现代食品加工新技术丛书

生物技术与食品加工

张柏林　杜为民　郑彩霞　等编著

化学工业出版社
·北京·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术与食品加工/ 张柏林, 杜为民, 郑彩霞等编著 . —北京: 化学工业出版社, 2005. 2
(现代食品加工新技术丛书)
ISBN 7-5025-6540-X

Ⅰ . 生… Ⅱ . ①张…②杜…③郑… Ⅲ . 生物工程-应用-食品加工 Ⅳ . TS205

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 007798 号

现代食品加工新技术丛书
生物技术与食品加工
张柏林 杜为民 郑彩霞 等编著
责任编辑: 侯玉周
文字编辑: 李 瑾
责任校对: 陶燕华
封面设计: 郑小红
*
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)
发行电话: (010) 64982530
http:// www .cip .com .cn
*
新华书店北京发行所经销
北京兴顺印刷厂印装
开本 720mm×1000mm 1/ 16 印张 17 字数 325 千字
2005 年 3 月第 1 版 2005 年 3 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-6540-X/ TS · 240
定 价: 28. 00 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

内 容 提 要

本书是《现代食品加工新技术丛书》中的一本。

本书从食品加工工艺、下脚料处理、贮藏保鲜、品质检测和新型食品添加剂的开发等角度入手，介绍了基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程在其中的应用，着重于食品加工各个环节中生物技术的引入，为读者开阔思路，增加解决问题的能力。同时本书还注重引入最新研究结果，为读者提供最前沿的研究动态，包括研究现状、存在问题等。

本书可供食品、营养、医药、卫生、生化等领域的科研人员、生产管理人员参考，也可供大专院校相关专业师生参考。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

前　　言

近年来，我国食品工业呈持续增长的趋势，2001 年全国食品加工业实现销售收入近 8740 亿元，2002 年则达到 10169 亿元，销售额提高了 16.4%，其中食品加工业的科技创新发挥着重要的作用，然而，持续不断的科技创新源于新知识和新技术的不断涌现。

生物技术是指从外源基因重组、克隆、表达的设计与构建，到含有重组外源基因的生物细胞（基因工程菌或细胞）的大规模培养以及外源基因表达产物的分离纯化的整个过程，涵盖基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程等内容。应用生物技术可以改造食品原材料，改善食品品质和加工特性，增强果蔬食品的贮藏性和保鲜性能，改革传统的发酵工业，生产保健食品及特殊食品以及对转基因食品的安全性进行检测和评价等。目前，生物技术已在不同的层面上推动着食品加工业的技术创新和产业升级，提高产品的综合利用率及附加产值。例如，采用生物技术进行玉米深加工，可以生产出变性淀粉、淀粉糖、低聚糖、高果糖、生化饲料、燃料乙醇、糖醇、玉米胚芽、皂苷、核酸等系列产品；运用基因工程技术可以培育出能替代进口产品的高油、高脂系列大豆新品种，大大提高食用油的出油率和脂肪含量。可以预见，随着生物技术的广泛应用，它将会为食品加工业创造更多营养丰富、符合人们健康需求的食品，促进和提升农产品加工业的发展。

尽管生物技术愈来愈多地应用于食品加工过程中，但在生产实践和科学研究中，我们发现与此相关的参考书籍却相当有限，仍然无法满足不同类型读者的需要。为促进我国食品加工技术的研究、开发、生产和应用，满足广大科技人员和相关高等院校师生的迫切要求，我们组织了一批长期从事食品加工研究与教学的专家，参考国内外最新文献资料，结合作者在科研、教学和实际工作中的经验撰写了本书，从食品加工工艺、食品下脚料综合利用、食品贮藏保鲜、食品品质检测、食品添加剂开发以及微生物菌种改造等方面系统阐述了生物技术在食品加工不同环节的应用原理和最新进展。

化学工业出版社的编辑在本书的整个编写过程中给予了很多的指导和帮助，在此深表感谢！

参加本书编著的有师俊玲（第六章）、欧阳杰（第一章、第五章）、张艳（第二章）、范俊峰（第五章）、崔建超（第一章）、王颉（第一章）、尤希凤（第四章）、张柏林（第三章）、杜为民（第五章）、郑彩霞（第五章）、袁静（第五章）、吴荣荣（第四章），全书由张柏林、杜为民、郑彩霞统编定稿。

