

FAS2 基因过表达对酿酒酵母风味酯生成能力的影响

杜永静, 陈叶福, 李洁, 何亚辉, 龚瑞, 郭学武, 肖冬光

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 研究了共表达脂肪酸合成酶复合体中 α 亚基的编码基因 FAS2 和 β 亚基的编码基因 FAS1 对酿酒酵母产风味酯的影响。前期实验室构建的过表达 FAS1 基因的菌株 α 5F-FAS1 和 α 5O-FAS1 可以提高酿酒酵母中链脂肪酸乙酯的含量, 本研究以这两株菌为出发菌株过表达 FAS2 基因, 相比较 α 5F-FAS1 菌株, 己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯分别提升了 154.31%, 65.22% 和 23.53%; 相比较 α 5O-FAS1 菌株, 己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、十二酸乙酯分别提升了 17.34%, 30.71%, 27.12% 和 28.13%。结果显示共表达 FAS1 和 FAS2 基因可以更进一步的提升酿酒酵母中链脂肪酸乙酯的产量。同时, 本研究还发现, 过表达 FAS1 可以提高乙酸乙酯的生成量。为了探究本现象产生的初步机理, 通过 RT-PCR 测定了合成与利用乙酰辅酶 A 相关基因的表达量, 实验结果表明, 过表达 FAS1 导致的乙酸乙酯生成量上升的现象主要是由于过表达 FAS1 使得 ATF1 的表达量上升造成的。

关键词: 酿酒酵母; 脂肪酸合成酶; 中链脂肪酸乙酯; 乙酸乙酯

文章编号: 1673-9078(2018)07-81-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.013

Effect of FAS2 Gene Overexpression on the Production of Flavor-active Esters in *Saccharomyces cerevisiae*

DU Yong-jing, CHEN Ye-fu, LI Jie, HE Ya-hui, GONG Rui, GUO Xue-wu, XIAO Dong-guang

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

Abstract: The effects of fatty acid synthase 1 gene (FAS1) and fatty acid synthase 2 gene FAS2 overexpression on medium chain fatty acid ethyl esters (MCFAEs) in *Saccharomyces cerevisiae* were investigated. Previous experiment showed that FAS1 gene-expression strains, α 5F-FAS1 and α 5O-FAS1, could improve the production of MCFAEs in *S. cerevisiae*. The 154.31% and 65.22% improvement of ethyl caproate and ethyl octanoate production and 23.53% increase of ethyl caproate accumulation were observed in the Co-overexpression of FAS1 and FAS2 with FAA1 deletion engineered strain FF1F2 compared to strains α 5F-FAS1. Consistent with this effect, the Co-overexpression strain OF1F2 achieved 17.34%, 30.71% and 27.12% increase of the three substances mentioned above and 28.13% improvement of ethyl dodecanoate, respectively, compared to strains α 5O-FAS1. The results showed that FAS1 and FAS2 gene co-overexpression could further enhance the yield of MCFAEs in *S. cerevisiae*. At the same time, we also found that overexpression of FAS1 gene can improve the production of ethyl acetate. To explore the preliminary mechanism of this phenomenon, the relative expression level of Acetyl-CoA related genes was measured by RT-PCR. The results showed that the increase in the amount of ethyl acetate produced by FAS1 overexpression is mainly attributed to the up-regulation of ATF1 gene expression.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; fatty acid synthase; medium chain fatty acid ethyl ester; ethyl acetate

白酒是我国特有的蒸馏酒, 在人们的日常生活中占有重要地位, 酯类作为白酒中含量最多的香味成分之一, 种类较多, 是白酒香气的物质基础, 对白酒的风味和香型起着关键性作用。适量的酯可使酒体丰满,

收稿日期: 2018-01-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31671843); 中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目 (2017JJ003)

作者简介: 杜永静 (1990-), 女, 硕士, 研究方向: 现代酿造技术

通讯作者: 陈叶福 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酵母代谢工程、

现代酿造技术和生物质资源开发与利用方面的研究工作

香味协调, 给饮酒者带来喜悦感。白酒中酯类主要分为两大类, 乙酸酯类和脂肪酸乙基酯类。乙酸酯类主要包括: 乙酸乙酯、乙酸异戊酯和乙酸异丁酯等, 在各种香型白酒中含量均较高, 对白酒风味贡献比较大, 其中乙酸乙酯是清香型、芝麻香型等多种香型白酒的主体香; 乙基酯主要有丁酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯和癸酸乙酯等^[1]。我国名优白酒中以含乙酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯和乳酸乙酯四大酯为主, 其和占总酯含量的 80% 以上, 含量多少与白酒香型相关^[2]。

以己酸乙酯为主体香成分的浓香型白酒, 是我国

产量和消费量最大的白酒。己酸乙酯是浓香型白酒的主体香，然而酿酒酵母自身虽然具有极强的酒精发酵效率，但其产酯能力极低。在酵母发酵过程中，代谢产物己酸乙酯含量很少，一般在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右。能否让酿酒酵母大量合成和分泌己酸乙酯，是一个长期困扰我国白酒界的问题^[3]。

