

# 过表达 *EHT1* 基因对酿酒酵母己酸乙酯生产能力的影 响

李锋, 陈叶福, 郭建, 郭学武, 肖冬光

(天津科技大学生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457)

**摘要:** 为了提高酿酒酵母己酸乙酯的产量, 缩短浓香型白酒的发酵周期, 降低生产粮耗。对酿酒酵母醇己酰基转移酶(ethanol hexanoyl transferase I)基因 *EHT1* 进行了过表达, 研究其对酿酒酵母己酸乙酯生产性能的影响。以大肠杆菌-酿酒酵母穿梭质粒 YEp352 为载体, 磷酸甘油酸激酶基因 *PGK1* 启动子为上游调控元件, *KanMX* 抗性基因为筛选标记构建了酵母菌表达质粒 Yep-PEK, 经醋酸锂转化和 G418 抗性筛选鉴定获得过表达 *EHT1* 基因的突变株 AY-PEK。经玉米原料液态白酒发酵后, 实验结果显示突变株的生长速度、发酵速度、酒精度等基本发酵性能没有明显变化, 但己酸乙酯的产量提高为原菌种的 2.21 倍, 辛酸乙酯和癸酸乙酯也分别提高了 31.4%和 49.1%。当加入等量的己酸模仿实际发酵过程中己酸菌提供己酸时, 己酸乙酯的量提高为原菌种的近 3 倍, 总酯也相应的提高了 32.2%。*EHT1* 基因的过表达对提高酿酒酵母产酯性能, 特别是产己酸乙酯有显著作用。

**关键词:** 中国白酒; 酿酒酵母; 己酸乙酯; 醇己酰基转移酶

文章编号: 1673-9078(2014)3-93-98

## Effects of Overexpressed *EHT1* on Ester Production of *Saccharomyces cerevisiae*

LI Feng, CHEN Ye-fu, GUO Jian, GUO Xue-wu, XIAO Dong-guang

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To increase the production of ethyl caproate by Chinese liquor yeast (*S. cerevisiae* AY15), shorten the fermentation period, and reduce the grain consumption, a recombinant strain AY-PEK was constructed by overexpressing *EHT1* (encoding ethanol hexanoyl transferase) to investigate the effect of *EHT1*-overexpression on the performance of ester-producing. The *EHT1* gene was amplified from genomic DNA of AY15, the *PGK1* promoter and resistance gene *KanMX* were orderly inserted into vector Yep352 to construct the expression plasmid Yep-PEK. Then *EHT1*-overexpression mutants AY-PEK were selected by YEPD agar plates containing 1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 after the plasmid Yep-PEK was transformed into AY15. The results showed that after liquid fermentation by corn, the differences in fermentation performances (growth rate, fermentation rate and the yield of alcohol) between AY-PEK and AY15 were negligible. However, the production of ethyl caproate produced by AY-PEK was markedly increased to 2.21-fold as high as that of parental strain AY15. Ethyl octanoate and ethyl decanoate were improved by 31.4% and 49.1%, respectively. The same amount of caproic acid was added to fermentation medium to imitate the actual fermentation, the production of ethyl caproate produced by AY-PEK was increased to nearly 2-fold higher than that of AY15, and the amount of total esters were also increased by 32.2%. Overexpression of *EHT1* gene can significantly enhance the production of ethyl esters, especially ethyl caproate.

**Key words:** Chinese liquor; *Saccharomyces cerevisiae*; ethyl caproate; ethanol hexanoyl transferase

与白兰地、威士忌、朗姆酒、伏特加和金酒并列  
为世界著名六大蒸馏酒的中国白酒, 因酿造原料酒曲

收稿日期: 2013-10-27

基金项目: 长江学者和创新研究团队项目 (IRT1166); 国家自然科学基金项目 (31271916); 天津市科委青年基金资助 (12JQNJC06500)

作者简介: 李锋 (1988-), 男, 硕士, 研究方向: 酿酒酵母的改造和选育

通讯作者: 陈叶福 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程, 微生物与生化药学

种类<sup>[1]</sup>、生产工艺以及自然环境等因素的不同, 形成了具有不同特色和风格的各种香型的白酒。目前共形成了以浓香型、清香型、酱香型、米香型四大香型为主的 12 种香型。其中, 以己酸乙酯为主体香的浓香型白酒, 是我国生产量和消费量最大的白酒, 占白酒总产量的近 70%<sup>[2]</sup>。酵母菌对白酒中己酸乙酯的生物合成起着一定作用, 但酵母菌能否大量分泌己酸乙酯或酯化己酸和乙醇合成己酸乙酯, 是一个长期困扰我国

