

吡哆醇对鲁氏接合酵母高盐胁迫耐受的影响

陈 胜, 王文欣, 刘子雄, 宋庆怡, 上官玲玲, 姚婉婷, 陈 雄, 代 俊*

(湖北工业大学 生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

摘要: 为了提高鲁氏接合酵母抗高盐胁迫能力, 作者探索了添加吡哆醇对鲁氏接合酵母高盐胁迫耐受的影响。通过测量甘油、海藻糖含量以及 Na^+/K^+ -ATP 酶活性等一系列生理表征来验证鲁氏接合酵母高盐适应性的变化。实验结果表明, 鲁氏接合酵母在高盐胁迫条件下外源添加吡哆醇, 在延滞期时, 菌株提前 24 h 积累细胞内甘油, 并且加快了细胞内海藻糖分解代谢速率; 在对数期时, 细胞内钠钾比率(Na^+/K^+)降低 82.3%, 细胞膜上 Na^+/K^+ -ATP 酶活性增加 16.9%, 2-苯乙醇产量提高 6.42 倍; 在稳定期时, 生物量提高 10.6%, 乙醇产量提高 5%, 2-苯乙醇产量提高 1.26 倍。综上所述, 吡哆醇的添加能有效提高鲁氏接合酵母的高盐胁迫耐受能力, 进一步增强了鲁氏接合酵母在酱油等高盐发酵食品中的应用前景。

关键词: 鲁氏接合酵母; 吡哆醇; 高盐胁迫; 食品发酵; 2-苯乙醇

中图分类号: Q815 文章编号: 1673-1689(2023)09-0036-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20211217003

Effect of Pyridoxine on Salt Tolerance in *Zygosaccharomyces rouxii*

CHEN Sheng, WANG Wenxin, LIU Zixiong, SONG Qingyi, SHANGGUAN Lingling,
YAO Wanting, CHEN Xiong, DAI Jun*

(School of Biological Engineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

Abstract: To improve the salt tolerance of *Zygosaccharomyces rouxii* (*Z. rouxii*), the effect of pyridoxine on the tolerance to high salt stress of *Z. rouxii* was explored. A series of physiological characterization tests, including measurements of glycerol, trehalose levels and Na^+/K^+ -ATPase activity, were carried out to verify the changes of high-salt adaptability of *Z. rouxii*. The experimental results indicated that yeast cells during the lag phase under high salt stress accumulated intracellular glycerol 24 hours in advance and accelerate the catabolism rate of intracellular trehalose by addition of pyridoxine. In the mid-logarithmic growth phase, the ratio of intracellular Na^+/K^+ decreased by 82.3%, while the activity of Na^+/K^+ -ATPase on cell membrane increased by 16.9%. Additionally, the production of 2-phenylethanol increased by 6.42-fold. In the stable phase, the biomass increased by 10.6%, the ethanol production increased by 5%, and the 2-phenylethanol production increased by 1.26-fold. In conclusion, the addition of pyridoxine could effectively improve the high salt stress tolerance of *Z. rouxii*, and further enhance the application prospect of *Z. rouxii* in high-salt fermented

收稿日期: 2021-12-17 修回日期: 2022-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31871789, 41876114)。

* 通信作者: 代 俊(1982—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事功能酵母与酿造微生物研究。E-mail: jundai@hbut.edu.cn

foods such as soy sauce.

Keywords: *Zygosaccharomyces rouxii*, pyridoxine, high salt stress, food fermentation, 2-phenylethanol

酱油作为我国最受欢迎的调味品之一,它是以蛋白质和淀粉为原料,经微生物发酵作用酿造而成的一种产物,具有独特、浑厚、浓郁的风味,已经成为人们生活中不可或缺的调味品之一^[1]。在酱油发酵过程中,酵母这类微生物具有产香、增鲜特性,能使酱油的风味更加良好^[2]。但是高盐稀态法酿造酱油需要在高盐的环境下才能实施,因此研究酵母抗高盐胁迫的能力是提高酱油风味的重要途径之一。鲁氏接合酵母作为典型的耐盐性酵母^[3],可以应用于食品发酵中产生独特的香气与风味物质,但为了更好地适应高盐环境,还需要进一步提高鲁氏接合酵母抗高盐胁迫的能力。

关于鲁氏接合酵母的耐盐机制前人已有探索,发现其耐盐性主要与细胞壁和细胞膜组成成分和形态、Na⁺转运系统、细胞内生物相容性物质以及抗氧化还原能力有关^[4]。为了增加发酵食品的风味,进一步深入研究鲁氏接合酵母的耐盐机制是至关重要的。

