浓香型白酒风味乙酯微生物合成机制研究进展

赵静溶[1,2]，徐友强[1,2]，朱 华[3]，李微微[1,2]，陈 曦[1,2]，王红安[3]，李秀婷[*1,2]

（1. 北京工商大学 食品营养与人类健康高精尖创新中心，北京 100048；2. 北京工商大学 食品与健康学院，北京 100048；3. 北京华都酿酒食品有限责任公司，北京 102212）

摘要：浓香型白酒是中国传统特色蒸馏白酒的典型代表，具有悠久的历史，风味独特。风味分析表明脂肪酸乙酯对浓香型白酒的感官具有重要影响。白酒发酵过程微生物所产酯合成酶催化酸和乙醇的酯化反应是脂肪酸乙酯的重要合成途径，然而目前相关的酶催化机制尚不明晰，导致浓香型白酒发酵过程酯类风味物质合成不稳定，是制约产业发展的瓶颈问题之一。经典的酶催化酸醇酯化反应存在于有机相体系，而白酒发酵过程中酒醅含水量（质量分数）为 53%~58%，属于水相体系，发掘和解析水相体系脂肪酸乙酯合成酶及其催化机制可以促进浓香型白酒的品质改善。作者对浓香型白酒酯类风味物质及微生物代谢研究进展进行总结，并深入探讨酯合成酶的结构和催化机制，为明晰浓香型白酒脂肪酸乙酯的合成机制提供科学依据。

关键词：酯合成酶；白酒；风味乙酯；分子改造；酯合成机制

中图分类号：TS 262.3　**文章编号：**1673-1689(2022)10-0001-16　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.001

Research Progress on Microbial Synthetic Mechanism of Flavor Ethyl Esters in Strong-Flavor Baijiu

ZHAO Jingrong[1,2]，*XU Youqiang*[1,2]，*ZHU Hua*[3]，*LI Weiwei*[1,2]，*CHEN Xi*[1,2]，*WANG Hong'an*[3]，*LI Xiuting*[*1,2]

(1. Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health ，Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2. School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. Beijing Huadu Brewery & Food Industry Co., Ltd., Beijing 102212, China)

Abstract: Strong-flavor Baijiu is a typical representative of traditional Chinese distilled alcoholic beverages, with a long history and unique flavor. Flavor analysis showed that fatty acid ethyl esters have a key influence on the sensory properties of strong-flavor Baijiu. Esterification reaction catalyzed by ester synthases from microorganisms is an important way to synthesize fatty acid ethyl esters using alcohols and acids as the substrates. However, the mechanism of enzymatic catalysis is not clear until now, and leads to the batch instability for synthesizing esters in strong-flavor Baijiu during fermentation process. The classical enzyme catalyzed esterification of acids and alcohols is under organic phase system, while the water content of fermented grains is 53% ~58% during Baijiu fermentation. It is generally recognized as a water phase system. Identifying enzymes for synthesizing

收稿日期：2022-04-29

基金项目：国家自然科学基金重点项目(31830069)；国家自然科学基金面上项目(31901632)；2021 年度北京工商大学食品与健康学院研究生创新项目。

*通信作者：李秀婷(1970—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品酶工程方面的研究。E-mail：lixt@btbu.edu.cn

fatty acid ethyl esters and revealing the catalytic mechanism can provide a theoretical basis for improving the quality of strong-flavor Baijiu. Baijiu flavor esters and microbial metabolism were summarized in this review. The structure and catalytic mechanism of microbial enzymes from Baijiu were also discussed to provide a scientific basis for clarifying the synthetic mechanism of ethyl esters in strong-flavor Baijiu.

Keywords: ester synthase, Baijiu,flavor ethyl ester,molecular modification,ester synthesis mechanism

白酒是世界著名的六大蒸馏酒之一,也是中国传统发酵食品的重要组成部分[1]。白酒分为 12 种香型，其中浓香型白酒占白酒市场份额的 70%以上,窖香浓郁、香味协调,是传统发酵白酒的典型代表[2]。浓香型白酒生产过程中很多环节仍延续粗放的经验模式，酿造效率低且不同批次产品稳定性差,限制了浓香型白酒品质的提升,其内在科学实质是传统酿造工艺过程中核心功能微生物以及风味物质形成机制不明晰。研究表明,浓香型白酒中酯类物质是重要的风味成分,其中以己酸乙酯为代表的小分子脂肪酸乙酯是浓香型白酒的关键风味化合物[1]。大量研究证实,白酒酿造过程中微生物源酯合成酶催化酸醇酯化反应生成酯类物质是浓香型白酒乙酯合成主要途径[1],由此可知,厘清酿造过程中脂肪酸乙酯的合成与产酯微生物及酯合成相关酶类之间的相互关系,阐明其有效合成的内在规律,可在一定程度上解析浓香型白酒风味品质改善的根本原因。作者拟从浓香型白酒中乙酯类风味物质的种类、含量以及香气贡献度、产酯微生物、微生物源酯合成酶、酯合成酶结构和催化机制以及其分子改造进行综合分析,以期为解析浓香型白酒风味乙酯化合物有效合成规律进而提升产品品质提供基础数据与科学参考。

1 浓香型白酒风味乙酯种类、含量、香气贡献度

1.1 浓香型白酒风味乙酯种类

浓香型白酒乙酯类物质丰富多样,赋予其水果香、花香以及甜味等香气[3]。到目前为止,共发现风味乙酯 114 种(见表 1),其中直链乙酯有 18 种,支链乙酯有 10 种,不饱和乙酯有 26 种,羟基乙酯有 11 种,羰基乙酯有 18 种,二乙酯有 9 种,环乙酯有 3 种,芳香乙酯有 19 种。虽然乙酯种类多样,但并非所有的乙酯对浓香型白酒的风味都至关重要,还需根据其含量和香气贡献度鉴定其对风味的重要性。

表 1　浓香型白酒风味乙酯化合物种类

Table 1　Types of ethyl ester flavor substances in strong-flavor Baijiu

分类	乙酯类风味物质
直链乙酯	甲酸乙酯、乙酸乙酯、丙酸乙酯、丁酸乙酯、戊酸乙酯、己酸乙酯、庚酸乙酯、辛酸乙酯、壬酸乙酯、癸酸乙酯、十一酸乙酯、十二酸乙酯、十三酸乙酯、十四酸乙酯、十五酸乙酯、十六酸乙酯、十七酸乙酯、十八酸乙酯
支链乙酯	2-甲基丙酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、2-甲基戊酸乙酯、3-甲基丁酸乙酯、3-甲基戊酸乙酯、4-甲基戊酸乙酯、5-甲基己酸乙酯、15-甲基庚酸乙酯、2-乙基辛酸乙酯、3-甲硫基丙酸乙酯
不饱和乙酯	油酸乙酯、亚油酸乙酯、亚麻酸乙酯、2-丙烯酸乙酯、2-戊烯酸乙酯、2-己烯酸乙酯、3-己烯酸乙酯、4-己烯酸乙酯、5-己烯酸乙酯、4-庚烯酸乙酯、2-辛烯酸乙酯、3-辛烯酸乙酯、4-辛烯酸乙酯、7-辛烯酸乙酯、2-壬烯酸乙酯、3-壬烯酸乙酯、8-壬烯酸乙酯、4-癸烯酸乙酯、9-癸烯酸乙酯、10-十一烯酸乙酯、11-十六烯酸乙酯、9-十六碳烯酸乙酯、9,12-十六二烯酸乙酯、9,12,15-十八三烯酸乙酯、反式-4-癸烯酸乙酯、2-丙烯酸-1-甲基乙基酯
羟基乙酯	乳酸乙酯、2-羟基丁酸乙酯、2-羟基戊酸乙酯、2-羟基己酸乙酯、3-羟基丁酸乙酯、3-羟基己酸乙酯、2-羟基-3-甲基丁酸乙酯、2-羟基-4-甲基戊酸乙酯、3-羟基-3-甲基丁酸乙酯、己酸-2-羟基乙酯、2-甲基-1-羟基丁酸乙酯
羰基乙酯	2-羰基丙酸乙酯、4-羰基戊酸乙酯、5-羰基己酸乙酯、7-羰基辛酸乙酯、9-羰基壬酸乙酯、3-乙酰基-4-羰基戊酸乙酯、甲氧基乙酸乙酯、乙氧基乙酸乙酯、2,2-二乙氧基丙酸乙酯、3-乙氧基丙酸乙酯、5-氧代己酸乙酯、丙酸-2-异丁氧基乙酯、乙酸-2-(1-戊氧基)-乙酯、3-(1-乙氧基乙氧基)-2-乙基丁酸乙酯、2-(1-乙氧基乙氧基)-丙酸乙酯、乙醇酸乙酯、丙酮酸乙酯、乙酰丙酸乙酯

续表 1

分类	乙酯类风味物质
二乙酯	丁二酸二乙酯、戊二酸二乙酯、己二酸二乙酯、2-甲基琥珀酸二乙酯、亚乙基丙二酸二乙酯、马来酸二乙酯、甲基丁二酸二乙酯、碳酸二乙酯、邻苯二甲酸二乙酯
环乙酯	环己酸乙酯、糠酸乙酯、烟酸乙酯
芳香乙酯	苯甲酸乙酯、苯乙酸乙酯、4-苯丁酸乙酯、3-苯丙酸乙酯、乙酸-2-苯乙酯、丙酸苯乙酯、丁酸-2-苯乙酯、戊酸 2-苯乙酯、己酸-2-苯乙酯、辛酸苯乙酯、2-甲基丙酸苯乙酯、3-甲基苯乙酸乙酯、2-甲基丙酸-2 苯乙酯、2-甲基丁酸-2-苯乙酯、3-甲基丁酸-2-苯乙酯、2-羟基-3-苯丙酸乙酯、甲氧基肉桂酸乙酯、4-乙氧基苯甲酸乙酯、香草酸乙酯

