

抗冻酵母的筛选及发酵特性研究

Screening of freeze-tolerant yeasts and their bread dough fermentative properties

薛美翠¹ 汪立平^{1,2} 郝彦利²

XUE Mei-cui¹ WANG Li-ping^{1,2} HAO Yan-li²

王正全² 赵勇² 黄宇良²

WANG Zheng-quan² ZHAO Yong² HUANG Yu-liang²

(1. 上海海洋大学食品学院食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学食品学院海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Engineering

Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai 201306, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering

Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

摘要:采用模拟面团预发酵法筛选出应用于冷冻面团的菌株,研究菌株胞内化合物含量与其抗冷冻能力、相对发酵力的相关性,并且根据菌株菌落形态和26S rDNA序列分析法鉴定抗冻性能或发酵性能优良的菌株。结果表明,4个样品中筛选了7株酵母菌,存活率为9%~86%,相对发酵力为9%~67%,其中菌株Y-3的存活率较高,达到86%,菌株H-1的相对发酵力最高,达到67%。相关性分析结果表明,细胞存活率与海藻糖含量、甘油、脯氨酸含量呈正相关,与精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸及相对发酵力呈负相关;相对发酵力与天冬氨酸、谷氨酸含量呈显著正相关,与海藻糖、甘油、脯氨酸、精氨酸呈负相关。菌株鉴定结果表明,菌株Y-3为汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*),菌株H-1为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。综合抗冷冻性能、发酵力和食用安全性,后续研究拟将菌株Y-3和H-1进行混合发酵,最终应用于冷冻面团的制作。

关键词:抗冻酵母;存活率;相对发酵力;胞内化合物

Abstract: Freeze-tolerance is a necessary characteristic of yeast used in frozen dough. Target freeze-tolerant strain was screened using liquid fermentation (LF) medium method, applied for frozen dough

production, and the relationship between the content of intracellular compounds and cell survival and relative fermentation ability in different yeasts was analyzed. The isolated strain was identified mainly by morphologic observation and 26S rDNA gene sequence analysis. The results showed that seven strains were selected from four various sourdoughs, their freeze-tolerance rate ranged from 9%~86%, and relative fermentation ability ranged from 9%~67%. Two strains, Y-3 and H-1, had highest survival ratio of 86% and highest relative fermentation ability of 67%, respectively. The result of correlation analysis showed that survival ratio was significantly positively correlated with trehalose, glycerol, proline level, but negatively correlated with arginine, aspartic acid, glutamate and relative fermentation ability; relative fermentation ability was significantly positively correlated with aspartic acid and glutamate, and negatively correlated with trehalose, glycerol, proline and arginine level. Strain Y-3 was identified as *Debaryomyces hansenii*, and strain H-1 was identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Comprehensive consideration of freeze-tolerance, fermentative ability and safety, mixed fermentation of Y-3 and H-1 will be used to produce of frozen dough.

Keywords: freeze-tolerant yeast; survival ratio; relative fermentation ability; intracellular compounds

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:31401486);上海市科学技术委员会工程中心建设项目(编号:11DZ2280300)

作者简介:薛美翠,女,上海海洋大学在读硕士研究生。

通信作者:汪立平(1968—),女,上海海洋大学副教授,硕士,博士。

E-mail:lpwang@shou.edu.cn

收稿日期:2017-12-21

普通商业酵母在低温条件下易受冷冻迫害且解冻后不能保留应有的发酵力,从而影响发酵面制品的风味和口感,因此不能应用于冷冻面团的制作。采用耐冻性能好的酵母制作冷冻面团是制约冷冻面团技术的一个关键因素^[1]。

