

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.03.001

敲除 *MIG1* 同时过表达 *MAL62* 面包酵母的发酵性能

张翠英, 林雪, 孙溪, 肖冬光

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以亲本面包酵母工业菌株 BY-14a 为对照, 研究了敲除 *MIG1* 同时过表达 *MAL62* 面包酵母重组菌 BPM-M 的发酵性能. 实验结果表明: 重组菌株 BPM-M 的麦芽糖酶活提高, 麦芽糖利用率较亲本菌株提高 29.1%; 葡萄糖阻遏减弱 38.8%; 无糖面团发酵力达到 163.4 mL/(h·g), 较亲本菌株提高了 50.6%.

关键词: 面包酵母; *MAL62*; *MIG1*; 发酵性能; 无糖面团

中图分类号: Q939.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2014)03-0001-05

Fermentation Abilities of the Recombined Strain BPM-M and its Overexpressing *MAL62* along with Deletion of *MIG1*

ZHANG Cuiying, LIN Xue, SUN Xi, XIAO Dongguang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The fermentation abilities of the recombined strain BPM-M and its overexpressing *MAL62* along with deletion of *MIG1* were investigated. Our results showed that the recombined strain BPM-M has the following advantages over the parental strain BY-14a. Maltose utilization was 29.1% higher, glucose repression of BPM-M was reduced by 38.8%, and the leavening ability of the lean dough was enhanced to 163.4 mL/(h·g), which was 50.6% higher than that of BY-14a.

Key words: baker's yeast; *MAL62*; *MIG1*; fermentation ability; lean dough

面包酵母是面食制作过程中必不可少微生物发酵剂和疏松剂^[1-2]. 在无糖面团中, 麦芽糖是主要的可发酵糖, 因此麦芽糖代谢能力是影响无糖面团中面包酵母发酵能力的主要因素^[3-4]. 酵母利用麦芽糖需要 3 种基因产物, 典型的为 *MAL61* (*MAL6T*) 编码的麦芽糖通透酶、*MAL62* (*MAL6S*) 编码的麦芽糖酶和 *MAL63* (*MAL6R*) 编码的正调节蛋白^[5]. 麦芽糖通透酶将麦芽糖运输到胞内, 经麦芽糖酶水解为两分子葡萄糖后进入糖酵解途径, 供细胞利用. 本实验室^[6-7]前期实验表明, 在麦芽糖代谢过程中麦芽糖酶的作用较为关键. 因此, 提高 *MAL62* 基因的表达量是加快麦芽糖代谢、提高面包酵母无糖面团发酵力的有效途径.

实际上, 在无糖面团中含有少量的葡萄糖、果糖等可发酵糖, 葡萄糖的存在对一些糖代谢相关基因的表达存在抑制作用, 从而降低了其代谢速度^[8-9]. Mig1 蛋白是一种锌指状 DNA 结合蛋白, 是 *SUC2*、

GAL 和 *MAL* 基因的阻遏子^[10], Mig1 蛋白复合体和 *MAL*-激活蛋白 (Mal63) 之间的复杂作用被认为是葡萄糖阻遏麦芽糖代谢的主要步骤. Hu 等^[11]发现 *MIG1* 的破坏或在 *MAL63* 启动子上 Mig1 蛋白结合位点的敲除会增加 *MAL63* 的表达. 因此敲除 *MIG1*, 去除葡萄糖阻遏效应也是提高面包酵母无糖面团发酵力的另一有效途径.

本实验对敲除 *MIG1* 同时整合过表达 *MAL62* 的面包酵母工业重组菌 BPM-M 进行了酶活、耗糖、葡萄糖阻遏以及无糖面团发酵力的测定.

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

面包酵母工业菌株 BY-14 由天津科技大学天津

收稿日期: 2013-11-21; 修回日期: 2013-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31000043, 31171730)

作者简介: 张翠英 (1979—), 女 (满), 河北宽城人, 副教授, cyzhangcy@tust.edu.cn.

市工业微生物重点实验室保藏; BY-14a 是亲本菌株 BY-14 的 a 型单倍体菌株^[12].

质粒 pUC-MKAB^[12]和 pUC-P^[13]由本实验室前期构建、保藏, pUC-P 质粒携有酿酒酵母 3-磷酸甘油酸激酶基因(*PGK1*)强启动子.

