

面包酵母高糖发酵力与蔗糖酶活力关系的研究

封冰, 张翠英, 林雪, 肖冬光

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 本文研究了面包酵母高糖耐性与蔗糖酶活性的关系。通过对八株酵母菌株的蔗糖酶活性和高糖面团发酵力比较分析, 其中 ADY2 蔗糖酶酶活最大, BY-6 最小, 分别为 128.70 U/g 干酵母和 30.55 U/g 干酵母, 而在高糖面团中发酵力却是 BY-6 最大, ADY2 最小, CO₂ 的产生量分别为 850 ccm 和 225 ccm, 证实了较低蔗糖酶活性的面包酵母菌株具有在高糖面团中发酵力较高的特性。通过测定蔗糖酶酶活相差较大的菌株 BY-6 和 ADY2 在蔗糖模拟面团中的蔗糖消耗和葡萄糖积累曲线, 结果表明 ADY2 不仅蔗糖消耗速度比 BY-6 快, 且其积累葡萄糖的速度比 BY-6 快, 同时所积累的最高葡萄糖量也比 BY-6 高, 分别为 5.89×10^{-2} 和 4.50×10^{-2} g/mL。此外, 即便是蔗糖酶酶活低且高糖面团发酵力大菌株 BY-6 在蔗糖模拟面团培养基中仍有较多葡萄糖积累, 因此选育蔗糖酶水解生成葡萄糖速度与其利用葡萄糖速度一致或相差不大的菌株是我们选育耐高糖面包酵母菌株的一个控制靶点。

关键词: 面包酵母; 蔗糖酶; 高糖耐性; 发酵力

文章编号: 1673-9078(2014)5-131-135

The Relationship between Fermentation Activity of *Saccharomyces cerevisiae* in High-sugar Dough and Sucrase Activity

FENG Bing, ZHANG Cui-ying, LIN Xue, XIAO Dong-guang

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

Abstract: Six active dry yeasts with two strains BY-6 and BY-14 were used as the tested strains. The sucrase activities, specific growth rates in different types of culture medium and fermentation activities in high and low sugar dough were detected. The yeast ADY2 and BY-6 showed the highest and lowest sucrase activities, respectively, being of 128.70 U/g dry yeast and 30.55 U/g dry yeast, respectively. For the fermentation activity in high-sugar dough, the outputs of CO₂ were 850 ccm and 225 ccm, respectively. It was proved that the strain with lower sucrase activity had better fermentation activity in high-sugar dough. By measuring the consumption of sucrose and accumulation of glucose in the simulation of high-sugar dough, the results showed that ADY2 with higher sucrase activity consumed more sucrose and accumulated glucose faster than BY-6 with lower sucrase activity; meanwhile, it accumulated more glucose than BY-6. For BY-6 with lower sucrase activity and strong fermentation activity, there was still a large number of glucose accumulations in the simulation of high-sugar dough. Therefore it was a control target spot to breed the strains whose sucrase activity was consistent with the speed of glucose consumption.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; sucrase; high-sugar-tolerance; fermentation activity

面包酵母是面包生产过程中最重要的微生物发酵剂和生物膨松剂。面包酵母被分为两类, 一类用于高糖面团发酵中, 为耐高糖酵母; 另一类用于不加糖或糖含量在 7% 以下的面团中, 为低糖面包酵母^[1]。耐高糖酵母主要用于甜面包的制作, 相对于普通面包而言, 甜面包的制作, 除添加面粉、酵母、盐和水外, 还需

收稿日期: 2013-12-16

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

作者简介: 封冰 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 现代酿造技术

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

加入大量的蔗糖 (用量高达 15~30%), 此时普通面包酵母的发酵速度就不可避免地受到抑制^[2]。一般工业制作上, 为了解决这个问题, 通常采用加大酵母用量的方法, 这无疑会带来一定的负面影响, 如面包酵母味较重, 生产成本较高等。因此为了保持面包的风味、降低甜面包的制作成本, 研究面包酵母对高糖的耐受性具有重要的实际指导意义。

