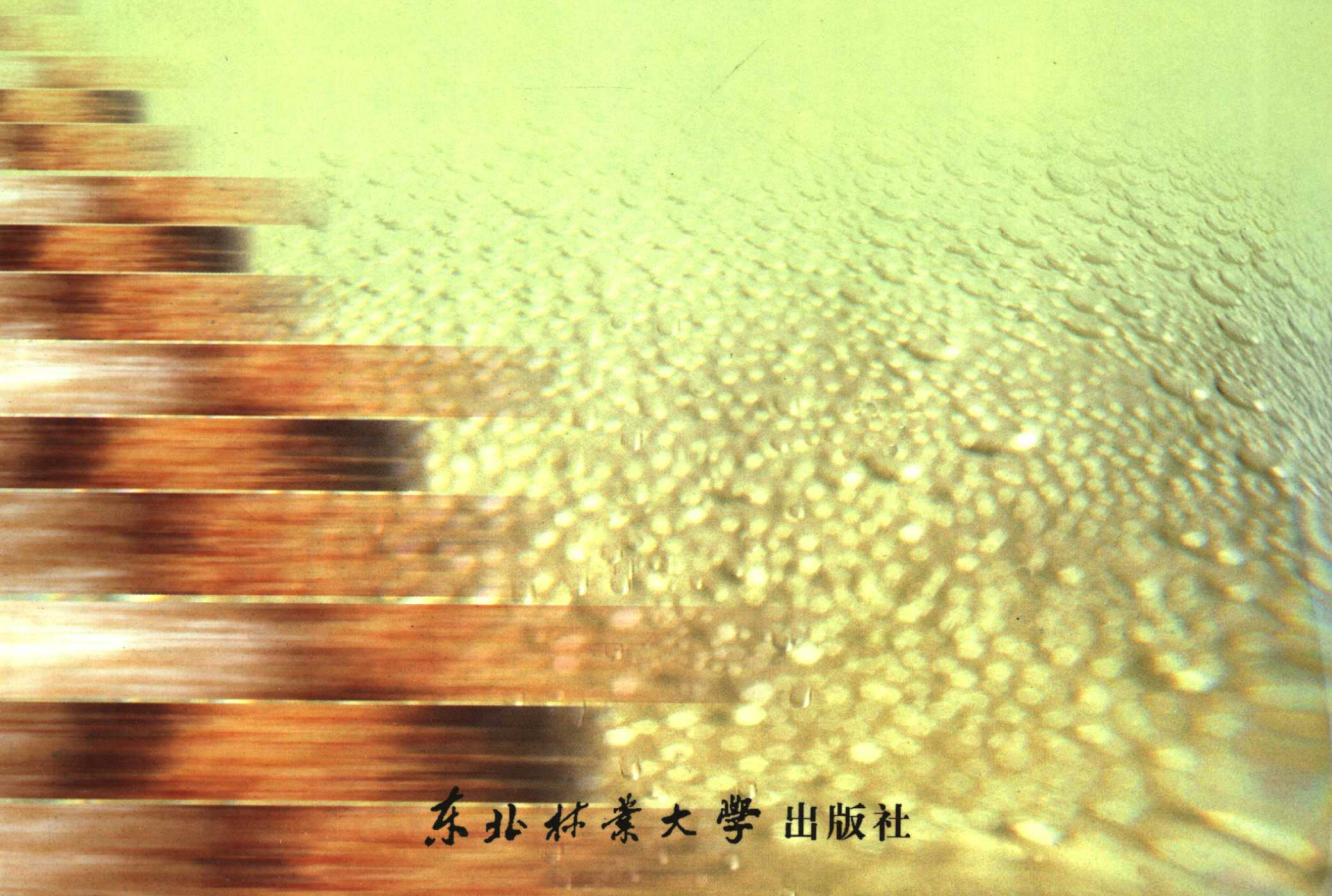




SHIPIN GONGYE XIN JISHU

食品工业新技术

主 编 纵 伟
副主编 申瑞玲 王章存



东北林业大学出版社

食品工业新技术

主 编 纵 伟

副主编 申瑞玲 王章存



东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

食品工业新技术/纵伟主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2006.4

ISBN 7 - 81076 - 858 - 1

I 食… II 纵… III. 食品加工—技术 IV. TS205

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 037958 号

责任编辑: 张红梅

封面设计: 彭 宇



NEFUP

食品工业新技术

Shipin Gongye Xin Jishu

主 编 纵 伟

副主编 申瑞玲 王章存

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

哈 尔 滨 市 工 大 节 能 印 刷 厂 印 装

开 本 787 × 1092 1/16 印 张 17.5 字 数 430 千 字

2006 年 4 月 第 1 版 2006 年 4 月 第 1 次 印 刷

印数 1—1 000 册

ISBN 7-81076-858-1

TS·14 定价: 35.00 元

编 委 会

主 编 纵 伟

副主编 申瑞玲 王章存

参 编 赵光远 安广杰 刘小玲

彭雪萍 司俊玲 刘卫东

前 言

食品工业向着追求营养、美味、健康、安全、快捷、方便、多样的趋势发展,传统的食品加工工艺和生产技术往往不能满足食品工业的需要,难以适应现代食品工业迅猛发展的潮流。因此,采用新技术是食品工业发展的必然趋势。目前,很多食品加工新技术已经在食品工业中得以应用。

