

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.08.004

# 乙酸-2-苯乙酯的合成途径与调节研究<sup>①</sup>

宋娟, 张霁红, 康三江, 胡生海, 李明泽

甘肃省农业科学院农产品贮藏加工研究所, 兰州 730070

**摘要:** 为了研究苹果醋发酵过程中的特征性香气成分乙酸-2-苯乙酯的合成途径和调节, 采用反应体系跟踪法检测各合成相关基质的浓度变化, 发现在苹果醋发酵第 7d 后, 乙酸-2-苯乙酯开始大量生成, 第 30 d 达到最高值; 根据分析乙酸-2-苯乙酯与其合成基质, AAT, Esterase 酶活浓度之间的相关系数, 初步确定乙酸-2-苯乙酯的合成途径同时存在酯酶途径和醇酰基转移酶途径, 推测醇酰基转移酶途径可能是主要的合成途径, 醇酰基转移酶可能是关键酶; 通过外源加标法, 检测到 8 g/L 是 L-苯丙氨酸的最佳添加质量浓度, 可以有效增加苹果醋的香气成分的生成量和醋酸质量浓度, 进而提高苹果醋制品独特的香味和风味. 研究结果为苹果醋制品香气成分和风味物质的深入研究和其关键工艺控制点提供了一定的参考依据.

**关键词:** 苹果醋; 乙酸-2-苯乙酯; 合成途径; 调节

**中图分类号:** Q54; TS275.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2018)08-0025-07

苹果醋是鲜榨苹果经过液态或固态发酵所获得的苹果原醋<sup>[1]</sup>, 再加以调制而成的醋饮料, 由于具有特有的苹果香气物质而备受消费者青睐<sup>[2]</sup>, 已经成为果醋饮料、调味品和保健营养食品等行业普遍运用的主要原料醋<sup>[3]</sup>.

乙酸-2-苯乙酯(acetic acid 2-phenylethyl ester,  $C_{10}H_{12}O_2$ , 103-45-7), 具有水果香味的酯类化合物, 是果品加工发酵过程中主要的特征性香气成分和风味物质<sup>[4-5]</sup>. 目前, 关于乙酸-2-苯乙酯的研究主要集中在白酒<sup>[6-7]</sup>、啤酒<sup>[8]</sup>、葡萄酒<sup>[9-10]</sup>、米酒<sup>[11]</sup>、脐橙酒<sup>[12]</sup>、甘薯酒<sup>[13]</sup>、酒醋<sup>[14]</sup>等酿酒行业, 刺梨果汁<sup>[15]</sup>、马铃薯醋<sup>[16]</sup>、麸醋<sup>[17]</sup>、醋醅<sup>[18]</sup>等酿醋行业, 以及香精<sup>[19]</sup>、烟草<sup>[20]</sup>、玫瑰<sup>[21]</sup>、链球菌<sup>[22]</sup>等其他领域. 国外学者在酵母发酵酒精类饮料(如啤酒、清酒)的过程中, 发现酯类化合物的合成途径有两条: ① 在酯酶(Esterase)的催化下由酸类和醇类缩合而成, 酯酶是一种可逆酶, 发酵液中的酯也可能被该酶水解成相应的醇和脂肪酸; ② 在醇酰基转移酶(AAT)的作用下由酰基辅酶 A 和醇类形成<sup>[23-24]</sup>. 目前, 可以通过化学酶法<sup>[25-27]</sup>和氨基磺酸催化酯化合成法<sup>[28]</sup>检测酯类化合物的合成途径. 然而, 有关苹果醋发酵过程中酯类化合物乙酸-2-苯乙酯合成途径的研究还未见报道.

本试验针对苹果醋动态发酵的不同时间段进行取样, 采用 HS-SPME-GC-MS 技术, 通过反应体系跟踪法和外源加标法, 初步分析乙酸-2-苯乙酯的合成途径与调节, 为苹果醋制品香气成分和风味物质的深入研究和其关键工艺控制点提供一定的参考依据.

① 收稿日期: 2017-12-28

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-27); 国家自然科学基金项目(31460449); 甘肃省农业科学院农业科技创新专项中青年创新基金项目(2016GAAS49).

作者简介: 宋娟(1988-), 女, 硕士研究生, 研究实习员, 主要从事农产品贮藏与加工的研究.

通信作者: 张霁红, 副研究员.

