

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20180468

麦芽糖酶基因 *MAL62* 的不同截断变体对面包酵母 发酵性能的影响

褚凯文, 宋海岩, 王金晓, 张翠英, 肖冬光

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

摘要: 为了探究麦芽糖酶基因 *MAL62* 的不同截断变体对面包酵母发酵性能的影响, 以面包酵母工业菌株 BY-14 基因组为模板, 通过 PCR 获得编码麦芽糖酶的 3 种不同长度氨基酸的 DNA 序列, 研究改造后菌株的发酵力、麦芽糖消耗速率及麦芽糖酶活力的变化, 从而揭示编码麦芽糖酶的氨基酸与其功能之间的关系. 结果表明: 含有编码麦芽糖酶不同长度基因的面包酵母菌株的发酵力、麦芽糖消耗速率及麦芽糖酶活力均优于含有未改造的麦芽糖酶的重组菌株, 说明敲除催化区域外的氨基酸不会影响面包酵母中麦芽糖酶的主要性能和面包酵母菌株的无糖面团发酵能力.

关键词: 面包酵母; 麦芽糖酶; 截断变体; 发酵性能

中图分类号: Q812 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)02-0006-07

Effects of Different Truncated Variants of Maltase Gene *MAL62* on Fermentation of Yeast

CHU Kaiwen, SONG Haiyan, WANG Jinxiao, ZHANG Cuiying, XIAO Dongguang

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

Abstract: To investigate the effect of different truncated variants of maltase gene *MAL62* on the fermentation of baker's yeast, DNA sequences of three different length of amino acid encoded maltase from baker's yeast BY-14 was amplified via PCR. The fermenting abilities, maltose utilization and maltase activity of all the recombinant strains were investigated to reveal the relationship between the amino acid encoded maltase and its function. The result showed that the fermenting abilities, maltose utilization and maltase activity of the baker's yeast strain containing molecularly modified maltase were slightly better than the recombinant strain containing unmodified maltase. It is indicated that knocking out amino acid outside the catalytic region can affect neither the main properties of maltase in baker's yeast, nor the ability of baker's yeast to ferment sugar-free dough.

Key words: baker's yeast; maltase; truncated variants; fermentation ability

面包酵母在面包生产过程中起着生物膨松、面筋扩展、增加风味等作用, 是最重要的微生物发酵剂和生物疏松剂^[1-3]. 麦芽糖是不加糖面团中最丰富的可发酵性糖, 麦芽糖代谢能力是影响面团发酵能力的关键因素^[4], 而麦芽糖酶是麦芽糖代谢的关键酶^[5-7]. 研究^[8]发现在面包酵母发酵过程中存在葡萄糖对麦芽糖酶的产物抑制作用.

麦芽糖酶又称 α -葡萄糖苷酶, 根据其一级结构可将其归为 α -葡萄糖苷酶 I 家族, 属于 GH-13, 含有 α -淀粉酶催化部位的氨基酸的 4 个保守部位^[9]. Yao 等^[10]通过研究麦芽糖、异麦芽糖及 α , α -海藻糖对麦芽糖酶的抑制作用, 得出在麦芽糖酶上至少存在 3 个不同的单糖结合位点的结论. 麦芽糖酶的亲核位点和水解位点已经被确认为 Asp214 和 Glu276, 并且编

收稿日期: 2018-11-29; 修回日期: 2019-02-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31571809)

作者简介: 褚凯文(1993—), 男, 山东枣庄人, 硕士研究生; 通信作者: 张翠英, 教授, cyzhangcy@tust.edu.cn

码麦芽糖酶第 13—582 氨基酸编码海藻糖 *treC* 基因^[11],在第 511—562 氨基酸位点存在麦芽糖酶的末端结构域.另外,Yamamoto 等^[12]通过定点突变技术研究来自酿酒酵母中的 α -麦芽糖苷酶(麦芽糖酶和异麦芽糖酶)的底物特异性,发现 α -麦芽糖苷酶保守序列 II 中 Val216 对识别 α -1,4-和 α -1,6-型底物起着十分重要的作用.因此,对麦芽糖酶基因 *MAL62* 的截断表达,研究对面包酵母不加糖面团发酵性能的影响,对探究编码麦芽糖酶的氨基酸与该酶的催化功能之间的关系有重要意义.

