

## *mal62* 基因高表达对工业面包酵母发酵力的影响

孙溪, 张翠英, 董建, 王光路, 吴鸣月, 肖冬光\*

天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

**摘要:** 【目的】构建高麦芽糖利用能力的面包酵母菌株, 以期提高面包酵母在不加糖面团中的发酵力, 增加经济效益的同时减少成本消耗。【方法】克隆工业面包酵母 BY-14 的麦芽糖酶基因 *mal62*, 以 *PGK1* 强启动子和终止子为调控元件, 以酵母-大肠穿梭型质粒 Yep-C 为载体, 构建重组表达质粒 Yep-CPM, 并转化酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) BY-14, 经筛选鉴定获得酵母转化子 BYCPM。进行转化子的酶活力、*mal62* 基因表达水平及发酵力测定, 检测目的基因的功能性表达。【结果】工业酵母转化子 BYCPM 的最大麦芽糖酶活力比对照菌提高 15% - 52%, 发酵力提高 40%, 比发酵力提高 5.6%。【结论】转化子 BYCPM 具有更高的麦芽糖酶活力和更强的抗葡萄糖阻遏能力。并且在不加糖面团中, 转化子具有更高的发酵力, 可以在更短的时间内获得更大的产气量且消耗更少的碳源。

**关键词:** 麦芽糖酶, 面包酵母, 发酵力, 麦芽糖代谢

**中图分类号:** Q935   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2012) 09-1094-09

面包酵母 (*S. cerevisiae*) 是重要的工业微生物, 在现代食品工业方面, 广泛被用作人类食品的优良发酵剂和营养剂<sup>[1-3]</sup>。一些面包、苏打饼干、馒头等的制作主要由不加糖面团发酵。不加糖面团中, 麦芽糖是主要的可发酵糖<sup>[4]</sup>, 因此麦芽糖的代谢能力影响着面包酵母的产气速度及发酵能力<sup>[5-6]</sup>。酵母利用麦芽糖需要三类基因产物: 麦芽糖通透酶 (由 *malx1* 基因编码) (x 代表五个不相关联的 *MAL* 位点之中的一个)、麦芽糖酶 (由 *malx2* 基因编码) 以及正调节蛋白 (由 *malx3* 基因编码)。在麦芽糖代谢过程中, 酵母菌的麦芽糖通透酶将胞外的麦芽糖运输至胞内, 并通过胞内的麦芽糖酶水解为 2 分子葡

萄糖进入糖酵解途径并产生二氧化碳。早期的研究报道称麦芽糖通透酶是麦芽糖代谢的关键酶<sup>[7-8]</sup>, 但基于 Jiang<sup>[9]</sup> 的实验结果我们推测麦芽糖酶的作用或许比以往认为的更加重要, 麦芽糖代谢的关键酶是麦芽糖酶而非麦芽糖通透酶。于是我们以酿酒酵母麦芽糖酶基因 (*mal62*) 为目的基因, 同时以酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶基因 (*PGK1*) 的强启动子 (*PGK1<sub>p</sub>*) 和终止子 (*PGK1<sub>r</sub>*) 为调控元件<sup>[10-13]</sup>, 构建 *mal62* 基因高表达质粒, 并在工业面包酵母中进行转化和功能性表达, 通过对转化子麦芽糖酶活力、麦芽糖代谢能力以及发酵力的测定, 尝试通过另一个途径获得具有高麦芽糖利用能力的工业面包酵母菌株。

**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 (10JJCZDJC16700)

\* 通信作者。Tel: +86-22-60601067; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

**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

**收稿日期:** 2012-03-28; **修回日期:** 2012-05-13

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒:** 面包酵母工业菌株 BY-14、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a、带有铜抗性基因 (*CUP1*) 的载体 *Yep-C* 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<sup>[14]</sup> 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) (葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, pH 6.0) 用于酵母菌的培养和保存。Luria-Bertani 培养基 (胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L) 用于大肠杆菌的培养和保存。液体模拟面团培养基 (LSMLD 培养基) (葡萄糖 5 g/L, 麦芽糖 40 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 B<sub>1</sub> 2.5 mg/L, 维生素 B<sub>6</sub> 1.25 mg/L, 维生素 B<sub>2</sub> 1 mg/L, 叶酸 0.5 mg/L) 和 不加糖面团 (天津利金粮油股份有限公司利达面粉) 用于测定菌株的发酵性能。3 种 LSMLD 培养基分别以 38 g/L 麦芽糖作为单麦芽糖碳源, 40 g/L 葡萄糖作为单葡萄糖碳源, 或者 33.25 g/L 麦芽糖加 5 g/L 葡萄糖作为混合糖碳源。3 种碳源的碳摩尔数均为 1.333 C-mol。

**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- $\alpha$ -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; 硫酸铜、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

