芳香氨基酸转氨酶Aro9过表达增强酿酒酵母耐冻性能

郭伟雄[1]，冯小勇[1]，冯劲[2]，高静[1]，汤阳春[1]，杨搏[1]，汤站[1]，施庆珊[2]，李志成[1*]

（1.广州酒家集团利口福食品有限公司，广东广州 511442）（2.广东省科学院微生物研究所，华南应用微生物国家重点实验室，广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东广州 510070）

摘要：为提高酵母在冷冻环境的存活率，降低冷冻面团的品质劣变。本研究探究芳香氨基酸转氨酶（Aro9）在酵母抗冻的作用，以期提高其在冷冻胁迫下的存活率。通过构建*aro9*过表达菌株（LKF-1-Aro9）与*aro9*敲除菌株（LKF-1-ΔAro9），验证Aro9对酿酒酵母抗冻能力的影响。LKF-1在−20 ℃保存2、5、10和15 d存活率分别为60.76%、56.40%、13.76%、8.63%。LKF-1-Aro9对应为79.97%、67.03%、43.80%、29.30%。经3 d冻藏后，LKF-1，LKF-1-Aro9和LKF-1-ΔAro9到达平台期的时间分别为14，12，21 h。扫描电镜结果显示，在−20 ℃保存7 d后，LKF-1-Aro9的细胞表面结构保持更为完整。此外，在−20 ℃保存3 d后LKF-1和LKF-1-Aro9经碘化吡啶（PI）染色后荧光强度分别为4 096.00，3 336.67，在−20 ℃保存后LKF-1的细胞膜比LKF-1-Aro9受到更大的破坏。同时LKF-1和LKF-1-Aro9胞内脯氨酸分别为0.35和2.19 μg·mg^{-1}。LKF-1-Aro9具有更多的脯氨酸对冷冻环境具有更好的耐受性。同时，LKF-1和LKF-1-Aro9的经结晶紫染色OD_{595}分别为0.242 4和0.279 6，LKF-1-Aro9分泌更多的生物膜对抗外界环境。实验表明，*aro9*基因的过表达提高耐冻性作用与强化细胞膜和生物膜、促进保护性物质脯氨酸的积累密切相关。

关键词：酿酒酵母；耐冻性；芳香氨基酸转氨酶（Aro9）

文章编号：1673-9078(2026)10-67-74 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1697

Overexpression of Aromatic Amino Acid Aminotransferase Aro9 Enhances Freezing Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

GUO Weixiong[1], FENG Xiaoyong[1], FENG Jin[2], GAO Jing[1], TANG Yangchun[1], YANG Bo[1], TANG Zhan[1], SHI Qingshan[2], LI Zhicheng[1*]

(1.Guangzhou Restaurant Group Likofu Food Co. Ltd., Guangzhou 511442, China) (2.Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology, Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

Abstract: To improve yeast survival under freezing conditions and reduce quality deterioration of frozen dough, the role of aromatic amino acid aminotransferase (Aro9) in yeast cryotolerance was investigated. An *aro9*-overexpressing strain (LKF-1-Aro9) and an *aro9* knockout strain (LKF-1-ΔAro9) were constructed to verify the effect of Aro9 on the freezing tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. The survival rates of LKF-1 after 2, 5, 10, and 15 days of storage at −20 ℃ were 60.76%, 56.40%, 13.76%, and 8.63%, respectively, whereas those of LKF-1-Aro9 were 79.97%, 67.03%, 43.80%, and 29.30%, respectively. After 3 days of frozen storage, the times required for LKF-1, LKF-1-Aro9, and LKF-1-ΔAro9 to reach the stationary phase were 14, 12, and 21 h, respectively. Scanning electron microscopy revealed that LKF-1-Aro9 maintained a more intact cell surface structure after 7 days of storage at −20 ℃. Furthermore, after 3 days of storage at −20 ℃, the fluorescence intensities of LKF-1 and LKF-1-Aro9 after propidium iodide staining were 4 096.00 and 3 336.67, respectively, indicating greater cell membrane damage in LKF-1 than in LKF-1-Aro9. After storage at −20 ℃, the intracellular proline contents of LKF-1 and LKF-1-Aro9 were 0.35 and 2.19 μg·mg^{-1}, respectively,

收稿日期：2025-11-27；修回日期：2026-01-07；接受日期：2026-01-13

基金项目：番禺区产业人才政策项目番禺区创新创业领军团队项目（2022-R01-1）

作者简介：郭伟雄（1969-），男，硕士，高级政工师，研究方向：食品加工制造工作，E-mail：lkfkjxm@126.com

通讯作者：李志成（1968-），男，正高级工程师，研究方向：中式面点，E-mail：852412383@qq.com

suggesting that the higher proline accumulation in LKF-1-Aro9 conferred greater tolerance to freezing stress. Additionally, crystal violet staining showed OD_{595} values of 0.242 4 and 0.279 6 for LKF-1 and LKF-1-Aro9, respectively, indicating that LKF-1-Aro9 produced a thicker biofilm that better withstands adverse environmental conditions. In conclusion, overexpression of the *aro9* gene effectively enhances freezing tolerance in *S. cerevisiae*. This improvement was closely associated with enhanced cell membrane integrity, increased biofilm formation, and elevated proline accumulation.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; freezing tolerance; aromatic amino acid aminotransferase (Aro9)

引文格式:

郭伟雄,冯小勇,冯劲,等.芳香氨基酸转氨酶Aro9过表达增强酿酒酵母耐冻性能[J].现代食品科技,2026,42(10):67-74.

