

# 游离高表达 *Mal62* 基因对面包酵母耐冷冻性的影响

孙溪,张翠英,董建,吴鸣月,王光路,肖冬光

(天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

**摘要:** 通过测定胞内海藻糖积累量、冷冻前后相对发酵力以及存活率的变化,对比游离高表达麦芽糖酶基因(*Mal62*)的突变株 BYCPM 与亲本 BY14 的海藻糖合成能力,研究 *Mal62* 基因游离高表达与酵母耐冷冻性之间的关系。结果表明,*Mal62* 基因游离高表达与酵母耐冷冻性有一定的相关性,突变株耐冷冻性改善,其在烘焙产业中具有潜在商业价值。

**关键词:** 微生物;海藻糖;面包酵母;耐冷冻能力;存活率

中图分类号:Q93-3;TQ920;TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2012)10-0032-03

## Effects of High-expressed *Mal62* Gene on Freezing Tolerance of Baker's Yeast

SUN Xi, ZHANG Cuiying, DONG Jian, WU Mingyue, WANG Guanglu and XIAO Dongguang

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The relations between high-expressed *Mal62* gene and freezing tolerance of baker's yeast were investigated through measuring the accumulating quantity of intracellular trehalose, observing the change of cell fermenting power and cell viability before and after freezing, and comparing trehalose synthesis of parent strain BY14 and mutant strain BYCPM. The results showed that there was certain relativity between high-expressed *mal62* gene and freezing tolerance of baker's yeast (freezing tolerance got improved for mutant strain). Accordingly, the improved freezing tolerance of BYCPM may make it useful in commercial baking industry.

**Key words:** microbee; trehalose; Baker's yeast; freezing tolerance; viability

冷冻面团技术由于效率高、成本低而在近年来烘焙产业中被广泛应用<sup>[1]</sup>。然而由于面包酵母在该技术使用过程中经历了低温、冰晶形成和脱水,导致细胞内保护性糖类的降解,因此冷冻后细胞的生存率及菌株的发酵能力均会大幅降低<sup>[2]</sup>。

海藻糖是自然界中广泛存在的非还原性二糖,逆境条件下面包酵母会大量积累细胞内海藻糖以应对各种胁迫<sup>[3-4]</sup>,MAL 基因编码的分子调节蛋白可以特异性地激活海藻糖合成的第二途径的合成酶系统<sup>[5]</sup>。基于这个前提,本实验测定了游离高表达 *Mal62* 基因的突变株与亲本的海藻糖的合成能力,细胞内海藻糖含量以及冷冻前后细胞的存活率,探究 *Mal62* 基因游离高表达对工业面包酵母耐冷冻能力的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

菌种:实验室保存的酿酒酵母(*Saccharomyces cere-*

*visiae*)工业菌株 BY14;在其基础上游离过表达 *Mal62* 基因的 BYCPM 突变株。

酵母完全培养基(YEPD):10 g/L 酵母粉,20 g/L 葡萄糖,20 g/L 蛋白胨,pH6.0,121 °C 灭菌 15 min。固体 YEPD 培养基需要再添加琼脂 20 g/L。

糖蜜培养基:将 30~35 Brix 的糖蜜稀释至 10~12 Brix,然后添加 0.5 g/L 硫酸铵,5 g/L 酵母粉,pH5.0,121 °C 灭菌 15 min。

液体模拟面团培养基(LSMLD):尿素 5 g/L,磷酸氢二钠 5 g/L,麦芽糖 33.25 g/L、葡萄糖 5 g/L,硫酸铵 2.5 g/L,硫酸镁 0.6 g/L,磷酸二氢钾 16 g/L,维生素 B1 2.5 mg/L,烟酸 22.5 mg/L,维生素 B2 1.0 mg/L,维生素 B6 1.25 mg/L,泛酸 5.0 mg/L,叶酸 0.5 mg/L。

