

NaF 对酸性海藻糖酶活力测定的影响及作用机制探讨

谭海刚^{1,2}, 郭学武¹, 王亚洲¹, 肖冬光¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457) (2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

摘要: 研究了氟化钠对酵母酸性海藻糖酶活力测定的影响。构建己糖转运蛋白基因缺失突变株 TL-105(*hxt14Δ*)和 TL-106(*gal2Δ*), 分析氟化钠对菌株 BY6-9α(亲本菌株)、TL-103(*ath1Δ*)、TL-104(*agt1Δ*)、TL-105(*hxt14Δ*)和 TL-106(*gal2Δ*)酸性海藻糖酶活力、海藻糖酶分泌、海藻糖分泌、葡萄糖摄取和葡萄糖分泌的影响, 结果表明, 氟化钠对中性海藻糖酶、酸性海藻糖酶和海藻糖分泌均无影响, 说明氟化钠对酸性海藻糖酶活力测定的影响与海藻糖酶和海藻糖分泌无关。在稳定期, 柠檬酸法测得菌株 TL-105(*hxt14Δ*)和 TL-106(*gal2Δ*)的酸性海藻糖酶活力分别比亲本菌株提高了 17.06% 和 300.23%, 而柠檬酸氟化钠法测得菌株 BY6-9α、TL-105(*hxt14Δ*)和 TL-106(*gal2Δ*)的酸性海藻糖酶活力却相差不大, 同时, 在对数期, 菌株 BY6-9α 和 TL-103(*ath1Δ*)在酸性海藻糖酶活力测定前(氟化钠 30 °C 诱导 30 min) 溶液中葡萄糖含量分别达到 108.53±1.39 和 30.53±1.02 mg/L, 这说明氟化钠能显著影响菌株对胞外葡萄糖的摄取并导致胞内葡萄糖的分泌, 从而使测得的酸性海藻糖酶活力较高。

关键词: 酵母; 氟化物; 酸性海藻糖酶基因; 发酵; 酶

文章编号: 1673-9078(2014)6-64-69

Effects and Mechanisms of Sodium Fluoride on Assay of Acid Trehalase Activity

TAN Hai-gang^{1,2}, GUO Xue-wu¹, WANG Ya-zhou¹, XIAO Dong-guang¹

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

(2. College of Food Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The effect of sodium fluoride on the determination of acid trehalase activity in baker's yeast was investigated in this study. The recombinant baker's yeast strains TL-105(*hxt14Δ*) and TL-106(*gal2Δ*) with deleted genes encoding the hexose transporters were constructed. The acid trehalase activity, the secretion of neutral trehalase and acid trehalase, the secretion of glucose and trehalose and the uptake of extracellular glucose of BY6-9α (parental strain), TL-103(*ath1Δ*), TL-104(*agt1Δ*), TL-105(*hxt14Δ*) and TL-106(*gal2Δ*) were measured. It was found that sodium fluoride had less effect on the secretion of neutral trehalase, acid trehalase and trehalose, although it had obvious effect on the assay of acid trehalase activity. Thus, sodium fluoride was not related to the secretion of intracellular trehalase or trehalose in the assay of acid trehalase activity. The acid trehalase activity, examined by citrate procedure, of strains TL-105(*hxt14Δ*) and TL-106(*gal2Δ*) at the stationary phase was 17.06% and 300.23% higher than those of the parental strain, respectively. However, the acid trehalase activities of the three strains examined by citrate and sodium fluoride method showed less difference. Furthermore, the extracellular glucose concentration of strains BY6-9α and TL-103(*ath1Δ*) at the exponential phase, which was incubated at 30 °C for 30 min with sodium fluoride before the acid trehalase activity was assayed, was 108.53±1.39 and 30.53±1.02 mg/L in the reaction mixture, respectively. These results indicated that sodium fluoride significantly affected the uptake of extracellular glucose and led to the secretion of intracellular glucose. Hence, the acid trehalase activity of the strains treated with sodium fluoride was higher than those without sodium fluoride treatment.