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料与试剂

### 1.1.1 材料

富士苹果, 甘肃庆阳.

菌种 1750, 20056, 购于中国食品发酵工业研究院有限公司.

### 1.1.2 培养基

马铃薯培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 自来水 1 000 mL, pH 值为 6.0; 液体培养基: 葡萄糖 1%, 酵母粉 1%, pH 值为 4.5.

121 °C, 30 min 高压灭菌, 备用.

### 1.1.3 试剂

氢氧化钠(粒): 分析纯, 天津大茂; 葡萄糖: 上海广诺; 酵母粉: 北京奥博星; 琼脂: 上海致化; 无水乙醇、碳酸钙: 天津光复; 果胶酶(>50 000 u/g): 上海源聚; 乙酸、乙醇、 $\beta$ -苯乙醇、乙酸-2-苯乙酯: 色谱纯, 上海阿拉丁; 3-辛醇: 色谱纯, 589-98-0, 美国 Sigma; L-苯丙氨酸(99.5%): 食品级, 湖南奥驰; 植物乙酰辅酶 A(A-CoA)ELISA 试剂盒、植物醇酰基转移酶(AAT)ELISA 试剂盒、植物酯酶(Esterase)ELISA 试剂盒: 北京冬歌.

## 1.2 试验仪器

BSA224S-CW 电子天平: 赛多利斯; YXQ-LS 立式压力蒸汽灭菌锅: 上海博讯; ZHJH-C1112B 超净工作台: 上海智城; ZWY-2102 恒温培养振荡器: 上海智城; LRH-250 生化培养箱: 上海一恒; TGL-16MC 冷冻离心机: 长沙维尔康; HH-S4 电热恒温水浴锅: 北京科伟; KDM-2000 型可调式电热套: 北京科伟; PZJ-0.5 型榨汁机: 江苏科威; 三重四级杆气质联用仪: GC(TRACE 1310), MS(ISQ-LT), 美国赛默飞世尔; Synergy H1 酶标仪: Gene Company Limited.

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 工艺流程

富士苹果→选、洗、榨→弃苹果渣→果胶酶处理苹果汁→酵母菌液(酒精发酵)→醋酸菌液(醋酸发酵)→陈酿→苹果醋

### 1.3.2 菌种活化

用 75% 酒精棉擦拭菌种冻干管表面进行消毒, 将管顶端在酒精灯外焰上均匀加热; 在加热部位立即滴 2~3 滴无菌水, 用镊子敲打使管壁破裂; 用无菌吸管吸取 0.5 mL 左右液体培养基于冻干管中将冻干菌粉全部溶解; 将溶解后的菌悬液转移至盛有 5 mL 液体培养基的试管中, 将试管于 24 °C (CICC1750)/ 28 °C (CICC20056) 恒温培养箱内静置培养. 因为菌种经过冻干保藏后, 处于休眠状态, 一代菌种需适当延长培养时间, 转接至 2~3 代恢复活力, 备用.

### 1.3.3 苹果汁制备

将富士苹果首先分选、清洗, 然后破碎、榨汁, 最后添加 0.04% 果胶酶, 45 °C 酶解 1 h, 90 °C 杀菌 10 min, 过滤, 备用.

### 1.3.4 酒精发酵和醋酸发酵

苹果汁 1 000 mL, 首先接入 8% 酵母菌液, 24 °C, 密封, 进行酒精发酵, 连续检测苹果汁发酵液中酒精体积分数不增加、糖度不降低时, 结束酒精发酵; 然后接入 10% 醋酸菌液, 28 °C, 进行醋酸发酵. 对苹果醋发酵过程中不同时间段进行取样, 分别检测酒精度和醋酸质量浓度.

### 1.3.5 测定方法

#### 1.3.5.1 挥发性物质

在李小慧<sup>[29]</sup>、张雪寒等<sup>[30]</sup>、周倩等<sup>[31]</sup>报道的香气成分分析方法的基础上进行优化, 获得符合苹果醋发酵过程中挥发性物质分析的 HS-SPME-GC-MS 条件, 具体如下:

1) 顶空固相微萃取法: 样品前处理采用 SPME 法处理, 分别取 5 mL 样品加入 50  $\mu\text{L}$  3-辛醇内标, 漩涡混匀, 装入 15 mL 顶空瓶中, 样品由 TriPlus RSH Autosampler-SPME 系统处理, 萃取头: 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS 萃取头. 萃取条件: 60.0  $^{\circ}\text{C}$  吸附 40 min, 保温 5 min. 外标标准品母液 1 000 mg/L, 100 mL 纯乙醇 + 0.1 g 外标(乙酸、 $\beta$ -苯乙醇、乙酸-2-苯乙酯), 外标测试样品准备 A 液 10 mL(4% 乙醇溶液)+10  $\mu\text{L}$  待测母液, 样品瓶 5 mL+50  $\mu\text{L}$  3-辛醇内标.