本书涉及基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程、轻工、农产品加工贮藏等诸多学科和行业，内容广泛，书中疏漏之处在所难免，敬请读者批评指正。

张柏林

2004 年 10 月

目　　录

第一章　生物技术在食品加工工艺中的应用 …… 1
第一节　基因工程在食品加工工艺中的应用 …… 1
一、改造食品原材料，改善食品品质和加工特性 …… 1
二、利用基因工程菌株改善发酵食品品质和风味 …… 5
三、酶制剂的生产和改良 …… 7
四、乳酸菌遗传和生物技术特性改良 …… 12
五、食品加工工艺的改良 …… 13
第二节　酶工程在食品加工工艺中的应用 …… 13
一、制糖工业 …… 14
二、酒精饮料 …… 21
三、在蛋白制品加工方面的应用 …… 24
四、乳品工业 …… 24
五、肉类和鱼类加工 …… 27
六、蛋品加工 …… 28
七、面包烤焙与食品制造 …… 29
八、谷类食品发酵 …… 29
九、醋 …… 30
第三节　细胞工程在食品加工工艺中的应用 …… 30
一、细胞工程在氨基酸生产菌育种中的应用 …… 30
二、细胞工程在酶制剂生产菌育种中的应用 …… 31
三、细胞工程在酵母菌育种中的应用 …… 32
四、细胞工程在酱油曲霉菌育种中的应用 …… 32
五、细胞工程在肉类工业中的应用 …… 32
第四节　发酵工程在食品加工工艺中的应用 …… 33
一、高活性干酵母的生产及其应用 …… 34
二、黄原胶的发酵生产 …… 35
三、结冷胶的发酵生产 …… 42
四、茁霉多糖的发酵生产 …… 45
第二章　生物技术在食品下脚料综合利用中的应用 …… 48
第一节　生物技术在果蔬综合利用中的应用 …… 48
一、概述 …… 48

二、有机酸的提取——发酵法提取柠檬酸 …… 49
三、葡萄皮渣生产白兰地 …… 51
四、果渣制醋 …… 52
五、生产乙醇 …… 52
六、生产甲烷 …… 53
七、果蔬下脚料的系统利用 …… 53
八、生产单细胞蛋白饲料 …… 54
第二节　生物技术在肉制品加工综合利用中的应用 …… 60
一、概述 …… 60
二、畜禽血液的处理 …… 61
三、畜禽粪便的处理 …… 63
四、肉类加工废水的处理 …… 69
第三节　生物技术在粮油综合利用中的应用 …… 86
一、淀粉类副产品的综合利用 …… 87
二、纤维素类产品的综合利用 …… 96
三、油脂类产品的综合利用 …… 112
第三章　生物技术在食品贮藏保鲜中的应用 …… 113
第一节　生物技术在食品保鲜中的应用 …… 114
一、利用葡萄糖氧化酶保鲜 …… 114
二、利用溶菌酶保鲜 …… 115
三、生物防治在果蔬保鲜上的应用 …… 116
四、利用遗传基因进行保鲜 …… 116
第二节　生物技术在食品贮存过程中的应用 …… 117
第三节　其他生物技术的应用 …… 117
一、生物保鲜液膜对草莓常温保鲜 …… 117
二、生物保鲜液常温荔枝保鲜 …… 118
第四节　农产品贮藏保鲜技术存在的问题及发展趋势 …… 119
第四章　生物技术在食品品质检测中的应用 …… 120
第一节　酶电极的应用 …… 120
一、酶电极的概述 …… 120
二、酶电极在食品检验中的应用 …… 121
第二节　DNA 指纹技术的应用 …… 122
一、核酸指纹 …… 123
二、应用 …… 126
第三节　PCR 技术的应用 …… 127
一、聚合酶链反应的原理 …… 127