前人通过外源添加物质来改变鲁氏接合酵母的代谢性质,比如添加 D-果糖来改变呋喃酮代谢机制^[5],因此作者通过添加外源物质来提高鲁氏接合酵母对高盐环境的适应性。已有文献报道,维生素 B₆(vitamin B₆, VB₆)能够调节酵母细胞信号传导,调节细胞膜上离子通道,增强细胞抗胁迫能力等^[6]。VB₆作为一种营养丰富的物质,添加后能提供发酵菌株更好的生长^[7];而且,VB₆还能提高细胞活性,提高发酵菌株的抗逆性。VB₆是由吡哆醇(PN)、吡哆醛(PL)、吡哆胺(PM)及其磷酸化衍生物在细胞内相互转化形成的^[8],并且磷酸吡哆醛(PLP)是由 PN、PL 或 PM 形成的最主要的活性形式,还能在氨基酸代谢过程中行使辅酶的作用^[9];吡哆醇的生物合成也与硫胺素相互联系^[8]。近年来,植物中已证明维生素 B₆可作为活性氧自由基(ROS)清除剂,具有增加对生物和非生物胁迫抗性因子的附加功能^[10]。由此考虑吡哆醇作为提高鲁氏接合酵母耐盐性营养物质的可能性。

目前,国内外已有报道阐明了维生素对动植物

的影响,不仅可以增强植物抗氧化能力,并且还可对动物的免疫功能产生影响^[11-12],但外源添加维生素对鲁氏接合酵母耐盐性影响的探究还比较少,因此本研究中主要是基于前期调研基础上,通过在高盐胁迫条件下,研究外源添加吡哆醇对菌株的生长状况、产甘油和海藻糖等生物相容性物质的能力、转运 Na⁺的能力等生理代谢过程的影响,进一步提高鲁氏接合酵母在增强发酵食品比如酱油风味品质的应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株

鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*) A 菌株:中国典型培养物保藏中心提供,保藏号为 CCTCCM 2013310^[13],由作者所在实验室分离保藏。

1.2 材料与仪器

YEPD 培养基:20 g/L 葡萄糖,20 g/L 蛋白胨,10 g/L 酵母浸粉。固体培养基则另加入 20 g/L 琼脂。根据盐质量浓度的不同分别加入 18 g/dL NaCl 或者 14 g/dL NaCl,115 ℃灭菌 20 min。

酵母浸粉:安琪酵母公司产品;葡萄糖、NaCl、无水乙醇、3,5-二硝基水杨酸:国药集团产品;蛋白胨:北京双旋微生物培养基制品厂产品;吡哆醇、三氯乙酸:上海麦克林公司产品;甘油含量测定试剂盒:北京普利莱公司产品;腺苷三磷酸酶试剂盒:南京建成生物工程研究所产品。

UV-722 型紫外可见分光光度计:上海精密科学仪器公司产品;YXQ-LS-100S II 型高压蒸汽灭菌锅、SPX-150D 型恒温生化培养箱:上海博讯实业公司产品;5810R 型高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;SBA-90 型生物分析传感仪:山东省科学院生物研究所提供;Synergy H1 全功能酶标仪:美国伯腾仪器公司产品;ZA3300 型原子吸收光谱仪:日本 HITACHI 公司产品;7890B 型气相色谱仪、Ultimate 3000 型高效液相色谱仪:赛默飞世尔科技公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化及培养条件 首先将鲁氏接合酵母菌种活化于 YEPD 培养基, 间隔 24 h 后再次活化得到次级种子液, 然后取次级种子液按照体积分数 5% 的接种量分别接种于含有 2 g/L 吡哆醇、18 g/dL NaCl 的 YEPD 培养基 (实验组) 和不添加吡哆醇的 YEPD 培养基中 (对照组), 最后在 30 °C、200 r/min 条件下发酵培养并取各个生长阶段的样品测定各项生理生化特征数据。

1.3.2 吡哆醇质量浓度的确定 为了更明显地看出不同质量浓度吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母生长的影响, 避免在含 18 g/dL NaCl 的 YEPD 平板上生长区分度不高, 因此降低盐质量浓度, 采用了含 14 g/dL NaCl 的 YEPD 平板进行后续实验。先将次级种子液稀释到 OD_{600 nm} 为 1, 然后按照 10、100、1 000 倍梯度稀释, 之后取 0.8 μL 点样于添加 6 种梯度质量浓度吡哆醇 (0~2 g/L) 的含 14 g/dL NaCl 的 YEPD 固体培养基上, 最后 30 °C 恒温培养 60 h, 观察菌落的生长状况。

1.3.3 生物量的测定 取 5 mL 摇瓶发酵液, 5 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 加 5 mL 去离子水重悬酵母细胞, 相同条件离心水洗 3 次, 最后用 5 mL 去离子水重悬细胞, 稀释后以去离子水为对照在紫外可见光分光光度计 600 nm 处进行比色测定, 光密度 OD_{600 nm} 为 OD 读数与稀释倍数的乘积。

1.3.4 细胞干质量的测定 分别用电子天平称量干燥的离心管质量以及 5 mL 摇瓶发酵液经过离心洗涤烘干至质量恒定的离心管和菌体的总质量, 利用两者之差计算出每毫升发酵液的细胞干质量。

1.3.5 葡萄糖质量浓度的测定 取 2 mL 摇瓶发酵液, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液采用 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS) 测定发酵液中葡萄糖的质量浓度^[14]。

1.3.6 乙醇产量的测定 取 2 mL 摇瓶发酵液, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液使用 SBA-90 型生物分析传感仪测量^[15]。

