

- 21 Deng Y Z, Yuan D X, Determination of Polysaccharide in Ginkgobilgal by Ultrasonic Fragmentation Pretreatment with HPLC Analysis, Chem. J. Of chinese Universities, 2000, 21 (12): 68 ~ 72.
- 22 赵中杰等. 银杏和银杏叶中 25 种元素的含量测定. 北京中医学院学报, 1992, 15(2) 36 ~ 36.
- 23 池静端等. 银杏叶的化学成分研究. 中国中药杂志, 1997, 22(2) :106 ~ 107.
- 24 王晓伟. 银杏的开发研究. 现代应用药学, 1991, 8(5) : 39 ~ 41.

新面包酵母的实用性分子育种技术

王 璋 中国食品发酵工业研究所 北京 100027

摘 要 一种新的面包发酵生产技术,冷藏面团法的实用性研究已取得显著性进展,并都已在国外实际生产中应用。本文着重介绍发酵生产技术中关键的新型实用性面包酵母菌株的育种技术及其特性分析方法,说明了新筛选菌株发酵性能低温敏感性的形成机理以及与这一特征相关连的基因及其克隆表达效果,并进一步阐述了该新发现基因的功能作用。

关键词 面包酵母 冷藏面团发酵技术 分子育种 发酵性能低温敏感型

Abstract New approaches have been developed in a new baking production, refrigerated dough process(RDP), which have been reportedly advanced to successful utilization in many bakeries abroad. The key point of RDP was reviewed through a detail introduction of the breeding and characterization of a new baker's yeast strain required in RDP, and the mechanism of the new isolated yeast getting the property of cold sensitive fermentation. Further illustration was focused on the discovery and cloning of a new gene related directly with this characteristic, and the demonstration of its metabolic function.

Key words Baker's yeasts Refrigerated dough process Breeding Molecular analysis Cold sensitive fermentation

众所周知,而包是将小麦粉、水和酵母等混合,揉合成生面团,再进行适当发酵后、焙烤加工制成的。发酵就是利用酵母的代谢功能,代谢产生的二氧化碳气体使得面包团膨胀、疏松,发酵形成的醇类、酯类等香味成分形成了面包特有的风味特征。但是,由于这种传统的发酵工艺中途不停止;而另一方面,近来,人们越来越喜欢吃当日烧烤的面包,而且对于面包产品质量的要求也越来越高。因此,为了制造出高规格、上档次的面包产品,通常面包的制作都是在深夜、或清晨中进行的,劳动强度很大。最近,国外一些生产公司和科研单位针对生产企业实施的每周休息两天和力求缩短每日工作时间的实际情况,以及为了适应客观需要,希望尽快改进工艺技术、提高生产效率的迫切愿望,经过各种改良方法选育出新的酵母菌种,使得这种中途终止发酵进程的工艺技术可以实现,并由此开发了新的面包加工生产方法。

1 冷藏生面团发酵生产面包技术

最近,在冰箱冷藏条件下可以终止发酵代谢的生面团冷藏法制造面包技术(Refrigerated dough process)的开发受到了新的关注。与以前被开发的冷冻面团法相似,该技术工艺中将生面团进行暂时冷藏保存,在必要的时候取出,再进行发酵

和焙烤。但由于通常的面包酵母在接近 0℃ 左右的冷藏过程中细胞仍徐徐地进行着发酵代谢作用,使得面团中的糖逐渐地被消费殆尽,而生成的过量酵母细胞也使得面包的风味下降,而且,另一方面,冷藏保存结束后正常的发酵代谢不能恢复进行,生面团不能充分地得到发酵而膨胀起来,生产不出品质良好的面包产品来。

日本协和发酵工业公司的科研人员经过长期的深入研究后,在解决这一难题上取得了重大进展,随后该公司东京研究所的京极和大内先生进一步筛选得到了一株实用性酵母菌种, RZT3 菌株。该菌株具有发酵性能低温敏感性(Cold sensitive fermentation, CSF)的特性,并且相应地开发了冷藏生面团发酵生产面包的新技术,并已推广应用。