影响白酒酿造最终产己酸乙酯的因素很多，如酵母菌种，原料、糖化剂及发酵工艺等^[4,5]。白酒中己酸乙酯等中链脂肪酸乙基酯主要是在酒精发酵后期，由大曲和窖泥中酯化能力极强的霉菌（根霉、毛霉和曲霉）在酯化酶的作用下酯化己酸和酵母产生的乙醇合成，但其发酵周期长，粮耗大^[6]。工业上为了提高白酒的酯含量，通常采用的方法有：添加生香酵母、延长发酵期和窖藏时间^[7]。然而这些方法在提高酯产量的同时，增加了人力和物力的消耗，延长发酵期还带来了糠臭味、涩味、酸味等异味，会降低白酒品质^[8]。为提高酿酒酵母产己酸乙酯的能力，使得酿酒酵母在主发酵期，保持其高产乙醇特性的同时高产己酸乙酯，以达到缩短白酒发酵周期、减少粮耗的目的，故有必要构建高产己酸乙酯的酿酒酵母菌株。因此，研究和构建高产己酸乙酯酿酒酵母用于白酒生产，对于改善白酒风味和品质具有重要意义^[9,10]。本研究以实验室前期构建的 $\alpha 5\text{F-FAS1}$ 及 $\alpha 5\text{O-FAS1}$ 作为出发菌株^[11]，过表达 *FAS2* 基因，从而获得 *FAS1*，*FAS2* 共同过表达的菌株 $\alpha 5\text{F-FAS1,2}$ 和 $\alpha 5\text{O-FAS1,2}$ ，研究共表达 *FAS* 基因对中链脂肪酸乙酯产量的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AY15 的单倍体 $\alpha 5$ 均为天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏。其中质粒 Yep352-P 为本实验室保存，质粒 pUC6 由德国 Hegemann 教授惠赠。

1.1.2 培养基及培养条件

YEPD 培养基 (m/V): 葡萄糖 2%，酵母粉 1%，蛋白胨 2%。

LB 培养基 (m/V): 葡萄糖 1%，酵母粉 0.5%，蛋白胨 1%。

以上两种培养基，自然 pH 值，固体培养基加 2% 琼脂，121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min。

发酵培养基：玉米糖化醪。

1.1.3 试剂和酶

限制性内切酶、DNA 连接酶、rTaq 聚合酶、RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、PCR 纯化试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒均购自宝生物工程（大连）有限公司；卡纳霉素 (KanMX) 购自 Merck 公司；酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；引物由金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.4 仪器

PCT-200 型 PCR 基因扩增仪，台式高速离心机，电热恒温水浴锅电子天平，DYY-4c 型电泳仪，Reference-2 型移液枪，DL102x 型电热鼓风干燥箱，AgilentGC 7890, StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪。

1.2 实验方法

本实验采用同源重组基因改造的方法，同时结合质粒构建技术将相应基因连接到载体 Yep352-P 上，然后以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 己糖转运蛋白 Hxt16 基因为整合位点，过表达脂肪酸合成酶亚基 *FAS2* 基因，并筛选得到重组菌株。

1.2.1 引物

本实验所用到的 PCR 反应引物见表 1，引物设计均采用 Primer 5.0 软件设计。具体引物说明如下：根据 NCBI 公布的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *FAS2* 基因，设计用于扩增 *FAS2* 基因的引物对 FAS2-U/FAS2-D。根据 pUC6 质粒序列设计用于扩增 KanMX 抗性基因序列的引物 KAN-U 和 KAN-D。根据 NCBI 公布 *S. cerevisiae* S288c 的 Hxt16 基因序列，设计用于扩增 HXT16 上游同源臂序列 FA 的引物对 FA-U(Hxt16)/FA-D(Hxt16)，及 HXT16 下游同源臂序列 FB 的引物对 FB-U(Hxt16)/FB-D(Hxt16)。根据 Yep352-P 质粒序列设计用于扩增过表达片段的引物对 PGK1_P-U/PGK1_T-D。