工业发达国家在食品生产中采用的先进技术大致有如下几个方面:一是先进的食品加工技术,如生物技术、微胶囊技术、超临界萃取技术、分子蒸馏技术、膜分离技术、挤压膨化技术、超微粉碎技术、先进的杀菌技术(超高压杀菌、臭氧杀菌、静电杀菌、生物杀菌等);二是先进的检测技术如食品无损检测技术、色谱分析技术、PCR技术等;三是先进的保鲜技术,如辐照技术保鲜、无菌包装技术保鲜、气调保鲜、可食用膜保鲜等。

本书对一些食品工业中的加工新技术做了较详尽的介绍,着重介绍了新技术的基本理论,同时通过一些实例对新技术在食品工业中的应用做了一定的介绍。

本书共分8章,主要包括生物技术、超高压技术、微胶囊技术、超临界流体萃取技术、膜分离技术、分子蒸馏技术、挤压技术、超微粉碎技术。

本书第一章第一节由郑州轻工业学院彭雪萍编写;第一章第二节、第三节由郑州轻工业学院安广杰博士编写;第一章第四节由郑州轻工业学院司俊玲编写;第二章、第六章由郑州轻工业学院纵伟博士编写;第三章由广西大学刘小玲博士编写;第四章由郑州轻工业学院赵光远博士编写;第五章第一节由郑州轻工业学院王章存博士编写;第五章第二节、第三节由刘卫东副教授编写;第七章、第八章由郑州轻工业学院申瑞玲博士编写。全书由纵伟博士主编、申瑞玲博士和王章存博士任副主编。

在本书编写过程中我们查阅了大量相关文献,由于篇幅所限,参考文献中未能一一列出,在此,谨向文献的作者表示衷心的感谢!

由于许多新技术为多种学科的交叉学科,加之作者学识有限,书中不妥之处在所难免,请广大读者批评指正。

编者
2006.1

目 录

第一章 食品生物技术	(1)
第一节 食品基因工程	(1)
第二节 食品酶工程	(17)
第三节 食品发酵工程	(42)
第四节 细胞工程及其在食品工业中的应用	(53)
第二章 食品超高压技术	(70)
第一节 超高压技术的沿革	(70)
第二节 超高压技术的原理	(72)
第三节 超高压对微生物活性的影响	(73)
第四节 超高压技术对食品品质的影响	(75)
第五节 超高压技术在食品中的应用	(80)
第六节 超高压技术加工设备	(90)
第七节 超高压处理技术存在的问题和前景展望	(97)
第三章 食品微胶囊技术	(100)
第一节 概述	(100)
第二节 微胶囊的主要制备方法	(102)
第三节 微胶囊在食品中的应用	(123)
第四章 食品超临界流体萃取技术	(131)
第一节 概述	(131)
第二节 超临界流体的基本概念和性质	(132)
第三节 超临界流体的过程系统及操作特性	(138)
第四节 超临界流体在食品工业上的应用	(146)
第五节 超临界流体萃取技术的一些新进展	(164)
第五章 食品膜分离技术	(167)
第一节 概述	(167)
第二节 膜技术基本原理	(169)
第三节 膜技术在食品工业中的应用	(185)
第六章 分子蒸馏技术	(200)
第一节 分子蒸馏技术产生的背景	(200)
第二节 分子蒸馏技术原理及特点	(202)
第三节 分子蒸馏设备	(207)
第四节 分子蒸馏技术参数模型及影响因素	(212)

第五节 分子蒸馏在食品工业中的应用	(215)
第七章 食品挤压加工技术	(223)
第一节 概述	(223)
第二节 食品挤压加工设备及工作原理	(228)
第三节 挤压加工技术在食品工业中的应用	(238)
第八章 食品超微粉碎技术	(247)
第一节 概述	(247)
第二节 超微粉碎的基本理论	(248)
第三节 超微粉碎设备和工艺概述	(252)
第四节 超微粉碎技术在食品工业中的应用	(264)
参考文献	(269)

第一章 食品生物技术

现代生物技术 (Biotechnology) 是在 20 世纪 70 年代伴随着 DNA 重组、细胞融合等新技术的出现而发展起来的。1982 年国际合作及发展组织对生物技术这一名词的含义进行了重新定义: 生物技术是应用自然科学及工程学的原理, 依靠微生物、动物、植物体作为反应器将物料进行加工以提供产品来为社会服务的技术。生物技术逐步成为与微生物学、生物化学、化学工程等多学科密切相关的综合性边缘学科。一般认为, 生物技术包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程四个部分。

现代食品生物技术 (Food biotechnology) 主要是指生物技术在食品工业的应用, 包括为食品工业提供基础原料、食品添加剂、保健食品的功能性基料, 以及在食品加工工艺和技术、包装、检测和污水处理等方面的应用。

第一节 食品基因工程

一、基因工程基础

基因工程 (Genetic engineering) 又称分子克隆 (Molecular cloning) 或 DNA 重组技术 (Recombinant DNA technology), 即对不同生物的遗传物质 (基因), 在体外进行人工“剪切”、“组合”和“拼接”, 将异源基因与载体 DNA 进行重组, 通过微生物质粒、噬菌体、病毒等载体, 将形成的重组子转入受体细胞, 使异源基因在其中复制表达, 从而改造生物特性, 大量生产出人类所需要的产物或创建新的生物类型。

(一) 基因工程的基本程序

基因工程的基本过程包括以下步骤:

- ①带有目的基因的 DNA 片段的制备;
- ②DNA 片段与载体 DNA 体外重组;
- ③DNA 重组体转入受体细胞;
- ④重组体克隆的筛选与鉴定;
- ⑤外源基因的表达。

