

國立臺灣海洋大學食品科學系碩士班

專題討論書面報告

碳硫裂解酶在發酵飲品香氣形成中的應用潛力

**The Application Potential of Carbon–Sulfur Lyases in Aroma
Formation of Fermented Beverages**

授課老師：吳彰哲 老師

吳俊逸 老師

指導老師：林泓廷 老師

學號：01132010

學生：林裕倫 (5121)

報告日期：114 年 11 月 12 號

內容 40%	時間掌控 10%	表達能力 30%	投影片 10%	書面資料 10%

指導教授簽名：

1 碳硫裂解酶在發酵飲品香氣形成中的應用潛力

2 林裕倫 (5121)

3 2025/11/12

4 大綱

5 一、 前言

6 二、 白酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* G20 中碳-硫裂解酶生成 2-呋喃甲硫醇
7 之研究

8 三、 透過過表現 *Saccharomyces cerevisiae* 基因 *STR3*，使釀酒酵母在發酵過程
9 中釋放 3-MH，以提升葡萄酒香氣的工程化研究

10 四、 探索微生物多樣性中的碳-硫裂解酶以增強啤酒與葡萄酒中的硫醇釋放

11 五、 結論

12 摘要

13 近年釀造科學研究指出，含硫香氣化合物 (volatile sulfur compounds, VSCs)
14 是酒類與發酵飲品風味形成的關鍵分子，其中具代表性的多官能硫醇，如 3-巰基
15 己醇 (3MH), 4-巰基-4-甲基戊酮 (4MMP) 及 2-呋喃甲硫醇 (2-furfurylthiol)，能
16 賦予葡萄酒、啤酒與白酒鮮明的熱帶水果、芝麻與烘烤香氣。這些硫醇在原料中
17 多以非揮發性的半胱氨酸或穀胱甘肽結合型前驅物形式存在，必須經發酵微生物
18 的代謝轉換才能釋放出香氣，其中碳硫裂解酶 (carbon-sulfur lyase, CS lyase) 扮
19 演關鍵角色。多項研究證實，釀酒酵母的 CS lyase 家族酵素能催化半胱氨酸結合
20 物的 C-S 鍵裂解，生成具香氣活性的硫醇。酵母中的 *STR3* 與 *CYS3* 基因所編碼
21 的酵素具此活性，能作用於多種硫醇前驅物，促進 3MH、4MMP 及 2-furfurylthiol
22 等化合物釋放。這些酵素屬的活性通常在中性或微鹼性條件下最佳，但部分微生
23 物來源的 CS lyase 亦能在酸性條件下維持活性，顯示其具應用於葡萄酒與啤酒低
24 pH 環境的潛力。然而，實際釀造過程中這類酵素的香氣釋放效率仍偏低，僅能
25 轉化少數前驅物。因此，現今的研究方向逐漸轉向以基因工程或蛋白質改造方式，
26 尋找對酸性、酒精及胺基酸干擾具有更高耐受性的酵素變異株，或開發能在發酵
27 後階段作用的酵素組合，以提升硫醇釋放效率。

1 一、前言

2 葡萄酒的香氣組成是影響其風味與品質的關鍵因素，其中揮發性硫醇在塑造
3 葡萄酒獨特香氣方面扮演重要角色。這些化合物可賦予葡萄酒如葡萄柚、百香果
4 等清新果香，因此深受消費者喜愛 (Clerat et al., 2024; Tofalo et al., 2020)。常見的
5 揮發性硫醇包括 4-巰基-4-甲基戊-2-酮 (4-mercapto-4-methylpentan-2-one,
6 4MMP)、3-巰基己-1-醇 (3-mercaptohexan-1-ol, 3MH) 與 3-巰基己酸乙酯
7 (3mercaptohexyl acetate, 3MHA) 等，然而這些香氣化合物在葡萄果實中以非發性
8 前驅物形式存在，主要為與半胱氨酸 (Cysteine, Cys) 或穀胱甘肽 (Glutathione,
9 GSH) 結合的衍生物，如 Cys-3MH、Cys-4MMP 與 GSH-3MH。這些前驅物需經
10 由酒精發酵過程中酵母酵素的催化作用，方能轉化為具香氣的硫醇化合物。

11 然而，酵母對香氣前驅物的內化率與轉化率普遍偏低，通常僅有不到 10%
12 的前驅物能被轉化為硫醇，導致香氣釋放效率受限 (Subileau et al., 2008)。為提
13 升揮發性硫醇的生成效率，近年來研究者開始關注外源性碳-硫裂解酶
14 (carbonsulfur lyase, C-S lyase) 的應用潛力。其中，半胱氨酸-S-共軛 β -裂解酶
15 (Cysteine-S-conjugate β -lyase, CBL) 因能直接催化半胱氨酸結合型前驅物進行 β -
16 裂解反應，釋放出具香氣的硫醇化合物，成為發酵產業提升香氣生成的重要候選
17 酵素 (Roland et al., 2010)。

18 二、白酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* G20 中碳-硫裂解酶生成 2-呋喃甲硫 19 醇之研究

20 2-呋喃甲硫醇 (2-Furfurylthiol, FFT) 是芝麻香型白酒中的關鍵香氣化合物，
21 賦予烘焙芝麻與焦香特徵。先前研究指出，酵母能以糠醛與 L-胱氨酸 (L-cysteine)
22 為前驅物生成 FFT，其中 *Saccharomyces cerevisiae* 的 *STR3* 與 *CYS3* 基因可能
23 參與此生合成過程。本研究旨在驗證 *STR3* 與 *CYS3* 所編碼的酵素是否具有碳-
24 硫裂解活性，並確認其催化生成 FFT 的能力。

25 研究先以白酒酵母 *S. cerevisiae* G20 為研究對象，建立以糠醛與 L-胱氨酸
26 為前驅物的發酵體系，並以 RT-qPCR 分析 *STR3* 與 *CYS3* 的基因表現。兩基因經
27 PCR 擴增後被克隆至表達載體 pEASY-E1，於 *E. coli* BL21 (DE3) 中誘導表達
28 並純化其蛋白 (Str3p、Cys3p)。使用 Ni-NTA 親和層析純化後，以 SDS-PAGE
29 驗證蛋白純度。接著透過酶活性測試、pH 與溫度穩定性分析，及氣相層析質譜
30 (GC-MS/MS) 定量評估其對胱氨酸-糠醛共軛物的裂解反應與 FFT 生成量。

RT-qPCR 結果顯示，在培養基中添加糠醛與 L-胱胺酸後，G20 酵母之 *STR3* 與 *CYS3* 基因表現分別上升約 2.9 倍與 2.1 倍，顯示其參與 FFT 的生合成過程。與對照株 S288c 相比，G20 於發酵早期 (3-9 小時) 表現量顯著較高，說明其較強的香氣生成潛力。以胱胺酸—糠醛共軛物作為單一前驅物時，FFT 生成量較直接添加糠醛與 L-胱胺酸提升 40%~120%，其中 G20 可產生高達 6.84 mg/L FFT，證實該共軛物為主要前驅體。蛋白表達與純化後，Str3p 分子量約 52 kDa，Cys3p 約 42 kDa，與理論值一致。兩者對 L-胱硫醯胺 (L-cystathionine) 具明顯 C-S 裂解酶活性。pH 活性曲線顯示，Str3p 於 pH 8、Cys3p 於 pH 7 時活性最高，且在 pH 6-9 範圍仍保持超過 80% 活性，呈現良好寬 pH 適應性。溫度測試中，Str3p 與 Cys3p 的最適溫度分別為 50°C 與 40°C，低於 40°C 仍保有超過 85% 活性，但超過 60°C 活性急劇下降，顯示具中等熱穩定性。以純化酵素對胱胺酸—糠醛共軛物進行體外反應時，GC-MS/MS 檢測到特徵峰 m/z 95、96 (furfural) 及 m/z 81、53 (FFT)，證實產物為 2-呋喃甲硫醇。Str3p 在 pH 8 下由 6 mM 前驅物釋放 2.32 μ M FFT，活性較 pH 7 高 47.8%；Cys3p 在 pH 7 下由 3 mM 前驅物產生 4.34 μ M FFT，較 pH 8 提升 75.7%。兩者均隨前驅物濃度增加而提升生成量，且控制組無產物生成。

結果表明 Str3p 與 Cys3p 皆能催化胱胺酸—糠醛共軛物裂解生成 FFT，為首次直接證實酵母 C-S β -裂解酶具此催化能力。

三、透過過表現 *Saccharomyces cerevisiae* 基因 *STR3*，使釀酒酵母在發酵過程中釋放 3-MH，以提升葡萄酒香氣的工程化研究

本研究透過在釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中過度表達其內源基因 *STR3*，成功使其在發酵過程中釋放更多芳香硫醇 3-mercaptohexan-1-ol (3MH)，為增強葡萄酒風味提供了基礎。