GUO Weixiong, FENG Xiaoyong, FENG Jin, et al. Overexpression of aromatic amino acid aminotransferase Aro9 enhances freezing tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 67-74.

当前，冷冻面团行业正迎来快速发展阶段，市场前景广阔。随着现代生活节奏不断加快，消费者对于“即烤即食”类烘焙产品的需求显著增长，冷冻面团逐渐成为家庭烘焙与餐饮企业的理想解决方案。尤其在连锁烘焙店、咖啡厅、快餐店等经营场景中，冷冻面团的应用能有效降低人工成本与原料损耗，大幅提升整体运营效率[1-4]。然而，冷冻面团在加工与储存过程中也面临技术挑战。其中，品质下降的主要原因是冻结及储存期间冰晶的形成与重结晶，这一过程会对面团中的关键成分造成负面影响。特别是在冷冻条件下，酵母的存活率与活性容易降低，进而影响面团最终的发酵性能与成品品质[5-8]。

不少学者提高酵母的耐冻性能，他们主要是通过外援添加各种提取物（如雪蚤抗冻蛋白、鱼载脂抗冻蛋白、海藻糖等）来提高酵母在冷后的存活率[9-12]。也有学者通过分子生物学技术改造酵母菌提高其耐冻性[13-16]。生物膜（Biofilm）是指由微生物（如细菌、真菌、藻类等）及其分泌的胞外聚合物（Extracellular Polymeric Substances, EPS）附着在生物或非生物表面所形成的复杂、结构化的微生物群落。这些胞外聚合物主要由多糖、蛋白质、核酸和脂质组成，形成一个保护性的基质，将微生物细胞黏附在一起并固定在特定表面上。生物膜中的 EPS 为微生物提供了物理屏障。因此生物膜能提高膜内微生物对恶虐环境的耐受性[17-19]。有报道，生物膜也能提高微生物对高温环境的耐受性[20,21]。在生物膜内微生物通过化学信号分子进行交流[22-24]。2-苯乙醇（2-PE）是酿酒酵母中的群体感应（QS）化学信号分子，其刺激生物膜的形成。*aro9* 基因的缺失降低了发酵早期 2-PE 的含量，减少了生物膜的形成[25,26]。如果过表达 *aro9* 基因提高生物膜的量是否也能提高酵母对冷冻环境的耐受性。

本研究以酿酒酵母 LKF-1 为出发菌株，借助同源重组和 CRISPR/Cas9 技术，分别获得 *aro9* 过表达株 LKF-1-Aro9 与缺失株 LKF-1-ΔAro9，系统评价 *aro9* 基因在冷冻胁迫中的功能。通过比较三株菌在 −20 ℃处理后的存活率、恢复生长、表面形貌、膜通透性、细胞壁致密性、生物膜产量及胞内脯氨酸水平，明确 *aro9* 基因对酵母耐冻性的调控作用，为后续耐冷冻工业菌株的精准构建奠定理论与材料基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 菌株和质粒

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）LKF-01，从法国乐斯福燕子牌鲜酵母分离所得。大肠杆菌（*Escherichia coli*）DH5*α* 用于重组质粒克隆的扩增。质粒 bRA66，由美国 Addgene 质粒保藏中心购得。质粒 pAUR123-EGFP 和 pRCC-K，从武汉淼灵生物科技有限公司购得。

1.1.2 培养基

YPD 培养基：葡萄糖 20 g，蛋白胨 20 g，酵母抽提物 10 g，加入 1 000 mL 蒸馏水调，节 pH 值为 7.0。

LB 培养基：蛋白胨 10 g，酵母抽提物 5 g，NaCl 10 g，加入 1 000 mL 蒸馏水调，调节 pH 值为 7.0。

1.2 主要试剂和仪器

酵母碳源基础 YCB，北京酷来搏科技有限公司；2×Rapid Taq Master Mix 和同源重组酶，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；酵母基因组 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、BCA 蛋白定量分析试剂盒和脯氨酸含量检测试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司；限制性内切酶 *Sac*I、*Eco*RV、*Bpl*I，美国赛默飞世尔科技公司；1 $mg·mL^{-1}$ 碘化吡啶（PI）溶液，上海碧云天生物技术有限公司；DNA Marker Ⅲ分子量标准，天根生化科技（北京）有限公司。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences

引物	序列
U-F	CCGGAACCTCTAATCATTCGC
U-R	GATATCACCCGGGTTAGAGAGCTCGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACC
TEF1-F	AACGACCGTACTTGCGAGCTCCCACACACCATAGCTTCAAAATG
TEF1-R	GGCAGAACCAGCAGTCATTTAGATTAGATTGCTATGCTTTCTTTCTAA
D-F	ACTAGTACGTCTCGAGATTATACCTCAAGCACGCAGAGAA
D-R	AACGAACGAGACCTTAACCTACTAAA
aro9-F	AAATGACTGCTGGTTCTGCCCC
aro9-R	GCCCTTGCTCACCATGATATCACTTTTATAGTTGTCAAAAAATTCTTTTATGC
kanMX-F	CGTTAGTATCGAATCGACAGCAGTATAGCGACCAGCATTC
kanMX-R	CTGCGTGCTTGAGGTATAATCTCGAGACGTACTAGTTAGGGATAACAGGGTAATCAGCG
pAUR123-EGFP-F	TCTAACCCGGGTGATATCATGGTGAGCAAGGGCGAGG
pAUR123-EGFP-R	CTGTCGATTCGATACTAACG
pRCC-K-F	TTTAGTAGGTTAAGGTCTCGTTCGTTCACTTTTCGGGGAAATGTGC
pRCC-K-R	GCGAATGATTAGAGGTTCCGGTACCTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
N20-F	TAACGCAGTTGCTCGATAATGTTTT
N20-R	ATTATCGAGCAACTGCGTTAGATCA
U-cas9-F	CCATCATTGGGGTAGGAAAC
U-cas9-R	GGTTTAATCTTCACTGTTCAACTGAGTCGATGAGAGAGTGTA
D-cas9-F	TACACTCTCTCATCGACTCAGTTGAACAGTGAAGATTAAACC
D-cas9-R	GACCATTTAGTTGCTTAGAG

T100 PCR 仪，伯乐生命医学产品有限公司；ECLIPSE E200 显微镜，日本尼康精机有限公司；Multiporator 4308 多功能细胞电穿孔仪，Eppendorf 公司；SYNERGY H1 酶标仪，美国伯腾仪器有限公司；Thermo Scientific Apreo 2s 场发射扫描电镜，美国赛默飞世尔科技公司；JXFSTPRP-4D 三维样品研磨仪，上海净信实业发展有限公司；ZQZY-75BN 振荡培养箱，上海知楚仪器有限公司。

1.3 引物的合成与设计

根据 GenBank 检索酿酒酵母 S288c 的基因组序列（GCA_000146045.2）使用软件 Primer Premier 5.0 设计引物，由北京六合华大基因科技有限公司合成，引物具体信息见表 1

1.4 构建过表达*aro9*基因的酿酒酵母和缺失*aro9*基因的酿酒酵母

aro9 过表达菌株（LKF-1-Aro9）的构建，采用郑会会等报道的方法[27]，通过多片段同源重组系统构建过表达菌株。以酿酒酵母 LKF-1 基因组 DNA 为模板，使用引物 U-F/U-R、D-F/D-R、TEF1-F/TEF1-R 和 aro9-F/aro9-R 分别 PCR 扩增 rDNA 上游同源臂、下游同源臂、*TEF1* 启动子及 *aro9* 基因编码区。以质粒 pRCC-K 为模板，使用引物 kanMX-F/kanMX-R 和 pRCC-K-F/pRCC-K-R 分别扩增 *KanMX* 抗性表达盒与 Amp-ori 片段。以质粒 pAUR123-EGFP 为模板，使用引物 pAUR123-EGFP-F/pAUR123-EGFP-R 扩增 *EGFP* 报告基因和终止子 *ADH1*。将上述扩增的上游同源臂、*EGFP-ADHt*、*KanMX* 片段、下游同源臂及 *Amp-ori* 片段进行重组。将该重组产物热激转化至大肠杆菌 DH5*α*，涂布于含 100 μg·mL^{-1} Amp 的 LB 平板，37 ℃培养后挑取单克隆，使用引物 U-F 与 KanMX-R 进行 PCR 验证，构建初级质粒。对验证正确的质粒进行 *Sac*I 与 *Eco*RV 双酶切，再与 *TEF1* 启动子及 *aro9* 基因进行同源重组，再次将重组产物热激转化入 DH5α，经 Amp 抗性筛选后，以引物 TEF1-F 与 aro9-R 进行 PCR 验证。以正确质粒为模板，使用引物 U-F/D-R 扩增线性化表达盒（结构为：上游同源臂 -*TEF1p-aro9-EGFP-ADH1t-TEF1p-kanMX-TEF1t*-下游同源臂），电转导入酿酒酵母 LKF-1，并在含 200 μg·mL^{-1} 遗传霉素（G418）的 YPD 平板上筛选阳性克隆。进一步以引物 TEF1-F 与 pAUR123-

EGFP-R 对阳性克隆进行 PCR 鉴定。将正确克隆接种至 SC 培养基，30 ℃培养 24 h 后，于荧光显微镜下观察（激发光 465~495 nm，发射光 512~558 nm，物镜 10×），可见明显绿色荧光，表明 ARO9-EGFP 融合蛋白成功表达。最终将该菌株命名为 LKF-1-Aro9。