二、PCR 的反应条件 …… 127
三、Taq DNA 聚合酶与 PCR 扩增的精确性 …… 128
四、PCR 的模板 …… 129
五、PCR 的引物 …… 129
六、应用 …… 130
第四节 SSCP 技术的应用 …… 133
一、PCR-SSCP 技术的基本原理 …… 133
二、PCR-SSCP 技术的改进和完善 …… 134
三、PCR-SSCP 技术的应用 …… 134
第五章 生物技术在食品添加剂开发中的应用 …… 136
第一节 生物技术在天然香料香精生产中的应用 …… 136
一、前言 …… 136
二、基因工程技术在天然香料香精生产中的应用 …… 136
三、植物细胞工程技术在天然香料香精生产中的应用 …… 137
四、酶工程技术在天然香料香精生产中的应用 …… 141
五、微生物工程技术在天然香料香精生产中的应用 …… 143
第二节 生物技术在功能肽开发中的应用 …… 146
一、功能肽的概念及类别 …… 146
二、生物技术在大豆肽及其他植物源肽中的应用 …… 149
三、生物技术在乳源肽中的应用 …… 154
四、生物技术在谷胱甘肽中的应用 …… 161
五、生物技术在其他功能肽中的应用 …… 165
第三节 生物技术在天然色素开发中的应用 …… 168
一、天然色素的主要特点 …… 168
二、天然植物色素的种类及化学结构 …… 169
三、生物技术在天然色素的提取与纯化中的应用 …… 171
四、天然植物食用色素开发利用中的问题及对策 …… 190
第四节 生物技术在食品防腐剂开发中的应用 …… 192
一、乳酸菌产生的生物防腐剂 …… 192
二、纳他霉素 …… 216
三、甲壳素/ 壳聚糖 …… 224
四、溶菌酶 …… 236
五、海藻糖 …… 237
六、红曲色素 …… 238
七、其他生物防腐剂的研究 …… 238
八、发展前景 …… 240

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

第六章　生物技术改造微生物……………………………………………… 242
一、微生物代谢调节在发酵工程中的应用 ……………………………… 243
二、运用途径工程手段进行化学物质的生产 …………………………… 248
三、细胞工程用于微生物改造 …………………………………………… 253
四、基因工程用于微生物改造 …………………………………………… 259
参考文献 ……………………………………………………………………… 264

第一章　生物技术在食品加工工艺中的应用

第一节　基因工程在食品加工工艺中的应用

基因工程（genetic engineering）是指将一种或多种生物体（供体）的基因与载体在体外进行拼接重组，然后转入另一种生物体（受体）内，使之按照人们的意愿遗传并表达出新的性状。因此，供体、受体和载体称为基因工程的三大要素，其中相对于受体而言来自供体的基因属于外源基因。除了少数 RNA 病毒外，几乎所有生物的基因都存在于 DNA 结构中，而用于外源基因重组拼接的载体也都是 DNA 分子，因此基因工程也称为重组 DNA 技术（recombinant DNA technology）。另外，DNA 重组分子大都需在受体细胞中复制扩增，故还可将基因工程表达为分子克隆（molecular cloning）。

广义的基因工程定义为 DNA 重组技术的产业化设计与应用，包括上游技术和下游技术组成。上游技术指的是外源基因重组、克隆和表达的设计与构建（即狭义的基因工程）；而下游技术则涉及到含有重组外源基因的生物细胞（基因工程菌或细胞）的大规模培养以及外源基因表达产物的分离纯化过程。

基因工程是在现代生物学、化学和化学工程学以及其他数理科学的基础上产生和发展起来的，并有赖于微生物学的理论和技术的发展和应用，微生物在基因工程的兴起和发展过程中起着不可替代的作用。基因工程的出现是 20 世纪生物科学具有划时代意义的巨大事件，它使得生物科学迅猛发展，并带动了生物技术产业的兴起。它的出现标志着人类已经能够按照自己的意愿进行各种基因操作，大规模生产基因产物，并且去设计和创建新的基因、新的蛋白质和新的生物物种。

基因工程研究的主要内容包括以下几方面：①带有目的基因的 DNA 片段的分离或人工合成；②在体外，将带有目的基因的 DNA 片段连接到载体上，形成重组 DNA 分子；③重组 DNA 分子导入宿主细胞；④带有重组 DNA 分子的细胞培养，获得大量的细胞繁殖群体；⑤重组体的筛选；⑥重组体中目的基因的功能表达。基因工程基本流程示意见图 1-1。

