

苏昊, 梁璋成, 李维新, 等. 酿酒酵母 JP2 代谢苹果酸途径及其关键基因解析 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (5): 632–638.

SU H, LIANG Z C, LI W X, et al. Metabolism pathway of malic acid in *Saccharomyces cerevisiae* JP2 and analysis of its key genes [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (5): 632–638.

酿酒酵母 JP2 代谢苹果酸途径及其关键基因解析

苏昊^{1,2,3}, 梁璋成^{1,2,3}, 李维新^{1,2,3*}, 任香芸^{1,2,3}, 何志刚^{1,2,3}, 林晓姿^{1,2,3}, 鞠延仑⁴

[1. 福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建 福州 350003; 2. 农业农村部亚热带特色果蔬菌加工重点实验室 (部省共建), 福建 福州 350003; 3. 福建省农产品 (食品) 加工重点实验室, 福建 福州 350003; 4. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨陵 712100]

摘要:【目的】酿酒酵母 JP2 (*Saccharomyces cerevisiae* JP2) 是从自然发酵枇杷酒醪中分离得到一株具有较好代谢苹果酸的酵母菌。为深入研究其内在降酸机理, 对其进行全基因组测序和基因组序列信息解析, 并分析其可能的代谢苹果酸途径, 找出影响降酸的基因。【方法】基于 Illumina Miseq 和 PacBio 测序平台, 联用第二代和第三代测序技术对酿酒酵母 JP2 和模式菌株酿酒酵母 S288c 进行全基因组测序, 采用生物信息学方法对其进行序列组装、基因预测与功能注释, 并挖掘 JP2 可能的苹果酸代谢路径。【结果】(1) 通过对酿酒酵母 JP2 基因组组装共得到 52 个重叠群, 整个基因组大小为 11.98 Mbp, GC 含量 38.07%; JP2 和 S288c 二者的全基因组大小和 GC 含量差异不大。(2) JP2 代谢苹果酸的途径有 3 个: 苹果酸→草酰乙酸→丙酮酸; 苹果酸→丙酮酸; 苹果酸→富马酸。相关的主要基因分别为 *maeA*、*MDH* 及 *fumC*, 其中苹果酸→草酰乙酸→丙酮酸是主要代谢路径, 关键基因是 *maeA*。(3) 模拟发酵过程苹果酸代谢及其关键基因表达量变化显示, JP2 的苹果酸含量下降了 35.8%, 下降程度显著高于 S288c; 与 S288c 相比, JP2 的 *maeA* 基因呈现表达极显著上调 ($P < 0.01$), 在发酵后期, 其相对表达量达到起始值的 130%。【结论】JP2 在果酒发酵过程中呈现 *maeA* 基因高效表达, 从而显著提高了苹果酸降解效率。研究结果可为酿酒酵母 JP2 降酸功能基因的研究以及降酸工程菌的研发提供技术支撑。

关键词: 酿酒酵母; 生物降酸; 苹果酸代谢路径; 基因表达

中图分类号: TS262.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 05-0632-07

Metabolism pathway of malic acid in *Saccharomyces cerevisiae* JP2 and analysis of its key genes

SU Hao^{1,2,3}, LIANG Zhangcheng^{1,2,3}, LI Weixin^{1,2,3*}, REN Xiangyun^{1,2,3}, HE Zhigang^{1,2,3}, LIN Xiaozhi^{1,2,3}, JU Yanlun⁴

[1. Institute of Agricultural Engineering Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Key Laboratory of Subtropical Characteristic Fruits, Vegetables and Edible Fungi Processing (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fuzhou, Fujian 350003, China; 3. Fujian Key Laboratory of Agricultural Products (Food) Processing, Fuzhou, Fujian 350003, China; 4. College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shanxi 712100, China]

Abstract: 【Objective】*Saccharomyces cerevisiae* JP2, isolated from naturally fermented loquat, is a yeast strain with good metabolism of malic acidwine mash. To further investigate its intrinsic acid lowering mechanism, whole genome sequencing and genome sequence information analysis were conducted, and possible metabolic pathways of malic acid were analyzed to identify genes that affect acid lowering. 【Method】Based on the Illumina Miseq and PacBio sequencing platforms, second and third generation sequencing techniques were used to sequence the entire genome of *S. cerevisiae* JP2 and the type strain *S.*

收稿日期: 2023-03-10 初稿; 2023-05-04 修改稿

作者简介: 苏昊 (1984-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事食品发酵与酿造方面的研究 (E-mail: suhaoxp@163.com)

