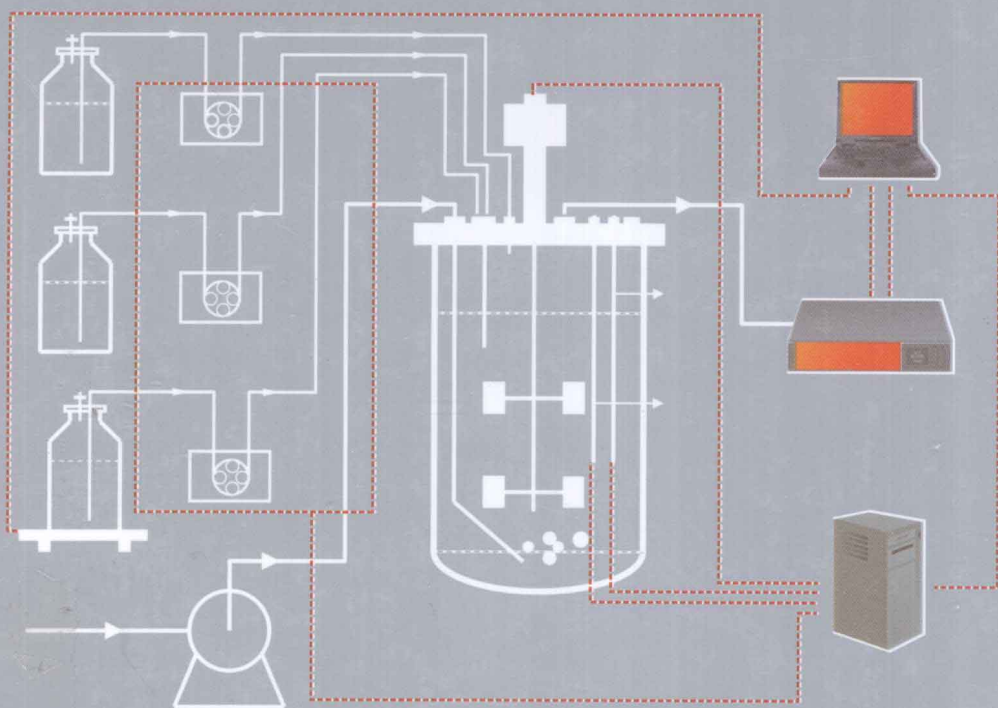


“十二五”国家重点图书

食品微生物 功能调控与优化

陈 坚 刘立明 堵国成 等编著



化学工业出版社

REGULATION AND OPTIMIZATION OF
PHYSIOLOGICAL FUNCTION IN FOOD MICROORGANISM

“十二五”国家重点图书

食品微生物 功能调控与优化

陈 坚 刘立明 堵国成 等编著



化学工业出版社

· 北 京 ·

前言

食品微生物制造是以源于生物质的农副产品为原料,采用微生物自身的细胞或酶的生物催化功能,生产、加工或制作人类生活所需的主导型食品、传统酿造食品、食品酶制剂、功能型食品和健康型食品的工业过程,或者利用微生物制造技术改造传统工艺过程以提高食品产量和质量。食品微生物制造通过阐明生物加工过程中的微生物细胞的生理机理,构建高产工业菌株,发展高效低耗加工工艺,实现食品及其成分的安全、营养与健康的高效生产。长期以来,食品微生物制造面临的瓶颈是:如何在充分理解微生物生理特性的基础上,全局调控微生物细胞的代谢功能,以提高食品微生物制造过程效能。实际上,在食品微生物制造过程中对微生物性能的理解、开发和利用是否达到或者超过化学加工水平,是提高食品微生物制造过程效能的关键。微生物性能受微生物自身的基因型、胞内微环境(如胞内能荷水平和氧化还原状态)和宏观环境(如温度、溶氧等物理和化学的因素)等因素共同决定。

作为国内第一部对食品微生物功能调控与优化的内涵与策略进行系统阐述的专著,本书在客观、科学地阐述了食品生物技术在食品工业的地位、应用前景、面临关键科学问题和发展趋势的基础上,结合作者完成和实施的包括国家自然科学基金重点项目、“863”计划、国家自然科学基金等项目的研究实例(博士、硕士论文),详尽阐述了食品微生物功能调控与优化的基本原理与技术。本书在引入食品微生物功能研究的前沿知识与创新技术的同时,注重微生物功能优化技术的开发,为开展类似研究提供了分析问题和解决问题的思路与方法。尽管源于食品微生物制造的食品及其配料种类繁多,但作为其主体的微生物的生理功能的认识、调控是通用或可以相互借鉴的。因此,相信本书会对读者产生积极的影响。

作者撰写此书,一方面得益于作者所在学校拥有发酵工程、食品科学两个国家级重点学科点,从1952年开始积累的食品科学和发酵工程的科学研究与工程实践的经验,以及作者从学生时代到留校工作一直能够生存和生长的学术土壤;另一方面受助于作者所在研究室许

多年轻的博士和硕士，他们和作者一起完成了与本书内容相关的 9 项国家级和部省级科研项目，包括国家自然科学基金重点项目、国家“863”计划、国家自然科学基金项目、教育部新世纪人才项目、霍英东教育基金会青年教师科研基金项目，并撰写了 6 篇博士学位论文，而这些学位论文正是本书素材来源的主体。

作者特别感谢中国工程院院士、江南大学（原无锡轻工大学）生物工程学院伦世仪教授的鼓励和指导，感谢所在研究室徐国强、吴重德、邹伟、汪军、陈克杰、周冒达、吴秋林、高倩等博士、硕士研究生给予的帮助。

尽管作者力图在本书中注重结合理论性和实践性，突出系统性和科学性，体现前沿性和创新性，但限于作者的学术功底、研究经验和写作能力，书中定有不少错误。若蒙赐教，不胜感激！