一、改造食品原材料，改善食品品质和加工特性

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。

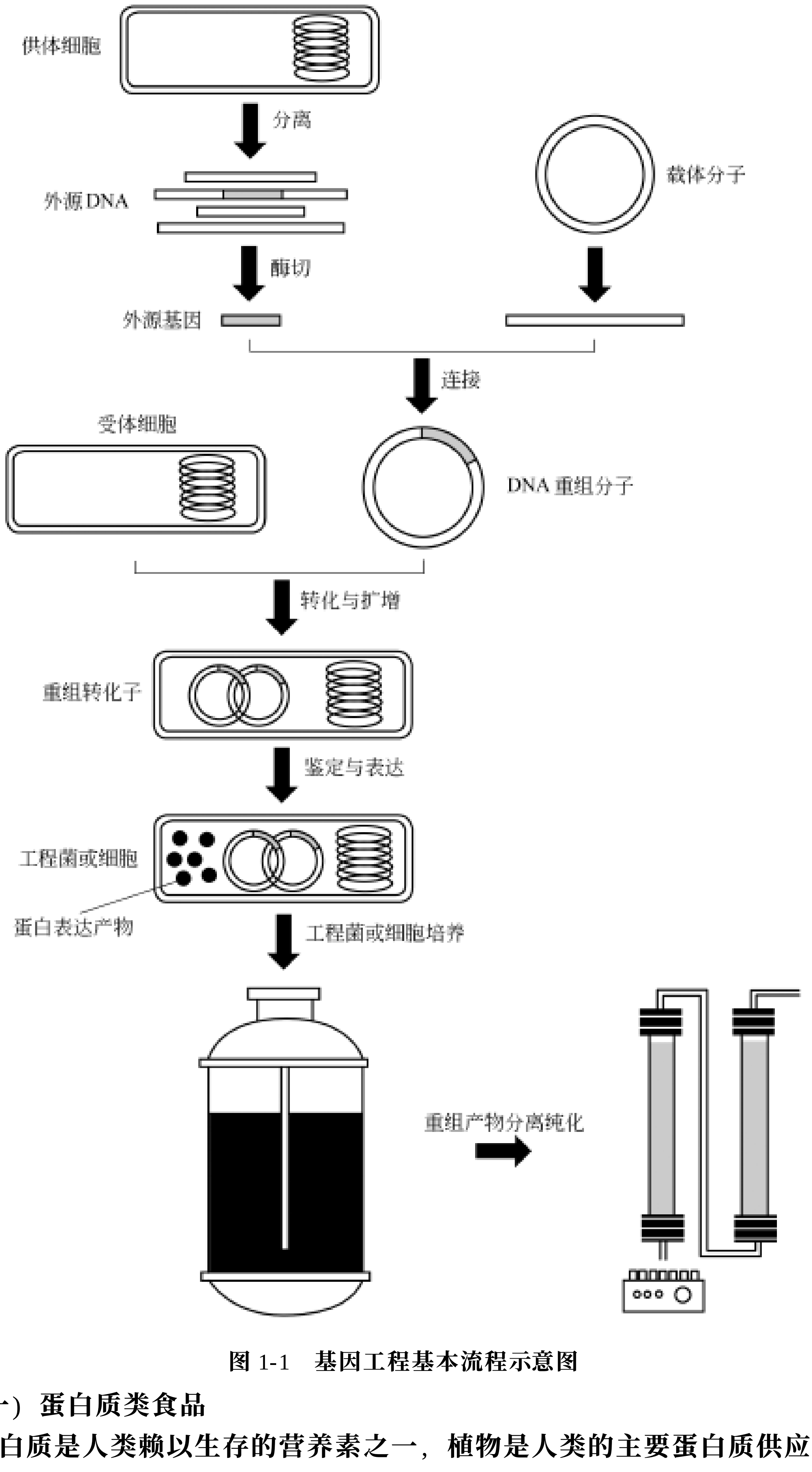

图 1-1　基因工程基本流程示意图

(一) 蛋白质类食品

蛋白质是人类赖以生存的营养素之一，植物是人类的主要蛋白质供应源，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。

Yang等合成了一个292bp的能编码高含量必需氨基酸DNA（high essential amina acid coding DNA），再把HEAAC-DNA导入马铃薯细胞中去，该基因在马铃薯细胞中能表达，表达水平为HEAAC蛋白占总蛋白的0.35%。1990年Clercq等用Met密码子序列取代了拟南芥菜2s白蛋白的可复区域，所获得的转基因拟南芥菜可生产富含Met的2s白蛋白。这些工作说明通过导入人工合成基因来修饰编码蛋白质的基因序列，来提高蛋白质中必需氨基酸含量是可行的。

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。另外，我国学者把从玉米种子中克隆得到的富含必需氨基酸的玉米醇溶蛋白基因导入马铃薯中，使转基因马铃薯块茎中的必需氨基酸提高了10%以上。美国Florida Gainesville大学的科学家将外来的高分子量面筋蛋白基因导入一普通小麦中，获得了含量更多的高分子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。

