

食品

# 发酵工程

SHIPIN FAJIAO GONGCHENG

潘力 主编

食品

# 发酵工程

SHIPIN FAJIAO GONGCHENG

ISBN 7-5025-8575-3



9 787502 585754 >

销售分类建议：轻工/食品  
生物

ISBN 7-5025-8575-3

定价：39.50元

# 食品

# 发酵工程

SHIPIN FAJIAO GONGCHENG

潘力 主编



化学工业出版社

·北京·

本书主要介绍了基因工程、生物反应器、下游分离纯化工程等发酵工程中的新技术，并详细阐述了发酵工程在保健食品、食品添加剂、传统酿造食品、发酵饮料、废水处理等食品工业中的应用。本书内容深入浅出，举例得当，具有较高的参考价值。

本书可供食品企业和科研单位初、中级技术人员使用，亦可作为相关专业在校学生参考用书。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

食品发酵工程/潘力主编. —北京: 化学工业出版社,  
2006. 4  
ISBN 7-5025-8575-3

I. 食… II. 潘… III. 发酵工程-应用-食品工业  
IV. TS26

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 041601 号

---

### 食品发酵工程

潘力 主编

责任编辑: 张彦 路金辉 梁虹

文字编辑: 彭爱铭

责任校对: 李林

封面设计: 九九设计工作室

\*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

\*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市海波装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 22½ 字数 461 千字

2006 年 7 月第 1 版 2006 年 7 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8575-3

定 价: 39.50 元

---

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

# 序

知识经济时代在崛起，现代科技在飞跃发展。21世纪是生物技术世纪。20世纪50年代初人类进入了划时代的分子生物学年代，70年代初由于基因工程的诞生，现代生物技术产业应运而生，并将这一高新技术应用于医药、食品、农业、环保和化工等部门，对人类健康、经济发展和工业科技产生深刻影响。因而，在科学发展史上逐步形成许多生物技术分支，包括医药生物技术、食品生物技术、农业生物技术、化工生物技术和环境生物技术等。

食品生物技术 (food biotechnology) 或称为食品生物工程 (food bioengineering) 是生物技术的重要分支学科。虽然迄今为止这一门分支学科尚未有统一涵义，但从其实际应用角度而言，其内涵应可概括为使食品原材料或细胞通过生物技术手段进行 DNA 重组改造或加工表达形成高附加值、高性能和优质的新型食品。

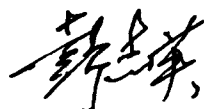
传统的食品发酵在我国有着数千年的历史，它是采用自然界的各种微生物或将这些微生物经过纯种培养后对谷物、果蔬原料等的糖类物质进行发酵而制成各种食品。如今，可采用现代的基因工程手段，通过不同种属间的 DNA 重组以达到改造食品工业原材料、促使食品工业达到优质高产的目的，以满足人类生活和健康日益增长的需要。目前，应用于食品加工的多种酶制剂，其生产菌株约 60% 都经过基因工程技术改造过。转基因食品 (包括转基因大豆、小麦、番茄等) 在全球也已有很大发展。据统计全球转基因作物种植面积已达到 5000 多万公顷，其中美国约有 60% 以上的加工食品中含有转基因成分。鉴于食品中引入新的“基因”成分是否引起副反应，虽然现在仍未有确切的实验证据，但已有各种不同的争议，为了维护消费者权益，各国已通过制定新的法规、进行“标识”等措施来规范市场秩序。

随着基因工程的发展，酶工程、发酵工程和细胞工程等新技术手段也得到有效的应用。固定化酶、固定化活细胞等新技术正在推动着食品加工工艺的革新。例如，过去生产淀粉糖是采用传统的酸水解法，而现在已成功地采用全酶法或固定化酶系统生产葡萄糖、麦芽糖或高果糖浆等。这样，可大大地降低能耗、减少污染、提高产品质量和生产效率。发酵技术也有很大的进步，已由传统的间歇式发酵发展为连续控制式发酵。尚有采用动、植物大量培养生产各种具有保健功能的活性因子、维生素和多种生长素等，作为制备各种保健食品的原材料。

