

GPD1 过表达调控葡萄酒酵母酒精和风味物质的生成量

高莹莹, 李凭, 李彤, 林良才, 张翠英

(省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 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: 本研究以葡萄酒酵母 WY1 为出发菌株, 探究 *GPD1* 基因过表达对葡萄酒酵母产酒精能力及风味物质的影响。利用分子生物学技术, 采用 PCR 技术扩增葡萄酒酵母 WY1 中甘油-3 磷酸脱氢酶基因 *GPD1*, 构建了单拷贝 *GPD1*, 两拷贝 *GPD1* 和三拷贝 *GPD1* 重组菌株。利用 Real-Time PCR 技术对 *GPD1* 基因表达量进行检测, 与出发菌株 WY1 相比, 单拷贝 *GPD1*, 两拷贝 *GPD1* 和三拷贝 *GPD1* 重组菌株中 *GPD1* 基因的表达水平分别提高了 1.75 倍、3.02 倍和 3.42 倍。葡萄酒发酵实验数据显示, *GPD1* 基因的过表达对乙醇的降低有显著效果, 单拷贝 *GPD1*, 两拷贝 *GPD1* 和三拷贝 *GPD1* 重组菌株分别比 WY1 降低了 8.07%、14.36% 和 15.34%; 总高级醇含量分别减少了 15.20%、17.11% 和 16.55%; 乙酸乙酯的含量分别下降了 17.63%、23.81% 和 27.42%, 乙酸异戊酯含量分别下降了 11.78%、15.87%、17.79%; 甘油生成量分别提高了 1.02 倍、1.80 倍和 1.83 倍。本研究表明过表达 *GPD1* 基因可以影响葡萄酒酵母产酒精的能力, 同时对改善葡萄酒风味有重要意义。

关键词: 葡萄酒酵母; *GPD1*; 乙醇; 甘油; 葡萄酒发酵

文章编号: 1673-9078(2020)07-63-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1198

Regulating the Production of Ethanol and Flavor by Overexpression of *GPD1* in Wine Yeast

GAO Ying-ying, LI Ping, LI Tong, LIN Liang-cai, ZHANG Cui-ying

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

Abstract: The effects of metabolism regulation of *GPD1* gene on ethanol-producing capacity and flavor production in wine yeast were studied, and wine yeast WY1 was used as the parental strain. In this work, three recombinant strains WY1-GPD1, WY1-2GPD1 and WY1-3GPD1 with overexpression of one, two and three copies of *GPD1* gene, respectively, were constructed using molecular biology by PCR amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene *GPD1* in *Saccharomyces uvarum* WY1. The expression level of *GPD1* gene in the recombinant strains and the parental strain was measured by Real-time PCR, and compared with the parental strain WY1, the expression of *GPD1* in recombinant strains WY1-GPD1, WY1-2GPD1 and WY1-3GPD1 increased to 1.75 times, 3.02 times and 3.42 times, respectively. The wine fermentation experiment revealed that the overexpression of *GPD1* had a significant effect on the reduction of ethanol. Compared to that of WY1, ethanol yields of the recombinant strains WY1-GPD1, WY1-2GPD1 and WY1-3GPD1 were reduced by 8.07%, 14.36% and 15.34%, respectively, while total higher alcohols were decreased by 15.20%, 17.11% and 16.55%, respectively. The contents of

引文格式:

高莹莹, 李凭, 李彤, 等. *GPD1* 过表达调控葡萄酒酵母酒精和风味物质的生成量[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 63-69

GAO Ying-ying, LI Ping, LI Tong, et al. Regulating the production of ethanol and flavor by overexpression of *GPD1* in wine yeast [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 63-69

收稿日期: 2019-12-06

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0400500)

作者简介: 高莹莹 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 现代酿造技术

通讯作者: 张翠英 (1979-), 女, 教授, 研究方向: 现代酿造技术

ethyl acetate were decreased by 17.63%, 23.81% and 27.42%, and isoamyl acetate concentrations were decreased by 11.78%, 15.87% and 17.79%, respectively. The contents of glycerol were increased to 1.02 times, 1.80 times and 1.83 times, respectively. This study showed that overexpression of *GPD1* gene can affect the ability of wine yeast to produce ethanol and is significant to improve wine flavor.

