿酒酵母基因序列均从 NCBI 数据库获得. 引物由金唯智生物科技有限公司合成.

1.2.2 重组质粒 Yep-PF1 的构建

将纯化后的 *FAA1* 片段用 *Bgl* II 酶切连入

Yep352-P, 构建表达载体 Yep-PF1, 构建过程如图 1 所示. 其余几个基因的载体构建与此方法相同.

1.2.3 酵母转化

将准备好的待转片段使用醋酸锂转化法转化到酿酒酵母 $\alpha 5$ 中, 在含 100 μg/mL G418 的 YEPD 平板上涂布, 30 °C 培养 2 d, 然后对平板上的单菌落进行筛选验证.

1.2.4 发酵验证

从斜面上挑取 1 环菌种接种到 5 mL 一级种子液, 30 °C 静置培养 24 h, 再按照 10% 的集中量将一级种子液接种到 45 mL 二级种子液中, 30 °C 静置培养

16~17 h, 再按照 10% 接种量接种到发酵培养基进行发酵, 每隔 12 h 进行 CO₂ 失重测定. 每个样品做 3 个平行样.

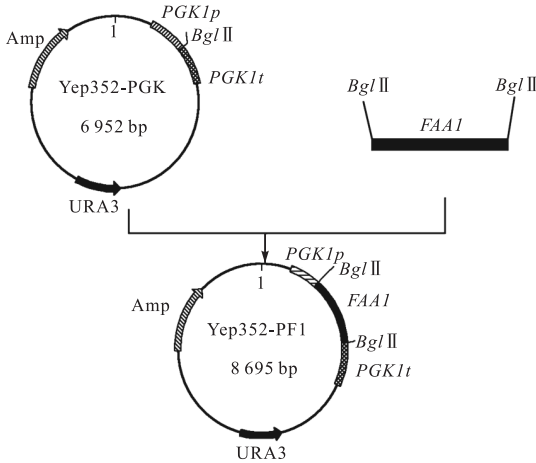


图1 重组质粒 Yep-PF1 的构建
Fig. 1 Construction of plasmid Yep-PF1

1.3 分析方法^[20]

1.3.1 发酵数据测定

每隔 12 h 对发酵样品进行 CO₂ 失重测定, 采用斐林试剂法测定样品中残还原糖的量, 酒精计比重法测发酵完样品酒精度.

1.3.2 己酸乙酯的测定

发酵结束后对发酵液进行蒸馏, 对蒸馏样进行气质联用(GC-MS)分析. 将酒样稀释到体积分数 12%, 取 8 mL 样品于 20 mL 螺口顶空进样瓶, 加入 3 g NaCl 后, 再放入搅拌子, 用封口膜封好. 样品在恒温磁力搅拌器中 60 °C 平衡 10 min, 将萃取头插入瓶内顶空吸附 40 min. 萃取后将萃取头插入 GC-MS 系统进样器, 250 °C 解吸附 5 min. GC-MS 检测条件: 色谱柱为 HP-5MS (60 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 石英毛细管柱; 进样口温度 250 °C; 载气为高纯氮气, 流量 1 mL/min; 起始柱温 40 °C 保持 3 min, 以 9 °C/min 升至 116 °C, 保持 4 min, 再以 9 °C/min 升至 260 °C, 保持 5 min; 不分流进样. 质谱仪条件: 离子源为 EI 源, 离子源温度 230 °C, 电子能量 70 eV, 四极杆温度 150 °C, 接口温度 280 °C, 电子倍增器电压 1 280 V, 扫描范围 *m/z* 为 40~450.