面包酵母的耐糖性是指酵母对面团中蔗糖的适应能力。面包酵母含有丰富的蔗糖酶, 又称为转化酶 (Invertase) 或 β -D-呋喃果糖苷酶 (EC 3.2.1.26), 属于水解酶类^[3]。酵母蔗糖酶由酵母蔗糖转换酶基因 *SUC2* 编码, 该基因是酵母细胞中的一个结构基因, 全长 2.7 kb, 是酵母 *SUC* 基因家族的一个成员, 位于

酵母的第IX条染色体的末端^[4]。蔗糖一般不能直接被微生物利用,而酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)却可以在蔗糖为唯一碳源的培养基上生长,这是因为酿酒酵母中含有可以降解蔗糖的蔗糖转换酶,它作用于 β -1,2糖苷键,将蔗糖不可逆地水解为D-葡萄糖和D-果糖,随后葡萄糖和果糖进入糖酵解途径以供酵母利用,同时由于蔗糖的快速分解生成葡萄糖和果糖会使酵母细胞渗透压增加,可能影响酵母的面团产气量低、发酵速度缓慢等现象^[5]。因此探明影响面包酵母高糖面团发酵力的主要因素,从调控其耐高糖机制的角度出发来调控甜面包的制作过程,可以为提升甜面包的品质提供新的可能性和更多的控制靶点。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

菌种:面包酵母,从市面上收集的6种高活性干酵母中分离纯化得到,分别命名为ADY1、ADY2、ADY3、ADY4、ADY5、ADY6,天津市工业微生物重点实验室保存菌种BY-6、BY-14。

面粉:利达面粉家庭装。

1.2 实验仪器

发酵力测定仪、高压蒸汽灭菌锅、岛津紫外分光光度计、生化培养箱、离心机、电子称量天平、恒温水浴锅、电热鼓风干燥箱、全自动生长曲线测定仪、SBA-40E生物传感仪。

1.3 实验试剂

乙酸-乙酸钠缓冲溶液(pH 5.2)、DNS(3,5-二硝基水杨酸)显色液、0.01 mol/L标准葡萄糖溶液、1 mol/L蔗糖溶液。

1.4 培养基

酵母培养基(YEPD)^[6]:酵母浸粉1%,葡萄糖2%,蛋白胨2%,固体培养基加2%琼脂;糖蜜培养基:将处理后的糖蜜(30~35°Brix)稀释至10~12°Brix,添加0.5%酵母粉,0.05%硫酸铵,pH 5.0;葡萄糖高渗培养基:葡萄糖30%,酵母浸粉1%,蛋白胨2%;葡萄糖低渗培养基:葡萄糖4%,酵母浸粉1%,蛋白胨2%;蔗糖模拟面团培养基^[7]:160 g/L蔗糖,2.5 g/L硫酸铵,5 g/L尿素,16 g/L磷酸二氢钾,5 g/L磷酸氢二钠,0.6 g/L硫酸镁,22.5 mg/L烟酸,5.0 mg/L泛酸,2.5 mg/L维生素B₁,1.25 mg/L维生素B₆,1.0 mg/L维生素B₂,0.5 mg/L叶酸,蒸馏水配制,100 °C灭菌

30 min 备用。

1.5 实验方法

1.5.1 鲜酵母的制备

从斜面上挑取1环菌泥接入种子培养基中,30 °C静置培养36 h,以10%的接种量转入糖蜜培养基,30 °C,180 r/min培养至酵母生长稳定期,静置2 h,4000 r/min离心5 min,蒸馏水洗涤2次收集菌体备用。

1.5.2 面包酵母生物量的测定

取10 mL糖蜜发酵液于离心管,4000 r/min离心5 min,去除上清液,用蒸馏水洗涤2次,用1 mL蒸馏水悬起菌体,倒入已称至恒重的称量瓶(记为M₁),再用1 mL蒸馏水重洗离心管,一并倒入称量瓶中,85 °C干燥箱内烘至恒重,称重记为M₂,带入下式得菌体生物量^[8],取三个平行样的平均值作为实验结果。