2 面包酵母菌株的育种

RZT3 菌株是通过直接选用工业生产用的面包酵母菌株作为出发菌株,在基本上不改变菌株原有特性的基础上,再赋予发酵性能低温敏感性这一性质。实验用工业实用性面包酵母菌株 KY5649 作为亲株,在控制死亡率在 70% 以上用紫外线照射营养细胞,进行诱变处理。用普通培养基和基本培养在常温下先后培养 12 小时,使得所有存活的酵母细胞生长,并都进入细胞生长周期的 G1 间隔期,再转接到含有呼吸

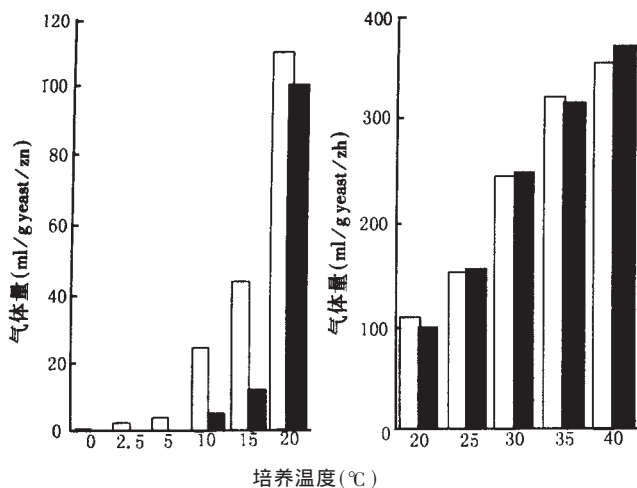


图1 不同温度下亲株 KY5649(空心)和 RZT3 突变株(实心)的代谢气体产生量比较

能源传递链的抑制剂抗霉素(Antimycin)的培养基中低温 10℃ 下培养,进行突变菌种的筛选。然后,又在低温下以 Nystatin(制霉菌素)进行突变菌株的浓缩处理,从而筛选了一株只有在低温下发酵(细胞增殖)性能被抑制的突变(CSF1 突变)菌株, RZT3 菌株。

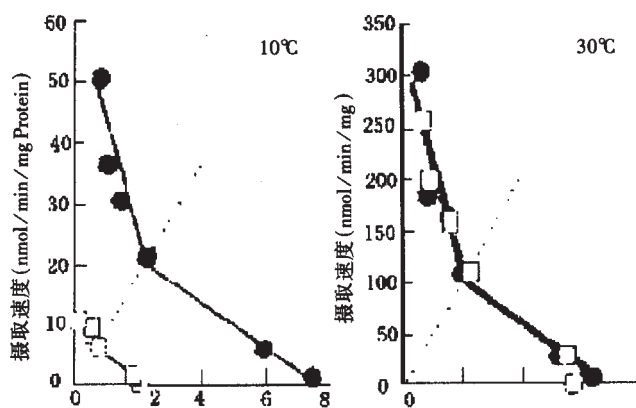
如图 1 所示, RZT3 菌株在 25℃ 以上的温度下与亲株一样,具有同等的发酵代谢能力,但是,当温度下降到 15℃ 以下时,该菌株的发酵力只有亲株的 1/3 或更低。实验还观察到,作为对照采用的普通面包酵母制成的生面团按照该冷藏面团制造面包方法在 5℃ 下冷藏 7 天后,面包发不起来,硬,而且外观颜色也不好。而利用该 RZT3 菌株在同样的条件下加工出的面包发酵效果良好,与不经冷藏处理直接发酵时做出的面包一样膨大、疏松,美观可口。这结果可以看出,实际上, RZT3 菌株在生面团冷藏过程中其发酵代谢作用被抑制,基本上处于停止状态。这样,冷藏保存过程中生面团仍可以很好地进行正常发酵、膨胀,烧烤后与通常的面包一样。由此,冷藏生面团制造面包技术可以得到实现。