注:以上数据来源于参考文献[4-18]。

1.2 浓香型白酒风味乙酯质量浓度

浓香型白酒中乙酯物质含量的差异是浓香型白酒区别于其他香型白酒,形成独特风格品质的一个重要原因。白酒中的乙酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯和乳酸乙酯 4 种乙酯对白酒的风味具有重要作用,是白酒中的关键风味物质[19]。浓香型白酒中己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯质量浓度分别为 400.0~7 606.0、25.4~1 773.0、4.4~1 067.0、45.0~622.0 mg/L[7-8,10,12,20],可以看出己酸乙酯质量浓度远高于其他 3 种酯,说明浓香型白酒是以己酸乙酯作为主体复合香的白酒。随着分析技术的发展,除传统意义上的四大乙酯,浓香型白酒中还存在一些前期研究未引起重视的对风味有显著影响的乙酯类物质,比如一些含量在百毫克范围内的乙酯物质(见表 2),由于含量相对较高,因此对浓香型白酒酒体风格的呈现具有不可或缺的作用。其他乙酯类物质虽然含量相对较低(见表 2),但是可能由于其阈值相对较低,在浓香型白酒的呈香呈味过程中仍具有一定的贡献。因此,酯类物质对风味的重要性,还需根据酯的香气贡献度加以判定。

表 2 浓香型白酒风味乙酯化合物质量浓度

Table 2 Content of ethyl ester flavor substances in strong-flavor Baijiu

质量浓度/(mg/L)	乙酯类风味物质
≥100	庚酸乙酯、己酸丁酯、十七酸乙酯、戊酸乙酯、癸酸乙酯、油酸乙酯、亚油酸乙酯、十六酸乙酯、庚酸乙酯、辛酸乙酯、十六酸乙酯、十五酸乙酯
10~100	2-甲基丙酸乙酯、十二酸乙酯、壬酸乙酯、丙酸乙酯、十四酸乙酯、3-苯丙酸乙酯、丁二酸二乙酯、苯乙酸乙酯
≤10	2-羟基丁酸乙酯、3-甲基丁酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯

注:以上数据来源于参考文献[7-8,10,12,20]。

1.3 浓香型白酒风味乙酯香气贡献度

香气贡献度是影响感官的重要指标。酯类的香气贡献度主要取决于两个参数:气味活性值(odor activity values,OAV)和风味稀释(flavor dilution,FD)因子。一般 OAV 大于 1.0 的酯被认为对香气有贡献。浓香型白酒中香气贡献度最大的是己酸乙酯,其次是辛酸乙酯、丁酸乙酯、戊酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、3-甲基丁酸乙酯、2-甲基丙酸乙酯、4-甲基戊酸乙酯、3-苯丙酸乙酯、癸酸乙酯(见表 3),说明浓香型白酒中己酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、戊酸乙酯等小分子脂肪酸乙酯对浓香型白酒的风味至关重要,各酯之间相互协调,对浓香型白酒的典型风味特征的呈现具有重要影响。白酒发酵过程中原料的带入、发酵过程中的化学转化以及微生物的代谢作用是酯类物质合成的途径,其中复杂的微生物菌群生长代谢是酯类风味物质产生的主要途径[21]。因此,对具有催化合成脂肪酸乙酯能力的核心功能微生物进行分析,对挖掘酯合成微生物提供一定的参考。

2 浓香型白酒酿造过程催化风味乙酯合成的重要微生物

研究表明,浓香型白酒发酵过程中共报道 508 种微生物,其中细菌 335 种、真菌 62 种、酵母菌 78 种、古生菌 15 种、放线菌 18 种[1]。值得注意的是,尽管在浓香型白酒中发现了大量微生物,但许多微生物的功能仍有待确定。由于脂肪酸乙酯是浓香型白酒中一类重要的呈香呈味物质,对具有催化合成脂肪酸乙酯能力的核心功能微生物进行总结,可以为浓香型白酒发酵过程中酯类风味物质代谢合成提供参考。具有脂肪酸乙酯合成功能的微生物包括细菌、霉菌和酵母菌等[22]。目前微生物可以通过以下 4 个途径实现酯化反应[23](见图 1):利用酸醇酯化反

表 3　浓香型白酒风味乙酯类物质香气贡献度

Table 3　Aroma contribution of ethyl ester flavor substances in strong-flavor Baijiu

乙酯类风味物质	OAV	FD 因子
己酸乙酯	26 890~137 558	4 096~59 049
辛酸乙酯	5 303~10 297	27~1 024
丁酸乙酯	1 853~3 312	>8 192
戊酸乙酯	1 252~2 598	>8 192
2-甲基丁酸乙酯	33~4 655	32~256
3-甲基丁酸乙酯	190~1 276	64~1 024
2-甲基丙酸乙酯	154~739	2~512
4-甲基戊酸乙酯	101~155	28~256
3-苯丙酸乙酯	125	1~99
癸酸乙酯	1~2	8~64

注：以上数据来源于参考文献[6-7, 10, 20]。

应生成酯，如图 1(a)所示；利用半缩醛脱氢生成酯，如图 1(b)所示；利用单加氧酶催化 2-酮类物质生成酯，如图 1(c)所示；利用醇酰基转移酶催化酯合成，如图 1(d)所示。白酒发酵过程中，醛酮类物质含量极低，并不是白酒酯合成的主要途径；酵母菌来源的醇酰基转移酶催化酯合成多为清香型白酒产酯主要途径[24]。而白酒发酵过程中含有大量的醇和有机酸，微生物来源酶催化酸醇酯化反应对于发酵过程中酯合成起到重要贡献作用，也是浓香型白酒小分子脂肪酸乙酯风味酯合成的主要途径(见图 1(a))。

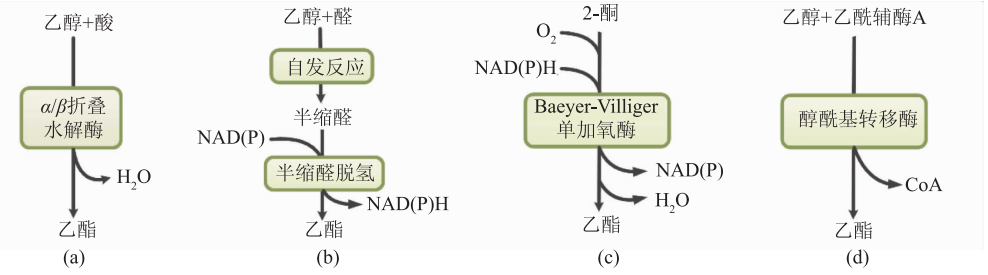


图 1　微生物的乙酯代谢合成途径

Fig. 1　Microbial metabolic pathways for synthesizing ethyl esters

近期相关细菌和霉菌源酯合成酶催化酸醇酯化反应的研究为浓香型白酒发酵过程酯的合成提供了重要依据。白酒中细菌来源产酯微生物主要有伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderria* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、拟杆菌(*Bacterium* sp.)、梭状芽孢杆菌 (*Bacillus fusiformis*)、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)、血红鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas sanguinis*)等[22]。例如菌株 *Burkholderia pyrrocinia* B1213 可以催化乙酸乙酯的合成，其所产酯合成酶 BpFae 也具有较好的产酯能力[25]。白酒中霉菌来源的产酯微生物主要有黑曲霉(*Aspergillus niger*)、根霉(*Rhizopus* sp.)、毛霉 (*Mucor* sp.)、烟灰色曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、紫色红曲霉(*Monascus purpureus*)、红色红曲霉(*Monascus ruber*)等[22]。研究发现菌株黑曲霉 CGMCC3.4309 具有水相体系高酯合成能力，优化后的菌株可以有效合成戊酸乙酯、己酸乙酯、辛酸乙酯和癸酸乙酯，转化率分别为 7.87%、29.20%、94.80%、85.20%[26]。此外，还有一株紫色红曲霉来源的菌株 YJX-8 在优化条件下，酯合成酶的酶活力达(1.177±0.009) U/mL[27]。也有研究证实根霉发酵可产酯合成酶，在一定条件下能够催化己酸与乙醇反应生成己酸乙酯，经优化条件后合成的己酸乙酯可达2 302 mg/dL[28]。

相关白酒源微生物，均具有在发酵体系或者酯合成反应的水相体系以脂肪酸和乙醇为前体，催化合成脂肪酸乙酯的能力，表明白酒源发酵体系中存在不同于经典的有机相反应体系催化酯合成的酶资源，可以在水相体系条件下催化脂肪酸乙酯的合

成。一株紫色红曲霉 YJX-8 来源的酯合成酶 LIP05 具有水相体系酯合成的能力,去除酶的盖子结构酶活力提升,但是并未对其催化机制进行解析[27]。目前对水相体系酶催化合成脂肪酸乙酯的报道较少,酶的催化机制并不明晰。因此对具有酯合成能力的相关酶类进行系统性分析,将有助于为新型水相体系酯合成酶资源的挖掘与利用提供参考。

3 浓香型白酒风味乙酯合成相关酶类

白酒发酵过程中存在大量微生物的生长代谢,是推动物料转化的核心动力。具有产酯能力的微生物分泌的酯合成酶催化白酒酯类风味物质的合成是浓香型白酒发酵过程产酯重要途径[27]。研究表明酯合成酶主要来源于酯酶,属于水解酶类(hydrolases,EC3)。根据国际酶学委员会的标准,酯酶全部列在酯键亚类条目(EC3.1),其中水解羧酸酯键的酶划为 EC3.1.1。羧酸酯酶中研究较多的是脂肪酶(EC3.1.1.3)、酯酶(EC3.1.1.1)和角质酶(EC3.1.1.74)[29-30]。该类酶均属于 α/β 水解酶家族,可以催化酯键的断裂和生成,但在酶的催化特性方面存在一定的差异。