研究首先以商用葡萄酒酵母株 EC-1118 為基因來源，擴增並克隆 *STR3* 基因，構築於含有 *PGK1* 強啟動子的表現載體中，再整合入酵母 VIN13 的基因組中，以獲得過度表現株 VIN13 (*STR3*)。為對照比較，另使用表現大腸桿菌 *tnaA* 基因的 VIN13 (*CSL1*) 株與原始 VIN13 株。

重組蛋白 Str3p 於 *E. coli* 表達並純化，用以分析其酵素特性，包括最適 pH、基質專一性與催化效率。酵素活性以高效液相層析 (HPLC) 與氣相層析-質譜 (GC/MS) 測定裂解反應產物。發酵實驗使用過濾滅菌的葡萄汁，在 18°C 下進

行 15 天，監測糖分、酸度、乙醇、揮發性硫化物與芳香硫醇生成量，同時以 RT-qPCR 追蹤 *STR3* 基因在發酵過程中的表現變化。重組 Str3p 蛋白為 53 kDa 的四聚體結構，需依附輔酶 pyridoxal-5-phosphate (PLP) 方具活性，最適 pH 為 8.75。酵素能裂解多種含硫胺基酸，其中以 L-djenkolate 與 L-cystathionine 為最佳基質，顯示具廣泛的硫-碳鍵裂解能力。進一步以半胱氨酸結合的 3MH (Cys-3MH) 與 4MMP (Cys-4MMP) 為基質測試，結果證實 Str3p 能夠釋放少量的自由芳香硫醇，產生分別約 2.1 μ M 的 3MH 與 12.3 μ M 的 4MMP，雖活性僅為大腸桿菌 *tnaA* 酵素的 0.2% 至 1.3%，但為首度直接證實酵母來源酵素具此活性。在發酵實驗中，VIN13 (*STR3*) 與對照株皆能完全發酵糖分至乾型，乙醇、酸、甘油等主要理化成分無明顯差異，且未產生不良硫化異味物質。基因表現分析顯示 *STR3* 在原始株於發酵末期表現上升，而在過度表現株中自發酵早期即高量穩定表現。最重要的是，VIN13 (*STR3*) 在葡萄汁發酵後釋放之 3MH 濃度較原始株高出約 27% (增加 278 ng/L, $P < 0.05$)，雖不及表現 *tnaA* 的 VIN13 (*CSL1*) 株提升幅度 (約 9.5 倍)，但此提升已超過 3MH 的嗅覺閾值 (60 ng/L)，足以顯著增強香氣感受。

本研究證實釀酒酵母的 *STR3* 基因編碼之 Str3p 為一具 β -裂解活性的半胱硫醚裂解酶，可催化芳香硫醇前驅物釋放出 3MH 與 4MMP。透過在釀酒酵母中過度表現 *STR3*，可在不改變基本發酵性能的情況下，有效提升葡萄酒中芳香硫醇濃度並改善香氣表現。

四、探索微生物多樣性中的碳-硫裂解酶以增強啤酒與葡萄酒中的硫醇釋放

在葡萄酒與啤酒的釀造過程中，揮發性硫化物 (volatile sulfur compounds, VSCs) 是決定香氣的重要成分，其中多官能性硫醇如 3SH、3SHA 與 4SMP 對果香與清新氣味的形成貢獻顯著。然而，這些硫醇多以非揮發性的硫共軛前驅物形式存在，必須經酵母等微生物的碳-硫裂解酶 (carbon-sulfur lyase, CSL) 催化轉化方能釋放。由於現行發酵菌株對前驅物轉化率僅約 1-10%，本研究旨在探索不同微生物來源之 CSL 酵素，評估其在啤酒與葡萄酒發酵中提升硫醇釋放的潛力。

研究團隊自多種微生物中篩選具有 GRAS (Generally Recognized As Safe) 資格者，包括 *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Metschnikowia pulcherrima* 與

1 *Lapidilactobacillus dextrinicus*，並以 *E. coli* 表達其 CSL 酵素。此外，亦製備
2 *Lactobacillus delbrueckii* 之兩種突變型 (E267A 與 E267K)。所有重組酵素經親
3 親和層析純化後，利用合成基質 L-Cys (4NP) 測定其 β -裂解活性，並於 pH 3-8
4 間及不同胺基酸存在下進行活性測試。進一步於釀酒與釀啤之試驗槽 (約 1 hL)
5 中，於發酵不同階段添加 CSL 酵素，觀察對 3SH、3SHA、4SMP 濃度之影響。

6 在酵素動力學方面，DEX CSL 之催化常數 (kcat) 高達 $277.5 \pm 5.8 \text{ s}^{-1}$ ，為
7 LDB CSL 的 20 倍；其 K_m 為 $0.69 \pm 0.03 \text{ mM}$ ，顯示雖親和力降低，但整體催化
8 效率 ($k_{cat}/K_m = 402.2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) 仍較 LDB CSL 高約兩倍。相較之下，Bs、Bb
9 與 Mp CSL 活性顯著較低。pH 效應顯示，除 DEX CSL 外，其餘酵素於酸性環
10 境下 (pH<5) 幾乎喪失活性，而 DEX CSL 於 pH 4.0 仍具可測反應，顯示其具
11 備釀造條件下的潛在應用性。序列比對指出，DEX CSL 與 LDB CSL 在胺基酸
12 序列上相似度達 82.2%，主要差異為活性中心之 Glu267 被 Lys265 取代，推測
13 此位點變化使其在酸性條件下更穩定。進一步的點突變實驗亦證實 LDB CSL-
14 E267K 在 pH 5-6.5 間活性較野生型高，顯示此殘基可調控酵素之 pH 敏感性。
15 胺基酸競爭實驗顯示，LDB CSL 受胱胺酸、精胺酸與離胺酸抑制約 20-30%，而
16 DEX CSL 僅受胱胺酸與甘胺酸輕微抑制，表明其對胺基酸干擾的耐受度更高。
17 在釀酒應用試驗中，於 Sauvignon Blanc 釀造過程添加 LDB CSL，於穩定化階段
18 可觀察到 約 20% 的 Cys (4NP) 轉化，發酵階段達約 60%，但於熟成階段 (3 個
19 月, 20 °C) 則未檢測到明顯活性。實際香氣化合物分析顯示，3SH 濃度自澄清後
20 之 $19.3 \pm 1.5 \text{ ng/L}$ 上升至熟成後之 $329.5 \pm 34.6 \text{ ng/L}$ ，但此提升在有無酵素添加
21 間無顯著差異 ($p>0.05$)。在啤酒試驗中，僅 DEX CSL 被測試；其於發酵初期與
22 33% 發酵階段可觀察到 Cys (4NP) 轉化現象，但對 3SH 釋放量無顯著影響
23 (12.5 ng/L 至 154 ng/L ，無酵素與酵素組間差異不顯著)。推測主因為胺基酸與
24 乙醇對酵素之抑制，以及自然前驅物濃度遠低於實驗用合成基質所致。

25 本研究首次比較多種微生物來源之 CSL 酵素於酒類發酵中的表現。結果顯
26 示，DEX CSL 具最高催化效率與酸性穩定性，且其活性中心的 Lys265 殘基可
27 能為酸耐性的關鍵。雖然在小試與中試發酵中添加外源 CSL 並未顯著提升硫醇
28 生成量，但證實此類酵素可在酸性釀造環境下維持活性。未來應聚焦於尋找對胺
29 基酸及乙醇抑制性較低的變異酵素，並結合其他輔助酶以促進前驅物轉化，從而
30 實現外源酵素強化香氣釋放的產業化應用。

31 五、 結論

1 碳硫裂解酶在發酵飲品香氣形成中的功能已被明確證實，其活性是揮發性硫醇
2 釋放的關鍵決定因素。不同研究一致指出，酵母來源的 STR3 與 CYS3 基因所
3 編碼酵素能有效催化半胱氨酸結合型前驅物，生成多種具特徵香氣的硫醇化合
4 物，並且具有良好的熱穩定性與寬廣的 pH 耐受範圍。此外，跨物種比較顯
5 示，部分乳酸菌與非傳統酵母的碳硫裂解酶在酸性條件下仍具催化能力，為其
6 應用於葡萄酒與啤酒等低 pH 發酵環境提供新契機。然而，實際發酵系統中，
7 香氣釋放效率仍受前驅物濃度、胺基酸競爭、乙醇濃度及酵母代謝調控等因素
8 限制，導致轉化率低。未來的研究方向應聚焦於酵素工程與代謝路徑優化，發
9 展對環境抑制具高耐受性且專一性強的酵素變異株，並結合發酵條件控制與基
10 因改造策略，以提升硫醇生成效率，實現對發酵香氣風味品質的提升。

11

1

2 六、 參考文獻

3 Clérat, L., Conter, C., Astegno, A., Schneider, R., Cavelier, F., & Vivès, E. (2025) .
4 Exploring carbon–sulfur (CS) lyase enzymes across microbial diversity for
5 enhanced thiol release in beer and wine. *Journal of Agricultural and Food*
6 *Chemistry*, 73 (35) , 23560–23569.