作者
2011 年 8 月

第一章 绪论	1
第一节 食品生物技术概述	1
一、食品生物技术的定义	1
二、食品生物技术在食品工业中的重要地位与作用	2
三、食品生物技术研究进展	4
第二节 食品生物技术的应用领域与发展趋势	8
一、拓展可食用资源	8
二、改进食品加工工艺	9
三、改善食品性能提高食品质量	10
四、开发功能食品及新型食品	11
五、提高农副产品的加工深度	11
六、增加食品包装功能	11
七、保证食品营养与安全	14
八、在食品贮藏保鲜中的应用	16
九、食品生物技术的发展趋势	18
参考文献	19
第二章 食品微生物制造	21
第一节 概述	21
一、微生物制造及其市场分析	21
二、食品微生物制造及在食品工业中的重要地位	22
第二节 食品微生物制造的类型	22
一、微生物制造传统生物食品	22
二、微生物制造食品用酶制剂	23
三、微生物制造有机酸	24
四、微生物制造增稠剂	25
五、微生物制造生物防腐剂	27
六、微生物制造维生素	29
七、微生物制造油脂	31
八、微生物制造食品添加剂	31
九、微生物制造色素	31

十、微生物制造香精香料·····	32
第三节 食品微生物制造中的关键科学问题·····	32
一、后基因组时代的食品微生物制造的特点·····	32
二、食品制造微生物生理功能的影响因素·····	34
第四节 食品微生物的功能调控与优化研究现状·····	36
一、微生物必需基因的鉴定·····	36
二、基于系统生物学和代谢工程的微生物细胞功能改造策略·····	36
三、辅因子工程技术提高微生物代谢效率·····	39
四、提高食品制造微生物对非生宜环境适应能力的代谢工程策略·····	41
参考文献·····	46

第三章 重要食品制造微生物代谢工程与生理功能 ····· 49

第一节 重要食品微生物基因组测序与特性分析·····	49
一、食品微生物基因组学·····	49
二、典型食品微生物基因组学研究进展·····	51
三、食品微生物基因组学的应用·····	59
第二节 乳酸菌代谢工程与生理功能改造策略·····	61
一、基于基因工程和代谢工程的乳酸菌分子改造·····	62
二、基于病理-生物技术的乳酸菌改造策略·····	64
三、基于生理功能的乳酸菌改造策略·····	65
第三节 霉菌代谢工程与生理功能改造策略·····	68
一、霉菌及其应用·····	68
二、霉菌的基因操作平台·····	68
三、霉菌生理功能改造策略·····	72
第四节 酵母代谢工程与生理功能改造策略·····	74
一、酵母基因工程原理·····	74
二、改良酵母细胞生理特性·····	77
第五节 杆菌代谢工程与生理功能改造策略·····	79
一、杆菌及其在食品工业中的应用·····	79
二、杆菌的代谢工程和生理改造策略·····	80
参考文献·····	85

第四章 利用代谢工程手段改善乳酸乳球菌胁迫抗性的研究 ····· 89

第一节 代谢工程策略改善乳酸菌胁迫研究概述·····	89
一、乳酸乳球菌在代谢工程中的重要作用·····	89
二、乳酸乳球菌面临的胁迫·····	90
三、提高乳酸乳球菌抵御胁迫的策略·····	91
第二节 在乳酸乳球菌 NZ9000 中生产外源谷氨酰胺转氨酶显著改善宿主菌好氧生长性能·····	95
一、 <i>mtg</i> 基因在乳酸乳球菌 NZ9000 中的活性表达·····	96
二、巯基乙醇对乳酸乳球菌 NZ9000 (pFL010) 和乳酸乳球菌 NZ9000 (pNZ8148) 好氧生长的影响·····	97
三、 <i>mtg</i> 基因在乳酸乳球菌胞内活性表达促进了细胞好氧生长·····	97
四、pH 对乳酸脱氢酶和 NADH 氧化酶活性的影响·····	101
五、乳酸乳球菌在不同培养条件下生物量的比较·····	101
六、关于 <i>mtg</i> 基因在乳酸乳球菌中的表达的三个问题·····	102

第三节 在乳酸乳球菌 NZ9000 中生产外源谷氨酰胺转氨酶对宿主菌胁迫抗性的影响	104
一、乳酸乳球菌 NZ9000 (pFL010) 和乳酸乳球菌 NZ9000 (pNZ8148) 氧胁迫抗性的比较	105
二、MTG 的分离纯化	107
三、MTG 纯酶清除氧自由基活性的测定	107
第四节 谷胱甘肽保护乳酸乳球菌 NZ9000 抵抗氧胁迫	109
一、半胱氨酸对乳酸乳球菌好氧生长的影响	110
二、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 抵抗 H_2O_2 氧胁迫抗性的影响	110
三、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 抵抗甲萘醌引发的氧胁迫抗性的影响	112
四、GSH 对乳酸乳球菌 NZ9000 的 <i>SodA</i> 缺失的互补作用	114
五、GSH 保护乳酸乳球菌的生理机制	116
第五节 谷胱甘肽保护乳酸乳球菌 SK11 抵抗氧胁迫和酸胁迫	118
一、GSH 在乳酸乳球菌 SK11 中的生产	118
二、GSH 对乳酸乳球菌 SK11 生长的影响	120
三、GSH 对乳酸乳球菌 SK11 氧胁迫抗性的影响	121
四、乳酸乳球菌 SK11 (pNZ9530/pNZ3203) 和乳酸乳球菌 SK11 (pNZ9530/pNZ8148) 发酵液中 NH_4^+ 浓度的比较	122
第六节 一株具有谷胱甘肽合成能力的乳酸乳球菌的分离与初步研究	122
一、乳酸乳球菌选择性培养基的确定	123
二、产 GSH 的乳酸乳球菌的初筛	123
三、引物的设计及产 GSH 的乳酸乳球菌的复筛	123
四、菌株 3C 的系统发育树分析与形态鉴定	124
五、乳酸乳球菌 CCSYU10100 的好氧生长	125
六、乳酸乳球菌 CCSYU10100 产 GSH 能力的鉴定	125
七、乳酸乳球菌 CCSYU10100 部分 <i>gshB</i> 基因的分析	125
参考文献	127