1.2.2 重组质粒 Yep-PF2 质粒构建

将纯化过的 *FAS2* 片段用 *Xho*I 酶切连入 Yep352-P，构建表达质粒 Yep-PF2。构建过程详见图 1。

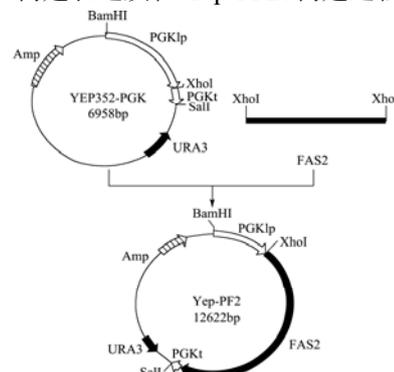


图 1 质粒 Yep-PF2 的构建

Fig.1 Flow chart of recombinant plasmid Yep-PF2 construction

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

引物	序列 (5'→3')	内酶切位点
菌株构建		
FAS2-U	CGGAATTCCAGATCTCCTCGAGATGAAGCCGGAAGTTGAG	XhoI
FAS2-D	GATCTATCGCAGATCCCTCGAGCTATTTCTTAGTAGAAAC	XhoI
FA-U(Hxt16)	ATTATGCCCTTACTTCATTTAC	
FA-D(Hxt16)	GACCTGCAGCGTACGAAGCTTCAGCTGTACCCCGCACTCTACTGTTTTTG	
KAN-U	CAAAAACAGTAGAGTGC GGGGTACAGCTGAAGCTTCGTACGCTGCAGGTC	
KAN-D	TCAGTTTTGGATAGATCAGTTAGAGCATAGGCCACTAGTGGATCTGATAT	
PGK1 _p -U	ATATCAGATCCACTAGTGGCCTATGCTCTAACTGATCTATCCAAAAGTGA	
PGK1 _T -D	ACTTCCCCATCTTCATCACCACCTAACGAACGCAGAATTTTCGAGTTATTA	
FB-U(Hxt16)	TAATAACTCGAAAATTTCTGCGTTCGTTAGTGGTGATGAAGATGGGGAAGT	
FB-D(Hxt16)	TATCGCAAATGAAAAGAAGAA	
Hxt16 验-U	TGTACGGAATTGTGGTAAGG	
Hxt16 验-D	TTTAATTGTCATAGTAACAGTCTGG	
RT-PCR 引物		
ACT1-F	CGTCTGGATTGGTGGTTCTA-	
ACT1-R	GTGGTGAACGATAGATGGAC	
ACS1-F	ATGTCGCCCTCTGCCGTAC	
ACS1-R	GCACGATCTTGACCGAAGTC	
ACS2-F	ATGACAATCAAGGAACATAAAGTAG	
ACS2-R	GTATGGAGCATCCAATGCAAG	
FAS2-F	ATGAAGCCGGAAGTTGAGCA	
FAS2-R	GCATAAGATTTCTCTATGTA	
ATF1-F	ATGAATGAAATCGATGAG	
ATF1-R	GTGAGCTGATCCCTAGTAC	

1.2.3 酵母转化

从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) $\alpha 5$ 的基因组上扩增得到上下同源臂 FA 和 FB, 从质粒 Yep-PF2 上扩增得 PGK1_p-FAS2-PGK1_T 片段, 从质粒 pug6 上扩增得 loxp-KANMX-loxp 片段, 使用醋酸锂转化法^[12] 转化到酿酒酵母 $\alpha 5$ 中, 涂布含 1000 $\mu\text{g/mL}$ G418 YEPD 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$, 静置培养 48 h, 对 YEPD 平板上生长的单菌落进行筛选验证。

1.2.4 发酵验证

从 YEPD 斜面上挑取 1 环菌种接入含 5 mL 一级种子培养基的试管中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h, 进入稳定期后, 按照 10% 的接种量将其接种到含 45 mL 二级种子培养基的三角瓶中。

30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 16~17 h 至对数期的后期, 然后按照 10% 接种量接种到发酵培养基。30 $^{\circ}\text{C}$ 静置发酵, 每隔 12 h 称重 1 次, 发酵结束后测定 CO_2 累计失重、发酵时间、酒精度、发酵液残余还原糖及酯的含量, 每个样品做 3 个平行, 取平均值。

1.3 分析方法

1.3.1 CO_2 失重的测定

在发酵过程中, 按照文献^[13]描述的方法每隔 12 h 称重 1 次。

1.3.2 还原糖的测定

斐林试剂法^[13]。

1.3.3 酒精度的测定

酒精计比重法^[13]。

1.3.4 酯测定方法

1.3.4.1 乙酸乙酯测定方法^[14]

发酵结束后将发酵液进行蒸馏, 得到含乙酸乙酯的样品进行气相色谱分析。根据 Agilent GC7890 气相色谱说明书及有关白酒样品检测资料设定检测高级醇的最佳条件为: 色谱柱: 105 m \times 0.530 mm 毛细管柱; 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 8 min, 然后以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 150 $^{\circ}\text{C}$, 再保持 15 min; 进样口温度 200 $^{\circ}\text{C}$; 检测器温度 200 $^{\circ}\text{C}$; 载气流速 20 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。

1.3.4.2 中链脂肪酸乙酯测定方法^[11,15]

发酵结束后将发酵液进行蒸馏, 得到含中链脂肪酸乙酯的样品进行气相色谱和气质色谱 (GC-MS) 分析。将酒样稀释至 12%(V/V), 取 8 mL 置于 20 mL 螺口顶空样品瓶, 加 3 g 氯化钠, 放入磁性转子, 用聚四氟乙烯将瓶口紧密封好。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 系统进样口, 250 °C 解吸附 5 min。