* 通信作者: 李维新 (1970-), 男, 博士, 研究员, 主要从事食品发酵与酿造方面的研究 (E-mail: lwx406x@163.com)

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2020J011373); 福建省科技计划公益类专项 (2020R1032008); 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目 (XTCXGC2021019-GCS01); 泉州市科技计划项目 (2021N043); 福建省农业科学院农业科技创新联盟专项 (CXLM202204); 福建省星火火项目 (2020S0035)

cerevisiae S288c. Bioinformatics methods were used to assemble their sequences, predict their genes, and annotate their functions, while exploring the possible malic acid metabolism pathways of JP2. 【Result】 (1) A total of 52 contigs were obtained by assembling the genome of *S. cerevisiae* JP2, with a total genome size of 11.98 Mbp and a GC content of 38.07%; There is no significant difference in overall genome size and GC content between JP2 and S288c. (2) There are three pathways for JP2 to metabolize malic acid: malic acid $\rightarrow$ oxaloacetate $\rightarrow$ pyruvate; malic acid $\rightarrow$ pyruvate; and malic acid $\rightarrow$ fumaric acid. The main genes involved are *maeA*, *MDH*, and *fumC*, among which malic acid $\rightarrow$ oxaloacetate $\rightarrow$ pyruvate is the main metabolic pathway with the key gene *maeA*. (3) The simulated fermentation process showed a decrease of 35.8% in malic acid metabolism and key gene expression levels in JP2, with a significant decrease compared to S288c; Compared with S288c, the *maeA* gene of JP2 was significantly upregulated ($P < 0.01$), and its relative expression reached 130% of the initial value in the late fermentation stage. 【Conclusion】 JP2 exhibits high expression of *maeA* gene during fruit wine fermentation, significantly improving the efficiency of malic acid degradation. The research results can provide technical support for the study of the acid reducing functional gene of *S. cerevisiae* JP2 and the development of acid reducing engineering bacteria.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; biological acid degradation; malic acid metabolic pathway; gene expression

0 引言

【研究意义】酵母菌是葡萄酒等果酒进行酒精发酵所必需的微生物。对于果酸含量较高的水果酿造，必须通过降酸环节来增加酒体柔和度和改善风味，进而提升果酒品质^[1-2]。与物理降酸和化学降酸相比，生物降酸被认为是最为合理、有效的降酸途径^[3]。目前主要的生物降酸方式是通过乳酸菌作用下的苹果酸-乳酸发酵和酵母菌作用下的有机酸代谢^[4]。但是，乳酸菌的发酵特性决定了苹果酸-乳酸发酵过程的降酸幅度是有限的，往往无法满足高酸性果酒的降酸需求^[5]。如果选择具有降酸能力的酵母菌用于果酒一次发酵即酒精发酵期的有机酸代谢，再通过二次发酵即苹果酸-乳酸发酵进一步代谢有机酸，即可实现“双效降酸”的效果。【前人研究进展】与乳酸菌相比，酵母菌对酒体环境中酒精、酸度等的耐受性更好^[6-7]；国内外早有酵母菌降酸方面的研究，但至今仍未得到实际应用。究其原因，主要有两方面：一方面受菌种特性的影响。酿酒酵母降酸能力普遍较差；裂殖酵母（*Schizosaccharomyces*）降酸能力虽强，但该菌酒精发酵力弱、产不良风味且生长过程受酿酒酵母的明显抑制，因此该菌的降酸过程和酿酒酵母的酒精发酵必需单独进行，工序复杂^[8-10]，不适宜用于果酒生物降酸。另一方面菌种选育技术还有待突破。利用诱变、原生质体融合和基因工程等对酿酒酵母的改造，虽可以使其兼有酒精发酵和果酸降解能力，但存在稳定性差和食品安全争议等问题，从而都止步于试验阶段^[11-12]。本研究前期筛选到的野生型酿酒酵母 JP2^[13]所具备的高酒精发酵、强果酸代谢能力，成功克服了以上两方面的问题，所以具有重要的研究价值。【本研究切入点】酿酒