第五章 谷胱甘肽对乳酸菌胁迫抗性的调控机制研究 130

第一节 谷胱甘肽对乳酸菌胁迫抗性的调控机制研究	130
一、乳酸菌及其在食品工业中的应用	130
二、乳酸菌在食品微生物制造过程中遭遇的冷冻胁迫	132
三、谷胱甘肽改善乳酸菌的生理性能	133
第二节 外源添加谷胱甘肽显著提高旧金山乳杆菌 DSM20451^T 冷冻胁迫抗性	134
一、在化学合成培养基 (CDM) 中旧金山乳杆菌对 GSH 的吸收	135
二、添加时间和添加浓度对 MRS 培养基中旧金山乳杆菌胞内 GSH 浓度积累的影响	135
三、经历不同前培养时期的菌体冷冻抗性比较	136
四、GSH 对冷冻胁迫后细胞生长速率的影响	137
五、细胞内外 GSH 在抗冷冻胁迫中的作用比较	138
六、GSH 与谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸混合物对细胞冷冻抗性的作用比较	139
第三节 谷胱甘肽对冷冻胁迫前后旧金山乳杆菌 DSM20451^T 代谢活性的调控	140
一、冷冻胁迫前 GSH 添加对旧金山乳杆菌 DSM20451 ^T 代谢的影响	141
二、冷冻胁迫条件下 GSH 对旧金山乳杆菌 DSM20451 ^T 代谢的影响	142
三、重培养过程中代谢关键酶活性的变化	144
四、冷冻胁迫和重培养过程中胞内 GSH 浓度的变化	144
五、冷冻胁迫下胞内 pH 的变化	145

第四节 谷胱甘肽对冷冻胁迫中细胞膜损伤的抵御机制	147
一、GSH 对冷冻胁迫过程中旧金山乳杆菌 DSM20451 ^T 细胞膜结构的影响	147
二、GSH 对冷冻胁迫过程中旧金山乳杆菌 DSM20451 ^T 细胞膜脂肪酸成分的影响	147
三、冷冻胁迫中 GSH 对细胞膜中亚油酸含量的影响	150
四、冷冻胁迫条件下旧金山乳杆菌 DSM20451 ^T 胞内氧化还原状态的变化	151
五、冷冻胁迫中 GSH 对 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 的保护作用	153
第五节 蛋白质组水平上谷胱甘肽对旧金山乳杆菌 DSM20451^T 冷冻胁迫抗性的影响	155
一、冷冻胁迫前旧金山乳杆菌 DSM20451 ^T (GSH ⁺) 与 DSM20451 ^T (GSH ⁻) 的蛋白质组学分析	156
二、冷冻胁迫后旧金山乳杆菌 DSM20451 ^T (GSH ⁺) 与 DSM20451 ^T (GSH ⁻) 的蛋白质组学分析	157
三、二维电泳图谱的蛋白质差异点分析	158
第六节 谷胱甘肽对乳酸菌酸胁迫抗性的影响	161
一、GSH 对乳酸菌抗酸胁迫能力的影响	162
二、酸胁迫过程中胞内 pH (pH _i) 的变化	164
三、GSH 在酸胁迫过程中的浓度变化	166
四、GSH 对酸胁迫过程中 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的调控	166
参考文献	168

第六章 吸水链霉菌谷氨酰胺转氨酶的活化机制和生理功能 170

第一节 吸水链霉菌发酵生产谷氨酰胺转氨酶研究进展	170
一、谷氨酰胺转氨酶简介	170
二、链霉菌简介	173
三、链霉菌中谷氨酰胺转氨酶的活化	177
第二节 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 液体培养中谷氨酰胺转氨酶以酶原形式分泌	179
一、TGase 和 Pro-TGase 的分离、纯化	179
二、Pro-TGase 的鉴定	181
三、吸水链霉菌液体培养中 TGase 以酶原形式分泌	183
第三节 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 液体培养中谷氨酰胺转氨酶活化过程的定位	184
一、无细胞上清液中 TGase 活化的沉默	184
二、细胞壁和细胞膜碎片对无细胞上清液中 TGase 活化的影响	185
三、无细胞上清液中 TGase 活化过程的唤醒	185
四、CTAB 唤醒无细胞上清液中 TGase 活化过程的机制	186
第四节 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 液体培养中谷氨酰胺转氨酶活化蛋白酶的分离纯化和种类鉴定	189
一、TGase 活化蛋白酶的纯化	189
二、部分纯化的 TAP 酶样品中蛋白酶种类的确定	190
三、无细胞上清液中 TGase 活化蛋白酶种类的确定	191
四、TGase 活化过程是多种蛋白酶参与的过程	192
第五节 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 液体培养中谷氨酰胺转氨酶活化蛋白酶抑制因子的纯化、鉴定及其表面活性的发现	195
一、TGase 活化蛋白酶抑制因子的纯化	195
二、TAPI 的鉴定	195
三、TAPI 是一种表面活性蛋白	198
四、TAPI 调控的 TGase 活化过程的模型	198

五、TAPI 表面活性的生理意义	199
第六节 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> 固体培养中谷氨酰胺转氨酶的活化过程及谷氨酰胺转氨酶抑制剂对菌体分化的抑制	200
一、吸水链霉菌固体培养中 TGase 的活化	200
二、CTAB 促进固体培养浸出液中 TGase 的活化	201
三、胱胺对分化的抑制	202
四、TGase 的生理功能	202
参考文献	204