根据 GenBank 中 *PGK1* 与 *mal62* 基因的核苷酸序列, 设计了表 1 中的扩增引物。所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成, 酶切位点以下划线表示。

表 1 本实验中所用引物

Table 1 Primers used in the present study		
Primers	Primers sequence (5'→3')	Size/bp
mal62 up1	GATCTGTACATCAGTCAAGCGTAACTAAAT	30
mal62 up2	TGTACATCAGTCAAGCGTAACTAAAT	26
mal62 down1	GATCTTTATTTGACGAGGTAGATTCTACCT	30
mal62 down2	TTTATTTGACGAGGTAGATTCTACCT	26
PGK up	GGA <u>AAGCTT</u> AAGCTTTCTAACTGATCTATC CAAACTGA	39
PGK down	GGA <u>AAGCTT</u> AAGCTTTAACGAACGCAGAA TTTTTC	34
mal62q-up	GGTCTCACAAATGGTCCTA	18
mal62q-down	TTCGCTGACTTCGTATC	17

### 1.3 *mal62* 基因的克隆

利用试剂盒, 提取面包酵母 BY-14 染色体 DNA, 以其为模板用高保真 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 反应条件: 95°C 5 min; 94°C 40 s, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 循环 25 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 重组质粒的构建

*Hind*III 酶切 pPGK1 质粒, 回收约 1.7 kb 的 *PGK1* 强启动子与终止子片段, 与经 *Hind*III 酶切的质粒 *Yep-C* 连接, 获重组质粒 *Yep-CP*。以 BY-14 基因组为模板, 同时使用引物 mal62 up1、mal62 up2、mal62 down1 与 mal62 down2, PCR 得到带有 *Bgl* II 粘性末端的 *mal62* 基因片段 (1.7 kb), 将其插入至 *PGK1* 强启动子 (*PGK1<sub>p</sub>*) 与终止子 (*PGK1<sub>T</sub>*) 之间的 *Bgl* II 酶切位点。经转化、扩增、验证, 构建 *Yep-CPM* 质粒。构建过程详见图 1。

### 1.5 醋酸锂方法化转与转化子的鉴定

酵母转化采用醋酸锂转化法<sup>[15]</sup>。化转后的细胞涂布于含有 4 mmol/L 硫酸铜的 YEPD 培养基, 30°C 培养 48 h 后筛选, PCR 验证。

### 1.6 酶活力测定

按照参考文献 [16] 进行麦芽糖酶活力测定。每个实验重复 3 次取平均值作为实验结果, 误差值小于 12%。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 ( $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ )。麦芽糖通透酶活力测定按照参考文献<sup>[18]</sup>的方法进行, 每个测定实验重复 3 次取平均值作为实验结果, 误差值小于 10%。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 ( $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ )。