Key words: yeast; fluoride; acid trehalase genes; fermentation; enzymes

海藻糖是两个葡萄糖以 α(1,1)键连接的非还原性

收稿日期: 201401-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171730); 国家高技术发展计划(863计划)(2013AA102106); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT1166)

作者简介: 谭海刚(1979-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 现代酿造技术

通讯作者: 肖冬光(1956-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 现代酿造技术

二糖, 在冷冻、高盐、高温等环境应力条件下, 其含量可达菌体干重的 25% 以上^[1-2]。研究表明, 海藻糖在面包酵母中有两个作用: 一是作为应激代谢产物使面包酵母免遭不良环境的伤害^[3-6]。二是作为贮藏型碳源, 该作用与面包酵母在冷冻面团预发酵过程中胞内海藻糖迅速降解相对应^[7], 同时, 该作用也体现在稳定期细胞在新鲜葡萄糖培养基中胞内海藻糖的迅速降

解、子囊孢子成熟和萌发阶段以及酵母的连续或分批培养过程^[1,8]。

面包酵母中存在两类海藻糖酶,即中性海藻糖酶(由 *NTH1* 和 *NTH2* 基因编码)和酸性海藻糖酶(由 *ATH1* 基因编码)^[8-9]。*Nth1p* 的功能是将胞内海藻糖水解释为两个葡萄糖,而 *Nth2p* 的功能还不清楚^[2]。*Ath1p* 在酵母中的存在部位及其功能一直饱受争议,通过基因融合绿色荧光蛋白进行亚细胞定位发现 *Ath1p* 存在于液泡中并在液泡中发挥其功能^[10],但也有证据指出其同时存在于壁膜间隙和液泡中^[11-12]。酸性海藻糖酶的功能一直被认为是参与胞外海藻糖降解,然而,新的研究发现其可能参与压力条件下胞内海藻糖的运输。目前,酸性海藻糖酶活力的测定主要采用柠檬酸氟化钠法^[12],该方法利用氟化钠抑制葡萄糖代谢,通过测定胞外葡萄糖的变化来反应酸性海藻糖酶活力,但氟化钠的加入可能引起葡萄糖、酸性海藻糖酶和中性海藻糖酶的分泌,从而影响测定结果的准确性。本文通过构建编码葡萄糖转运蛋白基因 *HXT14*、*GAL2* 缺失突变株,分析菌株 TL-105(*hxt14Δ*)、TL-106(*gal2Δ*)、TL-103(*ath1Δ*)、TL-104(*agt1Δ*)和亲本菌株(BY6-9α)在对数期或稳定期的酸性海藻糖酶活力、

胞内外葡萄糖含量、胞内外海藻糖含量和中性海藻糖酶活力,研究氟化钠对酸性海藻糖酶活力测定的影响,为改良酸性海藻糖酶测定方法奠定基础,对研究酸性海藻糖酶的功能、面包酵母胞内海藻糖降解以及耐冷冻面包酵母的开发都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

面包酵母BY6-9α、TL-103(*ath1Δ*)、TL-104(*agt1Δ*)、大肠杆菌DH5α、pUG6质粒,天津市工业微生物重点实验室保藏;

1.1.2 培养基

YPD固体培养基^[13];

突变株筛选培养基: YEPD中添加800 μg/mL终浓度的G418。

1.2 引物设计

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。

表1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in the current study

引物	引物序列(5' → 3')
HXT14 up	ATGACTGCTCAGATTCCGTATCAACATAGCTCGGGATACACAGCTGAAGCTTCGTACGC
HXT14 down	CTACTCCGGTTCAAATATTTTATGTGATCTCTTGCTCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
GAL2 up	ATGGCAGTTGAGGAGACAATATGCCTGTTGTTTCACAGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
GAL2 down	TTATTCTAGCATGGCCTTGTACCACGGTTTGTCTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
HXT14-X	AAAGATGAAATCGTTCCACCCT
GAL2-X	AAAGCAACTCCTGGATCGTTTCG
K-X-BAT	TAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGT

1.3 敲除片段的 PCR 扩增

以 pUG6 为模板,分别以 HXT14 up 和 HXT14 down、GAL2 up 和 GAL2 down 为引物进行 PCR 扩增,反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 40 s, 循环 29 次, 72 °C 10 min。产物按照 PCR 产物回收试剂盒(Solarbio)回收。

1.4 面包酵母突变株的获得与验证

面包酵母转化采用醋酸锂法^[14]。化转后的细胞涂布于突变株筛选培养基, 30 °C 培养 48 h, PCR 验证, 获得 *HXT14* 和 *GAL2* 基因缺失突变株 TL-105(*hxt14Δ*)和 TL-106(*gal2Δ*)。

1.5 氟化钠对酸性海藻糖酶活力测定的影响

取 0.1 g BY6-9α 和 TL-103(*ath1Δ*)稳定期湿菌体, 采用柠檬酸氟化钠法^[12]和柠檬酸法测定酸性海藻糖酶活力, 确定氟化钠对酸性海藻糖酶活力测定的影响。

柠檬酸氟化钠法: 菌体经离心洗涤后, 重悬于含 NaF (50 mmol/L) 的 0.84 mL pH 4.75 柠檬酸 (50 mmol/L) 缓冲液中, 30 °C 保温 30 min, 再加入 0.16 mL 580 mmol/L 的海藻糖, 30 °C 反应 30 min, 离心 (12000 r/min, 4 °C, 1 min), 取 100 μL 上清液与

100 μL 80 $^{\circ}\text{C}$ 的热水混合, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 使酶失活。其中, 柠檬酸法不加 NaF, 其他与柠檬酸氟化钠法相同。

葡萄糖含量的测定: 高效液相色谱法。测定条件: 示差折光检测器, Aminex HPX-87H 色谱柱, 检测器温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 65 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 5 mmol/L 硫酸, 流速 0.6 mL/min, 20 μL 进样量。

酶活力单位(U)定义为每分钟催化海藻糖水解产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量。

$$\text{酸性海藻糖酶酶活力}(U/g) = \frac{(B - A) \times 1000 \times C}{W \times T}$$

注: B 为反应后溶液中葡萄糖含量, mg/L; A 为反应前溶液中葡萄糖含量, mg/L; C 为反应液体积, L; W 为菌体干重, g; T 为反应时间, min。

1.6 氟化钠对中性海藻糖酶分泌的影响

取 0.1 g BY6-9 α 稳定期湿菌体, 采用柠檬酸氟化钠法和 HEPES 氟化钠法测定酸性海藻糖酶酶活力, 同时, 测定胞内中性海藻糖酶酶活力, 确定氟化钠对中性海藻糖酶分泌的影响。其中, HEPES 氟化钠法利用 pH 7.1 HEPES 缓冲液替代柠檬酸缓冲液, 其他与柠檬酸氟化钠法相同。

胞内中性海藻糖酶酶活力的测定: HEPES 法 [12]。

中性海藻糖酶酶活力单位(U)定义与酸性海藻糖酶酶相同, 数据处理参照酸性海藻糖酶酶活力计算公式。

1.7 氟化钠对酸性海藻糖酶分泌的影响

取 0.1 g BY6-9 α 稳定期湿菌体, 分别重悬于含或不含 NaF (50 mmol/L) 的 0.84 mL pH 4.75 柠檬酸 (50 mmol/L) 缓冲液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 min, 离心 (5000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min), 取上清液 0.42 mL, 加入 0.08 mL 580 mmol/L 的海藻糖, 其他与柠檬酸氟化钠法相同, 测定酸性海藻糖酶酶活力, 确定氟化钠对酸性海藻糖酶分泌的影响。

1.8 氟化钠对海藻糖分泌的影响

取 0.1 g BY6-9 α 和 TL-104(*agt1* Δ) 稳定期湿菌体, 采用柠檬酸氟化钠法测定酸性海藻糖酶酶活力, 同时测定加入海藻糖反应前溶液中海藻糖含量和胞内海藻糖含量, 确定氟化钠对海藻糖分泌的影响。