#### 1.2 实验方法

##### 1.2.1 鲜酵母制备

挑取一环酵母菌接种于 5 mL YEPD 液体培养基中,30 °C 下静置培养 36 h,间歇摇动,以 10% 接种量接入

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31000043),天津市科委自然科学基金重点项目(10JCZDJC16700)。

收稿日期:2012-07-10

作者简介:孙溪(1981-),女,天津人,博士,主要从事面包酵母工业应用方面的研究,E-mail: sunxiaoxisunxiao@163.com。

通讯作者:肖冬光,E-mail:xdg@tust.edu.cn。

优先数字出版时间:2012-08-23;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120823.0947.005.html>。

糖蜜培养基, 30 °C、150 r/min 培养至稳定期, 静置 2 h。3000 r/min 离心 10 min, 离心洗涤 2 次后收集菌体备用。

### 1.2.2 糖蜜处理

糖蜜(废糖蜜)是糖厂制糖副产物, 由于其中含有影响酵母生长的杂质, 所以糖蜜在使用前必须进行预处理: ① pH 值调为 4.5 左右(硫酸调节); ② 加热至煮沸, 然后持续沸腾 0.5~1 h, 适当通风(去掉有害气体); ③ pH 值调为 5.0 左右(石灰乳调节), 沉淀杂质; ④ 静置 24 h 以上, 取上清液使用。

### 1.2.3 耐冷冻实验

取稳定期菌液 1 mL, 无菌水洗涤 3 次后, 收集菌体放入 -20 °C 冰箱冷冻保存 14~21 d, 30 °C 解冻相应时间, 测定冷冻前后活菌数, 通过计算存活率得到菌株的耐冷冻能力。

### 1.2.4 酵母胞内海藻糖含量测定

采用硫酸-蒽酮法<sup>[6]</sup>。

### 1.2.5 冷冻前后细胞存活率

将新鲜酵母接入装液量 100 mL LSMLD 的 250 mL 三角瓶, 吸取 1 mL 菌液生理盐水洗涤后稀释至  $10^{-4}$ , 涂布计数; 同时于 -20 °C 冷冻剩余的 LSMLD 菌液, 一定时间后取出, 解冻至 30 °C, 同样吸取 1 mL 菌液生理盐水洗涤后稀释至  $10^{-4}$ , 涂布计数。按式(1)计算细胞冷冻存活率。

$$X_2 = \frac{B_1}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $X_2$ ——细胞冷冻存活率(%);

B——未冷冻样品菌落数(个);

$B_1$ ——冷冻样品菌落数(个)。

### 1.2.6 冷冻前后相对发酵力

取真空过滤后的酵母泥 1.500 g, 加入装有 100 mL LSMLD 的 250 mL 三角瓶摇匀, 30 °C 静置培养, 记录 5 h 内失重( $W_1/g$ ), 按(2)式计算  $CO_2$  体积( $V_1/mL$ ); 同时将同批的 100 mL LSMLD 培养液转于 -20 °C 冷冻 21 d, 融化至 30 °C 后以同样的方法记录 5 h 内  $CO_2$  失重( $W_2/g$ ), 计算二氧化碳体积( $V_2/mL$ ); 最终按式(3)计算冷冻前后相对发酵力。

$$V = \frac{W}{40} \times 22.4 \times 1000 \quad (2)$$

式中:  $V$ ——LSMLD 中 5 h 内二氧化碳释放体积, mL;

$W$ ——LSMLD 中 5 h 内二氧化碳释放量, g;

40—— $CO_2$  摩尔质量, g/mol;

22.4—— $CO_2$  摩尔体积, L/mol。

$$X_3 = \frac{V_2}{V_1} \times 100\% \quad (3)$$

式中:  $X_3$ ——LSMLD 冷冻前后相对发酵力, %;

$V_1$ ——未冷冻样品 5 h 内  $CO_2$  释放量, mL;