酵母菌 JP2 在完成酒精发酵的同时还达到了生物降酸效果，但其降酸的途径尚不明确。【拟解决的关键问题】本研究以酿酒酵母 JP2 为研究对象，以模式菌株酿酒酵母 S288c 为对照，采用全基因组、比较基因组及代谢组学方法，解析 JP2 代谢苹果酸关键基因和代谢路径，旨在明确酿酒酵母 JP2 代谢苹果酸过程的通路和关键基因功能，初步解析该菌降酸机制，为制定酿酒酵母生物降酸策略、实现代谢通路的可调可控提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 酿酒酵母 JP2，从自然发酵枇杷酒醪中分离得到，具有较强的酒精发酵能力和降酸特性^[13]。模式菌株酿酒酵母 S288c，购自美国标准生物品收藏中心（American type culture collection, ATCC）。

1.1.2 培养基 模拟葡萄酒培养基：100 g·L⁻¹ 葡萄糖，100 g·L⁻¹ 果糖，4.5 g·L⁻¹ L-苹果酸，2 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄，1.7 g·L⁻¹ 酵母膏，灭菌备用。

1.2 酿酒酵母 JP2 的培养与基因组 DNA 的提取

用 YPD 液体培养基活化酿酒酵母 JP2，接种于 1 L 模拟酒中，接种量 $\geq 1 \times 10^7$ cfu·mL⁻¹，25 °C 下发酵，每天收集发酵过程中的酒样，6000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体。

采用基因组提取试剂盒（Bacterial Genomic DNA Isolation Kit, #DP302, TIANGEN）提取酿酒酵母 JP2 基因组。

1.3 JP2 全基因组构建及苹果酸代谢路径分析

采用全基因组鸟枪法策略，构建不同插入片段的文库，利用第二代测序技术，基于 Illumina Miseq

测序平台，同时利用第三代单分子测序技术，基于 PacBio 测序平台对文库进行测序。本次测序总共构建了 400 bp 和 20 kp 2 个文库。采用 AdapterRemoval (v1.5.4) 去除测序数据包含的带接头、低质量的 reads，以减少后续冗余信息的干扰，保证信息分析质量；采用 SOAPec (v2.0) 软件基于 Kmer 频率对所有 reads 进行质量校正，校正所采用的 Kmer 设置为 17。基因预测采用 Glimmer3.0 软件，基因功能注释采用本地 BLASTP 方法将预测的基因序列与 KEGG 数据库进行比对，得到相应的注释信息。

1.4 酿酒酵母 JP2 降苹果酸关键基因筛选

将 JP2 与 S288c 的蛋白质序列合并建立数据库，同时合并的序列文件作为 Query 进行 All-VS-All BlastP 分析。采用 orthomcl 进行筛选，序列比对的长度不低于任意两条序列的长度的 70%，最后对筛选结果进行 mcl 聚类，其中 inflation 设置为 1.5。

1.5 降酸关键基因分析

将活化后 JP2 与 S288C 分别接入模拟酒中进行发酵，收集发酵过程中的酒样。采用高效液相检测方法，检测发酵酒样中的有机酸成分。采用 qRT-PCR 的方法^[11]，对影响 JP2 与 S288c 代谢苹果酸关键基因进行定量检测，考察两株菌的目标基因表达情况，分析 JP2 代谢苹果酸关键基因。

1.6 检测方法

有机酸检测方法参照相关文献^[14-15]。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母 JP2 全基因组构建

采用 SOAPdenovo软件组装得到酿酒酵母 JP2 基因组大小为 11982192 bp，最长片段大小为 956649 bp，最短片段大小为 1086 bp，GC 含量 38.07%，共 51 个支架，52 个重叠群。

对组装好的序列进行组分分析，采用 Augustus (version 3.03)、glimmerHMM (version 3.0.1) 和 SNAP (version 2006-07-28) 软件共预测 5205 个基因 (表 1)，总长度 8044579 bp，平均长度 1545 bp，占基因组全长的 66.50%。用 tRNAscan 软件共预测出 289 个 tRNA，用 rRNAmmer1.2 软件预测出 4 个 rRNA。通过基因组基本信息的比较，发现 JP2 基因组比 S288c 小了 0.18 Mbp，二者的全基因组 GC 含量差异不大。

2.2 酿酒酵母 JP2 苹果酸代谢路径分析

采用本地 BLASTP 的方法，结合 KEGG 数据库，对预测基因进行功能注释。

酿酒酵母 JP2 在 KEGG 数据库中共有 3168 个基

表 1 基因组基本信息
Table 1 Basic information of genome

特征 Property	酿酒酵母JP2 <i>S. cerevisiae</i> JP2	酿酒酵母S288c <i>S. cerevisiae</i> S288c
序列总长 Total sequence length/Mbp	11.98	12.16
GC含量 GC content/%	38.07	38.15
预测基因占比 Predicted gene proportion/%	66.50	75.37
预测基因数量 Predicted number of genes	5205	5906
预测基因长度 Predicted Gene Length/bp	1545	1369
tRNA数量 tRNA quantity	289	299
rRNA数量 rRNA quantity	4	10