异源基因是指从分类学关系较远的植物中分离获得的目的基因。巴西豆BN2s白蛋白富含Met（18%）和Cys（8%），Altenabch于1991年将巴西豆编码BN2s白蛋白的基因转移到烟草和油菜中去，发现BN2s基因在转基因烟草和油菜中能很好地表达，表达水平达8%。进一步研究还发现，构建嵌合基因的起动子的种类会影响到BN2s基因的表达水平。

（二）油脂类食品

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

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

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。

(三) 碳水化合物类食品

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 Glcpyrophosphorylase，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。Stark 等人利用突变的大肠杆菌菌株 618 来源的 AGPP 基因和 CMV35 启动子构建了一个嵌合基因，并把此基因导入烟草、番茄和马铃薯中，结果得到极少的转基因植物，表明 AGPP 基因的组成性表达对植物的生长、发育是有害的，它很可能改变了植物不同组织之间源库与沉积的关系。后来改用块茎特异表达的 Patatin 基因的启动子来构建嵌合基因，就得到了相当多的马铃薯，转基因马铃薯块茎中淀粉的含量比传统的马铃薯提高了 35%。在减少淀粉含量方面，Muller 等人利用含有不同启动子和反向连接的 AGPP 大或小亚基 cDNA 的融合基因构建表达载体，转化马铃薯，在 35S 加上反向连接的 AGPP 大亚基。DNA 的融合基因转化植株中，叶片的 AGPP 活性仅为野生型的 5%～30%，块茎中 AGPP

活性降得更低，活性仅为野生型的 2%。分析转化植株淀粉含量，结果表明转化植株块茎淀粉含量仅为野生型的 5%～3.5%。伴随着淀粉含量的下降，转化植株细胞内可溶性糖显著升高，蔗糖和葡萄糖分别占块茎干重的 30%和 8%。在已有的改变淀粉含量的研究之中，多数是针对 AGPP 的，反映出 AGPP 在控制淀粉合成速率方面的重要性。

淀粉由直链淀粉和支链淀粉组成。直链淀粉和支链淀粉的比例决定了淀粉粒的结构，进而影响着淀粉的质量、功能和应用领域。改变淀粉结构有着很多潜在的应用价值。高支链、低支链或低直链、高直链的淀粉都有着广泛的工农业用途，通过反义基因抑制淀粉分支酶基因则可获得完全只含直链淀粉的转基因马铃薯。Monsanto 公司开发了淀粉含量平均提高 20%～30%的转基因马铃薯，这种新马铃薯使油炸后的产品具有更强的马铃薯风味，更好的质构，较低的吸油量和较少的油味。相反，Visser 等人利用反义 RNA 技术，向马铃薯中导入反向连接的 GBSS 基因，导致 GBSS 基因含量和活性下降，进而导致马铃薯块茎中直链淀粉含量减少 70%～100%。同样地利用反义 RNA 技术，在木薯、水稻等植物中，也获得了低（或无）直链淀粉的转化体。可以说，对 GBSS 的操作是控制直链淀粉的可靠途径。

二、利用基因工程菌株改善发酵食品品质和风味

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方便、快捷的途径。

（一）酱油

酱油风味的优劣与酱油在酿造过程中所生成氨基酸的量密切相关，参与此反应的羧肽酶和碱性蛋白酶的基因已被克隆并转化成功，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，羧肽酶的活力可提高 13 倍。酱油制造中和压榨性有关的多聚半乳糖醛酸酶、葡聚糖酶和纤维素酶、果胶酶等的基因均已被克隆，当用高纤维素酶活力的转基因米曲霉生产酱油时，可使酱油的产率明显提高。另外，在酱油酿造过程中，木糖可与酱油中的氨基酸反应产生褐色物质，从而影响酱油的风味。而木糖的生成与制造酱油用曲霉中木聚糖酶的含量与活力密切相关。现在，米曲霉中的木聚糖酶基因已被成功克隆。用反义 RNA 技术抑制该酶的表达所构建的工程菌株酿造酱油，可大大地降低这种不良反应的进行，从而酿造出颜色浅、口味淡的酱油，以适应特殊食品制造的需要。

