

敲除 *REG1* 同时过表达 *SNF1* 基因对工业面包酵母不加糖面团发酵的影响

林雪, 张翠英, 柏晓雯, 徐佳, 刘小二, 肖冬光

(工业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: 研究了蛋白磷酸酶 PP1 调节亚基编码基因 *REG1* 缺失同时蛋白激酶基因 *SNF1* 过表达对工业面包酵母麦芽糖代谢和不加糖面团发酵的影响。比较分析 *REG1* 缺失同时 *SNF1* 过表达转化子 BYKPS-R 和亲本菌株 BY14 α 、*REG1* 缺失突变株 BYK-R 的 *MAL* 基因 mRNA 水平、麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力、麦芽糖代谢水平、不加糖面团发酵力, 以及基本生长性能; 结果表明, 敲除 *REG1* 同时过表达 *SNF1* 能够显著提高麦芽糖代谢相关基因转录和酶活力, 有效减弱葡萄糖阻遏, 从而使面包酵母的麦芽糖消耗速率(葡萄糖被完全消耗完之前)较 BY14 α 和 BYK-R 分别提高了 18.59% 和 4.40%, 不加糖面团发酵力分别提高了 12.51% 和 3.22%。在 *REG1* 基因缺失的基础上, 过表达 *SNF1* 可以进一步提高面包酵母的麦芽糖代谢和不加糖面团发酵水平, 同时不影响面包酵母菌株生长性能, 因此转化子 BYKPS-R 具备潜在的工业应用价值, 同时该研究为快速发酵面包酵母菌株的选育奠定基础。

关键词: 面包酵母; *SNF1*; *REG1*; 不加糖面团; 发酵; 麦芽糖代谢

文章编号: 1673-9078(2016)8-83-89

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.013

Effect of *REG1* Deletion with *SNF1* Overexpression on the Fermentation of Industrial Baker's Yeast in Lean Dough

LIN Xue, ZHANG Cui-ying, BAI Xiao-wen, XU Jia, LIU Xiao-er, XIAO Dong-guang

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

Abstract: The effects of *REG1* (regulatory subunits of protein phosphatase type 1 PP1) deletion with protein kinase gene *SNF1* overexpression on the maltose metabolism and lean dough fermentation by industrial baker's yeast were investigated by analysis of the *MAL* mRNA expression, maltase and maltose permease activities, maltose metabolism and leavening ability in lean dough. The basic growth characteristics of *REG1* deletion with *SNF1* overexpression strain BYKPS-R, the parental strain BY14 α , and the *REG1* deletion strain BYK-R were also studied. *REG1* deletion with *SNF1* overexpression had significant effects on increasing *MAL* gene expression and enzyme activity, and relieving glucose repression, thereby enhancing the maltose utilization efficiency (increase of 18.59% and 4.40% compared with the strains BY14 α and BYK-R, respectively, at the point of glucose exhaustion), and lean dough leavening ability (12.51% and 3.22% increases compared with the strains BY14 α and BYK-R, respectively). On the background of *REG1* deletion, overexpression of *SNF1* further improved maltose metabolism and leavening ability of industrial baker's yeast in lean dough. Moreover, overexpression of *SNF1* did not affect growth in *REG1* deleted yeast. This strain has potential for application. This study lays a foundation for the breeding of fast-fermenting baker's yeast.

Key words: baker's yeast; *SNF1*; *REG1*; lean dough; fermentation; maltose metabolism

面包酵母是发酵面食制作过程中重要的微生物发酵剂和疏松剂, 其发酵性能的好坏直接影响着面食产品的质量。馒头、花卷等不加糖的面食是中国最典型

收稿日期: 2015-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571809; 31171730); 天津科技大学2015年优秀博士学位论文创新基金资助(201503)

作者简介: 林雪(1989-), 女, 在读博士, 研究方向: 现代酿造技术

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

肖冬光(1956-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 现代酿造技术

的发酵面团蒸食, 是我国北方小麦生产地区人们的主要食物, 大约有 70% 的小麦面粉是用来制作馒头、花卷等。随着人们生活水平的提高, 面包也会普遍以咸面包为主, 制作过程中面团不加糖或低糖。麦芽糖是不加糖面团中含量最为丰富的可发酵糖^[1], 因此酵母的麦芽糖代谢能力成为影响不加糖面团发酵力的关键因素, 也是衡量面包酵母产品质量最根本的性能指标之一。但是, 不加糖面团中还含有少量的葡萄糖、果糖等, 葡萄糖的存在对面包酵母的麦芽糖代谢存在阻