因得到功能注释，可以分成 47 个亚分类图，结果见图 1，发现在翻译 (866 个)、折叠分类降解 (628 个)、复制和修复 (442 个) 得到较多的功能注释。将这些注释的基因比对到代谢通路图，最终得到 346 个代谢通路图。其中，与苹果酸代谢相关代谢路径共 3 条 (图 2)，分别为：(1) 苹果酸→草酰乙酸→丙酮酸→乙酸→乙醛→乙醇；(2) 苹果酸→丙酮酸→乙酸→乙醛→乙醇；(3) 苹果酸→富马酸。

2.3 酿酒酵母 JP2 降苹果酸关键基因解析

通过酿酒酵母 JP2 与 S288C 全基因组比较分析，结果表明 (图 3、图 4)，与 S288c 相比，JP2 特有 145 个基因，缺失 1111 个基因。在缺失基因中未找到与苹果酸代谢相关的基因，在特有基因中找到与苹果酸代谢密切相关的基因有 3 个，分别为：(1) *maeA* 基因。该基因是构成苹果酸脱氢酶 (EC 1.1.1.37) 关键基因，影响的代谢路径为苹果酸→草酰乙酸→丙酮酸。(2) *MDH* 基因。该基因是构成苹果酸脱氢酶 (EC 1.1.1.38) 关键基因，虽然在苹果酸脱氢酶 (EC 1.1.1.38) 作用下酵母 JP2 代谢苹果酸时也产生草酰乙酰盐，但草酰乙酰盐只是苹果酸脱氢酶 (EC 1.1.1.38) 催化反应过程中的中间产物，其会迅速转化为丙酮酸，因而该酶影响的代谢路径应该为苹果酸→丙酮酸。(3) *fumC* 基因。该基因是构成富马酸水合酶 (EC 4.2.1.2) 关键基因，代谢路径为苹果酸→富马酸。

