

## 果香型葡萄酒酵母的发酵特征与转录组学研究

许维娜<sup>1,2,3</sup>, 王磊<sup>2</sup>, 李记明<sup>2\*</sup>, 刘延琳<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学 陕西杨凌 712100

<sup>2</sup>烟台张裕集团有限公司 山东省葡萄酒微生物发酵技术重点实验室 山东烟台 264001

<sup>3</sup>滨州医学院药学院(葡萄酒学院) 山东烟台 264003)

**摘要** 为揭示果香型酵母香气物质代谢特征及调控机理,以果香型酵母 SSF12 为研究对象,以另一株果香表现较差的菌株 NGF6 作为对照,研究它们在葡萄酒发酵过程中的转录组学差异,以及发酵液的理化指标、香气物质含量及感官特性等发酵特征。结果表明:SSF12 糖利用度和发酵度高,发酵液中酯类、醇类、萜烯类物质含量高于 NGF6,醛类、脂肪酸含量低于 NGF6,果香感官特性明显优于 NGF6。转录组学分析显示:SSF12 相较于 NGF6 有 434 个基因差异表达(包括 290 个上调基因和 144 个下调基因)。代谢通路分析表明:SSF12 在碳水化合物(尤其是糖类、高级醇、酯类)代谢、核酸代谢途径有更多的上调基因,可能表现更突出。NGF6 在乙醛合成、脂肪酸合成、部分氨基酸代谢途径的上调基因更多。*ADH2*,*ADH6*,*ALD3*,*ATF2* 等差异表达基因与香气物质代谢密切相关,可作为基因工程改良酵母的研究基因,为果香型酵母的选育与改造提供参考。

**关键词** 果香型酵母;葡萄酒发酵;转录组学;香气物质代谢

**文章编号** 1009-7848(2023)01-0267-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.026

酵母菌是葡萄酒生产中的主要微生物,对葡萄酒的风味及质量至关重要<sup>[1]</sup>。葡萄酒发酵过程中,酵母负责将葡萄汁中的糖转化成酒精和 CO<sub>2</sub>,并生成数百种香气物质,形成葡萄酒最重要的香气——发酵香(酒香、二类香气),与品种香(果香、一类香气)和陈酿香(三类香气)一起构成葡萄酒复杂而独特的风味<sup>[2-3]</sup>,因此,酵母被称为“葡萄酒之父”。

葡萄酒中的主要香气物质有酯类(乙酸酯类和脂肪酸乙酯类)、醇类、酸类、酚类、酮类、醛类、萜烯类、含硫化合物等<sup>[4]</sup>。其中部分在葡萄原料中是以结合态存在的潜在香气物质,需要酵母代谢进行转化和激发。目前葡萄酒中发现的千余种香气物质,超过 400 种是在酵母发酵过程中产生的<sup>[5]</sup>。性状优良的果香型酵母能充分激发葡萄原料中的潜在香气,对提升葡萄酒果香型风味与质量是必不可少的<sup>[6]</sup>。我国气候以及葡萄种植多样化的特点

造就了丰富的葡萄酒酵母资源<sup>[7]</sup>。由于长期的自然选择作用,酵母菌株已经逐渐适应了我国的风土和葡萄特性,这些本土酵母用于葡萄酒酿造时,能够充分反映葡萄品种的特色,具有强化葡萄酒中风味特性的潜力,酿出个性和风格突出的优质葡萄酒<sup>[8-9]</sup>。本土优良酵母的选育及应用对于国产葡萄酒质量提升具有重要意义。

本项目组前期从陕西蛇龙珠发酵样品中分离到一株果香表现突出的酿酒酵母菌株 SSF12(专利号 ZL 2020 1 1494317.7),将其与另一株果香表现较差的菌株各自发酵后,收集酵母细胞进行转录组测序,研究两株酵母菌转录组学的差异。结合发酵液的理化指标、香气物质含量和感官特性,解析果香型酵母代谢机理,为优良酵母菌开发提供参考依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

野生葡萄酒酵母 SSF12、NGF6 为前期从陕西蛇龙珠、宁夏贵人香发酵的葡萄酒样品中分离所得;蛇龙珠葡萄取自烟台蓬莱某葡萄园。

葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、异丙醇、无水乙醇、氯仿,国药集团化学试剂有限公司;Takara 酵母

收稿日期:2022-07-05

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2021MC174, ZR2017LC020)

第一作者:许维娜,女,博士,副教授

通信作者:李记明 E-mail: zyljm@163.com

刘延琳 E-mail: yanlinliu@nwsuaf.edu.cn

RNAiso plus 试剂盒, Takara 公司; DNase-free 水、RNase-free 水, 金克隆(北京)生物技术有限公司。YEPD 培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L。

## 1.2 仪器与设备

M391F 垂直层流超净工作台, 法国 Erlab 公司; 发酵罐, 烟台帝伯仕自酿机有限公司; 5180R 台式大容量离心机, 德国 Eppendorf 公司; UVS-99 核酸蛋白测定仪, 上海彦哲仪器设备有限公司; Agilent 6890N-5975B 气相色谱-质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 酵母的活化、接种、发酵

配制 YEPD 培养基, 进行 SSF12 和 NGF6 的划线转接与活化。

成熟的蛇龙珠葡萄除梗破碎, 浸渍 12 h 后将皮渣过滤除去, 取纯汁。用葡萄汁进行酵母种子液的制备, 以 5% 的接种量接种至 20 L 发酵罐中, 24~26 °C 恒温发酵。每日监测发酵液比重和失重情况。

### 1.3.2 葡萄酒基础理化指标的测定

待发酵液比重  $\leq 0.995$  且日失重趋于稳定时, 停止发酵(发酵 6 d)。将发酵液澄清、倒罐并于 4 °C 下储藏。对酒样的基本理化指标进行检测, 包括还原糖、总糖、总酸以及酒精度。还原糖、总糖测定采用费林滴定法, 总酸测定采用酸碱滴定法, 酒精度测定采用密度瓶法<sup>[10]</sup>。每个酒样设 3 个重复。