海藻糖含量的测定: 高效液相色谱法, 测定条件与葡萄糖相同。

$$\text{胞内海藻糖含量}(mg/g \text{ 干菌}) = \frac{D \times E}{W}$$

注: D 为破壁液海藻糖含量, mg/L; E 为破壁液体积, L; W 为菌体干重, g。

1.9 氟化钠对葡萄糖分泌的影响

取 0.1 g BY6-9 α 和 TL-103(*ath1* Δ) 对数期湿菌体, 采用柠檬酸氟化钠法测定酸性海藻糖酶酶活力、胞内葡萄糖含量、胞内海藻糖含量和加入海藻糖反应前溶液中葡萄糖含量, 同时利用柠檬酸法测定加入海藻糖反应前溶液中葡萄糖含量, 确定氟化钠对葡萄糖分泌的影响。

胞内葡萄糖含量数据处理参照胞内海藻糖含量计算公式。

1.10 氟化钠对葡萄糖摄取的影响

取 0.1 g BY6-9 α 、TL-105(*hxt1* Δ) 和 TL-106(*gal2* Δ) 稳定期湿菌体, 采用柠檬酸法和柠檬酸氟化钠法测定酸性海藻糖酶酶活力, 确定氟化钠对葡萄糖摄取的影响。

1.11 数据处理

实验重复 3 次取平均值, 结果以平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 面包酵母突变株的获得与验证

2.1.1 敲除片段的克隆和鉴定

分别利用 PCR 扩增敲除基因 *HXT14* 和 *GAL2* 的目的片段, 产物用琼脂糖凝胶电泳分析, 结果表明, 扩增得到的片段大小与理论大小一致 (图 1)。

2.1.2 突变株的获得与验证

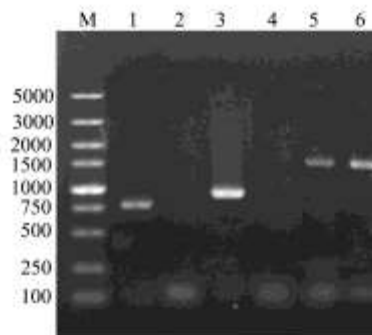


图 1 敲除片段和转化子验证

Fig.1 The verification of deletion fragment and transformants

注: M: 5000 bp DNA Marker; 1: 菌株 TL-105(*hxt1* Δ) 下游验证结果 (引物为 HXT14-X 和 K-X-BAT); 2: 亲本菌株 (BY6-9 α) 下游验证结果 (阴性对照, 引物为 HXT14-X 和

K-X-BAT); 3: 菌株 TL-106(*gal2Δ*)下游验证结果 (引物为 GAL2-X 和 K-X-BAT); 4: 亲本菌株 (BY6-9α) 下游验证结果 (阴性对照, 引物为 GAL2-X 和 K-X-BAT); 5: *HXT14* 基因敲除片段; 6: *GAL2* 基因敲除片段。

由图 1 可以看出, 菌株 TL-105(*hxt14Δ*)下游验证获得一条 873 bp 的条带, 菌株 TL-106(*gal2Δ*)下游验证获得一条 1004 bp 的条带, 均与理论大小一致, 而阴性对照均无此条带, 该结果证明菌株 TL-105(*hxt14Δ*)和 TL-106(*gal2Δ*)确为分别敲除 *HXT14* 和 *GAL2* 基因的重组酵母菌株。