基因工程的基本过程如图 1-1 所示。

1. 目的基因的获得

在基因工程中, 首先是获得所需要的特异基因, 即目的基因 (或称外源基因)。这是基因重组成功的关键。目的基因的得到可采取从已有的生物基因组中分离或人工合成的方法。

(1) 从已有的生物基因组中分离

有 3 种主要的方法, 即限制酶法、mRNA 或 cDNA 钓取法和分离法。

限制酶法是采用基因工程手段把染色体 DNA 用限制性内切酶切割, 将某种载体也用限制性内切酶切割, 通过粘性末端可将目的基因连接到载体上, 通过载体将目的基因转入工程菌中增殖, 再用适当方法来筛选出该基因的重重组体菌落, 从重组体细菌中提取 DNA, 经酶切后即可回收该基因。原核生物基因的分离多采用此法。

mRNA 或 cDNA 钓取法是利用 mRNA 或 cDNA 钓取含有相应基因的 DNA 片段。第一步是获得相应的 mRNA; 第二步是在逆转录酶的作用下体外合成 cDNA; 第三步用 cDNA 来钓取目的基因片段。

分离法是利用一些基因在碱基组成上与总体 DNA 有明显的区别, 可以利用物理性质的差别将这些基因从总 DNA 中分离出来。例如, 在一基因组中有多拷贝基因, 这种基因在 CsCl 密度梯度离心时, 相应的 DNA 可形成一种区别于主要 DNA 带的“卫星带”。利用这一特性便可将其从总 DNA 中分离出来。

(2) 人工合成法

人工合成带有目的基因的 DNA 片段的方法有酶促合成法和化学合成法。

酶促合成法是以 mRNA 为模板, 用逆转录酶合成长或接近全长的 cDNA, 然后进行克隆。这是获得真核基因的常用方法。实际操作时主要是根据绝大多数真核细胞 mRNA 分子 3'-末端都有多聚腺嘌呤核苷酸 (PolyA) 顺序这一特点, 先用寡聚 (dT) - 纤维素柱分离真核细胞的 mRNA, 再从中分离所需基因的 mRNA, 然后以此 mRNA 为模板用反向转录酶合成 cDNA, 经碱处理除去 mRNA 后, 另一条链用 DNA 聚合酶 I 合成。

化学合成法是以单核苷酸为原料, 在体外按照已知基因的碱基顺序, 经过单核苷酸活性基团保护、缩合反应, 去除保护基团和产物纯化等步骤, 先合成 DNA 短片段, 再依次连接成完整的目的基因链。此法必须预先知道目的基因或其 mRNA 或蛋白质的一级结构, 即核苷酸或氨基酸的顺序。

化学合成法能按人们的意愿合成突变基因, 但要合成较长的 DNA 分子比较复杂。随着基因工程技术的迅速发展, DNA 合成仪的问世, 使任何 DNA 片段的合成成为可能。目前, 许多合成基因, 如胰岛素基因、干扰素基因、乳糖操纵基因等已商品化。

合成法也可用聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 系统来完成, PCR 技

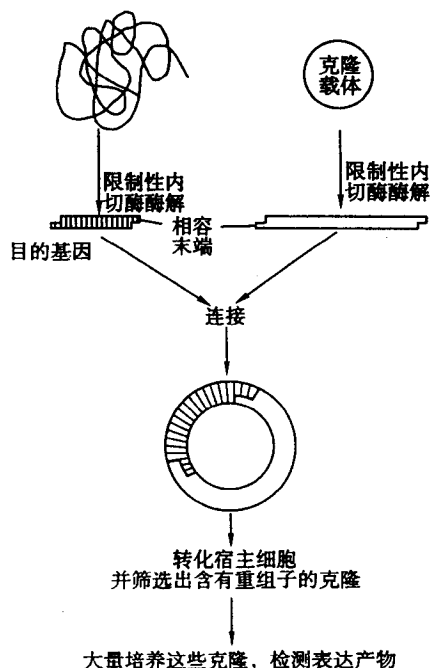


图 1-1 基因工程的基本过程

术就是在体外通过酶促反应成百万倍地扩增一端目的基因，它是 1985 年美国 Cetus 公司的 Mullis 等人建立的，由于此项工作，Mullis 在 1993 年获得了诺贝尔化学奖。采用这种方法，在反应系统中只要有一个拷贝的待扩增的 DNA 片段，在短时间内就能扩增出大量拷贝数的特异性 DNA 片段，可满足用于常规方法的 DNA 检测和重组。

PCR 技术操作步骤为：

①反复将目的基因片段进行热变性处理，令其双股链解开，形成两条单链模板。

②加入两种不同的单链 DNA 引物，并分别与两条单链 DNA 模板退火，即将反应温度降低，使两个引物分别与变性的两条模板 DNA 单链的 3' - 端配对。

③在四种脱氧三磷酸核苷存在的条件下，DNA 聚合酶在模板指导下，使引物沿 DNA 单链的 3' - 5' 方向延伸，合成出一条新的 DNA 链。然后开始第二个反应周期。每一反应周期，特异性目的基因扩增 1 倍，用 n 代表反应周期数，则特异性 DNA 目的基因片段便按 2^n 指数扩增下去，一直扩增至所需数量为止。