第七章 软化类芽孢杆菌 α -环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的表达及其产物特异性分析 207

第一节 α -环糊精葡萄糖基转移酶概述	207
一、 α -环糊精葡萄糖基转移酶的结构、功能及反应机理	207
二、CGT 酶发酵生产的研究进展	212
第二节 软化类芽孢杆菌 α -CGT 酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达	218
一、表达载体 pET-20b(+)/cgt 和 pET-22b(+)/cgt 的构建	218
二、大肠杆菌表达系统的构建	220
三、重组酶在 <i>E. coli</i> BL21(DE3)[pET-20b(+)/cgt] 中的胞外生产	220
第三节 采用两阶段温度控制策略提高重组 α -CGT 酶的胞外产量	223
一、在不同诱导温度下重组 α -CGT 酶胞外分泌过程	223
二、两阶段诱导温度控制策略的确定	224
三、升温时间对重组 α -CGT 酶胞外生产的影响	225
四、两阶段温度控制对重组 α -CGT 酶在胞内外分布的影响	225
五、相关机理探讨	226
第四节 甘氨酸与钙离子协同提高重组 α -CGT 酶的胞外产量	231
一、甘氨酸或钙离子对 α -CGT 重组酶胞外分泌的影响	231
二、甘氨酸或钙离子对大肠杆菌细胞膜透性的影响	232
三、甘氨酸或钙离子对大肠杆菌细胞生长的影响	233
四、钙离子能补偿甘氨酸对大肠杆菌细胞生长的抑制作用	235
五、甘氨酸和钙离子同时添加对大肠杆菌细胞膜透性的影响	237
六、甘氨酸和钙离子协同提高重组 α -CGT 酶的胞外产量	237
第五节 重组 α -CGT 酶的分离纯化及其生化性质分析	238
一、天然和重组 α -CGT 酶的纯化	238
二、物理性质	239
三、最适温度和热稳定性	239
四、最适 pH 和 pH 稳定性	240
五、二价金属离子对环化活力的影响	241
六、产物特异性	242
七、动力学分析	242
第六节 亚位点-3 处定点突变提高 CGT 酶的 α -环糊精特异性	243
一、突变 CGT 酶的表达与纯化	243
二、定点突变影响 CGT 酶的不同环化活力	244
三、定点突变影响不同环糊精的生产	245
四、定点突变提高 CGT 酶的 α -环糊精特异性	246

第七节 47 位赖氨酸突变提高 CGT 酶的 α -环糊精特异性	248
一、多重序列比对	248
二、突变 CGT 酶的表达与纯化	248
三、Lys47 对 α -环化反应非常重要	249
四、Lys47 突变增加 β -环化活力	250
五、Lys47 突变提高 CGT 酶的 β -环糊精特异性	251
参考文献	253

第八章 光滑球拟酵母中 ATP 的生理功能与作用机制 255

第一节 ATP 生理功能概述	255
一、胞内微环境在微生物细胞生长和产物积累过程中的重要作用	256
二、胞内 ATP 供给水平的调控策略	258
三、基于 ATP 水平调控的发酵过程优化	260
第二节 光滑球拟酵母基因操作系统的构建	262
一、G418 抗性试验	263
二、敲除框的构建	263
三、缺陷型突变株的富集与筛选	264
四、营养缺陷型突变株的验证	265
五、增强型绿色荧光蛋白的可诱导表达	266
六、质粒稳定性	266
第三节 线粒体基因敲除过程中的单细胞线粒体基因组多样性	267
一、线粒体转化	269
二、mtDNA 转化子可以在 YPG 平板上生长	269
三、mtDNA 转化子选择性丢失 mtDNA ($\Delta atp6::ARG8^m$)	270
四、mtDNA 异质性的存在	270
五、寡霉素和厌氧培养可以降低 mtDNA ($\Delta atp6::ARG8^m$) 的丢失率	271
六、厌氧培养对线粒体和 mtDNA 拷贝数的影响	273
七、厌氧培养降低 ATP6/ARG8 ^m 比例	274
八、mtDNA (ATP6) 的消除	274
九、研究意义	274
第四节 膜间腔中 H ⁺ 的过量积累导致 ATP6 缺失菌株 mtDNA 不稳定	278
一、NADH 氧化途径对 ATP6 敲除菌株中 mtDNA 稳定性的影响	279
二、 <i>T. glabrata</i> 及其突变株的胞内 ATP 浓度	280
三、 <i>T. glabrata</i> 及其突变株的胞内 ROS 浓度	280
四、MIMS 中 H ⁺ 的过量积累	281
五、ATP6 缺失菌株中 $\Delta\Psi_m$ 的不均一性	281
六、乌头酸酶的转录与定位分析	283
七、研究意义	284
第五节 ATP 合成酶亚基缺失对光滑球拟酵母中心代谢途径的影响	287
一、ATP 合成酶基因敲除及 <i>noxE</i> 的表达对发酵特性的影响	288
二、代谢网络分析	289
三、ATP 合成酶基因敲除及 <i>noxE</i> 的表达对胞内 ATP 水平的影响	289
四、ATP 合成酶基因敲除及 <i>noxE</i> 的表达对低 pH 和渗透压耐受性的影响	289
五、中心代谢关键酶基因的转录分析	291
六、中心代谢途径关键酶活性分析	291

七、研究意义	293
第六节 依赖 ATP 的 pH 平衡过程在细胞抵御酸胁迫中的作用	296
一、柠檬酸促进低 pH 值条件下 <i>T. glabrata</i> 的生长	296
二、胞外 pH 值对胞内 ATP 浓度的影响	297
三、柠檬酸添加促进能量代谢	298
四、提高 ATP 浓度促进 pH 梯度的维持过程	299
五、pH 对糖酵解关键酶活性的影响	300
六、pH 梯度与胞内 ATP 浓度的关系	301
七、研究意义	301
参考文献	303

