食品工业新技术

周家春　主　编
翁新楚　副主编

化学工业出版社
化学与应用化学出版中心
·北京·

需要全本请访问 www.ertongbook.com

（京）新登字 039 号

图书在版编目（CIP）数据

食品工业新技术/周家春主编，翁新楚副主编．—北京：化学工业出版社，2004.10
ISBN 7-5025-6190-0

Ⅰ．食… Ⅱ．①周…②翁… Ⅲ．食品工业-新技术 Ⅳ．TS2-39

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2004）第 106139 号

食品工业新技术

周家春 主编
翁新楚 副主编
责任编辑：路金辉
文字编辑：温建斌
责任校对：凌亚男
封面设计：郑小红

*

化学工业出版社
化学与应用化学出版中心 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
北京云浩印刷有限责任公司印刷
三河市前程装订厂装订
开本 787mm×1092mm 1/16 印张 28¼ 字数 704 千字
2005 年 1 月第 1 版 2005 年 1 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-6190-0/TS·206
定 价：58.00 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

前　言

中国的食品工业是一个景气度为120的高速发展产业，自20世纪90年代以来，食品工业产值的增长率每年都在10%以上，究其原因除了中国国民经济高速发展的背景以外，还与新技术不断在食品工业领域得到应用有极大关系。例如超高温杀菌和无菌包装生产线，在20世纪90年代初，全中国仅有数套设备，如今已成为广泛应用的必备设施；又如在1989年前，我国规模型钴-60γ辐照装置仅有18座，到1998年已达48座，实际装源量达到1300万居里（1Ci=37GBq），成为辐照食品的世界第一大国。社会发展的轨迹告诉我们，每一个新技术的诞生都会在相应领域引发一场革命性变革，并成为该领域发展的动力。

食品工业新技术的发展为食品工业发展奠定了基础，食品生物技术为人们开发了食品新资源和保健食品资源，辐照技术和超高温技术为食品资源的安全、营养、长久保藏提供了保障，食品高压技术开辟了食品加工的新方向，将对食品品质、卫生、营养产生深远影响，超临界技术、膜分离技术、微胶囊技术等都已经影响了食品工业的结构和发展，未来新技术的发展还将进一步推动食品工业的发展。

本书对一些食品工业新技术做了较详尽的阐述，着重于对新技术理论知识的介绍，同时结合了具体的应用实例，希望给读者提供理论参考的同时，能结合应用实例解决实际问题，成为食品专业人士的技术参考书。

本书共分九章，第一章由华东理工大学冯屏编写，第二章、第五章、第六章、第七章由华东理工大学周家春编写，第三章由华东理工大学夏泉鸣和上海大学李清华共同编写，第四章由长沙理工大学吴苏喜编写，第八章、第九章由上海大学王沂编写。全书由华东理工大学周家春副教授主编，上海大学翁新楚教授副主编。本书在编写过程中得到了华东理工大学徐玉佩教授、陈长华教授、许学书教授和王菊娣副教授、王国英老师的热情帮助，在此表示感谢。

由于许多新技术为多学科交叉科学，涉及的内容广泛，加之编者学识水平有限，书中不妥之处在所难免，恳请广大读者同仁批评指正。

周家春

于华东理工大学 2004 年 8 月

目　　录

第一章　食品生物技术 …… 1
第一节　食品基因工程 …… 1
一、基因工程基础 …… 1
二、基因工程在食品工业中的应用 …… 7
三、蛋白质工程及其在食品工业中的应用 …… 21
四、基因工程食品安全性 …… 25
第二节　食品酶工程 …… 29
一、酶工程基础 …… 29
二、酶工程在食品工业中的应用 …… 35
三、生物传感器 …… 53
第三节　食品发酵工程 …… 60
一、发酵工程基础 …… 60
二、发酵工程在食品工业中的应用 …… 62
第四节　细胞工程及其在食品工业中的应用 …… 82
一、细胞工程基础 …… 82
二、动物细胞工程 …… 84
三、植物细胞工程 …… 88
四、微生物细胞工程 …… 93
第二章　食品辐照技术 …… 96
第一节　辐射化学的物理基础 …… 96
一、辐射的种类 …… 96
二、辐射化学的基本特征 …… 99
三、辐射与物质的相互作用 …… 99
第二节　辐射化学效应 …… 106
一、过渡态活性粒子及其形成 …… 106
二、水的辐射化学 …… 109
三、营养素的辐射化学 …… 111
四、核酸的辐射化学 …… 114
第三节　辐射生物学效应 …… 116
一、辐射对生物分子的作用 …… 116
二、靶学说 …… 119
三、辐射对细胞的作用 …… 120
四、辐射对细菌的作用 …… 125
五、辐射对多细胞机体的作用 …… 130
第四节　辐射源与辐照工艺 …… 131