2.4 酿酒酵母 JP2 发酵过程中代谢苹果酸关键基因的表达变化

以 JP2 和 S288c 为对象，在模拟葡萄酒培养基中

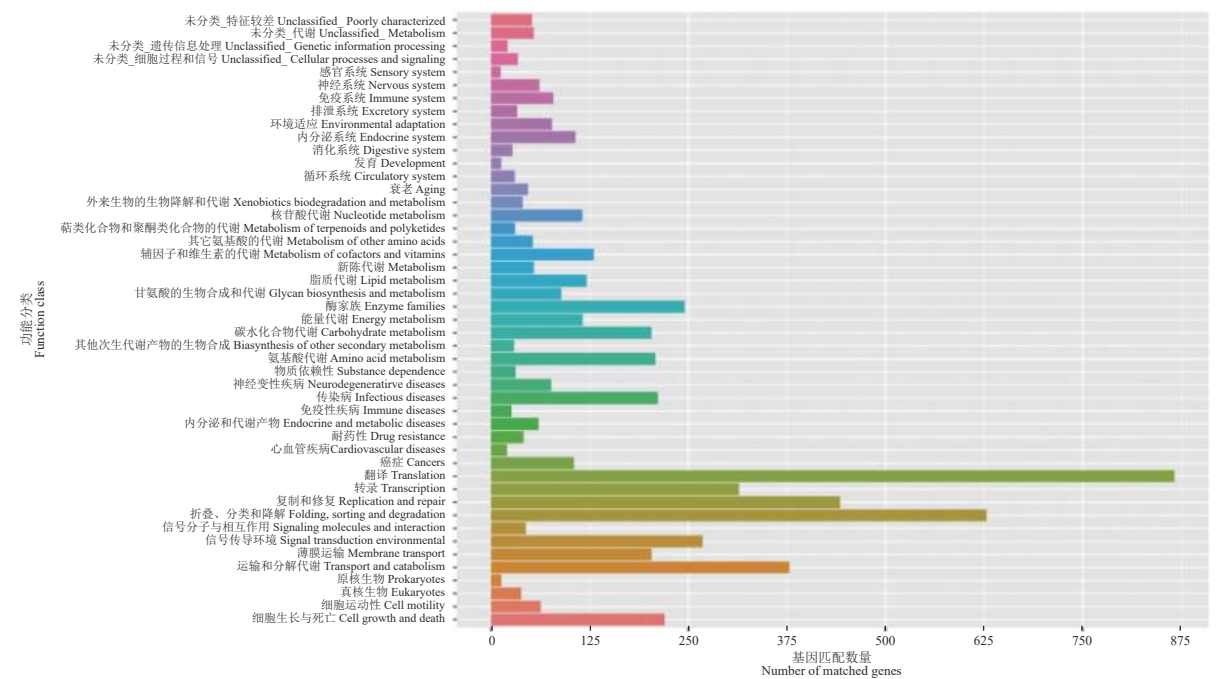


图 1 KEGG 功能注释基因

Fig. 1 KEGG functional annotation gene

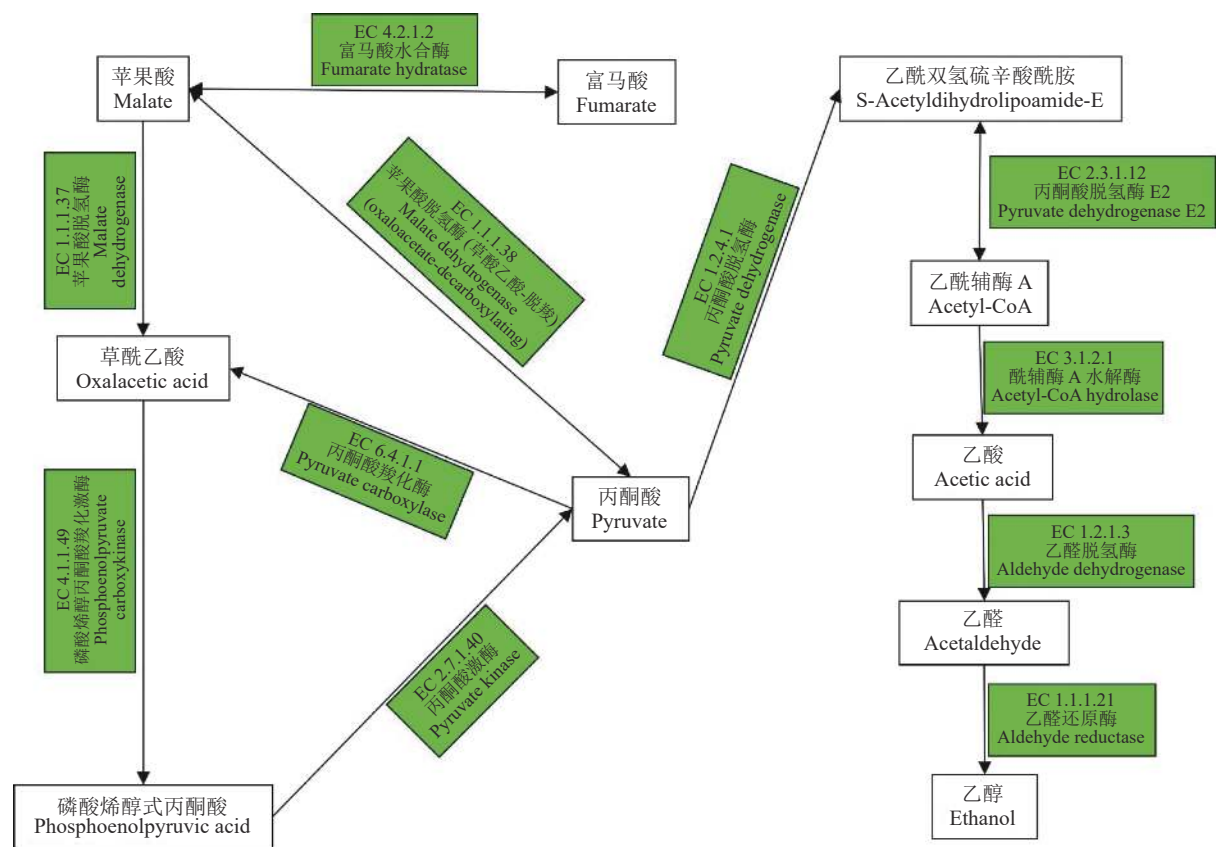


图 2 酵母菌 JP2 代谢苹果酸途径

Fig. 2 Metabolism pathway of malic acid by yeast JP2

发酵 13 d, 采用高效液相技术检测发酵前后有机酸的变化, 采用 PCR、qRT-PCR 技术对苹果酸代谢的密切相关基因进行存在和表达量研究。由表 2 可知, JP2 试验组中的苹果酸含量下降了 35.8%, 而 S288c 试验组的苹果酸含量下降程度显著低于 JP2 试验组, 两个试验组中的其余有机酸均呈不同程度的上升。