白酒界的问题<sup>[3]</sup>。

在传统的固态浓香型白酒发酵过程中,白酒中己酸乙酯主要由窖泥中己酸菌产生的己酸和酵母产生的乙醇经酯化菌反应合成<sup>[4]</sup>。然而据栗山一秀等<sup>[5]</sup>推测酵母自身也可经过酰基转移酶途径和酯化途径生成少量的己酸乙酯,即由酯酶催化己酸和乙醇合成己酸乙酯和由酰基 CoA 转移酶(AACTase)催化己酰 CoA 和乙醇合成己酸乙酯。Saerens 等<sup>[6]</sup>报道了酿酒酵母的三成员基因家族(YBR177c/EHT1, YPL095c/EEB1 和 YMR210w),该家族的两成员(EHT1 和 EEB1)被证明编码醇酰基转移酶,是酵母中链脂肪酸酯合成的关键基因,催化中链酰基辅酶 A 和乙醇合成中链脂肪酸酯。Lily 等<sup>[7]</sup>报道了在葡萄酒酵母中过量表达 EHT1 基因可提高己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯等酯类的产量。

工业上为了增加酒香,通常会采取添加己酸菌液<sup>[8]</sup>和生香酵母、延长发酵时间和增加窖藏陈酿时间来增加己酸乙酯等酯香物质的含量,然而延长发酵时间不仅增加粮耗,也带来了糠臭味、涩味、酸味等异味物质对白酒品质的影响<sup>[9]</sup>。因此,研究和选育高产己酸乙酯的酿酒酵母,实现其在白酒主发酵期内高产酒精的同时高产己酸乙酯,缩短其生产周期具有重大的现实意义。本研究以 Yep352 为基础质粒,酿酒酵母醇酰基转移酶基因 EHT1 为目的基因,磷酸甘油酸激酶基因 PGK1 启动子为上游调控元件构建了酵母菌表达质粒 Yep-PEK,在工业白酒酵母 AY15 中成功转化和表达,通过对突变株基本发酵性能和产物含量测定,获得具有高产酯能力的酿酒酵母菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

酿酒酵母(*S. cerevisiae*) AY-15、单倍体 a8 和  $\alpha$ 5,大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、游离表达质粒 Yep352、质粒 pUG6 和携有酿酒酵母磷酸甘油酸激酶基因(PGK1)强启动子的质粒均为本实验室保藏。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、SolutionI 连接酶和 TaqDNA 聚合酶,购自与宝生物工程有限公司;氨苄青霉素(Amp),购自 Amreco 公司;遗传霉素(G418),购自 Merck 公司;糖化酶、液化酶和酸性蛋白酶,购自于 Novozymes 公司;PCR 仪,购自 Biometra 公司;AgilentGC7890 型气相色谱仪、Agilent 5975C 质谱仪,购自安捷伦科技有限公司。

#### 1.1.3 培养基和培养条件

*E. coli*DH5 $\alpha$  保存和培养采用 LB 培养基,突变株筛选时添加终浓度为 100 mg/L 的 Amp, 37 °C 静置培养; *S. cerevisiae* 双倍体菌株 AY15 和单倍体菌株 a8 和  $\alpha$ 5 用 YEPD 培养基保存培养,突变株用含有终浓度 1400  $\mu$ g/mL G418 的培养基进行筛选鉴定, 30 °C 静置培养;一级种子培养基和二级种子培养基分别由浓度为 12°Brix 和 8°Brix 的玉米水解液加 0.5% (m/V) 的酵母浸粉构成;发酵培养基由 60g 玉米粉按 1:3 的料水比加水 70 °C 糊化 20 min、85~90 °C 加 30  $\mu$ L 淀粉酶液化 90 min、55~60 °C 加适量营养盐和酸性蛋白酶及 90  $\mu$ L 糖化酶糖化 20 min 后制得。