本实验根据麦芽糖酶不同的催化位点过表达部分麦芽糖酶基因,比较重组菌株之间在发酵力、麦芽糖消耗速率及麦芽糖酶活力的差异,进而探究编码麦芽糖酶的氨基酸与其功能之间的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

面包酵母工业菌株 BY-14 由本实验室保藏;600-1B 是只含有 *MAL1* 基因座中的 *MAL12* 基因的面包酵母菌株,购自美国模式培养物集存库(ATCC);600-1B Δ 12 是敲除 *MAL12* 的面包酵母 600-1B,由本实验室构建.

表达质粒 Yep-PGK 由本实验室构建;质粒 Yep-

PKM 由本实验室保藏.

1.1.2 培养基

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

YEPA 酵母培养基(g/L):蛋白胨 20,酵母粉 10,葡萄糖 20.

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

LSMLD 液体模拟面团培养基:

(1)麦芽糖 LSMLD(g/L):麦芽糖 9.5,硫酸铵 2.5,尿素 5,磷酸二氢钾 16,磷酸氢二钠 5,硫酸镁 0.6,烟酸 0.022 5,泛酸 0.005,维生素 B₁ 0.002 5,维生素 B₆ 0.001 25,维生素 B₂ 0.001,叶酸 0.000 5,蒸馏水配制.

(2)混合糖 LSMLD(g/L):麦芽糖 9.5,葡萄糖 3.5,其他成分与(1)相同.

1.1.3 仪器与设备

DYY III 2 型稳压稳流电泳仪,北京六一仪器厂;PCT-200 型 PCR 基因扩增仪,美国 Bio-Rad 公司;全自动凝胶成像仪,美国 Syngene 公司;发酵力测定仪,瑞典 SIA 公司;1100 系列高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 引物

实验室所用引物见表 1.

表 1 突变菌株构建所需引物

Tab. 1 Primers used in constructing the recombined strain

名称	序列(5'→3')	用途
Yep-PKM ₁₋₄₁₀ -U	TCCAGATCTCCTCGAGATGACTATTCTGATCATCCAG	扩增 <i>M</i> ₁₋₄₁₀ 片段
Yep-PKM ₁₋₄₁₀ -D	TCGCAGATCCCTCGAGTTATTTCACATCAACGTCCTCA	
Yep-PKM ₁₋₅₁₀ -U	TCCAGATCTCCTCGAGATGACTATTCTGATCATCCAG	扩增 <i>M</i> ₁₋₅₁₀ 片段
Yep-PKM ₁₋₅₁₀ -D	TCGCAGATCCCTCGAGTTAGTAACCATAAATCATAAGT	
Yep-PKM ₁₃₋₅₈₄ -U	TCCAGATCTCCTCGAGATGTGGAAAAGAGGCCACAATCT	扩增 <i>M</i> ₁₃₋₅₈₄ 片段
Yep-PKM ₁₃₋₅₈₄ -D	TCGCAGATCCCTCGAGTTATTGACGAGGTAGATTCTA	
<i>KanMX</i> -U	CATGCATGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	扩增 <i>KanMX</i> 基因
<i>KanMX</i> -D	CATGCATGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC	
PGK-U	CGGATCCGTCTAACTGATCTATCCAAAAGTGA	重组菌株构建验证
Yep-PKM-D	CCTCGAGGTTATTGACGAGGTAGATTCTACCT	

1.2.2 重组质粒的构建

以面包酵母 BY-14a 基因组为模板,用引物 Yep-PKM₁₋₄₁₀-U 和 Yep-PKM₁₋₄₁₀-D 扩增出目的基因 *M*₁₋₄₁₀,将 *M*₁₋₄₁₀ 插入到 Yep-PGK 质粒的 *Xho* I 酶切位点,得到重组质粒 Yep-PM₁₋₄₁₀;以质粒 pUG6 为模

板,以 *KanMX*-U 和 *KanMX*-D 为引物,扩增出 *KanMX* 抗性基因片段.将 *KanMX* 片段插入到 Yep-PM₁₋₄₁₀ 质粒的 *Sph* I 酶切位点,得到质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀,其构建流程如图 1 所示.