7 Clérat, L., Remond, E., Schneider, R., Cavelier, F., & Vives, E. (2024) . Exogenous CS
8 Lyase Enzyme, a Potential Tool To Release Aromas in Wine or Beer? *J Agric Food*
9 *Chem*, 72 (4) , 1878-1884.

10 Holt, S., Cordente, A. G., Williams, S. J., Capone, D. L., Jitjaroen, W., Menz, I. R.,
11 Curtin, C., & Anderson, P. A. (2011) . *Engineering Saccharomyces cerevisiae to*
12 *release 3-mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an*
13 *S. cerevisiae gene, STR3, for improvement of wine aroma. Applied and*
14 *Environmental Microbiology*, 77 (11) , 3626–3632.

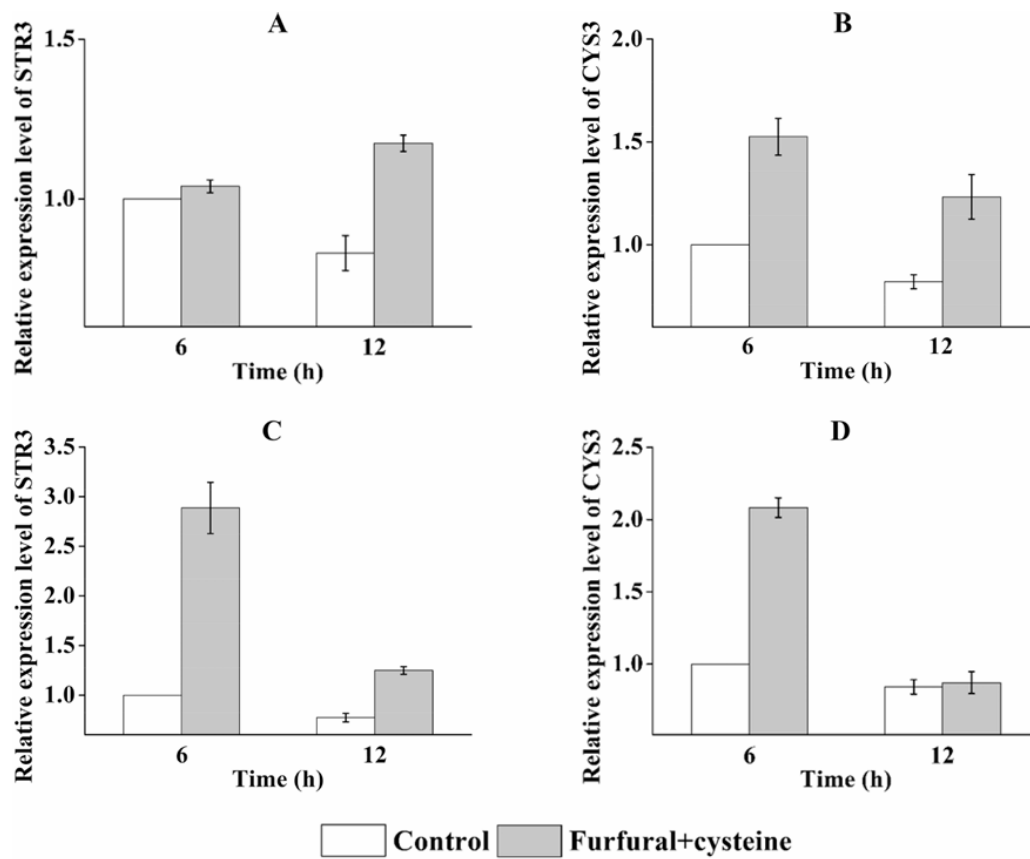
15 Subileau, M., et al. (2008) . New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in
16 sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (E) -Hexen-2-al are not the major
17 precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (19) , 9230-9235.

18 Tofalo, R., Perpetuini, G., Battistelli, N., Tittarelli, F., & Suzzi, G. (2020) . Correlation
19 between IRC7 gene expression and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one production
20 in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast*, 37 (9-10) , 487-495.

21 Zha, M., Sun, B., Yin, S., Mehmood, A., Cheng, L., & Wang, C. (2018) . Generation of
22 2-furfurylthiol by carbon–sulfur lyase from the Baijiu yeast *Saccharomyces*
23 *cerevisiae* G20. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (8) , 2114–2120.

24

1 七、圖表



2

3 Figure 1. Determination of STR3 and CYS3 gene expression levels in *S. cerevisiae*
 4 S288c (A,B) and G20 (C,D) fermented with and without the substrates (furfural and L-
 5 cysteine). The ACT1 gene was used as the internal control in the RT-qPCR, and the
 6 experiments were repeated three times. Data are the averages of three independent
 7 experiments. The error bars represent the SD.

8

(Zha et al., 2018)

9

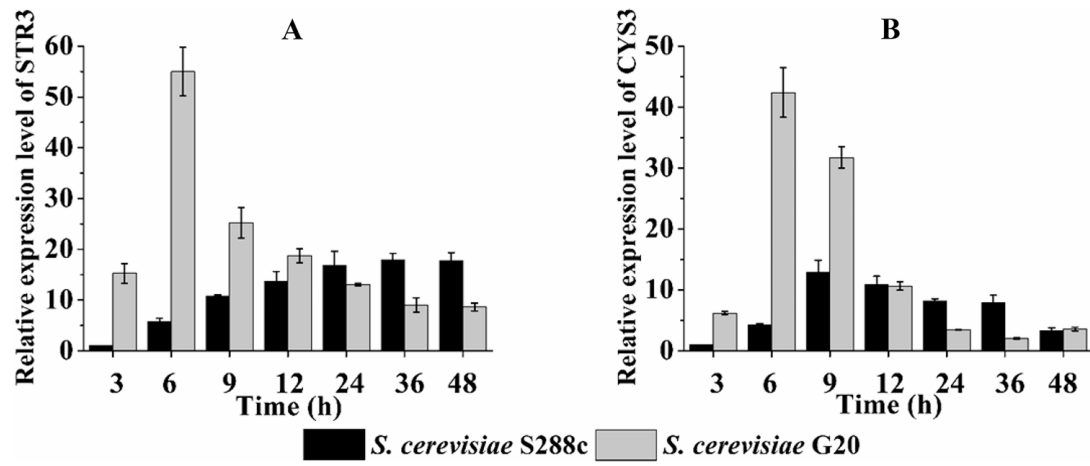


Figure 2. Expression patterns of the STR3 (A) and CYS3 (B) genes in *S. cerevisiae* G20 compared with those in S288c; furfural and L-cysteine were used as the substrates during the fermentation. Data are the averages of three independent experiments. The error bars represent the SD.

(Zha et al., 2018)

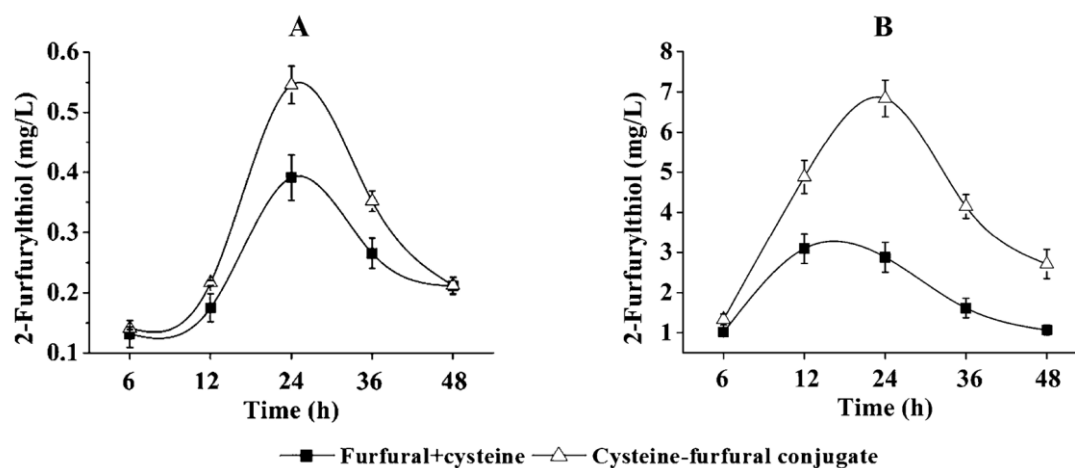


Figure 3. Concentrations of 2-furfurylthiol released by *S. cerevisiae* S288c (A) and G20 (B). Each strain was cultured with different substrates, furfural and L-cysteine (10 mM) or the cysteine–furfural conjugate (10 mM). Data are the average of three independent experiments. The error bars represent the SD.