第一章

绪论

第一节 食品生物技术概述

一、食品生物技术的定义

食品生物技术 (food biotechnology) 是现代生物技术 in 食品领域中的应用, 是以现代生命科学的研究结果为基础, 结合现代工程技术手段和其他学科的研究成果, 用全新的方法和手段设计新型的食品和食品原料^[1]。

在某种意义上, 基于现代分子生物学基础上的基因工程技术是食品生物技术的核心和基础, 它贯穿于细胞工程、酶工程、发酵工程、蛋白质工程、生物工程下游技术和现代分子检测技术之中。而细胞工程、发酵工程、蛋白质工程和现代分子检测技术又相互融合, 相互穿插, 与基因工程技术构成了一个既有中心又各有侧重点, 且相互联系、密不可分的有机整体。例如现代细胞工程已不再是简单的组织培养技术, 而是对经过基因工程改造的组织进行培养和细胞融合, 同时组织细胞培养也不再是为了得到再生的植株, 而是利用现代发酵工程技术, 对细胞进行大量培养, 培养的过程类似于发酵的过程, 这就是所谓的动植物细胞生物反应器。同样, 现代发酵工程也是建立在基因工程技术中 DNA 重组技术基础上的, 通过 DNA 重组技术, 获得高效表达的基因工程菌株, 这些工程菌株往往不再是微生物中的产物, 可以是人基因产生的、动物基因产生的, 也可以是植物基因产生的, 这在传统发酵工程中是不可想象的。在发酵工程中, 利用现代分子检测技术, 对发酵过程进行实时监控, 不断优化发酵条件, 对于降低成本、提高产量的意义是不言而喻的。从以上的论述中可以看出, 食品生物技术研究的主要内容之间是相互紧密联系的。同时, 现代食品生物技术又是建立在众多学科基础上的, 它们之间的关系如图 1-1 所示。

综上所述, 食品生物技术经历了数十年的发展, 特别是 20 世纪 60 年代以后的发展, 不再是传统意义上的食品生物技术, 已成为现代生物技术的重要组成部分。食品生物技术如同

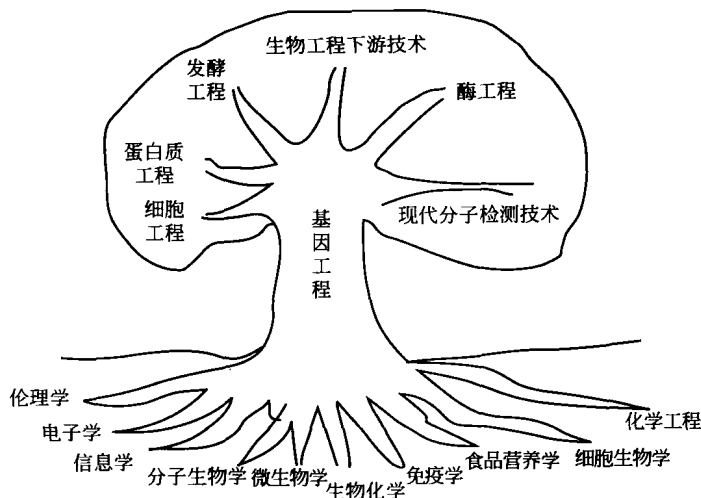


图 1-1 食品生物技术研究内容关系树

生物技术一样是所有自然学科中涵盖范围最广的学科之一。它以包括分子生物学、细胞生物学、微生物学、免疫学、生理学、生物化学、生物物理学、遗传学、食品营养与毒理学等几乎所有生物学科的次级学科为支撑，同时又结合信息学、电子学、化学工程、社会伦理学等非生物学科。从而形成一门多学科相互渗透的综合性学科。虽然其研究的领域已涉及数十个学科，但研究内容主要集中在基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程等技术领域。

二、食品生物技术在食品工业中的重要地位与作用^[2]

食品工业不仅是人类的生命工业，而且是我国国民经济的支柱产业。其在提高我国人民的生活质量、保障国民饮食安全、促进农副产品深加工、增加农民收入、带动其他关联产业发展、解决城乡人口就业和全面建设小康社会等方面发挥着极其重要的作用。十五期间，我国食品工业总产值年平均增长速度为 17.3% (<http://www.cfiin.com/echo.aspx?id=44725>)，食品工业呈现出持续高速成长的态势。然而，总体而言，我国食品工业与发达国家相比较还有较大的差距。主要体现在食品工业原料资源利用水平低，农产品产后深加工与综合利用水平比较落后，产品质量不稳定，技术含量不高，食品安全和食品法规、标准工作长期滞后。我国食品工业产值与农业产值的比值在 (0.3~0.4):1 之间，其中西部省区仅为 0.18:1，远低于发达国家 (2~3):1 的水平。我国粮食、油料、水果、豆类、肉类、蛋类、水产品等产量均居世界第一位，但加工程度很低，尤其是采用生物技术手段进行食品资源的加工。

生物技术在食品生产中的应用已有几个世纪，主要采用微生物发酵生产许多传统的食品，如面包、酸奶、奶酪及啤酒等，始终与人类生活息息相关。食品生物技术产业是指具有明确生物技术特征的食品产业，其产业涉及生物酿造食品业（如啤酒、黄酒、酱油等）、生物食品添加剂及配料业（如味精、柠檬酸、酵母等）和生物健康食品业（如乳酸菌饮料、食用菌、生物保健食品等），其相关生物技术产品属生物食品范畴。

食品生物技术产业不仅发展历史悠久，而且生物技术特征突出，其工业化生产的高度复杂性使其成为食品产业的高技术领域。食品产业属民生产业，其发展趋势导向为“安全、营养、多功能、生态和文化”，而生物技术在食品产业这一发展进程中发挥着越来越重要的作用。我国食品生物技术产业经过几十年的发展，在技术进步、产业成熟度、骨干企业发展、

