

中性海藻糖酶基因缺失对面包酵母耐冷冻性的影响

谭海刚^{1,2}, 董健¹, 王光路¹, 许海艳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: 研究了中性海藻糖酶基因 (*NTH1* 和 *NTH2*) 对面包酵母耐冷冻性的影响。通过分析中性海藻糖酶基因缺失突变株和亲本菌株(BY6-9 α)的生长曲线、生物量、比生长速率、中性海藻糖酶活力、胞内海藻糖含量、胞内海藻糖降解速率、冷冻存活率、冷冻前产气量、比发酵力、冷冻后产气量和相对发酵力, 结果表明, 中性海藻糖酶基因对酵母生物量、比生长速率、胞内海藻糖含量和比发酵力均无显著影响, 而相对于亲本菌株(BY6-9 α), TL-101(*nth1* Δ)和 TL-201(*nth1* Δ *nth2* Δ)的胞内海藻糖降解速率分别减慢了 9.22% 和 15.60%, 冷冻后 CO₂ 产生量分别提高了 63.04% 和 65.22%, -20 °C 冷冻 28 d 后冷冻存活率分别提高了 91.06% 和 103.01%, 冷冻后相对发酵力分别提高了 95.95% 和 116.04%, 这充分说明敲除 *NTH1* 基因能明显改善酵母菌株的耐冷冻特性, 而且酵母的耐冷冻特性与胞内海藻糖降解速率呈负相关。TL-102(*nth2* Δ)的耐冷冻特性与亲本菌株无显著差异, 说明单敲 *NTH2* 基因对酵母耐冷冻性无显著影响。

关键词: 酵母; 冷冻; 中性海藻糖酶基因; 发酵; 特性

文章编号: 1673-9078(2014)2-66-71

Effect of Neutral Trehalase Genes Deletion on the Freeze-tolerant Characteristics of Bread Yeast

TAN Hai-gang^{1,2}, DONG Jian¹, WANG Guang-lu¹, XU Hai-yan¹, 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 neutral trehalase genes deletion on the bread yeast was investigated by analysis of the growth curve, biomass, specific growth rate, neutral trehalase activity, intracellular trehalose content, degradation speed of intracellular trehalose, survival ratio, specific fermentation ability, CO₂ production before and after freezing, and the relative fermentation ability after freezing of trehalase genes deletion mutants and the parental strain (BY6-9 α). It was found that the trehalase genes had less significant effects on biomass, specific growth rate, intracellular trehalose content and the specific fermentation ability of bread yeast. The degradation speed of intracellular trehalose of TL-101(*nth1* Δ) and TL-201(*nth1* Δ *nth2* Δ) was 9.22% and 15.60% lower than the parental strain respectively. Meanwhile, the CO₂ production after freezing of TL-101 and TL-201 increased 63.04% and 65.22% compared with the parental strain. Furthermore, the survival ratio of TL-101 and TL-201 after freezing for 28 days at -20 °C was 91.06% and 103.01%, respectively, higher than the parental strain, and the relative fermentation ability after freezing was 95.95% and 116.04% higher than the parental strain, respectively. These results revealed that deletion of *NTH1* gene sufficiently improved the freeze-tolerance characteristics of bread yeast, and there was a negative correlation between the degradation speed of intracellular trehalose and freeze-tolerance characteristics of bread yeast. On the other hand, the freeze-tolerant characteristics of TL-102(*nth2* Δ) were not significant difference as that of the parental strain, which indicated that single *NTH2*-deleted was not significantly influence on the freeze-tolerant characteristics of bread yeast.

Key words: yeast; freezing; neutral trehalase genes; fermentation; characterization

收稿日期: 2013-09-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31171730); 国家高技术研究发展计划(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, 博士研究生, 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

冷冻面团技术是面包生产的一种新工艺, 它将面包生产中的面团制作和烘烤两个环节分离。大型面包生产企业负责将调粉、预发酵的面团冷冻制得冷冻面团, 然后运往超市、连锁店等面包零售机构, 在零售机构, 冷冻面团经过解冻、整形、醒发、烘烤, 即可得到新鲜面包供给消费者。冷冻面团技术的应用, 不仅可以为消费者提供更新鲜、品质更稳定的面包, 同