1.3.7 甘油含量的测定 使用甘油含量测定试剂盒测定细胞内外甘油的含量。

1.3.8 细胞内海藻糖质量分数的测定 取 5 mL 摇瓶发酵液, 5 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 用冰水清洗 3 次后收集菌体。在菌体中加入 4 mL

0.5 mol/L 的三氯乙酸, 振荡均匀后置于冰水混合物中, 每 15 min 振荡一次, 1 h 后于 3 000 r/min 离心 5 min, 吸取 1 mL 上清液于试管中, 加入 5 mL 硫酸蒽酮, 沸水浴 10 min, 冷却后于 630 nm 处测定 OD 值。再制作海藻糖标准曲线, 将样品测得的 OD_{630 nm} 值根据标准曲线计算出海藻糖质量分数, 以细胞干质量计^[16]。

1.3.9 细胞内钠钾比率 (Na⁺/K⁺) 的测定 使用原子吸收光谱仪测定细胞内的钠和钾离子的质量浓度^[13]。

1.3.10 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性的测定 采用腺苷三磷酸酶试剂盒测定, 结果以蛋白质质量计^[13]。

1.3.11 2-苯乙醇产量的测定 取 1 mL 摇瓶发酵液, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 用 0.22 μm 有机系滤膜过滤, 采用高效液相色谱法测定 2-苯乙醇的产量。检测条件为 Venusil MP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm), 进样量为 10 μL, 流动相中甲醇与水体积比为 6:4, 流量为 0.6 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 210 nm, 检测时间为 20 min^[17]。

1.3.12 统计分析 采用 Origin 9.0、GraphPad Prism 5 等软件对数据进行处理并绘图, 显著性水平设置为 1%。实验均重复 3 次, 图表中数据结果用“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 促进鲁氏接合酵母生长的最佳吡哆醇质量浓度的确定

吡哆醇主要是通过进入细胞内转化成磷酸吡哆醛 (PLP) 的活性形式来作为相关反应酶的辅酶或者底物, 从而参与各种合成代谢反应。鲁氏接合酵母可以耐受 18 g/dL 的 NaCl, 但基于前期基础, 为了使酵母生长实验结果对比更加明确, 本实验中选用了含 14 g/dL NaCl 的 YEPD 固体培养基来探究添加不同质量浓度的吡哆醇对鲁氏接合酵母生长的影响, 结果如图 1 所示。结果表明, 鲁氏接合酵母在不同质量浓度吡哆醇的影响下, 外源添加 2 g/L 吡哆醇时的生长状况最好, 而其他质量浓度对鲁氏接合酵母的促生长作用并不明显。没有做更高质量浓度下吡哆醇的促生长作用是因为 2 g/L 的质量浓度相对较高, 再提高质量浓度已经不再适合工业上扩大生产。所以最终选取外源添加 2 g/L 的吡哆醇来探究其对鲁氏接合酵母抗高盐胁迫机制的影响。

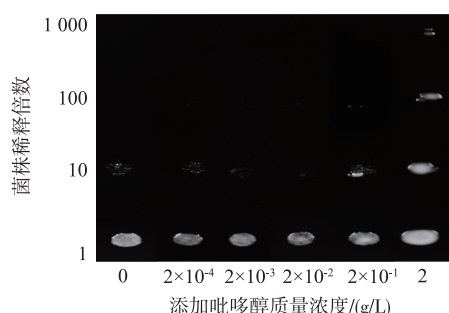


图1 不同质量浓度吡哆醇对鲁氏接合酵母生长的影响

Fig. 1 Effect of pyridoxine with different concentrations on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii*

2.2 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞生长和葡萄糖消耗的影响

鲁氏接合酵母在生长过程中伴随着糖类物质的消耗,从而提供能量供自己生长以及产生其他物质如乙醇、甘油等来应对外界胁迫的压力。探究在含 18 g/dL NaCl 的 YEPD 液体培养基中添加吡哆醇对鲁氏接合酵母细胞生长和葡萄糖消耗的影响,结果如图 2 所示。在对照组中,鲁氏接合酵母经历了 36 h 的延滞期后才进入对数期快速生长,葡萄糖也是刚好在 36 h 被快速消耗。与对照组相比,实验组消耗葡萄糖的速度更快,进入对数期的时间也提前了 24 h,相当于缩短了 2/3 的延滞期,并且从图中可以判断出在 72 h 后两者进入稳定期,此时对照组与实验组的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值分别为 9.4、10.4,生物量提高了 10.6%,表明吡哆醇的添加不仅可以缩短延滞期的时间,还可以促进鲁氏接合酵母的生物量积累。