遏作用,即“葡萄糖效应”,导致在不加糖面团中出现产气速度下降、发酵周期延长的现象^[2]。因此,解除或者减弱葡萄糖阻遏作用是提高面包酵母麦芽糖代谢水平和不加糖面团发酵力的一条有效途径。

SNF1 基因编码的 Snf1 蛋白激酶是碳代谢的中心调节因子,可用于解除葡萄糖对次级碳源的阻遏作用,如麦芽糖、半乳糖、蔗糖等^[3]。Snf1 蛋白激酶通过抑制阻遏因子 Mig1 与次级碳源代谢相关基因启动子的结合,起始受葡萄糖阻遏基因的转录。在高含量葡萄糖环境中,上游蛋白磷酸酶 PP1 通过对 Snf1 脱磷酸来抑制 Snf1 的活性,使下游阻遏因子发挥作用,从而抑制 *MAL* 等基因的转录^[4]。我们之前的研究表明,PP1 编码基因 (*GLC7-REG1*) 的破坏能够有效缓解葡萄糖阻遏,提高面包酵母的麦芽糖代谢和不加糖面团发酵力^[5]。同时也有研究表明,细胞核内 Snf1 的磷酸化是缓解葡萄糖阻遏的关键调节环节^[6]。因此,本研究利用质粒 Yep352 和磷酸甘油酸激酶基因 *PGK1* 的启动子,在敲除蛋白磷酸酶 PP1 调节亚基编码基因 *REG1* 的基础上过表达 *SNF1* 基因,通过分析转化子 mRNA、酶活水平、发酵和生长性能,尝试获得高麦芽糖代谢和不加糖面团发酵力的快速发酵工业面包酵母菌株。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

面包酵母工业菌株 BY14 α (*Saccharomyces cerevisiae*), 面包酵母野生型工业菌株 BY14 的 α 型单倍体)、*REG1* 缺失突变株 Δ *REG1* (*MAT* α , Δ *REG1*; *loxP*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、pUG6 质粒和 Yep352 质粒,以上均由天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏。携有酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶基因 (*PGK1*) 强启动子的 pPGK1 质粒^[7]由 Stellenbosch 大学的 Bauer F 教授惠赠。

1.1.2 培养基

酵母完全培养基(YEPD medium): 葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, pH 6.0;

Luria-Bertani 培养基 (LB medium): 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 10 g/L;

糖蜜培养基 (cane molasses medium): 10~12 Brix 糖蜜, 硫酸铵 0.5 g/L, 酵母粉 5 g/L, pH 5.0;

混合糖液体模拟面团培养基 (glucose-maltose LSMLD medium)^[8]: 葡萄糖 5 g/L, 麦芽糖 33.25 g/L, 硫酸铵 2.5 g/L, 尿素 5 g/L, 磷酸二氢钾 16 g/L, 磷酸氢二钠 5 g/L, 硫酸镁 0.6 g/L, 烟酸 22.5 mg/L, 泛酸

5 mg/L, 维生素 B1 2.5 mg/L, 维生素 B6 1.25 mg/L, 维生素 B2 1 mg/L, 叶酸 0.5 mg/L。

1.1.3 酶与化学试剂

酵母基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Solarbio 公司; 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶和 dNTP 购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 产物回收试剂盒(Cycle Pure Kit)购自 Omega 公司; EASYspin 酵母 RNA 快速提取试剂盒购自博凌科为公司; 对硝基苯基- α -D-吡喃半乳糖苷与对硝基苯酚购自 Sigma 公司; 碳酸钠购自天津市永大化学试剂开发中心; 酵母粉、蛋白胨、葡萄糖等其余试剂购自天津市北方天医化学试剂厂。化学试剂均为分析纯。

1.2 引物设计与合成

本实验所用引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成, 酶切位点以斜体表示。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers used in the current study

引物	引物序列(5'→3')
Kan-F	CGCGGATCCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
Kan-R	CGCGGATCCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
SNF1-F	CCGCTCGAGATGAGCAGTAACAACAACACAAAC
SNF1-R	CCGCTCGAGTCAATTGCTTTGACTGTAAACGG
PGK-F	ACATGCATGCTCTAACTGATCTATCCAAAACCTGA
PGK-R	ACATGCATGCTAACGAACGCAGAAATTTTC
MAL61-F	AGTTTCCTGGCAAATCGG
MAL61-R	GTCCACCGCAATCATAAC
MAL62-F	TACCTCCGTTTGTGGCG
MAL62-R	AGGACCATTGTGAGACCC
ACT1-F	ATTGATAACGGTCTGGT
ACT1-R	AATTGGGTAACGTAAAGTC