#### 1.1.4 引物

根据 GenBank 中 PGK1、EHT1 基因的核苷酸序列,利用 Primer5.0 设计 PCR 反应引物(表 1)。所有引物均有北京华大基因有限公司合成,酶切位点以下划线表示。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers

引物	碱基序列(5'→3')	大小/bp	酶切位点
EHT1-U	CCCCTCGAGATGTCAGAAGTTTCCAAATG	29	XhoI
EHT1-D	CCCCTCGAGTCATACGACTAATTCATCAA	29	XhoI
PGK-U	GGAAAGCTTTCTAACTGATCTATCCAAAA	29	BamHI
PGK-D	GGAAAGCTTTAACGAACGCAGAAATTTTCG	29	PstI
K-U	CGGGGTACCCAGCTGAAGCTTCGTACGCT	29	SphI
K-D	CGCGGATCCGCATAGGCCACTAGTGGATC	29	SphI
EHT1-F	AAGACGAGAAGGCGACAC	-	
EHT1-R	CCACTGCGAGACAGGTTT	-	
ACT1-F	CGTCTGGATTGGTGGTTCTA	-	
ACT1-R	GTGGTGAACGATAGATGGAC	-	

### 1.2 生长曲线的测定

取斜面菌种 1 环至接入 50 mL YEPD 液体培养基中, 30 °C 200 r/min 培养 24 h。按照 10%的接种量接

入新的 100 mL YEPD 新液体培养基中，每隔 1 h 取出 1 mL 菌液，3000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 10 mL 蒸馏水重悬，以蒸馏水为空白，600 nm 下测吸光度。以培养时间为横坐标，OD<sub>600</sub> 为纵坐标，绘制生长曲线。

### 1.3 酿酒工艺

从 4 °C 保藏的固体斜面取 1 环菌种接入装有 4 mL 一级种子的培养基中，30 °C 静置培养至稳定期后。全部转入装有 36 mL 二级种子培养基中。30 °C 静置培养 16 h，至对数后期按 10% 的比例接种到以配制好的发酵培养基中。静置发酵 15 d，每隔 12 h 称重一次，发酵结束后测定累积 CO<sub>2</sub> 失重、酒精度、残糖及酯类含量。

### 1.4 DNA 操作技术

#### 1.4.1 PCR 反应

目的基因的 PCR 反应条件为：94 °C 4 min，94 °C 40 s，64 °C 2 min，72 °C 1.5 min，30 个循环，72 °C 10 min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

#### 1.4.2 表达质粒 Yep-PEK 的构建

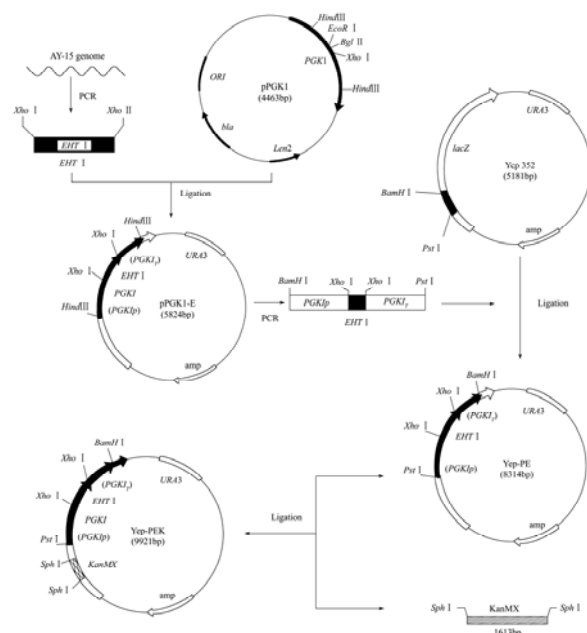


图 1 质粒 Yep-PEK 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid Yep-PEK

将纯化过的 EHT1 片段用 XhoI 酶切连入 pUC-PGK，构建表达质粒 pUC-PGKE，以 pUC-PGKE 为模板 PCR 扩增获得 PGKE 片段，将纯化的 PGKE 片段用 PstI 和 BamHI 双酶切连入 YEP352 质粒，构建质粒 Yep-PE。以 pUG6 质粒为模板 PCR 扩增得出 KanMX，将 KanMX 片段用 SphI 单酶切连入 Yep-PE。构建表达质

