

## 酵母海藻糖酶缺失突变株的构建及其耐性

吕焯<sup>1</sup>, 肖冬光<sup>1\*</sup>, 和东芹<sup>1,2</sup>, 郭学武<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>天津科技大学天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

(<sup>2</sup>邯郸职业技术学院, 邯郸 056001)

**摘要:**【目的】构建酵母海藻糖酶缺失突变株, 并进行耐性分析, 进一步研究海藻糖与酵母耐性之间的关系, 为商业生产打下一定的基础。【方法】利用同源重组的方法, 敲除了编码酸性海藻糖酶的 *ATH1* 基因和中性海藻糖酶的 *NTH1* 基因, 构建了酸性海藻糖酶缺失突变株 ( $\Delta ath1$ )、中性海藻糖酶缺失突变株 ( $\Delta nth1$ ) 和双缺失突变株 ( $\Delta ath1\Delta nth1$ ), 并进行了耐性分析。【结果】结合 PCR 和 Southern blot 的结果, 验证了突变株构建的正确。所有突变株的海藻糖积累量和细胞密度均高于亲本, 冷冻、高温、高糖和酒精耐性提高了。【结论】说明海藻糖含量与酵母耐性有一定的相关性。突变株耐性的改善, 表明它们在酿造和烘焙产业中具有潜在的商业价值。

**关键词:** 海藻糖; 中性海藻糖酶缺失突变株; 酸性海藻糖酶缺失突变株; 双缺失突变株; 酵母耐性  
中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 10-1301-07

海藻糖是一种非还原性的二糖, 在细菌、真菌和植物中具有很重要的生理作用。在 Crowe 第一次提出了海藻糖在真菌中的特殊保护作用后, 许多研究都表明海藻糖不仅是 *Saccharomyces cerevisiae* 中的一种重要贮藏性碳源, 而且可以作为酵母细胞的保护性物质。在一些极端环境 (冷冻、干燥、热处理等) 下, 生物体可以通过调节海藻糖的合成来抵御外界的不良伤害, 所以海藻糖含量被认为是酵母耐性的重要鉴定指标<sup>[1-3]</sup>。但当环境条件恢复的情况下, 胞内海藻糖又会迅速分解。所以如何降低胞内海藻糖的消耗速率是提高酵母耐性的有效途径。海藻糖的分解由两类海藻糖酶 (*Trehalase*) 调控, 中性海藻糖酶 (*NTH*, 由 *nth1* 和 *nth2* 基因编码) 和酸性海藻糖酶 (*ATH*, 由 *ath1* 基因编码)<sup>[4,5]</sup>。本研究利用同源重组的方法, 构建了酸性海藻糖酶、中性海藻糖酶缺失和双缺失突变株, 以此阻碍海藻糖的分解, 积累海藻糖, 从而提高酵母产品的耐性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌体的培养:** pUG6 质粒由德国 J.H. Hegemann 教授惠赠; 大肠杆菌 (*E. coli*, DH5 $\alpha$ ) 和酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* BY-6) 单倍体由本实验室保存。主要培养基: LB、YEPD、YNB 培养基<sup>[6]</sup>。面团的配方见表 1。

表 1 面团配方  
Table 1 Formula of dough

Dough	Flour/g	Sucrose/g	NaCl/g	Fresh yeast/g	Water/mL
Common dough	50	2	1	2	20
Sweat dough	50	15	1	2	20

### 1.2 海藻糖酶缺失突变株的构建

根据面包酵母酸性海藻糖酶 (*ATH1*) 和中性海藻糖酶 (*NTH1*) 的基因上下游序列设计引物 P1、P2 和 P3、P4。P1: 5'-GATCGCTTTGGTTCAATGCG-3', P2: 5'-C

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20050057001)