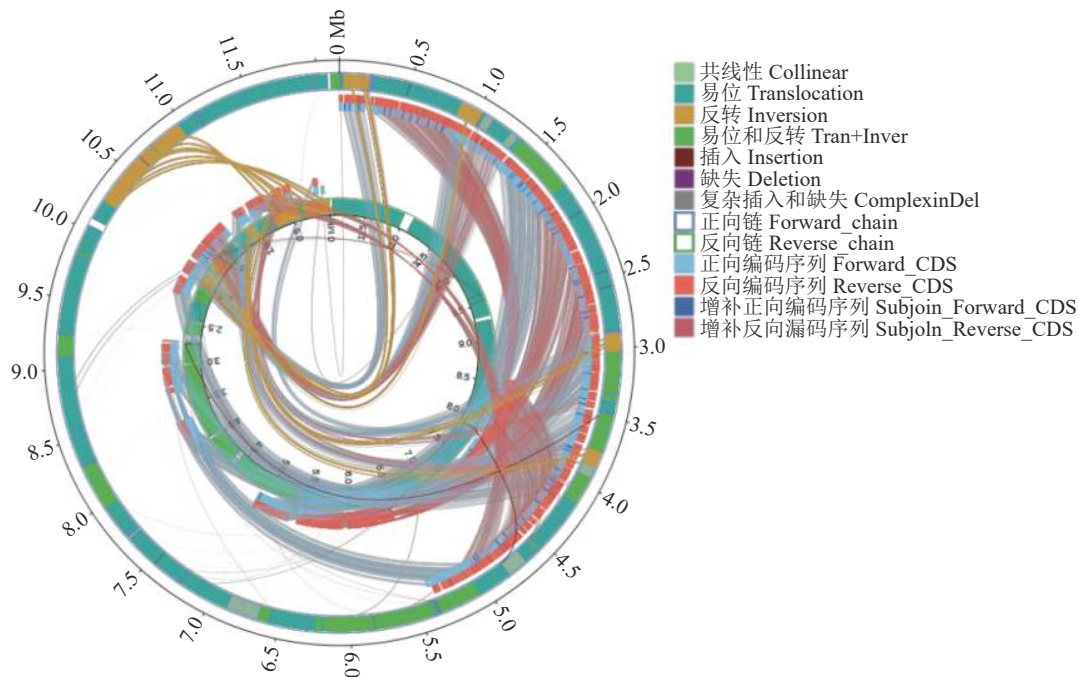


图 3 JP2 与 S288c 全基因组对比分析

Fig. 3 Comparative analysis of the whole genome of JP2 and S288c



图 4 JP2 与 S288c Venn 图

Fig. 4 JP2 and S288c Venn diagram

由图 5 可知，3 个基因在两菌中均存在，在菌株 S288c 中的基因表达水平弱于 JP2 菌株，推测为 S288c 同位点存在序列缺失。由表 3 可知，与 S288c 相比，JP2 的 *maeA* 基因出现表达极显著上调 ($P<0.01$)，而 *MDH*、*fumC* 基因表达差异不显著。

进一步考察两菌 *maeA* 基因在模拟发酵液中不同发酵时期的变化，结果见图 6。在酒精发酵的前 3 d，酿酒酵母 JP2 的 *maeA* 相对表达量上升，而后缓慢下

表 2 酿酒酵母 JP2 和 S288c 发酵过程有机酸代谢

Table 2 Organic acid metabolism during the fermentation process of *S. cerevisiae* JP2 and *S. cerevisiae* S288c (单位: $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