$$\text{菌体生物量}(g/L) = (M_1 - M_2) \times 100$$

1.5.3 细胞干物质含量的测定

收集的湿菌体约1 g放于已称至恒重的称量瓶(记为M₃)中,称重为M₄,在85 °C干燥箱中烘至恒重,称重记为M₅,代入下式计算干物质含量。

$$\text{干物含量} = (M_5 - M_3) / (M_4 - M_3)$$

1.5.4 面包酵母比生长速率的测定

取斜面菌种1环至装有5 mL YEPD培养基的试管中,30 °C,180 r/min培养12 h。取上述培养好的菌液40 μ L分别接入装有360 μ L高渗和低渗培养基100孔板的孔中,将100孔板置30 °C培养,每隔0.5 h测定600 nm处的吸光值,以时间为横坐标,OD值为纵坐标,绘制生长曲线。在菌株的对数生长期,以菌体吸光度ln值为纵坐标,培养时间为横坐标,作图求得斜率,即为菌株比生长速率 μ /h,实验重复三次取平均值作为实验结果。

1.5.5 低糖面团发酵力的测定

称面粉(于30 °C恒温箱保温1~2 h)280 g,鲜酵母9.0 g、NaCl 4 g、蔗糖5.6 g,将蔗糖、NaCl和鲜酵母分别用100 mL和50 mL的30 °C蒸馏水溶解,混匀倒入面粉中,快速揉成面团,揉面时间控制在6 min内,面团终温度30 \pm 1 °C。将面团放入发酵测定仪的不锈钢盒中,送入活力室内,发酵温度30 \pm 0.5 °C。调节记录仪零点,关闭放气小孔,发酵力以1 h内面团体积的增加量V₁(ccm)表示。

1.5.6 高糖面团发酵力的测定

NaCl 2.8 g、蔗糖44.8 g用130 mL蒸馏水溶解,其余同低糖面团发酵力的测定,发酵力以2 h内面团体积的增加量V₂(ccm)表示。

1.5.7 面包酵母蔗糖酶酶活的测定

1.5.7.1 蔗糖酶活力测定

100 mL 三角瓶中加入 1 mol/L 蔗糖溶液 1.0 mL, pH 5.2 NaAc-HAc 缓冲液 2.0 mL, 蒸馏水 6.5 mL, 混匀于 30 °C 水浴中预热 5 min。加入酵母干物质约为 25% 的酵母液 0.5 mL, 迅速混匀并计时 5 min, 迅速取 1 mL 反应液加入已加 2 mL DNS 显色液的比色管中, 终止酶反应, (混匀后于沸水中加热 5 min, 下同), 冷却后加水至 25 mL。另取一三角瓶作空白实验。蔗糖溶液、NaAc-HAc 缓冲液及蒸馏水同前, 平衡预热 5 min, 取 1 mL 混合液加入已加 2 mL DNS 显色液的比色管, 再加 0.5 mL 酵母液, 立即煮沸 5 min。以空白为参比, 测定反应液在 540 nm 波长处的吸光值, 对照葡萄糖标准曲线计算葡萄糖生成量, 并计算蔗糖酶活力值。

1.5.7.2 蔗糖酶活力的定义

30 °C, pH 5.2 条件下, 单位酵母量 (g 酵母干物质) 每分钟转化蔗糖生成 1 mg 葡萄糖为一个活力单位 (U)。

蔗糖酶活力的计算: 蔗糖酶活力 (U/g 酵母干物质) = $(A \times 0.180) / (5 \times 0.5 \times DW)$

注: A: 5 min 反应结束蔗糖酶水解蔗糖产生的还原糖量/ μmol , 由标准曲线计算出; 5: 酶反应时间/min; 0.180: 1 μmol 葡萄糖的质量/mg; 0.5: 反应体系中的酵母液量/mL; DW: 干物质含量/%

1.5.8 葡萄糖发酵速度曲线的绘制

取 2 g 鲜酵母加入 100 mL 液体模拟面团培养基, 30 °C 静置培养, 从 0 min 开始, 每 30 min 测定培养液中葡萄糖的含量, 取三个平行样的平均值作为实验结果。以培养时间为横坐标, 葡萄糖含量为纵坐标绘制葡萄糖发酵速度曲线。葡萄糖含量的测定: SBA-40E 生物传感仪。