\*通讯作者。Tel: +86-22-60601397; Fax: +86-22-60602298; E-mail: xiao99@tust.edu.cn

作者简介: 吕焯(1983-), 女, 天津人, 在读硕士, 从事生物发酵和分子生物学研究。E-mail: jessica0312@163.com

收稿日期: 2008-03-28; 修回日期: 2008-06-06

ATCATACACTCCTTGTACTGCC-3', P3: 5'-CGTCAGC TTAGCGCTAGGC-3', P4: 5'-CAATGCCTACCATCC GATCGC-3'。

将 PCR 扩增出来的 *ATH1* 基因, 用 *EcoR* I -*Nde* I 酶切, 与 pUC19 载体相连, 构成 pUC-A 质粒。用 *Hind* III -*Sac* I 从 pUG6 中酶切 *loxP-Kan<sup>r</sup>-loxP* 片段, 连入 pUC-A 质粒, 构成 pUC-AK 质粒, 然后用 *Sap* I 将 pUC-AK 质粒线性化。同样将 PCR 扩增出来的 *NTH1* 基因, 用 *EcoR* I -*Nde* I 酶切, 与 pUC19 载体相连, 构成 pUC-N 质粒。用 *Hind* III -*Sac* I 从 pUG6 中酶切 *loxP-Kan<sup>r</sup>-loxP* 片段, 连入 pUC-N 质粒, 构成 pUC-NK 质粒, 然后用 *Pci* II 将 pUC-NK 质粒线性化。Kan<sup>r</sup> 的敲除参照文献<sup>[7]</sup>。采用醋酸锂转化法<sup>[6]</sup>, 将经过线性化的重组质粒 pUC-AK 和 pUC-NK 转化酵母感受态细胞, 涂布含有 200 mg/L G418 的 YEPD 平板, 30℃ 培养 4~5 d。酵母细胞 DNA 分离是由 Hereford 提出的。Southern 杂交是根据制造商的要求使用尼龙膜、ECL 核酸标记和探测系统。按 Boehringer Mannheim 公司的 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书操作。

### 1.3 酵母耐性试验

从斜面取一环菌接于 30 mL YEPD 培养基中, 30℃ 静止培养 24 h, 再以 10% 的接种量转接于 50 mL YEPD 培养基中, 30℃、150 r/min 振荡培养到对数中期。

将培养到对数中期的酵母离心, 洗涤 2 次, 得酵母泥。按表 1 的配方制作面团, 面团进行预发酵 30 min, 在放入量筒中发酵 90 min, 测定前后体积差即为普通面团发酵力; 同时将面团进行预发酵 30 min, 再放入 -20℃ 冷冻 3 周, 每周测一次发酵力, 面团取出后, 先在 30℃ 解冻, 而后放入量筒中发酵 90 min, 测定前后体积差即为冷冻面团发酵力。

取培养到对数中期的菌液 10 mL, 用无菌水离心洗涤 3 次后, 用 10 mL 无菌水重悬菌体, 放入 -20℃ 冰箱中冷冻保存 3 周后, 30℃ 解冻后, 平板法计数。冷冻后的活菌数与冷冻前的活菌数相比的比值即为冷冻存活率。

将培养到对数中期的酵母, 离心, 用冷水洗涤后悬浮在 50 mL YEPD 培养基中, 当细胞浓度达到  $OD_{600}=0.5$  时, 在 52℃ 热处理 30 min, 测定细胞存活率。

取培养到对数中期的菌液 5 mL 转接到含葡萄糖 50% 的 50 mL 高糖培养基中处理 2 h, 用美兰染色法测定细胞存活率。

将培养到对数中期的酵母离心, 洗涤 2 次, 得酵母泥。按照表 1 制作面团, 利用量筒法测定普通面团和高糖面团的发酵力。

取培养到对数中期菌液 1 mL, 稀释到  $10^3$  个/mL, 利用平板计数法测定计数细胞数。同时, 取 5 mL 菌液, 离心洗涤, 转移至含酒精 18% 的 50 mL YNB 培养基中, 使菌数达到  $10^8$  个/mL, 30℃ 150 r/min, 每隔 1 h 取样, 涂布 YEPD 平板计数, 测定存活率。

### 1.4 海藻糖含量测定

硫酸—蒽酮法<sup>[8]</sup>

## 2 结果和讨论

### 2.1 质粒 pUC-AK 和 pUC-NK 的构建

以酵母总 DNA 为模板, 通过 PCR 将 *ATH1* 和 *NTH1* 基因扩增出来, 琼脂糖电泳可看到 3500 bp 和 2600 bp 的目的条带。纯化后将 *ATH1* 基因和 *NTH1* 基因分别连接到 pUC19 载体上, 构成 pUC-A 和 pUC-N 质粒。再将 *loxP-Kan<sup>r</sup>-loxP* 分别连接到质粒 pUC-A 和 pUC-N 上, 构成质粒 pUC-AK 和 pUC-NK (图 1)。

### 2.2 构建 $\Delta ath1$ 突变株、 $\Delta nth1$ 突变株和 $\Delta ath1\Delta nth1$ 双缺失突变株

将质粒 pUC-AK 和 pUC-NK 转入酵母中, 通过质粒上的 *ATH1* 和 *NTH1* 分别与酵母中的染色体上的同源序列发生重组, 从而整合到酵母染色体上随染色体一起复制。重组后一方面将 Kan<sup>r</sup> 基因引入酵母的染色体, 使重组菌株产生 G418 抗性; 另一方面, 质粒的插入打断了酵母染色体上的 *ATH1* 和 *NTH1* 基因, 产生由两个不完整的 *ATH1* 和 *NTH1* 基因构成的串联重复序列, 从而实现 *ATH1* 和 *NTH1* 基因的破坏 (图 2)。