有机酸 Organic acid	发酵时间 Fermentation time	JP2试验组 JP2 group	S288c试验组 S288c group
草酸 Oxalate	发酵起点	0.00±0.00	0.00±0.00
	发酵结束	2.58±0.02	2.76±0.04
酒石酸 Tartaric acid	发酵起点	0.00±0.00	0.00±0.00
	发酵结束	6.39±0.05	6.81±0.08
苹果酸 Malic acid	发酵起点	4500.00±0.00	4500.00±0.00
	发酵结束	2886.87±150.21	4365.36±143.45*
乳酸 Lactic acid	发酵起点	0.00±0.00	0.00±0.00
	发酵结束	44.19±3.14	47.12±4.86
乙酸 Acetic acid	发酵起点	0.00±0.00	0.00±0.00
	发酵结束	556.26±25.01	213.14±18.24
富马酸 Fumaric acid	发酵起点	0.00±0.00	0.00±0.00
	发酵结束	1.71±0.04	1.98±0.06

*: 同一发酵时间不同试验组之间差异显著 ($P<0.05$)。
*: Significant difference between different groups at the same fermentation time ($P<0.05$).

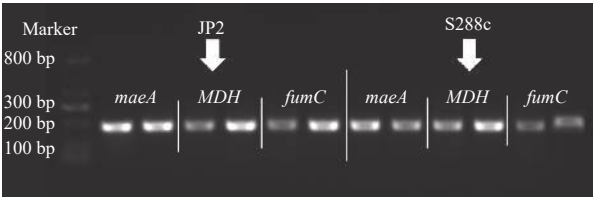


图 5 苹果酸代谢相关基因 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of malate metabolism-related genes

表 3 苹果酸代谢关键基因表达量比较

Table 3 Comparison of expression of key genes of malic acid metabolism

菌株 Strain	<i>maeA</i> 基因 <i>maeA</i> gene	<i>MDH</i> 基因 <i>MDH</i> gene	<i>fumC</i> 基因 <i>fumC</i> gene
JP2	1.25**	1.02	0.97
S288C	1.00	1.00	1.00

**：不同菌株之间差异极显著 ($P<0.01$)。

**：Significant difference between different strains ($P<0.01$)。

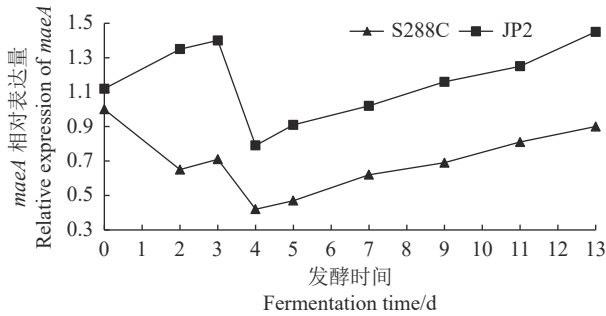


图 6 酿酒酵母 JP2 与 S288c 在降酸过程中 *maeA* 相对表达量的变化

Fig. 6 Changes in the relative expression of *maeA* gene in *S. cerevisiae* JP2 and S288C during acid reduction

降，在发酵后期，其相对表达量急速上升，达到起始值的 130%。而对照酵母菌酿酒酵母 S288c 的 *maeA* 相对表达量先下降后期略微上升，但仍低于起始值。表明苹果酸→草酰乙酸→丙酮酸是 JP2 代谢苹果酸的主要途径，*maeA* 是其关键基因。

3 讨论

苹果酸-乙醇发酵被认为是酵母菌代谢苹果酸的主要途径，这一途径有两个关键酶即苹果酸通透酶和苹果酸酶^[16]。裂殖酵母在苹果酸通透酶基因 *mae1* 表达的 H⁺-苹果酸同向运载蛋白作用下，将胞外苹果酸主动转运进入细胞^[14]；该基因的表达是组成型的，不受代谢副产物的抑制，保证了苹果酸的高效转运^[17]。然而，酿酒酵母没有苹果酸转运基因 *mae1*，苹果酸靠单纯扩散的方式进入细胞质，且该过程可能受到己糖（葡萄糖、果糖）的诱导或抑制，苹果酸转运效率较低^[18]。前期研究中，显示 JP2 主要代谢的有机酸为苹果酸，并通过高效代谢苹

果酸以实现其显著降酸功能。通过基因组及代谢组分析，明确酿酒酵母 JP2 降解苹果酸涉及代谢过程中 3 个关键基因，与 S288c 相比，JP2 的 *maeA* 基因出现表达极显著上调，而 *MDH*、*fumC* 基因表达差异不显著，同时 JP2 发酵液有机酸中苹果酸显著下降，乙酸显著增加，并生成少量的富马酸，因而代谢途径苹果酸→草酰乙酸→丙酮酸→乙酸→乙醇是 JP2 代谢苹果酸主要途径，关键基因为 *maeA*；苹果酸→富马酸和苹果酸→丙酮酸→乙酸→乙醇为次要路径。与模式酿酒酵母 S288c 相比，JP2 在果酒发酵过程中 *maeA* 基因高效表达，可显著提高苹果酸降解效率。后续研究将采用基因敲除或强表达技术，进一步对 *maeA* 基因的降酸功能进行验证。

参考文献：

[1] GRANDVALET C. *Oenococcus oeni*: Queen of the cellar, nightmare of geneticists [J]. *Microbiology*, 2017, 163 (3) : 297–299.