1.3.4.3 气相色谱条件

色谱柱为 Agilent CP-Wax (60 m×0.25 mm×0.5 μm); 进样口温度为 250 °C, 不分流; 载气氦气流速为 0.8 mL/min; 升温程序为起始 40 °C 维持 2 min, 按照 2 °C/min 的速度升到 100 °C, 再按照 4 °C/min 的速度升到 230 °C, 维持 3 min。质谱条件: EI; 70 eV; 扫描范围 30~500 u; 离子源温度 230 °C。

1.3.5 数据分析

每组实验做三个平行, 并使用 SPSS 11.0 和 EXCEL 2013 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 突变株的构建与验证

2.1.1 重组质粒 Yep-PF2 构建与验证

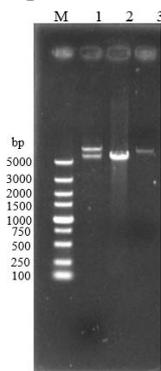


图2 重组质粒 Yep-PF2 的验证

Fig.2 The verification of recombinant plasmid of Yep-PF2

使用 1.2 的方法, 构建表达质粒 Yep-PF2。对重组质粒进行酶切验证, 结果如图 2 所示。其中 1 道为 Yep-PF2 用 XhoI 酶切后的线性化片段, 分别存在大小为 6958 bp 和 5664 bp 的条带; 2 道为以 a5 基因组为模板扩增得到的 FAS2 基因片段, 大小为 5664 bp; 3 道为 Yep-P 用 XhoI 酶切后的线性化质粒, 大小为 6958 bp。酶切结果与理论预期相符, 说明 FAS2 基因片段

成功插入到 Yep-P 上的 PGK1 启动子和终止子中间的多克隆位点处, Yep-PF2 质粒构建成功。

2.1.2 过表达 FAS2 基因突变株的构建与验证

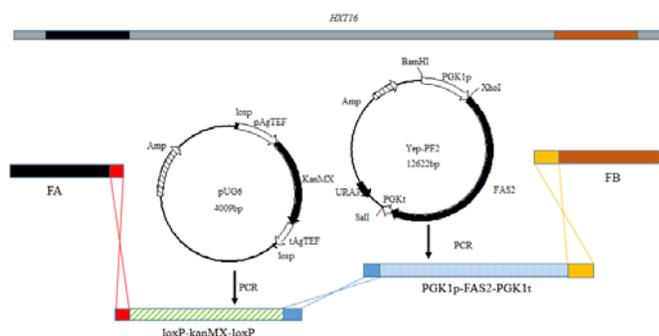


图3 重组片段的同源重组示意图

Fig.3 The process of homologous recombination

用醋酸锂转化法将四个片段: 上同源臂 FA、下同源臂 FB、PGK1p+FAS2+PGK1_T 片段、loxP-KanMX-loxP 基因片段导入酿酒酵母 α5F-FAS1 及 α5O-FAS1。通过 FA 和 FB 片段与酵母基因组上 HXT16 基因两侧的同源序列发生同源重组, 从而实现了 FAS2 基因的过表达盒整合到酿酒酵母染色体上。同源重组过程如图 3。将导入片段的菌液涂布在含有 1000 mg/L G418 抗性的 YEPD 平板上, 30 °C 条件下培养 2 d, 挑取转化子进行验证。分别以长势较好的转化子基因组为模板, 以出发菌株 α5F-FAS1 及 α5O-FAS1 的基因组为阴性对照, 分别用三对引物进行验证, 验证过程如图 4。

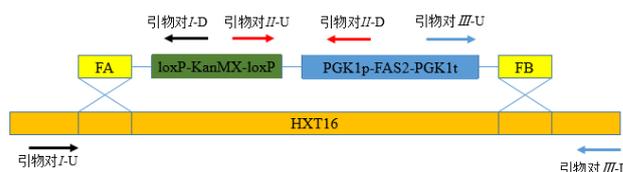


图4 突变株的验证过程

Fig.4 The verification of transformants

引物对 I: Hxt16 验-U/KAN-D 进行上游定点 PCR 验证, PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 可看到一条大小约 2655 bp 左右的特异性条带, 其大小与预期相当, 而出发菌株无法扩增出条带。

引物对 II: KAN-U/PGK1_p-D 进行中游定点 PCR 验证, PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 可看到一条大小约 3092 bp 左右的特异性条带, 其大小与预期相当, 而出发菌株无法扩增出条带。

引物对 III: PGK1_T-U/Hxt16 验-D 进行下游定点 PCR 验证, PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 可看到一条大小约 3553 bp 左右的特异性条带, 其大小与预期相当, 而出发菌株无法扩增出条带。说明片段