与生面团冷冻处理不一样,冷藏下理法虽然不适宜于进行长时间保藏,但是,保存期间如果只是几天时间,它在冷却处理等方面所需的费用比冷冻处理要低的多。而且,近来新开发的一些面包种类以及一些新兴产品中,如 Danish Pastry(丹麦酥饼糕点)和奶油蛋糕卷等,原来的加工过程中就包括有冷藏工艺,采用该酵母可以大大地提高产品质量。

另据报道,该酵母菌株已根据布达佩斯特条约取得了一新菌名 FERM BP-3871,保存到日本工业技术院生命工学工业技术研究所实用菌种保藏中心,结合相应的工艺技术和配套工程设备的开发落实,目前已被广泛实际利用。

3 新面包酵母菌株特定基因的分子生物学解析

迄今为止,有关与酵母的低温敏感型突变相关的因素方面的研究已有报告,主要有细胞增殖、细胞周期和 RNA 剪接等。而与发酵代谢方面的分析研究目前还尚未见报道。该



(实验测定酵母细胞在单位时间内摄入用放射线同位素标记的葡萄糖量。以蛋白质含量表示酵母细胞量,每 mg 每分钟摄入的葡萄糖即摄取速度 V , S 是底物葡萄糖的浓度,为 0.2 ~ 100mM, “●”是亲株 KY5649, “□”是 CSF1 基因破坏株)

图2 比摄取速度[(nmol/min/mg protein)/mM]

RZT3 菌株的发酵性能低温敏感性是在什么条件下或通过什么机制形成、表现的呢?为了解释这个疑问,该公司筑波研究所的渡海等人研究了 RZT3 菌株的发酵性能低温敏感性的机理,并且从野生型菌株中克隆出了可以互补 RZT3 菌株的 CSF1 突变(劣性突变)相关的基因,进行分析研究解答了这个问题。

首先,将野生型菌株的基因组染色体 DNA 分离提取后,用限制性内切酶水解成小片段,再用分离可以对于 RZT3 菌株中连接酶分别插入质粒 YCp50 中作成基因文库,然后把它们转化到 csf1 突变菌株克隆,并从中分离可以对于 RZT3 菌株中 csf1 突变进行功能性互补的重组质粒。在对该克隆质粒 DNA 进行全碱基系列分析后,发现其中包含有被称为 csf1 基因的 ORF(开放阅读框)。实际上,换句话说, RZT3 菌株中的 csf1 基因发生了突变。csf1 基因是一个含有 8874 bp 的巨大基因,它编码一个有 2958 个氨基酸的蛋白质分子。

但是,对该基因以酵母基因组数据库进行检索后,发现它相当于基因组中功能不明确的基因组中功能不明确的基因 YLR087C。采用各种数据库进行同源性检索,同样也没能获得可以推定该基因功能的任何信息情报。

由于从现有的基因资源情报探索不能直接了解到 CSF1 基因的功能,他们将野生型菌株的 CSF1 基因进行特异性破坏处理,作出了 CSF1 基因破坏菌株,再分析其特性。该基因破坏菌株与 RZT3 菌株一样显示出低温敏感性,但在 25℃ 以上的温度下发酵能力与野生型菌株之间没有什么差异。由此, CSF1 基因被认为是低温下发酵(增殖)必要的基因。

那么,这一低温敏感型特征是在发酵过程中什么地方形成、又如何体现的呢?这个问题在通过对于酵母细胞摄取葡萄糖能力的分析研究后得到了明确的答复。从图 2 的结果可以看出,该基因被破坏后,使得细胞对于葡萄糖的摄入变成了低温敏感型。如图 2 所示, CSF1 基因破坏菌株在 30℃ 时和野生型酵母菌株的生长速度一样,对于葡萄糖的摄取速率也完