Key words: *Saccharomyces uvarum*; *GPD1*; ethanol; glycerol; wine fermentation

葡萄酒中酒精含量过多会对酒体香气复杂性产生负面影响, 很难协调葡萄酒中的各种香气成分。低醇葡萄酒是指采用鲜葡萄或葡萄汁经全部或部分发酵, 经特种工艺加工而成的饮料酒, 酒精度为 1%~7%(v/v)^[1]。在人们对于健康和安全意识逐渐增强的社会背景下, 低度葡萄酒越来越得到消费者的青睐。因此, 人们对研究生产低醇葡萄酒产生了浓厚的兴趣, 同时, 低醇葡萄酒也有广阔的发展前景^[2,3]。

目前, 一些研究报道了多种方法用以降低葡萄酒中乙醇含量。非酿酒酵母^[3] (例如 *Hanseniaspora uvarum*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Pichiakluveri* 等) 具有生产低度葡萄酒的潜能, 其在特定环境下消耗糖生成除乙醇以外的其他物质, 赋予葡萄酒更加丰富的香气复杂性, 但是非酿酒酵母通常无法完成酒精发酵, 需接种酿酒酵母进行共同发酵或者连续发酵^[4]。商业化生产低醇葡萄酒的主要途径是膜技术和蒸馏技术^[5]; 蒸馏工艺利用真空式离心蒸发设备, 需要较高温度实现去除酒精, 高温下一些易挥发成分也易蒸发, 会影响葡萄酒的质量; 利用膜处理生产低度酒时, 酒精随着水通过渗透膜渗出的同时, 一些香气成分如酯类, 酸类及各种微量元素也随乙醇流失, 对葡萄酒感官品质产生不利影响; 利用未成熟果实生产的葡萄酒, 酒度低, 同时因果实含糖量低造成葡萄酒酸度高, 香气成分少, 酒质不佳^[3]。

使用生物学策略选育低产乙醇酵母菌株, 是从根本上降低葡萄酒中乙醇含量, 生产低醇葡萄酒的最经济有效的一种方法^[6]。目前, 研究者已开发出多种生物学方法以构建低产乙醇酵母: 将糖代谢转向三羧酸循环方向和甘油支路方向^[7]; 在酿酒酵母中表达异源基因 (*GOD1* 编码的葡萄糖氧化酶, *NOXE* 编码的 NADH 氧化酶及编码乳酸脱氢酶的 *LDH*) 等^[3,8]。但这些方法又有其局限性, 在厌氧发酵条件下, 葡萄糖氧化酶的活性较低, 且葡萄糖酸高产和乳酸高产等因素都不利于葡萄酒酒质。目前最有效的生物学方法之一是将糖代谢转向合成甘油以减少乙醇生成; 甘油是酒精发酵过程中产生的最重要的风味之一^[9,10], 能促进不同种类的葡萄酒的风味强度^[11], 影响葡萄酒的口感并增加香气复杂性, 通常情况下, 甘油浓度在 5~14 g/L 为宜, 葡萄酒呈现无味或微甜味^[12]。*GPD1* 编码的甘油-3-磷酸脱氢酶是代谢磷酸二羟丙酮生成甘

油过程中的关键基因^[13], 增加 *GPD1* 基因的拷贝数, 可以加快葡萄糖的消耗, 甘油的生成, 减少乙醇的生成量。但 *GPD1* 基因的过表达对其他风味物质的影响尚不明晰, 而葡萄酒中风味物质种类繁多, 风味物质之间的平衡决定了产品的风格和品质, 因此探明 *GPD1* 基因过表达对其他主要风味物质的影响对低醇葡萄酒品质控制具有重要意义。

葡萄酒酵母是与酿酒酵母具有相似遗传背景的酵母菌株之一, 具有高耐寒性, 在葡萄酒发酵过程中可以生成更多的乙酸酯等特性。目前对于酒精发酵过程中多种物质如何代谢调控的研究主要集中在酿酒酵母^[14], 对于葡萄酒酵母的代谢调控尚不清楚^[15,16]; 在不同的遗传背景下, 相同基因的代谢调控对不同菌株的影响不同。本研究以葡萄酒酵母 WY1 为出发菌株, 利用分子生物学方法, 插入强启动子 *PGK1p* 和终止子 *PGK1t* 来实现 *GPD1* 基因的过表达, 并进行葡萄酒发酵实验, 检测发酵液中的乙醇含量和风味物质的变化以及发酵性能, 并利用实时荧光定量 PCR 的方法对 *GPD1* 基因的表达量进行检测, 以探究 *GPD1* 基因代谢对葡萄酒酵母菌产酒精能力及风味物质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