粒 Yep-PEK。构建过程详见图 1。

### 1.5 醋酸锂转化<sup>[10]</sup>与突变株鉴定

将构建好的 Yep-PEK 直接醋酸锂转化入酵母细胞 AY15 中。转化后的细胞涂布于含有 1400 μg/mL G418 的 YEPD 培养基进行筛选，PCR 验证。

### 1.6 突变株的遗传稳定性实验

用传代的方法考察随机挑取的突变株的遗传稳定性，将突变株在斜面上反复传代 15 代，并取 1、5、10、15 带进行 PCR 验证。

### 1.7 实时定量 PCR

基因 EHT1 的表达水平采用实时定量 PCR (RT-PCR) 测定。突变株 AY-PEK 在 YEPD 中 30 °C 培养 12 h 后。经离心和无菌蒸馏水洗涤三次后，用酵母 RNA 试剂盒(Omega, 美国)提取 mRNA，取纯化的 RNA 各 500 ng，用 Rever TraAce® qPCR RT Kit 反转录试剂盒 (Toyobo 公司, 日本) 合成 cDNA 作模板，保存于 -20 °C。按文献方法<sup>[11]</sup>，实时荧光定量 PCR 反应总体积 25 μL，包括 12.5 μL SYBR® Green Real-time PCR Master Mix (Toyobo 公司, 日本)，500 nM 正、反向引物各 1.25 μL。PCR 程序：95 °C 预变性 1 min；PCR 反应条件：95 °C 15 s，58 °C 15 s，72 °C 45 s，50 个循环。以肌动蛋白基因 (ACT1) 为内参基因，合成引物 EHT1-F/EHT1-R 和 ACT1-F/ACT1-F 见表 1)。PCR 反应及数据采集在 ABI Prism7500 Sequence Detection System 系统上进行。

### 1.8 分析方法

#### 1.8.1 CO<sub>2</sub> 失重、还原糖、酒精度、总酸、总酯测定<sup>[12]</sup>

分别采用称重法、斐林试剂法、酒精计比重法、酸碱滴定和皂化反应。根据国标，将产生的白酒折合成 65° 标准白酒的量，按式下式计算原料出酒率。

$$\text{原料出酒率} = \frac{65^\circ \text{标准白酒的产量}(kg)}{\text{原料消耗量}(kg)} \times 100\%$$

#### 1.8.2 高级醇和酯的测定

##### (1) 顶空固相微萃取<sup>[13]</sup>

取 8 mL 酒样和 3 g NaCl 加入到 20 mL 顶空萃取瓶，50 °C 水浴平衡 15 min，插入装有 50/30 μm PDMS/DVB 萃取头的手动进样器，吸附 45 min 后，取出萃取头插入色谱进样口中 250 °C 解析 5 min。

##### (2) 气相色谱法和气相质谱法

根据利用气相色谱检测白酒的相关文献<sup>[14]</sup>，设定

气相色谱仪条件：色谱柱 Agilent1909N-213，30 m×320×0.5 μm 毛细管柱；进样口温度 230 °C；检测器温度 230 °C；载气流速 2.0 mL/min；氢气流速 30 mL/min；空气流速 400 mL/min；尾吹速度 25 mL/min；分流比 10:1；进样量 1 μL。

根据利用顶空固相微萃取法和气相质谱检测白酒中挥发性物质的文献<sup>[15]</sup>，设定气相色谱仪的条件 GC 条件：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，纯度>99.999%，流速 1 mL/min；柱温起始为 40 °C，保持 3 min，以 3 °C/min 升至 160 °C，保持 1 min，再以 5 °C/min 升至 240 °C，保持 1 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 1280 V，扫描范围 m/z 为 40~450 u。

### 1.9 数据分析

每组实验做三个平行，并使用 SPSS11.0 和 EXCEL2013 软件对实验数据进行差异显著性检验分析 (ANOVA)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 突变株的构建与鉴定

#### 2.1.1 表达质粒 Yep-PEK 的构建

使用 1.4 的方法，构建表达质粒 Yep-PEK。图 2 的 PCR 结果表明，Yep-PEK 质粒已成功构建，并且 PGK1 强启动子、终止子的方向与 EHT1 基因一致 (5、6 泳道)。