### 1.3.3 香气成分与含量的检测

将 2 g 氯化钠和 8 mL 酒样放入萃取瓶中并密封。添加混合内标用于半定量分析(内标 1: 薄荷醇 464.5  $\mu\text{g/L}$ ; 内标 2: 2-辛醇 500  $\mu\text{g/L}$ )。将样品在 45 °C 平衡 5 min 后, 用 SPME Arrow 自动进样装置以 250 r/min 的转速下平衡样品, 并在相同转速下用 SPME Arrow 纤维进行 50 min 吸附。待吸附平衡后迅速将进样器插入气相色谱进样口解析, 检测色谱柱: WAX 毛细管柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 nm); 程序升温: 初始温度 40 °C, 保持 1 min, 以 3 °C/min 升温至 180 °C, 再以 20 °C/min 升温至 230 °C, 保持 15 min; 载气(He): 1.2 mL/min; 进样口温度: 250 °C, 压力: 20.0 kPa。质谱条件: 传输线温度 280 °C, 离子源温度 230 °C, 溶剂延迟 0.5 min。每个样品设 2 个平行。将各香气成分质谱图结果与 NIST2008 标准谱

库进行比较, 结合人工图谱解析, 进行香气物质定性; 采用 2-辛醇内标法进行定量<sup>[11-12]</sup>。

### 1.3.4 感官质量分析

感官分析小组由 15 名经过专业训练的品酒师组成(7 男 8 女, 22~51 岁), 参照 GB/T 15038-2006<sup>[10]</sup>中的感官分析方法, 从果香香气(40 分)、果香口感(40 分)、果香整体(风格和典型性, 20 分)三个方面对不同酒样进行感官质量评价。每个酒样设 3 个重复。

### 1.3.5 发酵样品中酵母的收集与转录组学测序

发酵 6 d 后, 离心收集酵母细胞(6 000 r/min, 4 °C, 5 min), 并用 DNase-free 水洗涤 2 遍。每  $5 \times 10^7$  个细胞中加入 1 mL 的 RNAiso Reagent 溶液, 根据试剂盒说明进行 RNA 的提取。获得 RNA 沉淀后, 加入 RNase free 水使其完全溶解。用紫外吸收法检测 RNA 的浓度与纯度( $A_{260/280} \geq 1.8$ )。质检合格的 RNA 样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 Illumina 转录组学测序。每个样本设 2 个平行。

获得原始数据后, 先进行过滤, 提高其质量。过滤结束后, 以酿酒酵母 *S. cerevisiae* S288C (GCF\_000146045.2\_R64) 的基因组为参考, 采用 TopHat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) 进行比对分析。采用 RSeQC(v2.6.3) 对测序饱和度、基因覆盖率和重复读取进行分析, 以评估转录组数据的总体质量。为了鉴定差异基因(Differentially expressed genes, DEGs), 采用 FP-KM(Fragments per kilobase of exon per million mapped reads) 计算每个基因的差异表达水平, 并使用 EdgeR (Empirical analysis of Digital Gene Expression in R, v3.10) 进行差异表达分析, 将  $P\text{-adjust} < 0.05$  且  $|\log_2 \text{fold change (FC)}| \geq 1$  设置为默认阈值。根据 Ding 等<sup>[13]</sup>的方法, 将 DEGs 用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 进行功能注释与富集分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄酒样品基本理化指标

两酵母发酵样品的基本理化指标如表 1 所示。SSF12 发酵的样品酒精度相对较高, 糖含量和总酸较低, 而 NGF6 发酵的样品酒精度较低, 糖含量和总酸较高。总体而言, SSF12 发酵样品的发酵

表 1 发酵样品的基本理化指标

Table 1 Basic physicochemical parameters of fermentation samples

样品	酒精度/%	总糖/g·L <sup>-1</sup>	还原糖/g·L <sup>-1</sup>	总酸/g·L <sup>-1</sup>
SSF12	12.03 ± 0.12	3.50 ± 0.41	1.47 ± 0.11	6.22 ± 0.17
NGF6	11.31 ± 0.31	4.02 ± 0.50	2.02 ± 0.22	7.08 ± 0.15

程度和糖利用率更高。

## 2.2 香气物质测定结果

两样品中的香气物质检测结果如表 2 所示,共检测出 73 种香气物质,按照结构特性将其分为醛酮类(6 种)、酯类(44 种)、醇类(9 种)、酸类(8 种)、萜烯、C<sub>13</sub>-降异戊二烯类(5 种)、酚类(1 种)等。

两样品中,酯类物质的种类和含量均最多,醇类、酸类物质次之,酚类最少。戊酸乙酯只在 SSF12 的发酵样品中检测出来,其它物质在两样品中均存在。

检测到的香气物质中,种类和含量最多的为酯类,大多为葡萄酒贡献果香、花香<sup>[4]</sup>。SSF12 发酵样品中酯类物质含量较 NGF6 更高,预期花果香

更明显。含量第二的是醇类,通常来源于葡萄浆果本身以及发酵过程<sup>[15]</sup>。低浓度的高级醇(<300 mg/L)能够增加葡萄酒香气的复杂度<sup>[16]</sup>,两样品中醇类物质含量均较为适宜,SSF12 略高。葡萄酒中不同浓度的脂肪酸类、醛类物质会给酒体带来不同的影响,适宜浓度时有助于塑造酒体的层次感和丰富度,浓度过高时则会产生腐败和刺激性气味<sup>[17-18]</sup>。两样品中酸类物质含量均在适宜范围内,且差别不大(NGF6 中含量略高);醛类物质虽浓度有差异(NGF6 中含量更高),但也均在适宜范围内。另外,SSF12 中萜烯、C<sub>13</sub>-降异戊二烯类、酚类物质含量也略高于 NGF6。总体而言,SSF12 的香气物质种类和含量均高于 NGF6。

表 2 发酵样品香气成分含量与香气描述

Table 2 The content and aroma description of aroma components in different fermentation samples