1.1.2 培养基

细菌培养基(LB): 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 氯化钠, pH 7.0.

糖蜜培养基: 将 30 ~ 35 Brix 的糖蜜稀释至 10 ~ 12 Brix, 添加酵母粉 5 g/L、硫酸铵 0.5 g/L, pH 5.0.

酵母培养基(YEPD): 蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L.

液体模拟面团培养基(LSMLD):

(1) 葡萄糖 LSMLD: 葡萄糖 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 5.0 mg/L, 维生素 B₁ 2.5 mg/L, 维生素 B₆ 1.25 mg/L, 维生素 B₂ 1.0 mg/L, 叶酸 0.5 mg/L, 蒸馏水配制.

(2) 麦芽糖 LSMLD: 以 38 g/L 麦芽糖代替 40 g/L 葡萄糖, 其他成分不变.

(3) 混合糖 LSMLD: 以 33.25 g/L 麦芽糖、5 g/L 葡萄糖代替 40 g/L 葡萄糖, 其他成分不变.

1.1.3 设备与仪器

Precellys24 细胞破碎仪, 法国 Bertin Technologies 公司; 发酵力测定仪, 瑞典 SJA 公司; 1100 系列高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; SynergyTM 4 多功能酶标仪, 美国 Biotek 公司.

1.2 方法

1.2.1 引物

实验中所用引物见表 1.

表 1 BPM-M 突变株构建所用引物

Tab. 1 Primers used in the construction of the recombinant strain BPM-M

引物	引物序列(5'→3')
Mal62-up	CCGCTCGAGATGACTATTTCTGATCATCC
Mal62-down	CCGCTCGAGTTATTTGACGAGGTAGATT
PGK-up	CGCGGATCCAAGCTTTCTAACTGATCTATC- CAAAACTGA
PGK-down	CGCGGATCCAAGCTTTAACGAACGCA- GAATTTTC
MA-up	GGATTTTATGGAGTGTGATG
MB-down	GCTATGACTACGGCACCTACGA
M-S	TAGAAGTTAGCGAGCCAGCAC
M-X	GCTATGACTACGGCACCTACGA
K-S-B	CCTTTTATATTTCTCTACAGGGGCG
PGK1 _T (IN)-up	TAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGT

1.2.2 重组质粒的构建

以面包酵母 BY-14a 染色体 DNA 为模板, 利用引物 Mal62-up 和 Mal62-down PCR 扩增目的基因 *MAL62*; 将 *MAL62* 插入到 pUC-P 质粒的 *XhoI* 酶切位点, 得到质粒 pUC-PM; 以 pUC-PM 为模板, 利用引物 PGK-up 和 PGK-down PCR 扩增 PM 片段, 连接到 pUC-MKAB 质粒 *BamHI* 酶切位点, 构建质粒 pUC-MKABM.

1.2.3 醋酸锂方法转化与转化子的鉴定

以质粒 pUC-MKABM 为模板, 用引物 MA-up 和 MB-down 进行 PCR 扩增, 得到 MA-*KanMX*-(*PGK1_P* + *MAL62* + *PGK1_T*)-MB 重组盒; 通过醋酸锂转化法^[7]将重组盒转化酵母单倍体 BY-14a. 转化后的细胞涂布于含有 G-418 的 YEPD 平板, 30 °C 培养 48 h. 获得的转化子再通过 PCR 进行验证.

1.2.4 鲜酵母的制备

挑取 1 环酵母菌接种于 5 mL 的 YEPD 液体培养基中, 30 °C 静置培养 36 h, 间歇摇动; 以 10% 接种量接入糖蜜培养基, 30 °C、180 r/min 培养至稳定期, 静置 2 h 使酵母状态利于下一步发酵; 4 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 2 次后收集菌体备用.

1.2.5 糖蜜处理

废糖蜜先用硫酸调糖蜜 pH 至 4.5 (添加量约为糖蜜质量的 0.5%), 加热至沸腾后保持 0.5 ~ 1 h 以驱除有害气体; 待晾凉后加石灰乳调节 pH 至 5.0, 使杂质沉淀排除; 静置 24 h 以上, 过滤取上清液.