脂肪酶属于 α/β 水解酶家族,是一种催化长链酰基甘油(酰基链长度≥10 个碳原子)水解和合成的羧酸酯酶,在洗涤剂、食品、皮革、造纸、化妆品和生物能源等领域中发挥着重要作用[31-32]。在热力学有利条件下(比如低水分活度的条件)脂肪酶可以催化多种合成反应,可分为酯化反应和酯交换反应两大类[33]。研究发现在动物、植物和微生物中均存在脂肪酶,而大多数研究和工业中使用的脂肪酶都是从微生物中获得的。假丝酵母、黑曲霉、根霉、假单胞菌、链霉菌和碱假单胞菌是一些产脂肪酶能力较强的菌株[34]。根据底物性质的差异,酯酶与脂肪酶的不同之处在于其可以催化中短链酰基甘油(酰基链长度<10 个碳原子)水解和合成。基于氨基酸组成和蛋白质表面静电分布可以对二者进行区分[35],也可以比较在可溶性酯的水解过程中两种酶的 K_m 值,通常脂肪酶的 K_m 值高于酯酶的 K_m 值[36]。角质酶通常催化角质聚合物中酯键的水解,同时也可以水解长链和短链甘油三酯,但是不需要界面激活作用,与脂肪酶和酯酶具有相似的特性,是目前已知的脂肪酶和酯酶中结构最小的蛋白质,可以降解植物角质,属于丝氨酸酯酶,也可以看作是酯酶和脂肪酶之间的过渡蛋白质,能催化酯聚合物和甘油三酸酯的酯键水解。其来源广泛,许多真菌和细菌中都存在角质酶,其中研究最广泛的是真菌角质酶[37]。

4 酯合成酶结构及催化机制

酶结构是探索酶功能特性,解析酶催化机制以及酶理性设计的基础。目前对于酯合成酶结构的研究多聚焦于酶的核心催化结构域和盖子结构,此外催化活性中心、氧阴离子洞、底物通道以及关键的底物结合位点也成为解析酯合成酶催化机制的核心内容。

4.1 酯合成酶结构

研究发现,大多数酯合成酶属于 α/β 水解酶家族,其结构主要分为两个部分,一个是核心催化结构域,也叫 α/β 水解酶折叠结构域,另一个是盖子结构[38-39]。图 2 所示为酯酶 FAEs 的蛋白质结构,该酶的蛋白质结构即为标准的 α/β 水解折叠酶的结构[40]。催化结构域由 α-螺旋围绕着 8 个 β-折叠组成,且除第 2 个 β-折叠为反向平行,其余折叠均严格平行排列,为酶的活性位点提供了一个稳定的支架。盖子结构由一些小的 α-螺旋组成,位于酶的活性中心之上,其构象的开闭控制着底物进出催化活性中心,是大多数酯合成酶特有的结构域[41]。大部分酯合成酶的催化结构域较相似,均是经典的 α/β-折叠结构,差异主要在于 α-螺旋和 β-折叠的数量(见表 4)[42-71]。例如酯酶 EprEst 催化结构域由 5 个 α-螺旋围绕 7 个 β-折叠组成,其中第 1 个折叠 β1 和其他折叠 β2~β7 反向平行排列,且该结构域与盖子结构

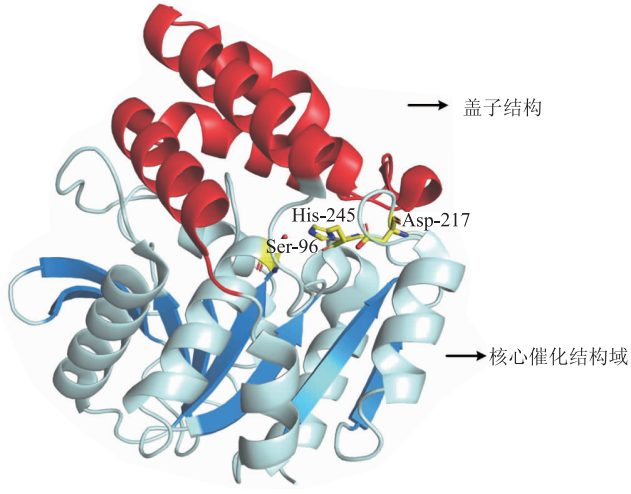


图 2 酯酶 FAEs 蛋白质结构

Fig. 2 Structure of esterase FAEs

表 4　酯酶结构特征及催化特性

Table 4　Structural characteristics and catalytic properties of esterase

酶	晶体形式					催化三联体	氧阴离子洞	底物通道/底物结合关键位点	参考文献
	聚体类型	催化结构域		盖子结构					
		α-螺旋数量/个	β-折叠数量/个	α-螺旋数量/个	β-折叠数量/个				
SABP2	二	6	6	3	3	S81-H238-D210	—	[b]氢键:A13、H238	[44]
EprEst	二	5	7	4	2	S85-D109-S214-H242	L21、M86	[b]氢键:L21、Y60、M86、L89、N121、H125 [b]π-π 键:H125	[42]
CrmE10	二	12	5	—	—	S29-H181-D178	G6、N97	—	[45]
ThaEst2349	二	5	8	4	0	S158-H285-D255	A86、G87	[a]D286、M90、W206	[46]
TtEst	单	*1~129、200~275		*130~199		S101-H250-D222	F35、M102	[b]氢键:F35、H250、Y105 [a]I224、R127、Y105、M197、F35	[43]
PnbE	三	8	6	5	—	S85-H232-D202	—	[b]D109、F111、F212、S85、I205、L149、T153	[47]
EH3	二	6	8	5	0	S192-H321-D291	G112、G113、G193	[a]酰基通道:M115、Y223、W228、L246、I244、L260 [a]醇通道:F26、L56、M59、M60、M63 [a]支链酰基通道:-	[48-49]
AF-Est2	单	6	8	4	0	S89-H228-D200	—	[a]羧基通道:M229、L154、F158、L140、M139、S32 [a]醇通道:L118、V120、L169、C172	[50]
RhEst1	—	—	—	—	—	S101-H253-D225	W33、Y102	[a]酰基通道:A147、V148、V140、M144、F200、I131、V228、G138、I128 [a]醇通道:F166、W33、V227、L170、A34、L184、W100	[51]
RmEstB	二	*51~191、253~322		*3~51、206~247		S161-H291-D261	G90、G91、A165	[a]H88-G91 和 I290-A297	[52]
EstDL136	二	—	8	2	—	S156-H282-D252	—	[a]W86、M211、W215	[53]
E40	四	*46~297		*1~45		S145-H269-E239	G76、G77	—	[54]
TmelEST2-3	四	5	8	3	0	S190-H317-D287	H116、G119	[a]两个大小不同的通道,主通道有两个底物入口,内表面排列有疏水性和极性残基,而次通道(酰基结合口袋)内排列有疏水性氨基酸	[55]
MES16	二	5	6	3	2	S87-H239-D211	—	—	[56]
E53	单	9	8	2	—	S162-H284-D254	G90、G91	—	[57]
Cbotu_EstA	单	—	—	*236~303、334~378		S182-H426-D384	—	—	[58]
GTL	单	5	7	—	—	S113-H358-D317	—	—	[59]
TLL	—	—	—	—	—	S146-H258-D201	—	—	[60]
MAS1	—	12	6	1	—	S109-H232-D200	T38、Q109	—	[61]
Yju3p	四	—	—	4	—	S123-H281-D251	M124、F49	—	[62]
LipC12	—	*4~108、163~293		*109~162		—	—	—	[63]
T6		—	—	*176~192		S114-H359-D318	—	—	[64]
PfL1	二	—	—	*178~255、282~328		S129-H372-D330	—	—	[65]
Est22	二	*58~243、258~344		*13~19、33~40		S188-H317-D287	G109、G189	—	[66]

续表 4

酶	晶体形式					催化三联体	氧阴离子洞	底物通道/底物结合关键位点	参考文献
	聚体类型	催化结构域		盖子结构					
		α-螺旋数量/个	β-折叠数量/个	α-螺旋数量/个	β-折叠数量/个				
mtbMGL	—	6	8	3	—	S110-H256-D226	M111、L39	[a]L39、A136、V137、A138、A139、L142、V143、V147、A148、A15、L154、L160、V163、F168、I171、V192、A194、L200、L201、L228、I229、P230	[67]
AFLB	—	—	—	—	—	S233-H361-D318	T169、Q234	—	[68]
L2	—	9	7	1	—	S113-H358-D317	—	—	[69]
Lip2	—	5	9	1	—	S162-H289-D230	T88、L163	—	[70]
PEL	—	—	—	*68~76		S132-D188-H241	—	[b]K55、E83、D92、P163、R182、K202	[71]

注:* 表示酶特定结构域的氨基酸残基范围;—表示未报道;a 表示构成底物通道的氨基酸残基;b 表示底物结合位点处的氨基酸残基。

之间形成催化裂缝[42]。与其不同的是,酯酶 TtEst 的催化结构域由序列的 1~29 和 200~275 构成,表现为 6 个 α-螺旋围绕 8 个 β-折叠,且第 2 个 β-折叠与其他折叠反向平行[43]。盖子结构、辅酶因子、催化活性中心、氧阴离子洞、底物通道或底物结合位点的差异是造成酯合成酶蛋白质结构差异的一个重要原因,也是影响酶催化特性的重要因素。