1.3 *SNF1* 基因的克隆

利用试剂盒, 提取面包酵母 BY14 α 染色体 DNA 为模板, 用引物 SNF1-F 和 SNF1-R, 用高保真 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 30 次, 72 °C 10 min。PCR 产物按照 PCR 产物回收试剂盒说明书的要求进行纯化回收。

1.4 质粒的构建

以 pUG6 质粒为模板, 使用引物 Kan-F 和 Kan-R 进行 PCR 扩增 *KanMX* 片段, 纯化回收约 1.6 kb 的 *KanMX* 片段后用 *Bam*HI 酶切, 与同样 *Bam*HI 酶切的 Yep352 质粒连接, 获重组质粒 Yep-K。XhoI 酶切 *SNF1* 片段, 将

其插入至PGK1强启动子(PGK1_p)与终止子(PGK1_T)之间的XhoI酶切位点, 获重组质粒pPS; 以重组质粒pPS为模板, 用引物PGK-F和PGK-R进行PCR扩增片段PGK1_p-SNF1-PGK1_T, SphI酶切后与同样SphI酶切的质粒Yep-K连接, 获得重组质粒Yep-KPS。

1.5 面包酵母转化与转化子的验证

酵母转化采用醋酸锂转化法^[9]。转化后的细胞涂布于含有800 μg/mL G418的YEPD培养基, 30 °C培养48 h, PCR验证, 获得分别含有重组质粒Yep-K和Yep-KPS的转化子BYK-R和BYKPS-R。

1.6 鲜酵母的制备

挑取一环酵母菌接种于50 mL的YEPD液体培养基中, 静置培养24 h; 以10%接种量接入糖蜜培养基, 30 °C、180 r/min培养24 h; 离心(5000 r/min, 5 min, 4 °C)洗涤两次后收集菌体, 备用。

1.7 基因表达水平的测定

使用酵母RNA快速提取试剂盒提取酵母的mRNA。然后用两步法SYBR Green I qRT-PCR试剂盒(with ROX; TIANGEN, China), 实时定量PCR(qRT-PCR)方法, 以ACT1为内参基因, 分别用引物MAL61-F/MAL61-R和MAL62-F/MAL62-R分析基因MAL61、MAL62相对表达量。取三个平行样的平均值作为实验结果。

1.8 酶活力的测定

1.2 g鲜酵母于混合糖液体模拟面团培养基中, 30 °C静置培养1 h, 取样1 mL, 用磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液洗涤2次后, 于匀浆管中重悬; 装入1.5 g直径0.5 mm的Sigma玻璃珠, 盖好管盖, 置于Precellys 24匀浆机(5500 r/min, 4 °C, 16 s, 5循环)匀浆, 离心后取上清液即为粗酶液。按照参考文献^[10]的方法分别进行麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力测定。麦芽糖酶活力单位为每分钟每毫克蛋白释放对硝基苯酚的微摩尔数[μmol/(min·mg)]。麦芽糖通透酶活力表示为每分钟每毫克干重菌体吸收麦芽糖的纳摩尔数[nmol/(min·mg)]。取三个平行样的平均值作为实验结果。

1.9 残糖的测定

1.2 g鲜酵母接种于混合糖液体模拟面团培养基中, 30 °C静置培养4 h, 每隔一定时间间隔取样。葡萄糖与麦芽糖含量测定采用高效液相色谱法, 采用

Aminex[®] HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, Calif.) 分离柱, 0.6 mL/min, 5 mmol/L H₂SO₄作为流动相, 65 °C条件下测定^[11]。Time span为葡萄糖与麦芽糖浓度各自消耗一半所用时间的时间差。取三个平行样的平均值作为实验结果。

1.10 不加糖面团发酵力的测定

面团发酵力根据食用酵母生产国标方法测定。280 g面粉(利达标准粉), 150 mL水, 4 g氯化钠, 9 g鲜酵母(含水量75%)。在30 °C±0.2 °C条件下快速均匀搅拌5 min, 放入发酵仪, 记录30 °C下120 min内的CO₂产生量。取三个平行样的平均值作为实验结果。

1.11 转化子的遗传稳定性测定

用传代的方法考察随机挑取的转化子BYK-R和BYKPS-R的遗传稳定性。将BYK-R和BYKPS-R在YEPD液体培养基中进行传代15代, 并取1、5、10和15代进行不加糖面团发酵力测定。