2) 气相色谱 GC 条件: 进样口温度 25  $^{\circ}\text{C}$ , 载气 He, 流速 1.2 mL/min. 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 分流进样, 分流比 40:1. 色谱柱为 DB-WAX(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ ), 升温程序 40  $^{\circ}\text{C}$  恒温 2 min, 以 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 180  $^{\circ}\text{C}$ , 然后从 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升到 230  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min.

3) 质谱 MS 条件: EI 电离源, 电子能量 70eV, 离子源温度 200  $^{\circ}\text{C}$ , 接口温度 250  $^{\circ}\text{C}$ . 扫描范围 33.00~350.00 amu.

4) 酒精度<sup>[32]</sup>: 以乙醇计, GB 5009.225-2016, 密度瓶法测定.

### 1.3.5.2 乙酰辅酶 A, AAT, Esterase 酶活性<sup>[33]</sup>

利用北京冬歌生物科技有限公司 ELISA 试剂盒进行乙酰辅酶 A, AAT, Esterase 酶活性的测定, 即采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验, 根据试剂盒说明, 依次加入待测样品 10  $\mu\text{L}$ , 标准品 50  $\mu\text{L}$ , HRP 标记的检测抗体 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温育后洗涤. 底物 TMB 颜色的深浅和样品中的植物乙酰辅酶 A(A-CoA), AAT, Esterase 呈正相关. 用酶标仪测定 450 nm 波长处各孔的 OD 值, 计算样品酶活浓度.

## 1.4 数据处理

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 采用 Origin 8.5 软件作图.

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果醋发酵过程中酒精度和醋酸质量浓度变化

苹果醋动态发酵过程包括酒精发酵和醋酸发酵, 检测到苹果汁发酵液在第 7 d 的酒精体积分数不再增加、糖度不再降低, 即酒精发酵结束; 然后接入醋酸菌液进行醋酸发酵和陈酿. 从图 1 可以看出, 随着发酵时间的增加, 酒精度达到峰值后开始降低, 而醋酸质量浓度逐渐升高后趋于平缓. 这是因为在苹果醋发酵过程中, 酒精发酵是葡萄糖通过 EMP 途径生成丙酮酸, 丙酮酸脱羧生成乙醛, 乙醛进一步被还原为乙醇, 进而醋酸发酵将乙醇在脱氢酶的催化下生成乙酸, 多种微生物参与调控苹果醋发酵的整个阶段.

### 2.2 特征性香气成分乙酸-2-苯乙酯的合成途径

#### 2.2.1 合成乙酸-2-苯乙酯相关基质的浓度变化

苹果醋动态发酵过程中, 与乙酸-2-苯乙酯合成直接相关的组分有  $\beta$ -苯乙醇、乙酸和乙酰辅酶 A. 从图 2 可以看出, 发酵液中  $\beta$ -苯乙醇在第 5 d 达到最大值 99.84 mg/L, 接着大幅度下降后趋于平稳(图 2a); 乙酸质量浓度从第 5 d 开始大幅度升高, 第 14 d 后保持平缓增长(图 2b); 乙酰辅酶 A 在第 12 d 达到最大值后开始下降(图 2c); 乙酸-2-苯乙酯质量浓度从第 7 d 开始急剧增高, 在发酵第 30 d 达到最高值, 然后虽稍有下降, 但仍然保持较高水平(图 2d).