（二）啤酒

在正常的啤酒发酵过程中，由啤酒酵母细胞产生的 α-乙酰乳酸经非酶促的氧

化脱羧反应会产生双乙酰。当啤酒中双乙酰的含量超过阈值（0.02～0.10mg/L）时，就会产生一种令人不愉快的馊酸味，严重破坏啤酒的风味与品质。去除啤酒中双乙酰的有效措施之一就是利用α-乙酰乳酸脱羧酶。但由于酵母细胞本身没有该酶活性，因此，利用转基因技术将外源α-乙酰乳酸脱羧酶基因导入啤酒酵母细胞，并使其表达，是降低啤酒中双乙酰含量的有效途径。Sone 等用乙醇脱氢酶的启动子和穿梭质粒载体 YeP13 将产气肠杆菌 α-乙酰乳酸脱羧酶基因导入啤酒酵母，并使其表达。当用此转基因菌株进行啤酒酿造时，可使啤酒中的双乙酰含量明显降低，且不影响其他的发酵性能和啤酒中的正常风味物质。但由于用此法所构建的基因工程菌株中α-乙酰乳酸脱羧酶基因是存在于酵母的质粒而不是染色体上，因而使该基因易于随着细胞分裂代数的增加而发生丢失，造成性能的不稳定。因此，Yamano 等将外源的 α-乙酰乳酸脱羧酶整合入啤酒酵母的染色体中，从而构建了能稳定遗传的转基因啤酒酵母。使用这种转基因酵母酿制啤酒，也能明显地降低啤酒中的双乙酰含量，而且不会对啤酒酿造过程中的其他发酵性能造成不良影响。

把糖化酶基因引入酿酒酵母，构建能直接利用淀粉的酵母工程菌用于酒精工业，能革除传统酒精工业生产中的液化和糖化步骤，实现淀粉质原料的直接发酵，达到简化工艺、节约能源和降低成本的效果。目前已有美国的 Cetus 公司和日本的 Suntory 公司分别把酒曲霉和米根霉的糖化基因转入酿酒酵母获得成功的报道，国内也有许多学者正在从事这方面的研究。唐国敏等从黑曲霉糖化酶高产株 T21 合成的糖化酶 cDNA，经 5′-端和 3′-端改造后克隆到酵母质粒 YED18 上，转化酿酒酵母；罗进贤等将大麦的淀粉酶基因及黑曲霉糖化酶 cDNA 重组进大肠杆菌-酵母穿梭质粒，构建含双基因的表达分泌载体 PMAG15，用原生质体转化法将之引入酿酒酵母，实现了大麦淀粉酶和糖化酶的高效表达，99％以上的酶活力分泌至培养基中。

(三) 奶酪

在奶酪工业中，近年来成功地将牛胃蛋白酶的基因克隆入微生物体内并使其表达，由此构建的基因工程菌可用来生产牛胃蛋白酶，彻底解决了奶酪工业受制于牛胃蛋白酶来源不足的问题。

(四) 面包

在焙烤工业中，将含有地丝菌属 LIPZ 基因的质粒转化到面包中，利用转基因酵母发酵生面团生产的面包较蓬松，内部结构较均匀。

另外，利用基因工程技术可生产出高效能高质量的酶产品，目前能利用遗传技术生产大多数常用的酶产品，并投放市场。世界上第一个应用在食品上的基因工程酶为凝乳酶。将牛胃蛋白酶的基因克隆入微生物体内，由细菌生产这种动物来源的酶类，解决了奶酪工业受制于牛胃蛋白酶来源不足的问题，并降低了生产

成本。

三、酶制剂的生产和改良

凝乳酶（chymosin）是第一个应用基因工程技术把小牛胃中的凝乳酶基因转移至细菌或真核微生物生产的一种酶。1990 年美国 FDA 已批准在干酪生产中使用凝乳酶。由于这种酶生产寄主基因工程菌不会残留在最终产物上，符合 GRAS（generally recognized as safe）标准，被认定是安全的，不需要标示。

20 世纪 80 年代以来，为了缓解小牛凝乳酶供应不足的紧张状态，日本、美国、英国等纷纷开展了牛凝乳酶基因工程的研究。Nishimori 等于 1981 年首次用重组 DNA 技术将凝乳酶原基因克隆到 *E. coli* 中并成功表达。随后，英、美等国相继构建了各自的凝乳酶原的 cDNA 文库，并成功地在 *E. coli*、酵母、丝状真菌中表达。