1.3.3 脂肪酸的测定

脂肪酸的测定首先将其衍生化为易挥发的甲酯再用 GC-MS 进行分析. 衍生条件: 取 30 mL 发酵上清液, 加入 6 mL 氯仿-甲醇溶液(体积比为 2:1), 充分振荡 30 s, 4 °C、5 000 g 离心 10 min, 氯仿相氮气

吹干后加入 0.5 mol/L NaOH-CH₃OH 溶液 1 mL, 65 °C 保温 30 min, 室温冷却后加入 BF₃-CH₃OH 溶液 1 mL, 70 °C 保温 2 min 后, 冷却至室温, 加入 1 mL 正己烷振荡萃取, 同时加入适量饱和 NaCl 溶液和无水 Na₂SO₄ 除水, 最后吸取正己烷层过膜后待测^[21]. GC-MS 检测条件: 色谱柱 HP-5MS (60 m × 0.32 mm × 0.25 μm) 石英毛细管柱; 进样口温度为 250 °C; 载气为高纯氮气, 流量 1 mL/min; 柱温起始为 200 °C 保持 0 min, 以 2 °C/min 升至 230 °C, 保持 0 min, 再以 8 °C/min 升至 260 °C, 保持 15 min; 分流比 1:1 进样. 质谱仪条件: 离子源为 EI 源, 离子源温度 230 °C, 电子能量 70 eV, 四极杆温度 150 °C, 接口温度 280 °C, 电子倍增器电压 1 280 V, 扫描范围 *m/z* 为 40~450.

1.3.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

对重组菌株相应基因的表达水平采用实时荧光定量 PCR 测定. 重组菌株用 YPD 液体 30 °C、180 r/min 摇床培养 12 h, 用酵母 RNA 试剂盒提取 mRNA, 以 mRNA 为模板, 采用反转录试剂盒合成互补脱氧核糖核酸(cDNA), 以 cDNA 为模板, 对 *FAA4* 基因进行实时荧光定量 PCR. 实时荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 40 个循环. 以肌动蛋白基因 *ACT1* 为内参基因.

1.4 数据分析

每个样品做 3 个平行样, 应用 SPSS 11.0 和 Origin 8.0 软件对实验数据进行差异显著性分析.

2 结果与讨论

2.1 出发菌的耐己酸实验

由于高浓度的脂肪酸会对酿酒酵母的生长产生抑制, 在不影响酵母生长的条件下, 为确定合适的己酸添加浓度, 进行了出发菌 *α5* 耐己酸实验. 选定在 YEPD 平板中添加不同浓度的己酸, 将 30 °C 过夜摇床培养的酵母菌稀释一定倍数涂布于平板上, 观察长势, 己酸添加量分别为 0%、0.005%、0.01%、0.02%, 结果如图 2 所示. 选定体积比 0.01% 作为己酸添加浓度.

2.2 脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶基因的敲除对己酸乙酯产量的影响

本实验通过用 *loxP-KanMX-loxP* 片段替代了对应的酰基辅酶 A 合成酶基因, 得到对应的敲除菌株 *α5ΔFAA1-4* 和 *α5ΔFAT1*; 通过把对应的过表达盒敲

入到对应的酰基辅酶 A 合成酶基因位点, 得到对应的过表达菌株. 以下以敲除 *FAA2* 为例阐述重组菌株的构建过程. 以酿酒酵母 $\alpha 5$ 基因组为模板, PCR 扩增得到 *FAA2* 基因的上、下游同源臂片段 *FA* (482 bp)、

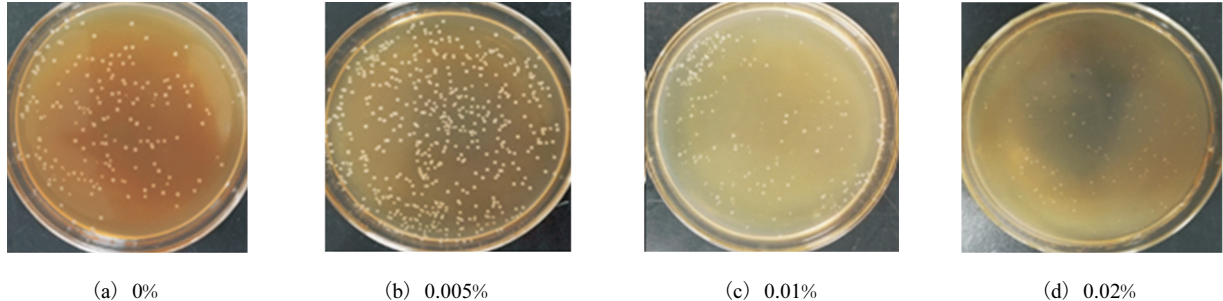


图 2 出发菌 $\alpha 5$ 菌株的耐己酸实验
Fig. 2 Tolerance test of $\alpha 5$ strain to caproic acid

FB (512 bp). 以 pUG6 质粒为模板, PCR 扩增得到 *KanMX* 片段 (1 613 bp). 其电泳结果如图 3 所示, PCR 扩增的特异性条带大小与目标片段大小一致, 结果正确, 扩增产物经 PCR 纯化回收或切胶回收.