#### 2.2.2 合成乙酸-2-苯乙酯的主要酶活性变化

苹果醋动态发酵过程中, 与乙酸-2-苯乙酯合成途径直接相关的酶有醇酰基转移酶(AAT)、酯酶(Esterase). 从图 3a 可以看出, 随着苹果醋发酵时间的延长, AAT 酶活性在酒精发酵第 3 d 达到峰值后开始大幅度下降, 直至苹果醋陈酿第 90 d 降至最低, 表明 AAT 在苹果醋发酵前期逐渐积累, 发酵后期快速消耗;

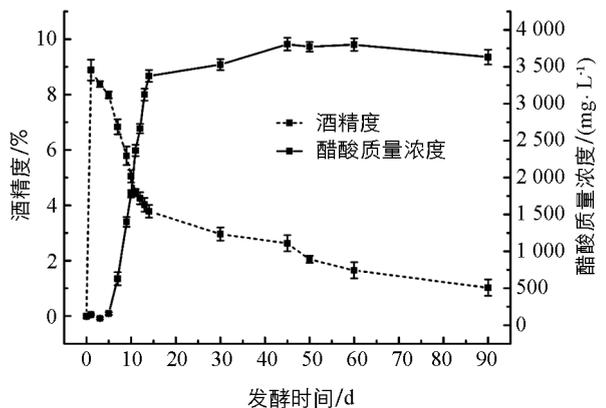
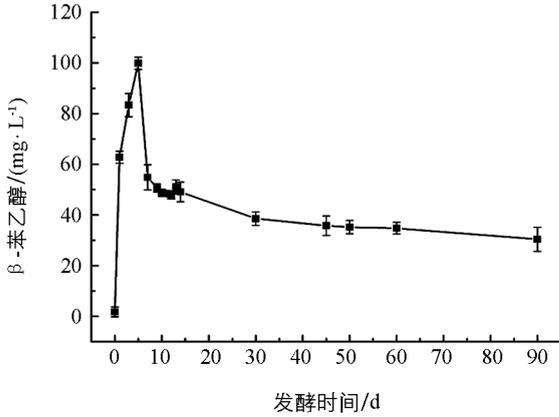
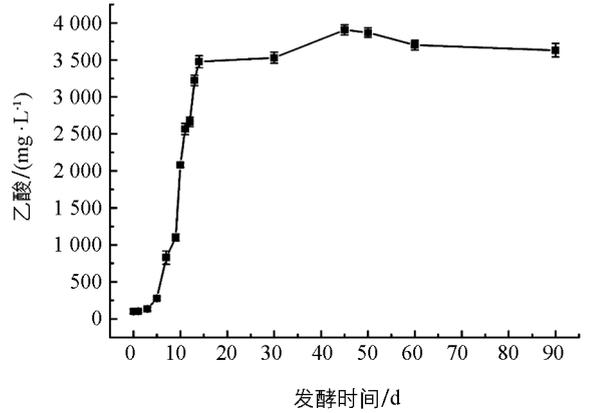


图 1 发酵过程中酒精度和醋酸质量浓度的变化

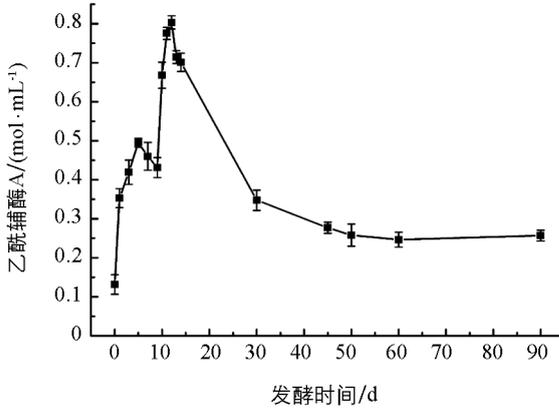
Esterase 酶活性呈“M”形变化规律,即呈现先上升后下降至某水平再次出现先上升后下降的动态变化趋势,酯酶是一种可逆酶,既可以催化发酵液中的酸和醇缩合生成相应的酯,又可以将生成的酯水解成相应的酸和醇(图 3b)。