[2] JIANG J, SUMBY K M, SUNDSTROM J F, et al. Directed evolution of *Oenococcus oeni* strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment [J]. *Food Microbiology*, 2018, 73: 150–159.

[3] FERNÁNDEZ-PÉREZ R, TENORIO RODRÍGUEZ C, RUIZ-LARREA F. Fluorescence microscopy to monitor wine malolactic fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 228–233.

[4] VILELA A. Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity [J]. *Fermentation*, 2019, 5 (1) : 27.

[5] 李华, 刘延琳, 蒋思欣, 等. *Oenococcus oeni* 苹果酸-乳酸发酵关键酶基因在酿酒酵母中的转化与表达 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14 (4) : 606–611.

LI H, LIU Y L, JIANG S X, et al. Cloning of two key enzyme genes from *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation and their expressions in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2006, 14 (4) : 606–611. (in Chinese)

[6] BENITO Á, JEFFARES D, PALOMERO F, et al. Selected *Schizosaccharomyces pombe* strains have characteristics that are beneficial for winemaking [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3) : e0151102.

[7] PETRUZZI L, CAPOZZI V, BERBEGAL C, et al. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 995.

[8] BENITO S, PALOMERO F, CALDERÓN F, et al. Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking [J]. *Food Microbiology*, 2014, 42: 218–224.

[9] MYLONA A E, DEL FRESNO J M, PALOMERO F, et al. Use of *Schizosaccharomyces* strains for wine fermentation—Effect on the wine composition and food safety [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 232: 63–72.

[10] MINNAAR P P, JOLLY N P, PAULSEN V, et al. *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in sequential fermentations: Effect on phenolic acids of fermented Kei-

- apple (*Diospyros kaki* L.) juice [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 257: 232–237.
- [11] VAUDANO E, COSTANTINI A, GARCIA-MORUNO E. An event-specific method for the detection and quantification of ML01, a genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* wine strain, using quantitative PCR [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 234: 15–23.
- [12] BENITO Á, CALDERÓN F, BENITO S. *Schizosaccharomyces pombe* biotechnological applications in winemaking [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1721: 217–226.
- [13] 何志刚, 李维新, 梁璋成, 等. 优良降酸酿酒酵母的分离和鉴定 [J]. *中国食品学报*, 2013, 13 (5): 191–197.
- HE Z G, LI W X, LIANG Z C, et al. Separation and identification of selected yeast with deacidification ability for brewing in fruit wine [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13 (5): 191–197. (in Chinese)
- [14] 李维新, 魏巍, 何志刚, 等. 酿酒酵母JP2发酵枇杷汁的有机酸代谢及其产香特征分析 [J]. *中国食品学报*, 2016, 16 (2): 251–257.
- LI W X, WEI W, HE Z G, et al. Analysis of organic acids metabolism and fragrant characteristic for fermented loquat juice using *Saccharomyces cerevisiae* JP2 [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16 (2): 251–257. (in Chinese)
- [15] LIANG Z C, LIN X Z, HE Z G, et al. Amino acid and microbial community dynamics during the fermentation of Hong Qu glutinous rice wine [J]. *Food Microbiology*, 2020, 90: 103467.
- [16] COMITINI F, AGARBATI A, CANONICO L, et al. Yeast interactions and molecular mechanisms in wine fermentation: A comprehensive review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (14): 7754.
- [17] DARBANI B, STOVICEK V, VAN DER HOEK S A, et al. Engineering energetically efficient transport of dicarboxylic acids in yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116 (39): 19415–19420.
- [18] BOVO B, NADAI C, VENDRAMINI C, et al. Aptitude of *Saccharomyces* yeasts to ferment unripe grapes harvested during cluster thinning for reducing alcohol content of wine [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 236: 56–64.

(责任编辑: 翁志辉)