RI	物质	SSF12/μg·L <sup>-1</sup>	NGF6/μg·L <sup>-1</sup>	香气描述
	醛酮类	44.85 ± 4.63	97.18 ± 7.47	
692	乙醛	14.56 ± 1.75	45.98 ± 2.20	辛辣味,苹果味
909	异戊醛	0.62 ± 0.21	1.09 ± 0.54	苹果味,桃味
1 393	壬醛	15.46 ± 1.73	18.48 ± 1.35	辛辣味
2 039	椰子醛	9.51 ± 0.25	10.32 ± 1.17	奶油味,椰子香
970	2,3-丁二酮	1.83 ± 0.50	16.46 ± 1.58	奶油味,甜香
1 284	2-辛酮	2.87 ± 0.19	4.85 ± 0.65	奶酪味,蘑菇味
	酯类	18 334.41 ± 1 358.38	14 549.15 ± 914.51	
811	乙酸甲酯	3.08 ± 0.65	5.64 ± 1.94	水果味,芳香味
871	乙酸乙酯	2 174.65 ± 163.35	1 822.46 ± 95.34	甜香,果香
949	丙酸乙酯	20.89 ± 1.77	16.34 ± 4.25	香蕉味,苹果味
956	异丁酸乙酯	7.63 ± 1.10	3.20 ± 0.23	水果味,苹果味
966	乙酸丙酯	3.93 ± 0.28	3.16 ± 0.24	胶水味,芹菜味,甜味
1 008	乙酸异丁酯	62.74 ± 1.34	12.79 ± 2.67	熟透的果香
1 029	丁酸乙酯	115.91 ± 11.53	104.07 ± 5.57	果味,花香味
1 116	乙酸异戊酯	548.63 ± 9.37	354.67 ± 39.04	水果味,甜味
1 129	戊酸乙酯	0.11 ± 0.11	0.00 ± 0.00	香蕉味,甜味
1 161	2-丁烯酸乙酯	3.17 ± 0.84	2.28 ± 0.43	腰果味,甜味,水果味
1 169	硅酸二乙酯双(三甲基硅基)酯	1.31 ± 0.05	1.43 ± 0.12	-
1 229	己酸乙酯	1 453.52 ± 99.77	972.99 ± 89.34	水果味,青苹果香
1 269	乙酸己酯	150.20 ± 2.96	11.02 ± 1.23	水果味,梨味

(续表 2)

RI	物质	SSF12/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NGF6/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	香气描述
1 275	六-5-烯酸乙酯	1.77 ± 0.44	0.46 ± 0.04	-
1 330	庚酸乙酯	17.40 ± 1.10	13.35 ± 1.27	果味,酒味
1 337	乳酸乙酯	27.99 ± 2.44	55.44 ± 8.40	果香,乳酸味
1 370	乙酸庚酯	5.24 ± 0.41	12.18 ± 1.19	玫瑰香,梨香
1 386	辛酸甲酯	11.51 ± 4.62	8.62 ± 0.89	果香,蜡味
1 431	辛酸乙酯	6 477.34 ± 417.76	4 824.07 ± 313.75	水果香,花香
1 455	己酸异戊酯	20.86 ± 2.17	11.96 ± 2.88	蘑菇味
1 472	乙酸辛酯	5.64 ± 0.07	8.32 ± 0.11	果香,花香
1 482	7-辛酸乙酯	5.83 ± 0.25	5.28 ± 1.05	梨香,花香
1 537	2-羟基-4-甲基戊酸乙酯	26.02 ± 1.58	2.96 ± 0.78	水果香气
1 591	癸酸甲酯	10.50 ± 1.73	9.01 ± 0.45	果香,蜡味,肥皂味
1 635	癸酸乙酯	4 337.94 ± 432.15	4 448.94 ± 220.11	水果味,甜味
1 654	辛酸异戊酯	70.86 ± 3.05	64.22 ± 2.90	甜味
1 671	丁二酸二乙酯	44.62 ± 6.53	61.41 ± 3.86	果香味,酒味,奶酪味
1 686	9-癸烯酸乙酯	458.99 ± 89.34	274.70 ± 14.88	果香,皮革香
1 735	十一酸乙酯	1.32 ± 0.26	3.70 ± 0.27	酒香,酯香,果香
1 815	乙酸苯乙酯	1 114.39 ± 9.53	62.19 ± 3.84	花香,果香
1 838	月桂酸乙酯	667.58 ± 41.44	797.95 ± 62.64	果香,花香
1 857	癸酸异戊酯	49.33 ± 5.38	68.90 ± 6.56	蜡味
1 862	2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇单异丁酸酯	3.35 ± 0.84	2.88 ± 0.95	-
1 882	3-羟基辛酸乙酯	18.09 ± 1.28	10.33 ± 1.55	-
1 896	琥珀酸异戊酯乙酯	14.30 ± 3.51	13.70 ± 3.71	-
2 047	十四酸乙酯	59.65 ± 2.02	102.57 ± 2.66	蜡味,肥皂味
2 094	3-羟基十三酸乙酯	17.48 ± 1.04	19.79 ± 0.89	-
2 111	13-甲基十四酸乙酯	4.86 ± 0.62	5.52 ± 0.17	-
2 146	十五酸乙酯	7.30 ± 0.84	12.19 ± 3.02	-
2 206	壬二酸二乙酯	3.52 ± 0.34	4.92 ± 0.78	香蕉、葡萄味
2 248	十六酸乙酯	248.45 ± 25.60	287.64 ± 7.60	果香,脂肪味,破败味
2 277	9-十六烯酸乙酯	50.80 ± 7.85	31.96 ± 5.20	-
2 284	2-羟基-3-苯丙酸乙酯	3.01 ± 0.25	11.35 ± 1.05	蜂蜜味,肉桂味
2 384	丁二酸单乙酯	2.70 ± 0.82	2.59 ± 0.66	愉悦香气
	醇类	8 036.40 ± 783.26	6 595.23 ± 249.17	
1 026	正丙醇	146.77 ± 9.21	117.53 ± 7.50	水果味,酒精味
1 084	异丁醇	872.51 ± 34.82	757.75 ± 65.48	醇香,酒精味
1 136	正丁醇	8.11 ± 1.88	10.19 ± 2.54	药味,酒精味
1 200	异戊醇	5 242.04 ± 513.47	4 165.70 ± 69.14	苦杏仁味,果味
1 305	异己醇	4.52 ± 0.46	3.80 ± 0.30	生青,青草味
1 344	正己醇	339.50 ± 20.90	358.17 ± 36.67	水果香,草本香
1 529	2,3-丁二醇	26.63 ± 0.95	25.86 ± 3.24	水果味,黄油味
1 872	苯甲醇	28.80 ± 2.75	33.21 ± 5.70	柑橘味,甜味
1 907	苯乙醇	1 367.52 ± 198.82	1 123.02 ± 58.60	玫瑰香,甜香
	酸类	4 741.61 ± 274.15	4 975.91 ± 107.67	
1 457	乙酸	4.31 ± 0.10	8.18 ± 1.56	酸味,辛辣味
1 567	异丁酸	12.48 ± 1.27	36.22 ± 4.82	辛辣味,脂肪味
1 840	己酸	264.60 ± 96.43	217.89 ± 11.13	果味,青草味,腐败味
2 056	辛酸	3 160.12 ± 55.68	3 502.51 ± 74.85	烘焙类香气、涩味