产品国际化、带动关联产业发展以及提高国民生活质量等方面成绩斐然，成为中国生物技术产业的突出特色，成为中国生物技术应用领域中经济效益贡献显现度最大的生物产业，不仅在我国食品产业的技术进步和产业升级中发挥着重要作用，而且成为中国食品产业的重要组成部分。此外，利用生物技术可将农副产品原料加工成产品并产业化，进行二次开发形成新的产业；同时借助生物技术改造传统工艺提高产品质量。因此，食品生物技术产业已逐渐成为食品工业的支柱，生物技术本身也将为全球性的食物、蛋白质、环保和健康等问题的有效解决提供有力支撑。

食品生物技术研究的内容已涉及食品工业的方方面面，从原料到加工，无处不存在食品生物技术的痕迹，此章结合生物技术的分类来阐述食品生物技术在食品工业发展中的地位和作用。

基因工程技术为人类带来前所未有的改造生物的技术，利用基因工程技术可以根据人类的需要人为地设计新型的食品及食品原料，这些食品不再是传统意义上的食品，它们包括：具有免疫功能的食品；增加人体所需维生素和微量元素的食品；调节人体代谢、增加人体免疫能力的功能性食品；满足时尚的休闲食品等。基因工程还可以为发酵工程提供优良的工程菌株，促进食品发酵工业的发展。可以肯定，基因工程将处于 21 世纪食品工业发展的核心位置。

发酵技术很早就被人们利用于生产食品，如酒作为人类利用发酵技术最早的产物，世界上许多民族都有自己的酒文化。作为食品的酒是古老而又为人们普遍接受的饮料型食品。酒是通过微生物对发酵底物水果和谷类发酵产生酒精的一类食品的总称。这类食品不仅为人类提供能量的需求，而且对促进发酵技术的发展作出了很大的贡献。奶制品是人类饮食的主要食物，从世界范围看，发酵的奶制品占发酵食品的 10%。过去，人们对奶发酵的本质缺乏了解，后来人们逐渐认识到这是一种叫乳酸杆菌的微生物在发挥重要的作用，并且发现乳酸杆菌对乳制品具有许多好处：①对乳制品的保存有益；②改善乳制品的质地与风味；③增加乳制品的营养；④对保持肠道微生态平衡有益。这些优点使乳制品成为人们最重要的食品。谷类发酵食品是人类最重要的食品。从古罗马时代起，面包就是最主要的谷类发酵食品。面包不仅可以为人们提供身体所需的热量和发酵过程中产生的诸多营养成分及维生素，而且也是古代一种重要的食品贮藏方式。蔬菜的发酵可以使蔬菜成为独具风味的泡菜，不仅丰富了人们对食品口味的需求，而且也增加了人体对各种营养的要求。用豆类发酵生产的酱油和用水果发酵生产的醋是我国古代劳动人民智慧的体现，此外，在生产食品添加剂〔如各种食用有机酸（柠檬酸）、氨基酸（赖氨酸）、维生素（维生素 B₁）、调味剂（味精）等〕方面，食品的现代发酵工业技术发挥了重要的作用。因此，食品发酵技术不仅成为人类制造食品最重要的技术手段之一，而且在生产食品添加剂等食品原料生产方面更是其他技术无法替代的。由此可见，食品发酵工程在食品工业中占有举足轻重的作用。

食品与酶的关系密切，食品生产离不开酶的处理。例如，淀粉酶在食品生产中可以应用淀粉糖类的生产，为食品生产提供必不可少的原料；凝乳酶应用于奶酪的生产，已为人类利用了数千年；在果汁和啤酒生产中，酶应用于澄清果汁和啤酒；转谷氨酰胺酶广泛应用于肉制品、乳制品、植物蛋白制品、焙烤制品等，可以提高食品加工过程中的溶解性、酸碱稳定性、乳化性、凝胶性，增加食品的风味、口感、组织结构和营养价值；利用酶解法生产新型低聚糖，为人类增添了可食用的具有保健功能的糖源。酶在食品中的应用非常广泛，其在食品工业中的地位也是显而易见的，特别是随着蛋白质工程技术的发展，将对新型酶的开发和对酶生理性能的改善有很大的促进作用。可以预见，蛋白质工程和酶工程在食品工业中所占的比重将会更大。

生物工程下游技术是高新技术在食品生物工程中的应用,是与食品加工工艺密切相关的技术,特别在生产功能性食品中,对功能因子的提取将会使生物工程下游技术得到充分的应用。在功能性食品中,功能因子大多是一些理化性质不稳定的物质,用常规的提取技术,不仅提取效率低,而且提取产物容易氧化,或被酸碱破坏。现代分离技术可以很好地克服这些缺点,在提取效率、纯度和活性方面都远好于传统的提取方法。因此,生物工程下游技术作为现代食品工业不可缺少的部分,将对食品工业的发展起到推动作用。

从以上的论述中,可以发现食品生物技术已经渗透到食品工业的方方面面。特别是基因工程技术、蛋白质工程技术、酶工程技术、发酵工程技术等现代生物技术,将在 21 世纪的食品工业中充当重要的角色。可以这么认为,食品生物技术极大促进了传统食品产业的改造和新兴产业的形成。当前全球食品生物技术领域正呈现如下趋势^[3]:①各国政府已经越来越认识到食品生物技术在解决未来粮食与食物安全,资源短缺,环境污染等问题中具有巨大的潜力和作用,并不断加大在此领域内的投入;②更加重视研究与开发新型食品配料和添加剂,以及功能性健康食品的生物制造;③注重运用现代生物技术来改造传统的食品产业,使其生产趋向于规范化和现代化;④更加关注食品生物技术应用领域内的安全检测和保障体系建设。