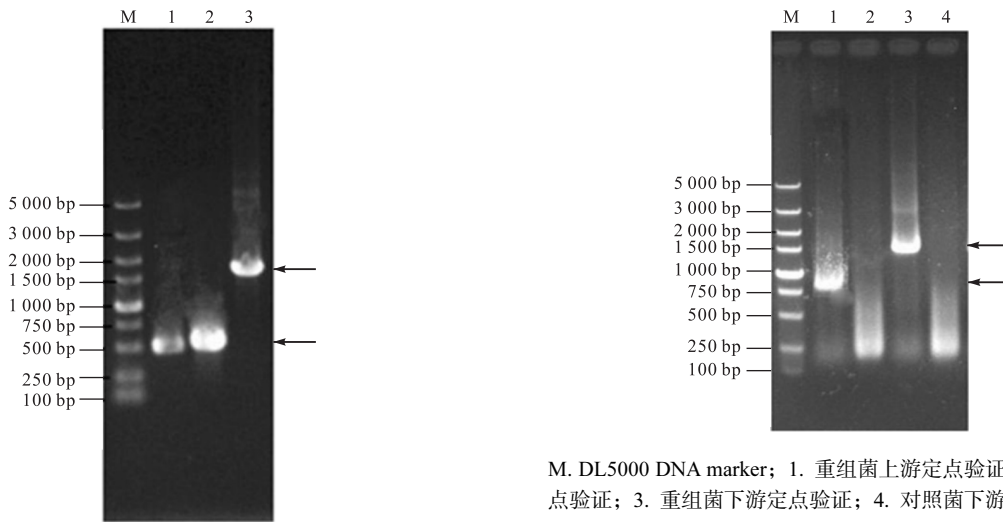


图 3 重组片段 *FA*、*FB*、*KanMX* PCR
Fig. 3 PCR of the recombinant fragment *FA*, *FB*, *KanMX*

在含有 1 000 mg/L G418 抗性的 YEPD 平板上筛选重组突变菌. 在 30 °C 培养的抗性板上挑取转化子进行 PCR 验证. 以出发菌株 $\alpha 5$ 的基因组为阴性对照, *FAA2* 基因缺失菌株基因组为模板, 分别对突变菌的上、下游进行 PCR 定点验证, 结果如图 4 所示. 由图 4 可见: 得到 784 bp 和 1 587 bp 大小的特异性条带, 与预期大小一致. 阴性对照无条带, 说明 *FAA2* 敲除菌株 $\alpha 5\Delta FAA2$ 构建成功.

基因敲除后自身会导致中短链脂肪酸乙酯产量变化, 为排除其对后续添加己酸发酵实验的干扰, 进行了敲除菌株玉米浓醪液态发酵实验作为空白对照, 结果如图 5 所示. 突变株相较于出发菌株的脂肪酸乙酯产量变化都很小 (小于 0.5 mg/L).

图 4 突变株 $\alpha 5\Delta FAA2$ PCR 定点验证
Fig. 4 PCR verification of the mutant strain $\alpha 5\Delta FAA2$

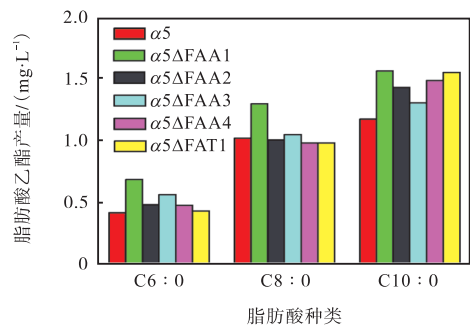


图 5 突变株在不添加己酸时的脂肪酸乙酯产量
Fig. 5 Comparison of fatty acid ethyl ester production without adding caproic acid of mutant strains

添加己酸经玉米醪发酵后检测的中链脂肪酸乙酯 (FAEEs) 和游离脂肪酸 (FFAs) 产量结果如图 6 所示.