质粒 Yep-PKM₁₋₅₁₀ 和质粒 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄ 的构建

方法同上.

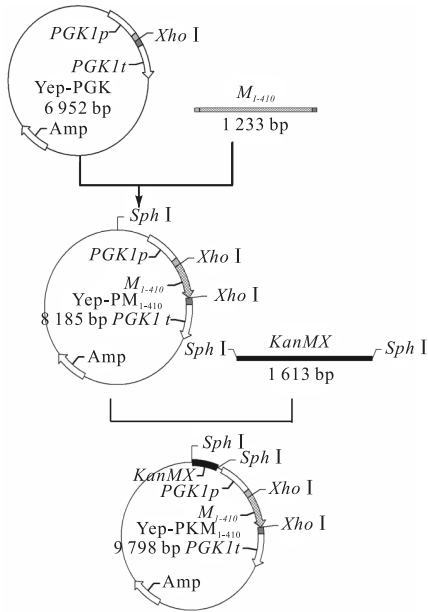


图 1 重组质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀ 的构建流程
 Fig. 1 Construction of recombinant plasmid Yep-PKM₁₋₄₁₀

1.2.3 发酵力的计算

称取利达面粉 140 g, 置于 30 °C 恒温箱保温 1 ~ 2 h, 称取 4.5 g 鲜酵母、2.0 g NaCl, 分别加入 30 mL 和 45 mL 的 30 °C 水于鲜酵母和 NaCl 中, 搅拌溶解后, 混合均匀倒入面粉中, 快速揉和成面团, 揉面时间控制在 5 min 内, 面团温度为 (30 ± 0.2) °C. 将面团放入发酵测定仪的不锈钢盒中, 送入活力室内, 发酵温度为 (30 ± 0.5) °C. 调节记录仪零点, 关闭放气小孔, 记录产气量. 根据 CO₂ 产气量计算面团发酵力, 即每小时每克干菌体产生 CO₂ 的体积.

1.2.4 重组菌株耗糖能力的测定

按 1.2% 的鲜酵母接种量将鲜酵母接入至装有不同碳源 100 mL 液体模拟面团培养基中, 在 30 °C 静置培养, 每隔 1 h 取 1 次样, 采用高效液相色谱测定残糖含量^[13].

1.2.5 麦芽糖酶活力测定

30 °C 水浴条件下, 将 0.1 mL 细胞抽提液加入 4.9 mL pNPG 溶液 (1 mg/mL), 开始计时, 20 min 内每隔 5 min 快速取出 1 mL 反应液加入装有 1 mL 0.1 mol/L 碳酸钠溶液的试管内终止反应, 测定该反应液所生成的对硝基苯酚在 410 nm 下的吸光度; 细胞抽提液中的总蛋白含量采用 Bradford (考马斯亮蓝法)^[14]测定 (使用上海美吉生物医药科技有限公司生产的 M2031 型考马斯亮蓝法蛋白测定试剂盒); 每个

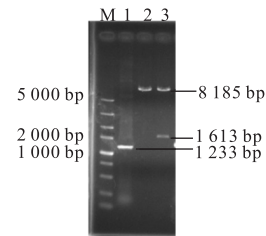
实验重复 3 次, 取平均值作为结果; 麦芽糖酶活力单位为在 30 °C 下每分钟每毫克蛋白释放对硝基苯酚的物质的量^[15], 即每分钟每毫克蛋白释放对硝基苯酚的物质的量.