参照 Levi 等[28]报道的 CRISPR-Cas9 方法进行基因敲除。以 LKF-1 基因组 DNA 为模板，使用引物 U-cas9-F/U-cas9-R 与 D-cas9-F/D-cas9-R 分别扩增 *aro9* 基因上游与下游同源臂，并通过重叠延伸 PCR 拼接为完整修复片段。将针对 *aro9* 设计的 sgRNA 寡核苷酸链 N20-F 与 N20-R 退火成双链，酶连至经 *Bpl*I 酶切的质粒 bRA66 中，构建 CRISPR 敲除载体。将该质粒与上述修复片段共电转至 LKF-1 中，于 200 μg·mL^{-1} 潮霉素－半乳糖 YPD 诱导 Cas9，以 U-cas9-F/D-cas9-R PCR 验证 *aro9* 编码区完全缺失，得敲除菌株 LKF-1-ΔAro9。

1.5 细胞冷冻胁迫及存活率测定

将野生型 LKF-1 与过表达菌 LKF-1-Aro9 以 5%（体积分数）接种量接入 YPD，30 ℃，180 r·min^{-1} 振荡培养 24 h。各取 1 mL 6 500 *g* 离心 3 min 收集菌体，置于 −20 ℃冻存。设定 2、5、10、15 d 三个时间点，室温静置解冻 10 min，加入 1 mL 常温生理盐水，30 ℃孵育 1 h。取 0.1 mL 菌液与 0.9 mL 美蓝染液（0.025 g 亚甲基蓝、0.042 g KCl、0.048 g $CaCl_2·6H_2O$、0.02 g $NaHCO_3$、1 g 葡萄糖，生理盐水定容至 100 mL）混匀，室温染色 10 min，血球计数板镜检：蓝色为死细胞，无色透明为活细胞，计算存活率[29]。

1.6 冷冻后菌体的生长曲线测定

LKF-1、LKF-1-Aro9、LKF-1-ΔAro9 三株均按 5%（体积分数）接菌量于 YPD 中 30 ℃，转速为 180 r·min^{-1} 振荡培养过夜。取 1 mL 菌液，6 500 *g* 离心 5 min 弃上清，菌体在 −20 ℃静置 3 d。解冻后重悬于 1 mL YPD，以 2%（体积分数）接种量转接新鲜 YPD，96 孔板每孔 150 μL，30 ℃静置，酶标仪每小时记录 OD_{600}，绘制恢复生长曲线。

1.7 冷冻−扫描电镜形态

按 1.5 进行菌体培养、菌体收集和冻存。分为 0 d（未冷冻）与 −20 ℃ 7 d 两组。PBS 缓冲液洗涤后，加 2.5%（体积分数）戊二醛 4 ℃固定 4 h。固定后，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，然后 30%~100%（体积分数）乙醇梯度脱水，每次 15 min，冷冻干燥后喷金，3 kV 观察表面形貌。

1.8 膜通透性测定

按 1.5 进行菌体培养、菌体收集和菌体冻存 3 d。用生理盐水调菌浓 OD_{600} 值达到 1.0，取 100 μL 加 1 μL 1 mg·mL^{-1} PI，避光孵育 10 min。孵育后荧光酶标仪检测（Ex：493 nm，Em：636 nm）。

1.9 脯氨酸含量测定

按 1.5 进行菌体培养、菌体收集和菌体冻存 3 d。分别使用生理盐水洗涤菌体 3 次。再加入锆石小珠，使用球磨机破碎菌体。然后将破碎的菌体分成 2 份，1 份使用脯氨酸含量检测试剂盒测脯氨酸含量。另外 1 份使用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测蛋白浓度。

1.10 生物膜的生物量测定

LKF-1、LKF-1-Aro9 两株均按 5%（体积分数）接菌量于含有 100 μL YPD 培养基的 96 孔板中 30 ℃，静置培养。24 h 后，倒去发酵液，再用 PBS 洗涤 96 孔板 3 次去除浮游的菌体。加入 0.05wt.% 结晶紫溶液染色 30 min。染色后，倒去结晶紫，再用去离子水清洗多余的结晶紫。晾干表面水分，每孔加入 100 μL 95%（体积分数）乙醇静置 30 min，测 OD_{595} 值。

1.11 数据分析

所有试验均重复 3 次，使用 Microsoft Office 2013 中 Excel 进行数据统计和显著性分析，数据表示为平均值 ± 标准差，P ＜0.05 被认为具有显著差异，P＜0.01 被认为具有极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 *aro9*基因过表达菌株及敲除菌株鉴定结果

经荧光显微镜观察，转化后的过表达菌株可见均匀绿色荧光（图 1c），表明 ARO9-EGFP 融合蛋白已在 LKF-1-Aro9 中成功表达；以 TEF1-F/pAUR123-EGFP-R 进行 PCR 验证，扩增出 2 597 bp 的单一条带（图 1a），与预期融合片段长度一致。进一步利用 CRISPR-Cas9 系统敲除野生型 LKF-1 的 *aro9* 基因，用引物 U-cas9-F/D-cas9-R 检测，缺失株 LKF-1-ΔAro9 仅得 200 bp 产物，大小等同于上下游同源臂之和，证实 *aro9* 编码区已被完全剔除。而野生型 LKF-1 的 PCR 产物为 1 742 bp，基因 *aro9* 与上下游同源臂序列长度之和大小相同（图 1b）。