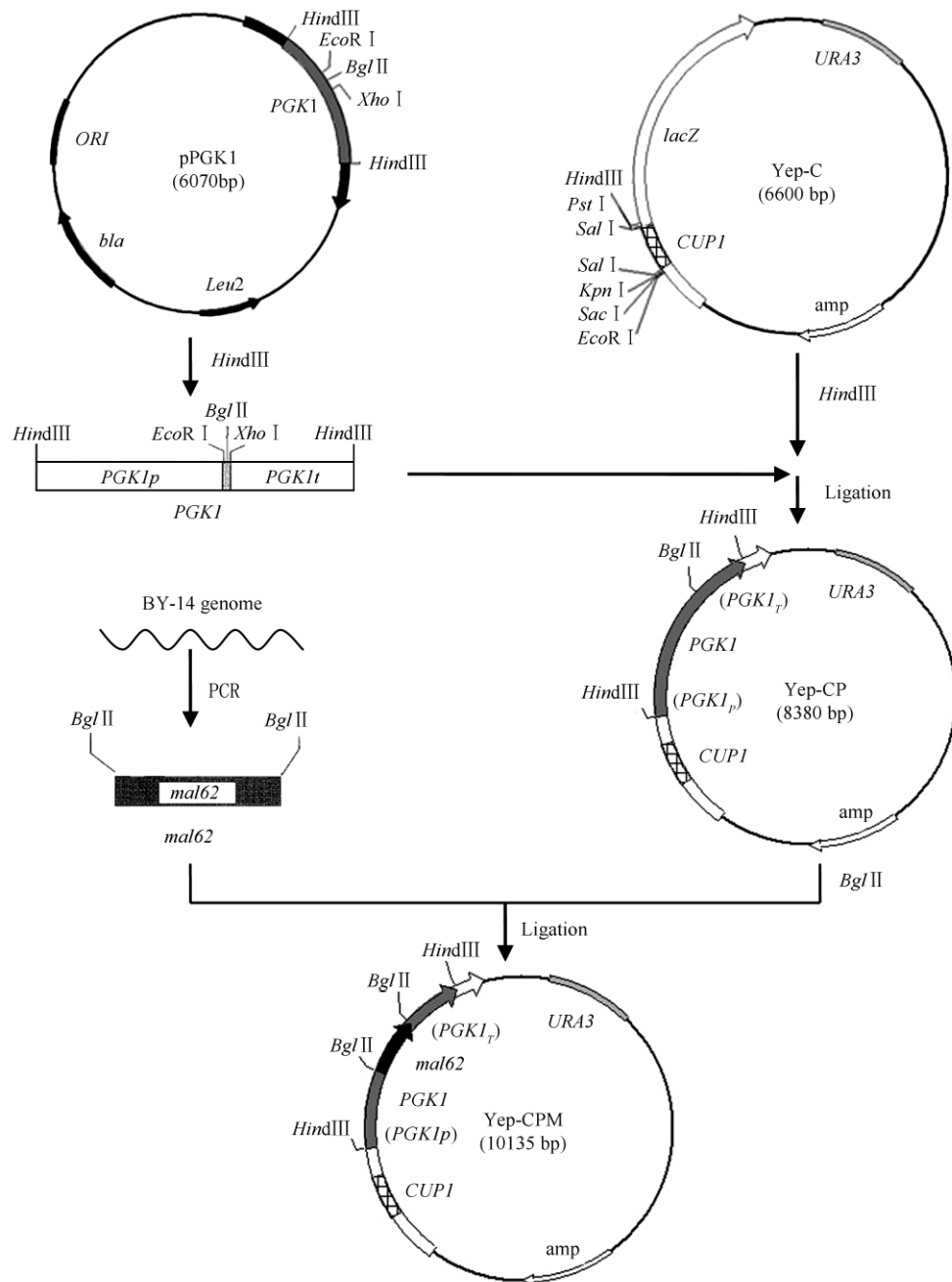


图1 酵母菌重组表达质粒 Yep-CPM 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid Yep-CPM.

### 1.7 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,150 mL水,4 g氯化钠,9 g鲜酵母(含水量75%)。在  $30^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  条件下快速均匀搅拌5 min,放入发酵仪,记录  $30^{\circ}\text{C}$  下60 min内的  $\text{CO}_2$  产生量,实验重复3次取平均值,误差值小于3%。

### 1.8 模拟面团残糖的测定

配制 LSMLD 培养基,  $100^{\circ}\text{C}$  煮沸30 min后冷却至  $30^{\circ}\text{C}$  使用。每100 mL LSMLD 培养基接入2 g鲜酵母,静置于  $30^{\circ}\text{C}$  培养4 h,前1 h内每隔10 min取样,1 h后每隔30 min取样。样品  $-20^{\circ}\text{C}$  保存,然后进行一次性测定。葡萄糖与麦芽糖含量测定使用高

压液相法。采用 Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, Calif.) 分离柱, 0.6 mL/min, 5 mmol/L H<sub>2</sub>

SO<sub>4</sub> 作为流动相, 65℃ 条件下测定。

### 1.9 比发酵力测定

$$\text{比发酵力} = \frac{\text{单位菌体产生的最大产气量}}{\text{达到最大产气量所需时间} \times \text{达到最大产气量所耗碳源 C-mol 数}}$$

单位为 mL CO<sub>2</sub> / (min · g · (C-mol))。

### 1.10 转化子的遗传稳定性实验

用传代的方法考察随机挑取的转化子 BYCPM 的遗传稳定性, 将 BYCPM 在 YEPD 斜面上进行反复传代 15 代, 并取第 1、5、10 和 15 代进行 PCR 验证。

### 1.11 基因表达水平测定

我们使用酵母 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) (CWBIO), 实时定量 PCR (qRT-PCR) 方法, 以引物 *mal62* q-up 与 *mal62* q-down, 分析 *mal62* 基因相对表达量的变化。

## 2 结果

### 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 *mal62* 目的基因理论大小一致 (data not shown)。

**2.1.2 表达重组子的构建、筛选与鉴定:** 使用 1.3 与 1.4 的方法, 获得重组质粒 Yep-CPM。图 2 的 PCR 验证结果表明, Yep-CPM 质粒已成功构建, 并且 *PGK1* 强启动子、终止子的方向与 *mal62* 基因方向一致 (5、6 泳道)。

**2.1.3 面包酵母重组菌株构建:** 将载体 Yep-C 以及精提后的表达质粒 Yep-CPM 分别导入工业面包酵母 BY-14 中, 在含有 4 mmol/L 硫酸铜的 YEPD 培养基上筛选阳性转化子 BY-C 与 BYCPM。酵母质粒提取后以引物 PGK up 与 PGK down 验证 BYCPM 转化子, 载体 Yep-C 为阴性对照, 电泳结果如图 3 所示, BYCPM 转化子获得一条 3535 bp 的 “*PGK1<sub>p</sub>* + *mal62* + *PGK1<sub>T</sub>*” 扩增片段, 而阴性对照无此条带, 该结果证明 BYCPM 转化子确为含有 Yep-CPM 质粒的重组面包酵母菌株。