从图 6 中可以看出: *FAA3* 基因敲除菌 $\alpha 5\Delta FAA3$

在添加己酸发酵后,己酸乙酯产量相较于出发菌 $\alpha 5$ 提高了 23.8%,产量提高了约 2.6 mg/L. 辛酸乙酯和癸酸乙酯产量也分别提高了 50.0%和 25.5%. 推测 *FAA3* 基因能够将己酸活化为己酰辅酶 A 并送入过氧化物酶体中进行降解,因为在有些可以利用脂肪酸作为碳源的菌中,*Faa3p* 倾向于将 C16:0 和 C18:0 的脂肪酸经过几次的 β 氧化最终变成乙酰 CoA 进入 TCA 循环,因此这个过程也会对比己酰 CoA 产生一定的降解作用,则敲除 *FAA3* 基因有助于提高己酰辅酶 A 的积累. 游离的饱和脂肪酸会显著影响白酒的品质,突变株中中链脂肪酸 C16:0 的产量提高了 67.5%. 这也说明酵母确实有摄入外源脂肪酸的能力,证明了实验的可行性.

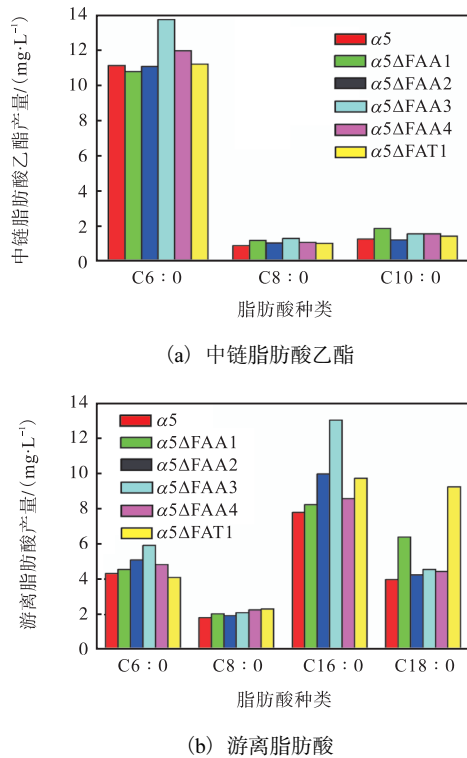


图 6 出发菌和突变株在添加己酸后的中链脂肪酸乙酯和游离脂肪酸的产量

Fig. 6 FAEEs and FFAs yield after adding caproic acid of $\alpha 5$ strain and mutant strains

2.3 脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶基因的过表达对己酸乙酯产量的影响

为了进一步研究各基因对己酸摄入的作用,分别构建了酰基辅酶 A 合成酶基因用 *PGK1* 强启动子在原位点过表达菌株 $\alpha 5$ -*FAA1*— $\alpha 5$ -*FAA4*、 $\alpha 5$ -*FAT1* 和以 *OPI1* 为敲除整合位点的过表达菌株 $\alpha 5O$ -*FAA1*— $\alpha 5O$ -*FAA4*、 $\alpha 5O$ -*FAT1*(其中 *OPI1* 是肌醇负调控基因,敲除 *OPI1* 能够提升风味酯的产量,所以选择此

位点). 玉米浓醪液态发酵空白对照实验结果如图 7 所示.

从图 7(a)中可知:与出发菌 $\alpha 5$ 相比,突变菌 $\alpha 5$ -*FAA1*— $\alpha 5$ -*FAA4*、 $\alpha 5$ -*FAT1* 己酸乙酯等中链脂肪酸乙酯的产量都有一定的浮动,但变化量很小,可忽略不计. 由图 7(b)可知: $\alpha 5O$ -*FAA1* 菌株己酸乙酯有一定的提高,但变化量在 1.0 mg/L 以下,变化量较小.