1.12 比生长速率的测定

挑取一环酵母菌接种于5 mL YEPD液体培养基中, 30 °C、180 r/min培养16 h; 将酵母细胞和培养基以一定比例混合于孔板中, 使用全自动生长曲线分析仪(Type 11001-F09, China)测定生长曲线。对数期内, 以菌株的干重ln值为纵坐标, 时间为横坐标绘图, 所得斜率即为平均比生长速率μ (h⁻¹)。实验重复三次取平均值为实验结果。

1.13 生物量的测定

取1.0 g左右的湿菌体称重为M₁ (g), 于85 °C烘干至恒重, 重量为M₂ (g), 干物质含量/%=(M₂/M₁)×100。生物量为每升培养基所获菌体干重。取三个平行样的平均值作为实验结果。

1.14 数据统计分析

每组实验重复3次取平均值, 结果以平均值±标准偏差表示, 并使用Student's *t*-test对转化子与亲本菌株之间差异进行分析, (*p*<0.05) 视作有显著差异。

2 结果和讨论

2.1 转化子的构建和鉴定

2.1.1 目的基因的克隆和鉴定

PCR扩增目的基因后, 反应产物用0.8%的琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明扩增得到的片段大小与SNF1

目的基因理论大小一致 (图1)。

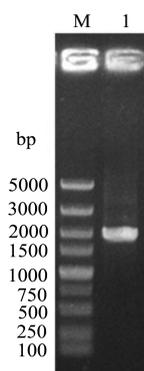


图1 目的基因的验证

Fig.1 Verification of target gene

注: M代表5000 bp DNA Marker; 1代表目的基因*SNF1* (引物为*SNF1-F*和*SNF1-R*)。

2.1.2 表达重组子的构建、筛选与鉴定

按照1.3和1.4的方法, 获得重组质粒Yep-K和Yep-KPS, PCR验证结果图2。

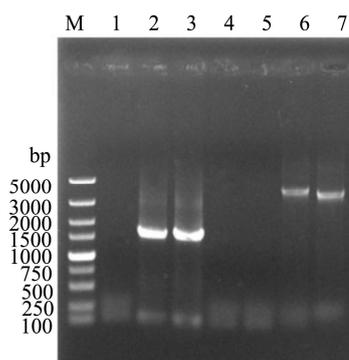


图2 重组质粒的验证

Fig.2 Verification of recombinant plasmid

注: M代表5000 bp DNA Marker; 1~3代表片段*KanMX*验证结果 (模板分别为Yep352、Yep-K和Yep-KPS, 引物为*Kan-F*和*Kan-R*); 4~6代表重组片段“*PGK1_p+SNF1+PGK1_T*”验证结果 (模板分别为Yep352、Yep-K和Yep-KPS, 引物为*PGK-F*和*PGK-R*); 7代表*PGK1*与*SNF1*基因方向验证结果 (模板Yep-KPS, 引物为*PGK-F*和*SNF1-R*)。

由图2可以看出, 以Yep-K和Yep-KPS为模板分别扩增得到1613 bp的*KanMX*片段, 而阴性对照载体Yep352为模板则无法获得该条带 (泳道1~3); 以Yep-KPS为模板扩增得到3673 bp的重组片段“*PGK1_p+SNF1+PGK1_T*”, 而阴性对照Yep-K和Yep352为模板则无法获得该条带 (泳道4~6)。综上结果表明质粒Yep-K和Yep-KPS构建成功, 并且*PGK1*强启动子、终止子的方向与*SNF1*基因方向一致 (3415 bp, 泳道7)。

2.1.3 面包酵母重组菌株的构建

将精提后的质粒Yep-K和Yep-KPS分别导入工业

面包酵母突变株 $\Delta REG1$ 中, 在含有800 $\mu\text{g/mL}$ G418的YEPD培养基上筛选阳性转化子BYK-R与BYKPS-R。酵母质粒提取后分别以引物*Kan-F/Kan-R*和*PGK-F/PGK-R*验证转化子, 电泳结果如图3。