**2.1.4 转化子遗传稳定性实验结果:** 由图 4 可知, 在不含有铜抗性的培养基条件下对 BYCPM 的第 1、5、10 和 15 代酵母转化子提取质粒进行 PCR 验证,

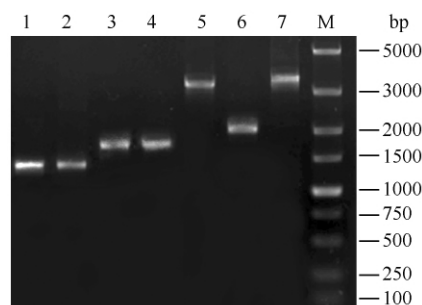


图 2 重组质粒 Yep-CPM 的构建过程

Fig. 2 The construction of plasmid Yep-CPM. 1. *CUP1* segment from plasmid Yep-C; 2. *CUP1* segment from plasmid Yep-CPM; 3. *mal62* segment from *Saccharomyces cerevisiae* genome; 4. *mal62* segment from plasmid Yep-CPM; 5. segment (*PGK1<sub>p</sub>* + *mal62*) amplified with PGK up and *mal62* down1 (or 2) primers from plasmid Yep-CPM; 6. segment (*mal62* + *PGK1<sub>T</sub>*) amplified with PGK down and *mal62* up1 (or 2) primers from plasmid Yep-CPM; 7. segment “*PGK1<sub>p</sub>* + *mal62* + *PGK1<sub>T</sub>*” (3535 bp) amplified with PGK up and PGK down primers from plasmid Yep-CPM; M. 5000 bp DNA Marker.

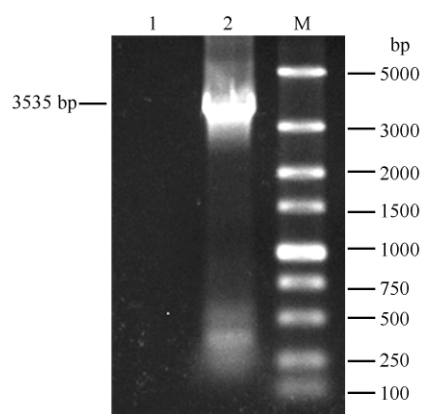


图 3 转化子的验证

Fig. 3 The verification of transformants. 1. result from transformant BY-C amplified with PGK up and PGK down primers; 2. segment amplified with PGK up and PGK down primers from transformant BYCPM; M. 5000 bp DNA Marker.

以 PGK up 和 PGK down 为引物, 均可扩增出大小为 3500 左右的片段, 该片段与预期的目的产物 “*PGK1<sub>p</sub>* + *mal62* + *PGK1<sub>T</sub>*” 片段大小 (3535 bp) 一

致。即随机挑取的转化子菌株 BYCPM 连续传代 15 代之内没有出现回复突变的情况。由此可得出 *mal62* 基因过表达的转化子 BYCPM 遗传性能稳定。

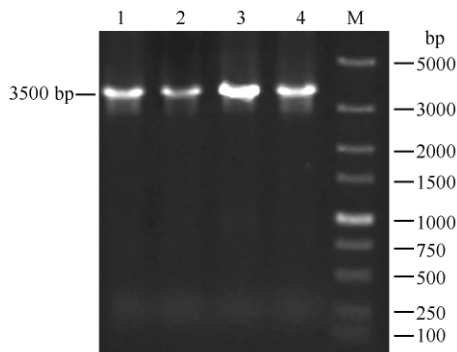


图4 转化子 BYCPM 稳定性的验证

Fig. 4 Genetic stability of passage strains from transformant BYCPM. Lane: 1. the first generation; 2. the fifth generation; 3. the tenth generation; 4. the fifteenth generation; 5. 5000 bp DNA Marker.

**2.1.5 *mal62* 基因相对表达量的 qRT-PCR 结果:** 为了探查 BYCPM 菌株中 *mal62* 基因的表达水平, 使用  $\beta$  肌动蛋白为内参, 通过 qRT-PCR 方法测定 *mal62* 的相对表达量, 实验结果证实了 *mal62* 基因在 BYCPM 菌株中的高表达(图 5)。

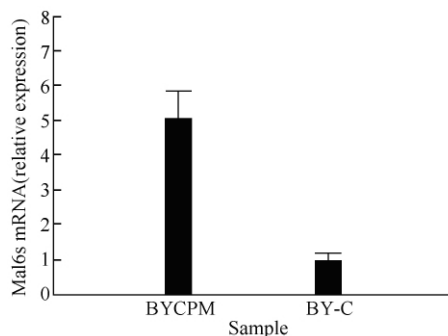


图5 转化子 qRT-PCR 结果

Fig. 5 The qRT-PCR results of transformants. *mal62* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Error bars indicate as the means  $\pm$  S. E. from the experiments performed in duplicate, and the experiments were repeated three times.