(续表 2)

RI	物质	SSF12/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NGF6/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	香气描述
2 158	壬酸	27.78 $\pm$ 2.81	28.46 $\pm$ 3.26	脂肪味, 椰子香
2 263	正癸酸	1 185.89 $\pm$ 106.72	1 143.37 $\pm$ 7.95	酸腐味, 脂肪味
2 326	9-癸烯酸	45.37 $\pm$ 8.53	17.95 $\pm$ 2.44	蜡味
2 475	月桂酸	41.06 $\pm$ 2.61	21.33 $\pm$ 1.66	肥皂味, 月桂油味
	萜烯、C <sub>13</sub> -降异戊二烯类	163.04 $\pm$ 21.81	140.38 $\pm$ 7.41	
1 539	里哪醇	6.65 $\pm$ 1.56	5.57 $\pm$ 0.90	花香, 果香
1 599	$\alpha$ -萜品醇	3.46 $\pm$ 0.91	3.17 $\pm$ 0.76	柑橘, 柠檬香气
1 756	D-香茅醇	26.99 $\pm$ 7.04	29.73 $\pm$ 1.64	苹果香, 花香
2 036	(E)-橙花醇	38.50 $\pm$ 3.35	29.29 $\pm$ 0.76	橘子香, 木香
1 821	大马士酮	87.44 $\pm$ 8.95	72.62 $\pm$ 3.35	果香, 甜香
	酚类	51.52 $\pm$ 5.50	41.52 $\pm$ 0.35	
2 299	2,4-二叔丁基苯酚	51.52 $\pm$ 5.50	41.52 $\pm$ 0.35	酚类气味

### 2.3 感官质量分析结果

两样品的感官分析结果如表 3 所示, 其外观无明显差异, SSF12 发酵的样品口感柔和, 果香香

气和口感更为突出, 酒体更加平衡、协调, 综合质量更佳。

表 3 感官质量品评数据

Table 3 Aroma sensory evaluation data

样品	口感(40分)	香气(40分)	果香整体(20分)	总分(100分)
SSF12	35.2 $\pm$ 2.2	33.8 $\pm$ 4.4	18.3 $\pm$ 3.3	87.3 $\pm$ 9.9
NGF6	30.6 $\pm$ 3.6	26.9 $\pm$ 2.6	17.2 $\pm$ 2.8	74.7 $\pm$ 9.0

### 2.4 酵母转录组学分析结果

利用 Illumina HiSeq 技术对两酵母进行转录组学分析, 筛选  $|\log_2\text{FC}(\text{SSF12}/\text{NGF6})| \geq 1$  且  $P\text{-adjust} < 0.05$  的基因作为差异基因 (DEGs), 共检测出了 434 个差异基因, 包括 290 个上调基因 (图 1, 红色) 和 144 个下调基因 (图 1, 绿色)。

2.4.1 差异基因的 KEGG 聚类分析结果 采用 KEGG 聚类分析对果香酵母 SSF12 和非果香型酵母 NGF6 之间主要代谢途径的差异进行表征, 结果如图 2 所示。所有的 DEGs 被划分为 5 个主要类别, 包括代谢 (碳水化合物代谢, 核苷酸代谢, 氨基酸代谢, 辅因子和维生素代谢, 能量代谢, 脂质代谢 6 个亚类, 141 个 DEGs), 遗传信息处理 (转录, 翻译, 折叠、分类和降解 3 个亚类, 69 个 DEGs), 细胞过程 (细胞生长与死亡, 运输和分解代谢 2 个亚类, 34 个 DEGs), 环境信息处理 (信号转导 1 个亚类, 9 个 DEGs) 和生物体系统 (环境适应 1 个亚类, 4 个 DEGs)。大部分途径中上调基因比下调基因的数量更多, 只有氨基酸代谢与能量

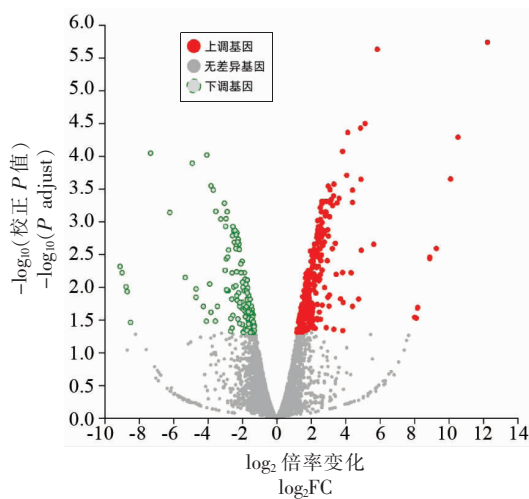


图 1 SSF12 与 NGF6 的基因表达差异火山图

Fig.1 The volcano graph of gene expression difference between SSF12 and NGF6

代谢途径中包含更多的下调基因, 表明 SSF12 中碳水化合物 (包括葡萄糖、氨基糖和核苷酸糖、乙醛酸和二羧酸、丙酮酸、磷酸戊糖、淀粉和蔗糖、半乳糖、果糖、甘露糖等)、辅因子 (泛酸、CoA、叶酸、

核黄素)、核苷酸等的代谢效率更高,并且 SSF12 在 DNA 转录、翻译、细胞生长、物质运输、信号传导、环境适应等方面表现更好,这些现象可能有助

于 SSF12 快速适应发酵环境<sup>[19]</sup>;而 NGF6 在部分氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、精氨酸等)和氮代谢(能量代谢)方面有一定优势。