目前,国外报道的抗冻酵母戴尔有孢圆酵母

(*Torulaspora delbrueckii*)^[2]、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) FRI-413^[3] 和 FRI-802^[4]、耐热克鲁维酵母(*Kluyveromyces thermotolerans*) FRI-501^[5],均是通过自然筛选方式得到的,并且已经应用到实际面包生产行业当中。中国也有研究者^[6-7]通过自然筛选的方法得到抗冻酵母,但是没有应用到实际工业生产中的报道。此外,近几年由于分子技术的发展,很多研究者开始从影响酵母抗冻机理方面进行研究,采用分子育种方法得到抗冻酵母。已有报道表明,细胞内的几种化合物含量影响细胞对冻融压力的耐受性,这些化合物包括海藻糖^[8-9]、甘油^[10]、脯氨酸^[11]及精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等带电荷氨基酸^[12]。Sun等^[8]通过表达MAL62基因增加胞内海藻糖含量,进而提高细胞的抗冻能力;Dong等^[9]通过敲除基因NTH1增加胞内海藻糖含量,进而提高细胞的抗冻能力。甘油脱氢酶(GDH)主要参与甘油的代谢过程,Izawa等^[10]将GDH基因敲除,从而增加胞内甘油含量,使细胞存活率增大。Takagi等^[12]发现其他带电荷氨基酸包括谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸和脯氨酸的抗冷冻能力等同于海藻糖和甘油,都被认为是酵母细胞的冷冻保护剂。Tsolmonbaatar等^[11]将PRO1基因突变,从而使菌株胞内脯氨酸含量增加,进而增加细胞的抗冻作用;精氨酸酶由CAR1基因编码,Shima等^[13]通过敲除CAR1基因,证实了胞内精氨酸含量的积累会增加细胞的抗冻性。为了提高细胞的存活率,研究者提出了其他的方法与技术,包括添加剂的应用,例如抗冻蛋白^[14](antifreeze proteins, AFPs)、亲水胶体^[15];改善冷冻工艺,例如James等^[16]提出,缓慢的冷冻速率会形成对组织细胞造成迫害的大冰晶,而过快的冷冻速率同样也会对细胞存活率有消极的影响,因此,在应用冷冻面团技术时,应该根据不同生产工艺选择合适的冷冻速率,从而保证细胞的存活率^[17-18];为了控制面团在冷冻期间形成的冰晶对酵母细胞的影响,超声波辅助冷冻(UAF)也被应用到冷冻食品行业^[19],Kiani等^[20]的研究表明,在-4~-2℃时使用超声波辅助冷冻可能增加细胞的存活率,但是,该技术在冷冻面团行业的应用非常局限,相关报道较少。

本研究拟从自然界筛选抗冻性好且冷冻后发酵力高的野生耐冷冻酵母菌。采用模拟面团预发酵法筛选耐冷冻酵母,分析胞内化合物与细胞存活率、相对发酵力的相关性,考察胞内化合物对存活率和相对发酵力的影响,总结出提高自然筛选法效率的方法,对冷冻面团技术应用到中国传统主食的生产具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

传统发酵酸面团:来自东北、山东、河南、内蒙古省的4个农村地区;

市售发酵剂面包酵母:上海市农工商超市,编号A-1,作为整个试验过程的对照组;

DP307酵母菌DNA提取试剂盒:天根生物技术公司;

26S rDNA通用引物:上海生工生物技术公司;

海藻糖:标准品,上海金穗生物科技有限公司;

其他试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

YPD培养基:酵母粉10g,葡萄糖20g,蛋白胨20g,pH 6.0,溶解于1L蒸馏水,用于酵母菌的初筛;

平板计数培养基:酵母粉10g,葡萄糖20g,蛋白胨20g,琼脂粉20g,pH 5.5,溶解于1L蒸馏水,用于冷冻后酵母菌菌落计数,计算存活率。

1.1.2 主要仪器设备

紫外可见分光光度计:UV2000型,上海尤尼柯有限公司;

冷冻离心机:H2050R型,湖南湘仪离心机仪器有限公司;

立式压力蒸汽灭菌器:LDZX-50KBS型,上海申安医疗器械厂;

酸度计:pHS-3C型,上海虹益仪器厂;

PCR仪:H1650-W型,杭州朗基科学仪器有限公司;

水平电泳仪:PYY-6C型,北京六一仪器厂;

凝胶成像仪:EC3 Imaging System型,美国UVP公司;

全自动氨基酸分析仪:L-8800型,日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌的分离与纯化 在无菌条件下,分别从4个样品中取10g面团加入90mL生理盐水(85%)中,无菌均质5min(12次/s),梯度稀释至 10^{-7} ,各梯度取100 μ L涂布于YPD平板培养基上,30℃培养48h,待平板长出菌落,将符合酵母菌细胞形态的菌落至YPD平板培养基多次划线,直至完全纯化。将市售发酵剂面包酵母溶解于生理盐水后,直接用于平板划线。将纯化后的酵母菌种转接到YPD斜面培养基上,28℃培养2~4d后,置于4℃冰箱保存备用。