2.2 氟化钠对酸性海藻糖酶活力测定的影响

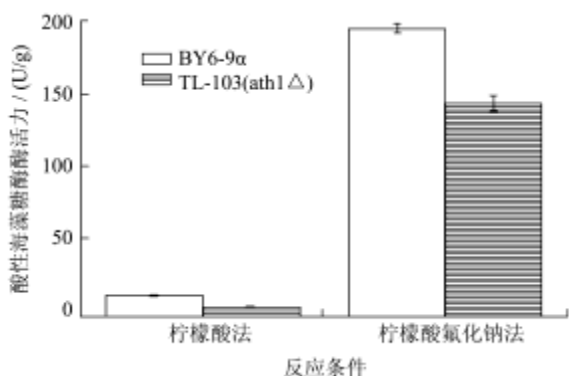


图 2 氟化钠对酸性海藻糖酶活力测定的影响

Fig.2 Effect of sodium fluoride on the assay of acid trehalase activity

由图 2 可以看出, 采用柠檬酸氟化钠法和柠檬酸法测定酸性海藻糖酶活力的结果差异很大, 柠檬酸氟化钠法测得亲本菌株 (BY6-9α) 的酸性海藻糖酶活力高达 195.77 ± 3.26 U/g, 是柠檬酸法测定结果的 22.12 倍, 这说明加入氟化钠可以显著提高胞外葡萄糖的含量, 这也是柠檬酸氟化钠法被广泛应用于酸性海藻糖酶活力测定的原因之一。同时可以看出, 柠檬酸法测得菌株 TL-103(*ath1Δ*)的酸性海藻糖酶活力接近于 0, 而柠檬酸氟化钠法测定的酶活却高达 143.39 ± 5.39 U/g, 这与菌株 TL-103(*ath1Δ*)酸性海藻糖酶基因 (*ATH1*) 已被敲除不相对应, 说明可能还有其他途径引起胞外葡萄糖含量的增加, 为此, 本研究开展了以下实验来确定柠檬酸氟化钠法中葡萄糖的来源及其与酸性海藻糖酶间的关系。

2.3 氟化钠对中性海藻糖酶分泌的影响

由图 3 可以看出, 在稳定期, 亲本菌株 (BY6-9α) 的胞内中性海藻糖酶活力高达 173.31 ± 3.73 U/g, 利用柠檬酸氟化钠法测得的酸性海藻糖酶活力为

195.77 ± 3.26 U/g, 但利用 HEPES 氟化钠法测得的酸性海藻糖酶活力为 0, 这说明氟化钠并没有引起中性海藻糖酶向胞外分泌, 而柠檬酸氟化钠法测得的葡萄糖也与中性海藻糖酶分泌无关。