(Zha et al., 2018)

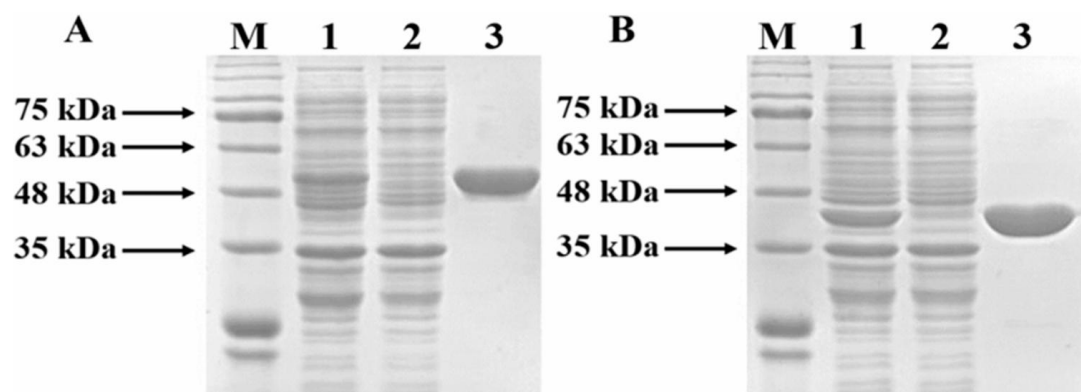


Figure 4. SDS-polyacrylamide gels of nickel-affinity-purified Str3p (A) and Cys3p (B). Lane M, low-molecular-weight standards; lane 1, cleared lysate; lane 2, flowthrough; lane 3, eluate with 200 mM imidazole.

(Zha et al., 2018)

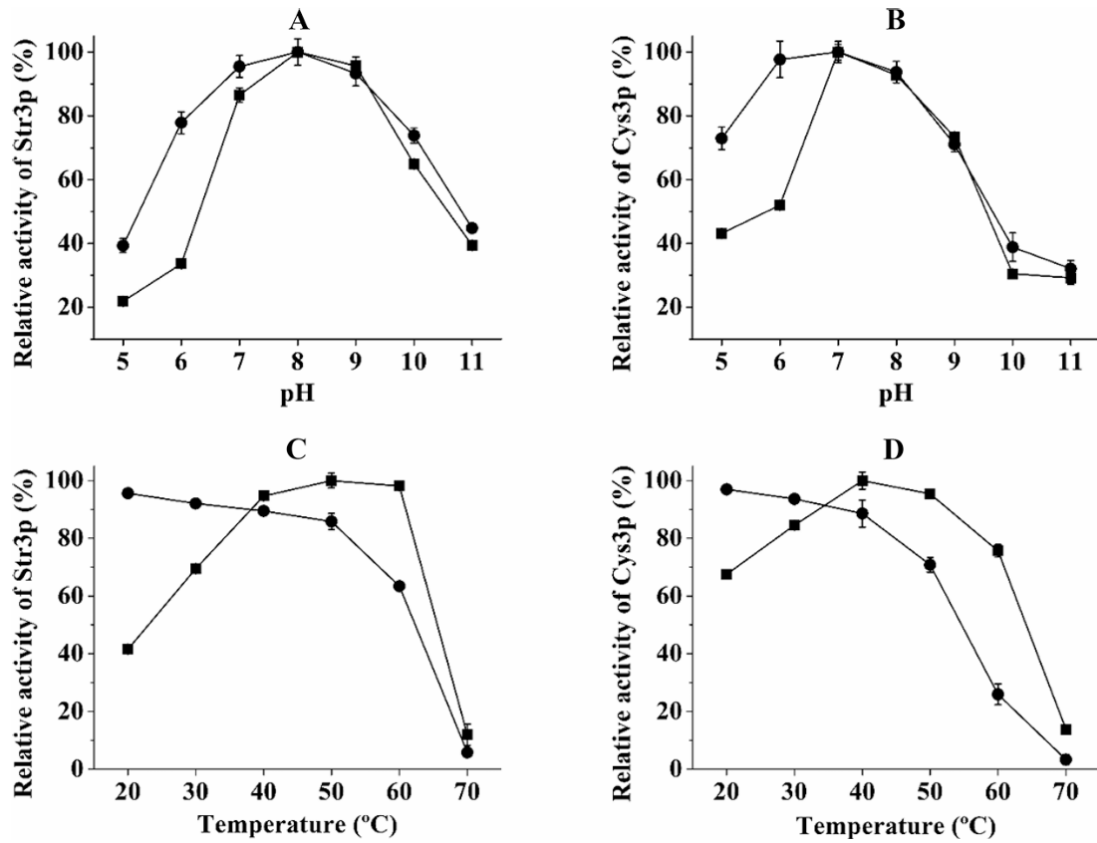


Figure 5. Effect of pH and temperature on the activity (■) and stability (●) of purified Str3p (A,C) and Cys3p (B,D). Data are the averages of three independent experiments. The error bars represent the SD.

(Zha et al., 2018)

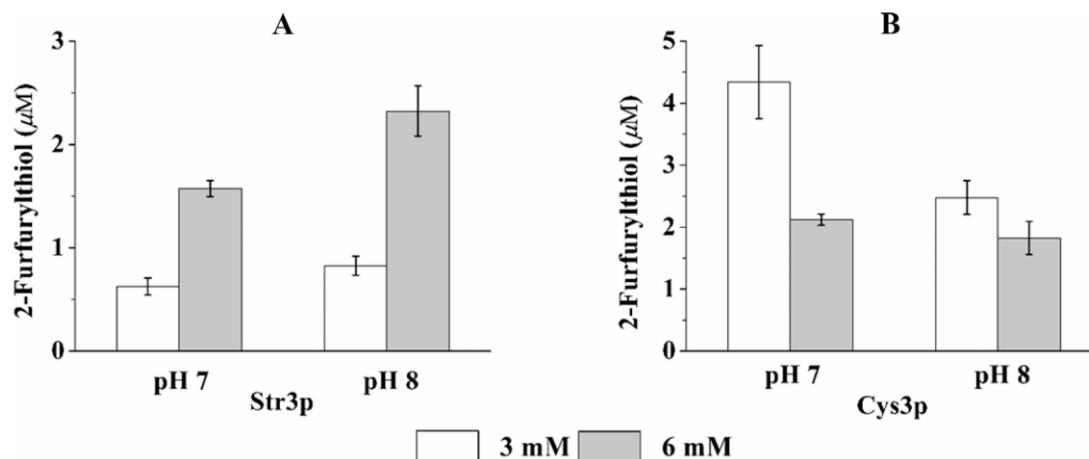


Figure 6. GC/MS quantitation of the enzymatic reactions with purified Str3p (A) and Cys3p (B). The release of 2-furfurylthiol was quantified with headspace GC/MS in reaction mixtures incubated with a 3 or 6 mM concentration of the cysteine–furfural-conjugated precursor. The experiments were carried out with 50 μg/mL purified Str3p and Cys3p at 30 °C and pH 7.0 or 8.0 to minimize the hydrolysis of the 2-furfurylthiol precursor. Data shown are the means of triplicate experiments ± standard deviations of the reactions. 2-Furfurylthiol was not detected with the empty vector control (pEASY-E1) or heat-inactivated purified enzymes.

(Zha et al., 2018)