时可以简化制作过程、降低工作强度^[1~2]。然而,面包酵母在冷冻面团低温(-18℃~23℃)贮藏过程中会受到冷冻伤害,如高渗、脱水和冰晶等,导致酵母细胞存活率明显下降,使解冻后的面团膨胀不足,结构粗,口感差,产品质量明显降低。因此,提高面包酵母的耐冷冻性是冷冻面团技术应用的关键。

研究表明,酵母的耐冷冻性与其胞内海藻糖含量密切相关^[3,4]。然而,在冷冻面团制作中的预发酵会导致胞内海藻糖的迅速降解,从而失去对酵母细胞的保护作用^[5]。一般认为,面包酵母胞内海藻糖的迅速降解与由 *NTH1* 和 *NTH2* 基因编码的中性海藻糖酶(Nth1p 和 Nth2p)有关^[6]。其中, Nth1p 存在于胞液中,最适 pH 值为 6.8~7.0,受磷酸化作用调控,参与解除环境胁迫后胞内海藻糖的迅速分解与利用^[7]。*NTH2* 基因与 *NTH1* 基因有 77% 的同源性,其功能一直不十分清楚。Jules 等发现 Nth2p 也存在于胞液中,具有活性功能,可能参与 *nth1 Δtps1 Δ* 菌株胞内海藻糖的转运^[8]。本文通过分析中性海藻糖酶基因缺失突变株和亲本菌株(BY6-9α)的生长曲线、生物量、比生长速率、胞内海藻糖含量、胞内海藻糖降解速率、冷冻存活率、冷冻前产气量、比发酵力、冷冻后产气量和相对发酵力,探讨中性海藻糖酶基因对工业面包酵母 BY6-9α 耐冷冻特性的影响,为开发耐冷冻面包酵母打下基础,对降低冷冻面团的成本、促进冷冻面团技术的推广具有重要的实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

面包酵母 BY6-9α (亲本菌株)、TL-101(*nth1Δ*)、TL-102(*nth2Δ*)、TL-201(*nth1Δnth2Δ*),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^[9];

葡萄糖液体模拟面团培养基(LSMLD):葡萄糖 40 g/L,尿素 5 g/L,磷酸氢二钠 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。使用前于 100℃ 蒸煮 30 min 灭菌,冷却至 30℃ 备用。

1.2 酵母生长曲线的测定

挑取一环酵母菌接种于 50 mL YPD 液体培养基中,30℃ 摇床培养 16 h,以 10% 接种量接入 100 mL

YPD 液体培养基于 30℃ 180 r/min 培养 22 h。每隔 1 h 取 1 mL 菌液,离心洗涤后稀释 25 倍,然后以蒸馏水为空白,测定 600 nm 下的吸光度值,绘制生长曲线。

1.3 酵母比生长速率的测定

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})。

1.4 鲜酵母制备

挑取一环酵母菌接种于 50 mL 的 YPD 液体培养基中,30℃ 摇床(180 r/min)培养 16 h,以 10% 接种量接入 YPD 液体培养基于 30℃ 180 r/min 培养 48 h,离心(5000 r/min, 5 min, 4℃)洗涤两次后收集菌体,称湿重,备用。

生物量(g)为菌株在 100 mL YPD 液体培养基 30℃ 180 r/min 培养 48 h 的获得的菌体量(干重)。

1.5 菌体干物质含量的测定

取 1.0 g 左右的湿菌体称重为 M_1 (g),于 85℃ 烘干至恒重,重量为 M_2 (g),干物质含量/% = $(M_2/M_1) \times 100$ 。

1.6 中性海藻糖酶酶活力的测定

发酵液离心收集菌体,取 2 g 湿菌体加入 50 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.1)洗涤 2 次后,用 10 mL 缓冲液重新悬浮。取 1 mL 装入匀浆管,再装入 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℃, 16 s, 5 循环)匀浆,离心后取上清液即为粗酶液。

中性海藻糖酶酶活力的测定:反应体系为 50 mmol/L HEPES 缓冲液(2.5 mmol/L CaCl_2 , 50 mmol/L 海藻糖) 500 μL 、粗酶液 100 μL , 30℃ 反应 30 min,取出 100 μL 反应液与 100 μL 80℃ 的热水混合,80℃ 水浴 5 min 使酶失活。葡萄糖含量的测定: SBA-40E 生物传感仪。