将质粒 pSH-CUP 转入  $\Delta ath1$  突变株, 敲掉 kan<sup>r</sup>, 获得了  $\Delta ath1$  突变株 (kan<sup>-</sup>)<sup>[7]</sup>。再将质粒 pUC-NK 转入  $\Delta ath1$  突变株 (kan<sup>-</sup>), 得到  $\Delta ath1\Delta nth1$  双缺失突变株。

### 2.3 Southern 杂交

以 *ATH1* 基因中经酶切的 2.7 kb 的片段为探针, 与 *Sap* I 酶解的酵母总 DNA 杂交, 出现了 3.8 kb 的杂交条带, 为酵母染色体上包含完整 *ATH1* 基因的 *Sap* I 片段; 与  $\Delta ath1$  突变株 *Sap* I 酶解的总 DNA 杂交出现 3.5 kb 和 5.0 kb 的 2 条杂交条带, 为酵母染色体上 *ATH1* 基因上游和下游的 *Sap* I 位点与质粒 pUC-AK 上 *Sap* I 位点间 DNA 片段的长度。同样, 以 *NTH1* 基因中经酶切的 1.2 kb 的片段为探针, 与经 *Pci* I 酶解的酵母总 DNA 杂交, 出现了 4.02 kb 的杂交条带, 为酵母染色体上包含完整 *NTH1* 基因的 *Pci* I 片段; 与  $\Delta nth1$  突变株 *Pci* I 酶解的总 DNA 杂交出现 2.0 kb 和 4.35 kb 的 2 条杂交条带, 为酵母染色体上 *NTH1* 基因上游和下游的 *Pci* I 位点与质粒 pUC-NK 上 *Pci* I 位点间 DNA 片段的长度 (图 3)。