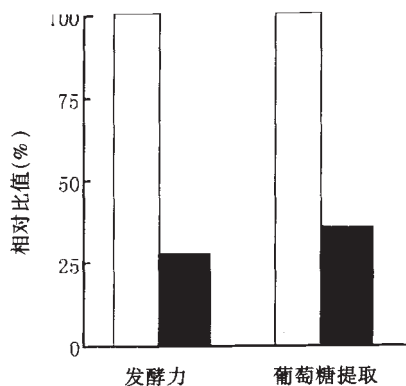


图3 野生型菌株(空一格,100%)和CSF1基因破损菌株(实心格)在低温下发酵力和葡萄糖摄取能力比较

全相同,但是,在10℃的低温下即表现为葡萄糖摄入的低温敏感型,能力显著下降。

图3的结果进一步旁证了CSF1基因对于低温下细胞摄入代谢底物起着重要的影响作用这一事实。CSF1基因破损菌株的葡萄糖摄取在低亲和系与高亲和系都形成低温敏感型,而且,其活性低下与发酵代谢能力的下降之间的相关性非常好。这一结果可以很好地说明,形成发酵性能低温敏感性的原因就是由于葡萄糖提取能力异常低下所引起的。

还有更有趣的是,实验进一步发现了CSF1基因破损菌株不仅在葡萄糖摄取上,而且在亮氨酸摄取和麦芽糖发酵上也显示了低温敏感性。这些物质的摄取系统由于与葡萄糖的摄取系统很不相同,因此,可以认为CSF1基因与低温条件下许多代谢物质的摄取都有直接的联系。

到目前为止,已经有许多低温敏感型突变菌株被报道

过,但是其中大多数突变是发生在细胞分裂或RNA修饰上,像CSF1基因这样与物质摄入相关的性质尚未见报道。而具有这种影响作用的各个因素中,目前主要被研究的有细胞膜的脂肪酸组成及细胞膜质子泵等。微生物及植物等为了适应生长的温度环境,通常通过细胞或体内代谢作用来改变细胞膜的脂肪酸组成以调节膜的流动性。人们为了研究的需要,常常通过人为地设计脂肪酸的组成比例进行实验,并了解到物质摄取时膜及其脂肪酸相对于温度变化会产生相应的变化。但是,在这一研究的预备性分析试验中,看到CDF1基因破损菌株和亲株之间在膜的脂肪酸组成以及低温下细胞质膜中的ATPase活性没有大的差异。因此,可推定CSF1基因是在一种新的机制下作用于低温条件下的物质摄取代谢。而今后的研究发展将为我们说明CSF1基因(及其产物)与低温下物质摄取之间的相关系以及具体的作用机制。

参考文献

- 1 石川日出夫. 食品与科学,1997,(4):97~102.
- 2 井目诚二郎. Japan Food Science, 1997,(1):33~40.
- 3 Kyogoku Y, Ouchi K. Appl. Environ. Microbiol.,1995,61(2):639~642.
- 4 渡海雅也,川崎秀纪,菊池泰弘,大内弘造.平成9年度日本生物工学会大会讲演要旨集,1997,27.
- 5 Tokai M, Kawasaki H, Kikuchi Y, Ouchi K. J. Bacteriol.,2000,182(10):2865~2868.
- 6 川崎秀纪. 生物工学会志,2000,78(2):104.
- 7 川崎秀纪,大内弘造. Bioscience and Industry, 2000,58(1):40~41.

《食品科学》撰稿要求

1. 稿件要求论点明确,论据可靠,数据准确,文字通顺,简练。
2. 稿件要求6000字以内,须有中、英文标题,并可做200字左右的中、英文文摘和3~5个关键词。
3. 来稿内容涉及配方时,须写明配料的名称和配比,勿用代号;工艺过程要完整,不要省略;插图、表格需放在正文的相应地方,不要集中;引用图表要有出处,计量要用法定单位。
4. 凡属于重大科技获奖的论文和国家级省部级资助项目的研究报告、论文,请来稿注明批准号,本刊将优先刊登。
5. 文稿中的参考文献不得超过20条,其格式请按如下规定表达:
[期刊]作者名. 引文题目. 期刊名,年,卷(期):起~止页。
[书籍]作者名. 书名. 出版地:出版单位,年:起~止页。
6. 来稿请注明详细地址和电话,便于通知联系。
7. 来稿请寄:100010 北京市东城区东四南大街礼士胡同161号《食品科学》编辑部
8. 电子信箱(E-mail):chnfood@public.fhnet.cn.net