随着生物科学的发展，生物技术融入新的学科内涵，逐步发展基因组学、蛋白质组学，以期阐明细胞内各种代谢途径与整体基因群、蛋白质体之间的协调关系。从整体细胞上研究蛋白质组成、结构、功能及其生命活动规律，更能揭示生命的奥秘。这一崭新的学科领域必将对经济发展、人类健康产生深远的影响。

鉴于食品生物技术的发展日新月异及其在食品工业中应用的宽度、广度，本编委会组织撰写了本书，旨在满足食品企业科技工作者的要求，从中汲取新技术的“营养”、提高自己的科技水平。

期望本书的出版对发展食品工业、农副产品深加工起到促进作用。

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized Chinese characters, likely the author's name.

2006年4月于广州

# 前 言

人类利用微生物自然发酵酿酒、制醋等可追溯到数千年以前。我国古代劳动人民创造了灿烂的历史文化。经过历代科学家的不断探索，发现了各种微生物的形态、特征及其代谢规律，“发酵”一词才逐渐有了其科学内涵。微生物学先驱巴斯德（L. Pasteur）创立的微生物发酵理论和后来柯赫（R. Koch）创造的纯种分离技术，为发酵技术的发展和进步奠定了理论基础，使微生物发酵从自然发酵步入纯种液体深层发酵技术的新阶段。1953年美国遗传学家 Watson 和英国生物化学家 Crick 提出划时代的“DNA 双螺旋结构”，70年代初基因工程诞生。从此，微生物发酵融入了现代高新技术的内涵，形成了现代发酵工程技术。

发酵工程是生物技术的重要组成部分，是利用微生物的特殊功能生产有用物质或直接将微生物应用于工业生产的一种技术体系。这项技术包括菌种选育、菌种生产、代谢产物的发酵以及微生物的利用技术等。到目前为止，全世界食品工业中发酵技术产业的总产值约为 2000 亿美元。维生素、氨基酸、酵母制剂、微生物多糖、环状糊精、低聚糖、不饱和脂肪酸、糖醇、核酸类鲜味剂、有机酸味剂、低热量甜味剂和乳酸菌类等产品的开发，均是发酵技术在食品工业领域中的新应用，这些均属于食品发酵工程的研究范围。本书对现代发酵工程共性的关键技术、优良菌种的选育、工艺的控制与优化、生物反应器、下游分离纯化、各类发酵产品的理论和工艺以及食品废水处理等作了详细阐述，力求体现理论结合实际。

本书由潘力主编，参加编写的人员还有王斌、吕莉、李立风等。全书内容已经过编委会及出版社审定，谨表示致谢。限于编者的学术和知识水平，书中不足之处在所难免，望读者赐教。

华南理工大学 潘力

2006 年 3 月

# 目 录

<b>第一章 总论</b> .....	1
第一节 现代发酵工程及其发展 .....	1
第二节 基因工程改良食品微生物菌种 .....	4
第三节 微生物生长动力学 .....	14
第四节 发酵过程的优化 .....	25
第五节 生物反应器 .....	35
第六节 发酵产品的下游工程 .....	45
<b>第二章 发酵法生产保健食品</b> .....	58
第一节 不饱和脂肪酸的发酵生产 .....	58
第二节 抗菌活性肽的发酵生产 .....	69
第三节 寡聚糖的发酵生产 .....	76
第四节 多糖类的发酵生产 .....	83
第五节 微生态制剂的发酵生产 .....	86
第六节 其它保健食品的发酵生产 .....	94
<b>第三章 发酵法生产食品添加剂</b> .....	104
第一节 食用香精香料 .....	105
第二节 食用色素 .....	109
第三节 新糖源 .....	114
第四节 酶制剂 .....	115
第五节 鲜味剂 .....	122
第六节 营养强化剂 .....	129
第七节 酸味剂 .....	137
第八节 食品胶 .....	145
<b>第四章 酿造食品</b> .....	154
第一节 概述 .....	154
第二节 白酒 .....	157
第三节 酱油 .....	172
第四节 食醋 .....	189
第五节 酸奶和豆乳发酵 .....	205
<b>第五章 发酵饮料</b> .....	220
第一节 啤酒酿造 .....	220