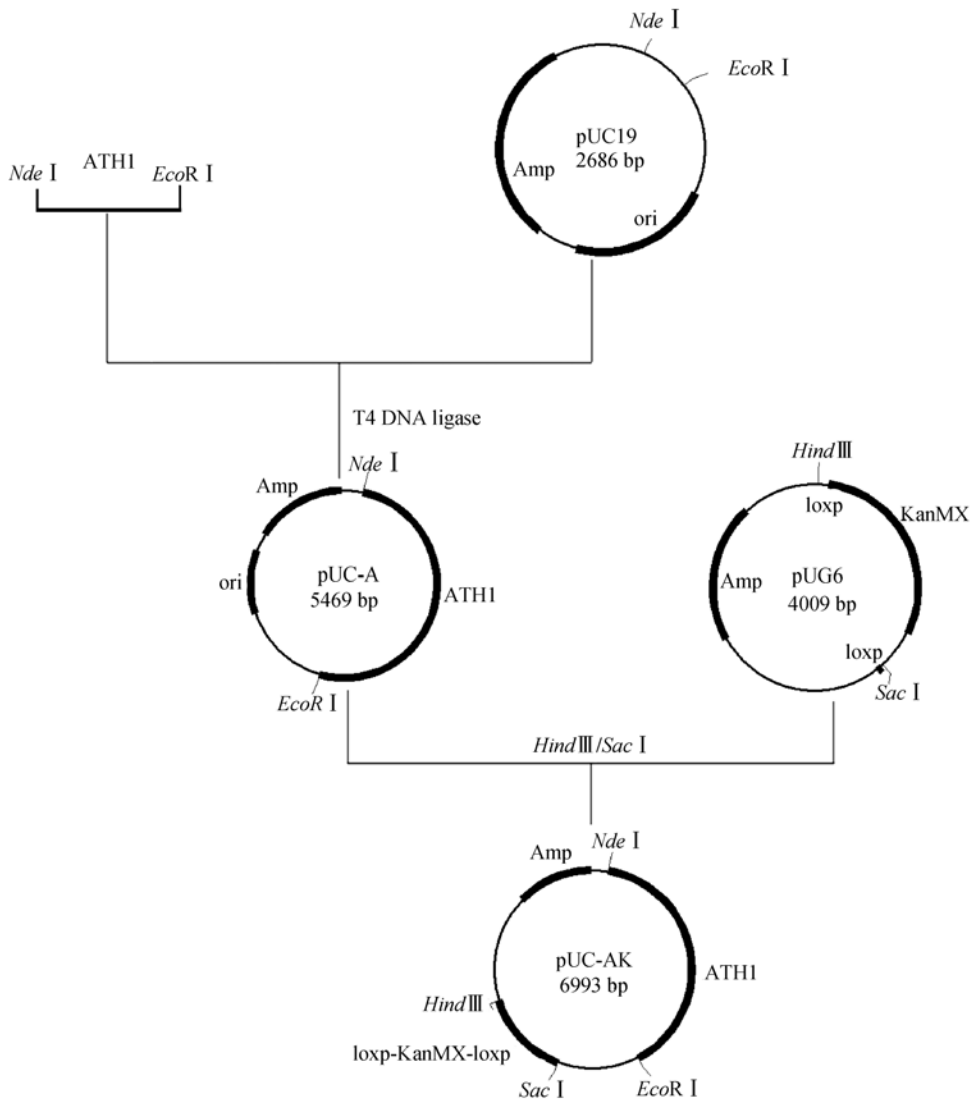


图 1 重组质粒 pUC-AK 的构建

Fig.1 Construction of the recombinant plasmid pUC-AK Construction of the plasmid pUC-NK the same as pUC-AK.

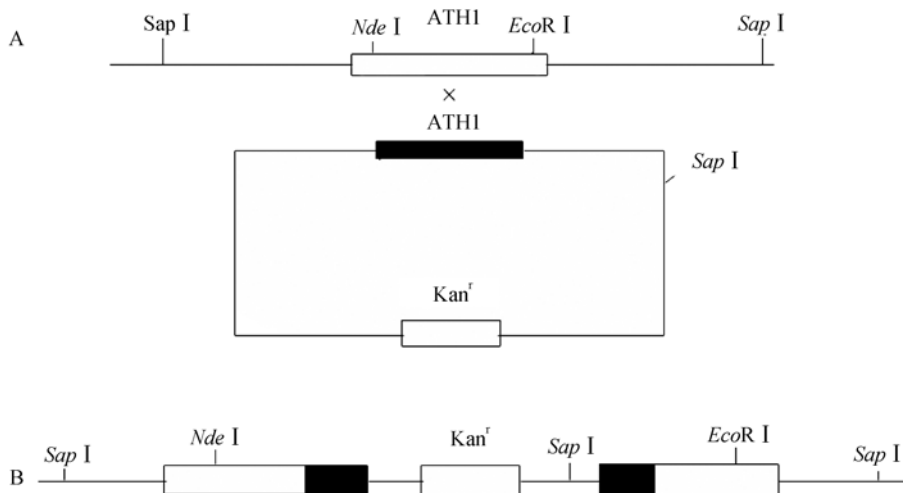


图 2 酵母 ATH1 同源重组的过程

Fig.2 Homologous Recombination of *ATH1* gene. A: Homologous recombination between *ATH1* gene in plasmid pUC-AK and homologous gene in *Saccharomyces cerevisiae* BY-6; B: Sequence analysis of recombinator.

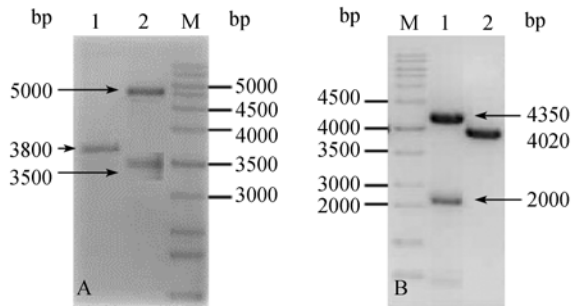


图3 Southern blot 分析  $\Delta ath1$  突变株和  $\Delta nth1$  突变株  
Fig.3 Analysis  $\Delta ath1$  mutant (A) and  $\Delta nth1$  mutant (B) by Southern blot. A:1 *ATH1* gene/*Sap* I; 2  $\Delta ath1$  mutant; B: 1 $\Delta nth1$  mutant; 2 *NTH1* gene/*Pci* I.

对于  $\Delta ath1\Delta nth1$  双缺失突变株, 分别以 *ATH1* 和 *NTH1* 基因中 2.7 kb 和 1.2 kb 的片段为探针, 采用 Southern blot 方法进行验证(图 4)。

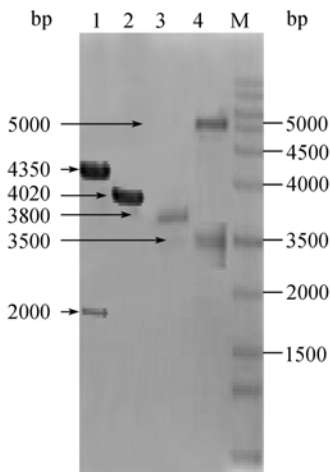


图4 Southern blot 分析  $\Delta ath1\Delta nth1$  突变株  
Fig.4 Analysis  $\Delta ath1\Delta nth1$  double mutant by Southern blot. 1-2. hybridized with a 2.7 kb *EcoRI-Nde* I fragment containing the *ATH1* ORF; 3-4. hybridized with a 1.2 kb *EcoRI-Nde* I fragment containing the *NTH1* ORF.