重组 DNA 技术生产小牛凝乳酶，首先从小牛胃中分离出对凝乳酶原专一的 mRNA（内含子已被切除），然后借助反转录酶、DNA 聚合酶和 St 核苷酸酶的作用获得编码该酶原的双链 DNA，再以质粒或噬菌体为运载体导入大肠杆菌。由于所用的 mRNA 样品依然含有各种 RNA 片断，因此所得到的 cDNA 克隆实际上是一个混合的 cDNA 文库，用放射性 mRNA 或 cDNA 探针进行杂交，可以挑选出含有专一性 cDNA 的克隆。所获得的 1095 核苷酸序列基本与凝乳酶原的氨基酸序列相符合，并在 *N* 端有一个由编码 10 个疏水性氨基酸组成的信号肽序列。为使外源基因在细菌中有效表达，在上游端还需插入适当转录启动子序列，核糖体结合部位以及翻译的起始位点 AUG。表达产物为一融合蛋白（*N* 端带有一小段细菌肽），但这不影响随后的酶原活化作用。在这一过程中该小肽与酶原的 42 肽一起被切除。用色氨酸启动子可以获得高效表达，问题是表达产物以不溶性的包含体（inclusion bodies）的形式存在。因此，表达后的加工及基因的改造都是不可缺少的。

利用基因工程菌生产凝乳酶是解决凝乳酶供不应求的理想途径。Marston（1984）和 Kawagnchi（1987）根据电泳扫描测得凝乳酶原基因在大肠杆菌中的表达水平为总蛋白的 8%和 10%～20%。1986 年，Uozumi 和 Beppu 报道从每升发酵醪液的菌体中可获得 13.6mg 有活性的凝乳酶。Melior 等构建了无前导肽凝乳酶的克隆，并将凝乳酶原基因导入酵母细胞（*Saccbaromyces cerevisiae*），其表达效率达总酵母蛋白量的 0.5%～2%。在酵母中，大约 20%的酶原以可溶形式存在并可被直接激活，剩余的 80%仍与细胞碎片混在一起。1990 年，Strop 把携带凝乳酶原基因的质粒 PMG13195 导入大肠杆菌 *E. coli* MT 中，然后在含有胰蛋白胨、酵母膏和乳糖的培养基中培养（37℃），重组凝乳酶原在包含体中逐渐积累，包含体占整个细胞的 40%。

张渝英等以 Tac 为启动子构建了牛凝乳酶原 B 基因表达质粒 PTaAC，转化

大肠杆菌 JM105 进行培养。凝乳酶原基因的表达受培养基内诱导剂 IPTG (isopropyl-β-D-thiogactose)、诱导时间和培养温度的影响。对数生长期中加入 0.1mmol/L 的 IPTG，能明显地诱导凝乳酶原的产生，进一步提高 IPTG 的剂量，效果基本相同，这说明 0.1mmol/L IPTG 足以诱导凝乳酶原基因在 JM105 受菌体中显著表达。同时，在大肠杆菌 JM105 不同生长期中加入 0.4mmol/L IPTG，6h 后收集菌体，根据电泳扫描结果，在整个对数生长期中加入 IPTG，均有明显诱导效果。凝乳酶原蛋白占细胞总蛋白的 13%左右，而在静止期加入 IPTG，则无明显诱导作用 (表 1-1)。

表 1-1 不同生长期 (对数生长期) 加入 IPTG 对凝乳酶原基因表达的影响

时间/min	0	35	75	90	120
A_{600nm}	0.13	0.35	0.71	1.1	1.2
表达水平/%	13.2	12.1	12.8	10.9	4.3

Schein 和 Noteborn 报道，外源基因在大肠杆菌中表达形成的包含体与培养温度有关，在 30℃以下很少形成包含体，提高温度有利于包含体形成。张渝英等人的研究也表明：牛凝乳酶原基因 B 表达质粒 PTaAC 转化大肠杆菌，在 30℃培养，即使有 IPTG 存在，凝乳酶原产量极低；无 IPTG 的条件下在 42℃培养，基因也能表达，表达产物占总蛋白的 12.5%；如将细菌先在 37℃培养，对数生长期前转入 42℃培养，其表达水平较在对数生长期后转入 42℃培养高出 50%。以上实验表明，在 37℃培养，能产生一种阻遏蛋白，妨碍凝乳酶原基因的表达，而提高温度能阻止这种蛋白的产生。