第二节	乳酸饮料 .....	236
第三节	果汁果酒饮料 .....	243
第四节	蔬菜汁饮料 .....	266
第五节	食用菌饮料 .....	277
<b>第六章</b>	<b>发酵法治理食品厂废水 .....</b>	<b>282</b>
第一节	废水生物处理的基本原理 .....	282
第二节	食品工业废水的概念和一般处理步骤 .....	309
第三节	食品工业废水的生物处理法 .....	317
第四节	新技术在废水生物处理中的应用研究 .....	333
<b>参考文献</b>	.....	<b>348</b>

# 第一章 总论

## 第一节 现代发酵工程及其发展

### 一、发酵工程发展史

#### 1. 发酵工程的雏形

就微生物发酵技术而言，人类掌握这一技能至少有五千年以上的历史了。我国白酒酿造技术起源于龙山文化时期，国外酿制葡萄酒最早始于古埃及，酿造啤酒始于亚述。我国公元前 14 世纪的《书经》记载“若作酒醴，尔惟曲蘖”，意思是要酿造酒类，必须用“曲蘖”。“曲”是指糖化发酵剂，包括大曲、小曲，曲中聚集着各种微生物和酶类。“蘖”是指发芽的谷物，其中有分解淀粉进行糖化的酶。谷物发酵中通常使用的“引子”或“起子”是专门培养的酵母，除此之外，谷物发酵还常用一些曲霉类微生物。在谷物发酵中，确定发酵用微生物后，还必须根据实际生产需要优化培养基、湿度、温度、酸碱度、空气等培养条件，才能保证正常的生产。由此可见，古人的酿造遵循着严格的“生产工艺”，这就是发酵工程的雏形。

#### 2. 发酵工程概念的建立

随着科学技术的发展，微生物的发现，从此打开了微生物研究的大门，也推动了发酵工业的发展。19 世纪，微生物学奠基人法国科学家巴斯德 (Pasteur) 发现了酒精发酵是由酵母菌引起的，他将酒精生成过程中产生二氧化碳而发泡的现象称为“发酵” (ferment)，同时他还证明了其它的食品酿造都是微生物引起的发酵，不同的发酵是由不同微生物引起的，从而揭示了微生物在发酵食品生产中的主导地位。同时德国细菌学家柯赫 (Koch) 的纯种培养技术的建立，使微生物学研究和应用走出了误区。他们把生物学原理和工程化概念相结合，确立了发酵工程的概念。

#### 3. 传统发酵工程的发展和成熟

20 世纪 40 年代，抗生素工业的兴起和迅速发展，使传统的凭经验的酿造发酵工业发生了质的变化。发酵工程进入了工程阶段，成为主动控制、改

造、设计微生物和微生物的外部环境条件从而生产众多发酵产品的独立的工业生产领域。

人类对微生物愈来愈深入的研究促进了发酵工程的发展，各种各样的发酵产品走向了产业化。自 1929 年英国的弗莱明 (Fleming) 发现了青霉菌 (*Penicillium notatum*) 可以产生拮抗性物质并取名为青霉素以来，陆续发现许多微生物都能产生这类物质。到 1941 年亚伯拉罕 (Abraham) 等人第一批成功地制备了青霉素 (6-aminopenicillansäure)，并在临床上取得了非凡的效果，推动了抗生素工业的发展，并结合深层液体通风发酵方法实现了许多抗生素的工业化生产。由此，抗生素工业的兴起极大地推动了微生物工业的大发展。1957 年日本科学家首先发现了谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 能发酵葡萄糖积累大量的 L-谷氨酸，从此开创了发酵法生产谷氨酸的新途径。用这种发酵法生产味精节约了粮食，降低了成本。紧随抗生素和谷氨酸工业化生产的步伐，人们又掀起了寻找产生各种氨基酸和蛋白质的微生物的热潮，氨基酸和蛋白质发酵工业迅速兴起。抗生素工业、氨基酸工业、酶制剂工业等构成了发酵工程的主体，是传统发酵工程的支柱。这些产业的不断完善，标志着传统的发酵工程已经逐步发展并走向成熟和完善。