酶活力单位(U)定义为每克干酵母每分钟催化海藻糖水解释产生 1 μg 葡萄糖所需的酶量。

1.7 酵母胞内海藻糖含量和海藻糖降解速率的测定

将 1 g 菌体接入 100 mL 葡萄糖液体模拟面团培养基 30℃ 静置培养 0 min 和 60 min,分别取样离心

(5000 r/min, 5 min, 4 °C) 洗涤两次后收集菌体。取 0.1 g 菌体加入 4 mL 0.5 mol/L 冷三氯乙酸提取 1 h, 海藻糖的测定采用硫酸蒽酮法^[10], 记录预发酵 0 min 和 60 min 的胞内海藻糖含量[mg/g(干重)]。

海藻糖降解速率[mg/min·g(干重)]定义为每克干酵母每分钟胞内海藻糖的降解量。

1.8 酵母冷冻存活率的测定

将 1 g 菌体接入 100 mL 葡萄糖液体模拟面团培养基 30 °C 静置培养 60 min, 取 100 μL 发酵液进行梯度稀释, 涂布于 YPD 固体培养基, 30 °C 培养 48 h, 计录活细胞数 (cfu/mL)。另取 100 μL 发酵液于 -20 °C 冰箱中分别冷冻 1 d、7 d、14 d 和 28 d, 30 °C 解冻 10 min, 梯度稀释后涂布培养, 计录活细胞数 (cfu/mL)。酵母冷冻存活率表示为冷冻后与冷冻前酵母活细胞数的百分比。

1.9 酵母冷冻前产气量的测定

将 1 g 鲜酵母接入 100 mL 葡萄糖液体模拟面团培养基中, 30 °C 静置培养 1 h, 称重, 计算 CO₂ 的产生量, 实验重复 3 次取平均值。

1.10 酵母比发酵力的测定

将 1 g 鲜酵母接入 100 mL 葡萄糖液体模拟面团培养基中, 30 °C 静置培养 2 h, 称重, 计算 CO₂ 的产生量。葡萄糖含量的测定: SBA-40E 生物传感仪。

比发酵力[mgCO₂/min·g(干重)·C(mol)]定义为每克干酵母每分钟每摩尔所耗碳源 C 的产气量。

1.11 酵母冷冻后产气量和相对发酵力的测定

预发酵 60 min 的葡萄糖液体模拟面团培养基在 30 °C 继续发酵 60 min, 记录 CO₂ 产生量 (A), 另取一份预发酵 60 min 的葡萄糖液体模拟面团培养基贮藏于 -20 °C 冰箱中冷冻 7 d, 30 °C 解冻 10 min 后, 记录 30 °C 60 min 内的 CO₂ 产生量 (B)。

相对发酵力 (%) 表示为 B/A×100。

2 结果与讨论

2.1 中性海藻糖酶突变株与亲本菌株生长曲线

由图 1 可以看出, 菌株 TL-102(*nth2*Δ)、菌株 TL-101(*nth1*Δ)和亲本菌株(BY6-9α)的生长曲线变化趋势基本相同, 这说明单敲 *NTH2* 基因或 *NTH1* 基因对酵母

生长情况无显著影响。但是, 菌株 TL-201(*nth1*Δ *nth2*Δ)的延滞期 (2 h) 比亲本菌株 (1 h) 长, 到达稳定期的时间比亲本菌株 (15 h) 晚 3 h, 这说明双敲 *NTH2* 基因和 *NTH1* 基因会使酵母的延滞期延长, 生长速度减慢, 到达稳定期的时间明显延长。