葡萄酒酵母 (*Saccharomyces uvarum*) WY1、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、pUG6 质粒、Yep352 质粒, 以上均为本实验室保藏菌株; Yep352-PG 质粒、WY1-GPD1、WY1-2GPD1、WY1-3GPD1, 以上均为本研究使用菌株。

1.1.2 培养基

YEPA 培养基: 酵母浸粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, pH 自然, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min; 固体培养基需添加 2% 琼脂粉。

LB 培养基: 酵母浸粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 自然, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min; 固体培养基需添加 2% 琼脂粉。

发酵培养基: 葡萄汁糖度为 12 °Brix。

1.1.3 引物

实验中所用引物列于表 1。

表1 实验中所用引物

Table 1 Primers in this study

引物	引物序列 (5'→3')	酶切位点
GPD1-U	GAATTCCAGATCTCCTCGAGATGTCTGCTGCTGATAGATT	<i>Xho</i> I
GPD1-D	ATCTATCGCAGATCCCTCGAGCTAATCTTCATGTAGATCTAATTCTTC	<i>Xho</i> I
GPD1-S-U	GCCCCAAAGAGTTATCGTTAC	
GPD1-S-D	CAGTTTTGGATAGATCAGTTAGACTTTATATTATCAATATTTGTGTTGTG	
GPD1-PGK-U	CACAAACACAAATATTGATAATATAAAGTCTAACTGATCTATCCAAAACCTG	
GPD1-PGK-D	GCGTACGAAGCTTCAGCTGTAAACGAACGCAGAAATTTTCGAG	
GPD-Kan-U	CTCGAAAATTCTGCGTTCTGTTACAGCTGAAGCTTCGTACGC	
GPD-Kan-D	GTATGATATGTTATCTTTCTCCAATAAATGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	
GPD1-X-U	CAGATCCACTAGTGGCCTATGCATTTATTGGAGAAAGATAACATATCATACT	
GPD1-X-D	CCTTAACAAGAACAATGTCATGAC	
Gal-S-U	CTTGCCCTTTGTAGGTGTGTCG	
Gal-S-D	CAGTTTTGGATAGATCAGTTAGAGACGGGAGTGGAAGAAGACG	
Gal-PGK-U	CGTTCCTTTCCACTCCCGTCTCTAACTGATCTATCCAAAACCTG	
Gal-Kan-D	CAAGCACAGGGCAAGATGCTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	
Gal-X-U	CAGATCCACTAGTGGCCTATGCAAGCATCTTGCCCTGTGCTTG	
Gal-X-D	GGAGCGCAATTTACTAATGGC	
HO-S-U	GGTTCATACCCTGACTTGCC	
HO-S-D	CAGTTTTGGATAGATCAGTTAGATTTAAAGTATAGATAGAATTGATTGCT	
HO-PGK-U	AGCAATCAATTCTATCTATACTTTAAATCTAACTGATCTATCCAAAACCTG	
HO-Kan-D	ACAACCTTTTAACTAATATACATTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	
HO-X-U	CAGATCCACTAGTGGCCTATGCAATGTGTATATTAGTTTAAAAAGTTGT	
HO-X-D	CCAACCATCAAGAGAAGAACC	
验证 GPD1-S-U	CTTGCGTGGTGTACTATGG	
验证 GPD1-S-D	GATTTTGTCTGTGATGCGTTC	
验证 KAN-U	CGATAGATCAATTTTTTCTTTTC	
验证 KAN-D	GACTGTCAAGGAGGGTATTCTG	
验证 GPD1-X-U	CATTTCGATTCCTGTTTGTAAATTG	
验证 GPD1-X-D	TCTATGGTCTGTTGGGTCCT	
验证 Gal-S-U	CATTTTTCAACATCTCCTCG	
验证 Gal-S-D	TATGTGAGGGTTCCTGTTC	
验证 HO-S-U	GGTAATCTTTGTTAGGTGCGA	
验证 HO-S-D	ACATTGCTGGTGGTGTTC	
RT-GPD1-U	GGCATCACTCTACCCGACAAT	
RT-GPD1-D	GCTCTGACGTGTGAATCAACATG	
RT-UBC6-U	GGACCTGCGGATACTCCTTAC	
RT-UBC6-D	TAATCGTGTGTTGGGCTTGA	

1.1.4 主要试剂与仪器

rTaq 聚合酶、LA-Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、Yeast RNAiso Kit 酵母 Total RNA 提取试剂盒及 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒, 均购自宝生物(大连)工程有限公司; 质粒小提试剂盒、D6493-D01 型 PCR 纯化试剂盒均购自