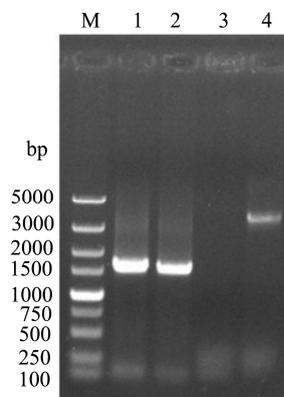


图3 转化子的验证

Fig.3 Verification of transformants

注: M代表5000 bp DNA Marker; 1, 2代表片段*KanMX*验证结果 (模板分别为BYK-R和BYKPS-R酵母质粒, 引物为*Kan-F*和*Kan-R*); 3, 4代表重组片段“*PGK1_p+SNF1+PGK1_T*”验证结果 (模板分别为BYK-R和BYKPS-R酵母质粒, 引物为*PGK-F*和*PGK-R*)。

由图3可以看出, 转化子BYK-R和BYKPS-R分别获得一条1613 bp的*KanMX*条带 (泳道1, 2); 转化子BYK-R无法获得3673 bp的“*PGK1_p+SNF1+PGK1_T*”扩增片段, 而转化子BYKPS-R获得该目的大小条带 (泳道3, 4), 该结果证明转化子BYK-R为含有Yep-K质粒的重组面包酵母菌株, 转化子BYKPS-R确为含有Yep-KPS质粒的重组面包酵母菌株。

2.2 基因表达水平和酶活力测定

2.2.1 *MAL62* 和 *MAL61* 基因的 mRNA 水平

酵母利用麦芽糖需要三类基因产物, 典型的为:*MAL61*编码的麦芽糖通透酶、*MAL62*编码的麦芽糖酶及*MAL63*编码的正调节蛋白。麦芽糖通透酶是转运麦芽糖的关键酶, 负责将麦芽糖运输至胞内; 麦芽糖酶是水解麦芽糖的关键酶, 将胞内麦芽糖水解为葡萄糖, 进入糖酵解途径, 供细胞利用。因此, 通过检测与麦芽糖代谢最直接相关的*MAL62*和*MAL61*基因的转录水平, 探究过表达*SNF1*对面包酵母麦芽糖代谢的影响。

按照1.7的方法, 使用Actin1 (*ACT1*) 基因为内参, 检测*MAL62*和*MAL61*基因的mRNA水平, 结果如图4。

由图4可以看出, 转化子BYKPS-R中*MAL62*和*MAL61*基因的表达量较亲本菌株BY14 α 分别提高了72.00%和41.00%, 表明敲除*REG1*同时过表达*SNF1*对

*MAL62*和*MAL61*基因的转录水平有显著影响^[12]；较BYK-R分别提高了16.22%和17.50%，表明在*REG1*缺失的基础上，过表达*SNF1*能进一步提高*MAL62*和*MAL61*基因的mRNA水平。

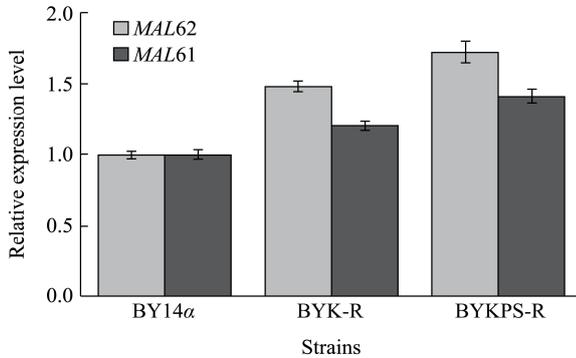


图4 不同菌株*MAL62*和*MAL61*基因的相对表达量

Fig.4 Relative expression levels of *MAL62* and *MAL61* in different strains

注：转化子BYK-R的性能参数与*REG1*突变株Δ*REG1*差异不大（未标注数据），表明空白质粒Yep-K的转化对菌株性能没有影响。文中直接使用BYK-R作为参照菌。