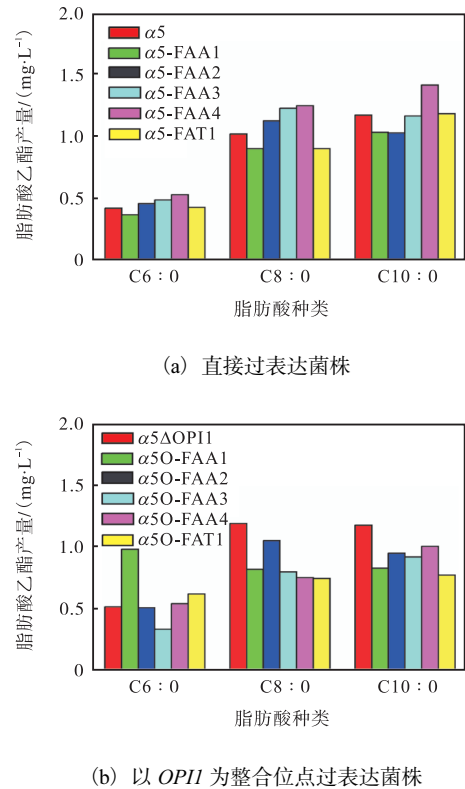
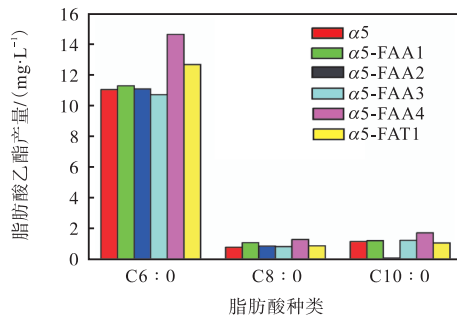


图 7 出发菌和单过表达菌在不添加己酸时的脂肪酸乙酯产量

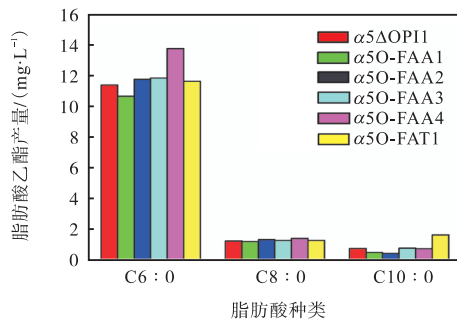
Fig. 7 Fatty acid ethyl esters yield without adding caproic acid of $\alpha 5$ strain and single overexpressing strains

经添加己酸发酵后,己酸乙酯结果如图 8 所示,相较于出发菌 $\alpha 5$,*FAA4* 过表达菌株 $\alpha 5$ -*FAA4* 中己酸乙酯产量提高了 32.1%,增加了约 3.5 mg/L,辛酸乙酯和癸酸乙酯产量也分别提高了 61.5%和 47.9%. $\alpha 5O$ -*FAA4* 中己酸乙酯产量提高了 20.7%,辛酸乙酯也提高了 12.7%. 结果表明 *FAA4* 基因过表达能够较大幅度地提高对己酸的摄入,增加前体己酰辅酶 A 的含量.

游离脂肪酸结果如图 9 所示, $\alpha 5$ -*FAA4* 的长链脂肪酸 C16:0 和 C18:0 的产量分别增加了 174%和 77%; $\alpha 5O$ -*FAA4* 的长链脂肪酸 C16:0 和 C18:0 的产量分别增加了 125%和 86%.



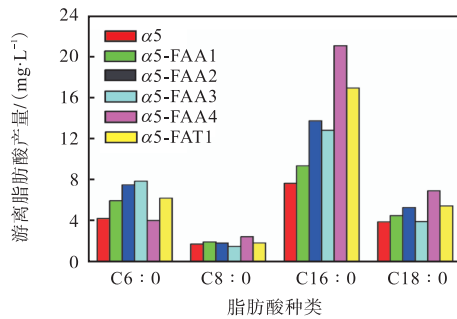
(a) 直接过表达菌株



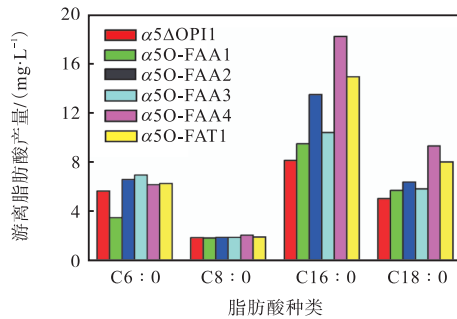
(b) 以 *OPII* 为整合位点过表达菌株

图 8 出发菌和单过表达菌在添加己酸后的脂肪酸乙酯产量

Fig. 8 Fatty acid ethyl esters yield after adding caproic acid of $\alpha 5$ strain and single overexpressing strains