1.2.6 酶活力测定

按照参考文献[14]进行麦芽糖酶活力的测定. 每个实验重复 3 次, 取平均值. 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物质的量 ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$).

1.2.7 残糖的测定

配制 LSMLD 培养基, 100 °C 煮沸 30 min 后冷却至 30 °C. 每 100 mL LSMLD 培养基接入 2 g 鲜酵母, 30 °C 静置培养 4 h. 每隔一定时间取样, -20 °C 保存, 待发酵完毕进行一次性测定. 葡萄糖与麦芽糖含量测定采用高效液相色谱法^[7]. 高效液相色谱条件为: Bio-Red 的 Aminex HPX-87H 色谱柱 (300 mm × 7.8 mm, 9 μm), 流动相为 5 mmol/L 的稀硫酸, 流量为 0.6 mL/min, 柱温为 65 °C, 检测器为示差折光检测器, 检测器温度为 45 °C. 样品稀释到合适的质量浓度 (低于 1.000 g/L) 并用 0.22 μm 的滤膜过滤, 进样量为 20 μL .

1.2.8 葡萄糖阻遏程度的测定

在混合糖模拟面团培养基中, 以葡萄糖含量由 0.5% 降至 0.1% 时所消耗的总糖量算作酵母的总糖利用量, 计为 u_1 (mmol); 再计算相同时间内单麦芽糖模拟面团培养基中麦芽糖的消耗量, 计为 u_2 (mmol); 由式 (1) 可以计算出葡萄糖的阻遏程度 I [12].

$$I = \frac{u_2 - u_1}{u_2} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.9 无糖面团发酵力的测定

面团发酵力根据 GB/T 20886—2007 《食品加工用酵母》 [15] 的方法测定: 面粉 280 g、水 150 mL、氯化钠 4 g 和鲜酵母 (含水量 75%) 9 g 在 (30 ± 0.2) °C 条件下快速均匀搅拌 5 min, 放入发酵力测定仪, 记录 30 °C 下 90 min 内的 CO₂ 产气量. 实验重复 3 次取平均值.

2 结果与分析

2.1 重组菌株 BPM-M 的构建

将 MA-*KanMX*-(*PGK1_P* + *MAL62* + *PGK1_T*)-MB 重组盒转化酵母单倍体 BY-14a, 同源重组过程如图 1 所示. 获得的 G-418 抗性转化子经 PCR 验证, 结果如图 2 所示.

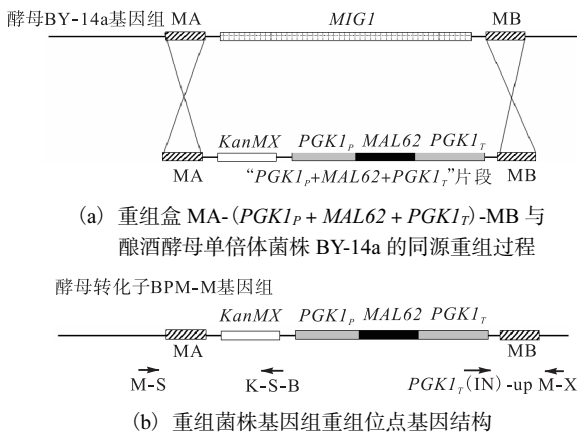
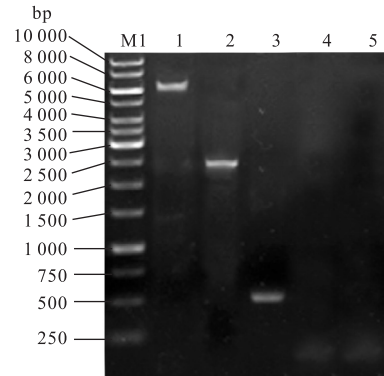


图 1 同源重组过程

Fig. 1 Homologous recombining process

在重组菌株 BPM-M 基因组上, 利用 3 对引物 M-S/M-X、M-S/K-S-B、M-X/*PGK1_T*(IN)-up 都能够 PCR 扩增分别得到明显的一条片段, 大小与预期结果 (6 470 bp、2 454 bp 和 533 bp) 一致; 而利用引物 M-S/K-S-B 和 M-X/*PGK1_T*(IN)-up 在亲本菌株 BY-14a 基因组上则不能 PCR 扩增获得明显片段. 这些结果证明, 在重组菌株 BPM-M 基因组上, 重组盒 MA-*KanMX*-(*PGK1_P* + *MAL62* + *PGK1_T*)-MB 重组整

合正确.