王革等人为了提高凝乳酶原基因在 *E. coli* 中的表达水平以及避免使用价格昂贵的诱导剂 IPTG，采用 $P_R P_L$ 启动子取代 Tac 启动子，构建了牛凝乳酶原基因表达质粒 PBC_4，转化到大肠杆菌的不同株系中，在同样条件下进行表达，供试的 4 个受菌体中以 JM105 最好 (表 1-2)。

表 1-2 受菌体对凝乳酶原基因表达的影响

寄主	JM105	HB101	DH5a	C600
表达水平/%	26.38	2.64	11.43	19.03
培养最终 OD_{600}	3.1	2.0	2.56	2.92

PBC_4 质粒转化到 JM105 后分别在不同培养基中表达，结果见表 1-3。2YT 培养基中胰蛋白胨和酵母浸汁比 LB 加倍，营养丰富，表达水平也较高。用 SOC 培养基虽然生物量增加不多，但表达水平有明显提高，可能与营养成分配比合理有关。

表 1-3　不同培养基对原基因表达的影响

培养基	LB	2YT	SOC	M9CA
表达水平/ %	23.77	28.39	38.87	16.60
培养最终 OD_{600}	2.48	3.92	2.96	0.72

Geoffrog 等人报道，编码牛凝乳酶的基因在乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyceslactis*）中成功表达，能有效地把凝乳酶原分泌到培养基质中，并成功地进行了大规模的工业生产。

耐热 α-淀粉酶基因的克隆和表达大致过程是这样的：将提取的嗜热脂肪芽孢杆菌全染色体 DNA 经限制性内切酶切割成小片段并与 PBR_{322} 质粒 DNA 重组，转化大肠杆菌获得芽孢杆菌基因文库，从中选出目的基因克隆入芽孢杆菌表达载体并转化入芽孢杆菌中。

操作步骤如下。

① 提取纯化嗜热脂肪芽孢杆菌染色体 DNA。

② 提取纯化质粒 PBR_{322} 及 PBD_6。

③ 紫外分光光度计测定染色体 DNA 及质粒 DNA 的含量。

④ 染色体 DNA 的酶切。在一小离心管中依次加入不同倍数酶解缓冲液 20μL，100mmol/ L Tris（pH7.6），100mmol/ L $MgCl_2$，500mmol/ L NaCl，10mmol/ L DTT，DNA 溶液 10μg/ μL，Hind Ⅲ 20U/ μL。37℃保温 1h 后，再于 65℃保温 10min。取 5μL 做琼脂糖凝胶电泳，观察酶切结果，余下的加入 200μL 水饱和酚/ 氯仿抽提，并用 2 倍体积的冷乙醇沉淀纯化酶切 DNA，风干后用 10×TE(μL) 溶解，于 4℃存放备用。

⑤ 载体 PBR_{322} DNA 的制备。在一小离心管中依次加入 10 倍浓缩酶解缓冲液，PBR_{322} DNA 溶液 2μg/ μL，Hind Ⅲ 4μg/ μL。37℃保温 1h 后，于 65℃保温 10min。取 1μL 做琼脂糖凝胶电泳，观察酶切是否完全。其余用 20μL 水饱和酚/ 氯仿抽提，并以 2 倍体积的冷乙醇测定纯化酶切 DNA。风干后用 TE 溶解，并加入 10 倍 CIP 缓冲液 5μL，其中有 0.5mmol/ L Tris（pH9.0）、10mmol/ L $MgCl_2$、1mmol/ L $ZnCl_2$。37℃保温 60min 后加入 H_2O 40μL，STE 10μL，10% SDS 5μL 。再于 65℃保温 45min 后，用苯酚/ 氯仿抽提 2 次，再用氯仿抽提 2 次。用 2 倍体积冷乙醇沉淀 DNA，70%乙醇洗涤沉淀 3 次，风干后用 10μL TE 溶解，于 4℃存放备用。

⑥ DNA 重组。在一小离心管中加入酶切去磷酸载体 DNA 1μg/ 5μL，酶原染色体 DNA 5μg/ μL，T_4 DNA 连接酶缓冲液（10×）5μL［0.5mmol/ L Tris（pH7.6）]、100mmol/ L $MgCl_2$、100mmol/ L DTT、500μg/ mL 牛血清白蛋白，10mmol/ L 5μL T_4 DNA 连接酶。16℃保温 8～16h 后，再于 65℃保温 15min。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com