1.2.2 鲜酵母的制备 将酵母菌种从YPD斜面培养基转接入内装200mL YPD培养基的三角瓶中,30℃、150r/min培养24h,发酵液于4℃、8000r/min离心20min,蒸馏水洗2次,得到各菌株的鲜酵母泥。在105℃将鲜酵母烘干,测定鲜酵母烘干前后的质量,计算含水率。

1.2.3 抗冻性试验 根据文献[6]修改如下:称取0.4g鲜酵母加入装有50mL模拟面团培养基的三角瓶中(模拟面团培养基的配置参照文献[21]),30℃预发酵180min后进行菌落计数。存活率定义为冷冻7d后和冷冻1h后酵母菌菌落数的百分比。抗冻性试验重复6次。

1.2.4 酵母胞内化合物含量测定

(1)海藻糖含量测定:采用硫酸-蒽酮法^[22]。酵母菌细胞内的海藻糖用三氯乙酸提取,所得溶液仅有海藻糖存在^[23]。胞内海藻糖含量 W_t (%,细胞干重)计算公式参考文献[24]⁴²。

(2)甘油含量的测定:采用比色法测定^[25]。胞内甘油含量 W_t (%,细胞干重)计算公式参考文献[24]⁴³。

(3)胞内氨基酸含量的测定:采用氨基酸分析仪测定^[26]。以上所有酵母胞内化合物重复测定次数为3次。

(4)胞内甘油和氨基酸的提取:参照文献[27]。

1.2.5 酵母菌发酵力的测定 采用失重法^[28]。用于发酵的

营养液配比参照文献[29],准确称取 2.5 g 鲜酵母加入装有 50 mL 营养液的三角瓶中,将酵母菌和发酵液混合均匀,盖上发酵栓称重后置于 30 °C 恒温培养箱预发酵 1 h。冷冻操作同 1.2.3,将解冻后的发酵液放置恒温培养箱中,记录 2 h 的产气情况。通过冷冻 7 d 产气量的变化来判断酵母菌的发酵能力。相对发酵力定义为冷冻 7 d 后和冷冻 1 h 后 CO₂ 产气量的比值。发酵力重复测定 3 次。

1.2.6 数据分析处理 采用 Origin 8.6 进行数据处理和绘制图表;采用 SPSS 20.0 软件分析细胞存活率和酵母菌发酵力与胞内化合物(海藻糖、甘油、脯氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸及总氨基酸)含量的相关性,单因素方差分析以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

1.2.7 菌种鉴定 根据菌株菌落形态进行初步鉴定^[30],再通过 26S rDNA 序列分析法鉴定酵母,对测序的结果在 NCBI 网站进行核苷酸序列 Blast 比对分析,并用 MEGA 5 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 抗冻酵母的筛选

2.1.1 酵母菌的筛选 从 4 个酸面团中筛选得到具有典型酵母菌菌落特征的菌株共 7 株。对菌株进行编号,其中从内蒙古面团中分离得到一株,编号 N-1;河北面团中分离得到一株,编号 H-1;山东面团中分离得 3 株,编号 S-1、S-2、S-3;东北面团中分离得到 2 株,编号 Y-3 和 Y-4。

2.1.2 抗冻酵母菌的筛选 按照 1.2.3 所示的方法,分别对 7 株酵母菌在模拟面团中预发酵 3 h,测定冷冻 7 d 和 1 h 后的存活率,结果见图 1。从图 1 中可以看出,菌株 Y-3 和 Y-4 在模拟面团中预发酵 3 h,冷冻 7 d 后存活率分别是 86% 和 94%,存活率均高于已被报道的抗冻酵母菌的存活率^[2,6]。其他菌株的存活率均在 70% 以下,对照组 A-1 菌株的存活率不到 10%,说明对照组酵母菌对低温特别敏感,不适于冷冻面团的制作。

2.2 数据分析

2.2.1 抗冻酵母胞内海藻糖含量 海藻糖标准曲线的回归方程为: $y = 6.6714x - 0.0182$, $R^2 = 0.9970$,用于海藻糖浓度的计算。酵母胞内海藻糖含量见图 2。从图 2 中可以得知,存活率最高的菌株 Y-4 其海藻糖含量最高为 10.91%,而