已经成功连接并整合到酿酒酵母单倍体基因组中的 HXT16 位点, 得到 FF1F2 和 OF1F2 突变株。结果如图 5 所示。

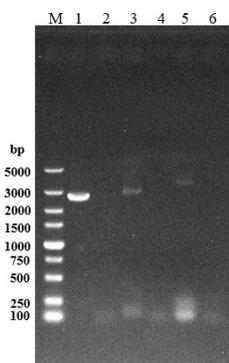


图 5 突变株 $\alpha 5F-FAS1, 2$ 的验证

Fig.5 The verification of transformants $\alpha 5F-FAS1, 2$

注: M: DL5000 DNA marker; 1.以突变株基因组为模板, 引物对 I 的 PCR 扩增结果; 2.以出发菌株基因组为模板, 引物对 I 的 PCR 扩增结果; 3.以突变株基因组为模板, 引物对 II 的 PCR 扩增结果; 4.以出发菌株基因组为模板, 引物对 II 的 PCR 扩增结果; 5.以突变株基因组为模板, 引物对 III 的 PCR 扩增结果; 6.以出发菌株基因组为模板, 引物对 III 的 PCR 扩增结果。

2.2 出发菌株与突变菌株的发酵性能比较

按照方法 1.2.5 以出发菌株 $\alpha 5$ 为对照菌株与 $\alpha 5F-FAS1$ 、FF1F2、 $\alpha 5O-FAS1$ 、OF1F2 同时进行玉米原料发酵, 发酵结束后测定各菌株的基本发酵性能。

由表 2 可知, 与出发菌株 $\alpha 5$ 相比, 敲除 FAA1 同时过表达 FAS1 基因后突变菌和敲除 OPI1 同时过表达 FAS1 基因后突变菌的主要发酵性能总 CO_2 失重、酒精度和残糖没有明显的影响。在过表达 FAS1 基因的基础上过表达 FAS2 的主要发酵性能也未受明显影响。

表 2 突变株的发酵性能比较

Table 2 The comparison of the fermentation performance of mutants

菌株	总 CO_2 失重/g	酒精度(% , V/V)	残糖/(g/100 mL)
$\alpha 5$	23.91±0.56	15.41±0.2	0.18±0.03
$\alpha 5F-FAS1$	23.72±0.78	15.23±0.2	0.19±0.02
$\alpha 5O-FAS1$	23.63±0.89	14.94±0.1	0.19±0.04
FF1F2	23.64±0.66	15.11±0.1	0.19±0.01
OF1F2	23.45±0.74	14.92±0.2	0.20±0.03

2.3 共表达 FAS1, FAS2 基因对中链脂肪酸乙酯生成量的影响

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 检测分析酒样中己酸乙酯等脂肪酸乙酯生成量。

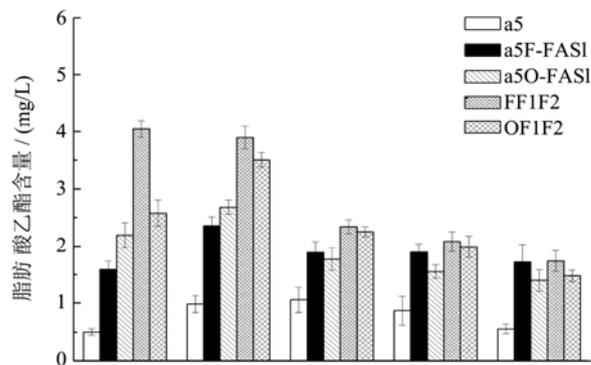


图 6 出发菌株和突变菌株中链脂肪酸乙酯的生成量比较

Fig.6 The comparison of medium chain fatty acid ethyl esters production between original strain and recombinant strains

如图 6 所示, 相比较于 $\alpha 5F-FAS1$ 菌株, 在此基础上共表达 FAS2 的菌株的 FF1F2 的己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯分别提升了 154.31%, 65.22% 和 23.53%, 但十二酸乙酯、十四酸乙酯基本不变。与此结果类似: 相比较于 $\alpha 5O-FAS1$ 菌株, 在此基础上共表达 FAS2 的菌株的 OF1F2 的己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、十二酸乙酯分别提升了 17.34%, 30.71%, 27.12% 和 28.13%, 但十四酸乙酯基本不变。结果显示共表达 FAS1 和 FAS2 基因可以更进一步的提升中链脂肪酸乙酯的产量, 特别是己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯的产量, 最终的最高产量分别达到 4.049 mg/L, 3.89 mg/L, 2.34 mg/L。

实验结果与 Furukawa 等在清酒酵母中过表达 FAS1 可以提高己酸乙酯, 并且共表达 FAS1 和 FAS2 可以使己酸乙酯的产量达到最大的结论一致^[16]。由于脂肪酸合成酶是由两个亚基组成, 它们对于脂肪酸合成酶的酶活力都有贡献, 并且编码 β 亚基的基因 FAS1 其主要作用, 其可以在 RNA 水平上调节编码 α 亚基的基因 FAS2 的表达, 从而提高脂肪酸合成酶的酶活力。并且同时共表达 FAS1 和 FAS2 使得 α 亚基和 β 亚基以等摩尔的形式存在^[17], 从而使脂肪酸合成酶达到最大的酶活力, 进一步提升了中链脂肪酸乙酯的含量。