在 12 h 内,实验组的葡萄糖质量浓度降低了 8%,但 $OD_{600\text{ nm}}$ 值总体变化很小,这种现象表明添加吡哆醇能够促进鲁氏接合酵母对葡萄糖的利用,生物量变化很小,进一步说明对葡萄糖的利用更可能用于合成维持细胞渗透压稳定的物质来抵抗外界的胁迫。细胞内主要是甘油和海藻糖等物质,合成的这些物质可以提高鲁氏接合酵母在高盐胁迫下的耐受性。但这只是初步推测,吡哆醇的添加能否加快葡萄糖的代谢来用于合成甘油以及海藻糖等物质还需下一步实验来判断。而在 12 h 之后随着葡萄糖的不断消耗,生物量快速增加,这种现象表明,添加吡哆醇能加快生物代谢,促进葡萄糖的吸收利用。磷酸吡哆醛是吡哆醇的活性形式,在 140 多种不同的酶反应中行使辅因子功能,在酵母的生长代谢中发挥重要作用^[18]。因此,在高盐胁迫下添加吡哆

醇能够加快氨基酸代谢刺激酵母的生长,合成相关物质维持细胞的渗透压平衡。

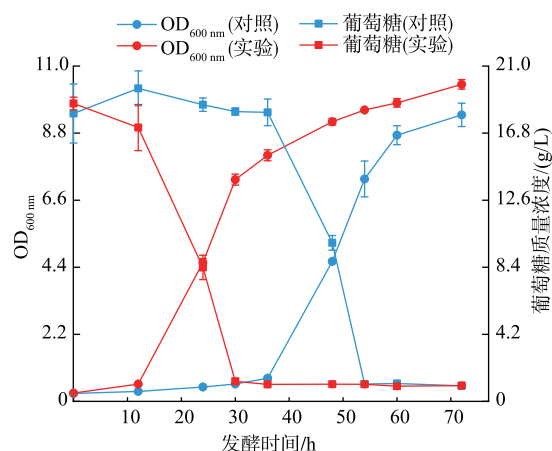


图2 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞生长和葡萄糖消耗的影响

Fig. 2 Effect of pyridoxine on cell growth and glucose consumption of *Zygosaccharomyces rouxii*

2.3 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母乙醇产量的影响

乙醇作为来源广泛、清洁、可再生的燃料,有利于发展绿色循环经济。在酱油生产过程中,乙醇有利于酱油的保存^[19],提高乙醇产量可提高酱油的质量。添加吡哆醇对鲁氏接合酵母乙醇产量的影响如图 3 所示。结果表明,添加吡哆醇的实验组在刚进入对数期后乙醇产量大幅度提高,随着葡萄糖的消耗,乙醇产量从 12 h 的 0.15 g/L 涨到最大值 30 h 的 4.20 g/L,当葡萄糖几乎消耗完时,乙醇产量才逐渐下降。与对照组相比(对照组乙醇产量最大达到 4.00 g/L),乙醇产量增加了 5%。

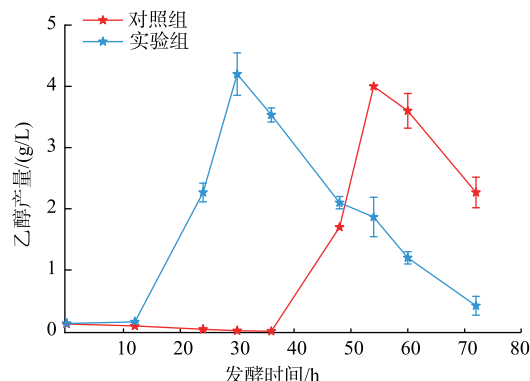


图3 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母乙醇产量的影响

Fig. 3 Effect of pyridoxine on the ethanol production of *Zygosaccharomyces rouxii*

上述实验结果表明外源添加吡哆醇可以提高鲁氏接合酵母的乙醇产量,这可能是因为氨基酸代谢形成的碳骨架有利于糖的合成,为糖酵解途径产生乙醇提供了可能^[20]。而且芳香族氨基酸代谢有利于提高菌株对乙醇的耐受性从而增加乙醇的产量^[21]。外源添加吡哆醇还可以促进硫胺素的合成^[8],硫胺素焦磷酸能作为辅助因子促进丙酮酸脱羧形成乙醛,乙醛进一步还原成乙醇,进而提高乙醇的产量^[13]。

2.4 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母甘油含量和细胞内海藻糖质量分数的影响

甘油和海藻糖作为重要的生物相容性物质,在鲁氏接合酵母受到高盐胁迫时会发挥关键的作用。比如拥有较好亲水性能的多羟基的甘油,能够维持细胞内的水分活度,平衡细胞内外的渗透压,并且高渗甘油(high osmolarity glycerol, HOG)应答途径是真核细胞应答高渗透压胁迫的关键响应机制^[22],能让细胞在高盐条件下避免脱水死亡。海藻糖是一种典型的应激代谢产物,由于其特殊的物理性质和稳定的化学结构,在酵母细胞面临高渗透压等恶劣环境时形成一层保护膜,能有效地保护酵母细胞结构不被破坏;此外海藻糖的水解还可为蛋白质恢复活性提供能量,从而维持酵母细胞在胁迫条件下的生存^[23]。因此,甘油和海藻糖的含量变化关系着酵母细胞抗逆性的强弱。探究在高盐胁迫下吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞内外甘油含量的影响,结果如图4所示。由图4(a)可知,对照组在前48 h内,细胞内甘油随着葡萄糖的消耗而稳定地合成,在48 h时达到最大积累量(48.81 mg/g,以细胞干质量计),此时鲁氏接合酵母刚好进入对数期中期,细胞快速生长,之后细胞内甘油代替葡萄糖作为碳源快速消耗,以维持细胞继续生长。在实验组中,添加吡哆醇后,鲁氏接合酵母细胞内甘油在24 h时达到最大积累量(45.46 mg/g),随后也如对照组一般快速消耗,但两组每克干细胞所积累甘油的最大值并无明显差别($P>0.05$)。这说明在吡哆醇的外源添加影响下,鲁氏接合酵母能在高盐高渗环境中提前激活HOG 应答途径,从而提前合成和积累甘油,为延滞期细胞提供更多地保护,平衡细胞内的渗透压,以尽快适应高盐高渗环境。