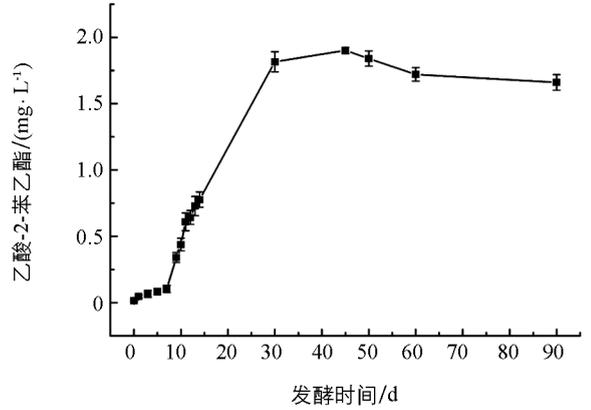
(a) 发酵过程中  $\beta$ -苯乙醇的质量浓度变化



(b) 发酵过程中乙酸的质量浓度变化

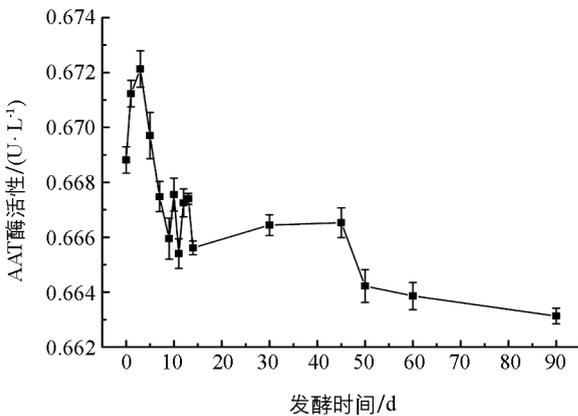


(c) 发酵过程中乙酰辅酶A的质量浓度变化

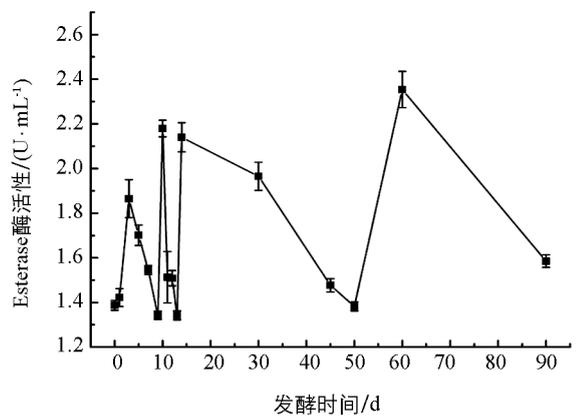


(d) 发酵过程中乙酸-2-苯乙酯的质量浓度变化

图 2 合成乙酸-2-苯乙酯相关基质的质量浓度变化



(a) 发酵过程中酞酰基转移酶(AAT)的酶活性变化



(b) 发酵过程中酯酶(Esterase)的酶活性变化

图 3 合成乙酸-2-苯乙酯的主要酶活性变化

### 2.2.3 合成乙酸-2-苯乙酯各基质的相关性分析

根据苹果醋发酵液中相关基质质量浓度和 AAT, Esterase 酶活性变化的相关系数, 可以确定合成乙酸-2-苯乙酯各基质变量之间相互关系的密切程度, 初步推测乙酸-2-苯乙酯的合成途径. 本试验从乙

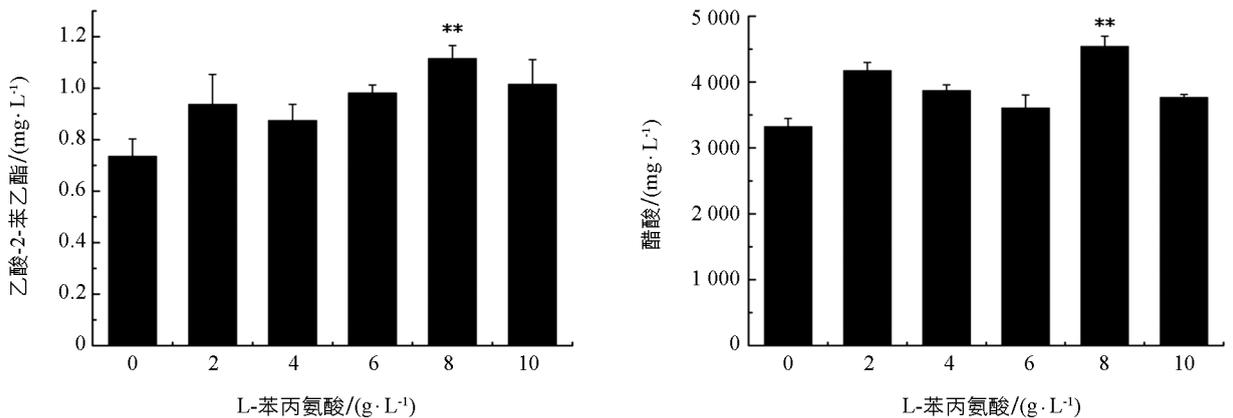
酸-2-苯乙酯已经大量、充分形成, 但还没有完全进入目标物质合成阶段的时间点开始进行相关性统计分析. 从表 1 可以发现, 乙酸-2-苯乙酯与  $\beta$ -苯乙醇, 乙酸, 乙酰辅酶 A, AAT, Esterase 之间均存在一定的相关性, 表明在苹果醋发酵过程中同时存在合成乙酸-2-苯乙酯的酯酶途径和醇酰基转移酶途径,  $\beta$ -苯乙醇, 乙酸, 乙酰辅酶 A, AAT 和 Esterase 都是影响乙酸-2-苯乙酯合成途径的限制性因素. 此外, 相关系数的绝对值越大, 相关性越强. 乙酸-2-苯乙酯与乙酰辅酶 A 的相关系数绝对值大于乙酸-2-苯乙酯与乙酸的相关系数绝对值, 乙酸-2-苯乙酯与 AAT 的相关系数大于乙酸-2-苯乙酯与 Esterase 的相关系数, 表明乙酸-2-苯乙酯的合成与乙酰辅酶 A, AAT 的相关程度更高, 初步推测合成乙酸-2-苯乙酯的主要途径可能是醇酰基转移酶途径, 醇酰基转移酶可能是关键酶.

