

优良面包酵母菌株的杂交育种

姜天笑 徐 曼 王 振 肖冬光*

(天津科技大学 天津市工业微生物重点实验室 天津 300457)

摘 要: 本文对实验室保存的面包酵母进行筛选,以不加糖面团发酵力最高的菌株 BY-14 和高糖面团发酵力最高的菌株 BY-6 作为两杂交亲本。二倍体菌株经过单倍体制备、分离和筛选后,利用群体杂交方法,获得了一株兼备两亲本优良性能的面包酵母菌株,其不加糖面团发酵力达到菌株 BY-14 水平,且高糖面团发酵力比菌株 BY-6 提高了 25%。

关键词: 面包酵母, 面团发酵力, 杂交

Construction of Baker's Yeast Strains with High Fermentative Abilities in both Lean and Sweet Doughs

JIANG Tian-Xiao XU Man WANG Zhen XIAO Dong-Guang*

(Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457)

Abstract: Two parental strains BY-14 and BY-6, with high leavening ability in lean and sweet dough respectively, were selected. Through spore production and separation, two haploids with opposition types were selected for cross-breeding. At last one hybridization strain was obtained, with good fermentation ability as BY-14 in lean dough and better than BY-6 by 25% in sweet dough.

Keywords: Baker's yeast, Dough fermentation ability, Hybridization

面包酵母是重要的工业微生物,在面包制造过程中具有无法取代的重要性。它在发酵过程中产生的二氧化碳气体使面团迅速膨胀,并赋予面包独特的风味和营养价值。目前,市售商品酵母种类有二种,一种为耐高糖酵母,在较高糖含量面团中具有高发酵力而在不加糖面团中发酵力较低;另一种为低糖酵母,在不加糖面团或糖含量 7% 以下的面团中起发速度较快,其高糖面团发酵力较低。对于大型面包制作厂来说,由于生产面包品种较为固定,可使用专用的面包酵母品种;而小面包作坊的生产品种灵活多样,一种高适应性面包酵母产品更适应他们需要,也更适合大众消费者家庭使用。本论文

通过对耐高糖酵母和低糖酵母进行杂交选育,得到一株在高糖和不加糖面团中发酵力均良好的优良面包酵母菌株,使商品面包酵母具有更广泛的实用性。

1 材料与方法

1.1 菌株

菌株为本实验室保存的商品面包酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae*), 标号分别为 BY-6、BY-11、BY-12、BY-14、BY-15、BY-16、A6、B6; 标准交配型单倍体 a 型 Y-2 和 型 Y-4, 系天津科技大学生物技术研究室保存菌株。

* 通讯作者: Tel: 022-60601397; ✉ xdg@tust.edu.cn
收稿日期: 2007-09-17; 接受日期: 2008-11-13

1.2 培养基

- 1.2.1 种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 20, pH6.0。
- 1.2.2 糖蜜培养基(g/L): 将处理后糖蜜(30~35°Brix), 加水稀释为 12°Brix, 添加酵母粉 5, 硫酸铵 0.5, pH5.0。
- 1.2.3 生孢培养基(g/L)^[1]: 醋酸钠 8.2, 氯化钾 1.86, 微量元素溶液 1 mL, 进口琼脂粉 20, 蒸馏水配制。微量元素溶液(g/L): Na₂B₄O₇·10H₂O 0.008, (NH₄)₆MoO₂₄·4H₂O 0.019, KI 0.1, Fe(SO₄)·6H₂O 0.288, MnCl₂·4H₂O 0.036, ZnSO₄·7H₂O 0.308, CuSO₄·5H₂O 0.39, 蒸馏水配制, 加入 1mol/L 盐酸不再混浊为止。
- 1.2.4 YEPD 平板(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 20, 琼脂 20。
- 1.2.5 2-脱氧葡萄糖药物平板(g/L): 麦芽糖 20, 磷酸二氢钾 1, 硫酸镁 0.5, 硫酸铵 0.5, 2-脱氧葡萄糖的加入量为 0.1, 0.2, 0.3, 进口琼脂粉 20, 蒸馏水配