这一技术的最大特点是高效扩增，能专一富集一个特异性 DNA 序列，即使很微量的目的基因也可扩增到足以方便检出，这也是分子克隆技术中的一次重大改进。

除了普通的 PCR 外，还有一些改进的 PCR，如逆转录 PCR、锚定 PCR 和反向 PCR 等。

2. DNA 片段与载体 DNA 体外重组

有了目的基因片断（或外源基因），就必须考虑如何将它引入受体细胞，要将一个外源基因送入受体细胞，需要有运输工具，即载体。作为载体应具备下列条件：

①本身是一个复制子，能自我复制。

②相对分子质量要小，小分子 DNA 易处理，限制性内切酶切点少，适于接受目的基因（外源基因）。

③能给寄主细胞（受体细胞）提供可选择的遗传标记，以便人们进行筛选。多数质粒皆有抗生素抗性基因，可作为选择标记。

④只有单一限制性内切酶切点，经某一限制性内切酶切割后，既可以把质粒 DNA 闭环打开以接纳外源 DNA 片段，又不会丢失自己的片段。目前经常使用的载体有质粒、噬菌体及动植物病毒。

将目的基因与载体相连主要是由 DNA 连接酶完成。底物是双股上有单股缺口的 DNA，当缺口处 5' - 端核苷酸有磷酸根，3' - 端核苷酸有羟基时，便可由 T_4 - DNA 连接酶封闭成共价连接。主要包括以下两步骤：

①DNA 分子的剪切：这一步骤是将带有目的基因的 DNA 片段和载体 DNA 同时使用某种方法进行处理，创造一种可将它们连接起来的条件。最常用的方法是使用限制性内切酶进行剪切。除了用限制性内切酶剪切 DNA 分子外，还可用非特异的核酸内切酶处理、化学降解和机械剪切等方法。

②DNA 分子的连接：带有目的基因的 DNA 片段与载体 DNA 在限制性内切酶剪切后产生了粘性末端。两者在末端处相结合形成了一个带有缺口的结合体。这种缺口可以用 DNA 连接酶封补，形成了一个完整的双链。

将 DNA 片段连接成为人工重组体的方法主要有三种：粘性末端法、接尾法和人工接头法。

3. 将重组子导入受体细胞

在体外完成 DNA 重组后，接下来应将重组子导入受体细胞，让目的基因在受体细胞中表达。受体细胞是指重组体分子在其中繁殖的一类宿主细胞。基因操作要求受体细胞应该具有以下特点：

- ①高转化率；
- ②保持质粒稳定；
- ③营养缺陷型；
- ④其他某种遗传性标记。

目前，基因工程采用的受体细胞以大肠杆菌为主，人的生长激素基因、胰岛素基因和干扰素基因等已在大肠杆菌中表达成功。另外，枯草杆菌、链球菌、放线菌等也可以用做受体细胞。酵母菌属于真核生物，能识别许多高等生物基因上的信号，进行蛋白的糖基化等，用来作为受体细胞，越来越受到重视。

把纯化的 DNA 导入细胞的过程称为转化 (Transformation)。转化是细胞直接吸收裸 DNA 的途径。具有吸收裸 DNA 的能力的状态被称为感受态 (Competence)。自然的转化与被称为感受态蛋白 (Competence proteins) 的一类蛋白质的合成诱导有联系。进行基因操作时，主要采取化学处理 (如 CaCl_2 法) 和电穿孔法两种途径。电穿孔法简单地说就是把宿主细胞置于一个高强电场中，通过电场脉冲在细胞壁上打孔，DNA 分子随即进入细胞。电穿孔法也因菌而异，对大肠杆菌来说，一般是 50 mL 细胞，用 $25\ \mu\text{F}$ 、 $2.5\ \text{kV}$ 和 $200\ \Omega$ 的脉冲处理 $4.6\ \text{ms}$ 。化学处理法比如先用冷的 CaCl_2 处理，然后置于 $42\ ^\circ\text{C}$ 高温热激 $90\ \text{s}$ 的方法帮助细胞吸收外源 DNA。

4. 重组体克隆的筛选与鉴定

转化后的菌落通常置于含有标记抗菌素的丰富培养基上进行扩增、初筛，然后再用标记的 mRNA 进行原位杂交、电泳等方法检测、筛出带有目的基因的转化子。重组体克隆的筛选与鉴定的方法较多，常用的方法有表型直接筛选法、菌落或噬菌斑原位杂交等。

(1) 表型直接筛选法

这种方法是利用载体的遗传标记、噬菌斑的形成等特点来选择重组子。一般质粒载体上都具有抗药性标记，外源 DNA 插入到载体 DNA 的某一抗药性基因内的酶切位点中，便引起了这一抗药性基因的失活。人们可以在药物选择平板上根据抗性的消失来选出重组体。

以外源 DNA 插入到 pBR322 的 BamH I 位点中为例，可以通过以下步骤来鉴别：先将转化的细胞涂布在一个含有氨苄青霉素的培养基上，只有那些带有完整的 pBR322 质粒或是插入有外源 DNA 片段的 pBR322 质粒的细胞可以在培养基上生长；没有转化的细胞就会被氨苄青霉素杀死。由于 BamH I 位点是在四环素抗性基因中，因此，如果 DNA 插入到这个基因中，就会破坏四环素抗性基因，四环素的抗性就会丢失，所以带有外源 DNA 的质粒的受体细胞对氨青霉素有抗性，但对四环素没有抗性。那些带有自身环化的质粒 DNA 的细胞既有氨苄青霉素的抗性，同时也有四环素抗性。第二步是把长在含有氨苄青霉素的培养基