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

2.1.1 重组质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀ 的构建

参照 1.2.2 节质粒构建方法构建质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀. 分别对重组质粒 Yep-PM₁₋₄₁₀ 和 Yep-PKM₁₋₄₁₀ 进行 PCR 及酶切验证, 结果如图 2 所示. 以重组质粒 Yep-PM₁₋₄₁₀ 为模板, 以 Yep-PKM₁₋₄₁₀-U 和 Yep-PKM₁₋₄₁₀-D 为引物, PCR 扩增编码 M₁₋₄₁₀ 的基因片段, 可得到大小为 1 233 bp 的片段; 对重组质粒 Yep-PM₁₋₄₁₀ 进行 Sph I 单酶切可得到 8 185 bp 的片段; 重组质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀ 进行 Sph I 单酶切, 可得到大小为 8 185 bp 和 1 613 bp 的片段, 电泳鉴定结果与预期结果均一致, 证明重组质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀ 构建成功. 测序结果显示启动子与目的基因的方向一致, 序列正确, 进一步证明质粒构建成功.



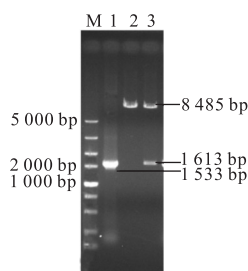
M. DL5000 DNA marker; 1. M₁₋₄₁₀ 基因; 2. 重组质粒 Yep-PM₁₋₄₁₀/Sph I; 3. 重组质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀/Sph I

图 2 重组质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀ 的验证

Fig. 2 Verification of recombinant plasmid Yep-PKM₁₋₄₁₀

2.1.2 重组质粒 Yep-PKM₁₋₅₁₀ 的构建

重组质粒 Yep-PM₁₋₅₁₀ 和 Yep-PKM₁₋₅₁₀ 的酶切验证结果如图 3 所示. 以重组质粒 Yep-PM₁₋₅₁₀ 为模板, 以 Yep-PKM₁₋₅₁₀-U 和 Yep-PKM₁₋₅₁₀-D 为引物, PCR 扩增编码 M₁₋₅₁₀ 的基因片段, 可得到大小为 1 533 bp 的片段; 对重组质粒 Yep-PM₁₋₅₁₀ 进行 Sph I 单酶切可得到 8 485 bp 的片段; 对重组质粒 Yep-PKM₁₋₅₁₀ 进行 Sph I 单酶切, 可得到大小为 8 485 bp 和 1 613 bp 的片段, 电泳鉴定结果与预期结果均一致, 证明重组质粒 Yep-PKM₁₋₅₁₀ 构建成功. 测序结果显示启动子与目的基因的方向一致, 序列正确, 进一步证明质粒构建成功.



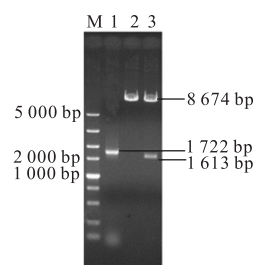
M. DL5000 DNA marker; 1. *M₁₋₅₁₀* 基因; 2. 重组质粒 Yep-PM₁₋₅₁₀/*Sph* I; 3. 重组质粒 Yep-PKM₁₋₅₁₀/*Sph* I

图3 重组质粒 Yep-PKM₁₋₅₁₀ 的验证

Fig. 3 Verification of recombinant plasmid Yep-PKM₁₋₅₁₀

2.1.3 重组质粒 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄ 的构建

重组质粒 Yep-PM₁₃₋₅₈₄ 和 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄ 的酶切验证结果如图4所示。



M. DL5000 DNA marker; 1. *M₁₃₋₅₈₄* 基因; 2. 重组质粒 Yep-PM₁₃₋₅₈₄/*Sph* I; 3. 重组质粒 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄/*Sph* I