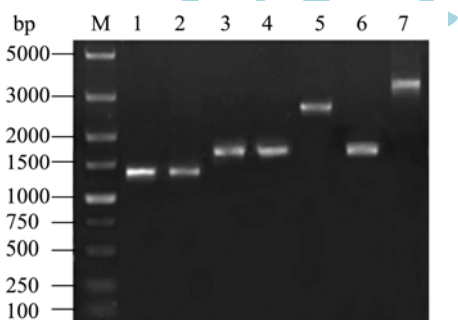


图 2 质粒 Yep-PEK 的构建和验证

Fig.2 The construction of plasmid Yep-PEK

注：M：5000 bp DNA marker；1-2：基因组和 Yep-PEK 上扩增得 EHT1(1356 bp)；3-4：pUG6 和 Yep-PEK 上 PCR 扩增得 KanMX(1613 bp)；5-7：Yep-PEK 上扩增得 PGK1<sub>p</sub>+EHT1 (2682 bp)、EHT1+PGK1<sub>T</sub>(1627 bp)、PGK1<sub>T</sub>+EHT1+PGK1<sub>T</sub>(3133 bp)。

#### 2.1.2 过表达 EHT1 的突变株 AY-PEK 的构建

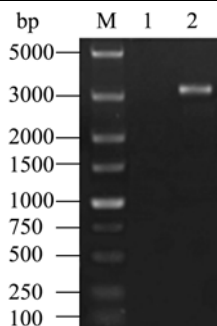


图 3 突变株的验证

Fig.3 The verification of transformant

注：M：5000 bp DNA marker；1：阴性对照；2：AY-PEK 上 PCR 扩增得 PGK1<sub>p</sub>+EHT1+PGK1<sub>T</sub> (3133 bp)。

将表达质粒 Yep-PEK 化转入 AY15 中，用含有 1400 μg/mL G418 的抗性平板筛选阳性突变株 AY-PEK。提取酵母质粒后以引物 PGK 的上下游引物 PGK-U/ PGK-D 验证 AY-PEK 突变株，原菌 AY15 为阴性对照，电泳图结果如图 3 所示，AY-PEK 突变株获得一条 3133 bp 的“PGK1<sub>p</sub>+EHT1+PGK1<sub>T</sub>”扩增片段，而阴性对照无此条带，结果证明 AY-PEK 突变株确含有 Yep-PEK 表达质粒。

#### 2.1.3 突变株遗传稳定性实验结果

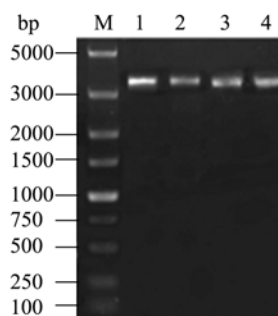


图 4 突变株 AY-PEK 遗传稳定性验证

Fig.4 Genetic stability of passage strain from transformant AY-PEK

注：M：5000 bp DNA marker；1-4：突变株的 1、5、10、15 代 AY-PEK 上 PCR 扩增得 PGK1<sub>p</sub>+EHT1+PGK1<sub>T</sub> (3133 bp)。

由图 4 可知，分别对第 1、5、10、15 代 AY-PEK 酵母突变株提取质粒，以 PGK-U 和 PGK-D 为引物，均可扩增出 3500 bp 左右的片段，该片段与预期的目的产物“PGK1<sub>T</sub>+EHT1+PGK1<sub>T</sub>”片段大小一样。即随机挑取的突变菌株连续传代 15 代之后遗传性能稳定。1~4 道分别为突变株的 1、5、10、15 代的 PCR 条带。

### 2.2 出发菌株与突变菌株的生长曲线测定

按照方法 1.2 对出发菌株 AY-15 和突变株 AY-PEK 生长曲线进行测定。从图 5 可以看出，与出发菌株 AY-15 相比，AY-PEK 延滞期稍长，而稳定期的生物