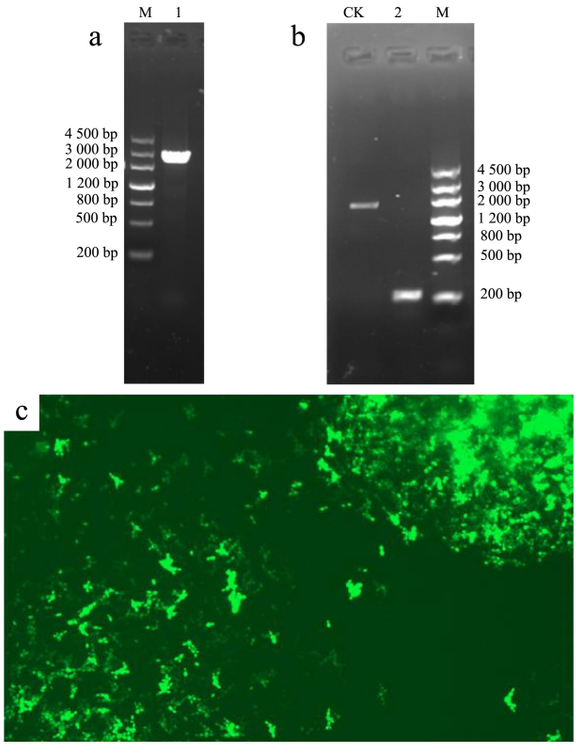


图 1 鉴定 *aro9* 基因过表达菌株及敲除菌株

Fig.1 Identification of the *aro9* overexpression and deletion strains

注：a：PCR 鉴定 LKF-1-Aro9 菌体中 *TEF1-aro9-egfp* 基因的结果；b：PCR 鉴定 LKF-1-ΔAro9 菌体；c：荧光显微镜下的 LKF-1-Aro9 菌体中 *aro9* 基因的结果。M：DNA marker III；CK：LKF-1；1：LKF-1-Aro9 菌体；2：LKF-1-ΔAro9 菌体。

2.2 存活率

图 2 结果显示，在 −20 ℃冷冻 2、5、10 和 15 d 后，LKF-1-Aro9 的存活率分别为 60.77%、56.40%、13.77%、8.63%。LKF-1-Aro9 的存活率分别为 79.97%、67.03%、43.80%、29.30%。在各个时段 LKF-1-Aro9 的存活率均显著高于野生型 LKF-1，提示 *aro9* 基因可提升酿酒酵母在冷冻胁迫下的生存能力。甘油、脯氨酸和海藻糖是常见提高酵母抗冻能力的添加剂。因此不少研究针对酵母对甘油、脯氨酸和海藻糖的代谢途径进行改造提高酵母的耐冻能力。中国学者通过编辑酵母菌海藻糖途径，提高海藻糖的合成量降低海藻糖的降解。该酵母菌冷冻 7 d 后存活率达 70% 以上[13]。日本学者对酿酒酵母菌中 *fps1* 基因敲除，降低菌体内的甘油扩散到外周，从而将酵母冷冻 3 d 后其存活率达 90% 以上[14]。也有日本学者筛选出突变的脯氨酸合成酶的酵母，其冷冻 1 d 后其存活率达 60% 以上[15]。*aro9* 过表达的酵母冷冻后的存活率优于突变的脯氨酸合成酶的酵母。

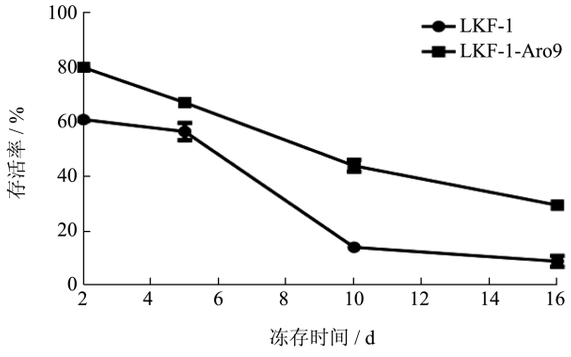


图 2 −20 ℃下不同时间酵母菌的存活率

Fig.2 Survival rate of yeast cells after different storage times at −20 ℃

2.3 生长曲线测定结果

图 3 生长曲线显示，经 -20 ℃冻存 3 d 后重新接种，LKF-1-Aro9，野生型 LKF-1 和 LKF-1-ΔAro9 到达平台期的时间分别为 12、14 和 21 h。LKF-1-Aro9 最先抵达平台期，野生型 LKF-1 次之，LKF-1-ΔAro9 最慢，提示冷冻过后过表达 *aro9* 的菌体活菌数最多、缺失株最少，证实 Aro9 蛋白可显著提升酿酒酵母的耐冻性。