2

#### 4. 现代发酵工程的兴起

20 世纪 70 年代以后，基因工程技术和细胞融合技术的相继建立，赋予了发酵工程新的涵义。对于自然界各种各样的微生物，人们不仅揭示了它的生命规律和机理，使研究进入分子水平，而且将它引入到工程领域建立了微生物发酵过程的数学模型，再与化工、机械、仪器仪表、计算机自动化设备等配套，使发酵工艺技术进入了发酵工程的新阶段。

现代发酵工程多采用基因工程手段所形成的基因工程菌、细胞融合菌以及动物细胞株和植物细胞株。它的无菌操作技术已不仅仅限于将杂菌排除在发酵系统以外，还要求发酵系统内的生物体不能逸出系统之外，因此，它的无菌概念是双向的，而不是单向的。它的培养技术已不是简单的通气搅拌培养技术，而是要根据生物的类型、目的产物的特性不同而采用更复杂的培养技术，并引入了生化工程放大概念。它所使用的培养装置已不是传统的标准发酵罐，而是形式多样、结构各异的新型生物反应器。现代生物技术的下游工程，即分离提取精制工程，也随着产物的特性和用途不同而采用各种不同提取设备、分离介质和精制工艺，几乎是在一个可控或自控的体系中进行。同时，现代的高新技术诸如计算机技术、新材料技术等已进入了发酵工程领域，使发酵工程焕发出新的光辉。

## 二、现代发酵工程涵义

发酵工程 (fermentative engineering) 又称为微生物工程, 是指传统的发酵技术与 DNA 重组、细胞融合、分子修饰等新技术结合并发展起来的现代发酵技术。发酵工程主要是利用微生物的特定性状, 通过现代化发酵技术生产有用物质或直接应用于工业化生产。它是与农产品、能源、化学制品、环境控制等全球性问题联系起来的一种技术体系。生物技术中的基因工程、酶工程、单克隆抗体、生物量的转化等研究成果, 一定要通过发酵工程才能转化为生产力, 才能获得显著的经济效益和社会效益。

现代发酵工程大大扩展了传统意义上的发酵工程, 其内容包括菌种的分离、选育、发酵器设计、空气净化、发酵条件以及产品分离、提纯等工艺技术。人们可以利用这套技术大规模生产人类必需的氨基酸、维生素、酶制剂、抗生素和有机酸、有机溶剂等, 形成一个庞大的发酵工业。发酵工程在饲料和动物饲养中应用, 已取得了良好的效果。通过细胞融合和 DNA 杂交技术选出了高产纤维素酶的酵母菌, 发酵 30h, 可大大提高最终纤维素分解率和蛋白质含量; 已筛选出既可固定空气中氮, 又能利用秸秆纤维作为唯一碳源的菌种, 可使秸秆发酵后所含蛋白质比原来提高 3~4 倍; 通过筛选或经遗传工程处理形成的单细胞微生物, 经发酵后提高了其蛋白质含量, 而且成本低, 产量大, 效益高, 容易工业化生产, 对禽畜养殖业大有裨益。