2.2.2 麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力

按照 1.8 的方法分别测定麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力，结果如图 5。

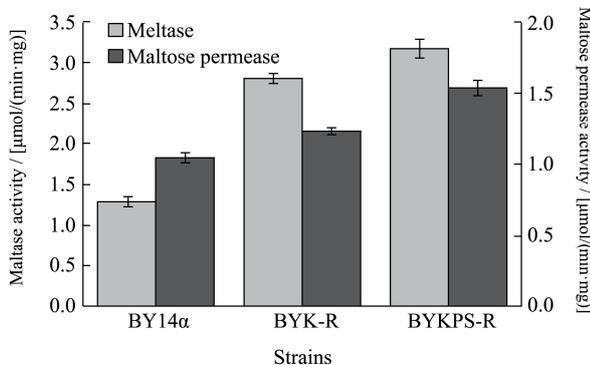


图5 不同菌株的麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力

Fig.5 Maltase and maltose permease activities of different strains

由图5可以看出，转化子BYKPS-R的麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力分别达到3.18 μmol/(min·mg)和1.54 nmol/(min·mg)，较BY14α分别提高了144.62%和48.07%，说明敲除*REG1*同时过表达*SNF1*对面包酵母的麦芽糖酶和麦芽糖通透酶水平有显著影响；较BYK-R分别提高了13.57%和25.20%，表明在*REG1*缺失的基础上，过表达*SNF1*能进一步提高麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力。缺失*REG1*基础上过表达*SNF1*进一步减弱了对*MAL*基因的转录抑制，从而促进麦芽糖利用相关蛋白的合成，这与Sun等人的研究结果一致^[10]。

2.3 发酵性能测定

2.3.1 液体模拟面团培养基中的发酵测定

按1.9的方法，通过HPLC测定混合糖LSMLD培养基中葡萄糖和麦芽糖消耗曲线，结果如图6所示。

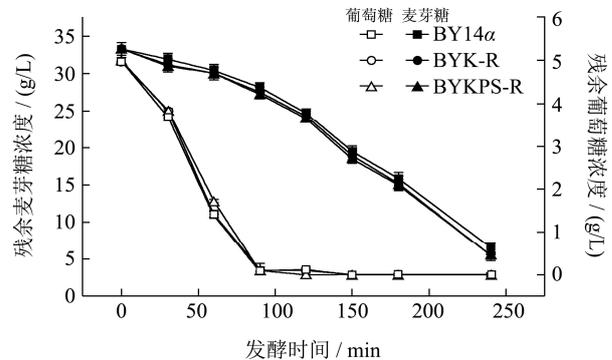


图6 LSMLD培养基中不同菌株的葡萄糖和麦芽糖残糖浓度

Fig.6 Concentrations of residual glucose and maltose in cultures of different strains in LSMLD medium

由图6可以看出，在葡萄糖和麦芽糖为碳源的模拟面团培养基中，三株菌株都能够快速利用葡萄糖，且在90 min左右葡萄糖消耗殆尽。在葡萄糖消耗的同时，不同菌株的麦芽糖消耗水平有所不同。在葡萄糖被完全消耗完之前，亲本菌株BY14α和BYK-R的麦芽糖利用率分别为15.22%和17.29%，过表达*SNF1*转化子BYKPS-R的麦芽糖利用率为18.05%，较BY14α和BYK-R分别提高了18.59%和4.40%。转化子BYKPS-R的Time span值较BY14α和BYK-R分别降低了15.61%和4.42%（表2）。综上结果表明，敲除*REG1*同时过表达*SNF1*能有效提高面包酵母的麦芽糖代谢，且在敲除*REG1*明显减弱葡萄糖阻遏的基础上，过表达*SNF1*进一步减弱了葡萄糖阻遏作用，从而提高面包酵母的麦芽糖代谢水平。

表2 模拟面团和不加糖面团中的性能参数

Table 2 Data from LSMLD medium and lean dough

菌株	Time span/h	发酵力/[mL CO ₂ /(g CDW·h)]
BY14α	2.05±0.14	355.63±4.23
BYK-R	1.81±0.11	387.62±5.12
BYKPS-R	1.73±0.12*	400.11±5.22*

注：从液体模拟面团培养基中计算 Time span 数值；从不加糖面团中计算发酵力。使用 Student's *t*-test 对转化子BYKPS-R与对照菌株之间差异进行分析，(*p*<0.05) 视作有显著差异 (**p*<0.05, n=3)。

2.3.2 不加糖面团中的发酵测定

按 1.10 方法，用发酵仪测定菌株在不加糖面团中的 CO₂ 产气量。结果如图 7。

由图 7 可以看出，在不加糖面团中，三株菌株都能迅速释放 CO₂，且都能达到 1175 mL 的 CO₂ 产气量，但是产气速率有明显差异。转化子 BYKPS-R 的产气能

力最强,在发酵 60 min 时,产气量达到 930 mL,较 BY14 α 和 BYK-R 分别提高了 130 mL 和 30 mL,并且达到最大产气量的时间较 BY14 α 和 BYK-R 分别提高了 20 min 和 10 min。根据单位干重的菌体在单位时间内产生 CO₂ 的体积数确定面团发酵力,结果如表 2。转化子 BYKPS-R 的发酵力达到 400.11 mL CO₂ / (g CDW·h), 比 BY14 α 和 BYK-R 分别提高了 12.51% 和 3.22%。综上结果表明,敲除 *REG1* 同时过表达 *SNF1* 能显著提高面包酵母的不加糖面团发酵性能,且在 *REG1* 缺失的基础上,过表达 *SNF1* 能进一步提高不加糖面团发酵力。此外,按照 1.11 的方法,对 BYKPS-R 的第 1、5、10 和 15 代转化子进行不加糖面团发酵,发酵力没有显著差异(未标注数据),即随机挑取的转化子菌株 BYKPS-R 连续传代 15 代之内没有出现回复突变的情况。由此可得出, *SNF1* 基因过表达的转化子 BYKPS-R 遗传性能稳定。