## 2.2 发酵性能的测定

**2.2.1 酶活力测定:** 以发酵时间为横坐标, 麦芽糖酶活力为纵坐标绘图, 可以发现(图 6), 在抑制性的葡萄糖(glucose) LSMLD 培养基中, 尽管两个菌株的麦芽糖酶活力均低于  $0.5 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , 但是过表达 *mal62* 基因的 BYCPM 菌株, 其最大麦芽糖酶

活力仍然高出对照菌 BY-C 52%; 在混合糖(glucose-maltose) LSMLD 培养基中, BYCPM 的最大麦芽糖酶活力也仍然比对照菌高 15%; 在诱导性的麦芽糖(maltose) LSMLD 培养基中, BYCPM 的最大麦芽糖酶活力更是高出对照菌 49%。另外, BYCPM 菌株麦芽糖通透酶活力与对照菌 BY-C 没有明显差异(data not shown)。因此, 我们推断在工业面包酵母中, 单独过表达 *mal62* 基因就可以有效提高麦芽糖酶活力。图 6 为三种碳源的 LSMLD 培养基中, 转化子 BYCPM 与对照菌 BY-C 的麦芽糖酶活力测定结果。

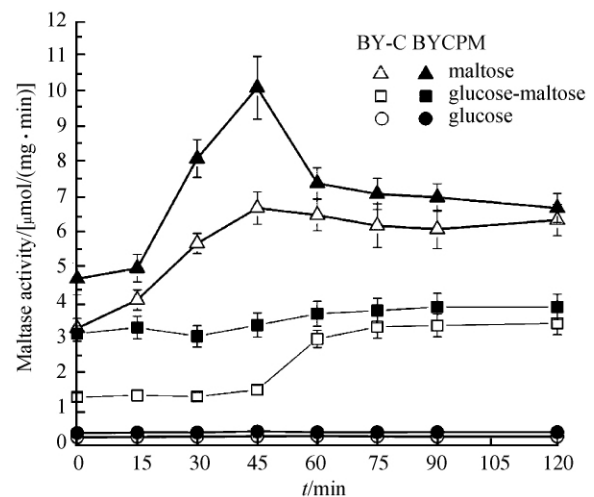


图6 三种 LSMLD 培养基(葡萄糖、麦芽糖、葡萄糖-麦芽糖)中, 两株菌的麦芽糖酶活力

Fig. 6 Maltase activity of the two strains in three LSMLD media (glucose; maltose; and glucose-maltose mixture medium). Error bars indicate as the means  $\pm$  S. E. from the experiments performed in triplicate, and the experiments were repeated three times.

**2.2.2 不加糖面团发酵力的测定结果:** 面团发酵力根据单位干重的菌体在单位时间内产生  $\text{CO}_2$  的体积数确定, 按照 1.7 方法, 利用发酵仪测定  $\text{CO}_2$  产气量。如图 7, 当以发酵时间为横坐标, 培养基中残留的麦芽糖浓度为左纵坐标、产气量为右纵坐标时, 对照菌 BY-C 在 80 min 时产气量达到最大, 面团发酵力为  $108.5 \pm 0.3 \text{ mLCO}_2/(\text{h}\cdot\text{g dw})$ 。而转化子 BYCPM 在发酵 60 min 时, 就可达到同等效力, 速度提高了 25%; 且 BYCPM 较对照菌 BY-C 的最大产气量升高 12.5%, 最终面团发酵力为  $151.4 \pm 0.2 \text{ mLCO}_2/(\text{h}\cdot\text{g w})$ , 比对照菌提高了 40%。

**2.2.3 模拟面团残糖的测定结果:** 按 1.8 方法, 通

过 HPTC 测定了混合糖 LSMLD 培养基中麦芽糖残糖浓度随时间的变化。通过图 7, 可以看出在前 30 min, 对照 BY-C 的麦芽糖残糖浓度变化缓慢; 相反转化子 BYCPM 的麦芽糖残糖浓度快速下降, 并在发酵的末期 (240 min) 比对照菌消耗的更为彻底; 两个菌株麦芽糖消耗能力与面团发酵力呈现明显正相关关系。据此我们判断, 过表达 *mal62* 确实可以增强菌株的麦芽糖利用能力和在不加糖面团中的发酵力, 另外过表达 *mal62* 还可以使菌株具有更高的抗葡萄糖阻遏能力。