4.1.1 盖子结构 大多数酯合成酶的盖子结构由 α-螺旋和 β-折叠组成(见表 4)。不同酶的盖子结构具有不同的特点,主要表现在组成盖子结构的 α-螺旋和 β-折叠的数量的多少、盖子结构的有无,以及盖子结构中配位的金属离子和盖子结构位置的不同。酯酶 SABP2 的盖子结构由 3 个 α-螺旋和 3 个 β-折叠组成[44](见图 3(a)),而酯酶 PnbE 的盖子结构由 5 个 α-螺旋组成[47](见图 3(b))。酯酶 Cbotu_EstA 的蛋白质晶体结构解析表明,该蛋白质的氨基酸残基 236~303 以及残基 334~378 组成盖子结构,其中 N 末端的残基 28~63 形成一个“臂”,包裹在该盖子结构上,并且发现该蛋白质结构中存在一个 Zn^{2+}结合位点,对调节盖子结构构象的改变具有重要作用,同时也是影响酶热稳定性的一个重要因素[58](见图 3(c))。假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)来源的脂肪酶 PML 中存在由 α-螺旋构成的两个盖子结构 Lid1 和 Lid2,当 Ca^{2+}存时,Lid1 被打开,进而启动 Lid2 的打开,行使酶的催化功能[72](见图 3(d))。此外,盖子结构在灵活性方面也表现出差异,脂肪酶 PEL 的盖子结构和催化活性区域之间形成一个“空腔”,且晶体的盖子结构完全无序,说明其盖子结构非常灵活[71](见图 3(e))。不同的是,在脂肪酶 AFLB 中,盖子结构由一段 Loop 环构成,盖子上的氨基酸残基 Cys273 和 Cys281 之间形成二硫键,限制了盖子的移动[68](见图 3(f))。来源于球形马拉色菌(*Malassezia globosa*)的脂肪酶 SMG1 的盖子结构呈一个 Loop 环构象,而非 α-螺旋构象,该结构的移动并不会激活酶的催化功能,但是结构中存在的两个残基 Asp278 和 Asn102 可以激活该酶,是负责调节脂肪酶活性和非活性状态的门控机制的关键位点[73](见图 3(g))。与此类似,脂肪酶 Mrlip1 在行使催化功能时盖子结构上的残基 Thr101 和 Thr107 以及“flap”区域的残基 Gln282 和 Phe278 引起构象变化,是负责打开和关闭 Mrlip1 DAG 脂肪酶活性口袋的门控机制的关键位点[74]。某些酶的盖子结构中存在盐桥,例如脂肪酶 ReLip 盖子结构氨基酸残基 Arg291 和 Glu118 之间存在一个盐桥,这种盐桥在其他具有盖子结构的脂肪酶中不保守,且盐桥的存在意味着疏水囊对大体积溶剂具有更高的保护作用,这可能与 ReLip 对有机溶剂的高耐受性有关,与其他脂肪酶相比,ReLip 的盖子也具有一种罕见的性质,即含有 5 种酸性氨基酸,这有助于增加该酶在酸性条件下的耐受性[75]。研究发现还存在一些非常特殊的不含有盖子结构的酯酶,对于 SGNH 家族的酯酶,其结构中不含有盖子结构和“nucleophile elbow”,且不具有典型的保守五肽序列,其保守序列表现为 GDSL。如酯酶 CrmE10 由 12

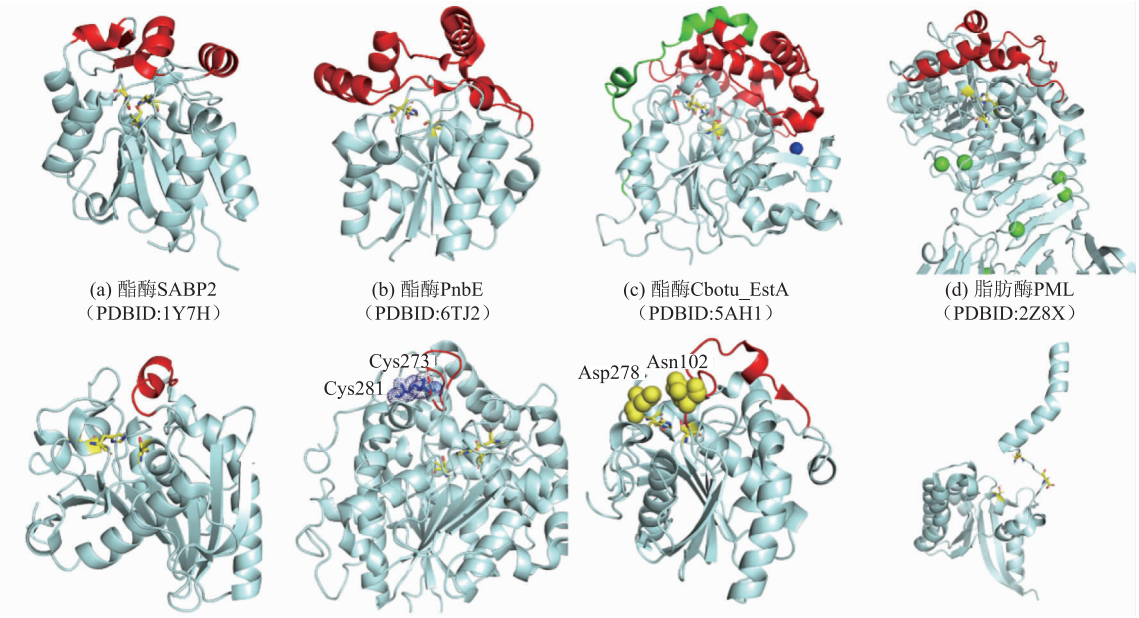


图 3　不同酯酶及其盖子结构

Fig. 3 Different esterases and their respective lid structures

个 α-螺旋和 5 个 β-折叠组成，不含有盖子结构[45]（见图 3(h)）。

4.1.2　辅酶因子　研究证实，少数酯合成相关酶类在催化过程中需要辅酶参与催化过程。革兰氏阴性菌许多酶的折叠和细胞定位依赖于伴侣和分泌系统网络，其中脂肪酶特异性折叠酶 Lif 作为一种膜结合的立体伴侣，存在一个小的结构域 MD1，该结构可以紧密结合并介导脂肪酶 LipA 的折叠[76]。来源于假单胞菌（*Pseudomonas* sp.）和洋葱伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia cepacia*）的脂肪酶折叠过程中存在一个巨大的障碍而无法自发正确折叠，研究发现这类脂肪酶中往往存在一个脂肪酶特异折叠酶，该类蛋白质为脂肪酶的立体分子伴侣，帮助脂肪酶越过折叠过程中的能量障碍，为其获得正确构象提供必要空间信息[77]。类似的研究表明伯克霍尔德氏菌来源（*Burkholderia glumae*）脂肪酶表达需要一个伴侣基因 *Lif* 来帮助其折成有活性的构象，且必须同时表达 LipA 和 Lif 才能获得有活性的脂肪酶[78]。此外还存在一些自身抑制酶活性的结构，例如华根霉（*Rhizopus chinensis*）来源脂肪酶 N 端片段（NTPS）是蛋白质分泌和折叠所必需的一个结构，但是该结构通过与脂肪酶的盖子结构和催化结构域形成保守的相互作用来抑制活性，说明 NTPS 是一种酶的内部竞争性抑制剂[79]。

4.1.3　催化活性中心　催化活性中心是酶催化的关键区域，目前主要通过结构测定以及序列比对的方法以确定酶的催化活性中心。酯合成相关酶类的催化活性中心即催化三联体通常由 Ser-His-Asp/Glu 组成（见表 4）。其中 Ser 是亲核性残基，位于保守的五肽序列“GX_1SX_2G”中，His 是质子受体/供体，Asp 则作为稳定组氨酸的残基。Ser 的氧原子和 His 的氮原子之间形成氢键以稳定亲核残基 Ser 的构象，而 His 和 Asp 的侧链则通过位于 β-折叠的羧基边缘的氢键来稳定。脂肪酶 CALB 的晶体结构解析表明该酶具有经典的催化三联体 Ser105-His224-Asp187[80]，与此类似，脂肪酶 T1 的晶体结构解析，表明该酶的催化三联体为 Ser113-His358-Asp317[81]。激素敏感脂肪酶家族的酯酶 E40 催化三联体为 Ser145-His269-Glu239，其中 Glu239 区别于其他酯酶催化三联体中残基 Asp[54]。通常该类酶具有保守五肽序列“GX_1SX_2G”，然而存在某些酶虽然表现为经典的催化三联体形式，但其保守序列却有所不同。例如酯酶 CrmE10 的催化三联体为 Ser29-His181-Asp178，但其保守序列为“GDSL”[45]；脂肪酶 PfL1 催化三联体为 Ser129-His372-Asp330，而保守序列为“AX_1SX_2G”[65]，脂肪酶 L2 保守序列也为