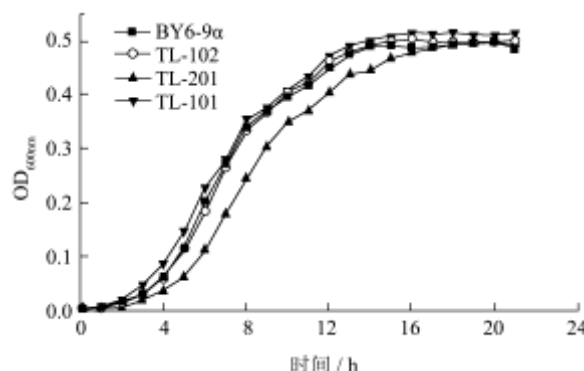


图 1 中性海藻糖酶突变株及其亲本菌株的生长曲线

Fig.1 Growth curve of the parental strain and the neutral trehalase mutants

2.2 中性海藻糖酶对酵母生物量的影响

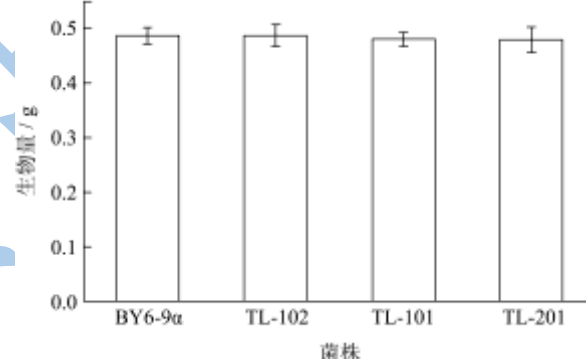


图 2 中性海藻糖酶对四株酵母菌株生物量的影响

Fig.2 Effect of neutral trehalase on the biomass of four yeast strains

由图 2 可以看出, 菌株 TL-102(*nth2*Δ)和亲本菌株(BY6-9α)的生物量基本相同, 这说明单敲 *NTH2* 基因对酵母生物量无影响。同时, 菌株 TL-201(*nth1*Δ *nth2*Δ)和菌株 TL-101(*nth1*Δ)的生物量略低于亲本菌株(BY6-9α), 分别减慢了 1.27% 和 1.52%, 这说明 *NTH1* 基因的敲除对酵母生物量的影响不显著。综上所述, 中性海藻糖酶 (*NTH1* 和 *NTH2*) 的敲除对酵母生物量无显著影响。

2.3 中性海藻糖酶对酵母比生长速率的影响

由图 3 可以看出, 菌株 TL-102(*nth2*Δ)的比生长速率略高于亲本菌株(BY6-9α), 提高了 2.84%, 而菌株 TL-201(*nth1*Δ *nth2*Δ)和菌株 TL-101(*nth1*Δ)的比生长速率略低于亲本菌株(BY6-9α), 分别减慢了 1.42% 和

3.78%，这说明中性海藻糖酶（*NTH1* 和 *NTH2*）的敲除对酵母比生长速率无显著影响。

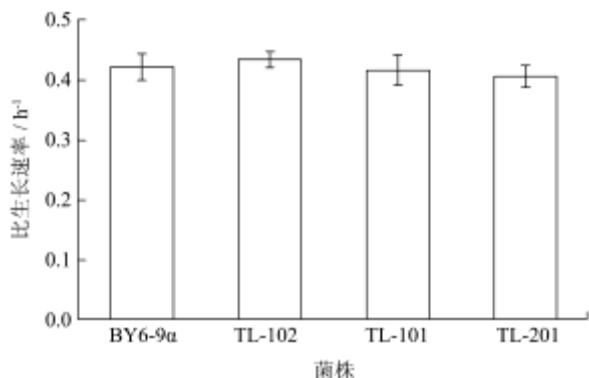


图3 中性海藻糖酶对四株酵母菌株比生长速率的影响

Fig.3 Effect of neutral trehalase on the specific growth rate of four yeast strains

2.4 中性海藻糖酶突变株与亲本菌株的中性海藻糖酶酶活力

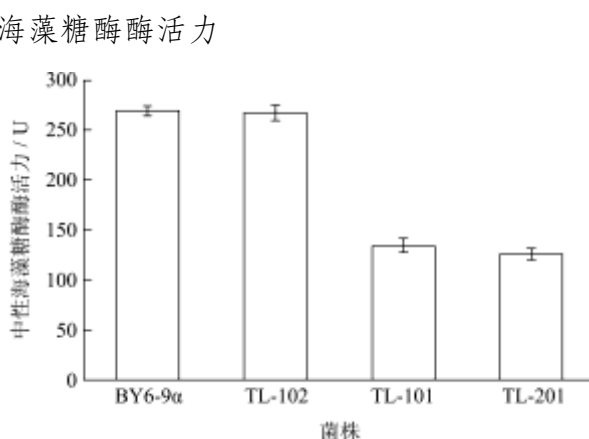


图4 中性海藻糖酶突变株及其亲本菌株的中性海藻糖酶酶活力
Fig.4 The neutral trehalase activity of the parental strain and the neutral trehalase mutants