吡哆醇的添加对细胞外甘油的影响如图4(b)所示。实验组在前30 h内细胞外甘油不断积累,且在30 h达到最大值13.95 mmol/L,随后快速消耗。

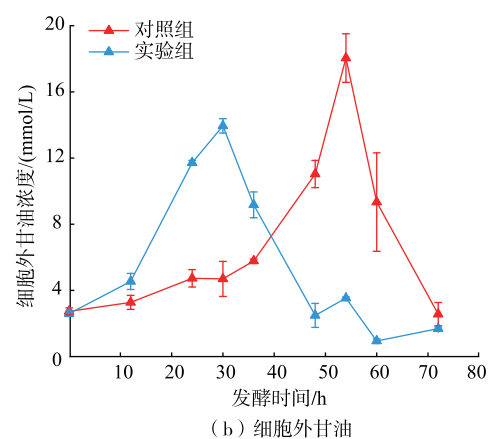
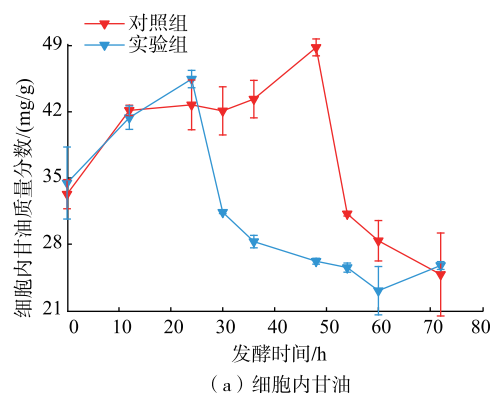


图4 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞内外甘油含量的影响

Fig. 4 Effect of pyridoxine on the intracellular and extracellular glycerol content of *Zygosaccharomyces rouxii*

而对照组细胞外甘油在前54 h内积累,在54 h达到最大值18.05 mmol/L,比实验组高出29%。这表明在细胞刚开始生长时,葡萄糖作为主要碳源被消耗,从而细胞外甘油开始积累,而在葡萄糖消耗完后,细胞外甘油可以被吸收到细胞内作为迟效碳源继续供细胞生长。在高盐高渗条件下,外源添加吡哆醇后,鲁氏接合酵母细胞能够促进细胞外甘油进入细胞,从而达到更多的生物量,并且还可以更好地平衡渗透压,使细胞在高盐高渗条件下生存下去,提高酵母耐盐性。

吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞内海藻糖质量分数的影响如图5所示。实验组和对照组细胞内海藻糖都在前12 h快速消耗,并且在前48 h内,实验组的海藻糖比对照组的海藻糖消耗的更多,分解速率更快,由此可知外源添加吡哆醇后,细胞内海藻糖消耗加快,为细胞代谢提供碳源,这是因为

吡哆醇会参与氨基酸的各种反应,促进酵母细胞的生长代谢,从而加速海藻糖的吸收利用。

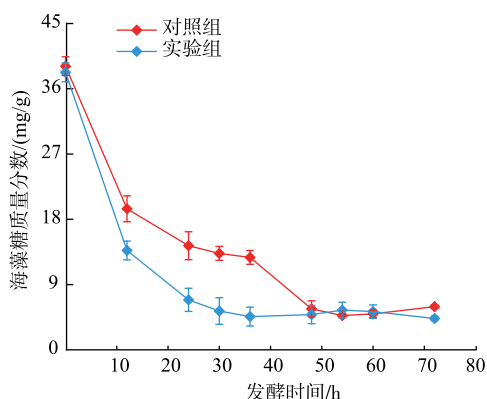


图5 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞内海藻糖质量分数的影响

Fig. 5 Effect of pyridoxine on the intracellular trehalose content of *Zygosaccharomyces rouxii*

高盐胁迫条件下,酵母会产生一些生物相容性物质来平衡渗透压,以防止细胞失水死亡或维持细胞内各种稳态。甘油和海藻糖作为经典的渗透调节物质,从实验结果来看,鲁氏接合酵母更依赖于甘油的富集来对抗高盐的胁迫,而并非海藻糖的积累。在高盐胁迫条件下,添加吡哆醇后,鲁氏接合酵母细胞内甘油合成明显提前,细胞外甘油外排减少,从而提高细胞在高盐条件下的适应性。而对于海藻糖而言,添加吡哆醇后,消耗反而增加,这表明外源添加的吡哆醇会促进海藻糖作为碳源被消耗,而非将其作为保护性物质,但其加速消耗也为酵母生长提供了有利条件。上述结果表明,鲁氏接合酵母在高盐胁迫条件下主要是利用甘油的生物相容性来增强其抗胁迫的能力,而外源添加吡哆醇后,有利于甘油提前合成,更早去抵抗高盐胁迫的环境,同时也加快了海藻糖的利用,提高生物量,使细胞能更快适应高盐高渗环境。