2.4 共表达 FAS1, FAS2 基因对乙酸乙酯生成量的影响

本研究还发现, 过表达 FAS1 可以提高乙酸乙酯的生成量。突变株的乙酸乙酯及乙酸的生成量结果如表 3。

表 3 过表达 FAS1 和共表达 FAS1, 2 的乙酸乙酯和乙酸产量

Table 3 The production of Acetate and Ethyl ester between Co-overexpression of FAS1 and FAS2 strains and overexpression of FAS1 strains

菌株	$\alpha 5$	$\alpha 5F$ -FAS1	$\alpha 5O$ -FAS1	FF1F2	OF1F2
乙酸乙酯/(mg/L)	16.11	40.62	56.83	51.14	94.35
乙酸/(mg/L)	281.15	196.44	217.73	179.52	183.91

从表 3 可以看出, 过表达 FAS1 可以提高乙酸乙酯的含量同时降低乙酸的含量。而共表达 FAS1,2 会进一步提高乙酸乙酯并降低乙酸的含量。并且敲除 Opi1 过表达 FAS1 的菌株 $\alpha 5O$ -FAS1 比敲除 FAA1 过表达 FAS1 的菌株 $\alpha 5F$ -FAS1 产生的乙酸乙酯更高, 同样共表达 FAS1,2 的菌株 OF1F2 比 FF1F2 产生的乙酸乙酯更高。说明不同整合位点对乙酸乙酯的生成量也有影响。

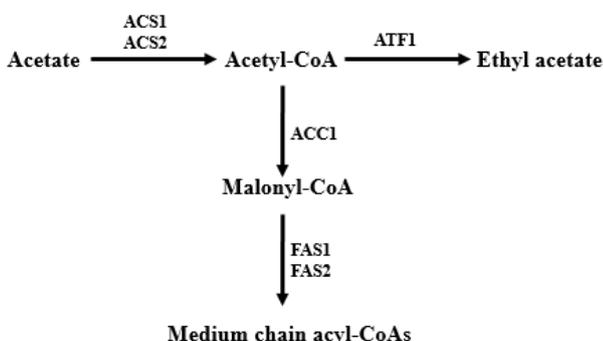


图 7 酿酒酵母细胞质 acetyl-CoA 的代谢途径

Fig.7 The metabolic pathway of acetyl-CoA in cytoplasm in *S.cerevisiae*

图 7 是酿酒酵母细胞质中乙酰 CoA 的代谢途径, 由于在细胞质中乙酰 CoA 一部分在醇乙酰基转移酶 Atf1p 和 Atf2p 催化下形成乙酸乙酯, 另一部分通过脂肪酸合成途径形成脂肪酸乙酯, 因此实际上脂肪酸合成途径和乙酸乙酯合成途径存在相互竞争底物乙酰 CoA 的情况, 当过表达 FAS 基因后, 理论上乙酸乙酯的生成量应该降低。因此表 3 的结果似乎与理论不符。

由于过表达 FAS1 导致了乙酸的降低, 癌症细胞的背景与此现象类似。相比较于正常细胞, 癌细胞的脂肪酸合成能力变强, 同时大部分癌细胞存在于低氧低营养的恶劣环境中, 许多研究学者都发现癌细胞通过 ACS1 基因的上调, 从而利用乙酸维持癌细胞的存活^[18,19]。猜测乙酸乙酯升高的第一种原因可能是过表达脂肪酸合成酶基因使乙酰 CoA 的上游途径基因 ACS1 或 ACS2 基因上调。另一方面由于乙酸乙酯主要是由醇乙酰基转移酶 Atf1p 催化, 并且 ATF1 基因会受到氧气, 氮信号, 不饱和脂肪酸等的调控^[20,21]。因此猜测乙酸乙酯升高的第二种原因是过表达脂肪酸合成酶基因可能使乙酸乙酯的调控基因 ATF1 上调。

为了探究本现象, 以出发菌株 $\alpha 5$ 和突变株 $\alpha 5O$ -FAS1 进行玉米原料发酵, 发酵培养 48 h 取菌体提 RNA 进行 RT-PCR。

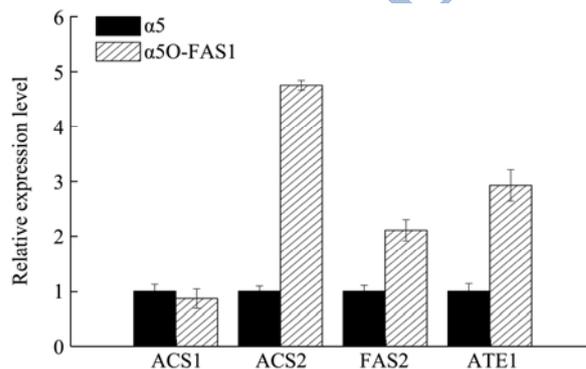


图 8 $\alpha 5$ 和 $\alpha 5O$ -FAS1 中 ACS1, ACS2, FAS2, ATF1 的基因表达量

Fig.8 Determination of ACS1, ACS2, FAS2, ATF1 gene expression levels in $\alpha 5$ and $\alpha 5O$ -FAS1