$V_2$ ——冷冻样品 5 h 内  $CO_2$  释放量, mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐冷冻突变株的海藻糖积累

图 1 为各菌株在糖蜜培养基中细胞内的海藻糖的含量。由图 1 可知, 亲本 BY14 在接种后的短时间内, 胞内海藻糖含量立即出现减少的现象, 而过表达 *Mal62* 基因的 BYCPM 菌株则趋于缓和。亲本 BY14 与 BYCPM 均在生长 10 h 时进入稳定期, 生长曲线相差不大(data not shown), 按照之前的理论, 海藻糖的大量合成应该始于进入稳定期一段时间以后; 不过图 1 中突变株 BYCPM 却可以在刚进入稳定期的时候便开始积累海藻糖, 即 *Mal62* 基因的高表达正面影响了菌株胞内海藻糖的积累。

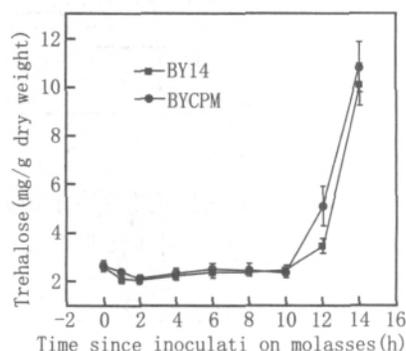


图 1 各菌株在糖蜜培养基中细胞内的海藻糖含量

### 2.2 冷冻前海藻糖含量与冷冻后细胞存活率的关系

为了观察 2 株菌冷冻前胞内海藻糖含量与冷冻后细胞存活率的关系, 本课题组将菌株培养在糖蜜培养基中, 然后收集菌体, 洗涤后分装至多个小 EP 管。在 -20 °C 条件下冷冻 14 d。融化后的菌体稀释涂布于 YEPD 平皿, 30 °C 培养 48 h 后统计存活率, 结果见图 2。

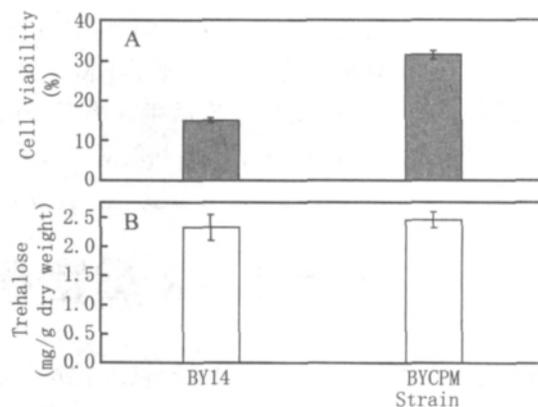


图 2 各菌株细胞存活率与海藻糖含量的关系

图 2A 所示, 亲本 BY14 对冷冻胁迫非常敏感, 经历冻融后细胞的存活率小于 20%; 相比之下, 游离过表达

*Mal62* 基因的 BYCPM 突变株细胞存活率则高于 30%。对比图 2A 与图 2B, 发现细胞存活率与冷冻前胞内海藻糖的含量存在着明显的对应关系。这证明 *Mal62* 基因的高表达不仅可以提升海藻糖的含量, 还可以提高菌株对冷冻胁迫环境的耐受性。

### 2.3 冷冻前后菌株相对发酵力的变化

表 1 为各菌株冷冻后相对发酵力的变化。由表 1 可知, 游离过表达 *Mal62* 基因的 BYCPM 突变株, 冷冻后剩余的相对发酵力可以达到原水平的 64% 以上, 然而亲本在冷冻后, 发酵力却有 38% 的丢失, 仅剩余 62.4%。这说明 *Mal62* 基因的高表达不仅可以提升海藻糖的含量、提高菌株对冷冻胁迫环境的耐受性, 更可以提高更具有实际应用意义的冷冻后菌株的发酵力。