三、食品生物技术的研究进展^[4,5]

(一) 转基因食品及食品配料生产

自 1973 年重组 DNA 技术创建以来,其就显示出巨大的应用价值和商业前景。1976 年,世界第一家应用重组 DNA 技术开发新药的公司 Genetech 公司建立,由此开创了现代生物技术产业发展的新纪元。到 2000 年全球的生物技术公司大约有 3000 多家,其中美国大约有 2000 多家,其余的分布在欧洲和日本。生物技术产品的销售额增长迅速,在 1980 年美国的现代生物技术产品的销售额还是零增长,到 1991 年时为 59 亿美元,1996 年已达到 101 亿美元,1997 年为 130 亿美元,2000 年达到 500 亿美元。《日经生物技术》对日本生物技术市场的调查结果表明,1991 年日本生物技术产品的市场是 2648 亿日元,1996 年达到 6552 亿日元。我国的生物技术产品在 1986 年的产值大约是 2 亿元人民币,到 1996 年销售额达到 110 亿元人民币,是 10 年前的 50 倍,其中医药卫生领域现代生物技术产品的销售额是 21.16 亿元,农业领域是 15 亿元,轻化工领域是 77.94 亿元。从发展现状看,现代生物技术主要集中在现代生物制药、农业及食品、现代检测技术等领域,在本章中主要侧重于食品领域。

基因工程技术在 20 世纪 90 年代开始在食品工业中应用,其标志是第一例重组 DNA 基因工程菌生产的凝乳酶在奶酪工业的应用。1993 年 Calgene 公司转反义 PG 基因的延熟番茄 Flavr-Savr 在美国批准上市。转基因植物源食品原料的种植面积迅速增加,从 1996 年的 170 万公顷迅速增加到 2001 年的 5260 万公顷,种植面积增加了 30 倍,6 年累计种植面积为 17720 万公顷。其经济效益也从 1995 年的 7500 万美元增加到 2001 年的近 40 亿美元,累计产值达 110 亿美元。2005 年产值将增加到了 80 亿美元,2010 年为 250 亿美元。而以其为原料的食品市场销售额 6 年累计已达上千亿美元。

动物源基因工程食品目前尚未商业化,但其发展异常迅猛。自 1984 年我国成功获得世界第一例转基因鱼,在后来的十几年中,许多国家的几十个实验室相继开展转基因鱼的研究工作,取得了令人鼓舞的成就,我国武汉水生物所的转金鱼生长素 GH 基因的三倍体黄河鲤鱼已通过中试,进入食品安全性评价阶段,并已实现商品化养殖,成为第一例走上餐桌的

动物源基因工程食品。此外,改善动物食用品质的转基因研究正在如火如荼地进行,如导入钙激活酶基因,以改善牛肉的食用品质,使牛肉变得鲜嫩可口;导入乳糖酶基因,使牛奶中的乳糖下降,从而消除许多人对牛乳乳糖的不耐受症,提高对牛乳营养的吸收等。转基因功能研究的另一大热点是,利用转基因动物生产功能性食品。目前,欧美等发达国家和地区在此领域已展开激烈竞争,许多全球最大的制药公司纷纷加入,InterNutria Inc. 公司总裁认为:“一种药物的开发时间需要 10 年以上和至少 2.5 亿美元的资金,而功能性食品只需几年和数百万美元的投入,并且利润丰厚。”

微生物源基因工程食品是最早的转基因食品,在 1988 年瑞士通过了重组 DNA 基因工程菌生产凝乳酶的安全性评价,允许在奶酪工业中使用。1990 年 3 月,美国 FDA 讨论了凝乳酶的管理,FDA 认为:引入基因所表达的蛋白具有和动物凝乳酶相同的结构和功能,生产菌在加工过程中被除去或消灭,并且本身不具备毒性和致病性,任何抗生素抗性标记基因在加工过程中已被除去,故认为该酶符合 GRAS。在美国已有超过 60% 的硬干酪生产使用该酶。另外,通过重组牛生长素基因的基因工程菌生产的牛生长激素,目前已大量应用于肉牛和奶牛的饲养,这对于提高牛的饲料转化率和产奶率作用非常明显。传统的酵母菌除能发酵加糖的面团外,还可以发酵未加糖的面团,经过改造的重组 DNA 酵母菌在发酵加工的初期,分泌的发酵麦芽糖酶水平增加,如麦芽糖酶和麦芽糖透性酶。这种重组 DNA 酵母比原来未改造的菌株有较高的代谢活力和在发酵初期释放高 CO_2 的能力,这样可以减少发酵的时间。目前,转基因微生物主要生产用于食品加工的酶和食品添加剂。

从转基因食品的发展阶段来看,转基因食品的发展可以分为三代:

1. 第一代转基因食品

第一代转基因食品是以增加农作物抗性和耐贮性为主的转基因植物源食品,这一代的转基因食品研究起始于 20 世纪 70 年代末 80 年代初,是以转入抗除草剂基因、抗虫基因增加农作物的抗逆性,以及延迟成熟基因等为主要特点。抗除草剂农作物转入的基因有耐受孟山都公司生产的除草剂草甘膦的 *CP4-EPSPS* 基因和耐受除草剂草胺磷的 *Bar*、*Pat*、*GOX* 基因,这类转基因植物源食品有玉米、棉花、油菜、甜菜、大豆、水稻等。抗虫农作物的基因主要有苏云金杆菌的 *Bt* 系列基因,包括 *Cry1Ab*、*Cry1Ac*、*Cry3A*、*Cry9C* 等,这类转基因植物源有玉米、棉花、番茄、马铃薯等。目前,这类基因研究的还有豇豆蛋白酶抑制剂基因 *CpTI*、马铃薯蛋白酶抑制剂基因 *Pin II*、豌豆凝集素基因 *P-lec*、雪花莲凝集素基因 *GNA*、半夏凝集素基因 *PTA* 等。延迟成熟的转基因植物源食品主要有:①利用转入反义多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因抑制 PG 酶的产生,使新鲜果蔬能保持一定的硬度,从而延长贮藏期;②转入 S-腺苷蛋氨酸水解酶基因,减少乙烯生物合成前体 S-腺苷蛋氨酸;③转入 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶基因,生成的酶可以脱去乙烯合成的直接前体 ACC,减少乙烯的生物合成;④转入有缺陷的 ACC 合成酶基因,通过合成有缺陷的 ACC 合成酶竞争性抑制 ACC 的合成,减少乙烯的生物合成,这类转基因植物源食品有番茄和甜瓜。此外,还有抗病毒的植物源转基因食品,主要是转入病毒的外壳蛋白基因,干扰病毒的产生以达到抗病毒目的,这类转基因植物源食品主要有番木瓜、西葫芦和马铃薯。