- 制, pH6.0。
- 1.2.6 高盐平板(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 20, NaCl 的加入量分别为 20、40、60、70、80、90、100、110, 琼脂的加入量随盐含量增加而增加, 分别为 20、25、30、40、40、40、40、40。
- 1.3 实验方法
- 1.3.1 鲜酵母泥制备: 从斜面上挑取一环菌泥于种子培养基中, 静置培养 24 h, 以 10%接种量转入糖蜜培养基中, 150 r/min, 30℃培养 24 h。离心洗涤 2 次后备用。
- 1.3.2 面团发酵力测定: 面粉在 30℃下预热 1 h~2 h, 按照面团配方(见表 1), 和成小面团(操作时间控制在 5 min), 使面团中心温度在 27℃±1℃, 立即放入 100 mL 量筒中贴壁压紧, 30℃培养一定时间, 测定面团体积增加值。不加糖面团和高糖面团发酵力以单位质量酵母单位时间内面团体积增加值来表示, 分别为(mL/(g·h))和(mL/(g·1.5 h))。

表 1 面团配方 Table 1 Ingredients of Doughs						
	面粉(g) Flour	盐(g) NaCl	蔗糖(g) Sugar	30℃水(mL) Water	酵母泥量(g) Yeast addition	培养时间(h) Incubation time
不加糖面团 Lean dough	25	0.25	0	12.5	0.25	1
高糖面团 Sweet dough	25	0.25	5	15	1.0	1.5

- 1.3.3 单倍体制备与分离^[1]: 将培养的酵母泥推放在生孢培养基上, 25℃培养 7 d, 收集菌体, 适当稀释后(菌浓 10⁶ 个/mL)用 3%的蜗牛酶 30℃水浴振荡处理 60 min, 其间镜检孢子破壁情况。在 55℃~60℃水浴下 10 min~15 min 杀死二倍体, 涂布于 YEPD 平板上, 挑取小菌落于生孢培养基上进行验证, 镜检不生孢的为单倍体, 编号, 转入斜面保存。
- 1.3.4 单倍体接合能力及接合型确定: 将单倍体与标准 a 和 α 型混合培养, 镜检观察, 如果与标准 a 型接合的单倍体为 α 型, 与标准 α 型接合的单倍体则为 a 型, 两者都不接合为不育型。
- 1.3.5 高麦芽糖发酵力菌株的筛选: 将菌体点接在含有一定浓度的 2-脱氧葡萄糖平板上, 在药物平板上生长良好菌株初步认为是高麦芽糖发酵力菌株。
- 1.3.6 耐高渗菌株的筛选: 将菌体点接在高盐平板上, 生长良好的初步认定为耐高糖菌株。
- 1.3.7 杂合株的检出及筛选: a 和 α 型的单倍体经种子培养基培养后, 各取 3 mL 于 30 mL 种子培养基

中培养, 其间显微镜观察是否有哑铃型接合子形成, 再继续培养 24 h 后涂布于 YEPD 平板上至菌落生长。挑取大菌落于药物平板和高盐平板上, 选取两平板上都生长良好的菌落于生孢培养基上进行验证, 具有产孢能力的菌株为杂合株。

2 结果与讨论

- 2.1 面包酵母菌株的筛选
- 将实验室保存的 8 株商品酵母进行面团发酵力测定, 每个实验重复 3 次, 取平均值作为实验结果, 见表 2。
- 由表 2 可知, 在不加糖面团中, 发酵力大小为 BY-14>BY-15>BY-6>A6>B6>BY-12>BY-16>BY-11; 在高糖面团中, 发酵力大小为 BY-6>A6> B6>BY-12>BY-11>BY-15>BY-14>BY-16。选择耐高糖面包酵母菌株 BY-6 和低糖面包酵母菌株 BY-14 作为杂交选育的亲本。