表 1 合成乙酸-2-苯乙酯各基质的相关性系数 ( $p < 0.01$ )

指标	$\beta$ -苯乙醇	乙酸	乙酰辅酶 A	AAT	Esterase
乙酸-2-苯乙酯	-0.973 9	-0.623 2	-0.979 9	0.945 7	0.402 7

### 2.3 特征性香气成分乙酸-2-苯乙酯的调节

在苹果醋动态发酵过程中的不同发酵阶段, 通过外源加标法检测乙酸-2-苯乙酯的生成量. 因为酵母自身合成  $\beta$ -苯乙醇浓度比较低, 而以 L-苯丙氨酸为底物, 由酵母细胞生物催化合成  $\beta$ -苯乙醇的主要途径包括: L-苯丙氨酸通过转氨酶作用形成苯丙酮酸, 苯丙酮酸在苯丙酮酸脱羧酶作用下脱羧形成苯乙醛, 苯乙醛再通过醇脱氢酶催化生成  $\beta$ -苯乙醇. 所以, L-苯丙氨酸可作为食品添加剂加入发酵液中, 通过艾利希途径<sup>[34]</sup>能使发酵液中香气成分和风味物质的生成量大幅度提高. 从图 4 可以看出, 和对照样相比, 随着 L-苯丙氨酸添加量的增加, 乙酸-2-苯乙酯的质量浓度极显著增加(图 4a,  $p < 0.01$ ), 同时也发现苹果醋发酵过程中醋酸质量浓度也随着 L-苯丙氨酸添加量的增加而极显著增加(图 4b,  $p < 0.01$ ). 其中, 当 L-苯丙氨酸添加量大于 8 g/L 时, 乙酸-2-苯乙酯和醋酸的质量浓度均降低. 综上所述, L-苯丙氨酸既可以增加特征性香气成分乙酸-2-苯乙酯的生成量, 又可以增加苹果醋发酵过程中的醋酸质量浓度, 具有剂量依赖性, 初步将 8 g/L 作为 L-苯丙氨酸的最佳添加质量浓度.



(a) L-苯丙氨酸对乙酸-2-苯乙酯质量浓度的调节

(b) L-苯丙氨酸对醋酸质量浓度的调节

图 4 L-苯丙氨酸对乙酸-2-苯乙酯和醋酸质量浓度的调节

## 3 结 论

乙酸-2-苯乙酯是苹果醋发酵过程中主要的特征性香气物质, 为了初步确定它的合成途径与调节, 采用反应体系跟踪法, 发现在苹果醋发酵第 7 d 后, 乙酸-2-苯乙酯质量浓度急剧升高, 第 30 d 达到最高值; 根据分析乙酸-2-苯乙酯与其合成基质, AAT, Esterase 酶活浓度之间的相关系数, 初步确定了乙酸-2-苯乙酯的合成途径同时存在酯酶途径和醇酰基转移酶途径, 初步推测醇酰基转移酶途径可能是乙酸-2-苯乙酯的主要合成途径, 醇酰基转移酶可能是关键酶; 通过外源加标法, 将食品添加剂 L-苯丙氨酸加入发酵液中, 和对照样相比, 随着其添加量的增大, 乙酸-2-苯乙酯和醋酸的质量浓度均极显著增加, 8 g/L 是 L-