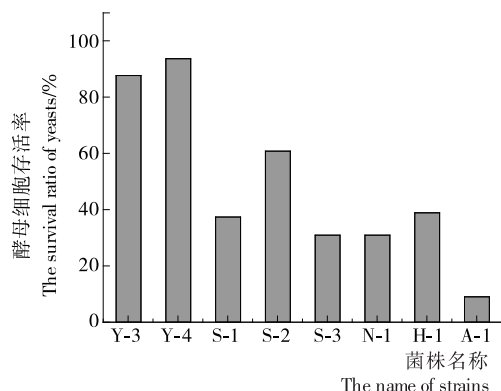


图 1 酵母菌在 -20 °C 的存活率

Figure 1 Survival ratio of yeasts stored at -20 °C

存活率次之的菌株 Y-3,其海藻糖含量却低于存活率不到 70% 的菌株 S-1、S-2 和 N-1,经方差分析得菌株 Y-3 与菌株 S-1 和 N-1 的海藻糖含量均不具有显著性差异($P > 0.05$),菌株 Y-3 与菌株 S-2 的海藻糖含量具有显著性差异($P < 0.05$)。说明海藻糖对细胞存活率有一定的影响,但不是唯一决定细胞存活率的因素,与 Hino 等^[31]报道的抗冻菌株 FRI 501 情况相同。

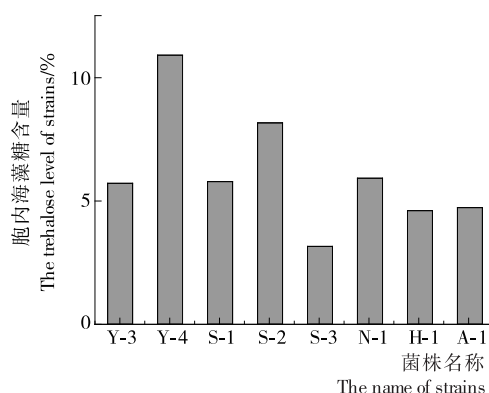


图 2 酵母菌胞内海藻糖含量

Figure 2 Intracellular trehalose level of yeasts

2.2.2 抗冻酵母胞内甘油含量 甘油标准曲线的回归方程为: $y = 21.469x + 0.001$, $R^2 = 0.9960$,可用于甘油浓度的计算。从图 3 中可以得知,菌株 Y-3 和 Y-4 的甘油含量远远高于其他抗冻性差的菌株的,通过单因素方差分析可知,甘油含量对细胞存活率的影响具有显著性差异($P < 0.05$)。说明细胞内甘油含量的积累对细胞存活率有影响,与已报道^[10,32]的通过分子技术积累甘油的酵母细胞具有较高的抗冻性结果相同。

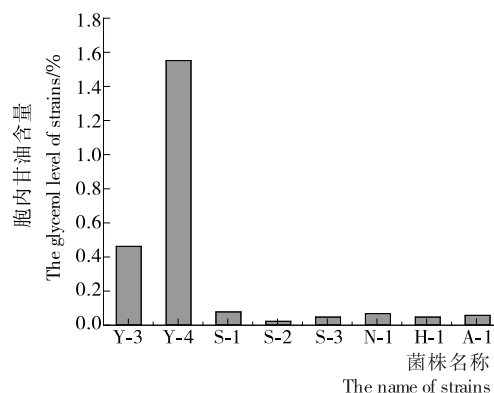


图 3 酵母胞内甘油含量

Figure 3 Intracellular glycerol level of yeasts

2.2.3 抗冻酵母胞内氨基酸含量 已有研究^[11-12]表明脯氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和精氨酸 4 种氨基酸均与细胞抗冻性有关,因此,本研究只对这 4 种氨基酸进行分析。酵母胞内氨基酸含量测定结果见表 1。从表 1 中可以看出,不同酵母菌氨基酸含量差异较大,通过单因素方差分析可知,4 种氨基酸对细胞存活率均有显著性影响($P < 0.05$)。菌株 Y-4 的存活率最高,但是其 4 种氨基酸的含量均低于存活率仅为 31% 的菌株 S-3,且通过方差分析得知,菌株 Y-4 与 S-3 的脯氨酸、精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸均具有显著性差异($P < 0.05$)。

