

酿酒酵母酒精耐性研究进展

杨建刚¹, 马跃¹, 肖冬光¹, 星野力²

(1.天津科技大学天津市工业微生物重点实验室, 天津 300222; 2.新泻大学农学部应用生物化学科, 日本)

摘要: 酿酒酵母是目前使用最广泛的菌种之一, 它的耐酒精性能及其机理一直被广泛地关注及研究。本文介绍了目前国内外对酵母酒精耐性的研究方向和进展, 主要内容包括耐酒精性能评价, 以及酵母细胞膜、蛋白质、海藻糖和培养基组成等方面与酒精耐性的关系。

关键词: 微生物; 酿酒酵母; 酒精耐性; 研究进展

中图分类号: TS261.1; TQ920 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2006)11-0086-04

Research Progress in Ethanol-tolerance of *S.cerevisae*

YANG Jian-gang¹, MA Yue¹, XIAO Dong-guang¹ and XING Ye-li²

(1.Tianjin University of Science & Technology, The Key Laboratory on Industrial Microbiology of Tianjin, Tianjin 300222; 2. Applied Biochemistry Department of Xinxie University, Japan)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most widely-used microbial species. Its ethanol tolerance performance and the corresponding mechanism has always been the research focus among researchers. The latest research direction and research progress in ethanol tolerance of *S.cerevisae* were illustrated in this paper and the main contents covered the evaluation of ethanol tolerance and the relations of ethanol tolerance and cell membrane, protein and fucose etc.

Key words: microbe; *Saccharomyces cerevisiae*; ethanol tolerance; research progress

Saccharomyces 属酵母从古代开始用于啤酒、葡萄酒、黄酒、清酒、白酒等食用酒精的酿造。另外, 近年来, 除酿造业外, 也被广泛用于溶剂、乳化剂、防腐剂、燃料等工业用乙醇的生产。

酵母对人类来说, 是利用最多的微生物之一。由于拥有其他微生物所不具备的高酒精耐性, 因此到现在还在酒精生产上被广泛应用。因此, 不论是在基础研究, 还是在开发研究中, 关于酵母的酒精耐性机理的研究成为酵母研究者的重要课题之一。有关酵母酒精耐性的基础研究, 早已在 1941 年的 *Journal of Bacteriology* 上就被最初报道^[1]。到目前为止, 世界上的研究者通过不同酵母菌株间的酒精耐性比较、同一菌株的酒精耐性的有无、用于酒精发酵的培养基组成的差异等, 从生物化学、分子生物学角度进行了研究, 获得了大量结果及成果^[2-7]。本文就目前国内外被广泛应用的酵母酒精耐性评价方法及研究概况作一介绍。

1 酵母的酒精耐性评价

酵母自身产生的酒精, 达到一定浓度时, 对酵母本

身具有毒性, 当然, 对其他微生物也同样。随酒精浓度的增加, 酵母的增殖速度及生存率下降, 进一步提高酒精浓度, 酵母的发酵会停止。也就是说, 作为酒精耐性的评价方法, 受酒精影响后, 酵母的增殖速度、生存率、发酵性能成为研究评价焦点^[3]。

以酵母的增殖速度来评价的例子。一定量酒精添加到培养基中, 用其酵母的增殖速度与不添加酒精的培养基上酵母增殖率进行比较。酵母的增殖率在 3 个评价项目中是最明显的。因此, 该方法是应用最广泛的。

根据生存率评价的例子, 在含有一定量乙醇缓冲液中加入酵母, 然后测定不同时间的酵母生存率, 该方法看起来可用于原本增殖率不同的酵母菌株间的乙醇耐性的测定。另外, 根据发酵能来评价的方法, 其是在含有乙醇培养基上添加酵母后, 测定二氧化碳的生成速度或酒精的生成速度, 该方法因为直接测定的是发酵速度, 具有接近实际发酵状态。