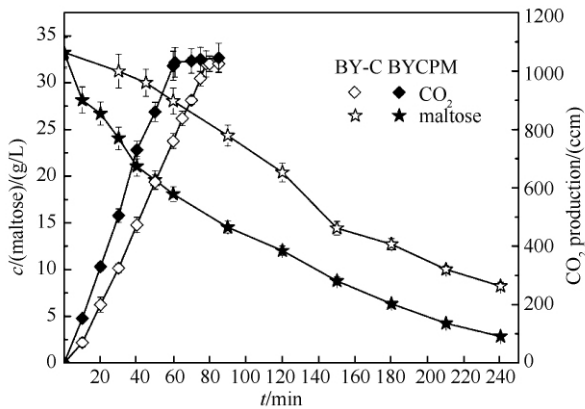


图 7 混合 LSMLD 培养基中两个菌株的麦芽糖残糖浓度及不加糖面团中两个菌株的产气量

Fig. 7 Concentration of maltose in glucose-maltose mixture LSMLD media and CO<sub>2</sub> production in plain dough of two strains. Error bars indicate as the means ± S. E. from the experiments performed in triplicate, and the experiments were repeated three times.

**2.2.4 抗葡萄糖阻遏能力测定:** 为了更加明显地观察过表达 *mal62* 的菌株 BYCPM 的抗阻遏能力, 我们在图 8 中进一步分析了图 6 与图 7 的数据。当以培养基中残留的葡萄糖浓度为横坐标、麦芽糖残糖浓度为左纵坐标、麦芽糖酶活力为右纵坐标绘图时, 可以发现在混合糖培养条件下, 当培养基中残留的葡萄糖浓度较高时 (5 g/L), BYCPM 菌株比 BY-C 菌株的起始麦芽糖酶活力高出 140%, 这说明在细胞外存在较高浓度葡萄糖的情况下, 过表达 *mal62* 可以让菌株在发酵起始阶段就具有更强的麦芽糖利用能力 (见图 8 中 ★ 与 ☆ 代表的麦芽糖消耗曲线), 即对葡萄糖阻遏敏感性更低。随着培养基中葡萄糖的消耗, 葡萄糖阻遏效应逐渐减少, BYCPM 菌株与 BY-C 菌株麦芽糖酶活力因此逐渐上升。这个过程中 BY-C 菌株的提升幅度更大, 但是由于其初始麦

芽糖酶活力过低, 因此直至培养基中的葡萄糖耗尽, BY-C 菌株的麦芽糖酶活力仍旧比 BYCPM 菌株低 12%。这说明初始麦芽糖酶活力对菌株利用麦芽糖的能力和产气具有重要的意义<sup>[5]</sup>, 也证明过表达 *mal62* 可以使菌株在整个发酵阶段都具有更高的抗葡萄糖阻遏能力。

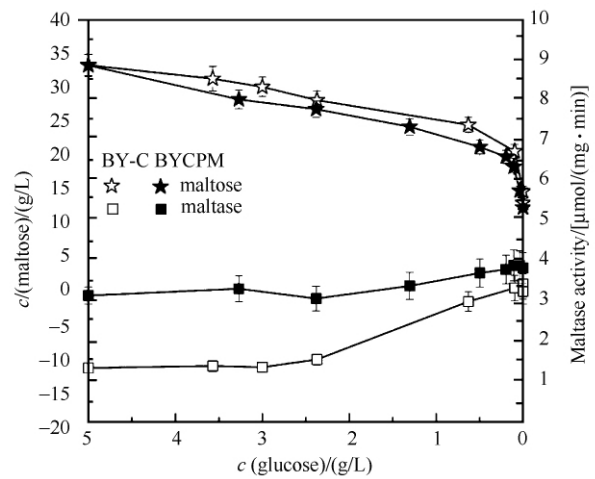


图 8 混合 LSMLD 培养基中两菌株麦芽糖残糖浓度及麦芽糖酶活力

Fig. 8 Maltase activity and the concentration of sugar of the two strains in glucose-maltose mixture LSMLD media. Error bars indicate as the means ± S. E. from the experiments performed in triplicate, and the experiments were repeated three times.

**2.2.5 比发酵力测定:** 与对照菌 BY-C 相比, 过表达 *mal62* 基因的 BYCPM 菌株的比发酵力提高了 5.6% (图 9), 并且在假设检验中  $p = 0.03 < 0.05$ , 实验存在显著性差异。因此确定 BYCPM 菌株可以在更短的时间内, 消耗更少的碳源获得更大的 CO<sub>2</sub> 产气量。

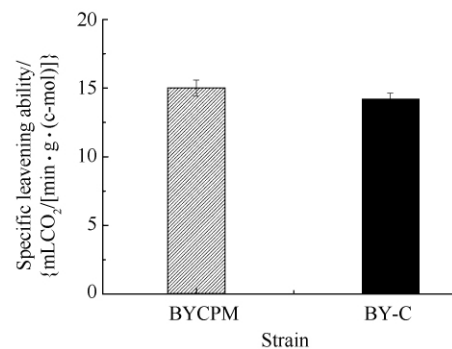


图 9 两个菌株的比发酵力

Fig. 9 Specific leavening ability of two strains.