表 2 各菌株的面团发酵力
Table 2 Dough fermentation abilities of different strains

菌株 Strains	BY-6	BY-11	BY-12	BY-14	BY-15	BY-16	A6	B6
不加糖面团发酵力 mL/(g·h) Unsugared dough raising ability	68	27	57	102	73	30.5	65.5	61
高糖面团发酵力 mL/(g·1.5 h) Sweet dough raising ability	24	12	15	6.5	11.5	3.5	22	16

2.2 筛选平板的确定

面包酵母一般分为耐高糖酵母和低糖酵母，耐高糖酵母往往由于较低的麦芽糖发酵力而在不加糖面团中起发速度较低^[2]；低糖面包酵母由于缺乏耐高渗特性则在高糖面团中发酵能力较差^[3]。将两亲本二倍体菌株经种子培养基培养至稳定期后涂布在 2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-D-glucose 简称 2-DOG)平板和高盐平板上进行比较，以确定 2-脱氧葡萄糖和 NaCl 的加入量，结果见表 3 和图 1。

表 3 菌株 BY-6 和 BY-14 在 2-脱氧葡萄糖平板上生长情况
Table 3 Growth on 2-DOG plates of strains BY-6 and BY-14

2 - DOG 浓度(%) Concentration of 2-DOG	0	0.01	0.02	0.03
BY-6	+	-	-	-
BY-14	++	+	-	-

注：++：菌落较大；+：菌落较小；-：无菌落生长
Note: ++: Colony growth well; +: Colony growth; -: No colony growth

面包酵母的麦芽糖发酵速度决定了面团发酵力大小^[2]。由于麦芽糖发酵过程受葡萄糖阻遏作用影响，导致面团起发速度降低。2-脱氧葡萄糖是一种不可代谢的葡萄糖结构类似物，有毒，对酵母产生一些不利影响，它通过与葡萄糖相同的运输系统被酵母吸收，可用于葡萄糖分解代谢阻遏作用中^[4, 5]。高麦芽糖发酵力的菌株则在以麦芽糖为唯一碳源的 2-脱氧葡萄糖平板上生长良好，反之则不生长。由表 3 可知，菌株 BY-14 在以麦芽糖为唯一碳源的平板上生长较菌株 BY-6 良好，且在含有 0.01% 的 2-脱氧葡萄糖平板上可以生长，而菌株 BY-6 则不生长。说明，菌株 BY-14 比 BY-6 具有较高的麦芽糖发酵力。

在高糖面团中，较高的糖含量造成的渗透压使酵母细胞质壁分离，细胞无法正常生长，发酵时间相应延长。因此，耐高渗特性是耐高糖酵母的必需。由图 1 可知，菌株 BY-6 比菌株 BY-14 更能抵抗高渗透压的影响，相同的盐浓度下，BY-6 的菌落相对较大，致死率较低。在盐含量为 8% 时，菌株 BY-14 不能生长；当盐含量高于 9% 时，两菌株都不能生长。确定高盐平板的 NaCl 加入量为 8%。

通过实验，也证明了面包酵母高麦芽糖发酵力、耐高渗能力是影响不加糖面团和高糖面团发酵力的关键因素。

2.3 单倍体制备、分离及筛选

对二倍体菌株进行单倍体分离、验证，得到菌株 BY-14 的单倍体 108 株，BY-6 的单倍体 94 株，分别点接在 0.01% 2 - 脱氧葡萄糖平板或含盐 8% 的平板上(见图 2)，挑取大菌落共 36 株，其中菌株 BY-14 单倍体 22 株，菌株 BY-6 单倍体 14 株，进行面团发酵力测定并确定其接合型。其中发酵力优于或等于菌株 BY-14 的单倍体 12 株，a 型 8 株，约占 2/3，α 型 3 株，约占 1/4，有一株为不育型；优于或等于 BY-6 的单倍体 6 株，a 型 4 株，约占 2/3，α 型 2 株，约占 1/3。

