

## 高适应性面包酵母菌株的杂交选育

刘青 姜天笑 毕琳 肖冬光

(天津科技大学生物工程学院,天津工业微生物重点实验室,天津,300222)

**摘要** 为了改善耐高糖酵母在不同含糖量面团中的发酵力,首先制备了240株耐高糖酵母单倍体,通过高麦芽糖发酵筛选培养基筛选出了28株麦芽糖发酵性能良好的单倍体菌株,通过测定这些单倍体在无糖面团中的发酵力,发现9株单倍体菌株的发酵力优于或等于其亲本,其中4株为a型,5株为 $\alpha$ 型。通过它们之间的杂交得到200株杂交株,在无糖、中糖、高糖面团中测定这些杂交株的发酵力,获得4株在不同含糖量(0~30%)面团中都具有高发酵力的高适应性面包酵母杂交株。研究表明,来自同一亲本单倍体之间的杂交有可能改善面包酵母的某些特征。

**关键词** 面包酵母,发酵力,单倍体,杂交

面包酵母是制作面包的最关键配料,可使面包膨胀,赋予面包更诱人的风味、色泽。衡量商用面包酵母是否优良的重要特性主要有较高产气力,快速发酵能力,耐高渗和耐冷冻特性等等<sup>[1]</sup>。根据在不同含糖量的面团中的发酵特性,可将面包酵母分为耐高糖面包酵母和无糖面包酵母。由于无糖酵母缺乏耐高渗特性,在高糖面团中的发酵性能较差,而耐高糖酵母的麦芽糖发酵能力较低,在无糖面团中发酵性能较差。目前,在市售商品面包酵母中,尚未发现在高糖面团和无糖面团中同时具有良好发酵性能的菌株,但面包生产者在生产过程中,总希望他们使用的面包酵母具有所有优良性状,而且能应用于不同品种的面包产品。耐高糖面包酵母 BY-6 在高糖面团中表现出非常优良的发酵性能(例如发酵速度快、高发酵力等),但在无糖面团中的发酵性能不如其他商用无糖酵母<sup>[2]</sup>,为了改善其在无糖面团中的发酵性能,我们通过耐高糖面包酵母 BY-6 单倍体的杂交,获得了在不同含糖量的面团中发酵性能都良好的高适应性商用面包酵母。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株

耐高糖面包酵母(*S. cerevisiae*) BY-6,本实验室筛选保存;标准交配型 a、 $\alpha$  单倍体菌株。

### 1.2 培养基

YEPD 培养基;产孢培养基:McClary 产孢培养基;高麦芽糖发酵菌株筛选培养基<sup>[4]</sup>:下层为 YPG 培养基(1%酵母膏,2%蛋白胨,2%甘油,2%琼脂);

上层培养基为 10% 麦芽糖,0.2 mg/mL 溴甲酚紫,1%琼脂。

### 1.3 试剂

蜗牛酶,购于联星生物公司。

### 1.4 面团配方

面粉、蔗糖、食盐均为市售,符合国家标准,无糖面团、普通面团、高糖面团配方见表 1。

表 1 面团配方

配料	面团种类		
	无糖面团	普通面团	高糖面团
面粉/g	50	50	50
鲜酵母泥/g	2	2	2
蔗糖/g	0	5	30
食盐/g	0.5	2	0.5
水/g	100	100	100

### 1.5 实验方法

#### 1.5.1 孢子形成及单倍体的制备<sup>[3]</sup>

将面包酵母 BY-6 的酵母泥涂布在 McClary 培养基平板上,28℃ 培养 3~5 d,收集 McClary 培养基上形成子囊的菌体,用 2% 的蜗牛酶 30℃ 水浴处理 60 min,然后 50℃ 水浴处理 10 min,以杀死营养体细胞,将粘连孢子打散后涂布 YEPD 培养基平板,挑取小菌落移种在 McClary 产孢培养基上,28℃ 培养 7 d 后镜检,不产孢子者为单倍体,将单倍体编号,4℃ 保存。

#### 1.5.2 高麦芽糖发酵菌株的筛选

参照 Satoshi<sup>[4]</sup>的方法,单倍体菌株在 YPG 培养基平板上培养 2 d 后,将 10 mL 含 10% 麦芽糖和 0.2 mg/mL 的溴甲酚紫的 1% 琼脂铺到 YPG 培养基上层,并在 30℃ 下保温 15 min。挑选有黄色水解圈的菌落为高麦芽糖发酵菌株。