(a) 直接过表达菌株



(b) 以 *OPII* 为整合位点过表达菌株

图 9 出发菌和单过表达菌在添加己酸后的游离脂肪酸产量

Fig. 9 FFAs production after adding caproic acid of $\alpha 5$ strain and single overexpressing strains

2.4 敲除 *FAA3* 同时过表达 *FAA4* 对己酸乙酯产量的影响

为了进一步提高己酸摄入, 增加己酸乙酯生成量, 构建了用 *PGK1* 强启动子过表达 *FAA4* 同时敲除 *FAA3* 的重组菌株 $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3*. 玉米浓醪液态发酵空白对照实验结果如图 10 所示. 相较于出发菌 $\alpha 5$, 重组菌 $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3* 中己酸乙酯、辛酸乙酯和癸酸乙酯都有一定的提升, 但变化量都很小.

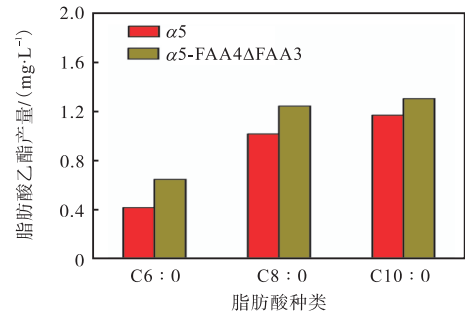
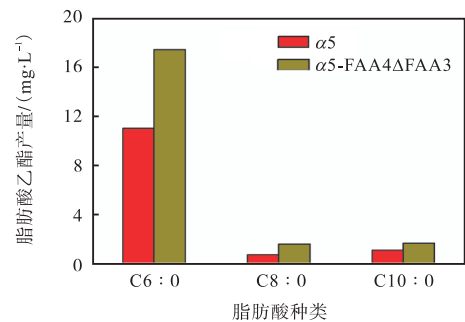


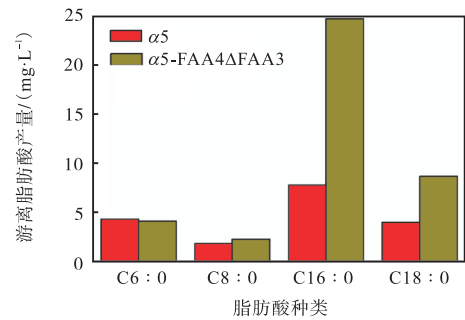
图 10 出发菌和重组菌在不添加己酸时的脂肪酸乙酯产量

Fig. 10 Fatty acid ethyl esters production without adding caproic acid of $\alpha 5$ strain and recombinant strains

经添加己酸发酵后, 中链脂肪酸乙酯和游离脂肪酸结果如图 11 所示.



(a) 脂肪酸乙酯



(b) 游离脂肪酸

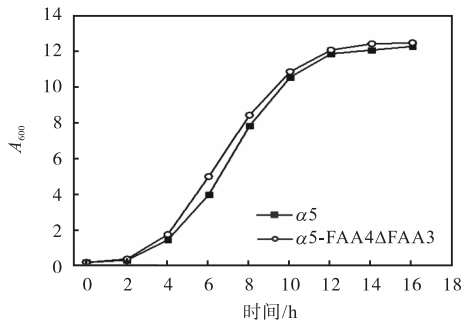
图 11 出发菌和重组菌在添加己酸后的脂肪酸乙酯和游离脂肪酸产量

Fig. 11 Fatty acid ethyl esters and FFAs production after adding caproic acid of $\alpha 5$ strain and recombinant strains

重组菌中己酸乙酯产量达到了 17.34 mg/L, 相比于出发菌 $\alpha 5$ 提高了 57.4%, 辛酸乙酯和癸酸乙酯也分别提高了 106% 和 48%. 其长链脂肪酸 C16:0 和 C18:0 的产量分别提高了 219% 和 119%. 结果表明, 敲除 *FAA3* 和过表达 *FAA4* 能够显著提高己酸摄入, 增加己酸乙酯的生成量.