一、辐射源…… 131
二、辐射剂量单位…… 136
三、辐射剂量计…… 137
四、辐照工艺…… 138
第五节　食品辐照的应用…… 144
一、食品的辐照杀菌…… 144
二、食物发芽的辐照抑制…… 147
三、食物虫害的辐照控制…… 148
四、果蔬成熟期的辐照延缓…… 149
五、酒类辐照…… 149
六、食品加工参与物的辐照…… 149
七、辐照技术应用实例…… 149
第六节　辐照食品的安全性和卫生性…… 153
一、辐照食品的安全性…… 153
二、辐照食品的卫生性…… 154
三、辐照食品卫生管理办法…… 155
第三章　食品超临界流体萃取技术…… 158
第一节　超临界流体萃取技术…… 159
一、超临界流体特性…… 160
二、超临界流体的 p-V-T 特性 …… 161
三、超临界流体的传递性质…… 162
四、超临界流体的溶解能力…… 164
五、超临界流体萃取的热力学基础及过程设计依据…… 166
六、超临界流体萃取的过程系统…… 168
七、超临界流体萃取设备…… 169
八、超临界流体萃取的操作特性…… 169
九、影响萃取效率因素…… 171
第二节　超临界流体萃取技术在食品工业中的应用…… 173
一、应用概况…… 173
二、在食用油工业中的应用…… 174
三、在酒类、调味品工业中的应用…… 175
四、在脱除食品中某些成分中的应用…… 176
五、在提取抗氧化成分中的应用…… 178
第四章　食品微波技术…… 182
第一节　微波技术的历史沿革…… 182
一、国外微波技术在食品工业中的应用…… 183
二、我国微波技术在食品工业中的应用…… 183
第二节　微波加热原理…… 183
一、微波的特性…… 183
二、微波加热的基本原理…… 185

需要全本请访问 www.ertongbook.com

三、微波能杀菌机理…… 186
四、微波加热的特点…… 188
五、微波对物质的穿透作用…… 189
第三节　微波在食品工业中的应用…… 194
一、热烫…… 195
二、蒸煮…… 195
三、焙烘…… 195
四、干燥…… 196
五、调温和解冻…… 197
六、杀菌和保鲜…… 197
七、家庭烹调…… 200
八、膨化…… 201
九、实例——微波技术在方便面生产工艺中的应用…… 201
第四节　微波加热对食品营养成分和风味的影响…… 203
一、微波加热对食品营养成分的影响…… 203
二、微波加热对食品风味的影响…… 207
第五节　微波加热设备…… 209
一、微波加热设备的类型…… 209
二、微波加热器的选择…… 214
第六节　用于微波技术（食品）的包装材料和专用薄膜…… 214
一、微波食品包装材料的选择…… 214
二、微波食品的外包装…… 216
三、微波食品的内包装…… 216
四、发展趋势…… 217
第七节　前景展望…… 217
第五章　食品微胶囊技术…… 219
第一节　微胶囊技术原理…… 219
一、微胶囊的基本组成和作用…… 219
二、微胶囊化方法和材料…… 220
三、部分壁材的性能…… 221
四、微胶囊的性能参数…… 225
五、微胶囊材料和工艺选用原则…… 228
第二节　微胶囊的主要制备方法…… 229
一、喷雾干燥法…… 229
二、界面聚合法…… 236
三、原位聚合法…… 240
四、水相分离法…… 242
五、油相分离法…… 247
六、囊芯交换法…… 248
七、干燥浴法（复相乳液法）…… 249