综上所述, 酵母乙醇耐性的评价方法有多种, 研究者不同, 采用的方法也不同。从全世界来看, 没有统一的评价方法。酵母本身产生的乙醇被认为比外部添加的乙

收稿日期: 2006-07-10

作者简介: 杨建刚, 男, 2000 年于日本国立新泻大学获博士学位, 天津科技大学教授、硕士生导师, 长期从事发酵工程及生物化学方面研究, 先后参加主持省部级课题, 七五、八五全国攻关等课题多项, 获省部级科技进步三等奖 3 项。

醇更具有毒性, 现在采用的方法, 基本上是外部添加酒精的测定方法, 这些评价法对实际发酵过程中酵母酒精耐性的评价具有局限性。因此, 作为实际发酵过程中酵母酒精耐性的评价方法, 测定发酵过程后期的酒精最大生成量来评价酵母的酒精耐性被认为是最贴切和最真实的^[7]。虽然这种方法不能测定酒精对酵母的增殖率、生存率的影响, 但是简单, 正在世界上被广泛用于评价各种实际发酵现场中酵母的酒精耐性。该方法将成为最有效的评价方法。

2 酵母的细胞膜与酒精耐性

酒精对酵母的细胞膜、各种细胞器膜、存在于膜上的疏水性蛋白质、细胞内的亲水性蛋白质等细胞构造都有影响。在这些构造当中, 特别是隔离外界与细胞内的细胞膜是酒精影响细胞的最主要领域。一般认为, 酒精通过对细胞膜产生作用, 细胞膜的透性、构造便发生变化, 结果引起细胞膜的功能产生比较大的损伤。酵母细胞对此作出应答, 使其细胞膜成分发生变化, 并使细胞本身在适应酒精存在下的环境而生长。于是, 酵母的细胞膜主要构成成分磷脂性脂肪酸、固醇的变化被认为是在解析酒精耐性上的一个重要因素。到 20 世纪 80 年代为止, 已对膜脂质的脂肪组成、固醇含量进行了大量研究, 对这些研究进行汇总后得出以下结论, 即作为酵母对酒精的适应现象, 表现在细胞膜构成成分的变化是膜的脂性脂肪酸链的伸长、不饱和脂肪酸的增加以及固醇含量的增加。这些变化导致细胞膜的整体流动性增加, 进而增加了酵母的酒精耐性^[9]。但是, 有一些研究结果得出了与此不同的结论。作为不同研究者得出不同结果的原因被认为是遗传上不一致的酵母菌株间的差异、培养基成分的不同而致。特别是培养基, 其组成不同, 即使同一株酵母, 它的酒精耐性也会发生变化^[9]。另外, 上面提到的在各脂肪酸成分的变化上, 不饱和脂肪酸的增加虽然可增加脂质二重膜的流动性, 而饱和脂肪酸链长和固醇含量的增加减少了二重膜的流动性。关于这些变化的综合结果, 也就是实际上细胞膜整体的流动性是否增加, 到目前为止没有推测或间接的测定结果报道。

进入 20 世纪 90 年代, Walker-Caprioglio 等报道了酒精能减少固醇合成的关键酶 HMG-CoA 的活性, 在酒精存在下酵母细胞膜的总固醇含量减少, 当时总固醇中的麦角甾醇含量增加^[8]。另外, Casey 等^[9]人报道, 棕榈油酸能增加麦角甾醇的含量, 在另一方面, 油酸显示能减少总固醇及棕榈油酸的含量。从这些结果我们可以看出, 一方面, 酒精胁迫导致细胞膜脂肪酸与固醇含量相互联动起来变化, 来维持细胞膜的构造; 另一方面, Li-oyd 等人尝试着直接测定在酒精环境下酵母的细胞膜整体的流动性。他们通过利用电子自旋共振测定细胞膜中