图4 重组质粒 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄ 的验证

Fig. 4 Verification of recombinant plasmid Yep-PKM₁₃₋₅₈₄

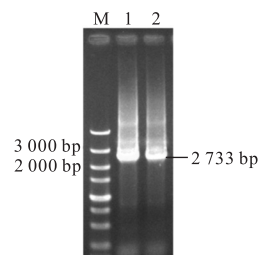
以重组质粒 Yep-PM₁₃₋₅₈₄ 为模板, 以 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄-U 和 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄-D 为引物, PCR 扩增 *M₁₃₋₅₈₄* 基因, 可得到大小为 1722 bp 的片段; 对重组质粒 Yep-PM₁₃₋₅₈₄ 进行 *Sph* I 单酶切可得到 8674 bp 的片段; 对重组质粒 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄ 进行 *Sph* I 单酶切验证, 可得到大小为 8674 bp 和 1613 bp 的片段, 电泳鉴定结果与预期结果均一致, 证明重组质粒 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄ 构建成功。测序结果显示启动子与目的基因的方向一致, 序列正确, 进一步证明质粒构建成功。

2.2 重组菌株的构建

2.2.1 重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 的 PCR 验证

以重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 的酵母质粒和构建的重组质粒 Yep-PKM₁₋₄₁₀ (阳性对照) 为模板, 用引物 PGK-U 和 Yep-PKM₁₋₄₁₀-D 进行 PCR 验证, 获得 2 条大小同为 2733 bp 的片段 (图5)。由图5可以看出 PCR 扩增产物单一, 条带大小与预期结果一致, 说明过表达重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 构建

成功。



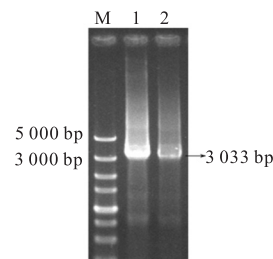
M. DL5000 DNA marker; 1. 以重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 质粒为模板的 PCR 产物; 2. 以质粒 PKM₁₋₄₁₀ 为模板的 PCR 产物

图5 重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 的 PCR 验证

Fig. 5 PCR verification of the recombinant strain 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀

2.2.2 重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀ 的 PCR 验证

以重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀ 的酵母质粒和构建的重组质粒 Yep-PKM₁₋₅₁₀ (阳性对照) 为模板, 用引物 PGK-U 和 Yep-PKM₁₋₅₁₀-D 进行 PCR 验证, 获得 2 条大小同为 3033 bp 的片段 (图6)。由图6可以看出 PCR 扩增产物单一, 条带大小与预期结果一致, 说明过表达重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀ 构建成功。



M. DL5000 DNA marker; 1. 以重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀ 质粒为模板的 PCR 产物; 2. 以质粒 PKM₁₋₅₁₀ 为模板的 PCR 产物

图6 重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀ 的 PCR 验证

Fig. 6 PCR verification of the recombinant strain 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀

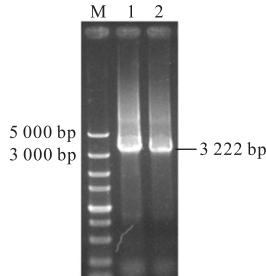
2.2.3 重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄ 的 PCR 验证

以重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄ 的酵母质粒和构建的重组质粒 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄ (阳性对照) 为模板, 用引物 PGK-U 和 Yep-PKM₁₃₋₅₈₄-D 进行 PCR 验证, 获得 2 条大小同为 3222 bp 的片段 (图7)。由图7可以看出 PCR 扩增产物单一, 条带大小与预期结果一致, 说明过表达重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄ 构建成功。

2.2.4 重组菌株 600-1BΔ12-PKM 的 PCR 验证

以重组菌株 600-1BΔ12-PKM 的酵母质粒和构建的重组质粒 Yep-PKM (阳性对照) 为模板, 用引物 PGK-U 和 Yep-PKM-D 进行 PCR 验证, 获得 2 条大

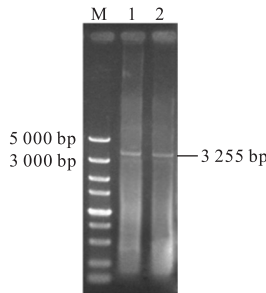
小同为 3 255 bp 的片段(图 8). 由图 8 可以看出 PCR 扩增产物单一, 条带大小与预期结果一致, 说明过表达重组菌株 600-1BΔ12-PKM 构建成功.