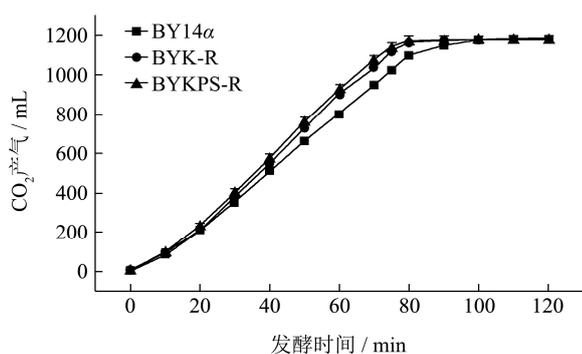


图7 不加糖面团中不同菌株的CO₂产气量

Fig.7 CO₂ production by different strains in lean dough

2.4 生长性能的测定

表3 不同菌株的生长性能参数

Table 3 Growth properties of different strains

菌株	比生长速率/h ⁻¹	生物量/(g CDW/L 糖蜜)
BY14 α	0.24±0.03	7.66±0.23
BYK-R	0.23±0.04	7.53±0.22
BYKPS-R	0.27±0.04*	7.85±0.26

注: 使用 Student's *t*-test 对转化子 BYKPS-R 与对照菌株之间差异进行分析, ($p < 0.05$) 视作有显著差异 (* $p < 0.05$, $n = 3$)。

在工业生产中,稳定的生长性能对菌株来说尤为重要。按照 1.12 和 1.13 的方法,分别测定三株菌株在 YEPD 培养基中的比生长速率和糖蜜培养基中的生物量,结果如表 3。敲除 *REG1* 菌株的比生长速率和生物量较亲本菌株 BY14 α 有所下降,但是差异并不明显 (* $p > 0.05$); 转化子 BYKPS-R 的比生长速率较 BY14 α 和 BYK-R 分别提高了 12.50% 和 17.39%,生物量分别提高了 2.48% 和 4.25%, 综上结果说明过表达 *SNF1* 基因可

以促进面包酵母细胞的生长速率,但对生物量的影响不显著。

3 结论

3.1 在酵母菌中,许多基因的表达都受到葡萄糖的控制和调节,如糖原异生作用(如 *FBP1* 和 *PCK1*) 和次级碳源的吸收利用(如 *MAL* 和 *SUC*) 等的相关基因。葡萄糖进入细胞后,生成 6-磷酸葡萄糖的同时激活 Reg1-Glc7 (蛋白磷酸酶 PP1), 蛋白磷酸酶对 Snf1 蛋白激酶脱磷酸作用,抑制 Snf1 激酶活性,因此蛋白磷酸酶 PP1 的破坏可以有效减弱对 Snf1 蛋白激酶的失活效应。Snf1 蛋白在解除葡萄糖阻遏效应的调节过程中发挥极其重要作用,它通过阻止转录抑制因子 Mig1 与目的基因启动子的结合,促进次级碳源代谢相关基因的表达。Treitel 等研究发现,在 *SNF1* 基因缺失突变中, *MAL* 基因的转录受到抑制^[13]。我们的研究进一步表明 Snf1 在调节次级碳源代谢、提高次级碳源代谢相关基因的转录水平中起重要作用。