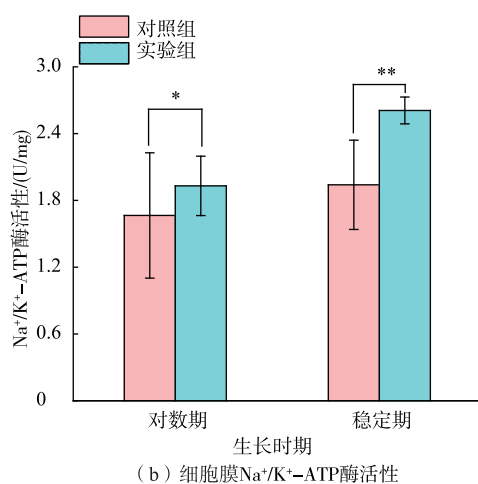
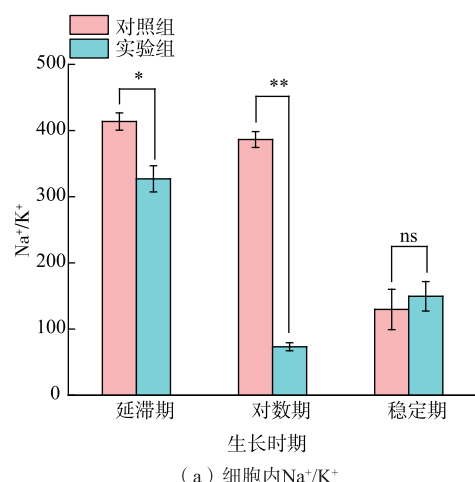
2.5 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞内 Na^+/K^+ 及 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性的影响

$\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶作为分布在细胞膜上的膜结合蛋白酶,主要功能是排出过量钠离子,解除钠离子对细胞的毒性,维持钾离子稳态和细胞内 pH 稳定,平衡细胞内外渗透压与维持细胞膜完整性,其酶活性大小关系着细胞抗高盐胁迫能力的强弱^[24]。鲁氏接合酵母在高盐胁迫条件下,细胞内 Na^+ 含量远大

于 K^+ , 此时为了避免 Na^+ 的毒性,就需要 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶依赖于 ATP 的能量将 Na^+ 从细胞内转运到细胞外,将 K^+ 转运到细胞内,平衡细胞内外离子差以及渗透压。吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞内 Na^+/K^+ 及 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性的影响如图 6 所示。结果表明,整个生长时期,对照组细胞内 Na^+/K^+ 一直持续下降,而实验组 Na^+/K^+ 是对数期先下降,稳定期 Na^+/K^+ 些许上升,原因可能为在高盐胁迫下,细胞会产生一些活性氧自由基(ROS)^[25],而这些活性氧自由基会对细胞膜造成损伤,从而影响 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性,导致 Na^+/K^+ 上升。在延滞期时,实验组的 Na^+/K^+ 比对照组低 26.5% ($P<0.05$);而在对数期,实验组的 Na^+/K^+ 比对照组低 82.3% ($P<0.05$)。从延滞期到对数期,添加吡哆醇后,实验组的 Na^+/K^+ 下降的幅度远高于对照组,表明在高盐胁迫条件下,吡哆醇增强了细胞膜上离子通道的调节作用,有利于 Na^+ 的外排。由图 6(b)可知,在对数期,实验组 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性比对照组高 16.9%;在稳定期,实验组 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性比对照组高 35.2%。而无论是对数期还是稳定期,实验组的 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性都比对照组的高,这一点证明了在高盐胁迫下,外源添加吡哆醇能够促进 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性,调节细胞内外离子平衡以及渗透平衡,降低 Na^+ 对酵母细胞的毒害作用从而增加细胞活性。

2.6 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母 2-苯乙醇产量的影响

2-苯乙醇作为效用普遍、价值可观的高级芳香醇,其特有的玫瑰香气对酱油风味的形成起重要作用。酱油发酵中若是缺少这种香味物质,则其风味就会淡薄^[26]。因此提高 2-苯乙醇的产量不仅有利于增加发酵食品的风味,使其更受欢迎,并且也为生产 2-苯乙醇提供一定的参考。吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母 2-苯乙醇产量的影响如图 7 所示。结果表明,实验组在对数期鲁氏接合酵母的 2-苯乙醇产量为 11.50 mg/L,比对照组的 2-苯乙醇产量(1.55 mg/L)提高了 6.42 倍;在稳定期,对照组的 2-苯乙醇产量为 13.13 mg/L,实验组为 29.64 mg/L,相比于对照组提高了 1.26 倍。这表明,在高盐胁迫条件下,外源添加的吡哆醇可以通过在氨基酸代谢中行使辅酶功能(包括转氨作用、脱羧作用等^[18])提高鲁氏接合酵母 2-苯乙醇的产量。这是因为酵母产生 2-苯乙醇涉及氨基酸的转运与调控,而吡哆醇在其氨基酸代谢中



** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母细胞内 Na^+/K^+ 及细胞膜上 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pyridoxine on the ratio of Na^+/K^+ in the cell and the activity of Na^+/K^+ -ATPase on the cell membrane of *Zygosaccharomyces rouxii*

起着重要作用,因此才促进产量增加高达 6.42 倍。上述结果表明,鲁氏接合酵母在高盐胁迫条件下,外源添加行使辅酶功能的吡哆醇能够促进 2-苯乙醇产量的提高。

参考文献:

[1] 阮志强,董玺梅,蒋雪薇,等.高盐稀态酱油发酵优势真菌与风味物质相关性分析[J].食品科学,2022,43(10):172-179.

RUAN Z Q, DONG X M, JIANG X W, et al. Correlation between dominant fungi and variation of flavor compounds during high-salt liquid-state soy sauce fermentation[J]. **Food Science**, 2022, 43(10): 172-179. (in Chinese)

[2] LI X, KANG Y J, YU C, et al. Exponential feeding strategy of high-density cultivation of a salt-tolerant aroma-producing yeast

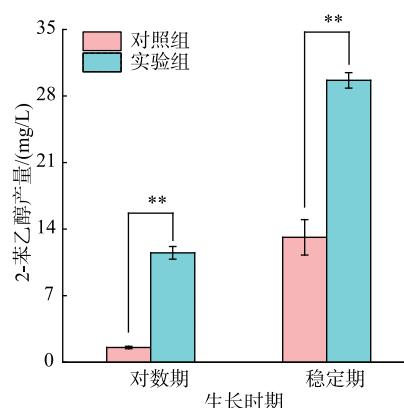


图 7 吡哆醇的添加对鲁氏接合酵母的 2-苯乙醇产量影响

Fig. 7 Effect of pyridoxine on the production of 2-phenylethanol of *Zygosaccharomyces rouxii*

3 结语

研究表明,在高盐胁迫条件下,添加吡哆醇(2 g/L)提高了鲁氏接合酵母细胞对高盐胁迫的耐受性,缩短了高盐胁迫条件下酵母生长的延滞期,提高了生物量,有利于食品发酵中香味物质的提前形成以及风味增加;还促进了甘油的提前合成,使细胞提前适应高盐环境,以及提高了细胞膜上 Na^+/K^+ -ATP 酶活性,降低 Na^+ 的毒害作用从而提高细胞活性。除此之外,吡哆醇的添加还提高了乙醇和 2-苯乙醇的产量,对酱油的保存和增香有很大的促进作用,最终提高了酱油的风味。

由此可见,吡哆醇的添加能提高鲁氏接合酵母对高盐胁迫的耐受能力,提高在高盐胁迫条件下的生物量,增加发酵过程中风味物质的含量,实验结果给工业上提高酱油等发酵食品风味提供了一定的思路和参考,以及有助于探索耐盐产香酵母风味形成的机理。作者初步探索了吡哆醇这类维生素对鲁氏接合酵母高盐胁迫耐受的影响,更深的分子机理以及其他类物质对其是否有同类作用还需进一步探究。