的标记的自旋(5-氮氧自由基硬脂酸), 来解析酵母的线粒体膜和微粒体的分馏物的流动性^[10]。所得结果, 在 9% 的酒精浓度的培养基上培养的酵母的线粒体膜的流动性不明显, 与在 0.1%Vol 和 0.7%Vol 的酒精培养基上培养的酵母相比, 微粒体的分馏物的流动性明显加快。另外, Alexandre 等^[11, 12]测定了用荧光标记的细胞膜的流动性。他们在原生质体化酵母细胞膜吸收 DPH 荧光物质, 最后测定应该的方位变化, 以此来解析细胞膜的流动性。在酒精含量为 10%Vol 的培养基上培养的酵母细胞膜与不含酒精培养基上培养的酵母细胞膜的流动性比较, 结果显示为增加^[11]。这时, 膜脂质组成为不饱和脂肪酸及麦角甾醇增加, 全部固醇含量减少^[12]。根据对这些酵母细胞膜的直接分析显示, 酵母通过调节自身细胞膜脂肪酸组成, 各种固醇含量的平衡, 来增加细胞膜整体的流动性, 达到适应酒精环境。另一方面, 人为地改变酵母的细胞膜脂质组成, 增加细胞膜的流动性, 以确认酵母的酒精耐性是否增加。日本的研究者^[13, 14]用分子遗传学手段作出细胞膜脂质中的不饱和脂肪酸种类及组成发生了变化的酵母, 测定了这些基因重组菌株的酒精耐性。结果, 却不同于此前的结论, 即细胞膜的流动性与酒精的耐性之间的关系^[15, 17]。

Kajiwara 和 Chi^[18, 19]还认为, 一价不饱和脂肪酸除引起细胞膜流动性外, 还可能存在其他作用, 探明这些作用, 可能在解明酵母酒精耐性方面具有重要作用。此外, HU Chun-Keng^[20]等人也通过改变膜蛋白氨基酸组成来改变膜流动性, 也发现对酵母的耐酒精性有较大影响。

3 酵母的蛋白质与酒精耐性

用非致死浓度酒精及热处理后的酵母, 其酒精耐性增强是众所周知的。因此, 在 20 世纪 90 年代定量了经酒精耐性处理而诱导合成的多种耐性蛋白质。Odumeru 等^[21]人的实验娴熟酵母在发酵过程 70 kD, 65 kD, 50 kD, 35 kD, 28 kD, 26 kD, 23 kD, 14 kD 的蛋白质被诱导合成。这些蛋白质与以前报道的热诱导蛋白质分子量相同的实验也被报道。另外, 除此之外, 酵母在 4%Vol ~ 10%Vol 酒精度下, 热诱导蛋白质 (HSP) 的 HSP104, HSP82, HSP70, HSP30 和 HSP26 被诱导的论文也被报道^[22]。特别是 HSP104, 通过利用 HSP104 遗传基因破坏株解析了热、酒精等各种胁迫处理时, 对酵母产生耐性起着重要作用^[23]。虽然还没有关于这些酒精胁迫诱导的蛋白质以怎样的机理使得酵母获得耐性方面直接的证据, 但是, 可能是 HSP104, HSP70 等与变性蛋白质结合成为抑制这种结合沉淀的分子伴侣, 酒精胁迫诱导的这些蛋白质的合成不是酒精对细胞的直接饱和, 而是被推测为是为了补偿酒精造成的损伤的一种现象^[24]。另一方面, 最近也有报告指出, 14 kD 的 HSP12 存在于细胞膜,

具有保护膜的作用^[25]。

另外,除 stress 蛋白质以外,有抗氧化活性的蛋白质的过氧化物酶(CTT1)、线粒体的锰超氧化物歧化酶被实验证明是在酒精胁迫下被诱导的^[26-27]。这些酶具有通过酒精胁迫诱导的氧自由基(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)等活性氧的来源来起到保护细胞的作用,其中 MnSOD 被认为是关键的酶^[28]。因此,在这种抗氧化作用中,根据存在于细胞中的另一个铜锌超氧化物歧化酶仅起辅助作用及在称为线粒体的呼吸链上发现活性氧等事实,可说明在酵母的酒精耐性方面,线粒体的功能具有重要的作用^[29]。最近,细胞膜脂质的脂肪酸组成被影响发现在 CTT1 基因、MnSOD 基因(SOD_2)等存在于表观控制领域的胁迫表达碱基对(STRE)的活性方面,也就是说,细胞脂类的脂肪酸组成影响 CTT1 基因、MnSOD 基因的表达^[30]。该结果在酒精耐性与细胞膜脂质的关系的研究上也具有重要意义。