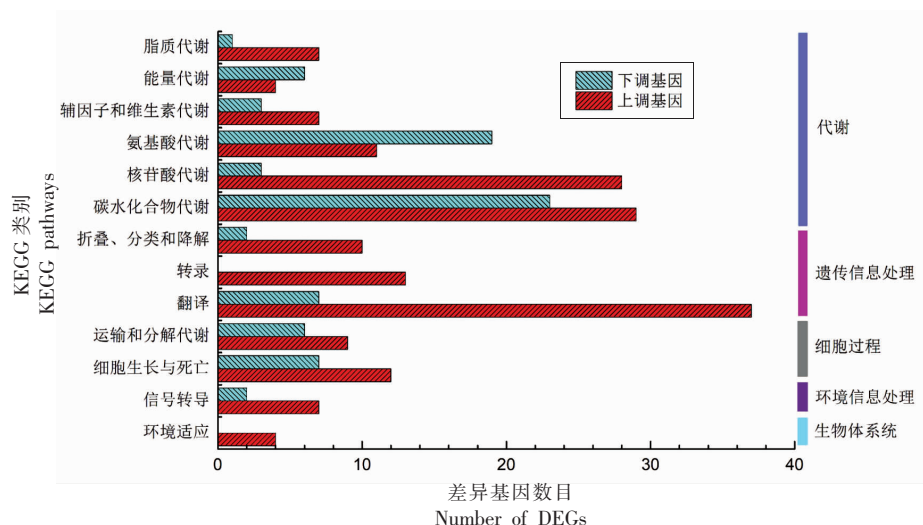


图2 差异基因的 KEGG 聚类统计柱形图

Fig.2 Statistics histogram of KEGG pathways of the DEGs

2.4.2 中心碳代谢及香气物质代谢途径分析 葡萄酒发酵过程中的香气物质产生情况是酵母菌的重要特征之一,这些香气物质主要包括脂肪酸、高级醇、酯类、醛类、氨基酸等<sup>[20-21]</sup>,它们大多是中心碳代谢途径的次级产物。为了探明果香型酵母中心碳代谢和香气物质代谢的情况,对这些途径及相关 DEGs 进行了更详细的研究,结果如图 3 所示。

淀粉和蔗糖代谢 (Starch and sucrose metabolism) 途径中,SSF12 有 8 个上调基因和 1 个下调基因。其中,只有编码葡聚糖 1,4- $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 *SGA1* 基因表达下调, $\log_2FC$  值为-1.30,其它基因均上调,包括 *IMA1*,*IMA2*,*IMA5*,*MAL12*,*MAL32* 等葡萄糖苷酶基因。这些基因的集中转录上调有助于蔗糖、葡萄糖、果糖等糖类的相互转化。

糖酵解 (Gluconeogenesis) 途径是葡萄糖经过一系列的酶促反应生成丙酮酸的过程,乙醛、乙酸和乙醇均在糖酵解中产生。此代谢途径中,相较于 NGF6,SSF12 有 *HXK2*,*ERR3*,*ADH6* 转录上调,*FBP1*,*GPM2*,*PDC6*,*ADH2*,*ALD3* 转录下调。据报道,*HXK2* 参与葡萄糖抑制的调节,而且此调节作用具有很强的菌株特异性<sup>[22-23]</sup>。乙醇脱氢酶 (ADH

家族)催化醛及相应醇的转化<sup>[24]</sup>,其中乙醇脱氢酶 VI (*ADH6p*) 参与醇类的合成,Mendes 等<sup>[25]</sup>认为酿酒酵母发酵过程中 *ADH6* 等基因的高水平表达与异丁醇、异戊醇和苯乙醇产量的提高相关,本研究中也观察到了类似现象 (表 2)。乙醇脱氢酶 II (*ADH2p*) 催化醇向醛的转化,刘奎等<sup>[26]</sup>研究发现中断 *ADH2* 基因能够减少乙醇转化为乙醛,提高乙醇产率。本研究中 *ADH2* 的  $\log_2FC$  值为-1.82,且 SSF12 发酵液乙醇含量高于 NGF6 (表 1),与文献报道结果相符。Pigeau 等<sup>[27]</sup>、Heit 等<sup>[28]</sup>报道 *ALD3* 编码的乙醛脱氢酶 III 的高表达是导致冰酒中乙酸含量升高、乙酸乙酯含量降低的重要原因。本研究中 NGF6 的 *ALD3* 基因转录水平更高,乙酸含量高,乙酸乙酯含量低,这与文献报道相符。

磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway) 是葡萄糖氧化分解的另一个途径,产生大量核糖和 NADPH。此途径中,SSF12 有 *PRS3* 和 *PRS4* 转录上调,*TKL2*,*GND2*,*SOL3* 转录下调。*PRS3* 和 *PRS4* 是编码磷酸核糖焦磷酸合成酶的 5 个基因家族中的 2 个,催化多种生物合成途径的第 1 步,包括嘌呤和嘧啶的生物合成。营养缺乏状态下,*PRS3* 对于维持细胞完整性、离子稳态和细胞骨架是必不可少的<sup>[29]</sup>。同时,*PRS3* 的高表达有助于细