OMEGA 公司; 引物由苏州金唯智公司合成; 气相色谱仪 7890A 型, 购自北京安捷伦科技有限公司; 1100LC 高效液相色谱仪, 购自美国 Agilent 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (StepOne PlusTM), 购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建

以葡萄酒酵母 WY1 基因组为模板, 利用引物对 GPD1-U/GPD1-D 进行 PCR 扩增, 得到目的片段 GPD1; 以 Yep-352 为表达载体构建同源重组质粒 Yep352-PG。以 Yep-352 质粒为基础质粒, 使用 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切, 将质粒线性化, 同时将 *PGK1* 片段在相同条件下双酶切后与线性质粒 Yep352 连接, 得到质粒 Yep352-PGK。用 *Xho*I 限制性内切酶酶切质粒 Yep352-PGK, 使其线性化, 利用同源重组原理用连接酶将 GPD1 基因片段与 Yep-PGK 切开质粒连接, 最终得到 Yep352-PG, 质粒构建过程如图 1 所示。

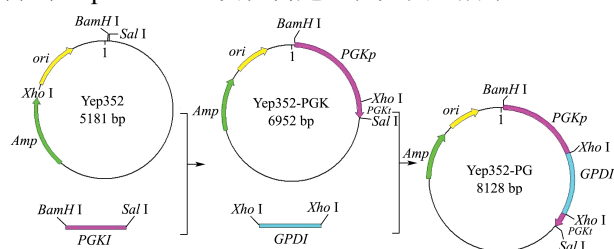


图 1 重组质粒 Yep352-PG 构建流程图

Fig.1 Flow chart of recombinant plasmid Yep352-PG construction

1.2.2 重组酵母菌株的获得

葡萄酒酵母转化采用聚乙二醇/醋酸锂转化法, 转化完成后, 将菌液进行适当稀释, 涂布在含 300 μ g/mL G418 抗性的 YEPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C, 培养 1~2 d, 使用 PCR 验证, 得到含有目的基因 GU-*PGKp*-GPD1-*PGKt*-*KanMX*-GD 的正确转化子 WY1-GPD1。使用相同方法得到 WY1-2GPD1 和 WY1-3GPD1 的转化子。

1.2.3 葡萄酒发酵

将葡萄汁用酒石酸调节 pH 至 3.4~3.6, SO_2 添加量 80 mg/L; 将酵母种子培养液按 5% (v/v) 的接种量接于装有 180 mL 葡萄汁的 250 mL 三角瓶中, 25 $^{\circ}$ C 培养箱中静置发酵 4~5 d。发酵期间每隔 24 h 称重并记录数据, 计算发酵瓶累积失重量(即 CO_2 的释放量)。

1.2.4 风味物质含量的测定

高效液相色谱法: 葡萄酒发酵液经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 用高效液相色谱仪测定。色谱柱为 Bio-Rad HPX-87H, 300 mm $\times$ 7.8 mm; 检测器为示差折光检测器 (RID); 流动相为稀硫酸, 浓度 5 mmol/L, 流速为 0.6 mL/min; 检测器温度为 45 $^{\circ}$ C, 柱温为 65 $^{\circ}$ C, 进样量为 20 μ L。

高效气相色谱法: 葡萄酒发酵液经蒸馏后的酒样采用气相色谱法测定。毛细色谱柱为 Agilent1909N-213; FID 检测器; 载气为高纯氮气, 分流比 1:10。

进样口温度 200 $^{\circ}$ C, 检测器温度 200 $^{\circ}$ C, 进样量 1 μ L。采用程序升温, 即 50 $^{\circ}$ C 保持 8 min, 以 5 $^{\circ}$ C/min 升温速度升温至 150 $^{\circ}$ C, 保持 15 min。

1.2.5 还原糖的测定

使用斐林试剂法^[17]测定发酵液中还原糖的含量。

1.2.6 Real-Time PCR

酵母 RNA 的提取及反转录均按照产品说明书进行操作, 使用 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (TliRNaseH Plus) (TaKaRa) 试剂盒进行实时荧光定量 PCR, 通过 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值法对目的基因及内参基因 *UBC6* 进行基因表达量的分析。