1.5.9 数据分析

每组实验进行三个平行实验, 三组实验平均值作为实验结果, 并使用 EXCEL 2013 软件对实验数据结果计算标准差 (STDEV)。

2 结果与讨论

2.1 试验菌株的生物量

按照 1.5.2 测定糖蜜中的生物量, 结果如表 1。

在相同培养基和培养条件下, 酵母细胞生长至稳定期, 生物量大小反映了酵母对糖利用率的高低, 生物量越高, 说明菌体对糖的利用率越高^[9]。由表可知, ADY2 生物量最大, ADY3 生物量最小, 分别为 8.01 和 7.65 g 干酵母/L 糖蜜, 但是两者相差并不大, 即 8 株菌对

糖的利用率相当。

表 1 不同菌株的生物量

Table 1 The biomass of different strains

菌株	生物量/ (g 干酵母/L 糖蜜)	菌株	生物量/ (g 干酵母/L 糖蜜)
ADY1	7.92±0.14	ADY4	7.70±0.15
ADY2	8.01±0.16	ADY5	7.93±0.10
ADY3	7.65±0.15	ADY6	7.80±0.12
BY-14	7.88±0.12	BY-6	7.97±0.13

2.2 试验菌株在葡萄糖培养基中的比生长速率

按照 1.5.4 测定试验菌株的比生长速率, 结果如表 2。

表 2 不同菌株的比生长速率

Table 2 The specific growth rate of different strains

菌株	低渗培养基 (μ_1/h)	高渗培养基 (μ_2/h)	μ_2/μ_1
ADY1	0.20	0.18	0.88
ADY2	0.20	0.19	0.96
ADY3	0.18	0.17	0.89
BY-14	0.19	0.16	0.86
ADY4	0.18	0.17	0.92
ADY5	0.18	0.17	0.94
ADY6	0.18	0.15	0.82
BY-6	0.20	0.18	0.92

通过测定试验菌株在低渗和高渗培养基中的比生长速率的大小可以反映出菌株在低渗和高渗环境下的生长状况。由表 3 可知 8 株菌在低渗培养基中的比生长速率差异相差不大, 即各株菌在正常培养基中单位时间内的繁殖量较大, 细胞繁殖较快, 然而在高渗培养基中比生长速率相比低渗培养基有明显降低, 这是因为高渗透压会抑制微生物的生长。通过比较表中数据可知: 在高渗培养基中受抑制程度由大到小依次为 ADY6、BY-14、ADY1、ADY3、ADY4、BY-6、ADY5、ADY2。

2.3 试验菌株的面团发酵力

按照 1.5.5 和 1.5.6 测定试验菌株在低糖和高糖面团中的发酵力, 结果如图 1。

通过测定试验菌株在低糖和高糖面团中的发酵力, 结果表明在低糖面团中各株菌的的发酵力 (V_1) 都很强而且相差不大, 除 ADY2 外 CO_2 产生量均超 1000 ccm, 但是在高糖面团中的发酵力 (V_2) 却相差很多, 其中 BY-6

发酵力最大, ADY2发酵力最小, CO₂的产生量分别为850 ccm和225 ccm, 这也表明高糖环境对各菌株产生不同程度的抑制。图中的比值大小反映了菌株对高糖环境的耐受性, 比值越大表示菌株对高糖环境的耐受性越大, 受抑制程度越小; 反之, 对高糖环境耐受性越小, 受抑制程度越大。由图中数据可知, 所用试验菌株在高糖面团中受抑制程度由大到小依次为BY-6、ADY5、ADY4、ADY3、ADY6、BY-14、ADY1、ADY2, 这与菌株在葡萄糖高渗环境中受抑制程度并不是一致的对应关系, 比如ADY-2在葡萄糖高渗环境中的受抑制程度最小但是在高糖面团中的受抑制程度最大, 这说明在高糖面团环境中除渗透压外还有其他因素影响菌株的发酵力。