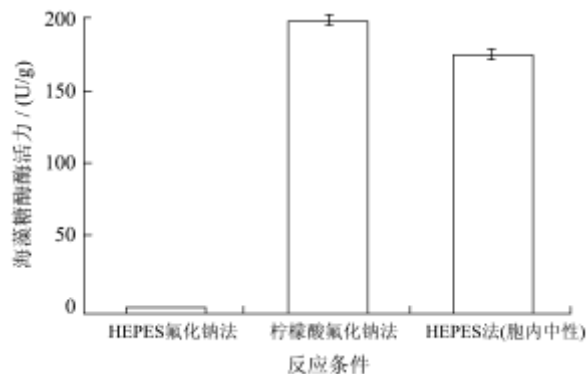


图 3 氟化钠对中性海藻糖酶分泌的影响

Fig.3 Effect of sodium fluoride on the secretion of neutral trehalase

2.4 氟化钠对酸性海藻糖酶分泌的影响

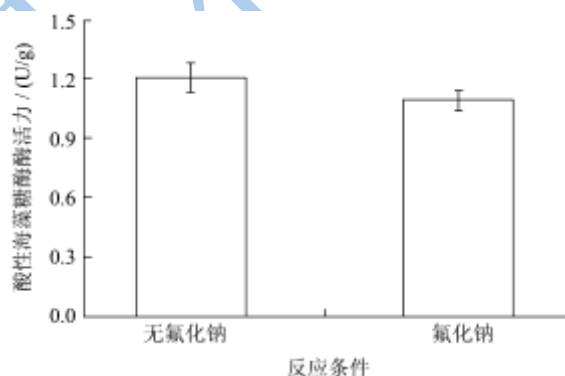


图 4 氟化钠对酸性海藻糖酶分泌的影响

Fig.4 Effect of sodium fluoride on the secretion of acid trehalase

由图 4 可以看出, 无论氟化钠加入与否, 诱导 60 min 上清液中酸性海藻糖酶活力均非常低, 约为柠檬酸氟化钠法测得的酸性海藻糖酶活力的 0.60%, 这说明分泌到溶液中的酸性海藻糖酶非常少, 其在酸性海藻糖酶活力测定中的影响可以忽略, 同时, 氟化钠加入与否对上清液中酸性海藻糖酶活力没有明显影响, 这说明氟化钠对酸性海藻糖酶的分泌无影响。

2.5 氟化钠对海藻糖分泌的影响

由图 5 可以看出, 在稳定期, 亲本菌株 (BY6-9α) 和菌株 TL-104(*agt1Δ*)的胞内海藻糖含量分别为 88.89 ± 1.23 和 87.33 ± 3.37 g/g 干菌体, 而酸性海藻糖酶活力测定前 (氟化钠 30 °C 诱导 30 min) 溶液中海藻糖含量均为 0。同时可以看出, 虽然菌株 TL-104(*agt1Δ*)缺失海藻糖转运蛋白基因 *AGT1*, 但其酸性海藻糖酶活力却高达 283.61 ± 7.03 U/g, 比亲本