0.05);此外,除了酵母中没有检出脯氨酸,菌株 H-1 的天冬氨酸含量低于菌株 Y-3,其他菌株的氨基酸含量均高于菌株 Y-3 的,且菌株 Y-3 与 H-1 的脯氨酸、精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸均具有显著性差异($P<0.05$),与已报道^[5,12,33]的细胞内某些带电荷氨基酸会影响到细胞耐冷冻率,但不是主要影响因素的结论一致。

表 1 酵母菌胞内氨基酸含量

Table 1 Intracellular amino acids level of yeasts mg/g				
菌株	脯氨酸	精氨酸	天冬氨酸	谷氨酸
Y-3	0.53±0.12	3.00±0.54	0.27±0.03	5.11±0.10
Y-4	2.66±0.06	3.46±0.48	0.61±0.01	5.40±0.21
S-1	1.98±0.03	5.62±0.09	1.60±0.10	16.90±0.21
S-2	0.67±0.08	4.78±0.38	0.97±0.07	9.20±0.31
S-3	3.25±0.13	5.38±0.18	1.79±0.09	20.43±0.01
N-1	0.86±0.01	4.70±0.22	1.46±0.13	15.52±0.25
H-1	3.19±0.12	0.75±0.04	2.23±0.05	25.22±0.49
A-1	0.00±0.00	10.56±0.24	1.15±0.01	12.76±0.51

2.2.4 不同酵母相对发酵力的测定结果 从图 4 中可以看出,冷冻 1 h 后菌株 Y-3 和 N-1 的发酵力低于对照组酵母 A-1,并具有显著性差异($P<0.05$);冷冻 7 d 对对照组酵母 A-1 和菌株 Y-3 的发酵力影响最大,但不具有显著性差异($P>0.05$),其他菌株的发酵力与对照组酵母的发酵力均具有显著性差异($P<0.05$)。

对照组酵母 A-1 和菌株 Y-3 的相对发酵力均为 9%,菌

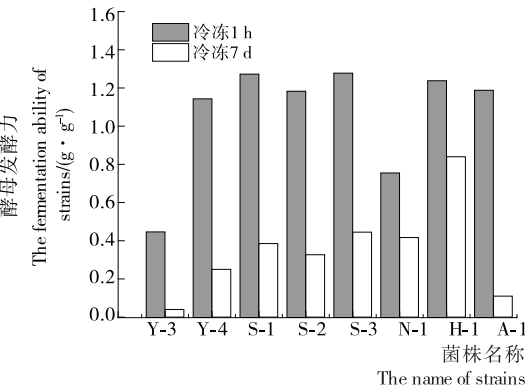


图 4 不同酵母的发酵力

Figure 4 Fermentative ability of various yeasts

株 H-1 的相对发酵力最高为 67%,是对照组酵母发酵力的 7 倍之多,具有应用到生产冷冻面团的潜在价值。

2.2.5 胞内化合物对细胞存活率及发酵力相关性 由表 2 可知,酵母胞内海藻糖含量与细胞存活率呈显著正相关,与相对发酵力呈负相关,与 Sun 等^[8]和 Tan 等^[34]报道的胞内海藻糖含量的提高可以显著提高细胞存活率,且胞内海藻糖含量与发酵力不存在相关性的结论一致;甘油与存活率具有显著相关性,与相对发酵力呈负相关,与 Izawa 等^[10]通过基因敲出方法使胞内甘油含量增大,从而提高细胞存活率和发酵力的结论一致,而与 Myers 等^[35]通过在面团中添加外援甘油,从而提高细胞的发酵力结果不一致,可能是试验方法不一致造成的;脯氨酸含量与细胞存活率呈正相关,而与相对发酵力呈负相关,与 Sasano 等^[36]报道的增加脯氨酸含量可以相应地增加细胞存活率和发酵力的观点不一致,可能是表达 MPR 基因减少活性氧(ROS)水平,从而改善细胞存活率和发酵力;精氨酸含量与细胞存活率、发酵力均为负相关性,与 Shima 等^[13]报道的通过敲除精氨酸氧化酶基因,增加细胞胞内精氨酸含量,从而增加细胞存活率和发酵力的报道不一致,可能是经过基因敲出等分子育种方法改变了精氨酸的代谢机制造成;天冬氨酸和谷氨酸含量均与细胞存活率呈负相关,且与细胞发酵力呈显著正相关,与 Takagi 等^[33]报道的细胞内某些带电荷氨基酸会影响到细胞耐冷冻率,但不是主要影响因素的结论一致。