### 3 讨论

麦芽糖发酵是面包制作和酿造过程中的一个重要阶段,已经在工业以及理论方面被广泛研究<sup>[19]</sup>。在酵母细胞内,由于外部的麦芽糖是借由麦芽糖通透酶转运至胞内,随后被麦芽糖酶水解为葡萄糖的,因此,参与此过程的麦芽糖酶与麦芽糖通透酶的活力与酵母在不加糖面团中的发酵能力存在明显的相关性<sup>[5, 20]</sup>。

在 *MAL* 基因表达中,普遍认为葡萄糖通过转录和转录后调控等多重机制,针对性地降低麦芽糖通透酶的表达水平,使得麦芽糖通透酶成为葡萄糖阻遏和决定面包酵母麦芽糖发酵能力的关键<sup>[19]</sup>。但是在我们的实验结果中,在麦芽糖通透酶活性没有增加的情况下,单独过表达麦芽糖酶基因 *mal62* 在三种不同碳源的 LSMLD 培养基中均可以有效提高菌种的麦芽糖酶活力(图 6);并且在不加糖面团和混合碳源 LSMLD 培养基中,单过表达 *mal62* 也可以有效提高酵母的产气能力和麦芽糖利用能力(图 7)。这说明麦芽糖酶的活性并没有受到麦芽糖通透酶活性的控制。近些年实验也证明,编码麦芽糖转运子的基因除了 *malx1* 以外还包括另外两个: *AGT1* 与 *MTT1*<sup>[21]</sup>。因此麦芽糖通透酶并不是唯一的麦芽糖转运子,麦芽糖由胞外至胞内的转运可以通过多个途径实现。多转运子的理论解释了 2008 年 Jiang 的观点, Jiang 通过比对多个面包酵母菌株的发酵参数,提出麦芽糖代谢系统中关键酶不是麦芽糖通透酶而是麦芽糖酶的假设<sup>[9]</sup>,我们的实验结果进一步在分子水平上验证了 Jiang 的推论,即单过表达 *mal62* 就可以在三种碳源 LSMLD 培养基及不加糖面团条件下有效提升麦芽糖酶活力以及面团发酵力。

在面团发酵过程中,大部分酵母对麦芽糖适应性差,葡萄糖的存在抑制了麦芽糖酶的表达,只有当葡萄糖和蔗糖消耗殆尽后,麦芽糖才作为主要发酵糖被利用,这种现象被称为葡萄糖阻遏。葡萄糖对麦芽糖代谢的多种调控方式属下游调节,主要发生在转录水平。葡萄糖抑制的中心物质是 *mig1* 转录抑制复合物、Snf1 蛋白激酶复合物和蛋白磷酸脂酶 I。这些转录阻遏物通过结合的方式抑制通透酶与麦芽糖酶的基因转录,使麦芽糖通透酶发生分解代

谢失活<sup>[22]</sup>。然而,由图 8 所示,单过表达 *mal62* 不仅能够提高菌株发酵力,还可以一定程度上减轻葡萄糖对麦芽糖代谢的控制,这说明过表达 *mal62* 可以降低酵母菌株对葡萄糖阻遏的敏感性。这是由于高表达的 *mal62* 基因可以通过调控包括葡萄糖阻遏、相关 mRNA 降解及调控基因代谢失活在内的多个葡萄糖控制机制<sup>[6]</sup>,多途径地全面提升麦芽糖利用能力。因此,单过表达 *mal62* 是提高麦芽糖酶活力、发酵力以及降低酵母菌株对葡萄糖阻遏敏感性的有效手段。另外,过表达 *mal62* 的 BYCPM 菌株还可以在消耗更少碳源的基础上产生更多的 CO<sub>2</sub>。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,同时为将来构建快速发酵面包酵母奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Oda Y, Ouchi K. Principal-Component Analysis of the Characteristics Desirable in Baker's Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55 (6) :1495-1499.
- [2] 李红民, 黄仁泉. 激光诱变选育面包酵母菌的研究. 光子学报 (*Acta Photonica Sinica*), 2001, 30 (11) : 1381-1384.
- [3] 贝氏. 面包酵母的技术开发现状. 食品工业 (*The Food Industry*), 1991, (6) :35-38.
- [4] Salema-Oom M, de Sousa HR, Assuncao M, Goncalves P, Spencer-Martins I. Derepression of a baker's yeast strain for maltose utilization is associated with severe deregulation of *HXT* gene expression. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110 (1) :364-374.
- [5] Higgins VJ, Braidwood M, Bell P, Bissinger P, Dawes IW, Attfield PV. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (2) :680-685.
- [6] Lucero P, Herweijer M, Lagunas R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Letters*, 1993, 333 (1-2) :165-168.
- [7] Charron MJ, Dubin RA, Michels CA. Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1986, 6 (11) :3891-3899.
- [8] Han EK, Cotty F, Sottas C, Jiang H, Michels CA.