1.2.7 数据分析

每组实验做三个平行, 统计学分析采用 Excel (2010) 对实验数据进行差异显著性检验分析。

2 结果与讨论

2.1 重组酵母菌株的构建

本实验使用的出发菌株 WY1 对 G418 敏感, 因此选择 G418 抗性作为筛选标记。以重组质粒 Yep352-PG 为模板, GPD1-PGK-U/GPD1-PGK-D 为引物扩增得到重组片段 PGK1p-GPD1-PGK1t; 分别以 pUG6 质粒和 WY1 基因组为模板, GPD1-Kan-U/GPD1-Kan-D 和 GPD1-S-U/GPD1-S-D、GPD1-X-U/GPD1-X-D 为引物扩增得到重组片段 *KanMX*、上下同源臂 GU、GD。利用醋酸锂转化法使重组盒与出发菌株 WY1 基因组的 GPD1 基因发生同源重组, 培养在含 300 μ g/mL G418 抗性的 YEPD 平板上。

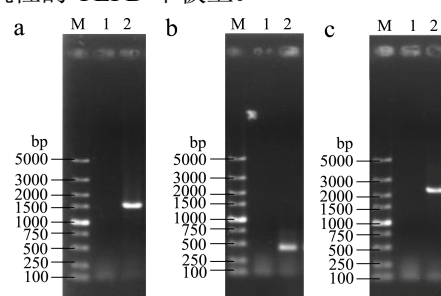


图 2 重组菌株 WY1-GPD1 验证

Fig.2 Verification of the recombinant strain WY1-GPD1

注: a.上游定点验证, b.中游定点验证, c.下游定点验证, M-DL 5000 DNAMaker, 1-葡萄酒酵母 WY1 为模板 PCR 条带, 2-WY1-GPD1 为模板 PCR 条带。

对筛选的 WY1-GPD1 转化子进行 PCR 验证。设计验证 GPD1-S-U/验证 GPD1-S-D, 验证 KAN-U/验证 KAN-D, 验证 GPD1-X-U/验证 GPD1-X-D 为验证引物, 分别以 WY1 和 WY1-GPD1 的基因组为模板进行 PCR 定点验证。以 WY1-GPD1 基因组为模板时, 得

到 1535 bp、420 bp、2284 bp 的特异性条带, 而阴性对照 WY1 没有特异性条带。验证结果表明 WY1-GPD1 转化子发生了正确的同源重组, 验证结果如图 2 所示。使用相同方法, PCR 验证得到 WY1-2GPD1 和 WY1-3GPD1 重组菌株。

2.2 出发菌株与重组菌株中 *GPD1* 基因表达量的测定

为了进一步验证 *GPD1* 基因过表达成功, 提取亲本菌株 WY1 和重组菌株 WY1-GPD1, WY1-2GPD1, WY1-3GPD1 的总 RNA, 并反转录成 cDNA 后, 以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR, 来分析 *GPD1* 基因表达量。由图 3 可以看出, 三个重组菌株的 *GPD1* 基因表达量分别是亲本菌株 WY1 的 1.75 倍、3.02 倍和 3.42 倍。实验结果表明过表达 *GPD1* 基因后, 导致其转录水平相应增加, RT-PCR 结果说明三株重组菌

株中 *GPD1* 基因表达成功。

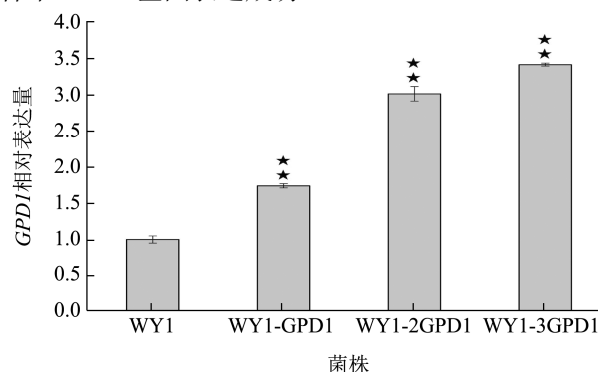


图 3 *GPD1* 基因相对表达量

Fig.3 Expression of *GPD1* gene as measured by RT-PCR

注: ★★: $p < 0.01$, p 值根据重组菌株和其亲本菌株计算得出。

2.3 出发菌株与重组菌株发酵性能的比较

表 2 出发菌株与重组菌株发酵性能的比较

Table 2 Comparison of fermentation performance of the parental and the recombinant strains