M1. 10 kbp ladder; 1. 以 BPM-M 基因组为模板, M-S 与 M-X 为引物扩增得到的 MS-MA-*KanMX*-(*PGK1_P* + *MAL62* + *PGK1_T*)-MB-MX 片段 (6 470 bp); 2. 以 BPM-M 基因组为模板, M-S 与 K-S-B 为引物扩增得到的片段 (2 454 bp); 3. 以 BPM-M 基因组为模板, M-X 与 *PGK1_T*(IN)-up 为引物扩增得到的片段 (533 bp); 4. 以 BY-14a 基因组为模板, M-S 与 K-S-B 为引物扩增得到的结果; 5. 以 BY-14a 基因组为模板, M-X 与 *PGK1_T*(IN)-up 为引物扩增得到的结果

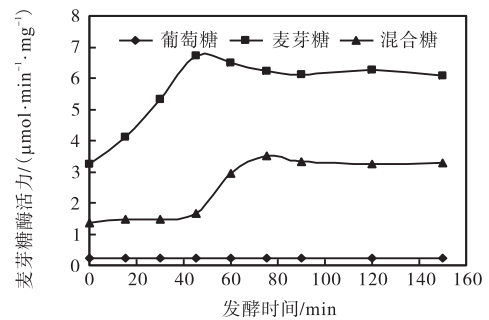
图 2 重组菌株 BPM-M 基因组验证

Fig. 2 Verification of the recombined strain BPM-M

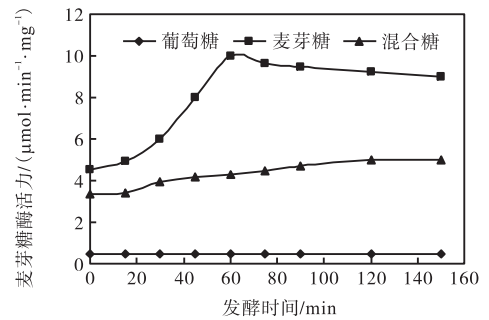
2.2 发酵性能

2.2.1 酶活力

不同碳源 LSMLD 培养基中菌株 BY-14a 和 BPM-M 的麦芽糖酶活力如图 3 所示.



(a) 亲本菌株 BY-14a



(b) 重组菌株 BPM-M

图 3 不同碳源 LSMLD 培养基中菌株 BY-14a 和 BPM-M 的麦芽糖酶活力

Fig. 3 Maltase activity of BY-14a and BPM-M in LSMLD medium of different carbon sources

在 3 种不同碳源 LSMLD 培养基中,与亲本菌株 BY-14a 相比,整合过表达 *MAL62* 基因的重组菌 BPM-M,其麦芽糖酶活力均有提高.在混合糖 LSMLD 培养基中,尽管存在一定程度的葡萄糖阻遏效应,但重组菌 BPM-M 最大麦芽糖酶活力比亲本菌株 BY-14a 高 42.9%;在麦芽糖 LSMLD 培养基中,BPM-M 的最大麦芽糖酶活力比亲本菌株 BY-14a 高 49.3%;在葡萄糖 LSMLD 培养基中,尽管两菌株的麦芽糖酶活力均低于 $0.5 \mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$,但是重组菌 BPM-M 的最大麦芽糖酶活力仍然高出亲本菌 BY-14a 100.0%. 这些结果证明整合过表达 *MAL62* 使重组菌株麦芽糖酶活力显著提高,从而提高菌株在细胞内分解麦芽糖的能力.

2.2.2 液体模拟面团培养基中的残糖及葡萄糖阻遏程度

通过 HPLC 测定了混合 LSMLD 培养基中葡萄糖和麦芽糖浓度随时间的变化,结果如图 4 所示.