M. DL5000 DNA marker; 1. 以重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄ 质粒为模板的 PCR 产物; 2. 以质粒 PKM₁₃₋₅₈₄ 为模板的 PCR 产物

图 7 重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄ 的 PCR 验证

Fig. 7 PCR verification of the recombinant strain 600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄



M. DL5000 DNA marker; 1. 以重组菌株 600-1BΔ12-PKM 质粒为模板的 PCR 产物; 2. 以质粒 PKM 为模板的 PCR 产物

图 8 重组菌株 600-1BΔ12-PKM 的 PCR 验证

Fig. 8 PCR verification of the recombinant strain 600-1BΔ12-PKM

2.3 重组菌株与原菌发酵性能的比较

2.3.1 重组菌株与亲本麦芽糖酶活力的比较

将重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀、600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀、600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄、600-1BΔ12-PKM 及 600-1BΔ12 分别按 1.2% 的接种量接入至 100 mL 不同碳源模拟面团培养基中, 每隔 1 h 取 1 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 1 min, 菌体用 1 mL PBS 缓冲液悬浮, 用珠磨仪将酵母菌体破碎离心收集上清液, 以 pNPG 为反应底物测麦芽糖酶的酶活力. 重组菌株与亲本菌株的麦芽糖酶活力的比较如图 9 所示.

由图 9 可知: 突变菌株的酶活力随着时间的推移, 酶活力都有逐渐增加的趋势. 与重组菌株 600-1BΔ12-PKM 相比, 麦芽糖酶活力提高最大是 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀, 发酵 5 h 的时候酶活力提高了 17%, 说明敲除催化活性区域外的氨基酸序列对麦芽糖酶活力有提高作用.

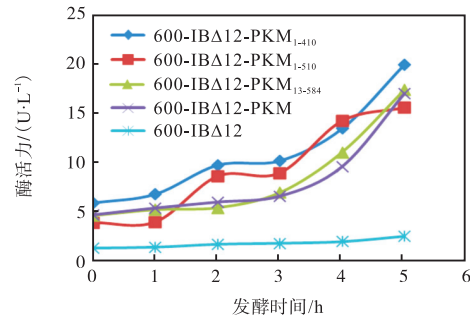


图 9 重组菌株与亲本菌株的麦芽糖酶活力

Fig. 9 Maltase activity of recombinant strain and parent strain

2.3.2 重组菌株与亲本菌株在不加糖面团中的发酵力比较

根据食品加工用酵母国家标准方法测定改造菌株与亲本菌株无糖面团中 CO₂ 产气情况, 可记录菌株发酵前 1 h 释放 CO₂ 量及发酵结束时间, 并计算酵母菌体发酵力. 各菌株的发酵力(以干菌体质量计)结果见表 2. 与原始菌 600-1BΔ12 相比, 各重组菌的发酵力都有明显的提高 ($P < 0.05$). 但是, 与重组菌株 600-1BΔ12-PKM 相比, 过表达部分麦芽糖酶基因的重组菌株的发酵力没有显著提高. 发酵力最高的为重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀, 与 600-1BΔ12-PKM 相比, 发酵力提高了 10.63%. 发酵力提高的原因可能是重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 的麦芽糖酶活力高于 600-1BΔ12-PKM. 这说明麦芽糖酶基因 MAL62 的截断表达虽然使其氨基酸序列不完整, 但是对菌株的发酵力并未产生消极影响, 甚至使发酵力略微提高.

表 2 无糖面团中重组菌株及亲本菌株的发酵力比较

Tab. 2 Fermentation ability of parent and recombinant strains in unsugared dough

菌株名称	发酵前 1 h 产气量/mL	发酵力/ (mL·g ⁻¹)
600-1BΔ12	166	142.81
600-1BΔ12-PKM	240	194.72
600-1BΔ12-PKM ₁₋₄₁₀	253	215.41
600-1BΔ12-PKM ₁₋₅₁₀	250	206.06
600-1BΔ12-PKM ₁₃₋₅₈₄	250	198.90