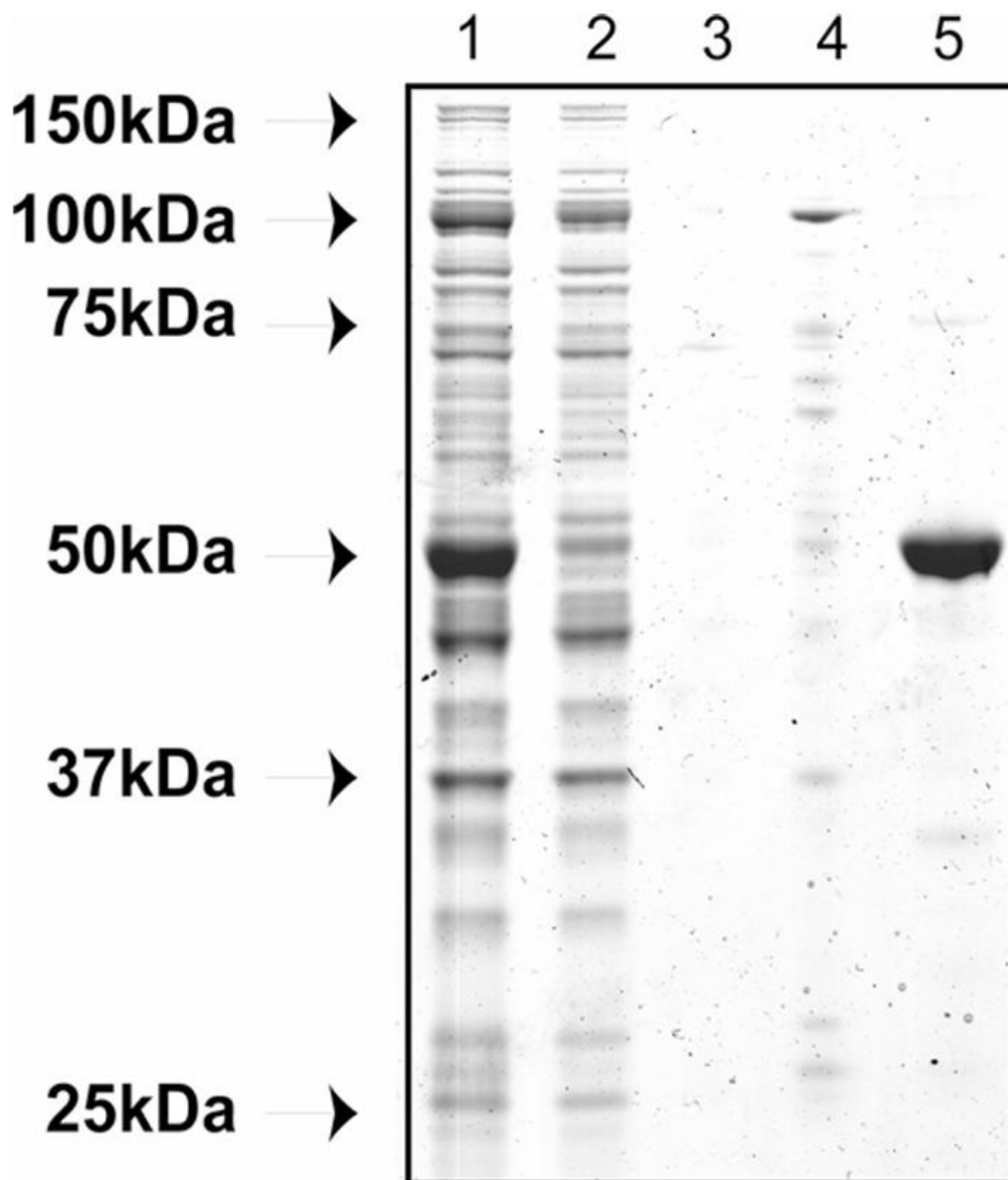


Figure 7. SDS-polyacrylamide gel of nickel affinity-purified Str3p. Lane 1, cleared lysate; lane 2, flowthrough; lane 3, 10 mM imidazole wash; lane 4, 100 mM imidazole wash; lane 5, elution with 500 mM imidazole.

(Holt et al., 2011)

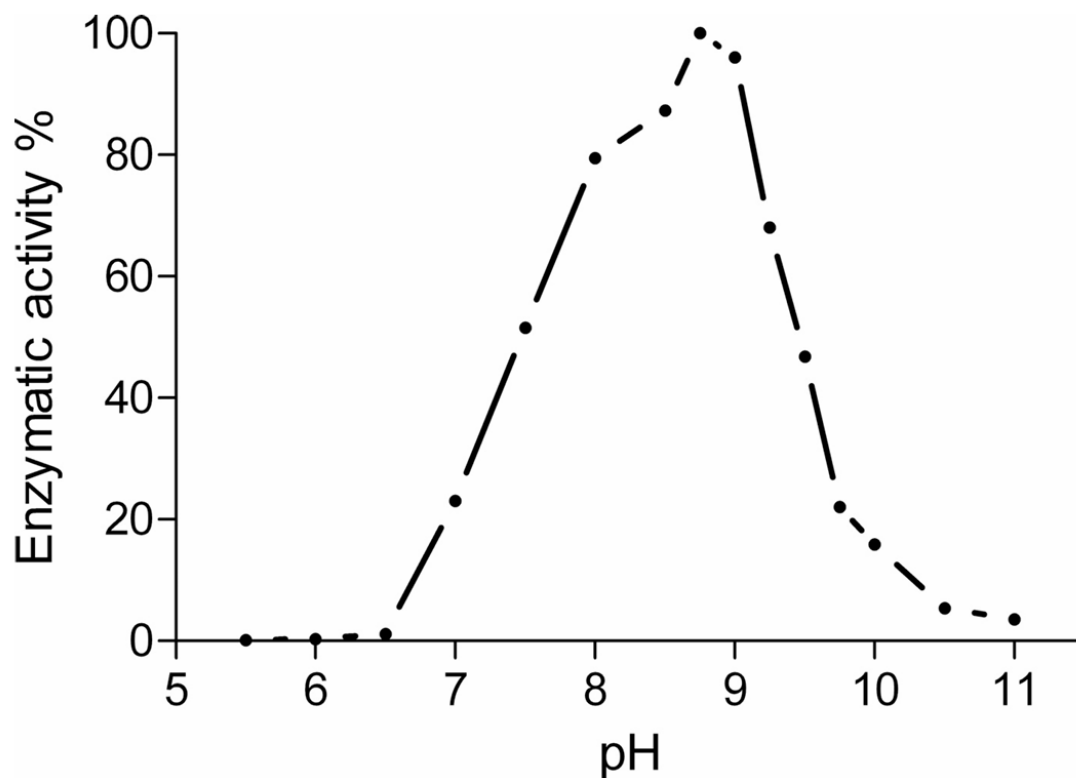


Figure 8. The activity of Str3p toward L-cystathionine was measured by detection of pyruvate by HPLC. The activity was normalized against a blank, and the result is expressed as a percentage of the maximal activity at pH 8.75. Data shown are the mean of three experiments. The standard deviation did not exceed 10% of any of the values.

(Holt et al., 2011)

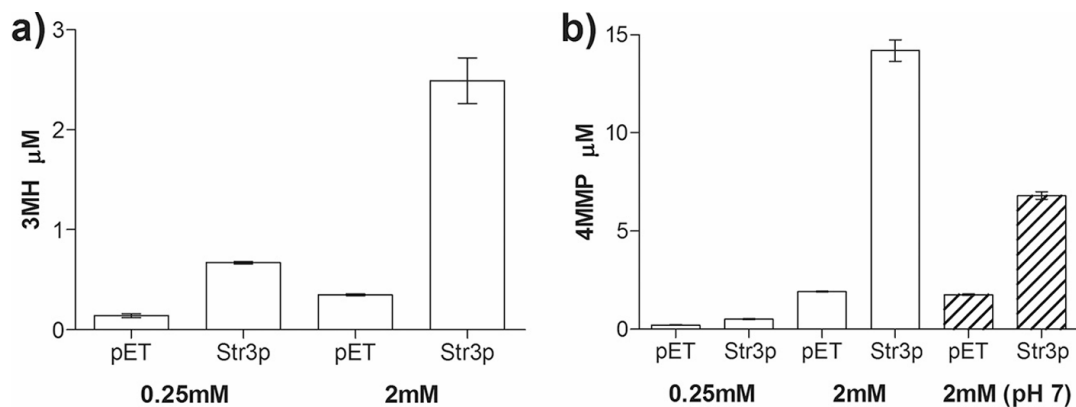


Figure 9. GC/MS quantification of enzymatic reactions with purified Str3p. The release of 3MH and 4MMP was quantified with headspace GC/MS in reaction mixtures incubated with 0.25 mM or 2 mM cysteine-S-conjugated precursor. Experiments were carried out with 31 g/ml purified Str3p at 28°C and at pH 7.5 to minimize hydrolysis of the 4MMP precursor (26). Data shown are the means of triplicate experiments standard deviations of Str3p reactions and empty vector controls (pET), which were significantly different (P 0.01) for both substrates. An additional negative control, using heat-inactivated Str3p, was indistinguishable from the empty vector control (P 0.225 for 3MH and P 0.442 for 4MMP). We observed a strong correlation (R² 0.95) between thiol and pyruvate formation for both Cys-3MH and Cys-4MMP (data not shown). Hatched bars show results of an experiment carried out at pH 7.0.

(Holt et al., 2011)