2.3 菌种鉴定

通过冷冻 7 d 后测定细胞存活率和相对发酵力的结果可知,菌株 Y-3、Y-4 的存活率最高,菌株 H-1 的相对发酵力最高,因此,对这 3 株菌株进行菌落形态和分子生物学鉴定。

2.3.1 菌落形态鉴定 各菌株的菌落形态见图 5。菌株 Y-3

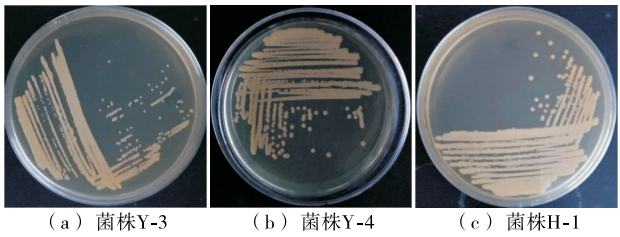


图 5 不同菌株的菌落形态

Figure 5 The colony morphology of different strains

表 2 存活率和发酵力与胞内化合物的相关性分析[†]

Table 2 Correlation analysis of intracellular compounds with survival ratio and fermentative ability								
项目	细胞存活率	相对发酵力	海藻糖	甘油	脯氨酸	精氨酸	天冬氨酸	谷氨酸
细胞存活率	1.000							
相对发酵力	—0.300	1.000						
海藻糖	0.706 *	—0.240	1.000					
甘油	0.777 *	—0.308	0.776 *	1.000				
脯氨酸	0.134	—0.513	—0.085	0.233	1.000			
精氨酸	—0.448	—0.546	—0.200	—0.273	0.546	1.000		
天冬氨酸	—0.683	0.745 *	—0.586	—0.571	0.588	—0.103	1.000	
谷氨酸	—0.697	0.766 *	—0.693	—0.621	0.550	—0.133	0.983 *	1.000

[†] * 表示在 0.05 水平相关显著。

菌落颜色为白色,菌落较小,形态为圆形,表面光滑、湿润、黏稠、容易挑起;菌株 Y-4 菌落颜色为白色,菌落较小,形态扁平,不光滑,不透明,不易挑起;菌株 H-1 菌落颜色为乳白色,菌落较大,菌落中央凸起,光滑,不透明,容易挑起,有明显的酒香味。

2.3.2 分子生物学鉴定 图 6 是菌株 Y-3、Y-4 和 H-1 的 26S rDNA 基因扩增电泳图,从图 6 中可以看出,3 株菌核苷酸序列均在 600 bp 左右出现特异性亮带。PCR 产物测序结果在 NCBI 网站上进行核苷酸序列 Blast 对比结果表明,Y-3 与汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)的相似性为 100%,Y-4 与赞斯托假丝酵母(*Candida xestobii*)的相似性为 99%,H-1 与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的相似性为 100%。查阅相关文献^[37],假丝酵母菌属于条件致病菌,会引起病人尿道感染。汉逊酵母属于生香酵母,石娇娇等^[38]从自然发酵的甜面酱中也筛选到该菌株并且对其发酵产物进行检测,说明该菌株在食品方面的应用已经有一定的理论基础,应用价值较大。因此,选择 Y-3 和 H-1 作为后续研究菌株。

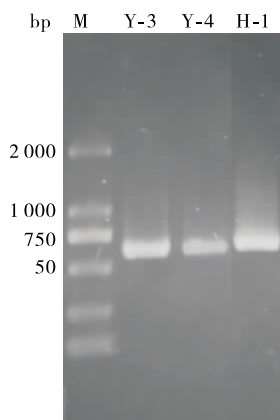


图 6 菌株 Y-3、Y-4 和 H-1 的 26S rDNA 基因扩增电泳图

Figure 6 PCR amplification of 26S rDNA gene of strains Y-3, Y-4 and H-1

2 株菌的系统发育树见图 7、8。菌株 Y-3 与菌株 *Debaryomyces hansenii* KY512216.1 在同一分支上,同源性为 92%;菌株 H-1 与菌株 *Saccharomyces cerevisiae* LC336458.1 在同一分支上,同源性为 99%,因此,可以确定菌株 Y-3 为 *Debaryomyces hansenii*,菌株 H-1 为 *Saccharomyces cerevisiae*。