2.3.3 各重组菌株与对照菌株的耗糖曲线

将菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀、600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀、600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄、600-1BΔ12-PKM 及 600-1BΔ12 分别按 1.2% 的接种量接入至 100 mL 不同碳源模拟面团培养基中, 每隔 1 h 取样测定培养基中麦芽糖和葡萄糖含量, 绘制耗糖曲线, 每个实验重复 3 次取平均值作为实验结果. 菌株在不同碳源模拟面团培养

基中的耗糖曲线结果如图 10 和图 11 所示。

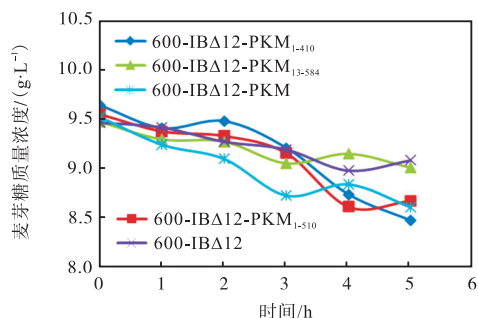


图 10 麦芽糖 LSMLD 液体模拟面团培养基中重组菌株与亲本菌株的耗糖曲线

Fig. 10 Sugar consumption curve of recombinant strain and parent strain in maltose LSMLD medium

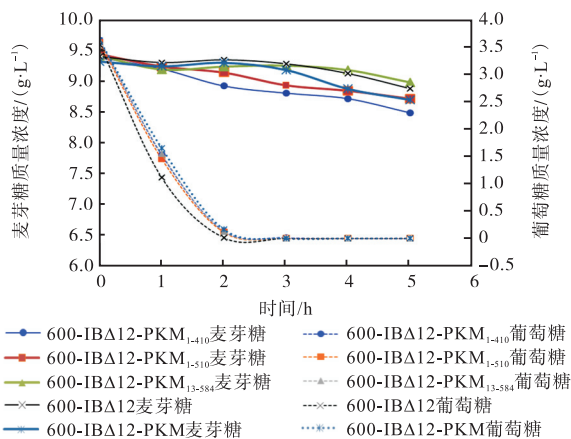


图 11 混合糖 LSMLD 液体模拟面团培养基中重组菌株与亲本菌株的耗糖曲线

Fig. 11 Sugar consumption curve of recombinant strain and parent strain in mixed LSMLD medium

由图 10 可以看出:在以麦芽糖为唯一碳源的模拟面团培养基中,重组菌株与亲本菌株的耗糖趋势是一致的,呈现出逐渐降低的趋势.发酵 5 h 后,重组菌株中只有 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 的利用速率略优于 600-1BΔ12-PKM.由图 11 可以看出:重组菌株和亲本菌株在麦芽糖和葡萄糖的混合培养基中消耗麦芽糖的速率都很慢,麦芽糖利用速率慢是因为亲本 600-1BΔ12 麦芽糖代谢系统(*MAL1*)被敲除.重组菌 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 利用麦芽糖的速率最快.根据图 10 计算得出:菌株 600-1BΔ12-PKM 的麦芽糖利用速率为 0.16 g/(L·h),在发酵 5 h 消耗了 8.63%;与 600-1BΔ12-PKM 相比,重组菌 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 利用麦芽糖的速率(0.21 g/(L·h))提高了 31%,在发酵 5 h 消耗了 10.84%的麦芽糖;重组菌 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀、600-1BΔ12-PKM₁₃₋₅₈₄ 及 600-1BΔ12 在发酵 5 h 后麦芽糖分别消耗了 8.46%、5.68% 和 6.70%.结果表明,

重组菌 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 和重组菌 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀ 麦芽糖利用能力较菌株 600-1BΔ12-PKM 略有提高,胞内酶活数据表明重组菌株 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 酶活高于 600-1BΔ12-PKM,推测耗糖能力的提高主要原因是麦芽糖酶活力提高,也可能是麦芽糖酶基因 *MAL62* 的截断表达减弱了葡萄糖对麦芽糖酶的抑制作用.