酒精一般被认为通过作用细胞膜,使流入细胞内的离子增加,这个增加减少了细胞膜内外的离子浓度梯度,导致细胞的增殖减少^[31]。另外,一般推测酒精降低了细胞膜上的 H^+ -ATP 泵酶的活性^[32]。当时 Rosa 等人^[33]在 6%Vol ~ 8%Vol 的酒精度的培养基上使酵母增殖,然后,测定其 H^+ -ATP 酶活性,发现与培养在不含酒精的培养基上的酵母相比,培养在 6%Vol ~ 8%Vol 的酒精浓度培养基上的酵母的 H^+ -ATP 酶高出 3 倍多。这样,他们认为这是由于菌株间的差别引起的。另外,他们还报道,培养基中的酒精浓度接近致死浓度时, H^+ -ATP 酶活性急减^[34]。现已清楚酒精诱导的 ATP 泵酶的活化主要依赖细胞膜 ATP 酶(PMA1),该活化机理不是 PMA1 的转录、翻译水平,而是取决于翻译后的调节^[35]。另外, Alexandre 等人^[36]也报道了同样的结果。以前的研究证明,长链脂肪酸有增加 ATP 酶活性的功能,固醇和磷脂的比率对 ATP 酶活性也很重要^[37-39]。今后,细胞膜脂质的组成与 ATP 酶活性的关系的研究将占有重要地位。

4 海藻糖与酒精耐性

海藻糖是酵母的贮藏二糖,研究证明海藻糖在酵母被干燥、冷冻时具有保护细胞膜和膜蛋白的功能^[40,41]。Mansure 等人^[42]测定了细胞内海藻糖含量不同的酵母菌株在 10%Vol 的酒精存在下的生存率。结果显示,海藻糖含量越多的菌株,其生存率越高。另外, Kim^[43]等人构建了中性海藻糖水解酶(NTH)基因缺乏的菌株,结果发现,ATH1 基因缺乏菌株和 NTA1 及 ATH1 双基因缺乏菌株细胞内的海藻糖含量增加。另外,比较了 ATH1 缺乏菌株与野生株在 18%Vol 酒精存在下的生存率及在含有 0~40%葡萄糖培养基上的最大酒精生成量,结果显示,ATH1 缺乏菌株在酒精存在下的存活率增加,在

含 20%~35%的葡萄糖培养基上的酒精生成量也增加。这种现象被认为,海藻糖的羟基(OH)与脂质二重膜的极性端以氢键相结合,从而在各种胁迫条件下,产生细胞构相上移动现象,使得细胞膜变得稳定,膜蛋白和细胞内物质的外渗得到阻止。有关这方面的研究,到目前为止还较少,有待进一步深入。

高峻等人^[44]对耐酒精酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 1200 菌株和酒精敏感酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* K5-5A 菌株的耐酒精能力进行了比较,同时分析它们在高浓度酒精冲击过程中的海藻糖含量变化。结果发现,这 2 株酒精酵母菌的海藻糖含量与它们的耐酒精能力、保护线粒体完整、防止线粒体丢失 DNA 有很大的关系。