由图4可以看出，菌株 TL-102(*nth2*Δ)和亲本菌株 (BY6-9α)的中性海藻糖酶酶活力基本相同，这说明单敲 *NTH2* 基因对中性海藻糖酶酶活力无影响，*Nth2p* 未显示有酶活存在。菌株 TL-201(*nth1*Δ*nth2*Δ)和菌株 TL-101(*nth1*Δ)的中性海藻糖酶酶活力远低于亲本菌株(BY6-9α)，分别降低了 53.16%和 49.81%，这说明 *NTH1* 基因的敲除对中性海藻糖酶酶活力的影响显著，*Nth1p* 在海藻糖降解中发挥主要作用。同时可以看出，菌株 TL-201 的中性海藻糖酶基因 (*NTH2* 和 *NTH1*) 都被敲除，但菌株仍能进行海藻糖的降解，这说明酵母中还存在其他海藻糖降解机制^[6]。

2.5 中性海藻糖酶对酵母胞内海藻糖含量的影响

由图5可以看出，菌株 TL-201(*nth1*Δ*nth2*Δ)和菌株 TL-101(*nth1*Δ)的胞内海藻糖含量略高于亲本菌株 (BY6-9α)，分别提高了 3.29%和 4.79%，这说明 *NTH1* 基因的敲除有利于胞内海藻糖的积累，但其影响并不显著。菌株 TL-102(*nth2*Δ)和亲本菌株(BY6-9α)的胞内海藻糖含量基本一致，这说明单敲 *NTH2* 基因对酵母胞内海藻糖含量无影响。综上所述，中性海藻糖酶 (*NTH1* 和 *NTH2*) 对酵母海藻糖的积累无显著影响。

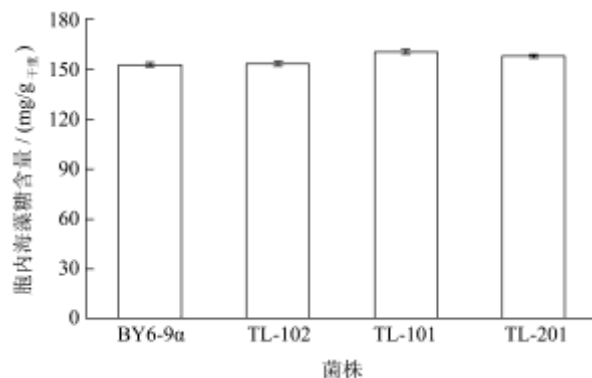


图5 中性海藻糖酶对四株酵母菌株胞内海藻糖含量的影响

Fig.5 Effect of neutral trehalase on the content of intracellular trehalose in four yeast strains

2.6 中性海藻糖酶对酵母预发酵胞内海藻糖降解速率的影响

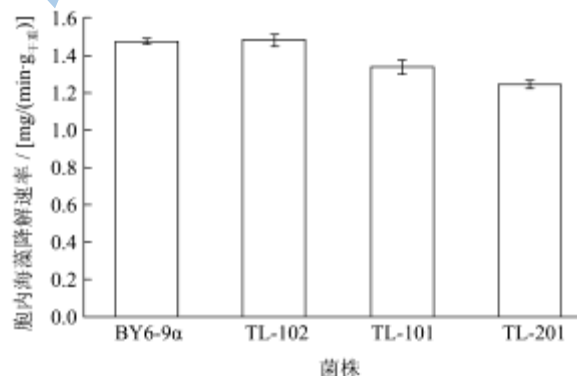


图6 中性海藻糖酶对四株酵母菌株预发酵胞内海藻糖降解速率的影响

Fig.6 Effect of neutral trehalase on the degradation speed of intracellular trehalose during the prefermentation in four yeast strains

由图6可以看出，菌株 TL-201(*nth1*Δ*nth2*Δ)和菌株 TL-101(*nth1*Δ)的胞内海藻糖降解速率明显慢于亲本菌株(BY6-9α)，分别减慢了 9.22%和 15.60%，这说明 *NTH1* 基因的敲除能明显降低海藻糖降解速率。同时可以看出，菌株 TL-102(*nth2*Δ)的胞内海藻糖降解速率与亲本菌株(BY6-9α)基本一致，这说明单敲 *NTH2* 基因对胞内海藻糖的降解无显著影响。