菌株	24 h 失重/(CO ₂ /g)	48 h 失重/(CO ₂ /g)	72 h 失重/(CO ₂ /g)	96 h 失重/(CO ₂ /g)	残糖含量/(g/L)
WY1	5.28	8.50	8.63	8.75	1.20±0.22
WY1-GPD1	6.17	8.33	8.47	8.60	1.60±0.31
WY1-2GPD1	5.67	8.03	8.17	8.30	1.53±0.32
WY1-3GPD1	5.50	8.03	8.17	8.30	1.62±0.28

在相同发酵条件下测定出发菌株与重组菌株的 CO₂ 失重、残糖, 用来衡量各菌株的发酵性能。由表 2 可知, 出发菌株 WY1 和各重组菌株变化趋势基本一致, 在发酵 0~48 h 失重呈对数值增长, 且重组菌株均比 WY1 失重多; 在 48 h 之后失重基本趋于稳定, 缓慢增加, 重组菌株 CO₂ 释放量均略低于出发菌株, 但是整体发酵趋势保持一致, 且各重组菌株的残糖含量与出发菌株 WY1 相比均无明显变化, 说明 *GPD1* 过表达基本没有影响葡萄酒发酵的速率, 对葡萄酒酵母的发酵性能无太大影响。

2.4 产酒精能力的测定

用高效液相色谱仪测定了葡萄酒发酵后乙醇的含量, 结果显示, 单基因修饰葡萄酒酵母菌株 WY1-GPD1 比出发菌株 WY1 降低了 8.07%, 两拷贝和三拷贝菌株的乙醇产量进一步降低, 分别降了 14.36% 和 15.34%。在酵母酒精发酵过程中, 葡萄酒酵母代谢葡萄糖, 一部分转向甘油支路, 一部分转向合成丙酮酸进而生成乙醇; *GPD1* 过表达菌株使糖代谢向甘油方向分流, 生成大量甘油, 从而葡萄酒中乙醇生成量减少。在之前的报道中, 使用 *GPD1* 过表

达酵母重组菌株, 在高葡萄糖的 YPD10 培养基中模拟发酵, 有效地降低了葡萄酒中乙醇产量, 由 100 g/L 降到了 89 g/L^[2], 说明在葡萄酒发酵过程中 *GPD1* 基因过表达对乙醇生成量有显著的影响。

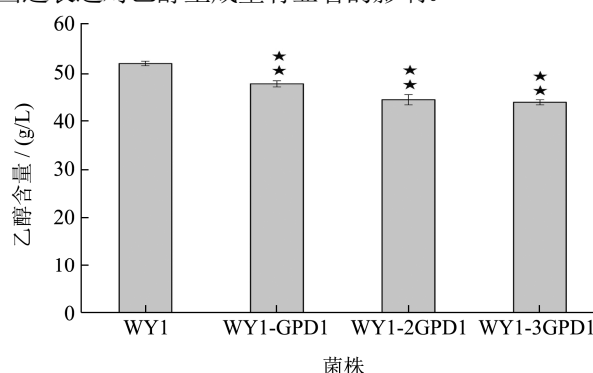


图 4 出发菌株与重组菌株的乙醇含量

Fig.4 The ethanol contents produced by recombinant strains and parental strain

注: ★★: $p < 0.01$, p 值根据重组菌株和其亲本菌株计算得出。

2.5 风味物质含量的测定

取发酵液后离心处理, 取澄清上清液处理后用高

效液相色谱仪测定甘油、苹果酸、乙酸以及乙偶姻的含量。结果如图 5 所示,与出发菌株 WY1 相比, WY1-GPD1, WY1-2GPD1, WY1-3GPD1 的苹果酸含量无明显变化;而甘油、乙酸和乙偶姻含量均呈上升趋势,其中甘油生成量分别提高了 1.02 倍、1.80 倍和 1.83 倍;乙酸含量分别提高了 1.05 倍、3.49 倍、3.82 倍;乙偶姻含量分别提高了 45.92%、3.35 倍、4.47 倍。在酵母中 *GPD1* 基因过表达使乙醇含量大量减少,伴随着甘油和乙酸浓度的提高,根据之前的文献报道, Varela C 等人构建过表达 *GPD1* 基因菌株后,乙醇生成量降低了 20%,甘油和乙酸产量分别提高了 6 倍和 20 倍^[2]。甘油和乙酸含量过高,不利于酒质,根据之前的文献报道,葡萄酒中甘油和挥发性酸(其中乙酸占 90%左右)含量分别 5~14 g/L 和 500~1000 mg/L 之间为宜^[12,18],本实验中利用较低糖度的葡萄汁进行葡萄酒发酵,可以实现葡萄酒中乙醇含量的降低,甘油及乙酸浓度虽有提高,但提高幅度并不太大,对酒质影响不大。