显然, 微生物是发酵工程的主体, 因此发酵工程也称微生物工程。目前人们利用微生物生产发酵产品可归纳为以下四个方面。①利用微生物菌体本身。一是获得菌体蛋白以解决人类食品紧缺之危; 二是利用菌体进行生物防治以减少农药对环境的污染, 三是获得可食用的大型真菌以满足人类对美味佳品的需要。②利用微生物的初级代谢功能。不同微生物的初级代谢可积累不同的初级代谢产物, 利用这一特性可生产多种多样的产品如白酒、啤酒、醋、酱、乳酪、乙醇、甘油、丙酮、丁醇、赖氨酸、谷氨酸等。③利用微生物的次级代谢功能。人们利用微生物的次级代谢产物主要是抗生素, 此外还有各种毒素、生长刺激素、生物碱、色素、维生素等。④利用微生物合成大分子物质的功能, 主要是酶。

## 三、现代发酵工程特点

现代发酵工程的主体即为利用微生物, 特别是用经 DNA 重组技术改造过的微生物来生产商业商品。它是生物工程技术的的重要组成部分, 是生物技术产业的重要环节, 是一门利用微生物的生长和代谢活动来生产各种有用物

质的工程技术。与传统发酵工程相比，现代发酵工程主要有以下几个特点：  
①不完全依赖地球上的有限资源，而着眼于再生资源的利用，不受原料的限制；②生物反应所需的温度较低，生产步骤简化，容易实现生产过程的连续性，大大节约能源，缩短生产周期，降低成本，减少对环境的污染；③可开辟一条安全有效、价格低廉、纯净的生物制品生产的新途径；④能解决传统技术或常规方法所不能解决的许多重大难题并为能源、环境保护提供新的解决办法；⑤可定向创造新品种、新物种，适应多方面的需要，造福于人类；⑥投资小，收益大，见效快。

## 第二节 基因工程改良食品微生物菌种

基因工程技术是现代化生物技术的核心内容，主要包括重组 DNA、基因缺失、基因加倍、导入外源基因及改变基因位置等分子生物学手段，它为定向改变生物性状提供了理论和技术基础。基因工程技术自 20 世纪 70 年代诞生以来，取得了飞速的发展和广泛的应用。目前，基因工程产品已在医药、农业、环保、食品工业等诸多领域占据了日益重要的地位，它使传统农业、食品工业、医药工业发生了根本性的变革。

4

近年来，国内外的食品科学家和生物学家已开始注重研究开发改善食品功能的新品种。如开发不产生豆腥味的大豆；在肠内不会产生胀气的化合物以及结晶胰蛋白酶的活性阻碍物质的大豆新品种。通过基因工程还可以改变酶的性质，生产食品结构改良剂。如荷兰的 Quset 公司对愈创种子所含的  $\alpha$ -半乳糖苷酶的密码进行解译，然后把该技术应用于酵母中，从而产生出高纯度的特殊酶，用这种酶切除愈创多糖类的侧链，可以改善稳定剂的性质。另外，通过基因修饰技术，可将脂酶基因导入受体而强化其分解脂肪的能力，从而可加工低脂和低胆固醇的食品，如奶油、低脂肪牛奶等。利用基因工程技术培育出新的酿酒酵母菌株，用以改进传统的酿酒工艺，并使之多样化。目前，已成功地选育出分解  $\beta$ -葡聚糖和分解糊精的啤酒酵母菌株、嗜杀啤酒酵母菌株，提高生香物质含量的啤酒酵母菌株。基因工程技术应用于氨基酸的生产已取得较大成绩，迄今为止，世界上已克隆和表达了十几种氨基酸的基因，已有 5 种用重组技术生产的氨基酸达到工业化水平，例如苏氨酸 (60g/L)、组氨酸 (42g/L)、脯氨酸 (75g/L)、丝氨酸 (40g/L) 和苯丙氨酸 (60g/L)。我国谷氨酸等氨基酸已投入工业化生产。目前，天然食品防腐剂的研究开发成为当前国际食品界中一个研究热点，这些天然食品防腐剂主要包括 Nisin、杀菌肽 (Cecropin)、爪蟾抗菌肽 (Magainin)、防御