2.7 中性海藻糖酶对酵母冷冻存活率的影响

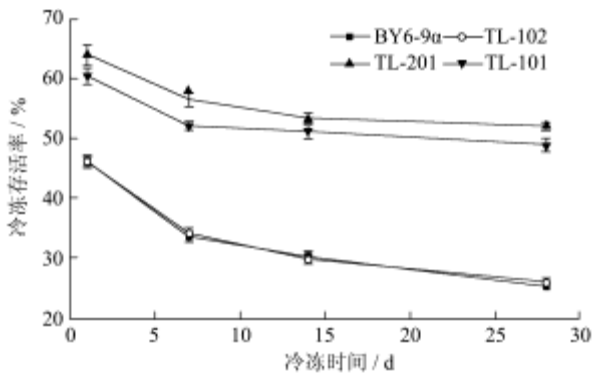


图 7 冷冻时间对四株酵母菌株冷冻存活率的影响

Fig.7 Effect of freezing time on the survival ratio of four yeast strains

由图 7 可以看出, 四株菌株的冷冻存活率均随着冷冻时间而降低, 而且短期内冷冻存活率下降较快, 随着时间的延长, 冷冻存活率下降速度逐渐减慢。其中, 菌株 TL-102(*nth2Δ*)与亲本菌株(BY6-9α)的冷冻存活率下降较快, 两株菌株的冷冻存活率变化曲线也大致相同。菌株 TL-101(*nth1Δ*)和菌株 TL-201(*nth1Δ nth2Δ*)的冷冻存活率明显高于亲本菌株。冷冻 28 d 后, 菌株 TL-101 和菌株 TL-201 的冷冻存活率分别为 $48.95 \pm 1.12\%$ 和 $52.01 \pm 0.69\%$, 分别比亲本菌株(BY6-9α)高了 91.06% 和 103.01%。这些结果表明, 敲除 *NTH1* 基因能明显提高预发酵后酵母的冷冻存活率, 而单敲 *NTH2* 基因没有明显效果。结合图 4 可以看出, 酵母的冷冻存活率与其预发酵过程中胞内海藻糖降解速率密切相关, 呈负相关。

2.8 中性海藻糖酶对酵母冷冻前产气量的影响

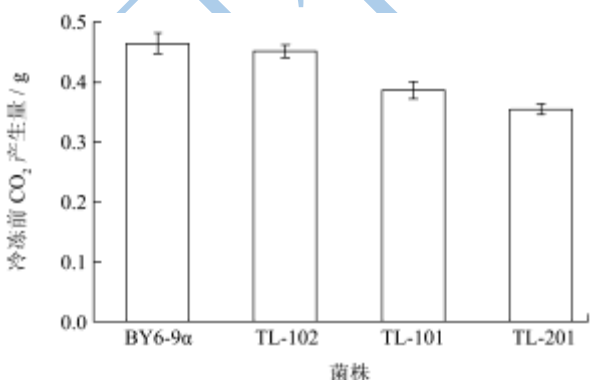


图 8 中性海藻糖酶对四株酵母菌株冷冻前产气量的影响

Fig. 8 Effect of neutral trehalase on the CO₂ production of four yeast strains before freezing

由图 8 可以看出, 菌株 TL-102(*nth2Δ*)与亲本菌株

(BY6-9α)的冷冻前 CO₂ 产生量大致相同, 这说明单敲 *NTH2* 基因对酵母 CO₂ 产生量无明显影响。同时可以看出, 菌株 TL-101(*nth1Δ*)和菌株 TL-201(*nth1Δ nth2Δ*)的冷冻前 CO₂ 产生量明显减少, 分别比亲本菌株减少了 16.77% 和 23.66%, 这说明敲除 *NTH1* 基因对两株菌株的产气能力有显著影响, 冷冻前产气量的降低可能与发酵初期这两株菌株的胞内海藻糖降解速率较慢有关, 因为 Shima 和 Singer 等研究发现海藻糖能抑制酶的活性并阻止部分变性蛋白恢复功能^[11-12]。

2.9 中性海藻糖酶对酵母比发酵力的影响

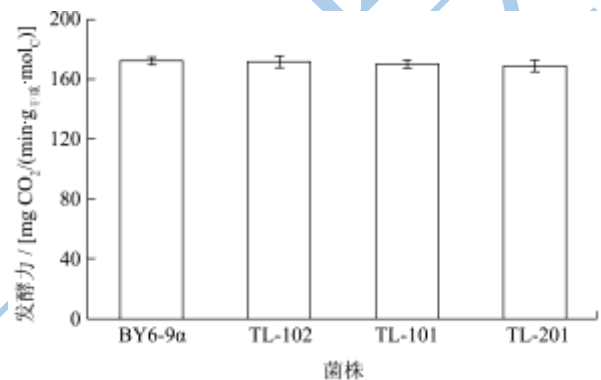


图 9 中性海藻糖酶对四株酵母菌株比发酵力的影响

Fig.9 Effect of neutral trehalase on the specific fermentation ability of four yeast strains