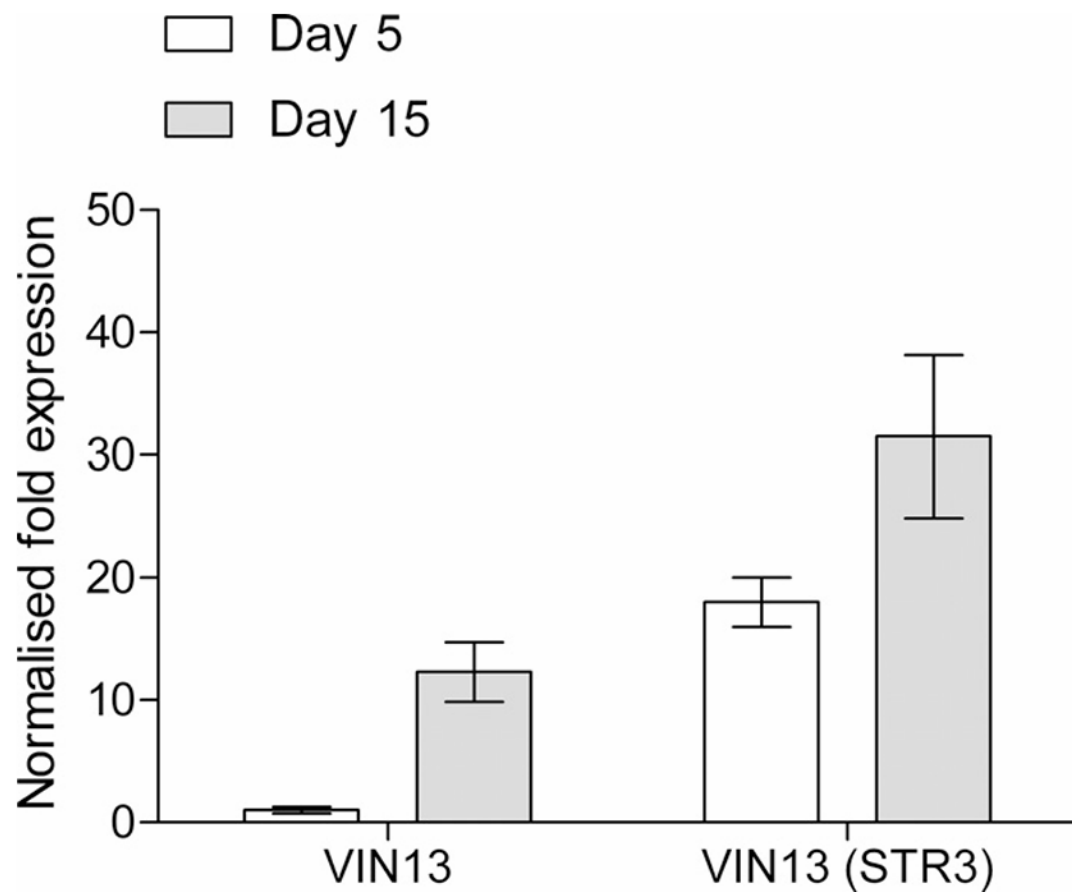


Figure 10. Quantitative RT-PCR of the STR3 mRNA level at day 5 and day 15 during fermentation with the commercial wine yeast, VIN 13, and a strain modified to overexpress STR3, VIN 13 (STR3). Data shown are the means of four data points from duplicate fermentations standard errors of the means.

(Holt et al., 2011)

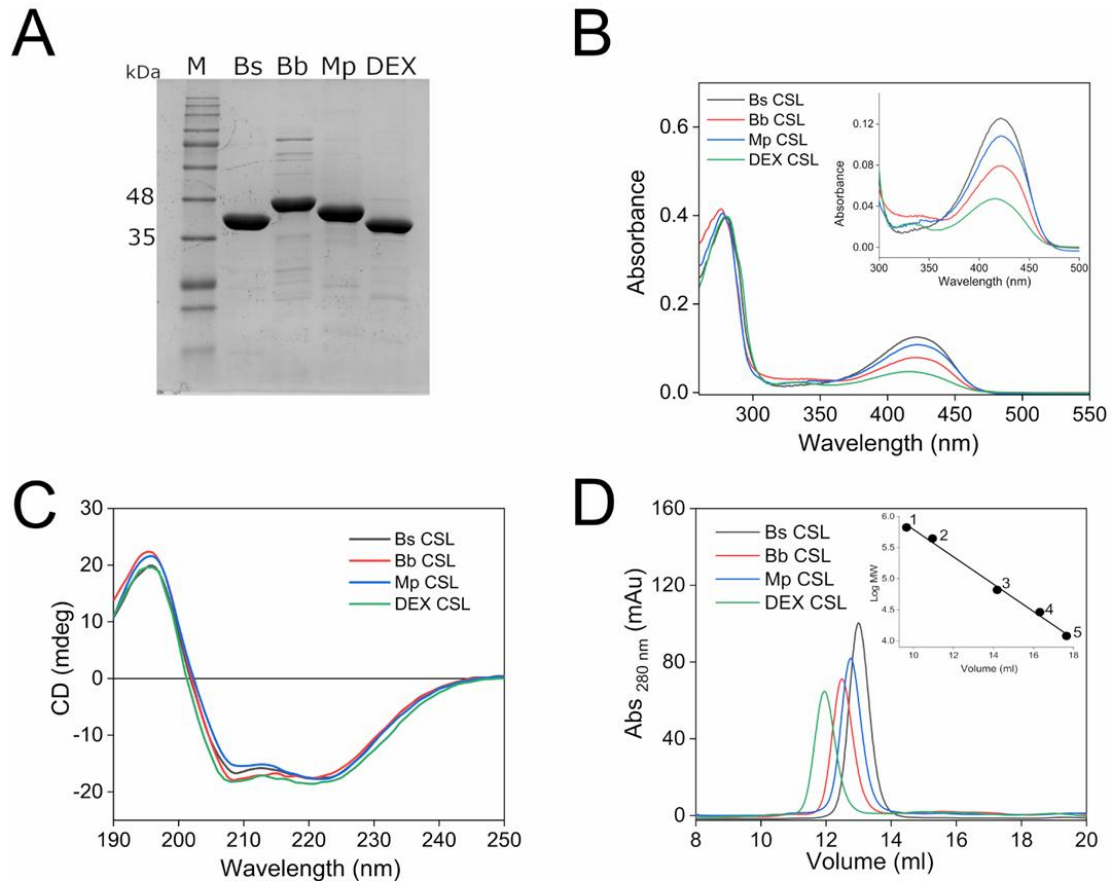
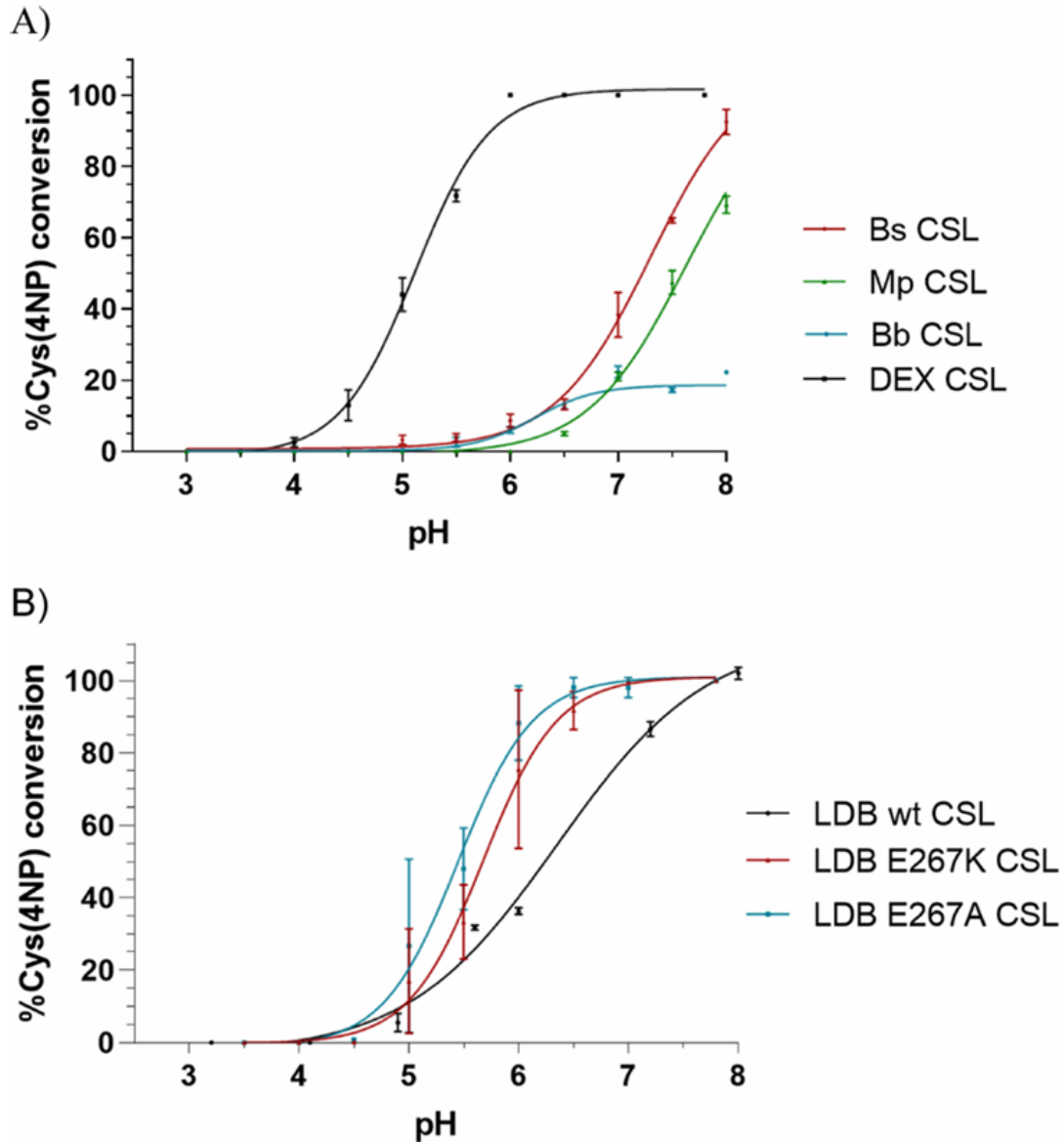


Figure 11. Properties of purified recombinant CSLs. (A) 12% SDS–PAGE analysis of purified recombinant CSLs. Lane M, protein marker; lane 1, Bs CSL; lane 2, Bb CSL; lane 3, Mp CSL; lane 4, DEX CSL. (B) UV–visible absorption spectra of purified CSLs recorded in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.6. Inset: zoom of the 300–500 nm region. (C) Far-UV CD spectra of 0.2 mg/mL CSL variants in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.6. (D) Gel filtration chromatography of various CSLs at 1 mg/mL using a Superdex 200 10/300 GL column in 20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl buffer, pH 7.6. Inset: calibration curve of the logarithm of the molecular weight versus elution volumes (Ve). The standard proteins used were: 1, thyroglobulin; 2, apoferritin; 3, bovine serum albumin; 4, carbonic anhydrase; 5, cytochrome c.