## 2.4 冷冻处理

冷冻 3 周后, 亲本的存活率为 85.32%, 而  $\Delta nth1$ 、 $\Delta ath1\Delta nth1$  和  $\Delta ath1$  突变株的存活率仍可维持在相对较高的水平, 分别为 95.21%、93.02% 和 88.42%。与此同时, 亲本的海藻糖含量下降到 10.01%, 而  $\Delta nth1$ 、 $\Delta ath1\Delta nth1$  和  $\Delta ath1$  的胞内海藻糖含量分别为 18.54%、16.6% 和 13.98% (图 5)。

在冷冻面团制作过程中不可避免的预发酵导致胞内海藻糖迅速降解, 从而失去对酵母细胞的保护。所以维持一定的胞内海藻糖水平是耐冷冻的物质基础。面包酵母胞内海藻糖的迅速降解与海藻糖水解酶 (*ATH1*、*NTH1*) 有关。海藻糖酶的突变株在预发酵中海藻糖含量下降很缓慢, 仍可维持较高的海藻糖水平, 使得酵母具

有很好的冷冻耐性<sup>[9]</sup>。

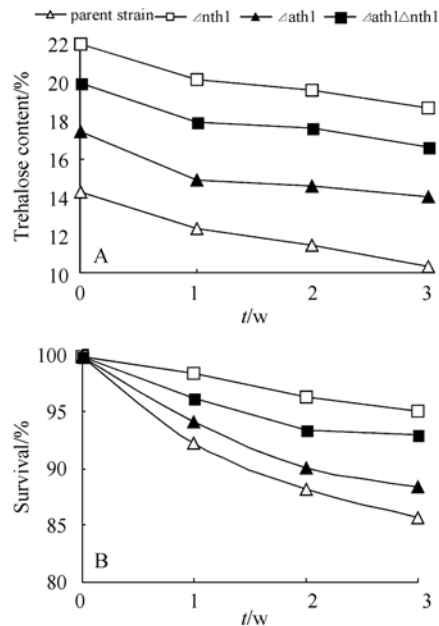


图5 冷冻后海藻糖含量(A)和细胞存活率(B)  
Fig.5 Trehalose content (A) and survival (B) after freezing.

2.4.1 冷冻面团发酵力: 按表 1 制作面团, 利用量筒法测定普通面团和冷冻面团的发酵力。亲本在冷冻 3 周后相对发酵力下降为原来的一半, 而  $\Delta nth1$ 、 $\Delta ath1$  和  $\Delta ath1\Delta nth1$  突变株仍维持在相当高的水平, 与亲本比较其冷冻酵母的发酵力提高了 18.12%、13.36% 和 10.71% (表 2), 说明海藻糖酶缺失突变株的耐冷冻能力大大提高了。

表 2 冷冻面团相对发酵力

Table 2 Relatively leavening ability in frozen dough

Leavening	Parent strain	$\Delta nth1$	$\Delta ath1$	$\Delta ath1\Delta nth1$
Common dough/ (mL/1.5h)	46	60	54	56
Frozen dough/ (mL/1.5h)	30	50	41	44
Relatively leavening/%	65.21	83.33	75.92	78.57

## 2.5 高温耐性

对亲本和突变株经 52℃ 高温处理后的存活率进行了比较 (图 6)。在热激 30min 后, 亲本的存活率为 14.53%, 而  $\Delta nth1$ 、 $\Delta ath1\Delta nth1$  和  $\Delta ath1$  的存活率可达 82.67%、75.75% 和 73.23%。海藻糖是酵母体内抵御高温的重要抗逆因子, 它可以增加热环境下蛋白质的稳定性, 抑制热应激所致的蛋白凝集。热激会增加海藻糖-6-磷酸合成酶 (*tps1*) 的表达量, 增加海藻糖的含量。所以敲除海藻糖酶, 可以阻止海藻糖的分解, 使得海藻糖大量积累, 从而提高其高温耐性<sup>[10]</sup>。

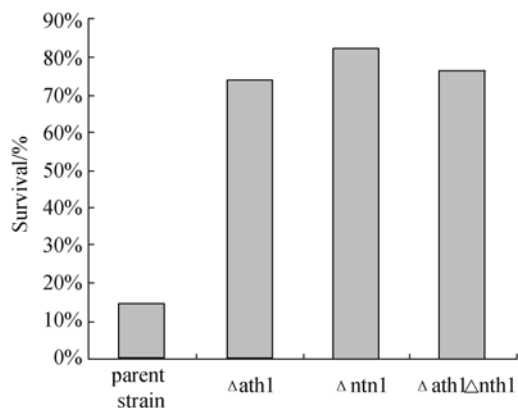


图 6 52°C 热激后细胞存活率  
Fig. 6 Survival after heat-shock (52°C).