基于上述结果, 测定了出发菌 $\alpha 5$ 与重组菌 $\alpha 5$ -*FAA4*、 $\alpha 5$ O-*FAA4*、 $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3* 中 *FAA4* 基因的表达水平, 并与其己酸乙酯产量作对比, 结果见表 2.

重组菌株 $\alpha 5$ O-*FAA4*、 $\alpha 5$ -*FAA4* 和 $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3* 的 *FAA4* 基因表达量分别是出发菌株 $\alpha 5$ 的 3.6、9.1 和 10.7 倍; 且随着 *FAA4* 基因表达量的提高, 己酸乙酯产量也有相应的提高. 这证明 *FAA4* 基因过表达能够提高己酸的摄入, 增加己酸乙酯生成量.



(a) 生长速率

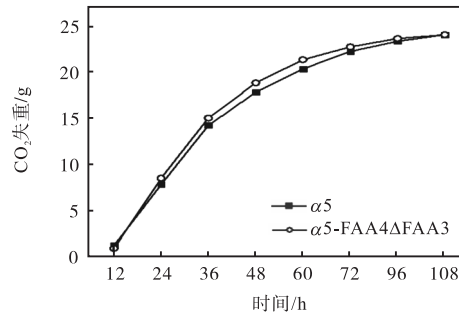
表 2 出发菌和重组菌中的 *FAA4* 基因表达水平和己酸乙酯产量

Tab. 2 *FAA4* gene expression level and ethyl caproate production of $\alpha 5$ strain and recombinant strains

菌株	基因表达水平	己酸乙酯产量/(mg·L ⁻¹)
$\alpha 5$	1.0 ± 0.08	11.02 ± 0.39
$\alpha 5$ O- <i>FAA4</i>	3.6 ± 0.15	13.71 ± 0.40
$\alpha 5$ - <i>FAA4</i>	9.1 ± 0.31	14.56 ± 0.45
$\alpha 5$ - <i>FAA4</i> Δ <i>FAA3</i>	10.7 ± 0.39	17.34 ± 0.50

2.5 重组菌株的发酵性能

进一步测定工程菌 $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3* 在玉米水解液中的生长和发酵性能(生物量、CO₂ 失重、残糖、酒精度), 与 $\alpha 5$ 比较, 评价其生长发酵性能. 如图 12 所示.



(b) CO₂ 失重

图 12 出发菌和重组菌的生长发酵特性

Fig. 12 Growth fermentation characteristics of $\alpha 5$ strain and recombinant strain

$\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3* 与出发菌 $\alpha 5$ 相比, 生长速率相近, 在 14h 达到了稳定期, $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3* 最终生物量略有升高. 重组菌发酵速率也有所提高, 最终 CO₂ 失重量一致. 残糖和酒精度无显著差异(表 3). 综上所述, 重组菌的生长速率、生物量、酒精度及 CO₂ 失重方面的发酵性能相对于出发菌株来说略有提升.

表 3 出发菌和重组菌发酵后的酒精度和残糖

Tab. 3 Alcohol content and residual sugar after fermentation of $\alpha 5$ strain and recombinant strain

菌株	酒精度	残糖/Brix
$\alpha 5$	14.6 ± 0.11	2.57 ± 0.14
$\alpha 5$ - <i>FAA4</i> Δ <i>FAA3</i>	14.8 ± 0.13	2.24 ± 0.16

3 结 语

提高己酸乙酯的含量是中国浓香型白酒的主要研究方向之一, 其中主要有两个途径: 一是提升白酒酵母的产酯能力, 二是在酿造工艺通过添加外源己酸来增加己酸乙酯的含量. 本研究是通过将两种方式