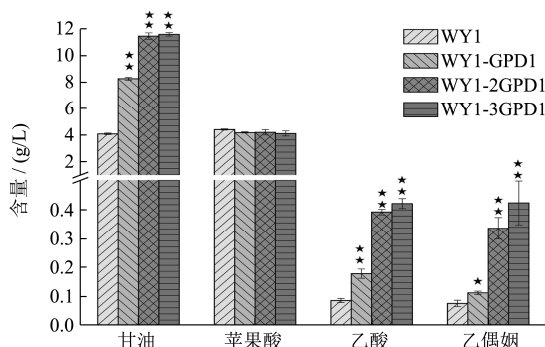


图 5 亲本菌株与重组菌株的风味物质含量

Fig.5 The flavor contents produced by recombinant strains and parental strain

注: ★: $p < 0.05$, ★★: $p < 0.01$, p 值根据重组菌株和其亲本菌株计算得出。

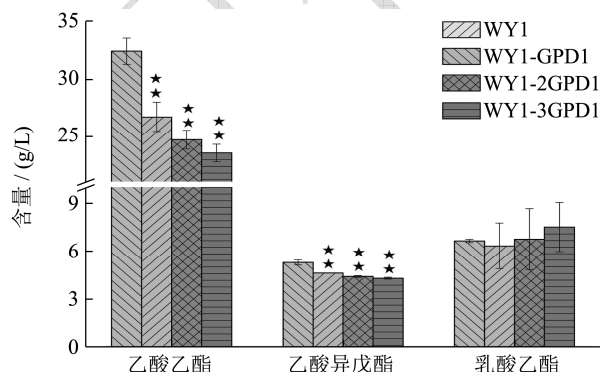


图 6 亲本菌株与重组菌株的酯含量

Fig.6 The esters contents produced by the recombinant strains and parental strain

注: ★★: $p < 0.01$, p 值根据重组菌株和其亲本菌株计算

得出。

发酵结束后,取发酵液进行蒸馏,将馏出液处理后使用气相色谱仪测定风味物质的含量。由图 6 可知,与出发菌株相比, WY1-GPD1, WY1-2GPD1, WY1-3GPD1 的乙酸乙酯的含量分别下降了 17.63%、23.81%和 27.42%,乙酸异戊酯含量分别下降了 11.78%、15.87%、17.79%; WY1-2GPD1, WY1-3GPD1 的乳酸乙酯比 WY1 分别提高了 1.63%、13.01%, WY1-GPD1 下降了 4.79%。*GPD1* 基因的过表达能够减少葡萄酒中乙醇的生成量,而乙醇是合成乙酸酯的前体物质,乙酸酯的生成量也随之减少,这与理论结果一致。

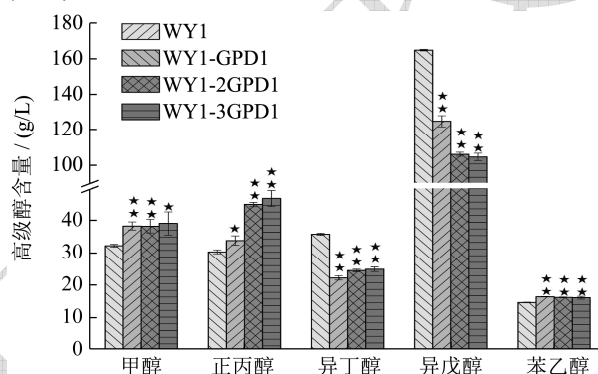


图 7 亲本菌株与重组菌株的高级醇含量

Fig.7 The higher alcohols contents produced by recombinant strains and parental strain