八、锅包法…… 250
九、空气悬浮成膜法…… 251
十、粉末床法…… 253
十一、包结络合法…… 254
十二、锐孔-凝固浴法 …… 254
十三、熔化分散冷凝法…… 257
第三节 微胶囊中的囊芯释放…… 258
一、囊芯材料释放机理…… 258
二、影响微胶囊囊芯缓释的因素…… 258
三、微胶囊囊芯释放动力学方程式…… 260
第四节 微胶囊技术在食品工业中的应用…… 260
一、食品及原料的微胶囊…… 261
二、食品添加剂的微胶囊…… 261
三、营养强化剂的微胶囊…… 263
第六章 食品膜分离技术…… 265
第一节 膜技术概述…… 265
一、膜的定义和分类…… 265
二、膜分离过程…… 266
三、膜的性能表征…… 269
四、膜材料概述…… 269
五、膜材料结构对膜性能的影响…… 273
六、膜的制备…… 275
七、工业构形膜…… 281
第二节 膜分离装置和工艺流程…… 282
一、膜分离装置…… 282
二、膜分离工艺流程…… 286
第三节 极化、污染现象和控制…… 288
一、浓差极化…… 289
二、吸附…… 291
三、膜表面特性…… 291
四、膜污染的控制…… 291
第四节 反渗透…… 294
一、反渗透（RO）的基本原理 …… 294
二、反渗透膜的透过机理…… 295
三、典型的反渗透膜…… 298
四、反渗透膜的性能指标和影响因素…… 301
五、反渗透膜的污染和控制…… 303
六、反渗透膜分离规律…… 305
七、纳滤技术（NF） …… 306
八、反渗透技术的应用…… 306

第五节　超滤…… 311
一、超滤的基本原理…… 311
二、典型的超滤膜…… 312
三、超滤膜的性能评价…… 313
四、影响超滤过程的因素…… 313
五、超滤操作工艺…… 314
六、超滤技术的应用…… 315
第六节　微滤…… 318
一、微滤（MF）的基本原理 …… 318
二、典型的微滤膜…… 319
三、微滤技术的应用…… 320
第七节　电渗析…… 321
一、电渗析原理…… 321
二、离子交换膜…… 323
三、电渗析运行工艺参数…… 324
四、离子交换膜的污染和控制…… 326
五、电渗析装置…… 327
六、高温电渗析和填充床电渗析…… 328
七、电渗析技术的应用…… 328
第八节　气体分离和渗透蒸发…… 329
一、气体分离…… 329
二、渗透蒸发…… 331
第七章　超高温杀菌和无菌包装…… 333
第一节　热杀菌处理的基本概念…… 333
一、微生物耐热性的表示方法…… 333
二、影响微生物耐热性的因素…… 334
第二节　超高温杀菌的基本原理…… 338
第三节　超高温杀菌的方法…… 340
一、蒸汽喷射式超高温杀菌（直接加热法之一）…… 341
二、蒸汽注入式超高温杀菌（直接加热法之二）…… 347
三、欧姆加热超高温杀菌（直接加热法之三）…… 349
四、板式热交换超高温杀菌（间接加热法之一）…… 351
五、环形管式热交换超高温杀菌（间接加热法之二）…… 355
六、刮面式热交换超高温杀菌（间接加热法之三）…… 358
第四节　无菌包装…… 360
一、包装材料的灭菌…… 360
二、无菌包装系统…… 365
第八章　食品超高压技术…… 377
第一节　超高压技术的沿革…… 377
一、超高压技术的应用现状…… 378