2.6 高糖处理

2.6.1 高糖存活率:对突变株和亲本的胞内海藻糖含量和高糖存活率之间的关系进行了比较(图 7)。高糖(葡萄糖含量 50%)处理 2 h 后,亲本的存活率迅速下降为 7.43%,而 Δnth1、Δath1Δnth1 和 Δath1 突变株的存活率仍可维持在相对较高的水平,分别为 92.91%、85.43%和 83.02%。与此同时,亲本的海藻糖含量下降到 2%,而 Δnth1、Δath1Δnth1 和 Δath1 的胞内海藻糖含量分别为 17.89%、15.34%和 14.66%。对于酵母的耐高糖机制,研究认为酵母存在 Crabtree 效应,即酵母处于高浓度葡萄糖液中时,其呼吸酶的合成会受到葡萄糖降解产物的抑制,发酵力下降;另外,高糖所带来的高渗透压对酵母造成严重的伤害。在耐高糖菌株中,会合成大量的海藻糖,在酵母脱水的过程中保护细胞膜的完整性,防止发生质壁分离<sup>[11]</sup>。

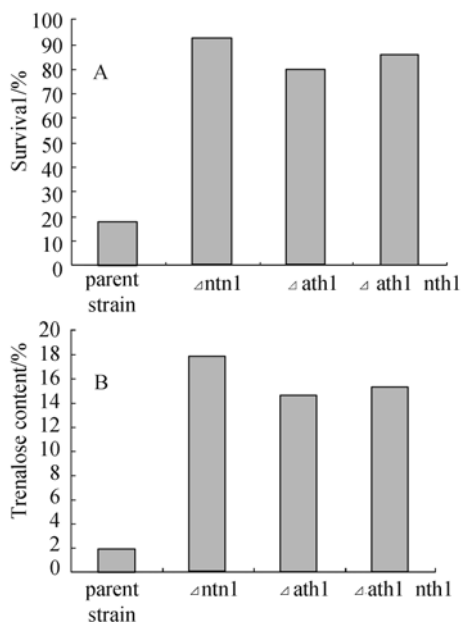


图 7 高糖处理后细胞存活率(A)与海藻糖含量(B)  
Fig. 7 Survival (A) and trehalose content (B) after high-sweet shock.

2.6.2 高糖面团发酵力的比较:按表 1 制作普通面团和高糖面团,亲本的高糖面团发酵力大幅下降为原来的一半,Δnth1、Δath1Δnth1 和 Δath1 高糖面团发酵力比亲本提高了 18.78%、16.03%和 11.86%(表 3),说明突变株的高糖耐性提高了。

表 3 高糖面团相对发酵力  
Table 3 Relatively leavening ability in sweet dough

Leavening	Parent strain	Δath1	Δnth1	Δath1Δnth1
Common dough/(mL/1.5h)	46	48	50	48
High-sweet dough/(mL/1.5h)	30	37	42	39
Relatively leavening/%	65.22	77.08	84	81.25

2.7 酒精耐性

比较了海藻糖酶缺失菌株和亲本的存活率(图 8)。酒精处理 2 h 后,亲本存活率大幅下降,只有 52.84%,而 Δnth1、Δath1 nth1 和 Δath1 存活率为 94.21%、90.53%和 88.32%。酵母菌细胞内含有高浓度海藻糖时,可以抑制由乙醇引起的细胞内含物的泄漏和提高酵母细胞在乙醇培养基中的存活率。海藻糖还可以与膜磷脂极性磷酸基团结合,从而稳定了细胞膜<sup>[12]</sup>。

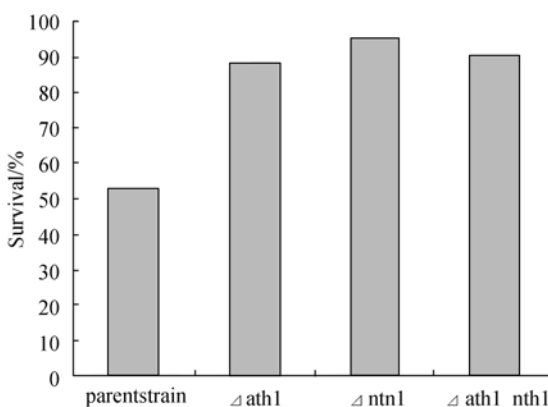


图 8 酒精冲击后细胞存活率  
Fig. 8 Survival after ethanol shock.