(Clérat et al., 2025)



(Clérat et al., 2025)

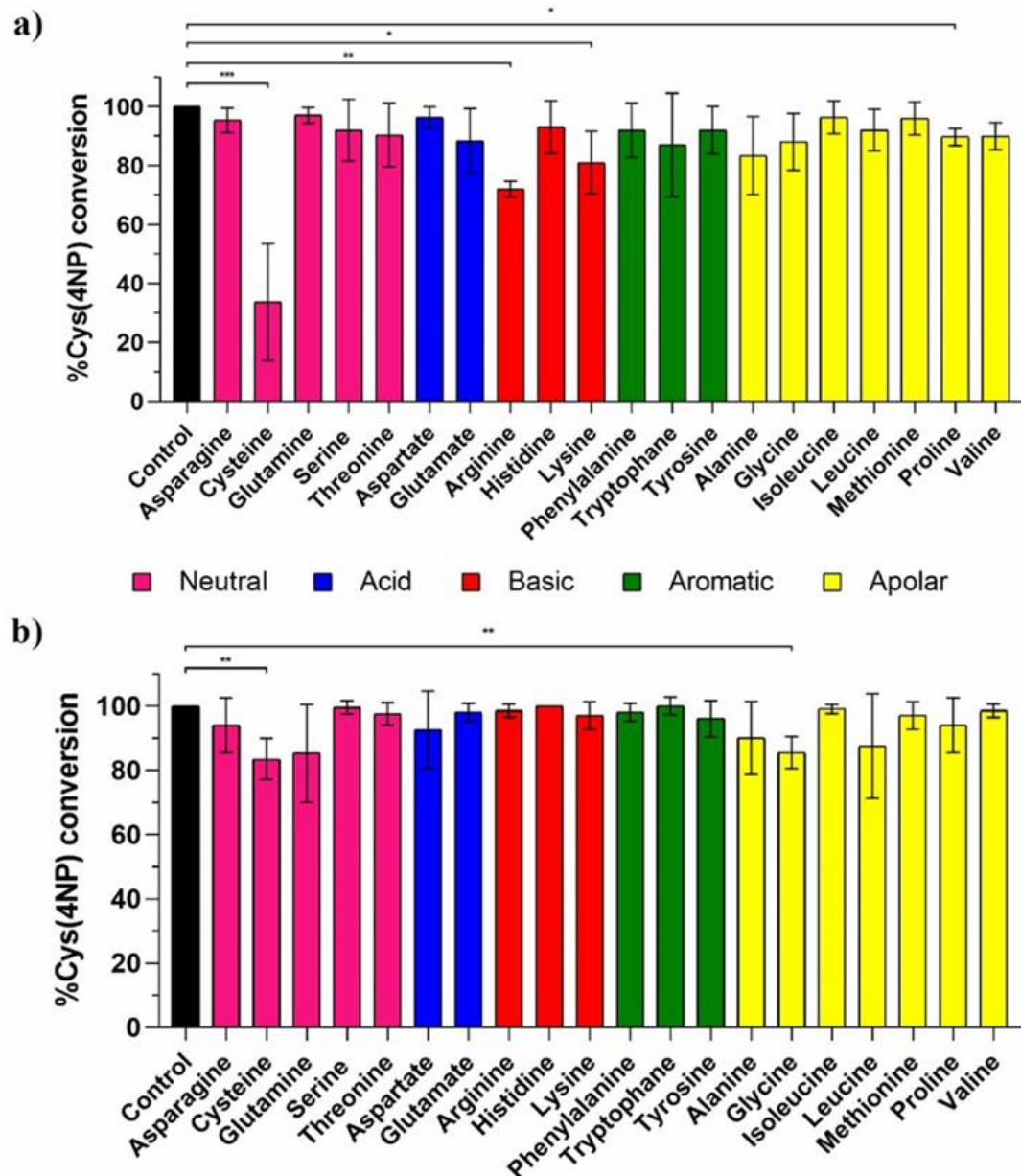


Figure 13 Enzymatic activity of (a) LDB CSL and (b) DEX CSL toward Cys(4NP) in competition with natural AAs. The black bar represents CSL activity with Cys(4NP) without a competitor as a control; each AA was tested as a competitor at a concentration ten times higher than that of the substrate ($n = 3$). The error bars represent SD. Values are statistically different in the Kruskal–Wallis test with (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, and (***) $p < 0.001$ compared to the control.

(Clérat et al., 2025)

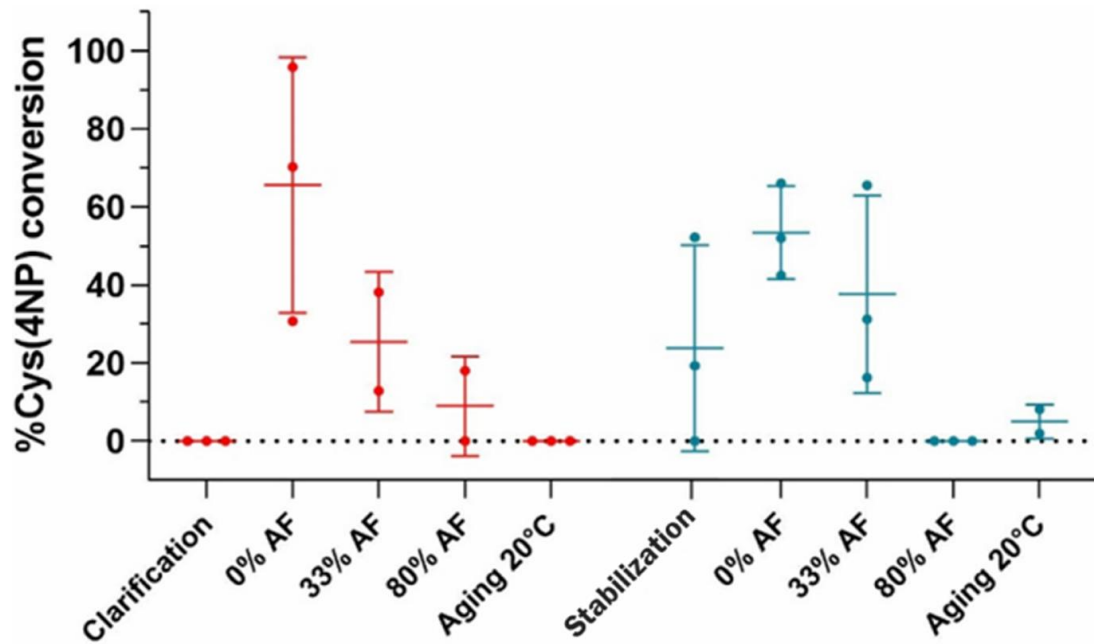


Figure 14. Spectrophotometric quantification of LDB CSL activity during the winemaking process at each application stage. Red values represent samples taken from the clarified tank, while blue values represent samples taken from the stabilized tank. All conditions were tested in triplicate, and the values shown are the mean of three spectral readings. Error bars indicate standard deviation (SD).

(Clérat et al., 2025)

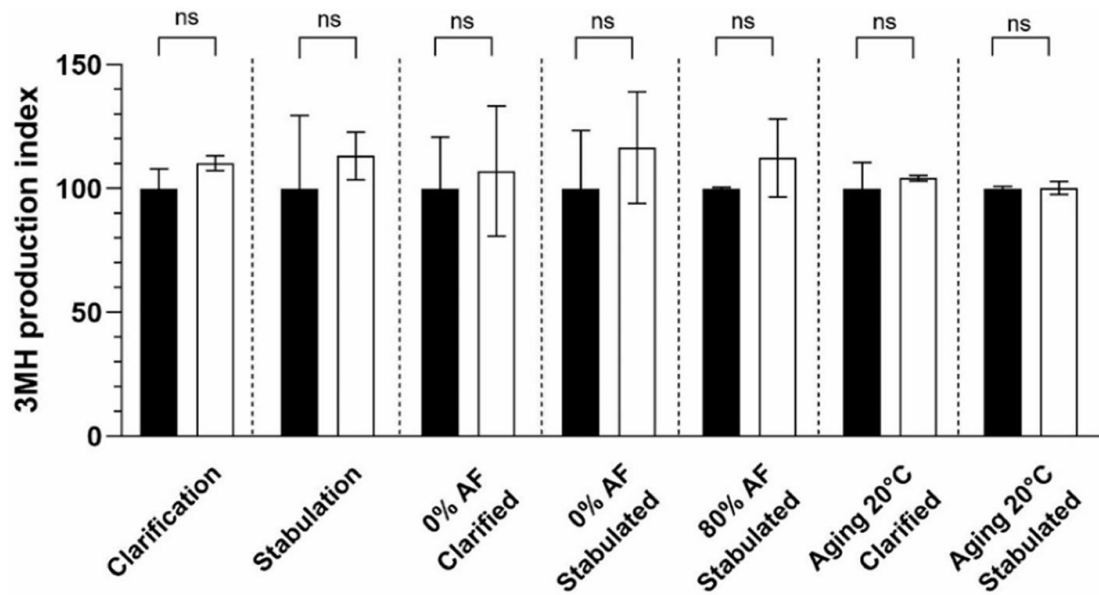


Figure 15. Production of 3SH at the end of each stage of enzyme application. Black boxes represent the control condition without enzyme at each stage: clarification, stabilization, fermentation, and aging. White boxes represent the average concentration of 3SH quantified in samples where the enzyme was added. Values obtained with enzyme application were compared to the control condition at the corresponding stage, with 100% representing the average concentration of 3SH in the control samples without enzyme. Error bars indicate SD ($n = 3$). No statistically significant differences were found in a one-way ANOVA, with (ns) $p > 0.05$ compared to the control.