“AX_1SX_2G”型[69]。此外,还存在某些酯酶的催化活性中心并不表现为经典的催化三联体形式。例如首次发现 SGNH 家族的脂肪酶 SrLip 活性位点位于疏水结合袋入口前,且催化活性中心由 Ser10 和 His216 残基组成催化二联体,其中 Ser10 的氧原子和 His216 的氮原子之间形成氢键,亲核的 Ser10 位于 α1 螺旋内,His216 位于残基 192~211 形成的 Loop 环的下方,残基 211~213 存在一个“转向”,使残基 Asn213(相当于其他水解酶催化三联体中的 Asp)远离催化位点,表现出该酶以催化二联体作为活性中心[82];酯酶 EprEst 的催化活性中心为 Ser85–Asp109–Ser214–His242 构成的催化四联体形式,具有保守的五肽序列“GHSMG”,位于 β4 和 α3 之间形成“nucleophilic elbow”,而其他 3 个活性残基位于不同的 Loop 区内,这 4 个残基通过氢键和盐桥作用进行稳定,残基 Ser85 的氧原子通过氢键与 His242 的氮原子相互作用,His242 的氮原子与 Asp109 的氧原子相互作用形成盐桥,而 Asp109 的侧链氧原子与 Ser214 相互作用形成氢键,构成稳定的催化四联体活性中心[42]。酶的催化活性中心突变后通常会使酶失活,但也有一些较为有趣的发现,例如以来源于南极假丝酵母的脂肪酶 B(CALB)作为带有 Ser–His–Asp 催化三联体的脂肪酶模型,通过定向进化得到具有 Cys–His–Asp 催化三联体的高活性半胱氨酸脂肪酶,催化效率较野生型提高 40 倍[83]。

4.1.4 *氧阴离子洞* 酯合成酶的盖子结构覆盖在酶的催化活性中心,阻止了底物与活性中心的接触。当位于油水界面时,会产生“界面激活”现象,使盖子结构发生构象变化,盖子结构被打开,活性中心暴露出来,底物进入活性中心并与之结合,酶催化活性显著提升。在酶的“盖子”打开的同时,氧阴离子洞也随之形成。氧阴离子洞是酶活性中心“口袋”附近的催化元件,位于丝氨酸羟基周围 0.3~0.5 nm,在大多数情况下由来自两个主链酰胺结合羰基氧形成的氢键来稳定四面体中间产物[26]。氧阴离子洞主要表现为 3 种类型:GGG(X)、G(X)和 Y 类。其中 G(X)类主要包括细菌和真菌脂肪酶、角质酶、磷脂酶和非血红素过氧化物酶。GGG(X)类主要包括细菌酯酶、真菌羧酸酯酶、激素敏感脂肪酶、乙酰胆碱酯酶和硫酯酶等[84]。表 4 所示为部分已知晶体结构的酯酶的氧阴离子洞,其中酯酶 EH3、RmEstB、TmelEST2–3 具有保守的氧阴离子洞序列 HGGG,酯酶 E40、E53、Est22 具有保守的 HGG 序列,而其他酯酶则表现为各自特有的氧阴离子洞序列。酯酶 Est4 序列分析发现该酶含有一个 GGG(X)型的氧阴离子洞[85]。酯酶 EstBP7 的序列分析发现该酶氧阴离子洞表现为 Gly–Gly–Thr,是一种罕见的氧阴离子洞[86]。研究表明红球菌来源的脂肪酶 LipR 氧阴离子洞表现为 Y 型,并将这种 Y 型氧阴离子洞改造为常见的 GGG(X)型,发现改造之后酶活力完全丧失,表明 LipR 的 Y 型氧阴离子洞是维持酶活性的重要结构[87]。

4.1.5 *底物通道和底物结合位点* 酶催化的过程中存在底物进入到反应区域和产物从反应区域释放的通道,即为底物通道或底物结合口袋。底物到达酶的催化活性区域是催化的第一步,对酶催化过程有着重要影响,甚至有可能成为整个酶催化效率的决定性因素。因此,底物通道是酶催化的关键性区域。此外,一些底物结合位点对于酶行使催化功能具有关键作用,也是酶催化的关键位点。

底物通道的表面通常由疏水性氨基酸组成,并与疏水性底物之间形成相互作用。通常底物通道在疏水相互作用的区域、形状、大小、口袋深度以及氨基酸的理化性质方面有所不同。如表 4 所示,酯酶 EH3 的底物通道由 3 个通道组成,分别为醇通道、酰基通道以及支链酰基通道,3 个通道大部分由来自盖子结构和催化结构域的疏水性残基组成,其中酰基通道由残基 M115、Y223、W228、L246、I244 和 L260 组成,醇通道由疏水残基 F26、L56、M59、M60 和 M63 组成[81]。酯酶 RmEstA 和 RmEstB 结构分析表明其底物结合口袋从蛋白质表面延伸到催化残基 Ser164 约 1.1 nm 的距离,呈“漏斗状”,被 4 个 α–螺旋和 Loop 环包围,而 RmEstA 的底物结合口袋则是一条贯穿整个酶的通道,该通道的入口被 5 个 α–螺旋和 Loop 环包围,表明不同酯酶的底物通道大小、形状不同[52]。酯酶 TmelESTs 的蛋白质晶体结构以及催化机制解析得出该酶的底物结合口袋由两个大小不同的通道组成,从亲核残基 Ser190 延伸到蛋白质的外表面,呈“隧道状”,其中大的通道有两个底物入口,内表面由疏水性和极性残基排列,而另一个小的通道是酰基底物结合通道,内表面由疏水性氨基酸排列[55]。研究表明脂肪酶 Yju3p 的底物入口通道主要由来自盖子结构的疏水残基和催

化结构域的残基组成，且底物在两个结构域之间充当一个“楔子”作用[62]。酯酶 EprEst 的盖子结构和催化结构域在其界面上形成一个细长的底物结合口袋，从催化中心延伸到蛋白质表面，其中 6 个芳香氨基酸残基参与了底物和通道入口的形成[42]。酯酶 E53 催化活性口袋由 7 个 α-螺旋和 4 个 β-折叠组成，催化口袋呈“L”形，该区域包括 3 个部分：一个是催化中心区域，一个是底物通道入口，一个是底物结合口袋末端区域[57]。酯酶 EstDL136 则具有一个相对较浅的底物结合口袋，这是因为有 3 个残基 Trp86、Met211 和 Trp215 聚集在活性位点的底部，使得口袋相对较小，因此其最适底物为乙酸对硝基苯酯而不是丁酸对硝基苯酯，而在同源家族的其他酯酶中，该位点处会被其他侧链较小的氨基酸取代，活性口袋较大，因而表现出对长链底物的偏好性，说明活性口袋大小与其底物偏好性有密切关系[53]。

4.2 酯合成酶催化机制

不同来源的酯合成酶在催化合成酯类物质时具有相似的催化机制，其中酯酶遵循经典的 Michaelis-Menten 动力学方程，具有相对开放的活性位点，而脂肪酶则需要“界面激活”作用，即水不溶性底物（如三酰甘油、脂肪和其他不溶性底物）的羧基酯键在水和低水介质中的水解反应，遵循酶吸附到非均相界面并随后增强脂解活性，定义为“界面活化”[88]。该类酶在行使催化功能时需要经历盖子结构构象的改变，当酶的盖子结构打开，底物分子进入酶的催化活性中心，如图 4(a)和图 4(b)所示。丝氨酸的侧链羟基氧原子亲核攻击底物的羧基碳原子，电子转移到底物的羧基氧原子上生成氧负离子，并与氧阴离子洞的氢原子形成氢键，维持酶-底物复合物的稳定性；丝氨酸残基的氧原子和底物之间形成共价键产生四面体过渡态 1，如图 4(b)和图 4(c)所示。随后，释放水分子形成酰基丝氨酸，如图 4(c)和图 4(d)所示。醇进入催化活性中心，醇氧原子攻击酰基丝氨酸的羰基碳原子，形成四面体过渡态 2，如图 4(e)所示。最后，四面体过渡态 2 的碳原子与醇的氧原子形成共价键，丝氨酸侧链羟基氧原