5 培养基组成与酒精耐性

发酵时,所用培养基营养源的不同,酵母的增殖、酒精的合成、以及酒精存在下的酵母生存率便随之不同^[6]。特别是随着培养基中的 Mg^{2+} 和 PO_4^{3-} 的增加,即便是培养基中相同葡萄糖浓度,酵母的酒精量也随之而增加。在以前,关于酒精发酵过程中,几种糖酵解酶必须有 Mg^{2+} 存在,而且在供给足够的 Mg^{2+} 时具有显著的效果。另一方面,关于 PO_4^{3-} 离子的效果被认为是能够对发酵引起的培养基 pH 的变化起缓冲作用^[6]。另外, Petrov 等人^[45]报道 Mg^{2+} 通过与细胞膜上的磷脂相互作用,从而减少了 H^+ 与 NH^+ 引起的膜透性的增加。保证了细胞膜的稳定性。Birch 等人^[46]通过扫描显微镜观察细胞表面,结果发现 Mg^{2+} 离子的增加能够减少酒精引起的细胞膜表面的损伤程度。他们还报道,随着 Mg^{2+} 离子浓度的增加,在 5%Vol ~ 20%Vol 的酒精存在下的酵母生存率及发酵时最大酒精生成量随之而增加。当时,热休克蛋白的合成诱导减少。这样关于酵母酒精耐性方面, Mg^{2+} 离子的多种作用到最近越来越被明确。另外,也有 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 具有相似效果的报道^[47]。到目前为止,虽然对于酵母的酒精耐性来说,这些离子的效果作用机理不十分明确,但这些结果被认为是对发酵生产及其他产业用酒精生产上来说是最有利用价值。

如上所述,酵母的酒精耐性机理不是单纯的,而是到目前为止明确的各种各样的因子(含尚不明确的因子)通过相互复杂的作用,来调整细胞结构及功能以适应酒精胁迫的环境。

1996 年,酵母的全部染色体的基因碱基配对被发表。在此基础上,在 21 世纪,利用转录组、蛋白质组染色情报的基因缺陷菌株,蛋白质间互相作用的解析等染色体水平的网络解析,将被应用到酵母研究^[48,49]。利用这种网络型研究方法的解析已有报道。今后,关于各种细胞内子的严密研究及染色体水平的这种网络状研究将越

来越多。各种研究方法、结果的相互借鉴,有望在不远的将来能明确酵母的酒精耐性的整个机理。

参考文献:

- [1] W.D.Gray[J]. *J. Bacteriol.* 1941, 42, 561.
- [2] L. A. Ingram, T. M. Bukkte[J]. *Adv. Microbial Physiol.* 1984, 25, 253.
- [3] G. P. Casey, W. M. Ingledew[J]. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1986, (13):219.
- [4] R. P. Jones[J]. *J. Appl. Bacteriol.* 1987, (63): 153.
- [5] R. P. Jones[J]. *Crit. Rev. Biotech.* 1990, (10): 205.
- [6] T.D. Amore, C. J. Panchal, I. Russell, G. G. Stewart[J]. *Crit. Rev. Biotech.* 1990, (9): 287.
- [7] G. M. Walker. In *Yeast Physiol. Biotech[M]*. John Wiley and Sons. 1998, 163.
- [8] H.M. Walker-Caprioglio, W. Mcasey, L. W. [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56, 2853.
- [9] W. M. Casey, G. A. Keesler, L. W. Parks[J]. *J. Bacteriol.* 1992, 174, 7283.
- [10] D. Lloyd, S. Morrell, H. N. Carlsen, H. Degn, P. E. James, C. C. Ro-wlands[J]. *Yeast.* 1993, (9): 825.
- [11] H. Alexandre, J. P. Berlot, C. Charpentier[J]. *Biotech. Techniques.* 1994, (8):295.
- [12] H. Alexandre, I. Rousseaux, C. Charpentier[J]. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, 124, 17.
- [13] S. Kajiwara, A. Shirai, T. Fujii, T. Toguri, K. Nakamura, K. Ohtaguchi[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 4309.
- [14] S. Kajiwara, K. Suga, H. Sone, K. Nakamura[J]. *Biotechnol. Lett.* 2000, 22, 1839.
- [15] M. M. Peyou-Ndi, J. L. Watts, J. Browse[J]. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, 376, 399.
- [16] H. Mizoguchi, S. Hara[J]. *J. Ferment. Bioeng.* 1997, 83, 12.
- [17] T. M. Swan, K. Watson[J]. *Can. J. Microbiol.* 1999, 45, 472.
- [18] S. Kajiwara, T. Aritomi, K. Suga, K. Ohtaguchi, O. Kobayashi [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53, 568.
- [19] Z. Chi, N. Arneborg[J]. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 86, 1047.
- [20] J. A. Odumeru, T. D. Amore, I. Russell, G. G. Stewart[J]. *J. Ind. Microbiol.* 1992, (10):111.
- [21] P. W. Piper, K. Talreja, B. Panaretou, P. Moradas-Ferreira, K. Byrne, U. M. Praekel, P. Meacock, M. Regnacq, H. Boucherie[J]. *Microbiology.* 1994, 140, 3031.
- [22] D. A. Parsell, S. Lindquist[J]. *Annu. Rev. Genet.* 1993, 27, 437.
- [23] P. W. Piper[J]. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995, 134, 121.
- [24] K. Sales, W. Brandt, E. Rumbak, G. Lindsey[J]. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000, 1463, 267.
- [25] T. Belazzi, A. W. Wagner, R. Wieser, M. Schanz, G. Adam, A. Hartig, H. Ruis[J]. *EMBO J.* 1991, (10):585.
- [26] R. Wieser, G. Adam, A. Wagner, C. Schuller, G. Marchler, H. Ruis, Z. Krawiek, T. Bilinski[J]. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 12406.
- [27] V. Cost, E. Reis, A. Quintaniha, P. Moradas-Ferreira[J]. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 300, 608.
- [28] V. Costa, M. A. Amorim, E. Reis, A. Quintaniha, P. Moradas-Ferreira[J]. *Microbiology.* 1997, 143, 1649.
- [29] M. T. Chatterjee, S. A. Khalawan, B. P. G. Curran[J]. *Microbiology.* 2000, 146, 877.
- [30] C. Leao, N. Van Uden[J]. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984, 74, 43.
- [31] C. P. Cartwright, F. J. Veazey, A. H. Rose[J]. *J. Gen. Microbiol.* 1987, 133, 857.
- [32] M. F. Rosa, I. Sa-Correia[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57, 830.
- [33] M. F. Rosa, I. Sa-Correia[J]. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, 135, 271.
- [34] G. A. Monteiro, P. Supply, A. Goffeau, I. Sa-Correia[J]. *Yeast.* 1994, (10): 1439.
- [35] H. Alexandre, I. Rousseaux, C. Charpentier[J]. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1993, 20, 173.
- [36] A. Johannsson, C. A. Keightley, G. A. Smith, C. D. Richard, T. R. Hesketh, J. C. Metcalf[J]. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 1643.
- [37] D. T. Cooke, R. S. Burden[J]. *Physiol. Plant.* 1990, 78, 153.
- [38] D. T. Cooke, R. Ros, R. S. Burden, C. S. James[J]. *Physiol. Plant.* 1993, 88, 397.
- [39] J. H. Crowe, L. M. Crowe, D. Chapman[J]. *Science.* 1984, 223, 701.
- [40] P. Gelinis, G. Fiset, A. LeDuy, J. Goulet[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55, 2453.
- [41] J. J. C. Mansure, A. D. Panek, L. M. Crowe, J. H. Crowe[J]. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994, 1191, 309.
- [42] J. Kim, P. Alizaden, T. Harding, A. Hefner-Gravink, D. J. Klionsky[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 1563.
- [44] R. M. Birch, G. M. Walker[J]. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 26, 678.
- [43] V. V. Petrov, L. A. Okorokov[J]. *Yeast.* 1990, (6): 311.
- [45] Z. Ciesarova, D. Smogrovicova, Z. Domeny[J]. *Folia Microbiol.* 1996, 41, 485.
- [46] T. Takahashi, H. Shimoi, K. Ito[J]. *Mol. Genet. Genomics.* 2001, 265, 1112.
- [47] H. Alexandre, V. Ansanay-Galeote, S. Depuin, B. Blondin[J]. *FEBS Lett.* 2001, 498, 98.
- [48] HU Chun-Keng, BAI Feng-Wu, AN Li-Jia. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology.* 2005, 21(5): 809-813.
- [49] 高峻, 池振明. 耐高浓度酒精酵母菌与酒精敏感酵母菌海藻糖含量与耐酒精的关系[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(5): 4-7.