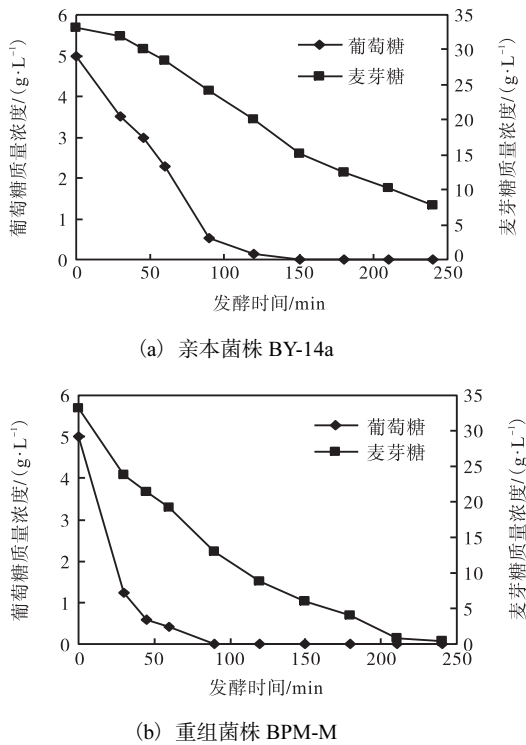


图 4 混合糖 LSMLD 培养基中菌株 BY-14a 和 BPM-M 的麦芽糖及葡萄糖残糖质量浓度
 Fig. 4 Concentration of residual maltose and glucose of BY-14a and BPM-M during shaking cultivation in maltose-glucose LSMLD media

经过一级培养,两菌株在接入麦芽糖与葡萄糖为碳源的混合糖 LSMLD 模拟面团培养基后,均立即出现麦芽糖与葡萄糖共同吸收的现象.然而在亲本菌株 BY-14a 中麦芽糖的吸收因为葡萄糖的存在延滞了

一段时间.在重组菌株 BPM-M 中葡萄糖利用速率显著加快,同时葡萄糖阻遏现象明显减轻,麦芽糖利用速率明显加快,发酵 240 min 麦芽糖利用速率较亲本提高 29.1%.同时,通过式(1)计算得到两菌株的葡萄糖阻遏程度.亲本菌株 BY-14a 受葡萄糖阻遏程度为 59%,重组菌株 BPM-M 受葡萄糖阻遏程度为 36.1%.与亲本菌株 BY-14a 相比,重组菌株 BPM-M 的葡萄糖阻遏程度降低了 38.8%.这些结果证明,面包酵母重组菌株 BPM-M 具有较高的抗葡萄糖阻遏能力、较快的麦芽糖利用能力. Klein 等^[16]将敲除 *MIG1*、表达 *MALT*、*MALS* 以及敲除 *MIG1* 同时表达 *MALT*、*MALS* 的 3 株酿酒酵母重组菌株分别与亲本菌株比较发现:在葡萄糖存在时,3 株重组菌的葡萄糖阻遏明显减弱,麦芽糖利用速率均有明显提高,甚至表达 *MAL* 的重组菌对麦芽糖摄取已经超过对葡萄糖的摄取.本研究结果则证明敲除 *MIG1* 仅同时过表达一个麦芽糖利用的酶——麦芽糖酶编码基因 *MAL62* (*MALS*) 就可以使面包酵母葡萄糖阻遏作用减弱,麦芽糖利用速率提高.

2.2.3 无糖面团发酵力

面团发酵力根据单位干质量的菌体在单位时间内产生 CO_2 的体积确定.不同菌在无糖面团中的 CO_2 产量如图 5 所示.