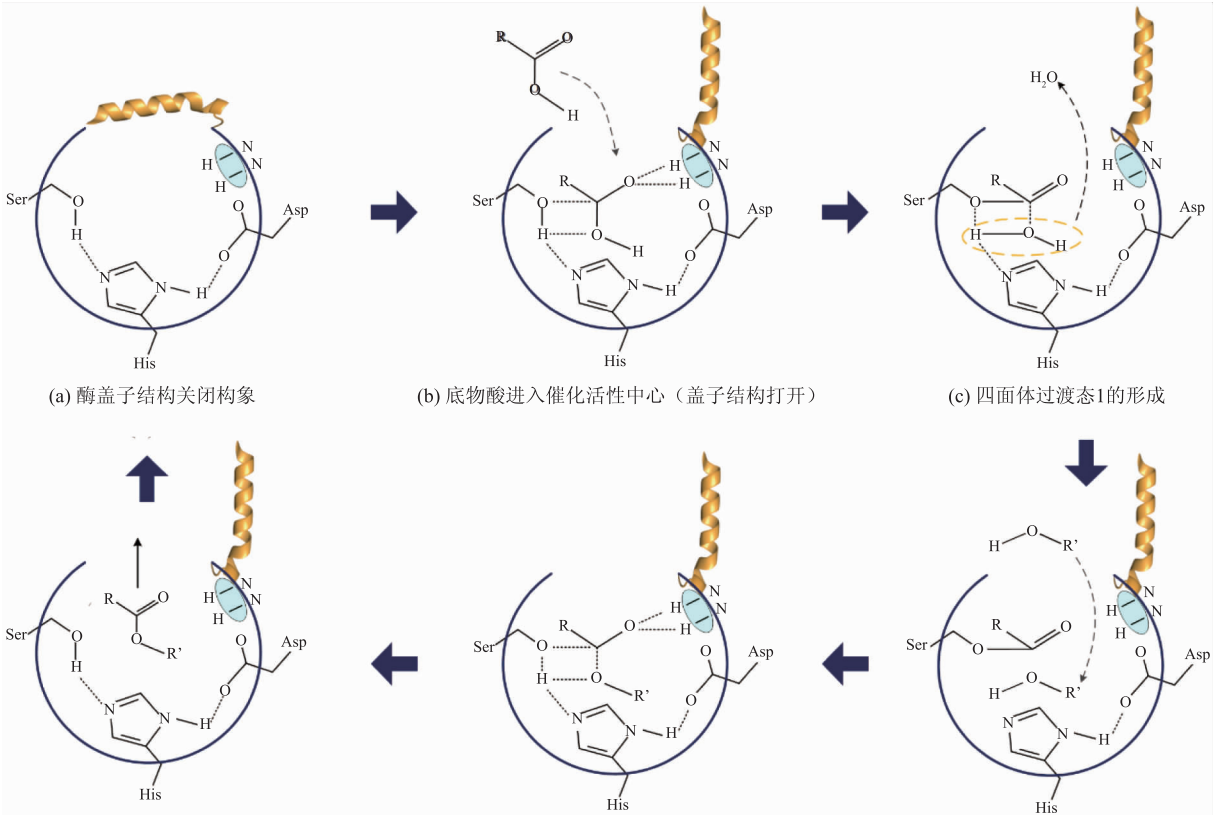


图 4 酶催化酯化反应机制

Fig. 4 Mechanism of esterification reaction catalyzed by enzyme

子与底物碳原子之间的共价键被打破,实现酯化反应,如图 4(f)所示[26]。

明晰酯合成酶催化机制对于指导生产过程中小分子脂肪酸乙酯的有效合成具有十分重要的作用。近年来,许多研究者聚焦于结构分析实现分子改造,通过提升酯酶的催化活性及其稳定性,来获得性能品质更优的酯酶,实现底物的高效转化以及产物的有效合成。

5 酯合成酶的分子改造

目前,酯合成酶的分子改造多聚焦于结构、催化活性中心以及与活性中心紧密联系的底物通道等酶蛋白结构区域,其中盖子结构的去除以及替换、盖子结构上的氨基酸残基以及底物通道或者底物结合位点处的关键氨基酸残基等点突变均为分子改造和催化机制研究的重要内容。表 5 中总结了

表 5 酯酶分子改造研究文献

Table 5 References in esterase molecular modification

酯酶	突变区域	突变策略	突变结果	参考文献
LIP05	盖子结构	去除	去除 N 端盖子结构,突变体 LIP05-50 酶活力增加,证明去除盖子结构可以使活性中心暴露,提高酶活力;稳定性下降证明盖子结构对维持酶结构的稳定性具有关键作用	[27]
T1	盖子结构	去除	突变酶活性位点暴露,省略盖子结构控制的界面活化步骤,底物可以直接与活性位点结合	[89]
AnFaeA	盖子结构	替换	疏水性盖子结构替换为亲水性盖子结构,将酶的特异性底物转变为水溶性底物,证明盖子结构的两亲性影响酶的底物特异性	[90]
TON-LPL	盖子结构	替换	N 端氨基酸替换为脂肪酶 TLIP 的盖子结构,特异性底物从单甘酯扩展到甘油三酯,证明盖子结构的替换改变底物特异性	[91]
Lipase	盖子结构	定点突变	突变体 Met93Ile 突变后使疏水性口袋缩小,影响底物结合亲和力;突变体 Thr96Asn 破坏 Lid 区域的氢键作用,破坏脂肪酶的结构	[92]
Est3563	—	定点突变	突变体 P218R、A242R 突变后使酶活力分别提高 2.5、2.1 倍,且影响盖子结构的稳定性,证明盖子结构的偏离可以扩大酯酶的结合口袋,从而提高酯酶活性	[93]
LipR1M1	—	定点突变	突变体 S130T 突变后从嗜热脂肪酶变为嗜冷脂肪酶,突变为 Thr130 后由于暴露于溶剂中,失去了与邻近氨基酸的氢键相互作用,从而增加了这种脂肪酶结构的灵活性	[94]
LipJ	—	定点突变	Gln121 位于表面结构的最长 Loop 环内,突变后 Arg121 与蛋白质中心的极性相互作用使 Loop 环固定,突变体热稳定性提升	[95]
MAS1	底物结合口袋	定点突变	突变体 H108A、F153A、V233A 突变后酶活力升高,证明空间位阻的降低可导致酶活力升高;F39A 突变后破坏氧阴离子洞;D137A 和 Q201A 突变后破坏氢键;突变体 V202A 和 V203A 突变后残基疏水性降低,促使底物与活性位点稳定结合,不利于底物释放,因此这些位点突变后酶活力降低	[96]
PEL	底物结合口袋	定点突变	突变体 V72A 突变后热稳定性下降,证明该位点突变使底物结合口袋氨基酸疏水性降低,且增加盖子结构灵活性	[97]
Est816	—	随机突变	突变体 A216V、K238N、L122A 突变后酶活力升高,突变体 A216V 增加了与内酯环的疏水相互作用,突变体 L122A 突变后减少了 L122 的长侧链和 HSL 的脂肪族尾部之间的空间碰撞	[98]
SMG1	盖子结构和烷基链结合裂缝	定点突变	W116 的侧链体积减小或亲水性增加有利于热稳定性;W229 和 F278 之间的 π 键堆积作用有利于稳定周围区域的构象和酶的热稳定性;W229 位点保持一定的空间位阻有利于维持酶活力	[99]
L1	Zn^{2+}结合位点	定点突变	Zn^{2+}对酶的结构稳定具有重要作用,突变破坏了 Zn^{2+}的结合位点,导致稳定性下降	[100]
PEL	底物通道	定点突变	突变体 I75A、V72A、F71A 突变后酶活力升高,证明降低底物通道入口空间位阻有利于底物进入活性中心;突变体 V237D、V237L、V237F 突变后酶活力降低,证明底物通道入口空间位阻影响酶活力	[101]
WT	—	定点突变	突变体 Pro247Ser 突变后使 Ser247 与 Glu250 和 Thr251 非常接近,从而引入了两个新的氢键,证明氢键是增强热稳定性的关键	[102]

目前酯酶的盖子结构以及关键位点突变改造的相关研究[27,89-102]。现有的大量研究通过酯酶形成氢键的氨基酸残基、氢键距离、疏水相互作用以及空间位阻等来分析酶催化的分子机制，进而采用去除或者替换盖子结构的分子改造方法来实现酶作用效率和应用性能的提升。

6 结 语

风味酯类物质的组成和比例对浓香型白酒的感官品质具有重要影响，其中脂肪酸乙酯因种类丰富和相对含量高，对酒体的感官品质的贡献尤为突出，而浓香型白酒酿造过程中的各类微生物对于酯类物质的生成十分关键。作者在分析浓香型白酒脂肪酸乙酯风味贡献基础上，系统总结了酿造过程酯合成相关的重要微生物以及相关酯合成酶的种类、序列、结构特征等，分析探讨了酯合成酶的催化机制以及相关酶的分子改造研究现状，在一定程度上为明晰浓香型白酒酿造过程中小分子脂肪酸乙酯的有效合成途径提供了新的视角和思路。然而，需要特别关注的是，浓香型白酒酿造过程中，尤其是在酒醅固态发酵阶段，酒醅含水量（质量分数）为53%~58%[32]，微生物与酶生长与作用的重要特征之一是处于水相体系中，这与现有的微生物来源酶催化酯合成在有机介质条件下的理论与机制存在较为显著的区别。因此，进一步深入探讨水相体系酯合成酶催化生成酯类化合物的相关分子机制，不仅能够为科学认知浓香型白酒风味酯的合成途径提供新的基础数据，更可为解析浓香型白酒风味化合物有效合成规律进而提升产品品质提供科学参考。

参考文献：

[1] XU Y, ZHAO J, LIU X, et al. Flavor mystery of Chinese traditional fermented Baijiu: the great contribution of ester compounds [J]. **Food Chemistry**, 2022, 369: 1-13.
[2] HONG J, ZHAO D, SUN B. Research progress on the profile of trace components in Baijiu [J/OL]. (2021-06-07)[2022-01-05]. http://doi.org/10.1080/87559129.2021.1936001.
[3] JIN G, ZHU Y, XU Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation[J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2017, 63: 18-28.
[4] HE Y, LIU Z, QIAN M, et al. Unraveling the chemosensory characteristics of strong-aroma type Baijiu from different regions using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry and descriptive sensory analysis[J]. **Food Chemistry**, 2020, 331: 1-10.
[5] HUANG Z, ZENG Y, SUN Q, et al. Insights into the mechanism of flavor compound changes in strong flavor Baijiu during storage by using the density functional theory and molecular dynamics simulation[J]. **Food Chemistry**, 2022, 373: 1-10.
[6] FAN W, QIAN M C. Characterization of aroma compounds of Chinese "Wuliangye" and "Jiannanchun" liquors by aroma extract dilution analysis[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, 54(7): 2695-2704.
[7] ZHAO D, SHI D, SUN J, et al. Characterization of key aroma compounds in Gujinggong Chinese Baijiu by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, and sensory evaluation[J]. **Food Research International**, 2018, 105: 616-627.
[8] ZHENG J, LIANG R, WU C, et al. Discrimination of different kinds of Luzhou-flavor raw liquors based on their volatile features [J]. **Food Research International**, 2014, 56: 77-84.
[9] LI H, WANG C, ZHU L, et al. Variations of flavor substances in distillation process of Chinses Luzhou-flavor liquor[J]. **Journal of Food Process Engineering**, 2012, 35(2): 1-13.
[10] DONG W, GUO R, LIU M, et al. Characterization of key odorants causing the roasted and mud-like aromas in strong-aroma types of base Baijiu[J]. **Food Research International**, 2019, 125: 1-13.
[11] HE X, GACA A, JELEN H H. Determination of volatile compounds in Baijiu using simultaneous chromatographic analysis on two columns: determination of volatile compounds in Baijiu using simultaneous chromatographic analysis on two columns [J]. **Journal of the Institute of Brewing**, 2020, 126(2): 206-212.
[12] SONG X, JING S, ZHU L, et al. Untargeted and targeted metabolomics strategy for the classification of strong aroma-type Baijiu (liquor) according to geographical origin using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry[J]. **Food Chemistry**, 2020, 314: 1-41.
[13] LIU H, SUN B. Effect of fermentation processing on the flavor of Baijiu [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,