上的克隆转移到含有四环素的培养基上,如果在含有四环素的平板上生长,该克隆就带有自身环化的 pBR322,因为这些细胞对两种抗生素都有抗性;而那些只在氨苄青霉素平板上生长,而在四环素平板上不能生长的克隆就是带有外源 DNA 的重组质粒的克隆。重复第二步筛选步骤,就可以较为确定地筛选出那些带有特异地插入的外源 DNA 的重组质粒。在 pBR322 质粒上的 Hind III 和 sal I 的位点也同样可以作为克隆的位点。

(2) 菌落或噬菌斑原位杂交

在筛选和鉴定基因文库中的某一特定 DNA 重组体克隆时,常用的方法是菌落或噬菌斑的原位杂交。方法是将菌体或噬菌斑从培养平板转移到硝基纤维膜上;然后用溶菌酶来处理膜,使 DNA 释放出来;经过变性和烘干过程,将 DNA 固定在膜上;用³²P 标记的探针 DNA 与膜上的 DNA 进行杂交;通过放射自显影,确定要选择的菌落。

在筛选出重组体后,还必须对重组 DNA 做进一步的鉴定。一般的鉴定方法有 DNA 测序、凝胶电泳分析和电镜观察等。

5. 外源基因在受体细胞中的表达

克隆 DNA 的最终目的是表达最终目的产物。因此,通过 DNA 重组技术使特定基因片段在受体细胞内大量增殖,拷贝数目大大增加,就必须使特定基因进一步转录、翻译为相应的蛋白质(或酶),甚至因此获得它们的代谢产物,这一过程称为基因表达。外源基因的表达是基因操作过程的重要组成部分。成功的表达是基因工程操作的目的,其标准是外源基因在表达体系中,既能保持原来的生物活性又能高效地产生蛋白产物。

外源基因高效表达系统的建立包含两个方面的内容:第一是根据外源基因及其表达产物的性质选择理想的受体细胞;第二是依据基因表达调控原理设计构建重组子,包括强化蛋白质的生物合成、阻断外源基因表达产物的降解、维持重组蛋白的特异性空间构象以及向胞外分泌。具体地讲,要构建一个较好的表达载体,主要应注意从以下几个方面去考虑:

- ① 转录启动子和终止子序列的特点;
- ② 核糖体结合位点的强弱;
- ③ 基因拷贝数及其是存在于质粒中,还是整合到宿主基因组中;
- ④ 合成的外源蛋白在细胞中的定位;
- ⑤ 宿主的翻译效率;
- ⑥ 克隆基因所表达的蛋白在宿主中的自身稳定性。

由于大部分克隆的目的基因有其独特的分子特点、理化性质和应用需求,因此要获得最大表达量,人们需要根据具体情况去找出相应的表达条件。

虽然在很多其他原核和真核生物中都能表达外源基因,但目前绝大多数进行商业生产的目的基因都是在大肠杆菌(*E. coli*)中表达的,这主要是基于以下几个原因:一是人们长期以来对大肠杆菌已做了大量研究工作,对其遗传学背景和分子生物学、生物化学以及生理学等方面的了解较为深入;二是很多目的基因在大肠杆菌中都能迅速而有效地表达出蛋白;三是大肠杆菌的培养条件易于控制,培养费用低廉。当然,其他的宿主系统,如枯草杆菌、酵母、动物、植物、昆虫细胞等,也可用于表达某些特定的目的基因。理论上讲,针对在大肠杆菌中大量表达外源基因而采用的方法也同样可以应用于其他原核表达

系统,只是采用的表达载体、转化方法以及培养和纯化的程序各不相同而已。

(二) 基因工程的工具酶

在 DNA 重组操作中, DNA 片段的位点特异性切割与连接是最基本的。有时外源 DNA 片段与载体分子拼接前,还需对连接位点做一些特殊的技术性处理,以提高连接效率。所有这些操作均由一系列功能各异的酶来完成。在基因工程中应用的酶统称为工具酶 (Enzyme of tools)。

1. 剪切酶

(1) 限制性核酸内切酶

限制性核酸内切酶 (Restriction endonuclease) 是一类能识别双链 DNA 中特殊核苷酸序列,并在适当的反应条件下使每条链一定位点上的磷酸二酯键断开,产生具有 3'-OH 基末端和 5'-磷酸基末端的 DNA 片段的内切脱氧核糖核酸酶 (Endo-deoxyribonuclease)。至今发现的限制性核酸内切酶有 I 型酶、II 型酶和 III 型酶,它们各具特性。II 型酶是基因工程操作中最有用的一类工具酶,它们能识别双链 DNA 上特异性核苷酸序列,专一性强,而且其识别序列与切割序列相一致,特别适合于基因工程中的生化操作。

限制性内切酶的作用特点如下:

①在双链上结合并切割回文结构:由于 DNA 具有双螺旋结构,识别核苷酸序列只能从 5'-末端向 3'-末端读碱基顺序。因此,在识别序列的两条核苷酸链中碱基排列次序是完全相同的,即正读与反读皆相同,这样的序列称为回文结构 (Palindrome)。