二、超高压技术研究动向…… 379
第二节　超高压技术的原理…… 379
一、超高压技术的概念及基本原理…… 379
二、超高压技术对食品品质的影响…… 380
三、超高压技术处理食品的特点…… 387
第三节　超高压技术在食品中的应用…… 389
一、超高压技术在食品中的应用…… 389
二、超高压食品加工工艺…… 400
三、超高压食品的包装设计…… 401
第四节　超高压技术加工设备…… 401
一、超高压食品加工装置的结构特点…… 401
二、超高压食品加工装置的分类…… 402
三、超高压食品加工处理装置…… 403
第五节　超高压技术的前景展望…… 405
一、超高压技术进展…… 406
二、超高压技术开发的重点…… 407
三、超高压技术进展存在的问题…… 407
第九章　食品分子蒸馏技术…… 409
第一节　绪论…… 409
一、分子蒸馏技术产生的技术背景…… 409
二、分子蒸馏技术的国内外发展简史…… 411
第二节　分子蒸馏技术原理及特点…… 412
一、分子蒸馏的基本原理…… 412
二、分子蒸馏技术特点…… 414
第三节　分子蒸馏设备及其工业化应用装置…… 416
一、分子蒸馏器的结构与性能特点…… 416
二、分子蒸馏装置的组成单元…… 422
三、分子蒸馏工业化装置及工艺流程…… 422
第四节　分子蒸馏技术的工业化应用…… 423
一、分子蒸馏技术工业化应用的适用性原则…… 424
二、分子蒸馏技术在工业化应用中的作用…… 424
三、分子蒸馏工业化应用领域…… 426
第五节　分子蒸馏技术在食品工业上的应用实例…… 426
一、分子蒸馏生产单甘酯…… 427
二、天然维生素 E 的提取…… 429
三、从鱼油中提取纯化 DHA、EPA …… 431
四、α-亚麻酸提取技术…… 434
五、高碳脂肪醇的精制…… 434
六、小麦胚芽油的制取…… 435
七、辣椒红色素提取技术…… 436

第六节　分子蒸馏技术工业化应用前景展望…… 437
一、我国分子蒸馏技术工业化应用存在的问题与对策…… 437
二、我国分子蒸馏技术工业化应用前景分析…… 437
主要参考文献…… 439

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，是以生命科学为基础，运用工程学的原理，利用生物体系（完整的生物个体、组织、细胞、组成成分及其代谢产物）提供产品或服务的一种综合性的新型科学技术。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）或重组DNA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）基因工程的工具酶

在DNA重组过程中，DNA片段的位点特异性切割与连接是最基本的操作。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（Endodeoxyribonuclease）。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 在双链上识别相同的序列　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：

需要全本请访问 www.ertongbook.com

Mbo Ⅰ： 5′-GATC-3′

Asu Ⅰ： 5′-GGACC-3′

Hind Ⅲ： 5′-AAGCTT-3′

③ 切割后形成各种黏性末端或平整末端　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：黏性末端和平整末端。

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，称为黏性末端(Cohesion ends)，例如，EcoR Ⅰ的切割形成黏性末端（图 1.1）。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 Alu Ⅰ切割后形成平整末端（图 1.1）：

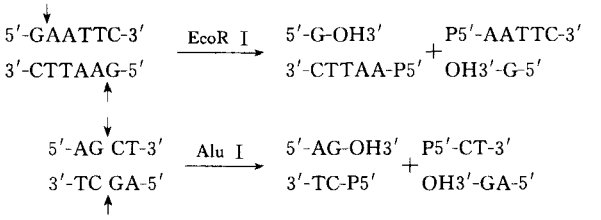


图 1.1　限制性核酸内切酶降解 DNA 形成黏性末端和平整末端

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，被称为同功酶（Isoschizomer）。同功酶可具有相同的酶切位点，例如 HhaⅠ和 CtoⅠ(-GC′GC-)，也可以具有不同的酶切位点，例如 SmaⅠ(-CCC′GGG-) 和 XmaⅠ(-′CCCGGG-)。

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黏性末端。例如 BamHI、BglⅡ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 黏性末端。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。

（2）DNA 核酸外切酶　这是一类以脱氧核糖核酸（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，以满足使用的需要；当获得的 DNA 片断为平整末端时，为使它变成黏性末端，可以采用从 5′-末端或 3′-末端作用的 DNA 外切酶，以获得所需的带有黏性末端的 DNA 片断，以利于体外重组 DNA。