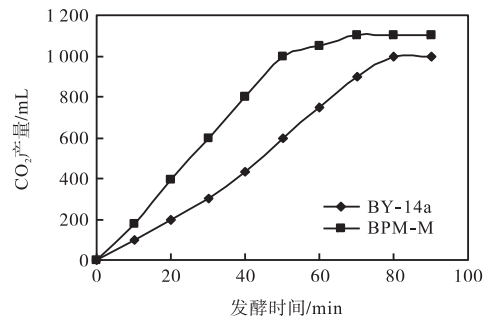


图 5 不同菌在无糖面团中的 CO_2 产量
 Fig. 5 CO_2 production of the strains in lean dough

亲本菌株 BY-14a 在 80 min 时 CO_2 产量达到最大,无糖面团发酵力为 $(108.5 \pm 0.3) \text{ mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$.而重组菌株 BPM-M 在发酵 50 min 时就可以达到同等效力,且最大产气量较亲本菌株 BY-14a 提高 10.2%,其无糖面团发酵力为 $(163.4 \pm 0.8) \text{ mL}/(\text{h}\cdot\text{g})$,比亲本菌株提高了 50.6%.该结果表明,面包酵母重组菌株 BPM-M 具有较高的麦芽糖利用能力,可以在较短的时间内获得较大的 CO_2 产量. Higgins 等^[4]在对麦芽糖酶活力与麦芽糖通透酶活力对“迟滞”与“非迟滞”面包酵母产气能力的探究中发现,酶活力与 CO_2

产量两者之间有关联性,麦芽糖酶活力的提高使产气量也明显增加,这与本研究结果一致。

3 结 论

本实验利用同源重组的原理,在面包酵母菌株中实现了敲除 *MIG1* 基因同时过表达 *MAL62* 基因。面包酵母重组菌株 BPM-M 具有较高的麦芽糖利用能力和无糖面团发酵力。敲除 *MIG1* 仅同时过表达一个麦芽糖利用的酶——麦芽糖酶编码基因 *MAL62* 就可以使面包酵母葡萄糖阻遏作用减弱、麦芽糖利用速率提高、无糖面团发酵力提高。

参考文献:

- [1] Bell P J, Higgins V J, Attfield P V. Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media[J]. Letters Applied Microbiology, 2001, 32(4): 224-229.
- [2] 李红民,黄仁泉. 激光诱变选育面包酵母菌的研究[J]. 光子学报, 2001, 30(11): 1381-1384.
- [3] Salema-Oom M, De Sousa H R, Assunção M, et al. Derepression of a baker's yeast strain for maltose utilization is associated with severe deregulation of *HXT* gene expression[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(1): 364-374.
- [4] Higgins V J, Braidwood M, Bell P, et al. 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2): 680-685.
- [5] Hu Z, Gibson A W, Kim J H, et al. Functional domain analysis of the *Saccharomyces MAL*-activator[J]. Current Genetics, 1999, 36(1/2): 1-12.
- [6] Jiang Tianxiao, Xiao Dongguang, Gao Qiang. Characterisation of maltose metabolism in lean dough by lagging and non-lagging baker's yeast strains[J]. Annals of Microbiology, 2008, 58(4): 655-660.
- [7] 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]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(10): 1533-1539.
- [8] Nehlin J O, Carlberg M, Ronne H. Control of yeast *GAL* genes by *MIG1* repressor: A transcriptional cascade in the glucose response[J]. EMBO Journal, 1991, 10(11): 3373-3377.
- [9] Cao H L, Yue M, Li S G, et al. The impact of *MIG1* and/or *MIG2* disruption on aerobic metabolism of succinate dehydrogenase negative *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(3): 733-738.
- [10] Horák J. Regulations of sugar transporters: Insights from yeast[J]. Current Genetics, 2013, 59(1/2): 1-31.
- [11] Hu Z, Nehlin J O, Ronne H, et al. *MIG1*-dependent and *MIG1*-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Current Genetics, 1995, 28(3): 258-266.
- [12] Zhang Yan, Xiao Dongguang, Zhang Cuiying, et al. Effect of *MIG1* gene deletion on glucose repression in baker's yeast[J]. Advanced Materials Research, 2011, 396/397/398: 1531-1535.
- [13] Zhang Jianwei, Zhang Cuiying, Dai Longhai, et al. Effects of overexpression of the alcohol acetyltransferase-encoding gene *ATF1* and disruption of the esterase-encoding gene *IAH1* on the flavour profiles of Chinese yellow rice wine[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2012, 47(12): 2590-2596.
- [14] Houghton-Larsen J, Brandt A. Fermentation of high concentrations of maltose by *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the COMPASS methylation complex[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(11): 7176-7182.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20886—2007 食品加工用酵母[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] Klein C J L, Olsson L, Ronnow B, et al. Glucose and maltose metabolism in *MIG1*-disrupted and *MAL*-constitutive strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Technology and Biotechnology, 1997, 35(4): 287-292.

责任编辑: 郎婧