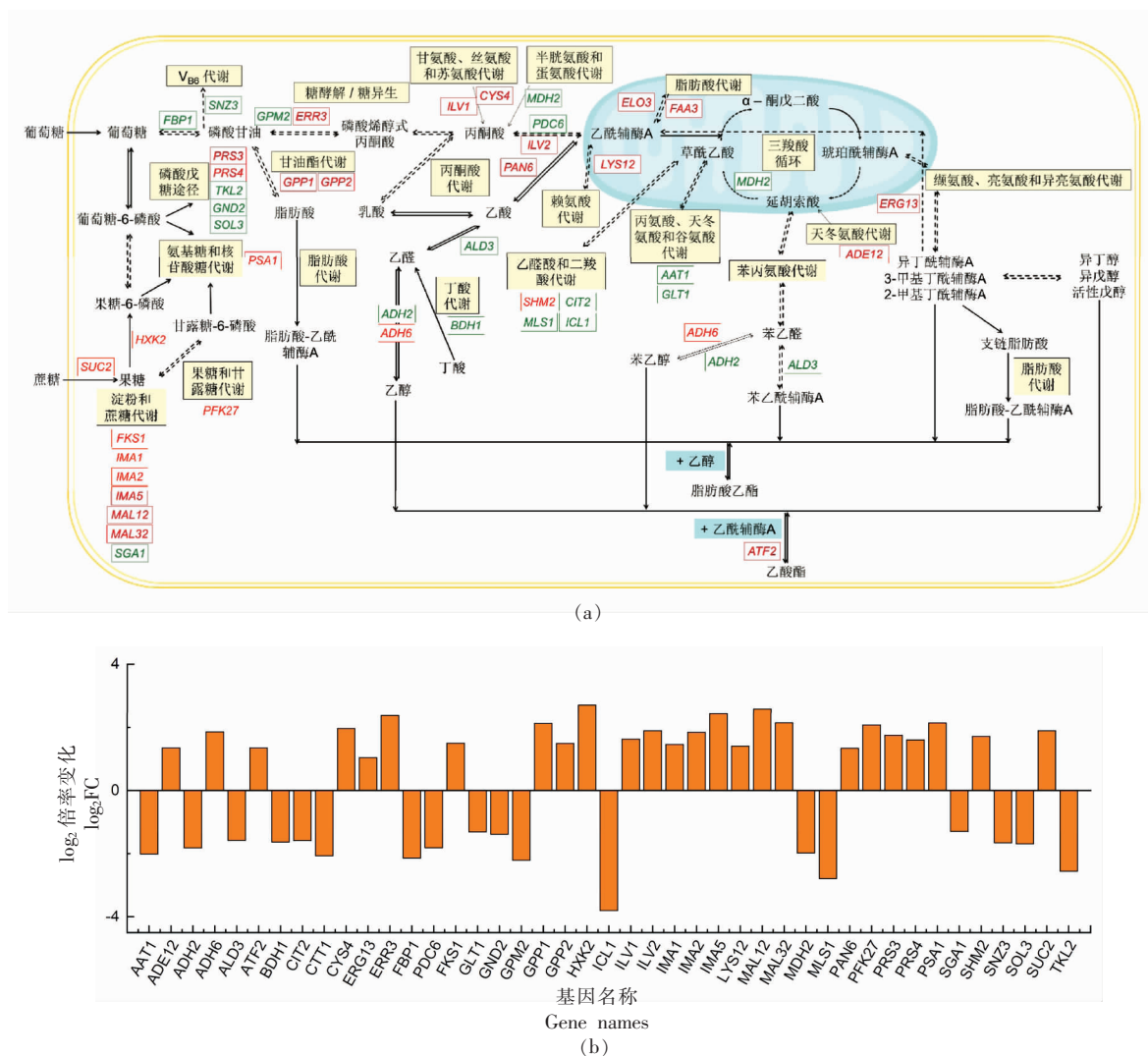


图 3 中心碳代谢和香气物质代谢途径中的差异表达基因 (a) 及差异表达倍数 (b)

Fig.3 The transcriptome profiles (a) and fold changes (b) of DEGs involved in the central carbon metabolism and volatile compound metabolism

胞提高对高乙酸等环境逆境的适应能力<sup>[30]</sup>。*GND2* 编码磷酸戊糖途径的关键酶 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶, *SOL3* 编码的 6-磷酸葡萄糖醛酸酶也是磷酸戊糖途径的重要酶类。Liu 等<sup>[31]</sup>报道 *GND2*、*SOL3* 等基因的增强表达对于 NADPH 的再生具有重要意义, 以提供乙醛转化、脂肪酸合成等所需的辅助因子。本研究中 NGF6 发酵液中乙醛含量高于 SSF12 (表 2), *GND2*、*SOL3* 的转录上调并未加剧这两种物质的消耗。而 NGF6 中脂肪酸类物质含量高于 SSF12 (表 2), 提示该菌株中过多的碳通量转向脂质的合成, Silverman 等<sup>[32]</sup>的研究中也发现了类似现象。

三羧酸循环 (TCA cycle) 途径中, *SSF12* 有 *MDH2* 转录下调, 二羧酸代谢 (Glyoxylate and dicarboxylate metabolism) 途径中, *SHM2* 转录上调, *ICL1*、*MLS1* 转录下调, 其中 *MDH2*、*ICL1*、*MLS1* 的下调可能会减弱对乙醛酸循环和糖异生的回补<sup>[33]</sup>。另外, 果糖和甘露糖代谢 (Fructose and mannose metabolism) 途径中, *PFK27* 转录上调; 氨基糖和核苷酸糖代谢 (Amino sugar and nucleotide sugar metabolism) 途径中, *PSA1* 转录上调; 丁酸代谢 (Butanoate metabolism) 途径中, *ILV2* 转录上调, *BDH1* 转录下调。研究报道, *PFK27* 编码 6-磷酸果糖-2-激酶, 是糖酵解途径的关键调节因子, 会在

葡萄糖缺乏的情况下抑制细胞生长<sup>[34]</sup>;*PSA1* 的过表达能增强细胞对非适宜温度的耐受性<sup>[35]</sup>;这两个基因的转录上调可能有助于增强 SSF12 细胞的环境适应性。*ILV2* 表达水平与高级醇产量负相关,即敲除该基因有助于提高高级醇含量<sup>[36]</sup>,这与本研究 SSF12 发酵液中高级醇含量更高的结果并不相符,这可能是由于基因转录与表达水平不一致,以及其它基因(*ADH2*、*ADH6* 等)转录调控的综合作用结果。

脂肪酸代谢中,参与甘油酯代谢(Glycerolipid metabolism)的 *GPP1*、*GPP2* 以及参与脂肪酸代谢(Fatty acid degradation/biosynthesis/elongation)的 *FAA3*、*ELO3* 转录上调。*GPP1*、*GPP2* 编码甘油-3-磷酸磷酸酶,催化甘油-3-磷酸向甘油的转化。文献报道,*GPP1* 和 *GPP2* 的高表达虽然不能显著增加甘油产量,但可增强细胞对渗透、厌氧和氧化应激的耐受性<sup>[37]</sup>。*FAA3* 编码长链脂肪酸 CoA 连接酶,*ELO3* 编码脂肪酸延长酶,这 2 个基因的表达上调有助于脂质的积累。

另有多个 DEGs 参与氨基酸代谢过程,如参与甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢的 *ILV1* 和 *CYS4*,参与赖氨酸合成的 *LYS12*,参与丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢的 *ADE12*,参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢的 *ERG13*,以及参与  $\beta$ -丙氨酸代谢的 *PAN6* 转录上调;参与丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢的 *AAT1*、*GLT1*,参与半胱氨酸和蛋氨酸代谢的 *MDH2* 转录下调。这些基因的转录调节可能影响相应氨基酸的合成和分解。