第一作者:博士研究生,讲师。

收稿时间:2004-10-25

1.5.3 单倍体接合能力与交配型的鉴定<sup>[5]</sup>

与标准 a 型菌株形成哑铃形接合子的待测菌株为 α 型,与标准 α 型菌株接合的待测菌株为 a 型,与 a 型、α 型菌株均不接合的为不育型菌株。

1.5.4 单倍体杂交及杂交株的检出

将 a 型与 α 型单倍体菌株混合接种于 YEPD 液体培养基中,28℃ 静置培养使之接合,24 h 后收集菌体,铺平板,分离单菌落,并在 McClary 产孢培养基上鉴定其产孢能力,具有产孢能力的菌株为杂交株,编号保存。

1.5.5 面团发酵试验

准确称取 2 g 鲜酵母泥加 100 mL 水使之溶解,置于三角瓶中 30℃ 活化 30 min,按照表 1 的面团配方制成无糖、普通、高糖面团,盖上发酵栓后称重,置于 30℃ 温箱静置发酵,以 2 h 失去的 CO<sub>2</sub> 重量来衡量面包酵母的发酵力。

2 结果与讨论

2.1 BY-6 单倍体的制备及高麦芽糖发酵单倍体的筛选

制备面包酵母 BY-6 的单倍体,经过产孢培养基鉴定分离到 240 株单倍体菌株用于此后的研究。由于无糖面团中可供面包酵母发酵的主要碳源为麦芽糖,所以面包酵母进行的代谢途径主要为麦芽糖发酵,而在麦芽糖发酵过程中,α-葡萄糖苷酶(α-glucosidase)和麦芽糖透性酶起到主要作用。根据这 2 种酶分解利用麦芽糖时产酸,而溴甲酚紫遇酸变黄的原理,设计了高麦芽糖发酵菌株筛选培养基<sup>[4]</sup>,如果菌株 α-葡萄糖苷酶和麦芽糖透性酶分泌较多,那么在利用麦芽糖的同时产酸会使菌落周围呈现黄色水解圈,从而筛选出麦芽糖发酵能力高及速度快的单倍体,淘汰了麦芽糖发酵缓慢的单倍体。通过此培养基对 240 株单倍体进行筛选,发现 28 株单倍体菌株菌落周围呈现黄色水解圈,初步认定为高麦芽糖发酵单倍体菌株,并对其进行配型鉴定,其中 13 株为 a 交配型,12 株为 α 交配型,其余为不育型(表 2)。

表 2 发酵麦芽糖单倍体菌株的筛选

菌株	菌株数量及比例	交配型	
		a 型	α 型
单倍体菌株总数	240(100%)	ND	ND
高麦芽糖发酵单倍体菌株	28(11.67%)	13	12
发酵力优于亲本的单倍体菌株	9(3.75%)	4	5

ND: 未检测。

2.2 高发酵力面包酵母单倍体的筛选

由于 BY-6 本身为耐高糖酵母,在高糖面团中的发酵力可达较高水平<sup>[3]</sup>,故只对其单倍体在无糖面团中的发酵力进行了比较,筛选出在无糖面团中具有高发酵力的单倍体菌株。测定了 28 株高麦芽糖发酵单倍体在无糖面团中的发酵能力,结果发现:耐高糖酵母 BY-6 单倍体的发酵能力高低不齐(数据未列出),这暗示了面包酵母的发酵能力由多个基因控制,其中 9 株单倍体菌株在无糖面团中的发酵力优于或等于亲本 BY-6,即 CO<sub>2</sub> 失量 ≥ 0.69 g/2 h,4 株单倍体为 a 型,5 株单倍体为 α 型(表 2)。

2.3 面包酵母单倍体的杂交及杂交株发酵力

通过不同配型的单倍体杂交,挑选具有产孢能力的 200 株杂交株,并测定在无糖、普通、高糖面团中的发酵能力,发现这些杂交株可分为 3 类,第 1 类为在无糖、普通、高糖面团中的发酵力都高于亲本 BY-6,4 株杂交株属于此类,编号为杂交株 ZJ-1(ZJ-4(表 3),杂交株 ZJ-1 在无糖面团中的发酵力高于亲本 30.0%,在普通面团中的发酵力高于亲本 23.75%,在高糖面团中的发酵力高于亲本 9.9%;第 2 类为只在普通、高糖面团中具有高发酵力,而在无糖面团中不具备高发酵力,107 株杂交株属于此类;第 3 类为在无糖、普通、高糖面团中发酵力都较差,72 株属于此类。

表 3 杂交株在无糖、普通和高糖面团中的发酵力

菌株	交配型 (a × α)	面团中 CO <sub>2</sub> 产量 /g·(2h) <sup>-1</sup>		
		无糖面团	普通面团	高糖面团
BY-6		0.69	0.8	0.9
ZJ-1	36 × 14	0.89	0.99	0.99
ZJ-2	42 × 11	0.87	0.95	0.99
ZJ-3	36 × 11	0.88	0.94	0.97
ZJ-4	42 × 11	0.89	0.93	0.9