素 (Defensin) 等, 它们也可利用基因工程技术进行大量生产。

发酵食品的品质、风味及产率是影响发酵食品工业经济效益的关键因素, 而这些又都取决于所使用的微生物菌株品种, 但传统的微生物育种方法又难以有效地达到定向改造微生物性状的目的, 而利用 DNA 重组技术、反义 RNA 技术及基因缺失等基因工程技术来构造所需的基因工程菌株是解决这一问题的一条有效途径。

酱油风味的优劣与酱油在酿造过程中所生成的氨基酸的量有密切关系, 而参与此反应的酶和碱性蛋白酶的基因已克隆并转化成功, 在新构建的基因工程菌株中碱性蛋白酶的活力可提高 5 倍左右, 羧肽酶的活力可大幅度提高 13 倍。此外在酱油酿造过程中, 木糖与酱油中的氨基酸反应生成褐色物质, 从而影响其色泽, 而木糖的生成与酱油酿造中所用的米曲霉中木聚糖酶的含量与活力密切相关, 如今米曲霉中的木糖酶基因已克隆成功, 利用反义 RNA 技术抑制该酶的表达所构建的基因工程菌株来酿造酱油, 可大大降低上述不良反应的进行, 酿造出的酱油色泽浅、口味淡、风味好。

发酵工程是利用微生物的特殊功能生产有用的物质, 或直接将微生物应用于工业生产的一种技术体系。这项现代技术包括菌种选育、菌种生产、代谢产物的发酵以及微生物的利用技术。利用发酵工程技术所取得的成就涉及新食品配料、食品加工的催化剂、饮料稳定剂、D-氨基酸及其衍生物制造以及废弃物利用和食品品质的检测等。目前, 国外已研制出了通过乳酸菌发酵生产的天然保鲜剂, 并形成系列产品。到目前为止, 全世界食品工业中生物技术产业的总产值约为 2000 亿美元。维生素、氨基酸、酵母制剂、微生物多糖、环状糊精、低聚糖、不饱和脂肪酸、糖醇、核酸类鲜味剂、有机酸味剂、低热量甜味剂和乳酸菌类等产品的开发, 均是生物技术在食品工业领域中的新应用。

## 一、利用基因工程改良微生物菌种的基本步骤

基因工程实际上是包括能将遗传基因从一种生物细胞转移到另一种生物细胞中并得以表达的若干实验技术的总称。概括起来, 基因工程应包括以下六个步骤。

### 1. 外源目的基因的取得

从复杂的生物细胞基因组中, 经过酶切消化或 PCR 扩增等步骤, 分离出带有目的基因的 DNA 片断, 取得所需的基因 (外源 DNA 片断); 或者从特定细胞提取所需基因的 mRNA 后, 在适宜的条件下利用逆转录酶的作用来取得所需基因; 或者通过探明目的基因所含的遗传密码及其排列顺序,

然后用化学方法人工合成所需的基因。

## 2. 基因载体的分离提纯

基因载体是具有自体复制能力的另一种 DNA 分子，它经过处理后能与外来基因相结合，并带有必要的标记基因。目前的基因载体主要有两类：一类是质粒；一类是病毒（包括噬菌体）。

## 3. 重组 DNA 分子的形成

通过专一限制性内切核酸酶的处理或人为的方法，使带有目的基因的外源 DNA 片断和能够自我复制并具有选择标记的载体 DNA 分子，产生互补的黏性末端而相互配对结合，并通过连接酶在体外使两者连接起来，形成一个完整的新的 DNA 分子——重组 DNA 分子。

## 4. 重组 DNA 引入受体细胞

重组 DNA 即是带有目的基因的载体（杂种质粒或病毒）。用人工的方法（转化或转导法），将重组 DNA 分子转移到适当的受体细胞（宿主细胞）中，使它能在细胞中定居下来。通过自体复制和增殖，形成重组 DNA 的无性繁殖系（即克隆），从而扩增产生大量的特定目的基因，并使之得到表达，即能指导蛋白质的合成。