2018,66(22):5425-5432.
[14] FAN W,QIAN M C. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese "Yanghe Daqu" liquors[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2005,53(20):7931-7938.
[15] 李贺贺,柳金龙,梁金辉,等. 2 种古井贡酒中挥发性成分的研究[J]. 食品科学技术学报,2016,34(1):55-65.
[16] 李贺贺,胡萧梅,李安军,等. 采用顶空固相微萃取和搅拌棒吸附萃取技术分析古井贡酒中香气成分[J]. 食品科学,2017,38(4):155-164.
[17] FAN W,QIAN M C. Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography olfactometry[J]. **Flavour and Fragrance Journal**,2006,21(2):333-342.
[18] WANG M Y,ZHANG Q,YANG J G,et al. Volatile compounds of Chinese Luzhou flavoured liquor distilled from grains fermented in 100 to 300 year - old cellars[J]. **Journal of the Institute of Brewing**,2020,126(1):116-130.
[19] WEI Y,ZOU W,SHEN C,et al. Basic flavor types and component characteristics of Chinese traditional liquors:a review[J]. **Journal of Food Science**,2020,85(12):4096-4107.
[20] HUANG Z,ZENG Y,LIU W,et al. Effects of metals released in strong-flavor Baijiu on the evolution of aroma compounds during storage[J]. **Food Science & Nutrition**,2020,8(4):1904-1913.
[21] WU Q,ZHU Y,FANG C,et al. Can we control microbiota in spontaneous food fermentation? Chinese liquor as a case example [J]. **Trends in Food Science & Technology**,2021,110:321-331.
[22] 王晓程,徐友强,李秀婷,等. 中国传统发酵食品来源典型小分子脂肪酸酯合成微生物及酶的研究进展[J]. 中国食品学报,2021,21(4):345-355.
[23] KRUIS A J,BOHNENKAMP A C,PATINIOS C,et al. Microbial production of short and medium chain esters:enzymes,pathways,and applications[J]. **Biotechnology Advances**,2019,37(7):1-19.
[24] LI W,WANG J H,ZHANG C Y,et al. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* genetic engineering on the production of acetate esters and higher alcohols during Chinese Baijiu fermentation[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2017,44(6):949-960.
[25] FAN G,ZHU Y,FU Z,et al. Optimization of fermentation conditions for the production of recombinant feruloyl esterase from *Burkholderia pyrrocinia* B1213[J]. **3 Biotech**,2020,10(5):1-15.
[26] XU Y,HUANG H,LU H,et al. Characterization of an *Aspergillus niger* for efficient fatty acid ethyl ester synthesis in aqueous phase and the molecular mechanism[J]. **Frontiers in Microbiology**,2022,12:1-16.
[27] XU Y,WANG X,LIU X,et al. Discovery and development of a novel short-chain fatty acid ester synthetic biocatalyst under aqueous phase from *Monascus purpureus* isolated from Baijiu[J]. **Food Chemistry**,2021,338:1-11.
[28] 刘雪,杨爱华,张学梅,等. 华根霉生物酶法合成己酸乙酯条件的研究[J]. 酿酒科技,2017(2):57-60.
[29] LEVISSON M,VAN DER OOST J,KENGEN S W M. Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles[J]. **Extremophiles**,2009,13(4):567-581.
[30] LAM L,ILIES M A. Evaluation of the impact of esterases and lipases from the circulatory system against substrates of different lipophilicity[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2022,23(3):1-14.
[31] JAEGER K E,DIJKSTRA B W,REETZ M T. Bacterial biocatalysts:molecular biology,three-dimensional structures,and biotechnological applications of lipases[J]. **Annual Review of Microbiology**,1999,53(1):315-351.
[32] YANG K S,SUNG B H,PARK M K,et al. Recombinant lipase engineered with amphipathic and coiled-coil peptides[J]. **ACS Catalysis**,2015,5(9):5016-5025.
[33] KAPOOR M,GUPTA M N. Lipase promiscuity and its biochemical applications[J]. **Process Biochemistry**,2012,47(4):555-569.
[34] ZHAO J,LIU S,GAO Y,et al. Characterization of a novel lipase from *Bacillus licheniformis* NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2,4-*D* butyl ester[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2021,176:126-136.
[35] FOJAN P. What distinguishes an esterase from a lipase:a novel structural approach[J]. **Biochimie**,2000,82(11):1033-1041.
[36] CHAHINIANA H,SARDA L. Distinction between esterases and lipases:comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases[J]. **Protein & Peptide Letters**,2009,16(10):1149-1161.
[37] AGRAWAL P B,AGRAWAL P B,NIERSTRASZ V A,et al. Cutinase and pectinase in cotton bioscouring:an innovative and

fast bioscouring process[J]. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2008, 26(5): 412-421.

[38] HOLMQUIST M. Alpha beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms[J]. **Current Protein and Peptide Science**, 2000, 1(2): 209-235.

[39] RAUWERDINK A, KAZLAUSKAS R J. How the same core catalytic machinery catalyzes 17 different reactions: the serine-histidine-aspartate catalytic triad of α/β-hydrolase fold enzymes[J]. **ACS Catalysis**, 2015, 5(10): 6153-6176.

[40] WEI X, WANG Y L, WEN B T, et al. The α-helical cap domain of a novel esterase from gut *Alistipes shahii* shaping the substrate-binding pocket[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2021, 69(21): 6064-6072.

[41] KHAN F I, LAN D, DURRANI R, et al. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties [J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2017, 5: 1-13.

[42] ZHU C, CHEN Y, ISUPOV M N, et al. Structural insights into a novel esterase from the east pacific rise and its improved thermostability by a semirational design[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2021, 69(3): 1079-1090.

[43] SAYER C, ISUPOV M N, BONCH-OSMOLOVSKAYA E, et al. Structural studies of a thermophilic esterase from a new *Planctomycetes* species, *Thermogutta terrifontis*[J]. **FEBS Journal**, 2015, 282(15): 2846-2857.

[44] FOROUHAR F, YANG Y, KUMAR D, et al. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2005, 102(5): 1773-1778.

[45] LI Z, LI L, HUO Y, et al. Structure-guided protein engineering increases enzymatic activities of the SGNH family esterases[J]. **Biotechnology for Biofuels**, 2020, 13(1): 1-14.

[46] DE SANTI C, LEIROS H K S, SCALA A, et al. Biochemical characterization and structural analysis of a new cold-active and salt-tolerant esterase from the marine bacterium *Thalassospira* sp.[J]. **Extremophiles**, 2016, 20(3): 323-336.

[47] WILKINSON R C, RAHMAN POUR R, JAMSHIDI S, et al. Extracellular alpha/beta-hydrolase from *Paenibacillus* species shares structural and functional homology to tobacco salicylic acid binding protein 2[J]. **Journal of Structural Biology**, 2020, 210(3): 1-10.

[48] CEA-RAMA I, COSCOLIN C, KATSONIS P, et al. Structure and evolutionary trace-assisted screening of a residue swapping the substrate ambiguity and chiral specificity in an esterase[J]. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2021, 19: 2307-2317.

[49] GIUNTA C I, CEA-RAMA I, ALONSO S, et al. Tuning the properties of natural promiscuous enzymes by engineering their nano-environment[J]. **ACS Nano**, 2020, 14(12): 17652-17664.

[50] SAYER C, FINNIGAN W, ISUPOV M N, et al. Structural and biochemical characterisation of *Archaeoglobus fulgidus* esterase reveals a bound CoA molecule in the vicinity of the active site[J]. **Scientific Reports**, 2016, 6(1): 1-13.

[51] LUAN Z J, LI F L, DOU S, et al. Substrate channel evolution of an esterase for the synthesis of cilastatin[J]. **Catalysis Science & Technology**, 2015, 5(5): 2622-2629.

[52] YANG S, QIN Z, DUAN X, et al. Structural insights into the substrate specificity of two esterases from the thermophilic *Rhizomucor miehei*[J]. **Journal of Lipid Research**, 2015, 56(8): 1616-1624.

[53] KIM S H, KANG P A, HAN K, et al. Crystal structure of chloramphenicol-metabolizing enzyme EstDL136 from a metagenome [J]. **PLoS One**, 2019, 14(1):1-12.

[54] LI P Y, CHEN X L, JI P, et al. Interdomain hydrophobic interactions modulate the thermostability of microbial esterases from the hormone-sensitive lipase family[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2015, 290(17): 11188-11198.

[55] CAVAZZINI D, GROSSI G, LEVATI E, et al. A family of archaea-like carboxylesterases preferentially expressed in the symbiotic phase of the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*[J]. **Scientific Reports**, 2017, 7(1): 1-15.

[56] LI H, PU H. Crystal structure of methylesterase family member 16 (MES16) from *Arabidopsis thaliana*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2016, 474(1): 226-231.

[57] DING Y, NIE L, YANG X C, et al. Mechanism and structural insights into a novel esterase, E53, isolated from *Erythrobacter longus*[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2022, 12: 1-12.