3 结论

本研究通过模拟面团预发酵法和测定酵母胞内化合物 2

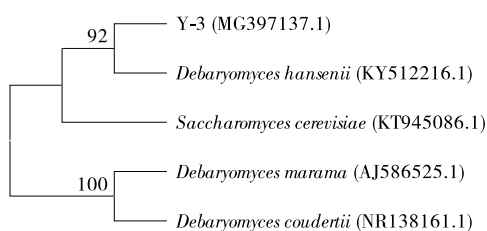


图 7 菌株 Y-3 的 26S rDNA 系统发育树

Figure 7 The phylogenetic tree for sequence of strain Y-3

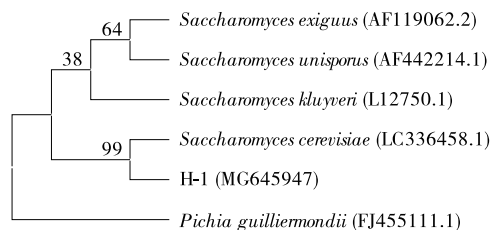


图 8 菌株 H-1 的 26S rDNA 系统发育树

Figure 8 The phylogenetic tree for sequence of strain Y-3

种方法相结合,筛选得到抗冻酵母菌 Y-3 (*Debaryomyces hansenii*),且不同于已报道的耐冷冻酵母^[2-5];与分子育种相比较^[8-10],自然筛选得到的野生酵母可以保留原有发酵食品的风味口感,食用安全性可以得到保证,从而体现出本试验所筛选到的酵母的优势;本试验对海藻糖、甘油、氨基酸含量与细胞存活率和发酵力的相关性进行分析,发现海藻糖和甘油的含量与细胞存活率呈显著正相关,因此,后续研究若采用自然筛选法筛选耐冷冻酵母时,可以先测定胞内海藻糖和甘油的含量,缩小抗冻性试验的筛选范围,从而降低工作量,增大筛选效率。

由于冷冻面团技术中的酵母菌在冷冻解冻后必须仍就保持较高的存活率和发酵力,因此,试验后期会对存活率高的菌株 Y-3 和发酵能力好的菌株 H-1 进行混合发酵,得到最优酵母添加比例,以期应用到冷冻面团的制作中。

参考文献

- [1] AKBARIAN M, GHASEMKHANI N, KOLADOOZI M, et al. Hydrocolloids and cryoprotectant used in frozen dough and effect of freezing on yeast survival and dough structure: a review[J]. Research Laboratory for Agricultural Biotechnology & Biochemistry, 2015, 9(3): 1-7.
- [2] HAHN Y S, KAWAI H. Screening of freeze-tolerant yeasts and their bread dough fermentative properties[J]. Journal of Home Economics of Japan, 2010, 41: 115-121.
- [3] HAHN Y S, KAWAI H. Isolation and characterization of freeze-tolerant yeasts from nature available for the frozen-dough method[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1990, 54(3): 829-831.
- [4] HINO A, TAKANO H, TANAKA Y. New freeze-tolerant yeast for frozen dough preparations[J]. Cereal Chemistry, 1987, 64(4): 269-275.
- [5] HSU K H, HOSENEY R C, SEIB P A. Frozen dough II: Effects of freezing and storing conditions on the stability of yeasted doughs[J]. Cereal Chemistry, 1979, 106(3): 424-426.
- [6] 江正强, 齐金娜, 邓红, 等. 耐冷冻酵母菌的筛选[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(6): 87-91.
- [7] 许春英, 王昌禄. 抗冻性面包酵母选育及其在冷冻面团中应用[J]. 食品科技, 2002(4): 30-32.
- [8] SUN Xi, ZHANG Cui-ying, WU Ming-yue, 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(1): 54.