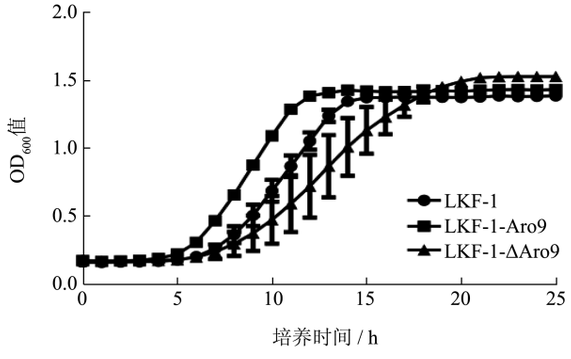


图 3 LKF-1、LKF-1-Aro9 和 LKF-1-ΔAro9 菌株的生长曲线

Fig.3 Growth curves of LKF-1, LKF-1-Aro9, and LKF-1-ΔAro9 strains

2.4 扫描电镜结果

扫描电镜（图 4）显示，0 h 时，LKF-1（图 4a）与 LK-1-Aro9（图 4b）菌体均光滑平整；−20 ℃冻存 7 d 后，两者表面均出现颗粒状附着物（图 4c 和 d），但 LKF-1-Aro9 的颗粒密度显著低于野生株 LKF-1，提示 *aro9* 表达可抑制冷冻诱导的细胞壁 / 膜损伤产物堆积，维持外壁完整性。不少报道增强细胞壁 / 膜能有效提高酵母在冷冻环境下的存活[6,8]。扫描电镜结果也支持这个观点。

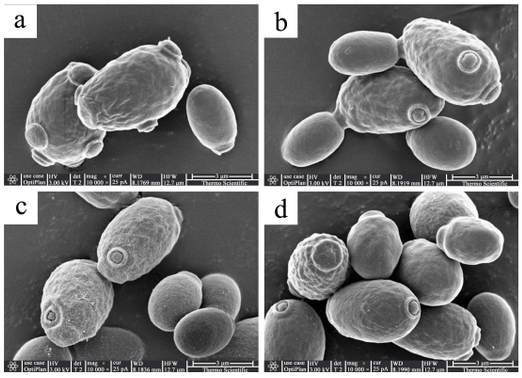


图 4 LKF-1 和 LKF-1-Aro9 在 –20 ℃冷冻不同时间的扫描电镜结果

Fig.4 Scanning electron microscopy of LKF-1 and LKF-1-Aro9 after different freezing durations at −20 ℃

注：（a）0 d 的 LKF-1；（b）0 d 的 LKF-1-Aro9；（c）−20 ℃冷冻 7 d 后的 LKF-1；（d）−20 ℃冷冻 7 d 后的 LKF-1-Aro9。

2.5 细胞的通透性

PI 仅能穿透受损膜并与核内 DNA 结合发出红色荧光。图 5 显示，LKF-1 和 LKF-1-Aro9 的荧光强度分别为 4 096.00 和 3 337.67。在 −20 ℃冷冻后的荧光强度 LKF-1 高于 LKF-1-Aro9，表明 LKF-1 的膜破损更严重。*aro9* 基因表达强化了冷冻胁迫下酵母的膜结构稳定性。这结果与扫描电镜的结果相符。Aro9 酶能将苯丙氨酸脱氨基，脱氨基后可生成苯丙酮酸，后者是合成生育三烯酚的前体。生育三烯酚属于维生素 E 家族，具有脂溶性，其侧链中含有三个不饱和双键，能够有效清除脂质自由基[30]。在冷冻条件下，酿酒酵母细胞膜的流动性降低，导致膜内氧自由基浓度升高[31,32]。生育三烯酚可嵌入细胞膜脂质双层中，清除氧自由基，从而减轻细胞膜的过氧化损伤[33]。因此，*aro9* 基因的过表达有助于酵母在冷冻胁迫下维持细胞膜的完整性和功能。

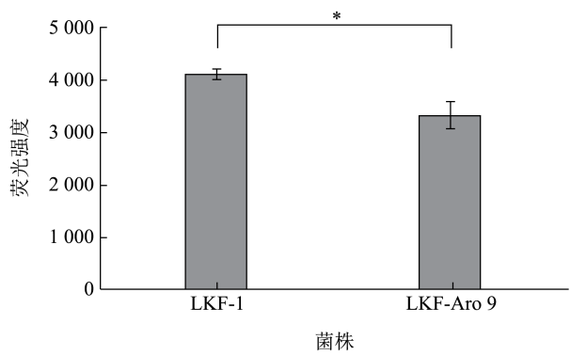


图 5 菌体胞内的荧光强度

Fig.5 Intracellular fluorescence intensity of yeast cells

注：*P＜0.05。下图同。

2.6 脯氨酸含量

图 6 所示在 −20 ℃冷冻后胞内的脯氨酸含量，LKF-1 和 LKF-1-Aro9 的胞内的脯氨酸的含量分别为 0.35 和 2.19 μg·mg^{-1}，LKF-1-Aro9 明显高于 LKF-1。*aro9* 基因表达提高酵母的胞内脯氨酸含量。*aro9* 基因编码芳香族氨基酸转氨酶，主要催化色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸的氨基转移反应[34]。该反应所转移的氨基可为胞内脯氨酸的合成提供氨基来源[35]。而脯氨酸作为一种重要的渗透保护剂，能够增强酵母对低温胁迫的耐受性[36-38]。