量和整体生长趋势与出发菌株基本保持一致，结果表明突变株生长没受到影响。

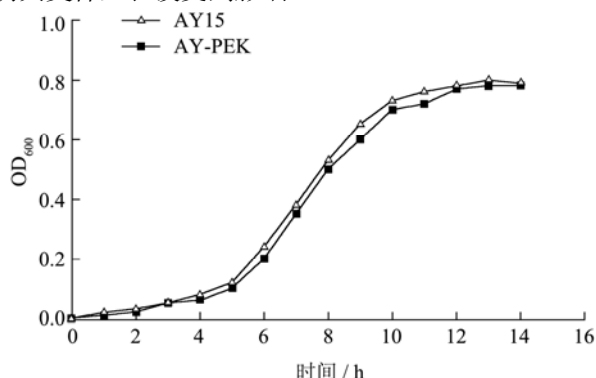


图5 AY-15 和 AY-PEK 的生长曲线比较

Fig.5 Growth curve of AY15 and AY-PEK

### 2.3 出发菌株与突变菌株的发酵性能比较

表2 AY-15 和 AY-PEK 的发酵性能比较

Table 2 The comparison of the fermentation performance between AY15 and AY-PEK

菌株	CO <sub>2</sub> 失重/g	酒精度/(%,V/V)	残糖/(10 <sup>-2</sup> g/mL)	原料出酒率/%
AY-15	24.4±0.12	11.7±0.1	0.160±0.03	31.32±0.26
AY-PEK	24.2±0.08	11.4±0.2	0.162±0.02	30.50±0.26

将亲本 AY15 与突变株 AY-PEK 同时进行玉米液态白酒发酵。发酵结束后测定各菌株的基本发酵性能，由表 2 可知，过表达 EHT1 基因突变株菌株与出发菌株在相同条件下 CO<sub>2</sub> 失重、残糖等主要发酵性能没有明显变化，而酒精度稍有变化但不是很明显，表明高表达 EHT1 基因对菌种的发酵性能没有太大影响。其中酒精度的变化可能由于己酸乙酯的量增加，用于合成己酸乙酯的底物乙醇消耗增加导致。

### 2.4 突变株与亲本高级醇和酯生成量测定

将亲本 AY15 与突变株为 AY-PEK 分别进行玉米液态白酒发酵。发酵结束后，对发酵醪进行蒸馏，获得的酒样经过顶空萃取和吸附后，用 GC-MS 检测分析酒样中的中链脂肪酸酯（己酸乙酯、辛酸乙酯和癸酸乙酯）含量。由图 6 可看出，己酸乙酯的含量提高到了 1.72 mg/L，提高为原菌的 AY15 的 2.12 倍，辛酸乙酯和癸酸乙酯含量为 0.93 mg/L 和 0.63 mg/L，分别提高了 31.4%和 49.1%，结果差异显著 (P<0.05)。实验结果支持了 Lily 等<sup>[7]</sup>在葡萄酒酵母中表达 EHT1 基因可以显著提高己酸乙酯含量的结论。过表达 EHT1 基因可能使醇己酰基转移酶的表达量得到增加，从而提高酶活加快了己酰辅酶 A 和乙醇反应生产己酸乙酯的速度，提高了己酸乙酯的产量。Saerens

等<sup>[6]</sup>报道在实验室菌株中表达 EHT1 并没有提高中链脂肪酸酯的量，这个差异可能和菌种的遗传背景和所使用的发酵培养基有关。

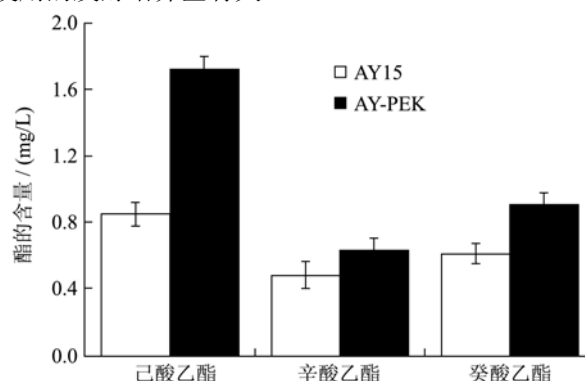


图6 AY-15 和 AY-PEK 的中链脂肪酸酯产量的比较

Fig.6 The comparison of medium-chain fatty acid ethyl esters between AY15 and AY-PEK

表3 AY-15 和 AY-PEK 的高级醇和酯产量比较(mg/L)

Table 3 The production of higher alcohols and esters between AY15 and AY-PEK

菌株	正丙醇	异丁醇	异戊醇	乙酸乙酯	己酸乙酯	总酸	总酯
AY-15	54.23	76.23	219.36	67.73	10.49	76.82	124.22
AY-PEK	53.72	75.91	220.33	65.38	29.09	77.96	164.34