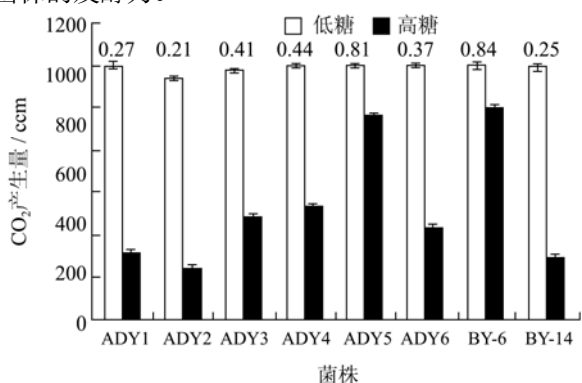


图1 试验菌株的发酵力

Fig.1 The fermentation ability of tested strains

注: 图中柱形图上方数据为高糖面团发酵力与低糖面团发酵力的比值。

2.4 试验菌株的蔗糖酶酶活

按照 1.5.7 测定蔗糖酶酶活, 结果如图2。

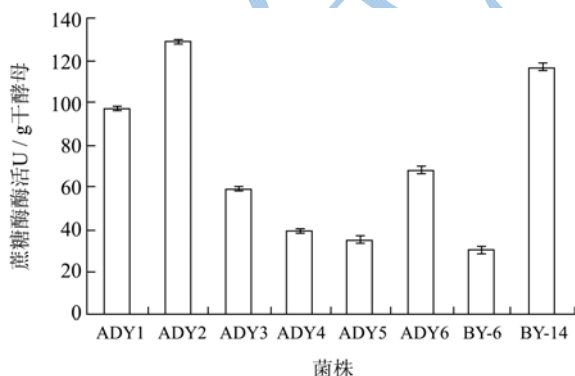


图2 试验菌株的蔗糖酶酶活

Fig.2 The sucrase activity of tested strains

高糖面团中的碳源主要是蔗糖, 在高糖面团中酵母蔗糖酶在酵母细胞外壁可将蔗糖转化成葡萄糖和果糖以供酵母利用^[10]。通过试验测定表明, ADY2 蔗糖酶酶活最大, BY-6 蔗糖酶酶活最小, 分别为 128.70 U/g 干酵母和 30.55 U/g 干酵母, 并且试验菌株蔗糖酶酶活

由大到依次为 ADY2、BY-14、ADY1、ADY6、ADY3、ADY4、ADY5、BY-6, 并且与试验菌株在高糖面团中的发酵力呈负相关, 这表明面包酵母菌株蔗糖酶活力越高其高糖面团发酵力越低, 这与 Evans 的结果一致^[11]。

2.5 不同菌株的葡萄糖积累情况比较

按照 1.5.8 测定酶活相差较大的 ADY2 和 BY-6 菌株在蔗糖模拟面团中葡萄糖积累和蔗糖消耗曲线, 结果如图3。

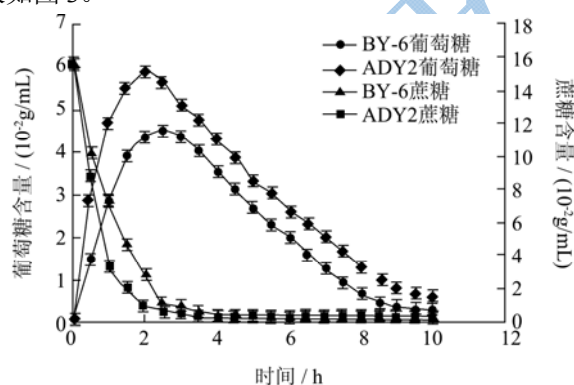


图3 ADY2 和 BY-6 葡萄糖积累和蔗糖消耗曲线

Fig.3 The curve of ADY2 and BY-6 glucose accumulation and sucrose consumption

从图3可以看出在蔗糖为唯一碳源的模拟面团培养基中, 产生的葡萄糖呈现快速上升, 然后下降的趋势, 并且蔗糖酶活力高的酵母菌株 ADY2 不仅积累葡萄糖的速度明显比 BY-6 快, 而且其最终所能积累的最高葡萄糖量也比 BY-6 高, 分别为 5.89×10^{-2} g/mL 和 4.50×10^{-2} g/mL, 同时蔗糖的消耗速度也比 BY-6 快。这说明在高糖面团中较高蔗糖酶活酵母菌株在发酵过程中积累较高量的葡萄糖。此外, BY-6 的蔗糖酶酶活虽然较低, 但是由于蔗糖酶水解生成葡萄糖的速度比酵母利用葡萄糖的速度快很多, 导致在蔗糖模拟面团发酵液中仍然会积累一定量的葡萄糖, 这与 Myers 等人研究的酵母蔗糖酶水解蔗糖的速度比酵母利用己糖的速度快 300 多倍结果相一致^[12]。另外酵母蔗糖酶水解蔗糖生成葡萄糖和果糖, 葡萄糖和果糖的积累使细胞快速的处于更高的渗透压下, 这是因为溶液的渗透压大小与溶液的物质浓度成正比, 从而使得高糖面团发酵力被抑制^[13]。因此, 选育低蔗糖酶酶活的菌株有助于提高面包酵母的高糖耐受性。