苯丙氨酸的最佳添加质量浓度,可以有效增加乙酸-2-苯乙酯的生成量和醋酸质量浓度,进而提高苹果醋制品独特的香味和风味。然而,关于合成乙酸-2-苯乙酯与相关底物(醇类、乙酸、酰基辅酶 A)、发酵条件、菌种生长周期、微生物群落结构更替、酸碱度降低、代谢产物积累等因素之间的关系非常复杂,为了得到更加充分的试验数据,本课题有待从分子水平和基因水平深入研究苹果醋发酵过程中乙酸-2-苯乙酯的合成途径与调节机制。

### 参考文献:

- [1] CARMEN Á, INES M, TERESA G, et al. Effect of Biological Ageing of Wine on Its Nitrogen Composition for Producing High Quality Vinegar [J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2014, 92(3): 291-297.
- [2] GULLA M, VERZELIONI E, CANONICO M. Aerobic Submerged Fermentation by Acetic Acid Bacteria for Vinegar Production; Process and Biotechnological Aspects [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(10): 1571-1579.
- [3] 薛淑琴, 谢思芸, 肖仔君, 等. 完全发酵与适度发酵苹果醋主要成分的差异性分析 [J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 137-143.
- [4] 李树萍, 邱诗棋, 吴宛芹, 等. 气相色谱-嗅闻-质谱联用分析红枣白兰地风味成分 [J]. *食品科学*, 2017, 38(4): 187-191.
- [5] 焦娇, 李 凯, 李树萍, 等. HS-SPME-GC-O-MS 分析红枣发酵酒中的挥发性成分 [J]. *食品科学*, 2017, 38(4): 197-203.
- [6] 王晓丹, 陈美竹, 班世栋, 等. 茅台大曲中酵母的分离、鉴定及其功能初探 [J]. *食品科学*, 2017, 38(4): 51-57.
- [7] 郑福平, 马雅杰, 侯 敏, 等. 世界 6 大蒸馏酒香气成分研究概况与前景展望 [J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(2): 1-12.
- [8] 吴文林. 浅谈影响啤酒中酯类含量的因素及控制措施 [J]. *啤酒科技*, 2015(4): 33-34.
- [9] 秦伟帅, 董书甲, 姜凯凯, 等. 采用顶空固相微萃取和气质联用法分析氮源浓度对酵母香气物质合成的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(3): 61-64.
- [10] 汤晓宏, 任继波, 胡文效, 等. 日照地区公酿一号葡萄及其桃红酒特征香气的研究 [J]. *中外葡萄与葡萄酒*, 2017(5): 29-33.
- [11] 赵婷婷, 卢倩文, 宋菲菲, 等. 1 株产香真菌的筛选及其协同米根霉对米酒发酵的影响 [J]. *食品科学*, 2017, 38(14): 42-48.
- [12] 刘 韬, 乔 宁, 饶 敏, 等. 基于顶空固相微萃取与气相色谱-质谱联用技术分析“赣南早”脐橙酒香气成分 [J]. *中国食品添加剂*, 2017, (9): 205-209.
- [13] 陈 燕, 李小惠, 张惟广. 不同地区甘薯的酿酒特性及其发酵酒风味物质的分析 [J]. *中国酿造*, 2016, 35(10): 120-125.
- [14] 孙金沅, 宫俐莉, 刘国英, 等. 古井贡酒酒酯挥发性香气成分的 GC-MS 与 GC-O 分析 [J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 87-93.
- [15] 刘芳舒, 罗 昱, 张 瑜, 等. 杏仁  $\beta$ -葡萄糖苷酶对刺梨果汁风味品质的影响 [J]. *食品科技*, 2016, 41(1): 240-246.
- [16] 余兆硕, 徐瀚麟, 彭彰文, 等. 马铃薯醋酿造工艺优化及其香气成分分析 [J]. *食品与机械*, 2017, 33(4): 171-219.
- [17] 黄 丹, 刘有晴, 倪 月, 等. 基于 ROAV 值的四川麸醋主体风味物质研究 [J]. *食品工业*, 2016, 37(9): 288-292.
- [18] 李江涌, 王如福, 焦玉双. 山西老陈醋熏醅前后香气成分的变化分析 [J]. *中国酿造*, 2016, 35(9): 47-50.
- [19] MCGINTY D, VITALE D, LETIZIA C S, et al. Fragrance Material Review on Phenethyl Acetate [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(2): S491-S497.
- [20] 黄传喜, 黄 兰, 葛少林, 等. 再造烟叶碎片原料中主要中性香味物质分析 [J]. *香料香精与化妆品*, 2017(1): 21-25.
- [21] 周 围, 王 波, 刘倩倩, 等. 基于电子鼻和 GC-MS 对不同品种玫瑰“活体”香气的研究 [J]. *香料香精与化妆品*, 2017(2): 1-6.
- [22] LEE J H, ZHANG C, KO J Y, et al. Evaluation on Anticancer Effect Against HL-60 Cells and Toxicity in Vitro and in Vivo of the Phenethyl Acetate Isolated from a Marine Bacterium *Streptomyces Griseus* [J]. *Fish Aquat Science*, 2015, 18(1): 35-44.
- [23] YOSHIOKA K, HASHIMOTO N. Ester Formation by Alcohol Acetyltransferase from Brewers Yeast [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1981, 45(10): 2183-2190.
- [24] INOUE Y, TREVANICHI S, FUKUDA K, et al. Roles of Esterase and Alcohol Acetyltransferase on Production of