3.2 本文比较分析亲本菌株 BY14 α 、转化子 BYK-R 和 BYKPS-R 的 *MAL62* 和 *MAL61* 基因 mRNA 水平,麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力,发酵过程中麦芽糖代谢水平,不加糖面团发酵力,以及基本生长性能,结果表明,转化子 BYKPS-R 的 *MAL* 基因 (*MAL62* 和 *MAL61*) 转录水平和酶活力(麦芽糖酶和麦芽糖通透酶)较亲本菌株 BY14 α 显著调高,说明敲除 *REG1* 同时过表达 *SNF1* 对麦芽糖代谢相关基因表达和酶活力有显著影响。BYKPS-R 的葡萄糖阻遏作用较 BY14 α 有所减弱,这种阻遏作用的缓解提高了面包酵母的麦芽糖利用能力,说明敲除 *REG1* 同时过表达 *SNF1* 对提高次级碳源(麦芽糖)的代谢水平有影响。BYKPS-R 的不加糖面团产气能力较 BY14 α 有显著提高,说明敲除 *REG1* 同时过表达 *SNF1* 对提高面包酵母的不加糖面团发酵力有显著影响,确证缓解葡萄糖阻遏和快速的从葡萄糖代谢转向麦芽糖代谢,可以有效提高面包酵母的不加糖面团发酵能力^[14],同时确证面包酵母的不加糖面团发酵力和麦芽糖酶、麦芽糖通透酶活力密切相关^[15]。与亲本菌株 BY14 α 相比, BYKPS-R 的比生长速率虽然提高,但是生物量提高不明显,说明敲除 *REG1* 同时过表达 *SNF1* 对面包酵母菌株的生长性能影响不显著。相对于转化子 BYK-R, BYKPS-R 的 *MAL* 基因 mRNA 水平、麦芽糖酶和麦芽糖通透酶活力、麦芽糖代谢水平、不加糖面团发酵力均有不同程度提高,生长速率虽有提高,但是生物量提高不明显,说明在 *REG1* 基因敲除的基础上,过表达基因 *SNF1* 可以进一步提高面包酵母的麦芽糖代谢和不加糖面团发酵水平,同时不影响面包酵母

菌株生长性能, 这些特征对面包酵母菌株的生产应用具有重要的经济意义, 同时为快速发酵面包酵母菌株的选育奠定了基础。

参考文献

- [1] Salema-Oom M, de Sousa H R, Assuncao M, et al. Derepression of a baker's yeast strain for maltose utilization is associated with severe deregulation of *HXT* gene expression [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 364-374
- [2] Johnston M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells [J]. Trends in Genetics, 1999, 15(1): 29-33
- [3] Simpson-Lavy K J, Johnston M. Sumoylation regulates the SNF1 protein kinase [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, 110(43): 17432-17437
- [4] Rolland F, Winderickx J, Thevelein J M. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast [J]. FEMS Yeast Res., 2002, 2(2): 183-201
- [5] Lin X, Zhang C Y, Bai X W, et al. Effects of *GLC7* and *REG1* deletion on maltose metabolism and leavening ability of baker's yeast in lean dough [J]. Journal of Biotechnology, 2015, 209: 1-6
- [6] Papamichos-Chronakis M, Gligoris T, Tzamarias D. The snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor [J]. EMBO Rep., 2004, 5(4): 368-372
- [7] Lilly M, Lambrechts M G, Pretorius I S. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 744-753
- [8] 封冰,张翠英,林雪,等.面包酵母高糖发酵力与蔗糖酶活力关系的研究[J].现代食品科技,2014,30(5):131-135
FENG Bing, ZHANG Cui-ying, LIN Xue, et al. The relationship between fermentation activity of *saccharomyces cerevisiae* in high-sugar dough and sucrase activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 131-135
- [9] Gietz R D, Woods R A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method [J]. Methods in Enzymology, 2002, 350: 87-96
- [10] Sun X, Zhang C, Dong J, et al. Enhanced leavening properties of baker's yeast overexpressing *MAL62* with deletion of *MIG1* in lean dough [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2012, 39(10): 1533-1539
- [11] 谭海刚,郭学武,王亚洲,等.NaF对酸性海藻糖酶活测定的影响及作用机制探讨[J].现代食品科技,2014,30(6):64-69
TAN Hai-gang, GUO Xue-wu, WANG Ya-zhou, et al. Effects and mechanisms of sodium fluoride on assay of acid trehalase activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 64-69
- [12] Mayer F V, Heath R, Underwood E, et al. ADP Regulates *SNF1*, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of AMP-activated protein kinase [J]. Cell Metabolism, 2011, 14(5): 707-714
- [13] Treitel M A, Kuchin S, Carlson A. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol. Cell Biol., 1998, 18(11): 6273-6280
- [14] Lin X, Zhang C Y, Bai X W, et al. Enhanced leavening ability of baker's yeast by overexpression of *SNR84* with *PGM2* deletion [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2015, 42(6): 939-948
- [15] Higgins V J, Braidwood M, Bell P, et al. Genetic evidence that high noninduced maltase and maltose permease activities, governed by *MALx3*-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2): 680-685