结合, 构建了重组菌 $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3*, 提高了白酒酵母对外源己酸的摄入能力, 进而增加了己酸乙酯合成所需己酰辅酶 A 的量, 从而促进了己酸乙酯的生成. 其中敲除菌株中单敲 *FAA3* 菌株己酸乙酯提高较明显, 过表达菌株中单过表达 *FAA4* 菌株己酸乙酯提高较明显, 进而构建了过表达 *FAA4* 同时敲除 *FAA3* 的重组菌 $\alpha 5$ -*FAA4* Δ *FAA3*, 其己酸乙酯生成量达到了 17.34 mg/L, 相较于原菌 $\alpha 5$ 提高了 57.4%. 能够显著提高酿酒酵母在酒精发酵阶段利用外源己酸生成己酸乙酯的能力.

参考文献:

[1] McGovern P E, Zhang J, Tang J, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(51): 17593-17598.
 [2] Zheng X W, Tabrizi M R, Nout M J R, et al. Daqu: A traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. Journal

- of the Institute of Brewing, 2012, 117(1): 82–90.
- [3] Zhao J S, Zheng J, Zhou R Q, et al. Microbial community structure of pit mud in a Chinese strong aromatic liquor fermentation pit[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2013, 118(4): 356–360.
- [4] Wu X, Zheng X, Han B. Characterization of Chinese liquor starter, “Daqu”, by flavor type with ¹H NMR-based nontargeted analysis[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(23): 11354–11359.
- [5] Chen Y, Luo W, Rui G, et al. Improved ethyl caproate production of Chinese liquor yeast by overexpressing fatty acid synthesis genes with *OPH1* deletion[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(9): 1261–1270.
- [6] Zhang J W, Zhang C Y, Dai L H, et al. Effects of overexpression of the alcohol acetyltransferase-encoding gene *ATF1* and disruption of the esterase-encoding gene *IAH1* on the flavour profiles of Chinese yellow rice wine[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47(12): 2590–2596.
- [7] Yong C P, Shaffer C E H, Bennett G N. Microbial formation of esters[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2009, 85(1): 13–25.
- [8] Ichikawa E, Hosokawa N, Hata Y, et al. Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1991, 55(8): 2153–2154.
- [9] Sofie M G S, Kevin J V, Stijn D M V L, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(7): 4446–4456.
- [10] Mason A B, Dufour J P. Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast[J]. Yeast, 2010, 16(14): 1287–1298.
- [11] Saerens S, Delvaux F, Verstrepen K, et al. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(2): 454–461.
- [12] Black P, Dirusso C. Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation[J]. BBA Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007, 1771(3): 286–298.
- [13] Soupene E, Dinh N P, Siliakus M, et al. Activity of the acyl-CoA synthetase ACSL6 isoforms: Role of the fatty acid Gate-domains[J]. BMC Biochemistry, 2010, 11(1): 1–13.
- [14] Tong F, Black P N, Coleman R A, et al. Fatty acid transport by vectorial acylation in mammals: Roles played by different isoforms of rat long-chain acyl-CoA synthetases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2006, 447(1): 46–52.
- [15] Leber C, Polson B, Fernandez-Moya R, et al. Overproduction and secretion of free fatty acids through disrupted neutral lipid recycle in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 28: 54–62.
- [16] Asano T, Kawadu M, Kurose N, et al. Effect of the *FAA1* gene disruption of sake yeast on the accumulation of ethyl caproate in sake mash[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2000, 89(6): 609–611.
- [17] Faergeman N J, Black P N, Zhao X D, et al. The Acyl-CoA synthetases encoded within *FAA1* and *FAA4* in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(40): 37051–37059.
- [18] Knoll L J, Johnson D R, Gordon J I. Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(23): 16348–16356.
- [19] Xie D, Shao Z, Achkar J, et al. Microbial synthesis of triacetic acid lactone[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 93(4): 727–736.
- [20] 杜永静, 陈叶福, 李洁, 等. *Fas2* 基因过表达对酿酒酵母风味酯生成能力的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(7): 81–88.
- [21] 寇秀颖, 于国萍. 脂肪和脂肪酸甲酯化方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 49–50.