②识别不同的特异核苷酸序列:大多数酶具有 4 个或 6 个碱基的识别位点。

③切割后形成各种粘性末端或平整末端:各种限制性内切酶不仅对其识别序列的切割位点不同,而且对碱基的专一性要求严格,对切点两边碱基有一定要求,同时对切点附近几个碱基序列都有严格要求。按其切割双链的方式可分两种:粘性末端和平整末端。限制性内切酶错位切割 DNA 双链而形成碱基序列彼此互补的单链末端,即或为 5'磷酸突出,或为 3'羟基突出的末端,称为粘性末端 (Cohesion ends),例如, EcoR I 的切割形成粘性末端如图 1-2 (a) 所示。这种末端的 DNA 片断很容易通过单链区的碱基配对而联结在一起,产生线状或环状 DNA 分子。这一作用对 DNA 体外重组十分重要。大多数限制性内切酶均有此种切割方式。另一种是在同一位点平齐切割 DNA 两条链而形成的双链末端,称为平整末端 (Flush ends)。如 AluI 切割后形成平整末端如图 1-2 (b) 所示。

④不同的酶能识别相同的位点:一些来源不同的限制性核酸内切酶,具有相同的识别序列,被称为同工酶 (Isoschizomer)。同工酶可具有相同的酶切位点,例如 Hha I 和 Cto I ($-GC^+GC-$),也可以具有不同的酶切位点,例如 Sma I ($-CCC^+GGG-$)。

⑤不同的酶能产生相同的末端:有些限制性内切酶,识别位点序列不同,切割后有可能产生相同的粘性末端。例如 BamH I、Bgl II 和 Mbo I 这三种不同来源的限制性内切酶的识别序列是不同的,分别为: $-GGATCC-$ 、 $-AGATCC-$ 和 $-GATC-$,但它们切割后都产生相同的 5'-GATC 粘性末端。这种酶被称为同尾酶 (Isocandamers)。这类酶的 DNA 酶解片断都可在体外重组,在连接酶的作用下,可以得到嵌合 DNA,称为异源二聚体。这种二聚体不再能被原来两种限制性内切酶所识别,有利于得到大量的重组 DNA 分子。

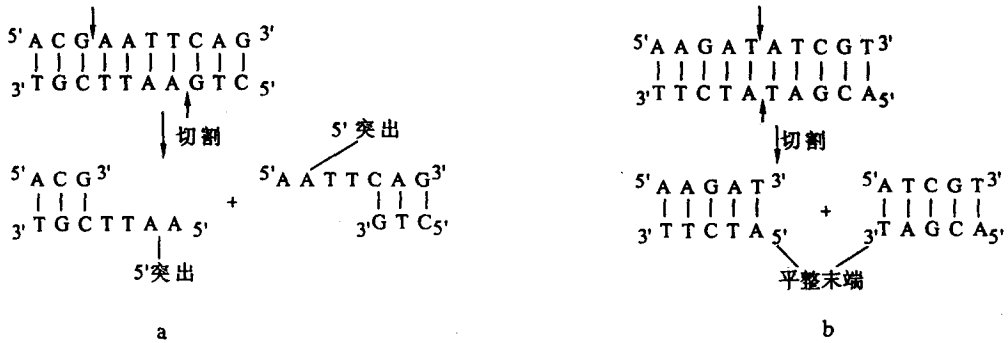


图 1-2 限制性核酸内切酶降解 DNA 形成粘性末端和平整末端

a. EcoRI 的切割形成粘性末端; b. 平整末端 DNA 的产生

(2) DNA 核酸外切酶

这是一类从脱氧核糖核酸 (DNA) 分子末端开始逐个除去末端核苷酸的酶。这些酶中有些可以从 DNA 链的 5'-末端开始作用, 有些从 3'-末端开始作用, 有些则可同时作用于 5'-末端和 3'-末端。在基因工程中 DNA 核酸外切酶用于载体或基因片段的切割加工。当获得的基因载体或基因片断太大时, 可利用 DNA 外切酶从两条链的末端各除去若干个核苷酸, 而使 DNA 片断变小一些; 当获得的 DNA 片断为平整末端时, 为使它变成粘性末端, 可以采用从 5'-末端或 3'-末端作用的 DNA 外切酶, 以获得所需的带有粘性末端的 DNA 片断, 以利于体外重组 DNA。

(3) 自我剪切酶

自我剪切酶是一类催化本身 RNA 分子进行剪切反应的核酸类酶, 它可以在一定条件下催化本身 RNA 进行剪切反应, 使 RNA 前体生成成熟的 RNA 分子和另一个 RNA 片断。

(4) RNA 剪切酶

RNA 剪切酶是催化其他 RNA 分子进行剪切反应的核酸类酶。1983 年 S. Altman 发现大肠杆菌核糖核酸酶 P (RNase P) 的核酸组分 M I RNA 在高浓度镁离子存在的条件下, 具有该酶的催化活性, 而该酶的蛋白质部分 C₃ 蛋白并无催化活性。MIRNA 可催化 tRNA 前体的剪切反应, 除去部分 RNA 片断, 而成为成熟的 tRNA 分子。后来的研究证明, 许多原核生物的核糖核酸酶 P 中的 RNA (Rnase P-RNA) 也具有剪切 tRNA 前体生成成熟 tRNA 的功能。

2. DNA 连接酶

在基因工程中常用的连接酶主要是 T₄-DNA 连接酶和大肠杆菌 DNA 连接酶。

(1) T₄-DNA 连接酶

该酶能催化 DNA 分子中相邻的 3'-OH 末端和 5'-磷酸基末端之间形成磷酸二酯键, 封闭双链 DNA 上相邻核苷酸之间的单链缺口, 使外源目的基因片断和载体质粒 DNA 片断在体外连接形成重组 DNA 分子或称为杂合子。它既能进行平端又能进行粘性末端的连接反应, 反应时需要 ATP 分子作为辅助因子。因此, 它在 DNA 合成、DNA 复制和基因重组中起着十分重要的作用。