由图 9 可以看出, 菌株 TL-102(*nth2Δ*)、菌株 TL-101(*nth1Δ*)与亲本菌株(BY6-9α)的比发酵力大致相同, 这说明单敲 *NTH2* 基因或 *NTH1* 基因对酵母单位时间内消耗单位碳源产生 CO₂ 的能力无明显影响。菌株 TL-201(*nth1Δ nth2Δ*)的比发酵力略少于亲本菌株(BY6-9α), 减少了 1.93%, 这说明双敲 *NTH2* 基因和 *NTH1* 基因对酵母比发酵力有一定影响, 但其影响不显著。综上所述, 中性海藻糖酶 (*NTH1* 和 *NTH2*) 对酵母比发酵力无显著影响。

2.10 中性海藻糖酶对酵母冷冻后产气量的影响

由图 10 可以看出, 菌株 TL-101(*nth1Δ*)和菌株 TL-201(*nth1Δ nth2Δ*)的冷冻后 CO₂ 产生量明显高于亲本菌株(BY6-9α), 分别提高了 63.04% 和 65.22%, 这说明敲除 *NTH1* 基因能明显提高两株菌株的冷冻后产气能力, 这与两株菌株较高的冷冻存活率密切相关, 呈正相关。菌株 TL-102(*nth2Δ*)与亲本菌株(BY6-9α)的冷冻后 CO₂ 产生量基本相同, 这与两株菌株的冷冻存活率基本一致相对应, 这也说明单敲 *NTH2* 基因对酵母冷冻后 CO₂ 产生量无影响。

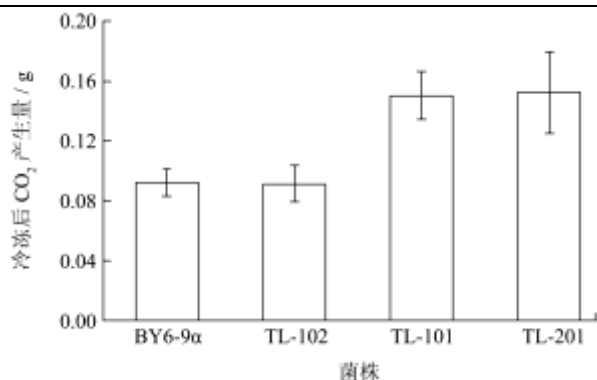


图 10 中性海藻糖酶对四株酵母菌株冷冻后产气量的影响

Fig.10 Effect of neutral trehalase on the CO₂ production of four yeast strains after freezing

2.11 中性海藻糖酶对酵母冷冻后相对发酵力的影响

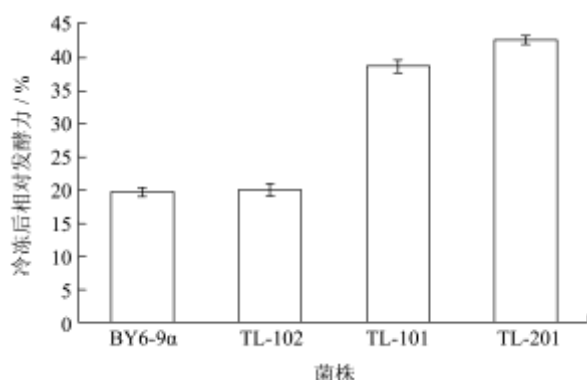


图 11 中性海藻糖酶对四株酵母菌株冷冻后相对发酵力的影响

Fig.11 Effect of neutral trehalase on the relative fermentation ability of four yeast strains after freezing

由图 11 可以看出, 菌株 TL-102(*nth2*Δ)与亲本菌株(BY6-9α)的冷冻后相对发酵力基本相同, 这说明单敲 *NTH2* 基因对酵母冷冻后相对发酵力无影响。同时可以看出, 菌株 TL-101(*nth1*Δ)和菌株 TL-201(*nth1*Δ*nth2*Δ)的冷冻后相对发酵力都得到显著提高, 分别比亲本菌株高了 95.95% 和 116.04%, 这说明敲除 *NTH1* 基因能显著提高冷冻后酵母的发酵性能。