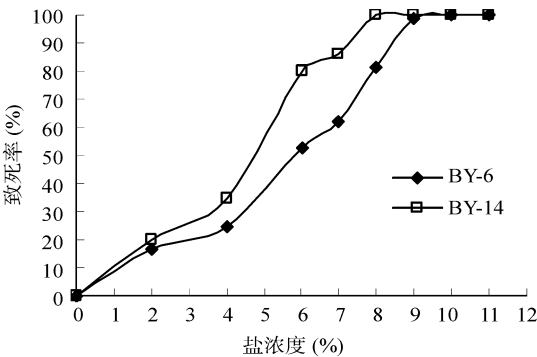


图 1 菌株 BY-14 和 BY-6 不同盐浓度下的致死率
Fig. 1 Death rates of strains BY-6 and BY-14 at different salt concentrations

在不加糖面团中，除了葡萄糖、果糖等少量的其它可发酵糖类，麦芽糖是最为丰富的可发酵糖类，

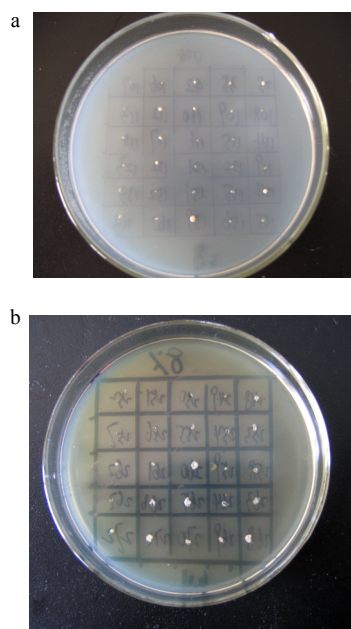


图2 单倍体在筛选平板生长情况

Fig. 2 Growth on screening plates of different haploids

注: a: BY-14 单倍体在 2-脱氧葡萄糖平板上; b: BY-6 单倍体在高盐平板上

Note: a: Growth on 2-DOG plates of haploids BY-14; b: Growth on salt plates of haploids BY-6

2.4 杂交株的获得及筛选

将来自不同亲本的两相反配型单倍体进行群体杂交, 其间显微镜观察是否有哑铃型接合子形成(见图3)。将培养液涂布于 YEPD 平板上挑取大菌落 239 株, 点接在 8% NaCl 平板上和 0.01% 的 2-脱氧葡萄糖药物平板上, 筛选两者生长均良好的菌株编号。将编号的菌株进行生孢验证, 有子囊孢子形成的菌株认定为杂合二倍体。将筛选的杂合株 26 株进行面团发酵力测定, 结果见图 4。

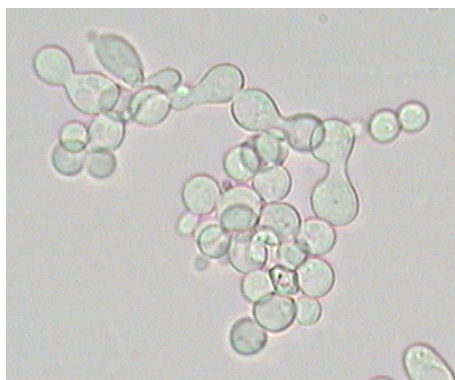


图3 显微镜下观察具有相反交配型单倍体面包酵母细胞间的接合($\times 40$)