如图 8, FAS1 基因过表达并未影响 ACS1 基因的表达量, 但会提高 ACS2 的和 ATF1 基因的表达量, 分别提高了 4.75 倍和 2.93 倍, 同时也使 FAS2 基因表达量提高了 2.11 倍。因此过表达 FAS1 导致乙酸乙酯的升高一方面可能是由于 ACS2 基因的表达量上调导致的, 另一方面也可能是由于 ATF1 基因的表达量上调导致的。

一方面为了进一步确定乙酸乙酯的上升是由于哪一种原因造成的, 另一方面为了探索不同整合位点导致乙酸乙酯提升程度不同的原因, 本研究以 $\alpha 5$, $\alpha 5F$ -FAS1, $\alpha 5O$ -FAS1 为出发菌株, 同时过表达 ATF1 基因, 得到 $\alpha 5$ -ATF1, FF1-ATF1, OF1-ATF1 三株突变株, 进行玉米白酒液态发酵。气相测定乙酸乙酯及乙酸产量如表 4。同时测定了 $\alpha 5$, $\alpha 5F$ -FAS1, $\alpha 5O$ -FAS1 菌株的 FAS1 和 FAS2 基因的表达量。

表 4 过表达 ATF1 和共表达 FAS1, ATF1 的乙酸乙酯和异戊醇产量

Table 4 The production of higher alcohols and esters between Co-overexpression of FAS1 and ATF1 strains and overexpression of ATF1 strains

菌株	$\alpha 5$	$\alpha 5$ -ATF1	FF1-ATF1	OF1-ATF1
乙酸乙酯/(mg/L)	16.21	523.12	277.13	73.75

表 4 结果显示与 $\alpha 5$ -ATF1 相比, FF1-ATF1 和

OF1-ATF1 的乙酸乙酯产量分别为 277.1 mg/L 和 73.7 mg/L, 出现逐渐递减的现象。假如脂肪酸合成途径的强化导致乙酸乙酯的升高是 ACS2 基因的表达量上调导致的, 那么过表达 ATF1 基因后, 菌株 FF1-ATF1 和 OF1-ATF1 生成的乙酸乙酯量应该比 $\alpha 5$ -ATF1 菌株的高。此结果可以说明脂肪酸合成途径的强化导致乙酸乙酯的升高并不是 ACS2 基因的表达量导致的, 而是由于 ATF1 基因的表达量上调造成的。

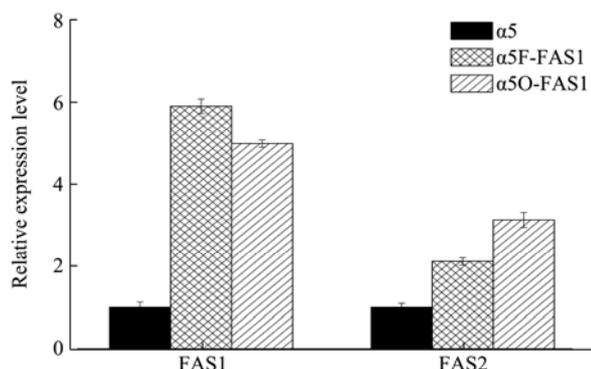


图9 $\alpha 5$, $\alpha 5F$ -FAS1 和 $\alpha 5O$ -FAS1 中 FAS1, FAS2 的基因表达量

Fig.9 Determination of FAS1 and FAS2 gene expression levels in $\alpha 5$, $\alpha 5F$ -FAS1 and $\alpha 5O$ -FAS1

图9显示整合 Opi1 过表达 FAS1 的菌株 $\alpha 5O$ -FAS1 比整合 FAA1 过表达 FAS1 的菌株 $\alpha 5F$ -FAS1 的 FAS2 的基因表达量更高。该结论与表 3-2 所出现的共表达 FAS1 和 FAS2 的菌株比单独过表达 FAS1 产生更多的乙酸乙酯相符合。结果说明菌株 $\alpha 5O$ -FAS1 比菌株 $\alpha 5F$ -FAS1 产生的乙酸乙酯更高, 是由于 Opi1 基因是脂肪酸合成途径的负调控基因^[22], 其敲除强化了脂肪酸合成途径导致的。