(2) 大肠杆菌 DNA 连接酶

这种酶是一种内源性细菌酶。与 T_4 -DNA 连接酶相同, 反应需要被连接的分子末端具有 3'-羟基和 5'-磷酸基团。与 T_4 连接酶不同的是, 它不能有效地进行平末端的连接反应。同时, 该酶的辅酶因子是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+), 而不是 ATP。

3. 其他用于 DNA 重组的工具酶

(1) DNA 聚合酶 I

该酶实际上是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I N 端的大片段, 首先 Klenow 利用枯草杆菌蛋白酶位点特异性降解的方法从大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 中制备, 故也称为 Klenow 酶。

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的作用是催化聚合脱氧核苷酸, 使之逐个接到引物上去, 最后形成新的 DNA。在基因操作中, DNA 聚合酶 I 在缺口翻译 (Nick translation) 上很有用。它以 DNA 分子内有缺损部位的单链作为模板, 前体为引物, dNTP 为基质, 从缺损部分 3'-OH 末端开始, 沿 5'→3' 方向依次将脱氧核苷酸拼接上去, 以填补小片断前体之间的空隙。与此同时, 5'→3' 外切酶降解 5'-磷酸末端, 翻译过程在酶到达 DNA 分子终点时才终止。Klenow 酶在 DNA 重组中的主要用途是:

- ① 修补由限制性核酸内切酶造成的 3' 凹端, 使之成为平头末端;
- ② 以含有同位素的脱氧核糖核苷酸为底物, 对 DNA 片段进行标记;
- ③ 用于催化 cDNA 第二链的合成;
- ④ 用于双脱氧末端终止法测定 DNA 序列;
- ⑤ 碱性磷酸酶。

碱性磷酸酶是催化从单链或双链 DNA 和 RNA 分子中除去 5'-磷酸残基, 即脱磷酸作用。在基因工程中主要用于载体 DNA 的 5'-端除磷工序, 以防止载体 DNA 自我环化, 从而提高重组效率。同时, 在用同位素 ^{32}P 标记 5'-OH 末端以制备 DNA 或 RNA 探针时, 先用该酶去除 5'-磷酸基而产生 5'-OH 末端, 再进行末端标记。碱性磷酸酶还可以用于水解核苷酸生成核苷, 并在酶标免疫测定方面应用。

(2) S_1 核酸酶

这是一种对单链 DNA 或 RNA 具有特异性的核酸内切酶, 产生 5'-磷酸基的单核苷酸或寡核苷酸。该酶降解 DNA 的速度大于降解 RNA 的速度, 但不能降解其双链的 DNA 或 RNA 的杂合子。因此, 在分子克隆中用来分析 DNA-RNA 杂合子结构; 从具有单链末端的双链 DNA 分子中除去单链部分的核苷酸, 生成平整末端的双链 DNA。在以 mRNA 为模板, 合成互补 DNA (cDNA) 时, 往往会发生“发夹状环”, 用核酸酶 S_1 可使这些“发夹状环”除去。

(3) 反向转录酶

反向转录酶 (Reverse transcriptase) 能以 RNA 为模板, 以脱氧核苷三磷酸为底物, 反向转录合成 DNA, 以获得目的基因。现在基因工程中利用各种反转录酶进行反转录 PCR, 可以简便、快速地获得所需的基因。在使用时, 首先要经过分离纯化, 获得单一的 RNA 作为模板使用, 如果 RNA 不纯, 将会产生错误反转录。此外需要设计和合成一段由 15~30 个碱基组成的与模板 RNA 互补的 PCR 引物, 才能进行反转录。

二、基因工程在食品工业中的应用

(一) 基因工程改良食品加工的原料

1. 植物类原料

在植物食品品质的改良上, 基因工程技术得到了广泛的应用, 并取得了丰硕成果。其中主要集中于改良蛋白质、碳水化合物及油脂等食品原料的产量和质量。

(1) 蛋白质类原料

蛋白质是重要的营养素之一, 植物是人类主要的蛋白质供应源, 蛋白质原料中有 65% 来自食物。蛋白质原料中有 65% 来自植物。与动物蛋白质相比, 植物蛋白质的生产成本低, 而且便于运输和贮藏, 然而其营养也较低。谷类蛋白质中赖氨酸 (Lys) 和色氨酸 (Trp), 豆类蛋白质中蛋氨酸 (Met) 和半胱氨酸 (Cys) 等一些人类所必需的氨基酸含量较低。通过采用基因导入技术, 即通过把人工合成基因、同源基因或异源基因导入植物细胞的途径, 可获得高产蛋白质的作物或高产氨基酸的作物。

植物体中有一些含量较低、但氨基酸组成却十分合理的蛋白质, 如果能把编码这些蛋白质的基因分离出来, 并重复导入同种植物中去使其过量表达, 理论上就可以大大提高蛋白质中必需氨基酸含量及其营养价值。例如, 豆类植物的主要贮存蛋白质——球蛋白中的蛋氨酸含量很低, 它是豆类植物的第一限制性氨基酸, 但豆类中赖氨酸含量却较高, 与谷物作物中的蛋白质正好相反, 通过基因工程技术, 可将谷物类植物基因导入豆类植物, 开发蛋氨酸含量提高的转基因大豆。此外, 还可针对性地将富含某种特异性的氨基酸的蛋白转入目的植物, 以提高相应的植物中特定氨基酸的含量。例如通过分析发现, 玉米的 β -phaseolin 富含 Met, 将此蛋白基因转入豆科植物, 就可以大大提高豆科植物种子贮存蛋白的 Met 含量, 而 Met 正是豆科植物种子贮存蛋白所缺少的成分。