（3）自我剪切酶　自我剪切酶（Self-cleavage ribozyme）是一类催化本身 RNA 分子进行剪切反应的核酸类酶。具有自我剪切功能的 R 酶 RNA 的前体。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。

1984 年，Apirion 发现 T_4 噬菌体 RNA 前体可以进行自我剪切，将含有 215 个核苷酸的前体剪切成为含 139 个核苷酸的成熟 RNA 和另一个 76 个核苷酸的片断。

已发现的具有自我剪切功能的 R 酶越来越多，通过自我剪切酶对自身 RNA 的剪切作用，可以获得各种所需的 RNA 或多聚核苷酸。

(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 M1RNA 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 C5 蛋白并无催化活性。M1RNA 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 T_4-DNA 连接酶和大肠杆菌 DNA 连接酶。

(1) T_4-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黏性末端的连接反应，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端的连接反应。同时，该酶需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 作为辅助因子，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，首先由 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。

(2) 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。

(3) Sl 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 Sl 可使这些“发夹状环”除去。

(4) T_4 多核苷酸磷酸激酶　T_4 多核苷酸磷酸激酶催化 ATP 上的 γ-磷酸转移至 DNA 或 RNA 的 5′-OH 上，其中包括两种反应。

① 磷酸激酶的正向反应　将 ATP 的 γ-磷酸基因转移到单链或双链 DNA 或 RNA 的 5′端游离羟基上，催化 5′突出末端的磷酸化速度比平头末端和 5′凹端快得多，但是，只要有足够量的酶和 ATP 存在，后两种末端也能得到完全磷酸化。

② 磷酸激酶的交换反应　在过量的 ADP 存在下，可将单链 DNA 或 RNA 的 5′端磷酸基团转移至 ADP 上形成 ATP，同时从 (γ-^{32}P) ATP 中获得放射性 γ-磷酸基团，使单链 DNA 或 RNA 的 5′端重新磷酸化，这个反应常用于核酸杂交探针的同位素标记。

(5) 末端脱氧核苷酸转移酶 (TDT)　末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotide transferase，TDT) 来源于小牛胸腺，是一种不需要模板的 DNA 聚合酶，其合适的底物形式为带有 3′游离羟基的双链 DNA 分子。其作用是向 DNA 的 3′-OH 末端转移脱氧核苷酸。在基因工程中利用该酶给 DNA 片断加上一段同聚体，形成附加末端。采用^{32}P 或者荧光标记的脱氧核苷酸进行 3′-末端标记，以便于 DNA 的分离检测。另外，TDT 酶在人工黏性末端的构建中极有用处。

(6) 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 1.2 所示。

1. 带有目的基因的 DNA 片段的形成

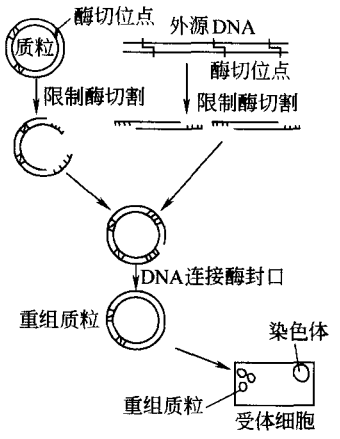


图 1.2　基因工程的基本过程

在基因工程中，首先是按照人们预先设计的蓝图，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以下途径，一是从已有的生物基因组中分离；二是人工合成。

(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。

① 限制酶法　此法是采用基因工程手段把染色体 DNA 用限制性内切酶切割，将所有片断都连接到某种载体上，转入大肠杆菌 (*E. coli*) 中增殖，再用适当方法来筛选出该基因的重组体菌落，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。

在基因工程经常使用的一种叫鸟枪法 (Shoot gun)，其基

本步骤是：将含有目的基因的全 DNA 用限制性内切酶切割；使获得的 DNA 片段插入到载体中；转化大肠杆菌；分离无性繁殖系，形成基因库；用目的基因的转录产物（RNA）做探针，通过菌落杂交技术筛选出含有该基因的菌落。应用这种方法，曾分离过蚕丝蛋白、鸡卵蛋白、人生长激素、人生长催乳激素的基因片段等基因。