2. 第二代转基因食品

第二代转基因食品是以改善食品的品质、增加食品的营养为主要特征。目前,转基因食品的研究正在朝这方面转移,最早的研究是在提高月桂酸、肉豆蔻酸和油酸的含量方面展开。商品化的转基因作物有油菜和大豆。这方面的研究已在植物、动物和微生物中全面展开,并已取得了许多研究成果,有些成果显示了良好的应用前景。主要表现为:

(1) 食品中新增营养因子 如《Science》在 2000 年 1 月 14 日报道了瑞士公立研究所成

功开发了富含维生素 A 前体的基因重组水稻,被称之为 Golden Rice,这种水稻的开发成功将有望解决世界许多发展中国家儿童因缺乏维生素 A 而导致的致盲现象。

(2) 油脂的改良 Dupont 公司通过反义 RNA 技术抑制油酸酯脱氢酶,获得含 80% 油酸的高油酸含量大豆油。Calgene 公司则开发出可替代氢化油制造人造奶油、酥油的含 30% 硬脂酸的大豆油和芥子油。

(3) 蛋白质的改良 通过基因重组技术获得高赖氨酸转基因玉米、高面筋蛋白小麦等也取得了可喜的成果。

(4) 果蔬品质的改良 除增加果蔬的贮藏期外,目前的研究已开始是提高营养品质和加工特性上展开。如转入酵母异戊烯腺嘌呤焦磷酸 (IPP) 异构酶基因的番茄,其胡萝卜素和番茄红素含量增加了 2~3 倍;利用反义技术将马铃薯多酚氧化酶 (PPO) 基因的 POT32 片段插入马铃薯中,获得抗加工褐变的转基因马铃薯。此外,还有改良碳水化合物的转基因食品等。

3. 第三代转基因食品

第三代转基因食品研究主要是增加食品中的功能因子和增加食品的免疫功能。1990 年, Curtiss 等^[6]首次报道了植物中抗原的表达,他们使变异链球菌表面蛋白抗原 A 在烟草中表达,再把这种烟草喂给老鼠吃后,黏膜免疫反应导致了老鼠中 *SpaA* 的出现。此后,又有肝炎抗原在烟草和莴苣中、狂犬病抗原在番茄中、霍乱抗原在烟草和马铃薯中和人类细胞巨化病毒抗原在烟草中的表达成功,这些研究成果掀起了世界范围的转基因食用疫苗的研究热潮。目前的研究主要集中在:

(1) 乙肝疫苗 乙肝病毒表面抗原是乙肝疫苗的主体成分,它的基因已在番茄、马铃薯、烟草、羽扇豆和莴苣中表达。乙肝病毒表面蛋白 M 基因也在马铃薯和番茄中成功表达。

(2) 大肠杆菌肠毒素疫苗 到目前为止,在转基因植物中表达用于疫苗研究的病原基因主要是大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位 (LT-B) 基因,用 LT-B 基因转化的烟草和土豆,其外源基因均能获得表达,并有较好的免疫原性。在烟草中最大表达量为每克可溶性蛋白 5 μ g,土豆块茎为每克可溶性蛋白 30 μ g。

(3) 霍乱病毒疫苗 在马铃薯中转入霍乱弧菌毒素 B 亚单位 (CTB) 基因,在块茎和叶片中 CTB 的最高表达量可达 30 μ g/g。

(4) 轮状病毒疫苗 该病毒是病毒性腹泻的主要病原物,正在研究将轮状病毒表面抗原蛋白转入番木瓜中,以期获得可食用的疫苗。

(5) 诺瓦克病毒疫苗 诺瓦克病毒是引起急性肠胃炎的病毒,在用烟草和马铃薯作为受体转入诺瓦克病毒衣壳蛋白基因,已经得到了具有免疫原性的表达产物。

(6) 结核病疫苗 结核病是结核杆菌引起的严重呼吸道疾病,每年造成数十万人的死亡。将结核杆菌的分泌性蛋白 MDT-64 和 ESTA 基因转入烟草、黄瓜、番茄和胡萝卜的研究正在进行中。

(7) 狂犬病疫苗 狂犬病是由狂犬病病毒引起的致命传染病,目前已经将 RV 糖蛋白基因转入番茄中,并得到了转基因番茄,但 RV 糖蛋白表达量还很低,正在进行如何提高表达量的研究。

基因食物疫苗与常规疫苗及其他新技术疫苗相比,具有以下独特的优势:①生产简单,转基因植物的种植不需特殊技术,更不需要复杂的工业生产设备和设施,只要有土地,就可以大规模产业化生产;②没有其他病原污染,常规疫苗及其他新技术疫苗在大规模细胞培养或繁殖过程中,很容易发生病原性或非病原性细菌、病毒等污染,特别是细胞培养过程中,霉形体的污染极其普遍,而转基因植物疫苗则不存在这个问题;③可以食用,转基因植物疫