葡萄酒中由发酵产生的酯主要有两类,分别是乙酸酯(高级醇/乙醇和活性乙酰辅酶 A 之间的缩合)和脂肪酸乙酯【活性脂肪酸(酰基辅酶 A)/高级醇(酰基辅酶 A)和乙醇之间的缩合】<sup>[38]</sup>。*ATF2* (编码醇乙酰基转移酶 II,log<sub>2</sub>FC 为 1.25)参与乙酸酯的合成,其上调可能导致乙酸酯的合成代谢加快。本研究 SSF12 发酵液中乙酸乙酯、乙酸异丁酯、乙酸异戊酯、乙酸己酯、乙酸苯乙酯等乙酸酯含量均高于 NGF6(表 2),可能与 *ATF2* 的转录上调相关。

总的来说,SSF12 和 NGF6 的中心碳代谢和挥发性化合物代谢途径存在差异。SSF12 在糖类转化、高级醇生成、酯类代谢等途径中有更多的上调

基因,而 NGF6 在乙醛合成、脂肪酸合成等途径更具优势。

### 3 结论

对比果香型酵母 SSF12 与果香表现较差的酵母 NGF6 的发酵和转录组学数据,发现两菌株的代谢及代谢调控情况有较大的差异。SSF12 糖利用度和发酵度高,发酵液中酯类、醇类、萜烯类物质含量高于 NGF6,醛类、脂肪酸含量低于 NGF6,果香感官特性明显优于 NGF6。转录组学分析发现,SSF12 在碳水化合物(尤其是糖类、高级醇、酯类)代谢、核酸代谢途径中表现更突出,NGF6 在乙醛合成、脂肪酸合成、部分氨基酸代谢途径中表现更好。*ADH2*、*ADH6*、*ALD3*、*ATF2* 等基因在 SSF12 中转录上调,且与香气物质代谢密切相关,可作为基因工程改良酵母的研究基因,为果香型酵母的选育提供参考。

选育性状优良的本土特色酵母是国内外的研究热点。本文通过对比分析果香型表现好的酵母与果香型表现差的酵母的发酵表现与转录组学差异,了解果香酵母香气物质代谢通路调节情况,解析各基因在发酵过程中的作用及影响,为果香型酵母的筛选与改良提供依据,有助于高效筛选高品质本土酵母,酿造出更具风土特性的国产葡萄酒。

### 参 考 文 献

- [1] LIU P T, LU L, DUAN C Q, et al. The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet sauvignon wines by spontaneous fermentation [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 71: 356-363.
- [2] SUN Y, LI E H, QI X T, et al. Changes of diversity and population of yeasts during the fermentations by pure and mixed inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(2): 911-919.
- [3] LIANG H Y, SU N, GUO K, et al. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* strains on chemical profiles of Cabernet sauvignon wines: Based on the combined results of <sup>1</sup>H NMR, HS-SPME/GC-MS and



- HPLC-DAD-ESI-MS/MS[J]. *Current Topics in Nutritional Research*, 2018, 18(2): 115-131.
- [4] 刘丽媛, 刘延琳, 李华. 葡萄酒香气化学研究进展[J]. *食品科学*, 2011, 32(5): 310-316.  
LIU L Y, LIU Y L, LI H. Research progress of wine aroma[J]. *Food Science*, 2011, 32(5): 310-316.
- [5] 杨莹, 徐艳文, 薛军侠, 等. 葡萄酒相关酵母的香气形成及香气特征[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(4): 757-760.  
YANG Y, XU Y W, XUE J X, et al. Formation and characteristics of wine bouquet produced by wine yeasts[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(4): 757-760.
- [6] 朱娟娟, 马海军, 李敏, 等. 不同酿酒酵母共发酵对干红葡萄酒理化特性和香气组分的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(2): 194-202.  
ZHU J J, MA H J, LI M, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermentation on physicochemical property and aroma components in dry red wine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(2): 194-202.
- [7] 王慧. 中国主要产地葡萄酒酵母菌种构成研究[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2008.  
WANG H. Study on strain composition of wine yeasts from main producing areas in China[D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2008.
- [8] 叶冬青, 孙悦, 李莹, 等. 本土酿酒酵母与商业酵母混菌发酵特性研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(4): 90-98.  
YE D Q, SUN Y, LI Y, et al. Studies on the characteristics of mixed fermentation with indigenous and commercial *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(4): 90-98.
- [9] FENG L, WANG J M, YE D Q, et al. Yeast population dynamics during spontaneous fermentation of icewine and selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the winemaking in Qilian, China[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(15): 5385-5394.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 葡萄酒、果酒通用分析方法: GB/T 15038-2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 1-2.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Analytical methods of wine and fruit wine: GB/T 15038-2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006: 1-2.
- [11] 余欢, 管敬喜, 杨莹, 等. 7株野生葡萄酒酵母对‘桂葡3号’干白葡萄酒香气成分的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 251-258.  
YU H, GUAN J X, YANG Y, et al. Effects of seven wild wine yeast strains on the aroma compounds of ‘Guipu 3’ dry white wines[J]. *Food Science*, 2019, 40(4): 251-258.
- [12] 程仕伟, 屈慧鸽, 栾丽英, 等. 新疆霞多丽自然发酵醪中本土酿酒酵母的选育与发酵特性[J]. *中国食品学报*, 2017, 17(8): 119-125.  
CHENG S W, QU H G, LUAN L Y, et al. Screening and fermentation characteristics of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from spontaneous fermentation of Chardonnay grapes[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(8): 119-125.
- [13] DING J, ZHANG Y. Analysis of key GO terms and KEGG pathways associated with carcinogenic chemicals[J]. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2017, 20(10): 861-871.
- [14] 李媛媛, 李德美, 张亚东, 等. 赤霞珠干红葡萄酒在不同子产区香气特征的差异[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(6): 256-262, 268.  
LI Y Y, LI D M, ZHANG Y D, et al. Comparative study of aroma characteristics of Cabernet sauvignon dry red wine in different sub-regions[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(6): 256-262, 268.
- [15] 张众, 李辉, 张静, 等. 贺兰山东麓‘赤霞珠’干红葡萄酒陈酿香气特征[J]. *食品科学*, 2019, 40(18): 203-209.  
ZHANG Z, LI H, ZHANG J, et al. Aroma characteristics of aged ‘Cabernet sauvignon’ dry red wine from eastern foothill of Helan Mountain[J]. *Food Science*, 2019, 40(18): 203-209.
- [16] IGNACIO B, JAVIER R, ADELAI DA E F, et al. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement[J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 189.
- [17] GARCÍA-CARPINTERO E G, SANCHEZ-PALOMO E, GALLEGO M A G, et al. Effect of cofermentation of grape varieties on aroma profiles of La Man-