- Characterization of *AGT1* encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology*, 1995, 17 (6) :1093-1107.
- [9] Jiang TX, Xiao DG, Gao Q. Characterisation of maltose metabolism in lean dough by lagging and non-lagging baker's yeast strains. *Annals of Microbiology*, 2008, 58 (4) :655-660.
- [10] Dahabieh MS, Husnik JI, van Vuuren Hennie JJ. Functional Expression of the *DUR3* Gene in a Wine Yeast Strain to Minimize Ethyl Carbamate in Chardonnay Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2009, 60 (4) :537-541.
- [11] Husnik JI, Delaquis PJ, Cliff MA, van Vuuren Hennie JJ. Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2007, 58 (1) :42-52.
- [12] Husnik JI, Volschenk H, Bauer J, Colavizza D, Luo Z, van Vuuren Hennie JJ. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering*, 2006, 8 (4) :315-323.
- [13] Saayman M, van Zyl WH, Viljoen-Bloom M. Cloning, characterisation, and heterologous expression of the *Candida utilis* malic enzyme gene. *Current Genetics*, 2006, 49 (4) :248-258.
- [14] Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS. Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (2) :744-753.
- [15] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics*. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [16] Houghton-Larsen J, Brandt A. Fermentation of High Concentrations of Maltose by *Saccharomyces cerevisiae* is Limited by the COMPASS Methylation Complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (11) :7176-7182.
- [17] Friedenauer S, Berlet HH. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Analytical Biochemistry*, 1989, 178 (2) :263-268.
- [18] Ferrer X, Coquet M, Saintarailles J, Ellie E, Deleplanque B, Desnuelle C, Levade T, Laguëny A, Julien J. Myopathie de l'adulte par déficit en maltase acide. Essai de traitement par régime hyperprotidique. *La Revue de Médecine Interne*, 1992, 13 (2) :149-152.
- [19] Goldenthal MJ, Vanoni M, Buchferer B, Marmur J. Regulation of *MAL* gene expression in yeast: gene dosage effects. *Molecular and General Genetics*, 1987, 209 (3) :508-517.
- [20] Oda Y, Ouchi K. Role of the yeast maltose fermentation genes in CO<sub>2</sub> production rate from sponge dough. *Food Microbiology*, 1990, 7 (1) :43-47.
- [21] Duval EH, Alves SL, Jr, Dunn B, Sherlock G, Stambuk BU. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109 (1) :248-259.
- [22] Stambuk BU, Batista AS, De Araujo PS. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89 (2) :212-214.



# Effects of *mal62*-overexpression on leavening ability of baker's yeast

Xi Sun, Cuiying Zhang, Jian Dong, Guanglu Wang, Mingyue Wu, Dongguang Xiao\*

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

**Abstract:** [Objective] To increase the leavening ability in the lean dough, the maltose utilization ability of baker's yeast was enhanced. [Methods] A 1.7kb *PGKI* promoter and terminator were ligated and inserted into vector Yep-C to give the expression plasmid named Yep-CP. Then a 1.7kb DNA fragment containing the open reading frame and terminator of *mal62* gene was amplified from *Saccharomyces cerevisiae* BY-14 by PCR, and inserted into Yep-CP to generate recombinant plasmid Yep-CPM. To express *mal62* gene properly in *S. cerevisiae*, the recombinant expression plasmids Yep-CPM with copper resistance gene as the selection marker for yeast transformation were introduced into *S. cerevisiae* BY-14. The resulting yeast transformant BYCPM was screened on YEPD with 4 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  and identified by colony PCR. Target protein was detected by qRT-PCR, and the enzyme activities and the leavening ability of the recombinant strain BYCPM were determined to confirm whether functional expression was achieved. [Results] The maximum maltase activity of recombinant strain BYCPM was 15% – 52% higher than that of control strain BY-C. Leavening ability and specific leavening ability of recombinant strain BYCPM were 40% and 5.6% higher than that of the control strain BY-C, respectively. [Conclusion] The *mal62*-overexpression was an effective way of increasing the maltase activity and the ability of glucose depression in the baker's yeast. Moreover, recombinant strain BYCPM could further enhance the leavening ability and produce more gas while consume lesser carbon source than the control strain.

**Keywords:** maltase, baker's yeast, leavening ability, maltose metabolism

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31000043) and by the Major Project of Research Program on Applied Fundamentals and Advanced Technologies of Tianjin (10JCZDJ16700)

\* Corresponding author. Tel: +86-22-60601067; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

Received: 28 March 2011/Revised: 13 May 2012

## 系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour – Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作 [参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应表明"树"上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为"Time New Roman",字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"\* . Tif",分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word",画出树,输入文字。