(Clérat et al., 2025)

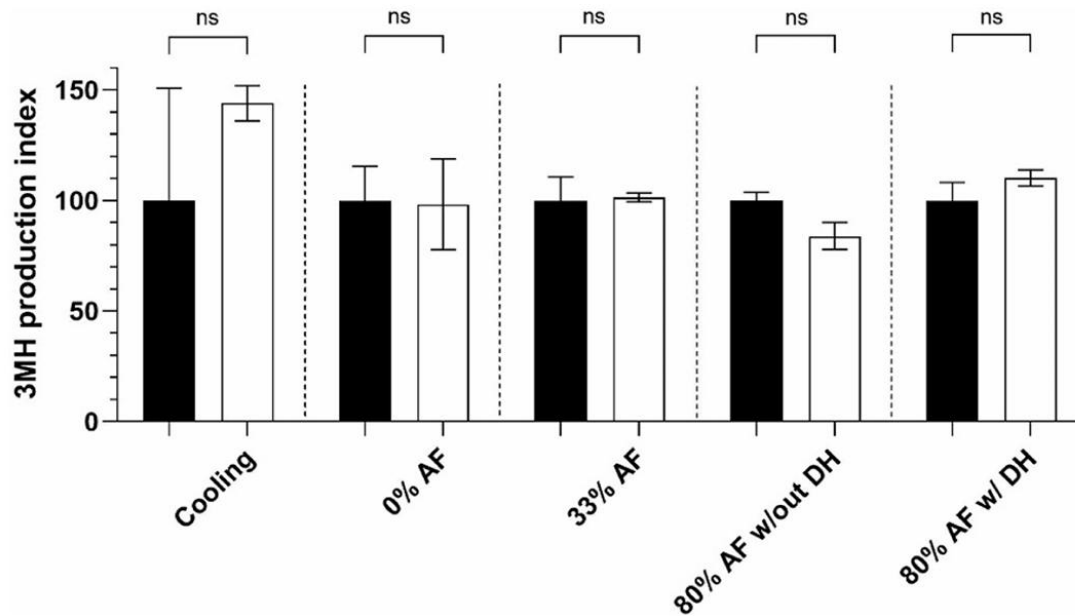


Figure 16. Production of 3SH at the end of each stage of DEX CSL enzyme application during brewing. Black boxes represent the control condition without enzyme addition at each stage, while white boxes represent the average 3SH concentration in samples with enzyme treatment. The values in the enzyme-treated samples are compared to the control condition at each corresponding phase, with 100% representing the average 3SH concentration in control samples. Error bars represent SD (n = 3). A one-way ANOVA showed no statistically significant differences between enzyme-treated and control samples (ns, $p > 0.05$).

(Clérat et al., 2025)

1 Table 1. Strains and plasmids used in this work.

strains and plasmids	relevant features	reference or source
plasmids		
pEASY-E1	Vector for protein expression, Amp ^R	TRANSGEN Inc., Beijing, China
pEASY-E1-STR3	PCR product of <i>STR3</i> cloned in pEASY-E1, Amp ^R	this work
pEASY-E1-CYS3	PCR product of <i>CYS3</i> cloned in pEASY-E1, Amp ^R	this work
strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	host for cloning	TIANGEN Inc., Beijing, China
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	host for protein expression	TIANGEN Inc., Beijing, China
<i>E. coli</i> BL21(STR3)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pEASY- E1-STR3, Amp ^R	this work
<i>E. coli</i> BL21(CYS3)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) harboring pEASY- E1-CYS3, Amp ^R	this work
<i>S. cerevisiae</i> S288c (ATCC 204508)	reference strain	laboratory collection
<i>S. cerevisiae</i> G20	wild strain with the capacity to produce 2-furfurylthiol, donor of <i>STR3</i> and <i>CYS3</i>	laboratory collection

2

3

4

(Zha et al., 2018)

1 Table 2. Substrate specificity of purified Str3p

Substrate	Relative activity (%) ^a
L-Cystathionine ^b	100 ± 10.9
L-Djenkolate	154 ± 11.0
L-Cystine	22.0 ± 2.1
<i>S</i> -Ethyl-L-cysteine	9.0 ± 0.7
<i>S</i> -Methyl-L-cysteine	7.4 ± 0.3
L-Cysteine	1.0 ± 0.3
L-Methionine	0.0

(Holt et al., 2011)

1 Table 3. Basic composition of the *V. vinifera* L. cv. Sauvignon blanc wines made using
2 the modified VIN 13 (STR3), VIN 13 (CSL1), and the control VIN 13 strains

Detection method and component	Amount of component in strain ^a :		
	VIN 13	VIN 13 (STR3)	VIN 13 (CSL1)
HPLC			
Alcohol (% [vol/vol])	11.5 ± 0.3	11.6 ± 0.2	11.4 ± 0.3
Residual sugar (g/liter)	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Acetic acid (g/liter)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.005
Glycerol (g/liter)	4.6 ± 0.13	4.4 ± 0.03	4.5 ± 0.31
Malic acid (g/liter)	2.6 ± 0.02	2.5 ± 0.01	2.5 ± 0.05
Tartaric acid (g/liter)	1.8 ± 0.01	1.8 ± 0.01	1.8 ± 0.12
Succinic acid (g/liter)	2.0 ± 0.07	2.0 ± 0.04	2.0 ± 0.14
GC/SCD			
Hydrogen sulfide (µg/liter)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.6 ± 1.1
Methanethiol (µg/liter)	4.1 ± 1.8	5.0 ± 1.1	4.6 ± 2.4
Ethanethiol (µg/liter)	ND	ND	ND
Dimethyl sulfide (µg/liter)	11.4 ± 6.0	10.7 ± 3.2	10.6 ± 5.7
Carbon disulfide (µg/liter)	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2
Diethyl sulfide (µg/liter)	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Methyl thioacetate (µg/liter)	3.2 ± 0.8	4.6 ± 2.6	2.9 ± 1.0
Dimethyl disulfide (µg/liter)	ND	ND	ND
Ethyl thioacetate (µg/liter)	0.3 ± 0.4	0.5 ± 0.6	0.5 ± 0.5
Diethyl disulfide (µg/liter)	ND	ND	ND

(Holt et al., 2011)

1 Table 4. Production of 3MH in a *V. vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grape must using
 2 the modified VIN 13 (STR3), VIN 13 (CSL1), and the control VIN 13 strains

Strain	3MH (ng/liter) ^a	<i>P</i> ^b
VIN 13	1,084 ± 66	
VIN 13 (<i>STR3</i>)	1,362 ± 84	0.014
VIN 13 (<i>CSL1</i>)	10,268 ± 548	0.001

(Holt et al., 2011)

1 Table 5. Kinetic Parameters of Different CSL Enzymes Using Cys (4NP) as Substrate
2 at pH 7.6

Enzyme	Encoding gene	k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Bs CSL	<i>MetC</i>	$0.09 \pm 0.03^{\text{a}}$	$0.5 \pm 0.2^{\text{a,b}}$	0.18
Bb CSL	<i>MetC</i>	$0.019 \pm 0.005^{\text{b}}$	$0.40 \pm 0.037^{\text{b}}$	0.0475
Mp CSL	<i>STR3</i>	0.024^{b}	0.2^{d}	0.12
DEX CSL	<i>PatC</i>	$277.5 \pm 5.8^{\text{c}}$	$0.69 \pm 0.03^{\text{a}}$	402.2
LDB CSL	<i>PatC</i>	13.7 ± 9.7	0.077 ± 0.019	177.9

(Clérat et al., 2025)

1 Table 6. Qualitative Detection of the Conversion of Cys(4NP) by DEX CSL during
 2 Brewing Trials (DH: Dry Hopping)

	CSL	pH of the matrix	Cys(4NP) conversion
	Cooling	5.3	-
	Start of AF	5.3	+
	33% AF	4.9	+
	80% AF without DH	4.4	-
3	80% AF with DH	4.4	-
4	(Clérat et al., 2025)		