3 结论

3.1 本研究以酿酒酵母 AY15 的单倍体 $\alpha 5$ 基因组为模板, PCR 扩增得到编码 α 亚基的 FAS2 基因, 经醋酸锂转化和 G418 抗性筛选鉴定获得共表达 FAS1 和 FAS2 基因的突变株 $\alpha 5F$ -FAS1,2 和 $\alpha 5O$ -FAS1,2。经玉米原料发酵后, 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都没有明显变化。相比较于单独过表达 FAS1 基因, 共表达 FAS1 和 FAS2 基因可以更进一步的提升中链脂肪酸乙酯的生成量, 最终 $\alpha 5F$ -FAS1,2 的己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯分别提升了 154.31%, 65.22% 和 23.53%, 同时 $\alpha 5O$ -FAS1,2 的己酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、十二酸乙酯分别提升了 17.34%, 30.71%, 27.12% 和 28.13%。

3.2 本研究发现过表达脂肪酸合成酶的编码基因可

以提高乙酸乙酯的生成量。通过 RT-PCR 测定发现脂肪酸合成酶编码基因的过表达可以使 ACS2 和 ATF1 基因上调, 不影响 ACS1 基因的表达。而与单独过表达 ATF1 基因的菌株相比, 共表达 FAS1 和 ATF1 的菌株的乙酸乙酯逐渐降低。因此过表达 FAS1 导致的乙酸乙酯生成量上升的现象主要是由于过表达脂肪酸合成酶编码基因使得醇酰基转移酶的编码基因 ATF1 的表达量上升造成的。但 ATF1 的表达量上调的原因是否是通过某些中间调节因子造成尚不清楚, 需要在后续在调控机理上进行更深入的研究。

3.3 本研究初步探讨了脂肪酸合成酶复合体对酿酒酵母中链脂肪酸乙酯生成的影响, 为后续研究中链脂肪酸乙酯合成的调控机制奠定了一定的理论基础。

参考文献

- [1] Saerens S M, Delvaux F R, Verstrepen K J, et al. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Biotechnology*, 2010, 3(2): 165-177
- [2] 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 Yi-fang. 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
- [3] 赵华, 赵树欣. 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 Hua, ZHAO Shu-xin. Biosynthesis and metabolic control breeding of ethyl caproate-producing yeast [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 1998, 4: 24-25
- [4] Verstrepen K J, Derdelinckx G, Dufour J P, et al. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(2): 110
- [5] Antonio G Cordente, Christopher D Curtin, Cristian Varela, et al. Flavour-active wine yeasts [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(3): 601-618
- [6] 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*, 2012, 118(4): 356-360
- [7] 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]. *食品与生物技术学报*, 1993, 12(2): 166-171
GU Guo-xian, XIE Guo-yin. Some thinking about the main flavoring ethyl caproate in Luzhou-flavor Daqu [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 1993, 12(2): 166-171
- [8] 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 Hu, DU Hai, XU Yan. 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
- [9] 朱玉贤,李毅.现代分子生物学[M].北京:高等教育出版社, 2002
- ZHU Yu-xian, LI Yi. *Modern molecular biology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002
- [10] Black P N, DiRusso C C. Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1771(3): 286-298
- [11] Chen Y, Luo W, Rui G, et al. Improved ethyl caproate production of Chinese liquor yeast by overexpressing fatty acid synthesis genes with OPI1, deletion [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(9): 1-10
- [12] Gietz R D, Robert H, Schiestl. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(1): 31-34
- [13] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:化学工业出版社,2005
- WANG Fu-rong. *Analysis and detection of wine* [M]. Beijing: Chemical Industry Publisher, 2005
- [14] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社, 1998
- SHEN Yi-fang. *Wine production technology encyclopedia* [M]. Beijing: Chinese Light Industry Publisher, 1998
- [15] 李锋,陈叶福,郭建,等.过表达 EHT1 基因对酿酒酵母己酸乙酯生产能力的影响[J].现代食品科技,2014,3:93-98
- LI Feng, CHEN Ye-fu, GUO Jian, et al. Effects of Overexpressed EHT1 on Ester Production of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 3: 93-98
- [16] Furukawa K, Yamada T, Mizoguchi H, et al. Increased ethyl caproate production by inositol limitation in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2003, 95(5): 448
- [17] Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein S D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2007, 1771(3): 255
- [18] Gao X, Lin S H, Ren F, et al. Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia [J]. *Nature Communications*, 2016, 7:11960
- [19] Schug Z T, Peck B, Jones D T, et al. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress [J]. *Cancer Cell*, 2014, 2(1): 1-1
- [20] Takahashi T, Ohara Y, Sawatari M, et al. Isolation and characterization of sake yeast mutants with enhanced isoamyl acetate productivity [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2016, 123(1)
- [21] Verstrepen K J, Derdelinckx G, Dufour JP, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene ATF1 is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways [J]. *FEMS Yeast Research*, 2003, 4(3): 285-296
- [22] Graves J A, Henry S A. Regulation of the yeast INO1 gene. The products of the INO2, INO4 and OPI1 regulatory genes are not required for repression in response to inositol [J]. *Genetics*, 2000, 154(4): 1485