3 结论

本文通过分析 BY6-9α(亲本菌株)、TL-101(*nth1*Δ)、TL-102(*nth2*Δ)和 TL-201(*nth1*Δ*nth2*Δ)的生长曲线、生物量、比生长速率、中性海藻糖酶活力、胞内海藻糖含量、胞内海藻糖降解速率、冷冻存活率、冷冻前产气量、比发酵力、冷冻后产气量和相对发酵力, 结果表明, 四株酵母菌株的生物量、比生长速率、胞内海藻糖含量和比发酵力均无显著差异, 这说明中

性海藻糖酶基因对酵母菌株的生物量、比生长速率、胞内海藻糖含量和比发酵力的影响均不显著。同时, TL-102 的胞内海藻糖降解速率、冷冻存活率、冷冻前产气量、冷冻后产气量和相对发酵力与亲本菌株(BY6-9α)无明显差别, 说明单敲 *NTH2* 对酵母耐冷冻特性无任何显著影响。而相对于亲本菌株(BY6-9α), TL-101 和 TL-201 的中性海藻糖酶活力降低了 49.81% 和 53.16%, 胞内海藻糖降解速率分别减慢了 9.22% 和 15.60%, -20 °C 冷冻 28 d 后冷冻存活率分别提高了 91.06% 和 103.01%, 冷冻后 CO₂ 产生量分别提高了 63.04% 和 65.22%, 冷冻后相对发酵力分别提高了 95.95% 和 116.04%, 这充分说明敲除 *NTH1* 基因能明显改善酵母菌株的耐冷冻特性, 而且酵母的耐冷冻特性与胞内海藻糖降解速率密切相关, 呈负相关。相对于亲本菌株(BY6-9α), TL-201 在 YPD 液体培养基中的延滞期延长, 生长速度减慢, 且其冷冻前 CO₂ 产生量减少了 23.66%, 同时 TL-101 冷冻前 CO₂ 产生量也减少了 16.77%, 这可能与发酵初期这两株菌株的胞内海藻糖降解速率较慢, 胞内海藻糖能抑制酶的活性并阻止部分变性蛋白恢复功能有关^[11-12]。

参考文献

- [1] Yokoigawa K, Sato M, Soda K. Simple Improvement in Freeze-tolerance of Bakers' Yeast with Poly-gamma-glutamate [J]. J. Biosci. Bioeng., 2006, 102(3): 215-219
- [2] Shima J, Takagi H. Stress-tolerance of Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cells: Stress-protective Molecules and Genes Involved in Stress Tolerance [J]. Biotechnol. Appl. Biochem., 2009, 53(3): 155-164
- [3] Aguilera J, Randez-Gil F, Prieto JA. Cold Response in *Saccharomyces cerevisiae*: New Functions for Old Mechanisms [J]. FEMS Microbiol. Rev., 2007, 31(3): 327-341
- [4] Shi L, Sutter BM, Ye X, et al. Trehalose is a Key Determinant of the Quiescent Metabolic State that Fuels Cell Cycle Progression upon Return to Growth [J]. Mol. Biol. Cell, 2010, 21(12): 1982-1990.
- [5] Teunissen A, Dumortier F, Gorwa M-F, et al. Isolation and Characterization of a Freeze-tolerant Diploid Derivative of an Industrial Baker's Yeast Strain and Its Use in Frozen Doughs [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68(10): 4780-4787
- [6] Garre E, Pérez-Torraldo R, Gimeno-Alcañiz JV, 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
- [7] Mahmud SA, 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
- [8] 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
- [9] 吕鸿雁,陈叶福,周大伟,等.产谷胱甘肽面包酵母的选育及发酵条件优化研究[J].现代食品科技,2011,27(5):559-563
LV Hong-yan, CHEN Ye-fu, ZHOU Da-wei, et al. Breeding of High Glutathione Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strain and Optimization of its Fermentation Conditions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(5): 559-563
- [10] DONG Jian, WANG Guang-lu, ZHANG Cui-ying, et al. A Two-step Integration Method for Seamless Gene Deletion in Baker's Yeast [J]. *Anal. Biochem.*, 2013, 439(1): 30-36
- [11] Sebollela A, Louzada PR, Sola-Penna M, et al. Inhibition of Yeast Glutathione Reductase by Trehalose: Possible Implications in Yeast Survival and Recovery from Stress [J]. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004, 36(5): 900-908
- [12] Singer MA, Lindquist S. Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding in Vitro and in Vivo [J]. *Mol. Cell*, 1998, 1(5): 639-648