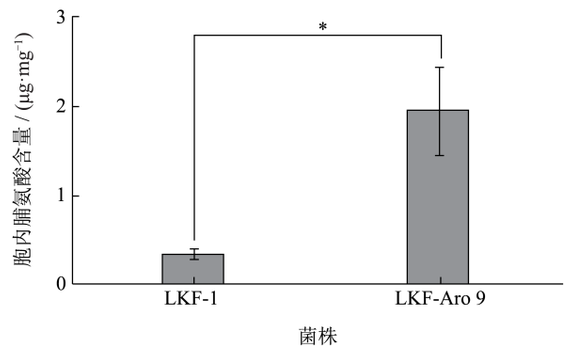


图 6 菌体胞内的脯氨酸的含量

Fig.6 Intracellular proline content of yeast cells

2.7 生物膜的生物量

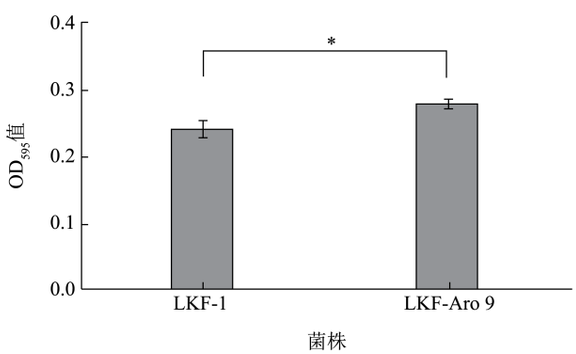


图 7 生物膜的生物量

Fig.7 Biofilm biomass

生物膜能提高微生物对恶虐环境的抵抗性。图 7 所示结晶紫测定生物膜的含量。LKF-1 和 LKF-1-Aro9 的 OD_{595} 分别为 0.242 4 和 0.279 6。静置培养 LKF-1-Aro9 的生物膜量明显高于 LKF-1。*aro9* 基因表达加强了酵母的生物膜的合成。*aro9* 基因所编码的酶是艾氏途径（Ehrlich pathway）中合成 2-PE 的关键酶之一[39]。2-PE 作为一种次级代谢产物，可能作为环境敏感的信号分子，通过特定信号通路调控细胞形态。此外，2-PE 对酿酒酵母生物膜的形成具有促进作用[25,26]。新形隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）在 −20 ℃冷冻

24 h 后生物膜内的菌体存活率是浮游菌的 2 倍以上。生物膜内的菌体对冷冻条件的敏感性显著低于浮游菌体。生物膜的建立可能促进细胞间相互作用而提供环境变化的保护，菌体外周基质则可能作为抵御应激条件的屏障[40,41]。

3 结论

该研究通过构建 *aro9* 过表达菌株和 *aro9* 敲除菌株，确认 *aro9* 基因能提高酿酒酵母抗冻能力。LKF-1-Aro9 的生长延滞期短于野生型 LKF-1，而 LKF-1-ΔAro9 的延滞期则更长。扫描电镜结果显示，冻藏 7 d 后，LKF-1-Aro9 的细胞表面结构比野生型 LKF-1 保持更为完整。此外，与野生型相比，LKF-1-Aro9 形成了更大量的生物膜，PI 渗透率显著更低，同时胞内脯氨酸的积累也更多。*aro9* 基因通过调控细胞膜通透性、促进脯氨酸积累以及增强生物膜形成，多途径协同提高酵母在冷冻处理后的存活率。这为开发耐冻酵母提高开发奠定基础。

参考文献

[1] 张宏康,黄悦怀,张清宇,等.新型面包加工研究进展[J].农产品加工,2023,4:91-100.

[2] 闫晓靖,曲锴锐,叶松,等.中高速增长新常态下五大趋势推动烘焙产业蓬勃发展[J].中国食品安全,2024,10:37-40.

[3] 杨千慧,吕莹果,刘安伟,等.冷冻烘焙技术及冷冻蛋糕研究进展[J].江苏调味副食品,2025,1:12-17.

[4] 李逸,田晓红,谭斌,等.全麦冷冻面团研究进展[J].粮油食品科技,2024,32(1):59-65.

[5] 曹蒙,周舟,刘晓媛,等.冻融循环对冷冻面团及其面条品质的影响[J].粮食与油脂,2025,38(7):15-21.

[6] ARIAS A C, BPBADILLA C A F, DOMINGUEZ C M Z. Cryoprotectants for frozen dough: a review [J]. Food Biophysics, 2024, 19: 18-28.

[7] BAN C, YOON S, HAN J, et al. Effects of freezing rate and terminal freezing temperature on frozen croissant dough quality [J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 73: 219-225.

[8] LUO W H, SUN D W, ZHU Z W, et al. Improving freeze tolerance of yeast and dough properties for enhancing frozen dough quality-a review of effective methods [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 72: 25-33.

[9] 钟文倩,颜倩倩,胡瑞芹,等.雪蚤抗冻蛋白HhAFP在毕赤酵母中的表达及其抗冻作[J].农业生物技术学报,2024,32(12):2848-2858.

[10] 耿嫦慧.鱼载脂抗冻蛋白在毕赤酵母中的胞内表达[J].生物化工,2025,11(1):95-101.

[11] 周洁,周惠明.添加海藻糖对酵母抗冻能力的影响[J].食品工业科技,2004,11:64-66.

[12] 刘玫.重组抗冻蛋白对冷冻面团品质劣变的干预及其机制研[D].无锡:江南大学,2018.

[13] SUN X, ZHANG C Y, WU M Y, et al. *MAL62* overexpression and *NTH1* deletion enhance the freezing tolerance and fermentation capacity of the baker's yeast in lean dough [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(54): 1-8.