己酸作为己酸乙酯合成的重要前体物质，是限制己酸乙酯的合成速度主要因素。为了模仿实际白酒酿造过程中窖泥中的己酸菌所提供的己酸，本实验在接种发酵 12 h 后向原菌和突变株同时添加体积比为 0.01%的等量 (23.25 mg/L) 前体物己酸。发酵结束后，对发酵醪进行蒸馏后，用 GC 分析检测酒样中的，高级醇和己酸乙酯含量。由表 3 可知，正丙醇、异丁醇、异戊醇等高级醇含量没有明显变化，而相比于乙酸乙酯含量的不变，突变株的己酸乙酯和总酯含量较出发菌都有显著地提高，其中己酸乙酯产量由 10.49 mg/L 提高到了 29.09 mg/L，提高了近 3 倍，总酯含量也提高了 32.2%，结果差异极显著 (P<0.01)。己酸乙酯产量的增加可以归结于加入己酸后，在脂肪酸活化酶的作用下，己酸被转化成己酰辅酶 A，相应地增加了己酰辅酶 A 的量，再经过酵母己酰基辅酶 A 酶转移途径，己酸乙酯的产量便得到了显著提高了。而加入己酸后，原菌和突变株的己酸乙酯含量都得到提高，可能是在酵母酯化酶的作用下，己酸直接和乙醇发生酯化反应直接生成己酸乙酯所致。

### 2.5 RT-PCR 结果

为进一步验证基因 EHT1 的成功表达，按照方法 1.7 对 AY-15 和 AY-PEK 的转录水平进行 RT-PCR 测

定。从图 7 可以看出,与 AY-15 相比突变株 AY-PEK 的转录水平比原菌提高了 0.82 倍,结果差异显著 ( $P < 0.05$ )。实验结果表明过表达 EHT1 基因后,导致了其转录水平的提高,从而可能导致酶表达量的提高,促进了酵母菌通过酰基辅酶 A 途径合成己酸乙酯。RT-PCR 结果的从转录水平解释了过表达基因 EHT1 导致了己酸乙酯产量的提高的原因。

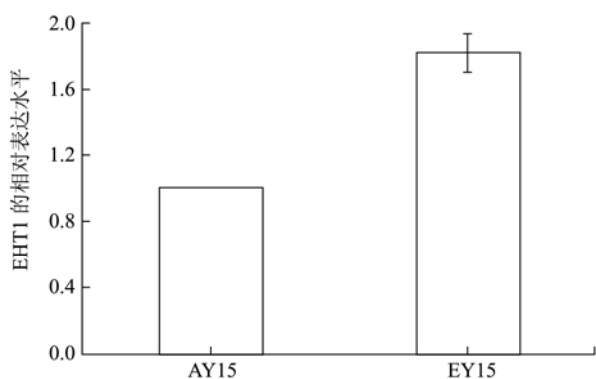


图 7 AY-15 和 AY-PEK 的中 EHT1 基因相对表达水平的比较

Fig.7 The comparison of relative expression level of EHT1 between AY15 and AY-PEK

### 3 结论

3.1 己酸乙酯是浓香型白酒的主体香,提高酿酒酵母己酸乙酯的产量不仅可以提高白酒中的香味而且可以缩短白酒的发酵周期同时减少粮耗。本实验通过构建得到 Yep-PEK 表达质粒,转化筛选得到高表达 EHT1 的突变株 AY-PEK,玉米原料液态白酒发酵结果显示:过表达 EHT1 后己酸乙酯的含量得到了显著地提高,突变株 AY-PEK 的己酸乙酯产量提高为原菌的 2.12 倍。此外,辛酸乙酯和癸酸乙酯也分别提高了 31.4% 和 49.1%。RT-PCR 结果显示突变株 AY-PEK 的 EHT1 基因转录水平比原菌提高了 0.82 倍,从转录水平解释了己酸乙酯产量提高的原因。当模仿实际白酒酿造过程同时向原菌 AY-15 和突变株 AY-PEK 的发酵培养基中添加适量己酸时,突变株的己酸乙酯产量提高到 29.09 mg/L,提高为原菌的近 3 倍,而且总酯的含量也得到了相应提高。正丙醇、异丁醇、异戊醇和乙酸乙酯等高级醇含量没有太大变化。除酒度稍有降低外 (0.3%左右),CO<sub>2</sub> 失重和残糖量等发酵性能几乎没有变化。