一般来说,杂交育种是通过来源于不同亲本的单倍体之间的杂交,以达到合并 2 种或多种工业菌株所需的特性的目的<sup>[6]</sup>,但本研究对耐高糖酵母 BY-6 单倍体进行同源杂交,来改善耐高糖酵母在无糖面团中的发酵力。面包酵母的发酵能力在无糖面团中被 MAL 基因家族所控制,在高糖面团中被 SUC 基因家族所控制<sup>[6]</sup>,在营养体的单倍体化与单倍体杂交过程中,这些基因通过分离、移动和重排进行了重新分布,导致了不同杂交株在高糖、普通、无糖面团中发酵力的较大差异,再通过不同含糖量面团中发酵力的筛选,得到高适应性的杂交株。本实验取得成功的关键在于对高麦芽糖发酵单倍体的筛选和无糖面团高发

醇力单倍体的双重筛选,避免了任意单倍体菌株之间的杂交,大大降低了工作量,而且有目的的获得了无糖面团高发酵力单倍体,极大的提高了目的菌株的获得率。

### 3 结 论

(1)通过高麦芽糖发酵筛选培养基与无糖面团中发酵力的双重筛选,得到9株单倍体,通过单倍体的杂交及对杂交株的筛选,获得在不同含糖量面团(0~30%)都具有高发酵力的高适应性面包酵母杂交株,改善耐高糖酵母在不同含糖量面团中的发酵力。

(2)本实验采用了同一亲本单倍体之间的同源杂交,实验证实这种同源杂交通过基因的分离、移动和重排进行重新分布,也有可能改善面包酵母的发酵特

性。

### 参 考 文 献

- 1 Oda Y, Ouchi K. Principal-component analysis of the characteristics desirable in baker's yeast[J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55:1495~1499
- 2 刘 涓,肖冬光.耐高糖酵母的研究[J].食品与发酵工业, 2001, 27(5):13~16
- 3 肖冬光,刘 青.酿酒酵母单倍体制备方法的优化[J].酿酒科技, 2004, 124(4):21~22
- 4 Satoshi N, Kozo O. Construction from a single parent of baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60:3 499~3 502
- 5 杜连祥.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科技出版社, 1992. 217
- 6 Bilinski C A, Casey C P. Developments in sporulation and breeding of brewer's yeast[J]. Yeast, 1989, 5:429~438

## Construction of Baker's Yeast with Good Leavening Activity in Lean, Regular and Sweet Doughs

Liu Qing Jiang Tianxiao Bi Lin Xiao Dongguang

(College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin Industrial Microbiology Key-Lab, Tianjin, 300222, China)

**ABSTRACT** To improve the leavening ability in lean dough of the sweet-tolerant strain BY-6, we selected 28 high-maltose-spore clones by high-maltose-fermentative selected medium. By measuring the gassing power in the dough, 9 spore clones with a good leavening ability in lean dough were obtained and a total of 200 hybrids were constructed by crossing them. Among these hybrids, we obtained 4 strains with good leavening ability in lean, regular and sweet dough comparable to that of strain BY-6. Especially, the gassing power of strain ZJ-1 was 20% more than that its parent from lean, regular and sweet dough. These results suggest that hybridization between spore clones derived from a single parent strain is effective for improving the properties of baker's yeast.

**Key words** baker's yeast, fermentation ability, sporulation, hybridize

信  
息  
窗

### 第九届中国国际食品添加剂展览会在上海光大会展中心成功举办



第九届中国国际食品添加剂展览会于2005年3月17~19日在上海光大会展中心举行。《食品与发酵工业》编辑部在这届展会上成功参展。《食品与发酵工业》期刊在展会上受到各界参观人士的喜爱,展会为期刊开辟了展示的窗口,为编辑部与读者、作者以及广大广告客户之间搭建了沟通的平台。

这届展览会来自比利时、日本、美国、法国、爱尔兰、丹麦、英国、德国、瑞典、新加坡、印度、加拿大、荷兰、瑞典、澳大利亚、韩国、泰国、马来西亚、中国台湾地区、香港地区等118家公司以及国内31个省市自治区的788多家公司参展,国内外展出总面积达35 000m<sup>2</sup>(折合国际标准展位1 800多个),原有展馆已不能容纳现有的参展商,不得不搭建临时展厅,展出规模再创历史新高。在国际展区,许多国际著名的跨国公司带着他们最新产品与技术参展。由比利时瓦隆出口局组织的比利时国家展团是首次参加FIC的展出,带来了9家企业参展;在国内展区,国内食品添加剂、食品配料生产的骨干企业全部参展,展出的展品反映了当今国内外食品添加剂、食品配料行业发展的前沿状况和科研的最新研究成果与技术。