## 5. 重组菌的筛选、鉴定和分析

从大量的受体菌中设法筛选出带有目的基因的重组菌，并进行鉴定。然后培养克隆株系，提取出重组质粒，分离已经得到的扩增的目的基因，再分析测定其基因顺序。

## 6. 工程菌的获得和基因产物的分离

将目的基因克隆到表达载体上，再次导入受体菌中，经反复筛选、鉴定和分析测定，最终获得较稳定的高产基因工程菌，然后进行大量的培养繁殖，产生出所需要的目的基因产物，再进行分离纯化。

## 二、基因工程技术在酵母菌种改良中的应用

酵母 (yeast) 是一类单细胞低等真核生物，它既具有类似原核生物的生长特性（易培养、繁殖快、便于遗传操作等），又具有典型真核生物的分子和细胞生物学特性。酵母作为人类利用最早的微生物，和人类的生活极其密切，是酿造、食品、饲料等领域应用最广泛的工业微生物。酵母生物学研究的最显著特点是基础理论研究与应用实践研究的内在统一，酵母不仅是研究真核细胞各种生命过程的有用模型和重要工具，而且也是外源真核生物基因表达的适宜宿主生物，对现有工业酵母菌种遗传改良和重组基因工程酵母生产外源蛋白显示出广阔的前景。

### (一) 酵母基因组的结构特点

酵母细胞核内有 16 条染色体，基因组为 12052kb，核外线粒体 mtDNA 为长约 25 $\mu$ m (约 75kb) 的双链环状分子，常见内源质粒为 2 $\mu$ m 双链环状 DNA (6kb, 周长约 2 $\mu$ m)，每个单倍体基因组含质粒 60~100 个拷贝。

酵母基因组虽小，但其表达调控过程与其它真核生物相似，酵母作为真核基因表达载体，用于大量生产外源蛋白质，是真核生物基因表达研究的理想工具。

### (二) 酵母基因工程的操作

#### 1. 酵母基因工程的载体系统

酵母细胞中基因克隆和表达的载体一般有 5 种类型 (见表 1.1)。

表 1.1 酵母菌质粒特性

质粒	大小	大肠杆菌复制子	酵母菌复制子	大肠杆菌选择表型	酵母菌选择表型	转化频率/(个/ $\mu$ g)	拷贝数	在非选择培养基中稳定性
Yip5(整合型)	5541bp	PMB1	无	<i>Ap<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup></i>	<i>Ura<sup>+</sup></i>	1~100	1	很稳定
Yrp179(复制型)	7002bp	PMB1	ARS1	<i>Ap<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup></i>	<i>Trp<sup>+</sup>, Leu<sup>+</sup></i>	$10^3 \sim 10^5$	3~30	很不稳定
Yep13(附加体型)	10.7kb	PMB1	2 $\mu$ m	<i>Ap<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup></i>	<i>Leu<sup>+</sup></i>	$10^3 \sim 10^5$	5~40	较稳定
Ycp19(着丝粒型)	10.1kb	PMB1	ARS1	<i>Ap<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup></i>	<i>Trp<sup>+</sup>, Ura<sup>+</sup></i>	$10^3 \sim 10^4$	1	稳定
Ylp21(线性型)	55kb	无	ARS1	无	<i>Trp, His</i>	$10^2 \sim 10^4$	5~30	很不稳定

其中以 2 $\mu$ m 环为基础构建的 Yep 较为常用。表达载体与克隆载体不同的是除复制子和选择基因外，还包含必须表达的 DNA 区段：①一个或多个供插入外源蛋白质编码序列的限制性酶切位点；②核心是其上有一个可调控转录表达的酵母启动子；③启动子下游是先导序列 (和翻译效率有关)、ATG (起始密码)；④还含有编码有用蛋白质结构域的序列：信号肽序列、核定位序列、某种抗原表位或其它标签蛋白序列。

#### 2. 酵母细胞的转化及筛选培养

构建好的载体质粒都要通过转化将外源 DNA 导入宿主酵母细胞中，再通过筛选操作分离得到转化子。酵母转化系统的选择标记基因 ( $M^+$ ) 与相对应的突变基因 ( $M^-$ ) 的菌株配套使用，不同选择标记有不同的筛选方法 (多为营养缺陷互补)，转化方法可分以下两种。