[14] IZAWA S, IKEDA K, MAETA K, et al. Deficiency in the glycerol channel Fps1p confers increased freeze tolerance to yeast cells: application of the *fps1*Δ mutant to frozen dough technology [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 66: 303-305.

[15] TSOLMONBAATAR A, HASHIDA K, SUGIMOTO Y, et al. Isolation of baker's yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 238(5): 233-240.

[16] TANGHE A, DIJCK PV, DUMORTIER F, et al. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5981-5989.

[17] 陈志娜,李映花,曾海燕,等.生物膜对消毒剂抗性研究进展[J].中国消毒学杂志,2024,41(8):618-621.

[18] METZGER G A, RIDENHOUR B J, FRANCE M, et al. Biofilms preserve the transmissibility of a multi-drug resistance plasmid [J]. npj Biofilms and Microbiomes, 2022, 8: 1-10.

[19] CIOFU O, MOSER C, JENSEN P Ø, et al. Tolerance and resistance of microbial biofilms [J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20: 621-635.

[20] ALMATROUDI A, TAHIR S, HU H, et al. *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are more resistant to heat treatment than traditional hydrated biofilms [J]. Journal of Hospital Infection, 2018, 98(2): 161-167.

[21] ZHAO W Y, ZHENG S K, YE C S, et al. Nonlinear impacts of temperature on antibiotic resistance in *Escherichia coli* [J]. Environmental Science and Ecotechnology, 2024, 22: 1-5.

[22] PLAKUNOV V K, MART'YANOV S V, TETENEVA N A, et al. Controlling of microbial biofilms formation: Anti- and probiofilm agents [J]. Microbiology, 2017, 86: 423-438.

[23] ARANSIOLA S A, SELVARAJ B, MADDELA N R. Bacterial biofilm formation and anti-biofilm strategies [J]. Research in Microbiology, 2024, 175(3): 1-2.

[24] KILIC T, BALI E B. Biofilm control strategies in the light of biofilm-forming microorganisms [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 39: 1-22.

[25] AVBELJ M, ZUPAN J, KRANJ L, et al. Quorum-Sensing Kinetics in *Saccharomyces cerevisiae:* a symphony of *ARO* genes and aromatic alcohols [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(38): 8544-8550.

[26] ZHANG D L, WANG F J, YU Y, et al. Effect of quorum-sensing molecule 2-phenylethanol and *ARO* genes on *Saccharomyces cerevisiae* biofilm [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105: 3635-3648.

[27] ZHENG H H, WANG K, XU X X, et al. Highly efficient rDNA-mediated multicopy integration based on the dynamic balance of rDNA in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbial Biotechnology,

2022, 15(5): 1511-1524.

[28] LEVI O, ARAVA Y. Expanding the CRISPR/Cas9 toolbox for gene engineering in *S. cerevisiae* [J].Current Microbiology, 2020, 77:468-478.

[29] GB/T 20886.1-2021,酵母产品质量要求:第1部分 食品加工用酵母[S].

[30] SHEN B, ZHOU P P, JIAO X, et al. Fermentative production of Vitamin E tocotrienols in *Saccharomyces cerevisiae* under cold-shock-triggered temperature control [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1-14.

[31] CHEN A. Enhancing freeze-thaw tolerance in baker's yeast: strategies and perspectives [J]. Food Science and Biotechnology, 2024, 33: 2953-2969.

[32] KRONBERG M F, TERLIZZI N L, GALVAGNO M A. Specific antioxidant enzymes are involved in the freeze-thawing response of industrial baker's yeasts [J]. Letters in Applied Microbiology, 2023, 76(10): 1-7.

[33] SERGI M B, SANDRA P, FENOLLOSA E, et al. Vitamin E protects from lipid peroxidation during winter stress in the seagrass *Cymodocea nodosa* [J]. Planta, 2022, 255(41): 1-13.

[34] IRAQUI I, VISSERS S, CARTIAUX M, et al. Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae ARO8* and *ARO9* genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1998, 257: 238-248.

[35] BRUNKE S, SEIDER K, RICHTER M E, et al. Histidine degradation via an aminotransferase increases the nutritional flexibility of *Candida glabrata* [J]. Eukaryot Cell, 2014, 13(6): 758-765.

[36] 宋振玉,李楠,张姝,等.低糖适应性耐冻酵母菌与普通酵母菌细胞构成成分的比较[J].中国酿造,2009,6:57-61.

[37] TERAO Y, NAKAMORI S, TAKAGI H. Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11): 6527-6532.

[38] DONG J, CHEN D D, WANG G L, et al. Improving freeze-tolerance of baker's yeast through seamless gene deletion of *NTH1* and *PUT1* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(61): 817-828.

[39] 陈先锐,王肇悦,何秀萍.酵母菌合成2-苯乙醇的研究进展[J].生物工程学报,2016,32(9):1151-1163.

[40] LIU J C, WU S Y, FENG L F, et al. Extracellular matrix affects mature biofilm and stress resistance of psychrotrophic spoilage *Pseudomonas* at cold temperature [J]. Food Microbiology, 2023, 112: 1-9.

[41] MARTINEZ L R, CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(14): 4592-4601.