美国 Florida Gainesville 大学的科学家将外来的高相对分子质量面筋蛋白基因导入一普通小麦中, 获得了含量更多的高相对分子质量面筋蛋白质的小麦。这样的小麦面筋蛋白具有良好的延伸性和弹性。

(2) 油脂类原料

人类日常生活及饮食所需的油脂 70% 来自植物, 改良植物油是世界上最重要的油脂之一。食用油有三个重要的质量指标: 营养价值、氧化稳定性和功能性, 但这三个指标之间存在着矛盾, 即含较多的高不饱和脂肪酸的食用油对人的健康是有益的, 但存在着氧化稳定性差的缺点; 制造人造奶油和起酥油等需要高熔点的植物油, 但这种油通常含高比例的饱和脂肪酸成分。为了获得氧化稳定, 饱和程度高的煎炸油和烹调油以及为制造人造奶油和起酥油等提供高熔点的植物生物技术与食品加工油, 食品工业采用的方法是对植物油进行氢化处理, 但在氢化过程中不可避免地会产生反式构型脂肪酸, 反式脂肪酸会增加血液中低密度脂胆固醇的水平, 最新研究成果表明, 反式脂肪酸与心脏病的发病有线性关系。基因工程技术与传统的育种方法结合为人们提供了改善植物油质量的新途径, 它不仅可增加植物油脂脂肪酸的饱和度, 而且不会带来反式脂肪酸问题, 提供对人体健康有益的植物油, 如将硬脂酰 CoA 脱饱和酶基因导入作物后, 可使转基因作物中饱和脂肪酸的含量有所下降,

而不饱和脂肪酸的含量则明显增加。

另外,高等植物体内脂肪酸的合成由脂肪合成酶(FAS)的多酶体系控制;因而改变FAS的组成还可以改变脂肪酸的链长,以获得高品质、安全及营养均衡的植物油。目前,控制脂肪酸链长的几个酶的基因已被成功克隆,如通过导入硬脂酸-ACP脱氢酶的反义基因,可使转基因油菜种子中硬脂酸的含量从2%增加到40%;美国CaCalgene公司正在开发高硬脂酸含量的大豆油和芥花菜油,新的大豆油和芥花菜油将含30%以上的硬脂酸,这些新油可以取代氢化油用于制造人造奶油、液体起酥油和可可脂替代品,而不含氢化油中含有的反式脂肪酸产物。

此外,利用基因工程改良油料作物品质,提高含油量是当前国际上植物基因工程研究的一个热点。

(3) 碳水化合物类食品原料

利用基因工程来调节淀粉合成过程中特定酶的含量或几种酶之间的比例,从而达到增加淀粉含量或获得性质独特、品质优良的新型淀粉。高等植物体内涉及淀粉生物合成的关键性酶类主要有ADP葡萄糖焦磷酸化酶(ADP Glcypyrophosphoryase, AGPP)、淀粉合成酶(Starchsynthase, SS)和淀粉分支酶(Starchbranchingenzyme, SBE),其中淀粉合成酶又包括颗粒凝结型淀粉合成酶(Granule-bound starch synthase, GBSS)和可溶性淀粉合成酶(Soluble starch synthase, SSS)。

农作物淀粉含量的增加或减少都有其利用价值。增加淀粉含量,就可能增加干物质,使其具有更高的商业价值;减少淀粉含量,可生成其他贮存物质,如贮存蛋白的积累增加。目前,在增加或减少淀粉含量的研究方面都有成功的报道。

淀粉由直链分子和支链分子组成,淀粉的质量与其组成有关,植物细胞内的淀粉合成酶(GBSS)和分支酶(BE)分别控制直链淀粉和支链淀粉的合成。淀粉不同的用途对其性质的要求也不同,食品工业上一般需要直链成分尽可能少的淀粉。人们通过转入淀粉粒凝运结合淀粉合成酶,基因反义RNA的方法,将内源和外源的GBSS反义基因成功地导入马铃薯中,使其GBSS的活性降低了1倍,减少直链淀粉的含量。如GBSS表达完全受到抑制,则可在淀粉总量不变的前提下获得不含直链淀粉的马铃薯淀粉。特别适合制作烘烤食品,这在以马铃薯淀粉为主食的国家具有特别重要的意义。

2. 动物类原料的基因工程

要改善家畜和家禽的遗传特性,如产奶量、产毛品质、增重快慢、下蛋频率等,人们往往需要进行多代杂交选择,在每一代中选择那些具有优良性状的动物作为下一次交配的种畜和种禽。最后,培育出接近为纯种的高产动物品种。这种传统的动物育种方法将交配与选择相结合,尽管费时而且费用昂贵,但效果却很好;目前大多数用于生产的家畜、家禽品种都是用这种方法选育出来的。然而,这种方法有它的不足之处,那就是一旦育成了一个较好的品种,再想要通过杂交引入其他新的遗传性状就非常困难。因为,带有新的有益遗传性状的品种可能同时也携带有一些有害基因,杂交后有可能会降低原有产量。因此,又需要重新进行多代杂交和严格筛选,确保新的品种既保留原有的优良品质又引入了新的有用性状。