[58] PERZ V, BAUMSCHLAGER A, BLEYMAIER K, et al. Hydrolysis of synthetic polyesters by *Clostridium botulinum* esterases: polyesterases from *Clostridium*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2016, 113(5): 1024-1034.

[59] MOHARANA T R, PAL B, RAO N M. X-ray structure and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus*

thermoleovorans[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,2019,508(1):145-151.
[60] KUMAR M,MUKHERJEE J,SINHA M,et al. Enhancement of stability of a lipase by subjecting to three phase partitioning (TPP):structures of native and TPP-treated lipase from *Thermomyces lanuginosa*[J]. **Sustainable Chemical Processes**,2015,3(1):1-10.
[61] ZHAO Z,HOU S,LAN D,et al. Crystal structure of a lipase from *Streptomyces* sp. strain W007 - implications for thermostability and regiospecificity[J]. **FEBS Journal**,2017,284(20):3506-3519.
[62] ASCHAUER P,RENGACHARI S,LICHTENEGGER J,et al. Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* monoglyceride lipase Yju3p[J]. **Molecular and Cell Biology of Lipids**,2016,1861(5):462-470.
[63] MARTINI V P,KRIEGER N,GLOGAUER A,et al. Structure solution and analyses of the first true lipase obtained from metagenomics indicate potential for increased thermostability[J]. **New Biotechnology**,2019,53:65-72.
[64] DROR A,KANTEEV M,KAGAN I,et al. Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2015,99(22):9449-9461.
[65] BIUNDO A,HROMIC A,PAVKOV-KELLER T,et al. Characterization of a poly (butylene adipate-co-terephthalate) -hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2016,100(4):1753-1764.
[66] HUANG J,HUO Y Y,JI R,et al. Structural insights of a hormone sensitive lipase homologue Est22[J]. **Scientific Reports**,2016,6(1):1-12.
[67] ASCHAUER P,ZIMMERMANN R,BREINBAUER R,et al. The crystal structure of monoacylglycerol lipase from *M. tuberculosis* reveals the basis for specific inhibition[J]. **Scientific Reports**,2018,8(1):1-9.
[68] HUANG W,LAN D,POPOWICZ G M,et al. Structure and characterization of *Aspergillus fumigatus* lipase B with a unique, oversized regulatory subdomain[J]. **FEBS Journal**,2019,286(12):2366-2380.
[69] RAJA A B D, RAHMAN R N Z,MOHD S F,et al. 3D structure elucidation of thermostable L2 lipase from thermophilic *Bacillus* sp. L2[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2012,13(7):9207-9217.
[70] BORDES F,BARBE S,ESCALIER P,et al. Exploring the conformational states and rearrangements of *Yarrowia lipolytica* lipase [J]. **Biophysical Journal**,2010,99(7):2225-2234.
[71] BIAN C,YUAN C,CHEN L,et al. Crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Penicillium expansum* at 1.3 Å determined by sulfur SAD[J]. **Proteins:Structure,Function,and Bioinformatics**,2010,78(6):1601-1605
[72] ANGKAWIDJAJA C,MATSUMURA H,KOGA Y,et al. X-ray crystallographic and md simulation studies on the mechanism of interfacial activation of a family i.3 lipase with two lids[J]. **Journal of Molecular Biology**,2010,400(1):82-95.
[73] GUO S,XU J,PAVLIDIS I V,et al. Structure of product-bound SMG1 lipase:active site gating implications[J]. **FEBS Journal**,2015,282(23):4538-4547.
[74] ALI S,KHAN F I,CHEN W,et al. Open and closed states of Mrlip1 DAG lipase revealed by molecular dynamics simulation[J]. **Molecular Simulation**,2018,44(18):1520-1528.
[75] RADE L L,DA SILVA M N P,VIEIRA P S,et al. A novel fungal lipase with methanol tolerance and preference for macaw palm oil[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**,2020,8:1-15.
[76] VIEGAS A,DOLLINGER P,VERMA N,et al. Structural and dynamic insights revealing how lipase binding domain MD1 of *Pseudomonas aeruginosa* foldase affects lipase activation[J]. **Scientific Reports**,2020,10(1):1-15.
[77] VERMA N,DOLLINGER P,KOVACIC F,et al. The membrane-integrated steric chaperone lif facilitates active site opening of *Pseudomonas aeruginosa* lipase A[J]. **Journal of Computational Chemistry**,2020,41(6):500-512.
[78] PAUWELS K,LUSTIG A,WYNS L,et al. Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate [J]. **Nature Structural & Molecular Biology**,2006,13(4):374-375.
[79] ZHANG M,YU X W,XU Y,et al. Structural basis by which the N-terminal polypeptide segment of *Rhizopus chinensis* lipase regulates its substrate binding affinity[J]. **Biochemistry**,2019,58(38):3943-3954.
[80] XU J,CEN Y,SINGH W,et al. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters[J]. **Journal of the American Chemical Society**,2019,141(19):7934-7945.
[81] ISHAK S N H,KAMARUDIN N H A,ALI M S M,et al. Structure elucidation and docking analysis of 5M mutant of T1 lipase *Geobacillus zalihae*[J]. **PLoS One**,2021,16(6):1-20.
[82] ASLER I L,STEFANIC Z,MARAVELSKI A,et al. The catalytic dyad in the sgnh hydrolase superfamily:in-depth insight into

structural parameters tuning catalytic process of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus* [J]. **ACS Chemical Biology**, 2017, 12(7): 1928-1936.

[83] CEN Y, SINGH W, ARKIN M, et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution[J]. **Nature Communications**, 2019, 10(1): 1-10.

[84] DIMITRIOU P S, DENESYUK A I, NAKAYAMA T, et al. Distinctive structural motifs co-ordinate the catalytic nucleophile and the residues of the oxyanion hole in the alpha/beta-hydrolase fold enzymes[J]. **Protein Science**, 2019, 28(2): 344-364.

[85] BASSEGODA A, FILLAT A, PASTOR F I J, et al. Special *Rhodococcus* sp. CR-53 esterase Est4 contains a GGG(A)X-oxyanion hole conferring activity for the kinetic resolution of tertiary alcohols[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(19): 8559-8568.

[86] FILLAT A, ROMEA P, URPI F, et al. Improving enantioselectivity towards tertiary alcohols using mutants of *Bacillus* sp. BP-7 esterase EstBP7 holding a rare GGG(X)-oxyanion hole[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(10): 4479-4490.

[87] INFANZON B, SOTELO P H, MARTINEZ J, et al. Rational evolution of the unusual Y-type oxyanion hole of *Rhodococcus* sp. CR53 lipase LipR[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2018, 108: 26-33.

[88] SILVESTRINI L, CIANCI M. Principles of lipid-enzyme interactions in the limbus region of the catalytic site of *Candida antarctica* lipase B[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020, 158: 358-363.

[89] MOHAMED R A, SALLEH A B, LEOW T C, et al. Site-directed mutagenesis: role of lid region for T1 lipase specificity[J]. **Protein Engineering, Design and Selection**, 2018, 31(6): 221-229.

[90] YU X W, ZHU S S, XIAO R, et al. Conversion of a *Rhizopus chinensis* lipase into an esterase by lid swapping[J]. **Journal of Lipid Research**, 2014, 55(6): 1044-1051.

[91] SONI S, SATHE S S, SHETH R R, et al. N-terminal domain replacement changes an archaeal monoacylglycerol lipase into a triacylglycerol lipase[J]. **Biotechnology for Biofuels**, 2019, 12(1): 1-11.

[92] ZHU S S, LI M, YU X, et al. Role of Met93 and Thr96 in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2013, 170(2): 436-447.

[93] REN L Q, CHANG T T, REN D P, et al. Rational design to improve activity of the Est3563 esterase from *Acinetobacter* sp. LMB-5[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2019, 131: 1-8.

[94] SHARMA M, KUMAR R, SINGH R, et al. Thirty-degree shift in optimum temperature of a thermophilic lipase by a single-point mutation: effect of serine to threonine mutation on structural flexibility[J]. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2017, 430(1/2): 21-30.

[95] GOOMBER S, KUMAR R, SINGH R, et al. Point mutation Gln121Arg increased temperature optima of *Bacillus* lipase (1.4 subfamily) by fifteen degrees[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016, 88: 507-514.

[96] ZHAO G, WANG J, TANG Q, et al. Improving the catalytic activity and thermostability of MAS1 lipase by alanine substitution [J]. **Molecular Biotechnology**, 2018, 60(4): 319-328.

[97] TANG L, SU M, ZHU L, et al. Substitution of Val72 residue alters the enantioselectivity and activity of *Penicillium expansum* lipase[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2013, 29(1): 145-151.

[98] LIU X, CAO L C, FAN X J, et al. Engineering of a thermostable esterase Est816 to improve its quorum-quenching activity and the underlying structural basis[J]. **Scientific Reports**, 2016, 6(1): 1-11.

[99] GAO C, LAN D, LIU L, et al. Site-directed mutagenesis studies of the aromatic residues at the active site of a lipase from *Malassezia globosa*[J]. **Biochimie**, 2014, 102: 29-36.

[100] CHOI W C, KIM M H, RO H S, et al. Zinc in lipase L1 from *Geobacillus stearothermophilus* L1 and structural implications on thermal stability[J]. **FEBS Letters**, 2005, 579(16): 3461-3466.

[101] TANG L, SU M, CHI L, et al. Residue Val237 is critical for the enantioselectivity of *Penicillium expansum* lipase [J]. **Biotechnology Letters**, 2014, 36(3): 633-639.

[102] CHOPRA N, KUMAR A, KAUR J. Structural and functional insights into thermostable and organic solvent stable variant Pro247Ser of *Bacillus* lipase[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 108: 845-852.