(1) 完整细胞壁的酵母细胞的直接转化 最常用的转化方法是乙酸锂转化法，操作快捷，转化效率高 (可达  $10^5 \sim 10^6$  个转化子/ $\mu$ gDNA)，分为一般法和快速法两种。快速法省时实用，转化频率却较低。在乙酸锂转化法中， $Li^+$  的最适浓度为 100mmol/L，受体酵母浓度为  $5 \times 10^7$  个细胞/mL，



pH 为 7.0, 为维持高转化频率, 体系中需加聚乙二醇 (PEG4000 或 PEG3350), 乙酸锂可用硫氰化锂代替。

(2) 酵母原生质体转化 首先将酵母用酶法去壁成原生质体后再进行外源 DNA 导入, 筛选出的转化子再使细胞壁再生, 操作过程需将原生质体保持在一定合适渗透压的培养基中。操作步骤多而费时, 原生质体非常脆弱, 不能直接筛选 (药物), 且原生质体可能融合产生多倍体细胞, 对其表型筛选造成困难, 而直接法就不存在这些问题。

### (三) 酵母基因工程在食品和发酵工业中的应用

各种酵母在生产领域有着广泛的应用历史。酵母作为各种特殊蛋白的表达系统, 在生产特殊活性肽 (疫苗、药物等) 方面已取得成功应用, 并且随着研究的深入还会得到更广泛的应用, 这里仅对酵母基因工程在食品和发酵工业几个方面的应用作一简述。

#### 1. 酿酒酵母的改良

国内外最早的研究都集中在对酿酒酵母利用淀粉、寡聚糖和糊精的基因工程改良上, 最早被克隆并引入的是 *Saccharomyces diastaticus* (糖化酵母, 但不耐酒精) 的 STA1, STA2 和 STA3, 基因引进后以 PGK 为启动子, ARS1 为复制子, 但 2 $\mu$ m 质粒存在稳定性不好的问题。Yocum (1986) 将黑曲霉的葡萄糖淀粉酶 (GA) 基因通过 Yip 整合在酵母染色体上, 遗传稳定性及酶活能满足生产要求, 存在问题是真菌糖化酶耐热, 不能为巴氏杀菌灭活。罗进贤等人 (2000) 采用基因重组技术将黑曲酶糖化酶 GAIcDNA 与 MF $\alpha$ 1 因子的启动子信号序列及 PGK 基因的转录终止位点重组进大肠杆菌-酵母穿梭质粒构建酵母表达载体 YepMGT20, 用原生质体转化法引入酿酒酵母 GRF18, 在酵母 MF $\alpha$ 1 启动子信号序列及 PGK 终止位点的调控下, 实现糖化酶的高表达, 99% 的酶分泌至胞外, 构建的酿酒酵母 GRF18 (YepMGT20) 在 10% 淀粉的培养基中培养 48h, 淀粉水解率达 96.1%; 在 10% 淀粉的 YPS 培养基中发酵 96h 可产生 5.6% (v/v) 的酒精 (在 20% 淀粉培养基中酒精产量达 8.4%), 在无选择压力的 SC 培养基中培养 5d, 重组质粒的丢失率只有 1.9%。*Schivaniomyces occidentacis* 的 GAM1 基因整合剂 ADH1 (乙醇脱氢酶) 在基因启动子下, 可达正常工艺要求, 生产出低糖 (干) 啤酒。分泌  $\beta$ -葡聚糖酶可降低啤酒汁黏度, 改善过滤性能, 该酶基因来自木霉 (*Trichoderma reesei*) 的 EGL1 或大麦, 整合入 PPGK1 时可改善过滤, 不影响持泡特性。

#### 2. 啤酒酵母的双乙酰控制

双乙酰作为啤酒成熟的主要标志, 它来自丙酮酸经  $\alpha$ -乙酰乳酸合成缬