- Zygosaccharomyces rouxii* in stirred fermenter[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2016, 111: 18-23.
- [3] WANG D K, ZHANG M, HUANG J, et al. *Zygosaccharomyces rouxii* combats salt stress by maintaining cell membrane structure and functionality[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2020, 30(1): 62-70.
- [4] DAKAL T C, SOLIERI L, GIUDICI P. Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2014, 185: 140-157.
- [5] LI X, DAIL Y, LIU H, et al. Molecular mechanisms of furanone production through the EMP and PP pathways in *Zygosaccharomyces rouxii* with *D*-fructose addition[J]. **Food Research International**, 2020, 133: 109137.
- [6] CHEN H, XIONG L M. Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses[J]. **Plant Journal**, 2005, 44(3): 396-408.
- [7] WILLIAMS R J. Growth-promoting nutrilites for yeasts[J]. **Biological Reviews**, 1941, 16(1): 49-80.
- [8] PERLI T, WRONSKA A K, ORTIZ-MERINO R A, et al. Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Yeast**, 2020, 37(4): 283-304.
- [9] KENNEDY D O. B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy: a review[J]. **Nutrients**, 2016, 8(2): 68.
- [10] BILSKI P, LI M Y, EHRENSHAFT M, et al. Vitamin B₆ (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants[J]. **Photochemistry and Photobiology**, 2000, 71(2): 129-134.
- [11] CZÉGÉNY G, KÖRÖSI L, STRID Å, et al. Multiple roles for vitamin B₆ in plant acclimation to UV-B[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9(1): 1259.
- [12] 凌娟, 李军晖, 罗建波, 等. 吡哆醇对动物免疫功能影响的研究进展[C]// 第十三届中国实验动物科学年会论文集. 成都: [出版者不详], 2017: 431-438.
- [13] 姚婉婷, 李可, 宋娜, 等. 硫胺素对鲁氏接合酵母高盐适应性的影响[J]. **中国酿造**, 2020, 39(11): 78-84.
- YAO W T, LI K, SONG N, et al. Effect of thiamine on high-salt adaptability of *Zygosaccharomyces rouxii*[J]. **China Brewing**, 2020, 39(11): 78-84. (in Chinese)
- [14] 杨泉女, 周权驹, 吴松健, 等. 3,5-二硝基水杨酸法与酶法测定甜玉米还原糖和蔗糖含量的比较[J]. **中国农业科技导报**, 2017, 19(11): 125-131.
- YANG Q N, ZHOU Q J, WU S J, et al. Comparison of 3,5-dinitrosalicylic acid method and enzymatic method in the determination of sugar and sucrose content in sweet corn[J]. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2017, 19(11): 125-131. (in Chinese)
- [15] 王惊春, 田康明, 苗佳, 等. 增强海藻糖胞内积累提高大肠杆菌耐受性与乙醇产率[J]. **食品与发酵工业**, 2019, 45(21): 15-21.
- WANG J C, TIAN K M, MIAO J, et al. Enhanced intracellular trehalose accumulation improves stress tolerance and ethanol yield of *Escherichia coli*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2019, 45(21): 15-21. (in Chinese)
- [16] 胡梦蝶, 陈雄, 李欣, 等. 不同胁迫条件对鲁氏酵母胞内海藻糖积累的影响研究[J]. **食品工业科技**, 2016, 37(11): 130-133.
- HU M D, CHEN X, LI X, et al. Intracellular trehalose metabolism characteristics of *Zygosaccharomyces rouxii* under different stresses[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2016, 37(11): 130-133. (in Chinese)
- [17] 富志磊, 范光森, 马超, 等. 老白干酒曲中一株高产 β -苯乙醇酵母菌的分离、鉴定及其产香特性研究[J]. **中国食品学报**, 2019, 19(1): 207-215.
- FU Z L, FAN G S, MA C, et al. Isolation and identification of a yeast with high-yield for β -phenylethanol from Laobaigan-flavor Daqu and studies on aroma characteristics[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2019, 19(1):

207-215. (in Chinese)

- [18] DI SALVO M L, CONTESTABILE R, SAFO M K. Vitamin B₆ salvage enzymes: mechanism, structure and regulation [J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, 2011, 1814(11): 1597-1608.
- [19] 王君高. 酱油乙醇含量及其对质量的影响[J]. 中国调味品, 1994, 19(1): 16-17.
- WANG J G. Ethanol content of soy sauce and its influence on quality[J]. **Chinese Condiment**, 1994, 19(1): 16-17. (in Chinese)
- [20] 曹文敏. 氨基酸代谢相关基因的缺失对沙门氏菌 VNP20009 的肿瘤靶向性和抗肿瘤疗效的影响[D]. 南京: 南京大学, 2016.
- [21] 张明明, 万青青, 张克俞, 等. 过表达分支酸歧化酶编码基因 *ARO7* 对酿酒酵母抑制物耐受性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(2): 201-205.
- ZHANG M M, WAN Q Q, ZHANG K Y, et al. Effect of overexpression of chorismate mutase encoding gene *ARO7* on the inhibitor tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2016, 22(2): 201-205. (in Chinese)
- [22] 陆信曜, 诸葛斌, 宗红, 等. 产甘油假丝酵母 HOG 途径应答研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(5): 585-594.
- LU X Y, ZHUGE B, ZONG H, et al. Advances in the HOG pathway of *Candida glycerinogenes* [J]. **Scientia Sinica (Vitae)**, 2019, 49(5): 585-594. (in Chinese)
- [23] 方华, 李灏. 海藻糖与热激蛋白在酿酒酵母耐受乙醇胁迫中的作用[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(6): 84-89.
- FANG H, LI H. The roles of trehalose and heat shock proteins for enhancing ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **China Biotechnology**, 2014, 34(6): 84-89. (in Chinese)
- [24] PRIBYLOVA L, PAPOUSKOVA K, SYCHROVA H. The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane Na⁺/H⁺-antiporters (ZrNha1p and ZrSod2-22p) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology [J]. **Fungal Genetics and Biology**, 2008, 45(10): 1439-1447.
- [25] ZHANG M, SMITH J A C, HARBERD N P, et al. The regulatory roles of ethylene and reactive oxygen species (ROS) in plant salt stress responses [J]. **Plant Molecular Biology**, 2016, 91(6): 651-659.
- [26] 邹谋勇, 朱新贵, 刘丹, 等. 产 2-苯乙醇酵母的鉴定及其在酱油发酵中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(6): 217-222.
- ZOU M Y, ZHU X G, LIU D, et al. Identification of 2-phenethyl alcohol-producing yeast and its application in soy sauce fermentation [J]. **Food Science**, 2019, 40(6): 217-222. (in Chinese)