表 1 各菌株冷冻后相对发酵力的变化

菌株编号	未冷冻	冷冻 21 d 后	发酵力剩余 (%)
BY14	1.470869	0.918561	62.4
BYCPM	1.475263	0.945032	64.1

### 2.4 预发酵对菌株耐冷冻性的影响

本实验模拟了冷冻面团法使用过程中出现的预发酵过程, 观察了不同的预发酵时间对于酵母菌体生存率的影响, 结果见图 3。

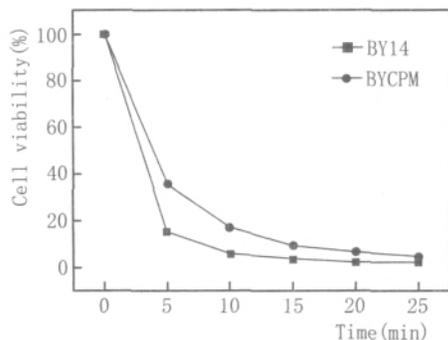


图 3 预发酵对冷冻后菌株生存率的影响

由图 3 可观察到, 无论预发酵的时间长(25 min)或短(<5 min), 两个菌株的生存率均出现了下降的情况。值得注意的是, BYCPM 突变株冷冻后生存率下降的趋势减缓, 这一点与前述结果体现了两者间的对应关系。

## 3 结论

除 Cabib 等人发现的酵母海藻糖合成的经典途径以外, Panek 认为, 酵母内还存在有另外一条海藻糖合成途径, 该途径的特异性与麦芽糖的利用密切相关<sup>[7]</sup>。本实验结果证实, 游离过表达麦芽糖酶(*Mal62*)基因, 不仅可以提升菌株的海藻糖合成能力, 还可以在此基础上提高细胞内海藻糖的含量、冷冻后的剩余比发酵力、预发酵不同时间后再进行长时间冷冻之后的存活率。因此, 携有游离过表达麦芽糖酶基因的 BYCPM 突变株是一株具有较强抗冷冻能力的面包酵母菌株。

### 参考文献:

- [1] Hsu K, Hosene R, Seib P. Frozen dough. I. Factors affecting stability of yeasted doughs[J]. *Cereal Chem*, 1979, 56(5): 419-424.
- [2] Sasano Y, Haitani Y, Hashida K, et al. Overexpression of the transcription activator Msn2 enhances the fermentation ability of industrial Baker's Yeast in Frozen Dough[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2012, 76(3): 624-627.
- [3] Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1990, 58(3): 209-217.
- [4] Lejeune A, Delvigne F, Thonart P. Trehalose as a stress marker of the physiological impact of mixing on yeast production: scale-down reactors and mini-bioreactors investigations[J]. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, 2010, 14: 531-536.
- [5] Petit T, Francois J. Accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* growing on maltose is dependent on the TPS1 gene encoding the UDPglucose-linked trehalose synthase[J]. *FEBS Letters*, 1994, 355(3): 309-313.
- [6] Jules M, Guillou V, Francois J, et al. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2771-2778.
- [7] Panek A. Trehalose metabolism and its role in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 1985, 3: 121-130.

## 2012年1~8月贵州白酒出口值猛增65.4%

本刊讯 2012年以来贵州白酒出口值为1.26亿美元, 同比增长65.4%, 其中茅台集团白酒出口量所占比例最大, 总出口值创历史新高。数据显示, 截至8月底, 贵州省共检验检疫白酒类产品出口52个批次, 89.73万升, 价值1.26亿美元, 同比分别增长52.9%、3.2%和65.4%, 其中出口至香港地区最多, 占总出口货值近三成。

据介绍, 随着市场对酱香型白酒需求量增加, 贵州白酒品牌效应凸显, 白酒产品出口价值创新高。数据显示, 今年以来贵州白酒出口价值平均每升达146美元, 超过去年同期每升92.5美元的平均出口值。(小小荐)