② mRNA 或 cDNA 钓取法　这种方法是利用 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，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。1976 年，威斯曼（Weissman）就是利用这种方法获得了珠蛋白基因片段。

③ 分离法　有一些基因在碱基组成上与总体 DNA 有明显的区别，所以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 或 Cs_2SO_4 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。利用这种方法曾分离出了第一个真核基因——南非爪蟾核糖体 RNA 基因。

（2）人工合成法　人工合成带有目的基因的 DNA 片段有两种方法：酶促合成法和化学合成法。

① 酶促合成法　酶促合成法是以 mRNA 为模板，用逆转录酶合成全长或接近全长的 cDNA，然后进行克隆。这是获得真核基因的常用方法。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）顺序这一原理，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。

② 化学合成法　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，采用磷酸二酯法或磷酸三酯法，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。1972 年，霍拉纳（Khorana）等人采用化学法首次合成了含 77 个碱基对的酵母丙氨酸 tRNA 的结构基因。

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。

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），就必须考虑如何将目的基因引入受体细胞，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）提供可选择标记，可供辨认的表形特征，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，是把不同来源的 DNA 重新组合，这个过程也称为基因重组，这种重组过程由 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。

(1) DNA 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。

(2) DNA 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黏性末端。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：黏末端法、接尾法和人工接头法。

3. 重组子导入受体细胞

在体外完成 DNA 重组后，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）。自然的转化常发生在生长的特殊阶段（如稳定期），并且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，必须人为地诱导像大肠杆菌这样的受体细胞进入感受态，主要采取化学处理和电击法两种途径。

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。

(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 ^{32}P 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。

上述扩增操作比较繁杂。1983 年建立了体外扩增 DNA 片段的方法，即聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction，PCR）技术。采用这种方法，在反应系统中只要有一个拷贝待扩增的 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一倍，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。

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），甚至进而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以及维持重组蛋白的特异性空间构象。

目前使用的受体系统有大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母菌、丝状真菌和动物细胞等。大肠杆菌表达体系研究较深入，是最早得到应用的表达体系。

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. 动物基因工程

多年以来，杂交选择一直是改良家畜和家禽的遗传特性的主要途径。随着现代生物技术的发展，传统的杂交选择法的各种缺陷日益明显，而现代分子育种技术却显示出越来越强大的生命力，逐渐成为动物育种的趋势和主流。

动物转基因技术是以基因工程、细胞工程和胚胎工程为基础，将外源基因导入动物的基因组并获得表达，以实现动物种间遗传物质的交换，获得动物性状的改良或新性状。由此产生的动物称为转基因动物（Transgenic animal）。

（1）转基因家畜　获得产奶量更大、生长更快的优秀品种是转基因家畜研究的重要目的之一。由于家畜的很多性状，如育性、生长速度、产奶量等都受到激素的调节，因此，很多转基因动物中转入的都是能够提高激素水平的基因。牛生长激素（Bovine growth hormone，BGH）基因是最早投入使用的转入基因之一。通过基因工程的手段，利用大肠杆菌大量生产牛生长激素，然后将分离纯化得到的牛生长激素注射到牛体内。在不增加饲料消耗的情况下，牛的产奶量提高 15%～20%。应用基因工程技术生产某些畜用激素已批量生产，但是由于注射到牛体内的 BGH 会不断分解，因此需要经常注射，这无疑大大提高了饲养的成本。由此，研究人员想到了更直接的解决方法，即将超量表达的牛生长激素基因转入牛体内，培育转基因牛，提高产量，减少消耗。

进行转基因牛研究的另一个重要用途是改变牛奶的成分。在生产干酪时，乳酪的产量与牛奶中酪蛋白的含量直接相关，转入一个超量表达的 κ-酪蛋白基因应该能够增加 κ-酪蛋白

需要全本请访问 www.ertongbook.com