- cha red wines[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(8): C1169–C1180.
- [18] XU W N, JIAN Z, KONG X J. RNA-seq-based transcriptomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous and inoculated fermentations of organic and conventional grapes[J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2021, 143(9): 111183.
- [19] MUTHA N V R, MOHAMMED W K, KRASNOGOR N, et al. Transcriptional profiling of coaggregation interactions between *Streptococcus gordonii* and *Veillonella parvula* by dual RNA-seq[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 7664.
- [20] ROSSOUW D, NÆS T, BAUER F F. Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 530.
- [21] HIRST M B, RICHTER C L. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2016, 67(4): 361–370.
- [22] KÜMMEL A, EWALD J C, FENDT S M, et al. Differential glucose repression in common yeast strains in response to *HXK2* deletion[J]. *FEMS Yeast Research*, 2010, 10(3): 322–332.
- [23] SCHUURMANS J M, BOORSMA A, LASCARIS R, et al. Physiological and transcriptional characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains with modified expression of catabolic regulators [J]. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(1): 26–34.
- [24] QIN G H, QI X X, QI Y J, et al. Identification and expression patterns of alcohol dehydrogenase genes involving in ester volatile biosynthesis in pear fruit[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(8): 1742–1750.
- [25] MENDES I, SANCHEZ I, FRANCO-DUARTE R, et al. Integrating transcriptomics and metabolomics for the analysis of the aroma profiles of *Saccharomyces cerevisiae* strains from diverse origins [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 455.
- [26] 刘奎, 梁丽敏, 李振辉, 等. CRISPR/Cas9 介导的酿酒酵母 *ADH2* 基因中断及反义 RNA 干扰 *GPD1* 的表达[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(10): 64–71.
- LIU K, LIANG L M, LI Z H, et al. CRISPR/Cas9 mediated *ADH2* gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* and antisense RNA interference in *GPD1* expression[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(10): 64–71.
- [27] PIGEAU G M, INGLIS D L. Response of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) aldehyde dehydrogenases to acetaldehyde stress during icewine fermentation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 103(5): 1576–1586.
- [28] HEIT C, MARTIN S J, YANG F, et al. Osmoadaptation of wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during icewine fermentation leads to high levels of acetic acid [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(6): 1506–1520.
- [29] BINLEY K M, RADCLIFFE P A, TREVETHICK J, et al. The yeast *PRS3* gene is required for cell integrity, cell cycle arrest upon nutrient deprivation, ionhomeostasis and the proper organization of the actincytoskeleton [J]. *Yeast*, 1999, 15(14): 1459–1469.
- [30] CUNHA J T, COSTA C E, FERRAZ L, et al. *HAA1* and *PRS3* overexpression boosts yeast tolerance towards acetic acid improving xylose or glucose consumption: Unravelling the underlying mechanisms [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4589–4600.
- [31] LIU Z L, MA M, SONG M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 282(3): 233–244.
- [32] SILVERMAN A M, QIAO K, XU P, et al. Functional overexpression and characterization of lipogenesis-related genes in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 1–18.
- [33] MCCAMMON M T. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in acetate metabolism: Isolation and characterization of *Acn*-mutants [J]. *Genetics*, 1996, 144(1): 57–69.
- [34] BENANTI J A, CHEUNG S K, BRADY M C, et al. A proteomic screen reveals SCF<sup>Gat1</sup> targets that regulate the glycolytic-gluconeogenic switch [J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9: 1184–1191.
- [35] JANIK A, SOSNOWSKA M, KRUSZEWSKA J, et al. Overexpression of GDP-mannose pyrophosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae* corrects defects in

- dolichol-linked saccharide formation and protein glycosylation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, 1621(1): 22–30.
- [36] LI P, LI T, ZHANG C Y, et al. Effect of *ILV2* deletion and *ILV3* or/and *ILV5* overexpression in *Saccharomyces uvarum* on diacetyl and higher alcohols metabolism during wine fermentation[J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246(3): 563–572.
- [37] PAHLMAN A K, GRANATH K, ANSELL R, et al. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(5): 3555–3563.
- [38] UGLIANO M, HENSCHKE P A. *Yeasts and wine flavour*[M]. *Wine Chemistry and Biochemistry*, New York: Springer, 2009: 328–333.

## Studies on Fermentation Characteristics and Transcriptomics of Fruity-flavored Wine Yeast

Xu Weina<sup>1,2,3</sup>, Wang Lei<sup>2</sup>, Li Jiming<sup>2\*</sup>, Liu Yanlin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi

<sup>2</sup>Yantai Changyu Group Co., Ltd., Shandong Provincial Key Laboratory of Wine Microbial Fermentation Technology, Yantai 264001, Shandong

<sup>3</sup>School of Pharmacy (School of Enology), Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong

**Abstract** The fruity-flavored yeast SSF12 was used as the research object and another strain NGF6 with poor fruity flavor was used as the control to study their transcriptomic differences in the process of wine fermentation. Combined with the physical and chemical indexes, aroma substances content and sensory characteristics of fermentation broth, the metabolic characteristics and related regulated mechanism of aroma substances of fruity yeast were revealed. Results showed that SSF12 had higher sugar utilization and fermentation degree. The contents of esters, alcohols and terpenes in the fermentation broth of SSF12 were higher than that of NGF6, while the contents of aldehydes and fatty acids were lower than NGF6. Meanwhile, the fruity sensory characteristics of the fermentation broth of SSF12 were significantly better than that of NGF6. Transcriptomic analysis showed that there were 434 genes differentially expressed in SSF12 compared with NGF6 (including 290 up-regulated genes and 144 down-regulated genes). KEGG analysis showed that SSF12 had more up-regulated genes in carbohydrate (especially sugars, higher alcohols and esters) metabolism and nucleic acid metabolism, thus might be more prominent in these pathways. NGF6 had more up-regulated genes in pathways of acetaldehyde synthesis, fatty acid synthesis and some amino acid metabolism. The differentially expressed genes such as *ADH2*, *ADH6*, *ALD3*, and *ATF2* were closely related to aroma substances metabolism. So they can be used as candidate genes for wine aroma improvement. Results of this study might provide a reference for the breeding and strain improvement of fruity-flavored yeasts.

**Keywords** fruity-flavored yeast; wine fermentation; transcriptome analysis; aroma metabolism profile