菌株 (BY6-9 α) 高了 44.87%。这两方面结果都说明氟化钠并未引起海藻糖的分泌,胞外生成的葡萄糖也与胞内海藻糖无关。

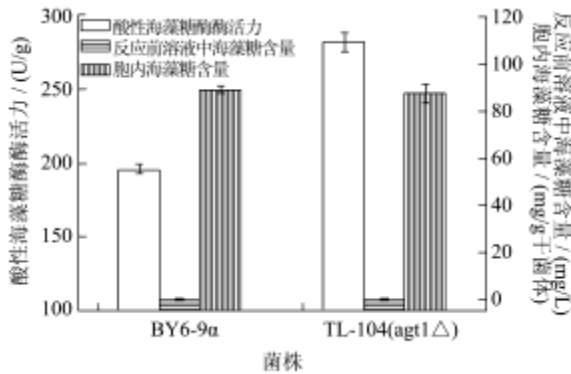


图5 氟化钠对胞内海藻糖分泌的影响

Fig.5 Effect of sodium fluoride on the secretion of intracellular trehalose

2.6 氟化钠对葡萄糖分泌的影响

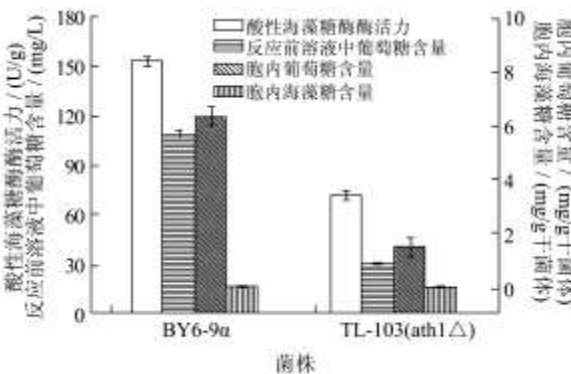


图6 氟化钠对胞内葡萄糖分泌的影响

Fig.6 Effect of sodium fluoride on the secretion of intracellular glucose

由图6可以看出,在对数期,菌株BY6-9 α (亲本菌株)和TL-103(ath1 Δ)的胞内葡萄糖含量分别为6.31 \pm 0.26和1.46 \pm 0.39 mg/g干菌体,胞内海藻糖含量均为0,而亲本菌株(BY6-9 α)和菌株TL-103(ath1 Δ)在酸性海藻糖酶活力测定前(氟化钠30 $^{\circ}$ C诱导30 min)溶液中葡萄糖含量分别为108.53 \pm 1.39和30.53 \pm 1.02 mg/L。同时,两株菌株无氟化钠(柠檬酸法)诱导30 min溶液中葡萄糖含量均为0(结果未列出),这充分说明加入海藻糖反应前溶液中葡萄糖来源于胞内葡萄糖分泌且葡萄糖分泌是由氟化钠引起的。同时可以看出,在对数期,菌株TL-103(ath1 Δ)的酸性海藻糖酶活力为72.27 \pm 3.35 U/g,这与菌株TL-103(ath1 Δ)的酸性海藻糖酶基因(ATH1)已被敲除不相对应,这也说明菌株TL-103(ath1 Δ)的酸性海藻糖酶活力测定中胞外葡萄糖的主要来源为胞内葡萄糖分泌,而葡萄糖来源可能有两个:一个是胞内残存的

葡萄糖,另一个可能是由Agt1p(由AGT1基因编码)介导将胞外海藻糖转运到胞内被Nth1p(中性海藻糖酶)分解产生的^[12]。

2.7 氟化钠对胞外葡萄糖摄取的影响

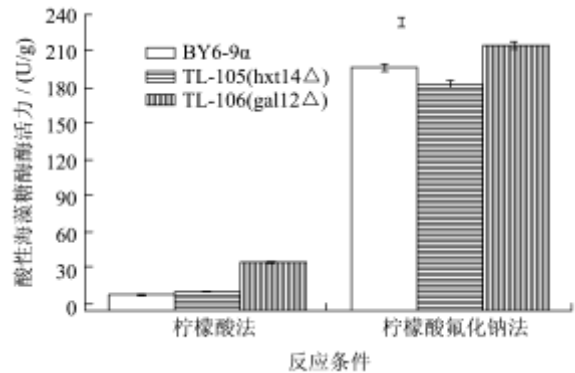


图7 氟化钠对胞外葡萄糖摄取的影响

Fig.7 Effect of sodium fluoride on the uptake of extracellular glucose

由图7可以看出,利用柠檬酸氟化钠法测得菌株BY6-9 α (亲本菌株)、TL-105(hxt14 Δ)和TL-106(gal2 Δ)的酸性海藻糖酶活力都远高于柠檬酸法。利用柠檬酸氟化钠法测得菌株TL-105(hxt14 Δ)的酸性海藻糖酶活力为182.23 \pm 3.91 U/g,比亲本菌株(BY6-9 α)低了6.92%,但利用柠檬酸法测得的酸性海藻糖酶活力却比亲本菌株高了17.06%。同时,利用柠檬酸氟化钠法测得菌株TL-106(gal2 Δ)的酸性海藻糖酶活力为215.30 \pm 2.39 U/g,比亲本菌株(BY6-9 α)高了9.98%,但利用柠檬酸法测得的酸性海藻糖酶活力却比亲本菌株高了300.23%。这说明柠檬酸法测得TL-105(hxt14 Δ)和TL-106(gal2 Δ)的酸性海藻糖酶活力较高与编码葡萄糖转运蛋白基因HXT14和GAL2缺失有关。因此,柠檬酸氟化钠法测得酸性海藻糖酶活力远高于柠檬酸法也与葡萄糖转运和摄取速度减慢有关,这是因为F能与烯醇化酶的辅助因子Mg²⁺形成复合物使烯醇化酶失去活性,从而导致糖酵解途径受阻。

3 结论

本文通过构建编码葡萄糖转运蛋白基因(HXT14和GAL2)缺失突变株TL-105(hxt14 Δ)和TL-106(gal2 Δ),分析氟化钠对指数期或稳定期酵母菌株BY6-9 α (亲本菌株)、TL-103(ath1 Δ)、TL-104(agt1 Δ)、TL-105(hxt14 Δ)和TL-106(gal2 Δ)酸性海藻糖酶活力、中性海藻糖酶分泌、酸性海藻糖酶分泌、海藻糖分泌、葡萄糖分泌和葡萄糖摄取的影响。结果表明,加入氟化钠能显著提高测得的酸性海藻糖酶活力,柠檬酸氟化钠法测得亲本菌株(BY6-9 α)的酸性海藻