- Isoamyl Acetate in *Hansenula Mrakii* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(3): 644–649.
- [25] ENDOMA-ARIAS M A, HUDLICKY T. Chemoenzymatic Total Synthesis of (+)-Galanthamine and (+)-Narwedine from Phenethylacetate [J]. *Chemistry*, 2016, 22(41): 14540–14543.
- [26] INOUE Y, TREVANICHI S, FUKUDA K, et al. Roles of Esterase and Alcohol Acetyltransferase on Production of Isoamyl Acetate in *Hansenula mrakii* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(3): 644–649.
- [27] AKITA O, SUZUKI S, OBATA T, et al. Purification and Some Properties of Alcohol Acetyltransferase from Sake Yeast [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 54(6): 1485–1490.
- [28] 贾永辉, 罗一鸣, 范俊源. 乙酸苜酯和乙酸苯乙酯的合成研究 [J]. *化学世界*, 2000(6): 309–316.
- [29] 李小惠. 金刺梨发酵酒工艺研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [30] 张雪寒, 司辉清. 腊梅精油不同部位的香气成分鉴定及差异分析 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 41(4): 40–41.
- [31] 周 倩, 蒋和体. 干型番木瓜果酒酿造工艺研究 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 41(5): 122–128.
- [32] 酒中乙醇浓度的测定: GB 5009. 225-2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [33] 吴霏霏. 枇杷果实香气检测及 AAT1 基因克隆表达与酶活性分析研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [34] EHRlich F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und Über Ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe [J]. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1907, 40(1): 1027–1047.

## A Study on the Synthetic Pathways and Regulation of Acetic Acid-2-phenyl Ethyl Ester

SONG Juan, ZHANG Ji-hong, KANG San-jiang,  
HU Sheng-hai, LI Ming-ze

*Agricultural Product Storage and Processing Research Institute,  
Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China*

**Abstract:** In order to understand the synthetic pathway(s) and regulation of acetic acid-2-phenyl ethyl ester, which is a characteristic aroma component in apple vinegar fermentation, a preliminary study was made, in which the reaction system tracing method was adopted to detect the concentration change in the related synthetic matrices. The results showed that acetic acid-2-phenyl ethyl ester increased significantly after 7 days' fermentation and reached the highest after 30 days. According to the correlation coefficient between acetic acid-2-phenyl ethyl ester and its synthesis matrix, AAT and esterase activity, it was tentatively concluded that the esterase pathway and alcohol acyltransferase pathway existed simultaneously for the synthesis of acetic acid-2-phenyl ethyl ester, and it was speculated that the acyltransferase pathway could be the main synthetic pathway and acyltransferase could be the key enzyme. A test of the external standard method showed that 8 g/L was the optimal concentration of L-phenylalanine, which increased the aroma components of apple cider vinegar and the concentration of acetic acid, thus enhancing the unique scent and flavor of the apple vinegar products.

**Key words:** apple vinegar; acetic acid-2-phenyl ethyl ester; synthetic pathway; regulation