Fig. 3 Conjugation of haploid yeast cells with opposite mating types

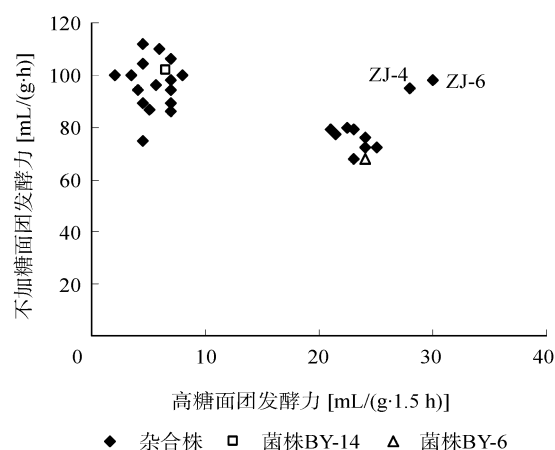


图4 杂合株和原始菌株面团发酵力对比图

Fig. 4 Comparison between hybrid and parental strains in dough raising ability

在酵母细胞中, 麦芽糖利用酶系包括麦芽糖酶和麦芽糖通透酶, 受 MAL 基因控制, 用于将麦芽糖运输到胞内并水解为葡萄糖供细胞利用; 酵母耐高渗能力与多种因素有关, 如胞内甘油积累量、海藻糖含量、细胞膜成分、蔗糖酶活力等, 每种因素都受不同基因控制。在酵母二倍体营养细胞单倍体化、分离、接合过程中, 基因经过了分离重组过程, 造成杂合株的发酵性能千差万别^[6]。从图 4 看出, 经过初筛后, 26 株杂合株不加糖面团和高糖面团发酵力大致分为 4 类, 一类与原始二倍体菌株 BY-14 发酵性能相近; 一类与原始二倍体菌株 BY-6 相近; 一类, 1 株杂合子不加糖和高糖面团发酵力都较低; V 类, 结合了两原始菌株的优良特性杂合子, ZJ-4 和 ZJ-6, 其中 ZJ-6 达到菌株 BY-14 不加糖面团发酵力水平且高糖面团发酵力水平最高, 比菌株 BY-6 提高了 25%, 是一株性能优良的面包酵母菌株。

3 结论

(1) 对实验室保存的商品面包酵母菌株经过面团发酵力的筛选, 以耐高糖酵母 BY-6 和低糖酵母 BY-14 作为杂交选育的亲本。

(2) 通过对菌株 BY-6 和 BY-14 在 2-脱氧葡萄糖平板和高盐平板生长情况的比较, 也证明了菌株麦芽糖发酵力、耐高渗能力是影响不加糖面团和高糖面团发酵力的关键因素。

(3) 杂交育种通过两亲本基因分离、重组过程达到合并优化工业菌株特性的目的^[6-8]。本实验通过此方法得到了一株高发酵力的面包酵母菌株, 提高

了酵母的实用性。

参 考 文 献

- [1] 杜连祥. 工业微生物学实验技术. 天津: 天津科技出版社, 1992, pp.217.
- [2] 肖冬光, 姜天笑, 刘 青. 面包酵母无糖面团发酵力与麦芽糖发酵力相关性的探讨. 食品与发酵工业, 2005, 31(11): 6-8.
- [3] Hernandez-Lopez MJ, Prieto JA, Rande-Gil F. Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 84: 125-134.
- [4] Rincón AM, Codón AC, Castrejón F, et al. Improved properties of Baker's yeast mutants resistant to 2-Deoxy-D-glucose. *Applied and environmental microbiology*, 2001, 67(9):4279-4285.
- [5] Rande-Gil F, Prieto JA, Sanz P. The expression of a specific 2-deoxyglucose-6p phosphatase prevents catabolite repression mediated by 2-deoxyglucose in yeast. *Curr Genet*, 1995, 28: 101-107.
- [6] Higgins VJ, Bell PJL, Dawes IW, et al. Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 4346-4348.
- [7] Nakagawa S, Ouchi K. Construction from a single parent of baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 3499-3502.
- [8] 刘 青, 姜天笑, 毕 琳, 等. 高适应性面包酵母菌株的杂交选育. 食品与发酵工业, 2005, 31(3): 30-32.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtb.cn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依据提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 突出重点。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *ns14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p. 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp. 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2008-00-00 ; 接受日期: 2008-00-00

(下转 p. 618)