注: ★: $p < 0.05$, ★★: $p < 0.01$, p 值根据重组菌株和其亲本菌株计算得出。

由图 7 可知,与出发菌株相比, WY1-GPD1, WY1-2GPD1, WY1-3GPD1 的甲醇、正丙醇、苯乙醇含量均有提高,分别增加了 19.11%、18.94%、21.54%、11.60%、48.50%、54.69%和 12.34%、11.03%、10.37%;而异丁醇和异戊醇均呈现下降趋势,分别减少了 41.34%、35.16%、34.08%和 24.31%、35.60%、36.50%;总高级醇含量整体减少了 15.20%、17.11%和 16.55%。高级醇是葡萄酒酒精发酵过程中的主要副产物,也是主要的风味物质,当酒中高级醇过高时,会带有异味,且上头。由糖代谢合成高级醇的途径中,葡萄糖经过糖酵解途径和三羧酸循环合成中间体 α -酮酸,然后经过脱羧、脱氢形成相应的高级醇;在葡萄酒发酵中, *GPD1* 过表达菌株消耗一部分葡萄糖,生成 3-磷酸甘油醛,进而合成大量的甘油,一部分合成丙酮酸和三羧酸循环中进而形成高级醇,消耗葡萄糖甘油含量增加,因此高级醇含量降低。

3 结论

本研究以葡萄酒酵母 WY1 为出发菌株,利用同

源重组技术构建了不同拷贝数的 *GPD1* 重组菌株, 利用 Real-Time PCR 技术检测 *GPD1* 基因表达量, 结果显示, 单拷贝 *GPD1*, 两拷贝 *GPD1* 和三拷贝 *GPD1* 过表达菌株中 *GPD1* 基因的表达水平分别比亲本菌株 WY1 提高了 1.75 倍、3.02 倍和 3.42 倍, 说明三株过表达菌株中 *GPD1* 基因过表达成功。利用亲本菌株和重组菌株进行葡萄酒发酵实验, 研究了 *GPD1* 基因过表达对葡萄酒酵母乙醇生成能力和风味物质产生量的影响, 发酵结果显示 *GPD1* 基因的过表达对乙醇的降低有显著效果, 与亲本菌株 WY1 相比, 单拷贝 *GPD1* 菌株中乙醇生成量降低了 8.07%, 两拷贝 *GPD1* 和三拷贝 *GPD1* 菌株实现了进一步的降低, 且不影响菌株的基本发酵性能, 甘油和乙酸产量有所提高, 而酯类物质及高级醇含量呈现一定的下降趋势, 对于降低葡萄酒中高级醇含量起到了较好的作用; 因此, 过表达 *GPD1* 基因在影响葡萄酒酵母的产酒精能力的同时, 可改善葡萄酒的风味。

参考文献

- [1] 李艳, 马丽, 李静. 低醇葡萄酒研究进展[J]. 酿酒, 2006, 33(4): 9-11
LI Yan, MA Li, LI Jing. The development of study in low-alcohol wine [J]. Liquor Making, 2006, 33(4): 9-11
- [2] Varela C, Kutyna D R, Solomon M R, et al. Evaluation of gene modification strategies for the development of low-alcohol-wine yeasts [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(17): 6068-6077
- [3] Goold H D, Kroukamp H, Williams T C, et al. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines [J]. Microbial Biotechnology, 2017, 10(2): 264-278
- [4] Contreras A, Hidalgo C, Henschke P, et al. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(5): 1670-1678
- [5] 屈慧鸽. 国外对低醇葡萄酒的研究[J]. 酿酒, 2003, 3: 54-57
QU Hui-ge. A review of the study on dlarw in foreign country [J]. Liquor Making, 2003, 3: 54-57
- [6] Tilloy V, Ortiz-Julien A, Dequin S. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(8): 2623-2632
- [7] Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology [J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 64-64
- [8] Malherbe D F, Toit M D, Otero R R C, et al. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2003, 61(5-6): 502-511
- [9] Gawel R, Francis L, Waters E J. Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(7): 2683
- [10] Axel M, Philippe M, Virginie M, et al. Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: role of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Hsp12 [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(5): 2004
- [11] Zhao X, Procopio S, Becker T. Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review [J]. Journal of Food Science & Technology, 2015, 52(12): 7588-7598
- [12] 郝瑞颖, 王肇悦, 张博润, 等. 葡萄酒中酿酒酵母产生的重要香气化合物及其代谢调控[J]. 中国食品学报, 2012, 12(11): 121-127
HAO Rui-ying, WANG Zhao-yue, ZHANG Bo-run, et al. The metabolism regulation of important aromatic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* in wine [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(11): 121-127
- [13] Steensels J, Snoek T, Meersman E, et al. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(5): 947-995
- [14] Almeida P, Gonçalves C, Teixeira S, et al. A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum* [J]. Nature Communications, 2014, 2(5): 4044
- [15] Gamero A, Tronchoni J, Querol A, et al. Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(5): 1405-1414
- [16] Stribny J, Gamero A, Pérez-Torrado, et al. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 205: 41-46

(下转第 10 页)