3 结论

3.1 通过测定试验菌株在葡萄糖高、低渗培养基中的比生长速率和在低、高糖面团中的发酵力以及试验菌株的蔗糖酶酶活, 可以看出菌株在低渗环境和低糖面

团中比生长速率和发酵力都很高且没有明显差异的情况下,但是在高糖面团中的发酵力却相差很大,并且其在高糖面团中抑制程度与高渗中的抑制程度并不是严格的一致关系,而与试验菌株的蔗糖酶活存在很明显的负相关的关系,即蔗糖酶活越高,其在高糖面团中的发酵力越低,表明相比菌株对高渗环境的耐受性而言,蔗糖酶活是影响高糖面团中酵母发酵力的主要因素,结合我们之前研究的海藻糖与甘油的积累可以提高高糖面团发酵力的结果,这将丰富耐高糖面包酵母菌株选育方面的理论依据。

3.2 在蔗糖为唯一碳源的高糖模拟面团培养基中,由于蔗糖酶的作用,培养基中蔗糖含量下降,葡萄糖和蔗糖含量增加,并在细胞外产生较高的渗透压,这将严重抑制酵母菌株的生长和在面团中的发酵力,并且随着蔗糖酶活的增高,葡萄糖积累速度加快,这种抑制作用也会增强,这是因为具有较高蔗糖酶活的酵母菌株由于葡萄糖的积累使细胞更快的处于更高的渗透压的环境下。

3.3 蔗糖酶活最低且高糖面团发酵力最大的试验菌株BY-6在蔗糖模拟面团培养基中,由于蔗糖酶的作用使得蔗糖含量快速下降的同时便随着较高量的葡萄糖积累,因此选育蔗糖酶水解生成葡萄糖的速度与其利用葡萄糖的速度相一致或相差不大的菌株是我们今后在选育耐高糖面包酵母菌株工作中的一个方向。

参考文献

- [1] 姜天笑,徐曼,王振,等.优良面包酵母菌株的杂交育种[J].微生物学通报,2008,35(4):550-554
JIANG Tian-xiao, XU Man, WANG Zhen, et al. Construction of baker's yeast strains with high fermentative abilities in both lean and sweet doughs [J]. Microbiology China, 2008, 35(4): 550-554
- [2] Kumar R, Kesavapillai B. Stimulation of extracellular invertase production from spent yeast when sugarcane pressmud used as substrate through solid state fermentation [J]. Springer Plus, 2012, 1: 81-86
- [3] Shi-An Wang, Fu-Li Li. Invertase SUC2 is the key hydrolase for inulin degradation in *saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(1): 403-406
- [4] Emine Akardere, Büşra Özer, Evran BIÇak Çelem, et al. Three-phase partitioning of invertase from baker's yeast [J]. Separation and Purification Technology, 2010, 72(3): 335-339
- [5] Edna Maria Morais Oliveira, Jose Joao Mansure, Elba Pinto da Silva Bon. Gln3p and Nil1p regulation of invertase activity and SUC2 expression in *saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Research, 2005, 5: 605-609
- [6] LiLi Li, Yanrui Ye, Li Pan, et al. The induction of trehalose and glycerol in *saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 387: 778-783
- [7] Teunissen A. Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 4780-4787
- [8] 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
- [9] Thiago O Basso, Stefan de Kok, Marcelo Dario, et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield [J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(6): 694-703
- [10] Lisbeth Olsson, Jens Nielsen. The role of metabolic engineering in the improvement of *saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26, (9-10): 785-792
- [11] Evans I H. Yeast strains for baking: recent developments [M]. Heidelberg: Spencer, J T F, Spencer, D M, 1990
- [12] D K Myers, D T Lawlor, P V Attfield. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(1): 145-150
- [13] Jun Shima, Hiroshi Takagi. 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