3 结 语

本实验对麦芽糖酶基因 *MAL62* 的截断表达,获得了表达不同长度麦芽糖酶编码基因的面包酵母菌株,研究了含有改造的麦芽糖酶的面包酵母菌株的发酵力、麦芽糖消耗速率及麦芽糖酶活力的变化.结果证明麦芽糖酶在含有糖苷水解酶 GH13 家族的催化域第 36—397 氨基酸的情况下,删除其他部分氨基酸序列对该酶的催化活性不会产生消极的影响,反而会对其酶活力、发酵速度有所提升.麦芽糖酶不同截断变体中 600-1BΔ12-PKM₁₋₄₁₀ 和 600-1BΔ12-PKM₁₋₅₁₀ 两个菌株破坏了海藻糖 *treC* 基因,使得葡萄糖与酶无法正常结合,同时这两株菌不含有麦芽糖酶 C 末端结构域,从而减弱了葡萄糖对麦芽糖酶的抑制作用,因此这两株菌的酶活力高于其他菌株.但是,也存在这两个变体只是单纯地提高了麦芽糖酶活力的可能,因此,还需进一步纯化该酶后分析酶活性质进行验证.

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 in Applied Microbiology, 2010, 32(4): 224-229.
- [2] 王立,虞榭芳,钱海峰,等.天然酵母面包研究现状及发展趋势[J].食品与机械,2016,32(9):201-208.
- [3] 张守文.面包酵母的功能特性与科学使用方法[J].食品科技,2002(4):31-34.
- [4] 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, 2015, 110(1):364-374.
- [5] 姜天笑,肖冬光,刘青,等.快速发酵面包酵母菌株的选育[J].食品研究与开发,2006,27(11):76-79.

- [6] Jiang T X, Xiao D G, Qiang G. 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] Higgins V B M, Bell P, Bissinger 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 & Environmental Microbiology*, 1999, 65(2) : 680–685.
- [8] Zhang C Y, Song H Y, Lin X, et al. Expression, purification and characterization of maltase from "Quick" baker's yeast[J]. *Advances in Applied Biotechnology*, 2015: 265–275.
- [9] Soro R Y, Diopoh J K, Willemot R M, et al. Enzymatic synthesis of polyglucosylfructosides from sucrose alone by a novel α -glucosidase isolated from the digestive juice of *Archachatina ventricosa* (Achatinidae) [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2008, 42(1) : 44–51.
- [10] Yao X, Mauldin R, Byers L. Multiple sugar binding sites in α -glucosidase[J]. *BBA-Proteins and Proteomics*, 2003, 1645(1) : 22–29.
- [11] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1) : D200–D203.
- [12] Yamamoto K, Nakayama A, Yamamoto Y, et al. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(16) : 3414–3420.
- [13] Sun X, Zhang C Y, 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.
- [14] Oda Y, Tonomura K, X J X T. Detection of maltose fermentation genes in the baking yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 23(4) : 266–268.
- [15] Lin X, Yu A Q, Zhang C Y, et al. Functional analysis of the global repressor Tup1 for maltose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* : Different roles of the functional domains[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1) : 194.

责任编辑: 郎婧

(上接第5页)

- [13] Jia L, Wang W, Shang J, et al. Highly efficient soluble expression, purification and characterization of recombinant A β 42 from *Escherichia coli* [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(33) : 18434–18441.
- [14] Dev K K, Hofele K, Barbieri S, et al. Part II: Alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease[J]. *Neuropharmacology*, 2003, 45(1) : 14–44.
- [15] Clayton D F, George J M. The synucleins: A family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease[J]. *Trends in Neurosciences*, 1998, 21(6) : 249–254.
- [16] Ueda K, Fukushima H, Masliah E, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(23) : 11282–11286.
- [17] Han H, Weinreb P H, Lansbury P T. The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: Is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? [J]. *Chemistry & Biology*, 1995, 2(3) : 163–169.
- [18] Weinreb P H, Zhen W, Poon A W, et al. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(43) : 13709–13715.
- [19] Ehrnhoefer D E, Bieschke J, Boeddrich A, et al. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15(6) : 558–566.

责任编辑: 郎婧