3 讨论

在烘焙产业中,要求酵母具有很好的耐性和品质,比如风味、产气量。在酿酒工业中,尽管酵母对酒精的耐受力很强,但超过一定的限度时,乙醇就会对酵母产生毒害作用。它会改变酵母细胞的结构和通透性,并导致不良的发酵性能。以往人们都是通过传统的杂交育种获得耐性酵母,这种酵母产品品质差,

无法推广生产<sup>[13, 14]</sup>。20 世纪 90 年代科研人员进行了大量的研究, 普遍认为海藻糖含量与酵母的耐性之间有密切的关系, 但对于海藻糖是否在酵母的各种耐性方面都起作用以及在各种胁迫条件下海藻糖的代谢过程, 还不太清楚。本研究采用基因工程的方法, 将 *loxP-kanMX-loxP* 片段转入酵母, 以 G418 抗性作为筛选标记, 利用同源重组的方法敲除了酵母的酸性海藻糖酶 (*ATH1*) 基因和中性海藻糖酶 (*NTH1*) 基因, 获得了 *Anth1*、*Δath1* 和 *Δath1Δanth1* 突变株。结果表明 *Anth1*、*Δath1* 和 *Δath1Δanth1* 突变株可以维持很高的海藻糖含量, 耐冷冻、耐高糖和耐高温能力优于亲本, 说明海藻糖含量与酵母耐性之间有一定的相关性。其中 *Anth1* 突变株的海藻糖含量最高, 酵母的耐性最好。但 Shima<sup>[15]</sup> 等报道, 与野生型菌株相比, *Anth1* 突变株胞内海藻糖含量并无明显提高。Kim<sup>[16]</sup> 等报道, *Δath1* 突变株的耐性要优于 *Anth1* 突变株, 与我们的研究相反, 可能的原因是海藻糖的积累能力取决于亲本, 而不同的菌株基因背景不同。

我们的研究结果还表明, *Δath1Δanth1* 突变株的海藻糖含量比 *Anth1* 突变株还低, 说明 *NTH1* 和 *ATH1* 之间并没有协同增强效应, 这与 Shima 等<sup>[15]</sup> 的研究结果相同。

综上, 我们认为海藻糖酶缺失突变株在冷冻条件下海藻糖积累量和酵母细胞的存活率呈正相关, 在实际应用中, 高的海藻糖水平意味着冷冻面团的准备过程可以减少酵母用量和醒发时间, 降低成本; 高海藻糖含量可以保护细胞膜, 防止线粒体 DNA 丢失和胞内物质的外渗, 解除乙醇对酵母细胞的抑制效应; 海藻糖是重要的抗高渗保护剂, 还可以保护细胞抵御高温胁迫, 使得海藻糖在医用生物制品的干燥保存、食品保鲜, 研究用生物制品的保存上将会有广泛的应用前景。本研究对海藻糖代谢机制及酵母耐性机理的研究, 具有重要的意义, 为构建商业酵母生产菌种打下了一定的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Dijck PV, D. Colavizza, P. Smet, et al. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(1): 109–115.
- [2] Odumeru JA, D'Amore T, Russell I, et al. Alterations in fatty-acid composition and trehalose concentration of *Saccharomyces cerevisiae* strains in response to heat and ethanol shock. *Journal of Industrial Microbiology*, 1993, 11: 113–119.
- [3] Nwaka S, Mechler B, Holzer H. Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett*, 1996, 386: 235–238.
- [4] Fillinger S, Chaverocche MK, Van Dijck, et al. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-Sgm*, 2001, 147: 1851–1862.
- [5] Meinrad Kopp, Hanne Muller, Helmut Holzer. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of biological chemistry*, 1993, 268(7): 4766–4774.
- [6] Adatns A, Gottschling DE, Kaiser CA, et al. 酵母遗传学方法实验指南, 刘子铎, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 和东芹, 肖冬光, 吕焯. pSH-CUP 重组质粒的构建及面包酵母酸性海藻糖酶基因的敲除. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(2): 147–151.
- [8] Jules M, Guillou V, Francois J, et al. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2771–2778.
- [9] Patrick VD, Marie-Francoise G, K Lemaire, et al. Characterization of a new set of mutants deficient in fermentation induced loss of stress resistance for use in frozen dough applications. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55: 187–192.
- [10] Stefaan Wear. Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Society*, 1999, 343: 621–626.
- [11] Suresh Chunder, Sbarma. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 152: 11–15.
- [12] Mansure JC, Panek AD, Crowe LM, et al. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1191(2): 309–316.
- [13] Arguelles J. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol*, 2000, 174: 217–224.
- [14] Richards AB, Krakowka S, Dexter LB. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40: 871–898.
- [15] Shima J, Y Suzuki, R Nakajima, et al. Breeding of freeze-tolerant baker's yeast by the regulation of trehalose metabolism. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*, 2000, 34(4): 257–260.
- [16] Kim J, Alizadeh T, Harding A, et al. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 1563–1569.