糖酶活力 (195.77 ± 3.26 U/g) 是柠檬酸法的 22.12 倍, 同时, 氟化钠对中性海藻糖酶分泌、酸性海藻糖酶分泌和海藻糖分泌均无影响, 说明氟化钠对酸性海藻糖酶活力的提高与中性海藻糖酶、酸性海藻糖酶和海藻糖分泌无关。在稳定期, 柠檬酸氟化钠法测得菌株 BY6-9 α (亲本菌株)、TL-105(*hxt14* Δ) 和 TL-106(*gal2* Δ) 的酸性海藻糖酶活力相差不大, 而柠檬酸法测得菌株 TL-105(*hxt14* Δ) 和 TL-106(*gal2* Δ) 的酸性海藻糖酶活力却分别比亲本菌株 (BY6-9 α) 提高了 17.06% 和 300.23%, 这与编码葡萄糖转运蛋白基因 *HXT14* 和 *GAL2* 缺失明显相关。同时, 在对数期, 亲本菌株 (BY6-9 α) 和 TL-103(*ath1* Δ) 的胞内海藻糖含量均为 0, 胞内葡萄糖含量分别为 6.31 ± 0.26 和 1.46 ± 0.39 mg/g 干菌体, 在此情况下, 酸性海藻糖酶活力测定前 (氟化钠 30 °C 诱导 30 min) 溶液中葡萄糖含量分别达到 108.53 ± 1.39 和 30.53 ± 1.02 mg/L, 这说明氟化钠能显著影响菌株对胞外葡萄糖的摄取并导致胞内葡萄糖的分泌, 从而使测得的酸性海藻糖酶活力较高。

参考文献

- [1] Jules M, Beltran G, François J, et al. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 encodes a functional cytosolic trehalase, and deletion of TPS1 reveals *ath1p*-dependent trehalose mobilization [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74(3): 605-614
- [2] He S, Bystricky K, Leon S, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function [J]. FEBS J., 2009, 276(19): 5432-5446
- [3] Garre E, Matallana E. The three trehalases Nth1p, Nth2p and Ath1p participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiology, 2009, 155(9): 3092-3099
- [4] Mahmud S A, Nagahisa K, Hirasawa T, et al. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 2009, 26(1): 17-30
- [5] Mahmud S A, Hirasawa T, Shimizu H. Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses [J]. J. Biosci. Bioeng., 2010, 109(3): 262-266
- [6] Guo Z P, Zhang L, Ding Z Y, et al. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance [J]. Metab. Eng., 2011, 13(1): 49-59
- [7] Van Dijck P, Gorwa M F, Lemaire K, et al. Characterization of a new set of mutants deficient in fermentation induced loss of stress resistance for use in frozen dough applications [J]. Int. J. Food Microbiol., 2000, 55(1-3): 187-192
- [8] Jules M, François J, Parrou J L. Autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* during batch cultures on trehalose [J]. FEBS J., 2005, 272(6): 1490-1500
- [9] Garre E, Pérez-Torradó R, Gimeno-Alcañiz J V, et al. Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Res., 2009, 9(1): 52-62
- [10] Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast [J]. FEMS Microbiol. Rev., 2000, 24(4): 469-486
- [11] Huang J, Reggiori F, Klionsky D J. The transmembrane domain of acid trehalase mediates ubiquitin-independent multi-vesicular body pathway sorting [J]. Mol. Biol. Cell, 2007, 18(7): 2511-2524
- [12] Jules M, Guillou V, François J, et al. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(5): 2771-2778
- [13] 左勇, 刘利平, 鞠帅, 等. 无花果果酒酵母的筛选及发酵性能研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(6): 1293-1296
- [14] ZUO Yong, LIU Li-ping, JU Shuai, et al. Screening and fermentation of yeast for fig fruit wine production [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(6): 1293-1296
- [14] 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