- [9] DONG Jian, WANG Guang-lu, ZHANG Cui-ying, 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(6): 817-828.
- [10] IZAWA S, SATO M, YOKOIGAWA K, et al. Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2004, 66(1): 108.
- [11] 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: 233.
- [12] TAKAGI H, IWAMOTO F, NAKAMORI S. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1997, 47(4): 405-411.
- [13] SHIMA J, SAKATATSUDA Y, SUZUKI Y, et al. Disruption of the CAR1 gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 715-718.
- [14] ZHANG Yan-jie, ZHANG Hui, WANG Li, et al. Extraction of oat (*Avena sativa*, L.) antifreeze proteins and evaluation of their effects on frozen dough and steamed bread[J]. Food & Bioprocess Technology, 2015, 8(10): 2066-2075.
- [15] SHI Ke, YU Hai-long, LEE Tung-ching. A novel approach for improving yeast viability and baking quality of frozen dough by adding biogenic ice nucleators from *Erwinia herbicola* [J]. Journal of Cereal Science, 2013, 57(2): 237-243.
- [16] JAMES C, PURNELL G, JAMES S J. A review of novel and innovative food freezing technologies[J]. Food & Bioprocess Technology, 2015, 8(8): 1616-1634.
- [17] AYATI S V, HAMDAMI N, LE-BAIL A. Frozensangak dough and bread properties: Impact of pre-fermentation and freezing rate [J]. International Journal of Food Properties, 2016, 20(4): 782-791.
- [18] BAN Choongjin, YOON Sangeun, HAN Jungwoo, 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.
- [19] 逢晓云, 夏秀芳, 孔保华. 超声波辅助冷冻技术作用机理及在冷冻食品中的应用[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(4): 190-194.
- [20] KIANI Hossein, SUN Da-wen, ZHANG Zhi-hang, et al. Ultrasound-assisted freezing of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*: The freezing process and cell viability [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 18(2): 138-144.
- [21] HINO A, MIHARA K, NAKASHIMA K, et al. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1990, 56(5): 1386.
- [22] FERREIRA J C, PASCHOALIN V M F, PANEK A D, et al. Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts [J]. Food Chemistry, 1997, 60(2): 251-254.
- [23] 谭海刚, 梅英杰, 关凤梅, 等. 蕈酮-硫酸法测定酵母中海藻糖的含量[J]. 现代食品科技, 2006(1): 125-126.
- [24] 时晓剑. 面包酵母耐冻性的改善及机理分析[D]. 南京: 南京工业大学, 2013.
- [25] 张永生, 高辉, 王艳萍. 克拉维酸发酵液中碳源-甘油含量的比色法测定[J]. 天津科技大学学报, 2006, 21(1): 15-17.
- [26] 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.124—2016 食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 3-7.
- [27] KAINO T, TAKAGI H. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae*, under ethanol and sorbitol stresses[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2008, 79(2): 273-283.
- [28] 肖冬光, 刘青, 李静. 面包酵母发酵力测定方法的研究[J]. 食品工业科技, 2004(11): 61-63.
- [29] 黄晶晶, 吉孟彩, 梁建芬. 市售面包酵母冷冻过程发酵性能研究[J]. 食品科技, 2011(6): 175-179.
- [30] 于景芝. 酵母生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 12-28.
- [31] HINO A, MIHARA K, NAKASHIMA K, et al. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1990, 56(5): 1386.
- [32] IZAWA S, IKEDA K, MAETA K, et al. Deficiency in the glycerol channel Fps1p confers increased freeze tolerance to yeast cells: application of the *fps1delta* mutant to frozen dough technology[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2004, 66(3): 303-305.
- [33] TAKAGI H, SAKAI K, MORIDA K, et al. Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 184(1): 103-108.
- [34] TAN Hai-gang, DONG Jian, WANG Guang-lu, et al. Enhanced freeze tolerance of baker's yeast by overexpressed trehalose-6-phosphate synthase gene (TPS1) and deleted trehalase genes in frozen dough[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(8): 1275-1285.
- [35] MYERS D K, JOSEPH V M, PEHM S, et al. Loading of *Saccharomyces cerevisiae* with glycerol leads to enhanced fermentation in sweet bread doughs[J]. Food Microbiology, 1998, 15(1): 51-58.
- [36] SASANO Y, TAKAHASHI S, SHIMA J, et al. Antioxidant N-acetyltransferase Mpr1/2 of industrial baker's yeast enhances fermentation ability after air-drying stress in bread dough[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(1): 181-185.
- [37] TOKA Ö T, DURMAZ S, YULA E. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture[J]. Journal of Infection & Chemotherapy, 2016, 22(9): 629.
- [38] 石娇娇, 邓静, 吴华昌, 等. 自然发酵甜面酱中生香酵母的鉴定及发酵代谢产物的研究[J]. 中国调味品, 2014(12): 11-14.