## Construction and stress tolerance of trehalase mutant in *Saccharomyces cerevisiae*

Ye Lv<sup>1</sup>, Dongguang Xiao<sup>1\*</sup>, Dongqin He<sup>1, 2</sup>, Xuewu Guo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(<sup>2</sup> Handan Vocational Technology College, Handan 056001, China)

**Abstract:** [Objective] Accumulation of trehalose is critical in improving the stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Two enzymes are capable of hydrolyzing trehalose: a neutral trehalase (NTH1) and an acidic trehalase (ATH1). We constructed trehalase disruption mutants to provide a basis for future commercial application. [Methods] To retain the accumulation of trehalose in yeast cell, we constructed diploid homozygous neutral trehalase mutants ( $\Delta nth1$ ), acid trehalase mutants ( $\Delta ath1$ ) and double mutants ( $\Delta ath1\Delta nth1$ ) by using gene disruption. We tested mutants' trehalose content and their tolerance to freezing, heat, high-sugar and ethanol concentrations. [Results] These trehalase disruption mutants were further confirmed by PCR amplification and southern blot. All mutant strains accumulated higher levels of cellular trehalose and grew to a higher cell density than the isogenic parent strain. In addition, the levels of trehalose in these mutants correlated with increased tolerance to freezing, heat, high-sugar and ethanol concentration. [Conclusion] The improved tolerance of trehalase mutants may make them useful in commercial applications, including baking and brewing. protein.

**Keywords:** trehalose;  $\Delta nth1$  mutant;  $\Delta ath1$  mutant;  $\Delta ath1\Delta nth1$  mutant; stress resistance

Supported by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20050057001 )

\*Corresponding author. Tel: +86-22-60601397; Fax: +86-22-60602298; Email: xiao99@tust.edu.cn

Received: 28 March 2008/Revised: 6 June 2008

### 科技写作中应正确使用英语缩写语

科技文章的发表是科学研究的重要组成部分。科研成果如果没有发表,就意味着科研工作没有完成。而科技文章发表的目的,就是把科研中的新发现、或者在原有基础上的提高传播给同行、乃至跨领域以及广大普通的读者。因此,科技写作在道义上来讲,作者应该对读者负责,即:要准确、简洁、清晰地向读者传达科学研究的目的、方法、结果、结论和意义。

在科技论文的写作中,初学者经常会滥用英文缩写语。有些缩写语出现在正文、摘要、甚至题目中,让读者丈二和尚摸不着头脑。这种滥用缩写语的做法危害之深,让一个辛辛苦苦的实验结果失去了传播知识的价值和机会!因为除了作者自己,没有人能够看懂作者要传播什么信息。其实,许多年后,这些作者自己再来看自己文章中这些莫名其妙的缩写语时,他一定也会后悔莫及。借此机会,根据自己学习的体会和国际上科技文章缩写语使用的惯例,和大家探讨正确使用英语缩写语的方法。

原则上,不鼓励使用缩写语。(1) 题目:根据常规,题目中一律不用缩写语。因为题目是一个非常重要的检索工具,如果作者在题目中使用缩写语,会造成人们通过检索系统找不到这篇文章,因此也就失去了传播科学技术的作用和意义。找不到文章,就更谈不上文章被人引用的次数了。(2) 摘要:同样,摘要往往是独立的,一般和正文分开被检索利用,因此也不用缩写语。对于摘要中出现的真正十分冗长的名词或短语,如果出现频率较高,例如大于 6 次,则可以考虑使用缩写。但是在第一次出现这个缩写语时,要把缩写语放在括号内并紧跟在缩写语所代表的名词或短语(全拼)之后,即:名词或短语全拼(缩写语),而此后就不再使用该缩写语的全名。(3) 正文:正文中缩写语的使用规则和摘要中万不得已要使用的情况一样。我这里强调万不得已就是要强调尽量不用缩写语。

有一些例外的缩写语,包括度量单位如毫升(mL)、公斤(kg)、分钟(min)等,则不必全拼全名给予解释。其实即使记不住那么多的惯例和规则,始终记住你文章的可读性和信息传播的目的,你就会负责任地正确使用科技写作的英语缩写语。期待《微生物学报》能够迅速成为一个正确使用英语缩写语的净土。

注:在中文稿件中,对于正文中第一次出现的西文缩写语,应附上完整的西文名,以避免由于翻译上的不统一而造成误解。应写为:中文名(西文全名,缩写)。

(朱阳 供稿)