3.2 本实验获得的白酒酵母突变株在适量高产己酸乙酯的同时也保持了酿酒酵母的优良酒精发酵特性,使得酿酒酵母在高产酒精的同时也高产己酸乙酯,单位时间里的产酯量增加,从而达到缩短了发酵周期减少生产粮耗的目的。本实验通过过表达 EHT1 基因也为将来浓香型白酒生产技术的革新提供了一种新型酵

母菌,通过培养高产酯酿酒酵母来替代提供产酯和产酸微生物的窖泥,保持酒体香气的同时,也为减少窖泥中微生物产生的土臭素等异味物质提供了可能。

### 参考文献

- [1] Zheng X W, Tabrizi M R, Nout M J, et al. Daqu-A Traditional Chinese Liquor Fermentation Starter [J]. Journal of the Institute of Brewing, 2011, 117(1): 82-90
- [2] 赵爽,杨春霞,窦岫,等.白酒生产中酿酒微生物研究进展[J].中国酿造,2012,31(4):5-10  
ZHAO S, YANG C X, DOU S, et al. Research Advance about Microbes in Chinese Liquor Production [J]. China Brewing, 2012, 31(4): 5-10
- [3] 赵华,赵树欣,李颖究,等.酵母菌己酸乙酯生物合成与代谢控制育种[J].酿酒科技,1998,4:24-25  
ZHAO H, ZHAO S X, LI Y X, et al. Biosynthesis and Metabolic Control Breeding of Ethyl Caproate-Producing Yeast [J]. Liquor-Making Science & Technology, 1998, 4: 24-25
- [4] 沈怡方.白酒中四大乙酯在酿造发酵中形成的探讨[J].酿酒科技,2003,(5):28-31  
SHEN Y F. Study on the Formation Mechanism of Four Main Kinds of Ethyl Esters in the Fermentation of Liquors [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2003,(5): 28-31
- [5] 李大和,刘念,李国红.浓香型大曲酒酿造中酯化菌研究的现状与展望[J].酿酒科技,2008,2:92-98  
LI D H, LIU N, LI G H. Present Research Situation & Prospect of the Application of Esterifying Bacteria in the Production of Luzhou-flavor Daqu [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2008, 2: 92-98
- [6] Saerens S M G, Verstrepen K J, Van Laere S D M, 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
- [7] Lilly M, Bauer F F, Lambrechts M G, et al. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates [J]. Yeast, 2006, 23(9): 641-659
- [8] 顾国贤,谢国银.对浓香型大曲酒中主体香-己酸乙酯的几点思考[J].无锡轻工业学报,1993,12(2):166-171  
GU G X, XIE G Y. Some thinking about the main flavoring -ethyl caproate in Luzhou-flavor Daqu [J]. Journal of The WuXi Institute of Light Industry, 1993, 12(2): 166-171
- [9] 路虎,杜海,徐岩.中国白酒固态发酵及蒸馏过程中糠臭味

- 物质变化规律的研究[J].酿酒科技,2012,(8):29-32
- LU H, DU H, XU Y. Study on the Change Rules of Earthy-musty Odorants in Solid Fermentation and Distillation Process of Chinese Liquor [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2012, (8): 29-32
- [10] Gietz R D, Woods R A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method [M]//Yeast Protocol. Humana Press, 2006,107-120
- [11] Saerens S M G, Delvaux F, Verstrepen K J, et al. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74(2): 454-461
- [12] 王福荣. 酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2005  
WANG F R. *Brewing analysis and detection* [M].Beijing: chemical industry press, 2005
- [13] Luo T, Fan W, Xu Y. Characterization of Volatile and Semi - Volatile Compounds in Chinese Rice Wines by Headspace Solid Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography - Mass Spectrometry [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2008, 114(2): 172-179
- [14] Zhang J W, Zhang C Y, Dai L, 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
- [15] Mo X, Fan W, Xu Y. Changes in volatile compounds of Chinese rice wine wheat Qu during fermentation and storage [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2009, 115(4): 300-307